

# POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale  
in Ingegneria dei Materiali**

Tesi di Laurea Magistrale

## **Studio di sistemi per il rilascio controllato di principi attivi da tessuti**



### **Relatori**

*firma del relatore dei relatori*

Prof.ssa Ada Ferri

.....

Prof. Antonello Barresi

.....

### **Candidato**

*firma del candidato*

Matteo Baudino

.....

Dicembre 2017



## Introduzione

Il lavoro che verrà presentato nelle seguenti pagine ha avuto come tema principale lo studio bibliografico e sperimentale di sistemi transdermici a rilascio controllato di farmaco: in parallelo alla ricerca teorica, è stata eseguita sperimentalmente la funzionalizzazione di tessuti di varie tipologie di fibre organiche con carrier nanometrici di policaprolattone contenenti caffeina, con una successiva caratterizzazione del rilascio in vitro. Questa seconda parte del lavoro ha avuto come obiettivo la messa a punto dei relativi protocolli sperimentali, indagando le variabili e le problematiche in gioco.

La ricerca, pertanto, si è articolata in due fasi distinte ma strettamente legate tra di loro: in un primo momento si è svolto uno studio bibliografico relativo ai sistemi a rilascio di farmaco (*controlled drug delivery systems*), focalizzando l'attenzione sulle tecnologie riguardanti i tessuti funzionalizzati con carrier polimerici per applicazioni transdermiche. I temi analizzati sono stati i principi di farmacocinetica relativi alla cute umana, il funzionamento e l'evoluzione tecnologica dei sistemi transdermici a rilascio controllato di farmaco, i principi relativi alle tecnologie di preparazione e funzionalizzazione dei tessuti, i carrier polimerici più utilizzati nelle ricerche in questo ambito e le metodologie sperimentali per caratterizzare a livello qualitativo e quantitativo un rilascio controllato transdermico. In queste sezioni si è posta particolare attenzione alle tematiche e alle tecniche sperimentali che sono state poi utilizzate nelle analisi sperimentali, presentate nella seconda parte del lavoro.

Le attività di laboratorio, svolte nelle strutture del Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia del Politecnico di Torino e nella sede distaccata di Biella, sono state pianificate per lo studio preliminare di tessuti funzionalizzati con carrier polimerici per un rilascio controllato di farmaco. La funzionalizzazione è stata eseguita nelle medesime condizioni per tre tipologie di tessuti: il primo contenente il 100% di fibre di cotone, il secondo 50% di fibre di cotone e 50% di fibre di viscosa e il terzo campione costituito completamente da viscosa. I tre materiali hanno subito un pretrattamento nel laboratorio della sede di Biella del Politecnico di Torino, mentre la produzione dei carrier, la funzionalizzazione dei supporti, il rilascio e le relative analisi sono state svolte presso i laboratori di Torino. Come molecola utilizzata per il rilascio controllato si è adottata la caffeina, che come vedremo è stata ampiamente adoperata come sonda per queste tipologie di studi: per poter confrontare in modo completo il comportamento dei tre tessuti, un set di campioni è stato funzionalizzato con caffeina pura, mentre un secondo con una sospensione di nanoparticelle di policaprolattone contenente caffeina. I due gruppi di tessuti sono stati poi sottoposti a cicli di rilascio controllato in vitro utilizzando le celle di Franz, uno strumento in grado di simulare il rilascio transdermico: tramite prelievi nel tempo e analisi spettrofotometrica delle soluzioni recettrici, si sono poi elaborate le curve cinetiche di diffusione della caffeina a partire dai relativi cerotti. Da un'analisi dei dati raccolti è pertanto stato possibile effettuare un confronto dei sistemi prodotti, tenendo conto dei parametri in gioco.



## Indice

<b>1. Sistemi a rilascio controllato di farmaco: aspetti teorici e sperimentali .....</b>	<b>7</b>
1.1 Principi di farmacocinetica .....	7
1.2 Cerotti medicati.....	14
1.3 La caffeina.....	18
1.4 Tessuti funzionalizzati .....	19
1.4.2 Carrier polimerici per i principi attivi.....	21
1.4.3 Funzionalizzazione dei tessuti .....	26
1.4.4 Il cotone e la viscosa.....	35
1.4.5 Simulazione e quantificazione del rilascio.....	37
<b>2. Materiali e metodi .....</b>	<b>39</b>
2.2 Pretrattamento tessuti.....	39
2.2.1 Trattamenti di <i>desizing</i> e <i>scouring</i> .....	39
2.2.2 Test della goccia .....	41
2.3 I sistemi liquidi per la funzionalizzazione superficiale dei tessuti.....	42
2.3.2 Analisi con DLS.....	42
2.3.3 Analisi con spettrometria UV .....	42
2.4 Imbibizione dei tessuti .....	43
2.5 Rilascio di caffeina da tessuti funzionalizzati .....	44
2.6 Tampone fosfato salino - PBS.....	45
<b>3. Risultati e discussioni.....</b>	<b>47</b>
3.1 Pretrattamento tessuti.....	47
3.1.1 Composizione soluzioni di <i>desizing</i> e <i>scouring</i> .....	47
3.1.2 Test della goccia .....	48
3.2 Funzionalizzazione dei tessuti.....	49
3.2.1 Nanoparticelle senza caffeina .....	49
3.2.2 Nanoparticelle con caffeina .....	49
3.3.2 Imbibizione dei tessuti .....	50
3.2.3 Commenti.....	50

3.3 Simulazione di rilascio transdermico con celle di Franz.....	51
3.3.1 Caratterizzazione delle membrane cellulosiche.....	51
3.3.2 Rilascio da tessuti con caffeina libera.....	52
3.3.3 Rilascio da tessuti con caffeina in nanoparticelle.....	54
3.3.4 Bilanci di materia.....	56
3.3.5 Commenti.....	57
<b>4. Conclusioni.....</b>	<b>59</b>
<b>Riferimenti bibliografici e sitografici .....</b>	<b>I</b>
<b>Appendice.....</b>	<b>XI</b>

# 1. Sistemi a rilascio controllato di farmaco: aspetti teorici e sperimentali

## 1.1 Principi di farmacocinetica

Nel primo capitolo di questo lavoro verranno esplorate le tecniche di rilascio controllato di farmaco, in inglese *drug delivery* (nozioni generali tratte da [1 - pp. 25-45]), passando in rassegna quelle già affermate in ambito biomedicale e quelle in corso di studio. Come vedremo nel dettaglio, le tecniche di drug delivery consentono un maggiore controllo quantitativo e spaziale nella somministrazione e assorbimento di principi attivi.

Un *medicinale* (o farmaco) [2] è una sostanza o associazione di sostanze differenti in grado di prevenire o curare una malattia, ripristinare, correggere, inibire o incentivare una funzionalità di un organo o tessuto. Secondo l'Agenzia Italiana del Farmaco [3], rientrano nella definizione di farmaco anche le sostanze chimiche somministrate allo scopo di stabilire una diagnosi medica (ad esempio i mezzi di contrasto impiegati nella risonanza magnetica) o per ripristinare, correggere o modificare funzioni fisiologiche, senza che vi sia alcuna malattia da curare (ad esempio la pillola contraccettiva prescritta per impedire l'ovulazione).

In generale, un farmaco è composto da due parti:

- Il *principio attivo*, costituito dalla sostanza che agisce in maniera terapeutica sulle cellule dell'essere vivente interessato;
- Gli *eccipienti*, sostanze con scopo protettivo, veicolatore e promotore dell'assorbimento indirettamente coinvolte nell'azione farmacologica. [3]

Una classificazione dei farmaci può anche essere effettuata in funzione della localizzazione degli effetti sull'organismo [4]:

- Farmaci *ad azione topica*, se in grado di agire nella zona limitrofa a quella di applicazione - tipicamente cutanea;
- Farmaci *ad azione sistemica*, se invece è necessario il suo ingresso in circolo tramite il sistema cardiovascolare, per poter poi svolgere la sua funzione;
- Farmaci *ad azione elettiva*, se in grado di agire selettivamente su cellule specifiche.

I farmaci ad azione sistemica si suddividono a loro volta in due classi dipendenti dalla via di somministrazione:

- Farmaci per via *enterale*, che vengono somministrati mediante un assorbimento dal sistema gastrointestinale (vie orale, sublinguale o rettale/vaginale): presentano economicità, semplicità e rapidità di assunzione (in particolare nei caso sublinguale e rettale), e vedono un'elevata superficie di assorbimento; gli svantaggi riguardano la possibile ridotta efficienza in funzione dell'assorbimento a opera di organi non interessati dall'azione farmacologica, che possono causare un effetto di primo passaggio [5] (in particolare nel caso orale, praticamente assente in quello sublinguale), un'irritazione delle vie di assorbimento, una velocità di azione bassa (soprattutto relativamente a casi di emergenza), una possibile interazione con il cibo in fase di digestione e una dose assumibile tipicamente limitata.
- Farmaci per via *parentale*, che non necessitano di un assorbimento dal sistema gastrointestinale ma raggiungono direttamente il circolo sanguigno tramite il sistema cardiocircolatorio o respiratorio (vie intravascolare, intramuscolare, sottocutanea o per inalazione). Nel caso siano coinvolte iniezioni, i vantaggi riguardano tipicamente l'immediata immissione in circolo del farmaco, in seguito a una iniezione localizzata, e il quantitativo di dose che tecnicamente può

essere illimitato e mantenuto costante nel tempo (come per esempio nel caso delle flebo); gli svantaggi invece si riscontrano nel rapido raggiungimento di alti valori di concentrazione sanguigna del principio attivo (con possibile superamento delle soglie tollerabili), possibile dolore al momento dell'iniezione, rischio di emboli e infezioni. Nel secondo caso, che non prevede l'utilizzo di iniezioni per l'assorbimento del principio attivo, esso viene assorbito dall'organismo tramite le vie respiratorie, come nel caso dell'aerosol: l'immissione in circolo è abbastanza rapida e l'effetto di primo passaggio è limitato, ma le dosi trattabili possono non essere elevate e solo alcuni farmaci possono essere somministrati tramite questa via (tipicamente utilizzata proprio per curare disturbi dell'apparato respiratorio). L'efficienza di trasporto del principio attivo nell'albero bronchiale, ad esempio, è determinata dalle dimensioni delle gocce nel quale è sciolto.

I farmaci ad azione topica (o locale), vedono un loro assorbimento a seguito della loro applicazione sulla pelle o sulle membrane mucose interessate, con conseguente diffusione e trasporto regolati dal gradiente di concentrazione tra ambiente interno ed esterno. I principi attivi sono tipicamente contenuti in oli, creme o nella matrice di un cerotto: i vantaggi sono relativi alla elevata localizzazione dell'applicazione (selettività spaziale - come nel caso di un analgesico applicato dove si ha la percezione del dolore), alla costanza nel tempo dei livelli sanguinei del principio attivo rilasciato, al limitato effetto di accumulo, all'assenza di picchi nella dose e dell'effetto di primo passaggio tramite la via gastrointestinale (entrando lentamente in circolo in seguito al loro accumulo negli strati più interni della pelle), alla assenza di strumentazioni per il dosaggio talvolta ingombranti, alla comodità di utilizzo (anche nel caso di cicli di applicazione ripetitivi) e alla relativa economicità; gli svantaggi risiedono nella bassa azione sistemica, nel limitato quantitativo di principio attivo contenibile, nella necessità di bassi pesi molecolari dei principi attivi (per via della diffusione attraverso l'epidermide), nei requisiti di affinità rispetto ai siti cutanei interessati (con i relativi comportamenti nei confronti di sostanze organiche o inorganiche, polari o apolari - come vedremo in una sezione successiva) e negli elevati tempi di azione del farmaco. [6] Come approfondiremo in seguito, questa ultima osservazione può risultare utile nel caso in cui sia necessaria una somministrazione caratterizzata da dosi limitate e pressoché costanti per svariate ore. Inoltre, le applicazioni transdermiche sono particolarmente vantaggiose per i pazienti affetti da disturbi cronici, che necessiterebbero di assunzioni periodiche e invasive di farmaci per via orale o endovenosa, e anche per chi soffre di sensibilità gastrointestinale o non può ricevere punture o flebo.

La concentrazione di principio attivo assunto dall'organismo presenta un andamento caratteristico nel tempo, con un intervallo di latenza iniziale (prima del quale non si ha insorgenza di alcun effetto), seguito da un incremento verso un valore massimo, e un decremento finale fino a un valore nullo nella fase di eliminazione [7]: tale concentrazione influenza in modo diretto l'azione farmacologica della sostanza assunta dal paziente. Tipicamente, oltre un certo livello di soglia di concentrazione locale o sistemica possono insorgere problemi di tossicità: essi possono essere diretti nelle funzionalità interessate, o indiretti nei confronti di altri organi o tessuti. La tossicità può verificarsi anche dopo un certo numero di somministrazioni di dosi non tossiche ma ravvicinate nel tempo, per via di un accumulo del principio attivo prima della sua completa eliminazione dall'organismo. Un principio attivo sarà pertanto efficace nei limiti di concentrazione definiti da una *finestra terapeutica*, delimitata dalla concentrazione minima, in grado di fornire i voluti effetti terapeutici, e una massima corrispondente al livello di tossicità.

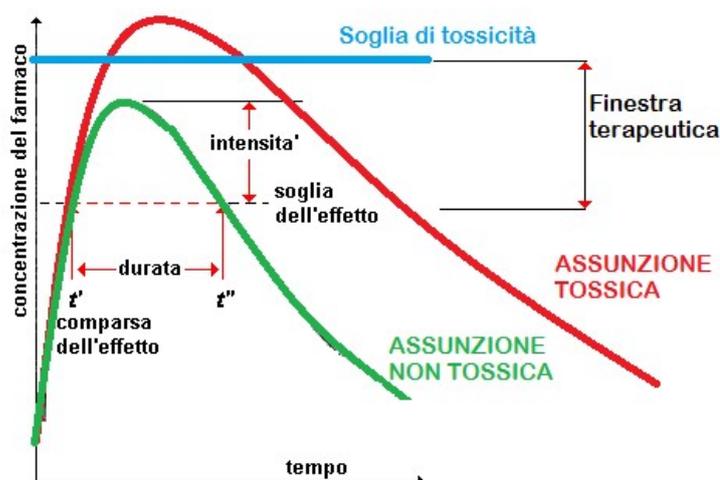


Fig.1.1 - Andamento temporale della concentrazione sanguigna di principio attivo (grafico adattato da [1 - p. 26])

La *farmacocinetica* [8] è quel ramo della farmacologia che studia quantitativamente la variazione della concentrazione nel tempo di un principio attivo in un essere vivente. Attraverso gli studi farmacocinetici è possibile correlare un'azione farmacologica alla relativa funzione fisiologica interessata, tramite uno studio della dose, della via di somministrazione e delle tempistiche delle varie fasi di azione del principio attivo. Un parametro molto importante è costituito dall'*emivita* di una molecola, che indica il tempo necessario al dimezzamento della sua concentrazione nei fluidi corporei, e quindi relativo all'effetto farmacologico di tale molecola: nel caso di un'emivita troppo breve si avrà il rischio di un effetto limitato nel tempo e non sufficiente a sopperire alla necessità richiesta dal farmaco.

Le fasi principali dell'azione farmacologica sono fortemente influenzati dalle proprietà chimiche e fisiche del farmaco, e comprendono l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo (o biotrasformazione, avviene principalmente nel fegato e in parte in polmoni, intestino e reni) e l'eliminazione attraverso le urine, la bile, le feci, la saliva, l'aria espirata il sudore. Nella fase di assorbimento, il picco massimo di concentrazione del principio attivo è fortemente legato alla velocità di tale processo, in quanto con un rapido assorbimento, il picco si manifesta più precocemente. Un altro fattore importante nell'azione farmacologica è la *biodisponibilità*, ovvero la frazione di farmaco non modificato che raggiunge la circolazione sistemica a seguito di una somministrazione attraverso una delle vie prima elencate; come prima spiegato, nel caso di un effetto di primo passaggio si avrà una riduzione della biodisponibilità.

La dose di assunzione di un farmaco necessaria a un paziente dipende dalle sue condizioni psicofisiche, e si potrà avere il compimento dell'azione desiderata o l'insorgere di effetti collaterali: ciò potrà avvenire in funzione del suo stato di salute, dell'età del sesso, del peso, della concomitanza con altre cure farmacologiche - taluni farmaci, se assunti in concomitanza di altri, possono agire incentivando, inibendo o rallentando le azioni reciproche. Per limitare l'insorgenza e gli effetti negativi di queste problematiche, negli ultimi anni hanno subito un forte sviluppo le tecniche farmacologiche o cosmetiche che sfruttano il rilascio controllato di farmaco, una frontiera innovativa nell'ambito medico: esse riguardano il controllo dell'immagazzinamento e del trasporto di principi attivi verso siti specifici all'interno del corpo umano, rendendo più costante la concentrazione sanguigna del principio attivo interessato.

L'utilizzo di *carrier*, tipicamente polimerici, ha potuto portare una soluzione a queste necessità: essi sono sistemi in grado di contenere e rilasciare nel tempo la molecola interessata - un esempio di carrier macroscopico e dalla tecnologia non avanzata sono le compresse gastroresistenti o le supposte; il rilascio può essere effettuato all'interno del corpo, nel caso in cui il carrier vada in

circolo (e tale rilascio può essere a sua volta mirato o meno), oppure può avvenire a livello cutaneo, svolgendo prettamente una funzione di immagazzinamento prima del rilascio: nel caso analizzato dal presente lavoro, si studierà la funzionalizzazione di vari tessuti con sistemi nanometrici volti a un controllo di rilascio del farmaco per via transdermica.

I carrier per il drug delivery possono essere classificati in base alla loro morfologia (tipicamente sferica, ad ago, a guscio), alla tempistica di utilizzo (permanenti o temporanei) e alla dimensione. In quest'ultimo caso si distinguono:

- sistemi *macrometrici* (dimensione caratteristica maggiore di 1 mm), quali innesti vascolari e stent - tubolari applicati nei vasi interessati;
- sistemi *micrometrici* (dimensione caratteristica tra 100  $\mu\text{m}$  e 0.1  $\mu\text{m}$ ), che comprendono innesti o aggregati di scala inferiore al millimetro;
- sistemi *nanometrici* (dimensione caratteristica tra 1 nm e 100 nm), come liposomi, micelle e sistemi sintetici di nanoparticelle.

Come precedentemente accennato, i sistemi di rilascio controllato di farmaco sono volti a superare i limiti presenti nelle normali modalità di assunzione farmacologica, quali quella orale o venosa, relativi alla dose, alla modalità e alla via di somministrazione: incremento iniziale e istantaneo di concentrazione del principio attivo nel sangue (con possibile sovradosaggio e tossicità), non costanza della concentrazione sanguinea, necessità di assunzione periodica ed eventualmente invasiva, ridotta selettività dell'azione farmacologica. Gli scopi principali delle tecniche che sfruttano il drug delivery riguardano pertanto la selettività cellulare dell'azione biologica del principio attivo, con un conseguente aumento dell'efficacia del trattamento, la semplificazione delle modalità di assunzione da parte del paziente, il controllo della cinetica e del quantitativo rilasciato, la riduzione degli effetti collaterali (invasività e sovradosaggio - non riportato in Fig.1.2) tramite un controllo spaziale e temporale della concentrazione di farmaco assunta dall'organismo.

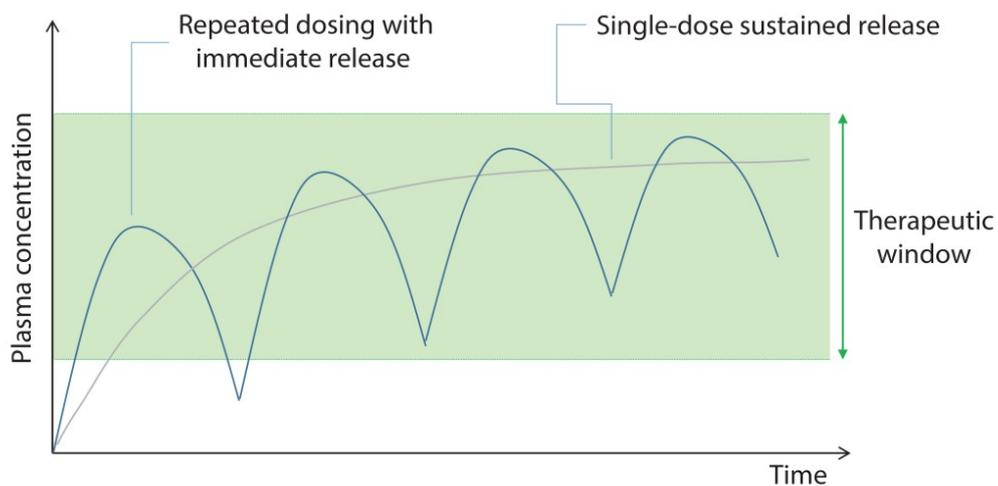


Fig. 1.2 - Generiche variazioni temporali della concentrazione sanguigna di un principio attivo somministrato tramite due modalità: pulsata (es. una serie di iniezioni) o controllata (es. un sistema di drug delivery) [1]

I sistemi a rilascio controllato di farmaco per via topica, e in particolare cutanea, sono una delle pratiche più comuni e diffuse di drug delivery. Una pratica comune fin dall'antichità riguarda l'uso di creme e unguenti depositate sulla pelle a scopo medicale o estetico: i principi attivi interessati vengono assorbiti gradualmente negli strati cutanei, insieme alla restante composizione della

crema, per dare un effetto principalmente locale. Negli ultimi anni hanno trovato sviluppo anche dispositivi oftalmici a rilascio controllato di farmaco, quali Lacrisert® (per il trattamento della secchezza oculare [9]), Ocusert® (per il trattamento del glaucoma [10]), Ozurdex® (impianto a rilascio di farmaco antinfiammatorio [11]).

I vantaggi dell'utilizzo di unguenti e creme funzionalizzate con principi attivi risiede nelle tempistiche di assorbimento di tali sistemi, che vedono un loro iniziale accumulo negli strati più esterni dell'epidermide, contemporaneamente all'allontanamento di sostanze volatili quali l'acqua, per poi essere assorbiti negli strati sottostanti del derma ed eventualmente distribuiti dal sistema cardiovascolare: in questo modo la concentrazione locale e sanguigna dei composti utilizzati si mantiene costante per un tempo anche elevato, e può essere rapidamente incrementata da un'ulteriore applicazione cutanea. Un'evoluzione dei sistemi transdermici a base di creme consiste nei cerotti medicati, ovvero sistemi macroscopici contenenti un principio attivo immobilizzato in una membrana o un tessuto che sarà a diretto contatto con la pelle; uno dei vantaggi dell'uso di questa tecnologia, è che sono i materiali del cerotto a controllare direttamente la diffusione della molecola interessata sulla pelle. Nella sezione successiva analizzeremo più nel dettaglio l'evoluzione di questi strumenti medici.

La cute [12, 7] fa parte dell'apparato tegumentario, contenente anche le ghiandole mammarie e gli annessi cutanei (peli, unghie, ghiandole sebacee e sudoripare): essa riveste quasi integralmente il corpo umano, pertanto svolge le principali funzioni di protezione e comunicazione tra il primo e l'ambiente esterno (tramite liquidi e gas). La sua estensione superficiale può arrivare fino a 2 m<sup>2</sup> e riceve circa un terzo del flusso ematico, pertanto risulta evidente la sua importanza in numerosi processi fisiologici quali la termoregolazione (che coinvolge fenomeni come la vasodilatazione o vasoconstrizione superficiali e la secrezione di sudore) e la sensibilità cutanea, risposta nervosa in relazione a stimoli esterni dovuti alla variazione di condizioni ambientali (come l'idratazione o il contatto con agenti chimici). La cute è caratterizzata da vari strati, il cui spessore varia in relazione alla sua localizzazione nel corpo e ai parametri fisiologici dell'individuo considerato. La struttura cutanea, rappresentata in Fig. 1.3, si compone pertanto di:

- *Epidermide*: di spessore variabile tra 0.5 mm a 1.5 mm, esso è costituito da vari strati caratterizzati da specifiche cellule formanti un tessuto epiteliale. Esse sono interessate da funzioni strutturali, pigmentarie, immunitarie, sensoriali, di assorbimento, secrezione e trasporto.
- *Derma*: di spessore maggiore rispetto al derma, tra 0.3 mm e 4 mm, è costituito da cellule formanti un tessuto connettivo, caratterizzate da buone proprietà strutturali. A differenza del primo è molto vascolarizzato, pertanto questo strato è in grado di fornire i nutrienti necessari a quello sovrastante.
- *Ipoderma* (tessuto sottocutaneo): formato da cellule di adipociti aggregate in spessori variabili e tipicamente superiori ai 2 mm, ha prevalentemente funzioni protettive (a livello termico e meccanico) e di riserva energetica.

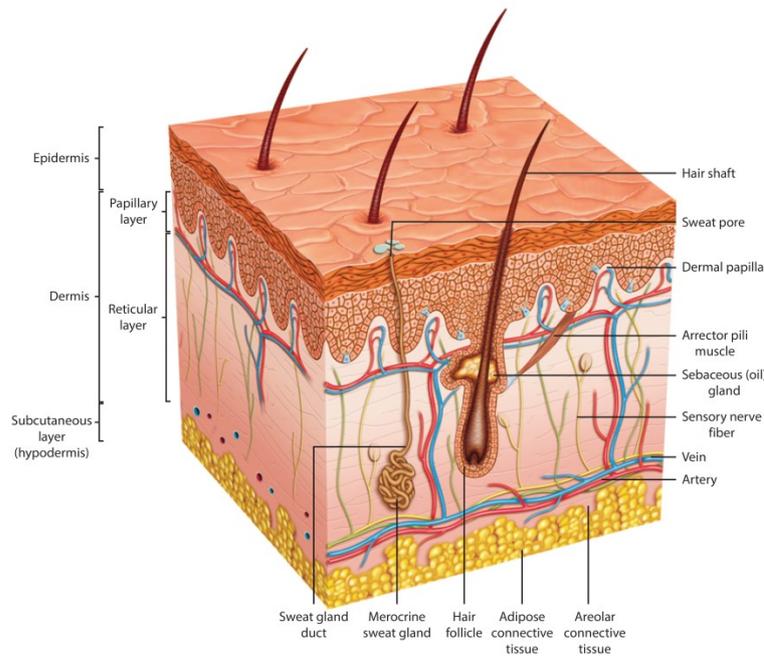


Fig. 1.3 - Schema rappresentativo dei vari strati cutanei [1]

Lo strato esterno dell'epidermide, denominato *strato corneo*, presenta una barriera alla diffusione dei principi attivi potenzialmente a contatto con esso, permettendo il trasporto di sostanze negli spazi tra le cellule o attraverso di esse (*diffusione passiva*); la penetrazione diretta di una sostanza (ad esempio contenuta in un unguento o in una crema) avviene lungo i canali costituiti dai follicoli piliferi, dalle ghiandole sudoripare o sebacee (*diffusione attiva*), ma tali sistemi costituiscono soltanto l'1% dell'intera superficie cutanea.

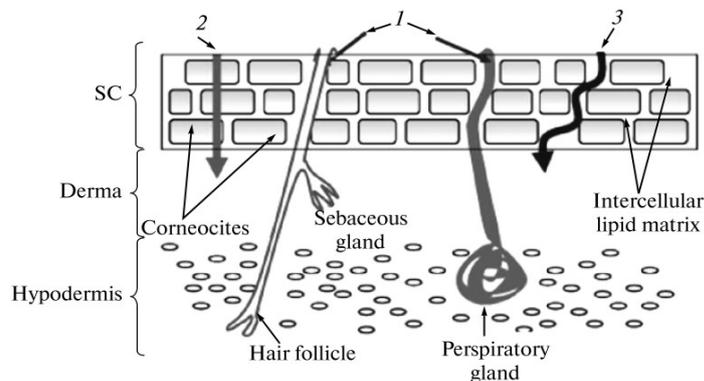


Fig. 1.4 - Schema rappresentativo delle tre vie di penetrazione cutanea: 1) penetrazione attraverso follicoli o ghiandole; 2) penetrazione intracellulare; 3) penetrazione intercellulare [6, 7]

Fissata la dose superficiale di farmaco posta sulla pelle, il suo assorbimento dipenderà da numerosi fattori - sovente interdipendenti:

- la tipologia, l'estensione, il pH e la temperatura del sito interessato (in alcuni casi certi sistemi sono adatti al funzionamento solo in zone specifiche, caratterizzate da determinati parametri cutanei);
- il tempo di applicazione;

- il livello di irrorazione sanguinea, di vasodilatazione e di idratazione cutanea - che incentiva l'assorbimento delle sostanze idrosolubili (con l'utilizzo di cerotti, inoltre, si ha un aumento del livello di idratazione in corrispondenza della pelle coperta dalle membrane funzionalizzate);
- l'eventuale apertura o chiusura dei pori superficiali;
- le proprietà della cute interessata - quali lo spessore dei vari strati o il contenuto di melanina (determinante il fototipo di un soggetto) -, dipendenti da fattori come l'età, il sesso e lo stato di salute;
- il peso molecolare delle sostanze diffondenti (comprehensive dei principi attivi e dei sistemi adottati per il loro trasporto, quali polimeri nelle creme o dei carrier) - molecole ad alto peso molecolare tenderanno a diffondere tramite la via diretta, avendo solubilità limitata nelle membrane cellulari. In generale, un farmaco per applicazioni transdermiche deve possedere un peso molecolare inferiore ai 500 Da [13] ed essere efficace a basse dosi;
- l'interazione tra le sostanze diffondenti e l'area della pelle interessata, caratterizzata da specifiche proprietà chimico-fisiche - principalmente l'affinità nei confronti dell'acqua o dei grassi: alcune molecole possono promuovere l'assorbimento del principio attivo, reagendo con esso e/o con la pelle.

In quest'ultimo caso, va considerata la polarità delle sostanze depositate sulla pelle: delle tre vie elencate in Fig. 1.4, la via di penetrazione che interessa i follicoli piliferi, le ghiandole sudoripare e sebacee riguarda principalmente sostanze lipofile, mentre le rimanenti due tipicamente sono atte al trasporto di sostanze non lipofile. In linea di massima, è necessario che il farmaco presenti proprietà intermedie, vista l'eterogeneità delle vie diffusive - caratterizzate da varie parti con diverse caratteristiche. Nel corrente studio è stata utilizzata la caffeina come principio attivo per la funzionalizzazione delle fibre trattate: come vedremo nella sezione dedicata a questa molecola organica essa presenta un comportamento sia idrofilo che lipofilo.

Come prima accennato, la diffusione di un farmaco dall'epidermide è complessiva di tre fenomeni, due di tipo passivo e uno di tipo attivo. Vari studi [14, 15] hanno cercato di modellizzare la diffusione attraverso la cute - tramite i risultati ottenuti da Adolf Fick nel 1855 -, elaborando equazioni in grado di predire i rilasci nel tempo: le problematiche maggiori si sono evidenziate nella enorme complessità del sistema cute umana, nella variabilità dei materiali interessati (pelle o prodotti artificiali, come membrane polimeriche) e nella relativa interazione con le molecole diffondenti. Una delle prime, e più semplificate, equazioni proposte fu quella elaborata da Takeru Higuchi nel 1961 [15], ricavata studiando il rilascio di un principio attivo da un sottile strato oleoso posto sulla pelle. Da questo studio sono state poi ricavate relazioni più complesse che includono altri aspetti del fenomeno. L'equazione proposta per la velocità di assorbimento è la seguente:

$$(1) \quad \frac{dQ}{dt} = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{D(2A-C_s)C_s}{t}}$$

dove  $dQ/dt$  è la velocità di assorbimento del principio attivo (esprimibile ad esempio in  $mg/cm^2 \cdot s$ ),  $A$  la concentrazione volumica di principio attivo presente nell'unguento (esprimibile ad esempio in  $mg/cm^3$ ),  $C_s$  la solubilità del principio attivo nell'unguento (esprimibile in  $mg/cm^3$ ),  $D$  il coefficiente di diffusione del principio attivo nell'unguento (esprimibile in  $cm^2/s$ ). Nel caso generico di un unguento, dove la concentrazione della specie diffondente nella sospensione è molto maggiore della sua solubilità, il medesimo studio propone la seguente semplificazione:

$$(2) \quad \frac{dQ}{dt} = \frac{A \cdot D \cdot C_s}{2t}$$

Riportiamo una versione modificata [7] e adattata al trasporto attraverso l'epidermide tramite le tre vie diffusive elencate precedentemente:

$$(3) \quad \frac{dq}{dt} = \frac{R \cdot D_s \cdot A \cdot S}{h}$$

dove  $q$  è il quantitativo in massa di principio attivo assorbito (esprimibile in  $mg$ ) differenziato nel tempo  $t$  (esprimibile in  $s$ ); le variabili aggiuntive sono:  $R$  il coefficiente di ripartizione (adimensionato) del principio attivo tra unguento e barriera dell'epidermide,  $D_s$  il coefficiente di diffusione del principio attivo attraverso l'epidermide,  $S$  la superficie di epidermide esposta e  $h$  lo spessore attraversato.

Per studiare i fenomeni diffusivi si possono adottare membrane asportate direttamente da un essere vivente (*ex-vivo*) o prodotte artificialmente in grado di simulare la cute (*in vitro*): un confronto tra queste due tipologie è affrontato ad esempio negli studi di Rubio [16] e Bhaskar [17]. Un tipico apparato sperimentale atto a questo tipo di analisi è costituito da un vano donatore, dove ha sede la fase contenente il principio attivo diffondente, separato tramite una membrana dal vano recettore, contenente quest'ultimo un liquido in grado di simulare i fluidi corporei (come ad esempio soluzione fosfato salina, PBS [18], utilizzata dal corrente lavoro). Come nel caso della cute, la penetrazione della molecola diffondente può verificarsi nella membrana senza necessariamente diffondere o passare attraverso i suoi pori. Il livello di assorbimento della cute può poi essere misurato *in vivo* tramite i livelli di concentrazione sanguigna o la presenza del farmaco e suoi metaboliti nelle urine, mentre nell'esecuzione di esperimenti *in vitro* tramite la misura della concentrazione del principio attivo (che in questo caso non avrà subito alcun metabolismo) nel vano recettore dello strumento che simula il processo diffusivo. Nello studio sperimentale *in vitro* affrontato nel corrente lavoro si adotterà la cella di Franz, strumento in grado di simulare la diffusione di principi attivi attraverso la cute umana, utilizzando come substrato interessato dal rilascio una membrana cellulosica.

Per quanto riguarda la velocità di diffusione nell'assorbimento, si definisce *tempo di ritardo* (*lag time*) l'intervallo temporale necessario al flusso diffondente per passare attraverso la membrana, raggiungere il vano recettore e giungere a uno stato stazionario: riportando il modello ai fenomeni reali, rappresenta il tempo che trascorre tra l'assorbimento sull'epidermide, l'accumulo negli strati inferiori e la diffusione con velocità costante nei vasi sanguigni. Se riportato graficamente, pertanto il tempo di ritardo è l'intervallo nel quale la velocità di diffusione aumenta nel tempo, mentre lo stato stazionario sarà rappresentato da una retta parallela all'asse temporale.

## 1.2 Cerotti medicati

I cerotti medicati sono un'applicazione ormai assodata ma in costante sviluppo nel campo della somministrazione farmaceutica per via topica, in quanto presentano i vantaggi prima elencati. Le frontiere di innovazione in questo campo sono numerose, e nel corrente studio analizzeremo a livello sperimentale la funzionalizzazione di tessuti con sistemi polimerici in scala nanometrica caricati con un principio attivo.

Il primo sistema a rilascio transdermico precursore degli attuali cerotti risale al secondo millennio avanti Cristo, ed era utilizzato in Cina: esso era costituito da polveri e frammenti di piante medicinali disperse in una resina o gomma naturali, applicate su di un tessuto [19]. Nei secoli seguenti, soprattutto nella medicina orientale, i sistemi transdermici subirono un grande sviluppo; in parallelo, la scienza europea giunse nei decenni a cavallo tra il XIX e il XX secolo a importanti risultati iniziali [20, 21] nello studio degli effetti delle sostanze chimiche sulla pelle. Nel 1920 Earle Dickinson [22], un dipendente dell'azienda farmaceutica Johnson & Johnson, inventò il cerotto. Egli, cercando una soluzione al facile distacco delle bende utilizzate per fasciare le ferite, tipicamente imbevute di fenolo e avvolte intorno alla ferita, applicò una garza al centro di un foglio rettangolare di nastro adesivo chirurgico e coprì dal lato adesivo con un tessuto di protezione, rimovibile prima dell'uso. Dall'anno seguente al 1924 ci fu lo sviluppo del prodotto, ad esempio inserendo il tratteggio di pre-strappo dei fogli per agevolarne l'uso, il conseguente lancio

nel commercio di massa del prodotto BAND-AID®, e nel 1926 fu registrato il brevetto "*Surgical dressing*" [23]. I cerotti inventati da Dickinson sono stati un'invenzione rivoluzionaria in campo medico e preventivo, perché hanno introdotto un trattamento delle ferite innovativo, permettendo la chiusura più rapida della ferita, una prevenzione maggiore delle infezioni e la possibilità di riprendere l'uso della parte del corpo lesa.

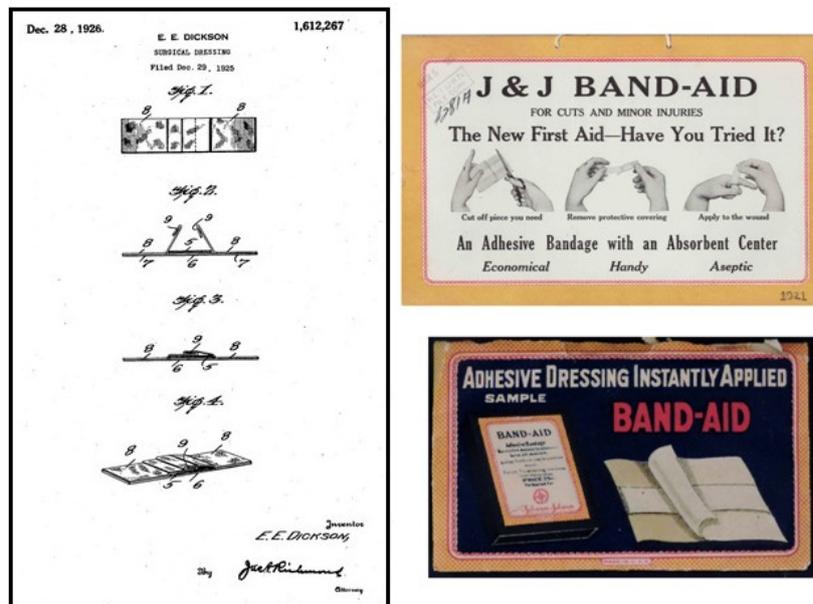


Fig. 1.5 - Brevetto BAND-AID® (1926), cartellone pubblicitario (1921), involucro del prodotto (1920) [22, 23, 24]

A partire dal 1970 si iniziarono diversi studi [25, 26, 27, 28] sul rilascio controllato transdermico basato su membrane, applicate su un tessuto e controllanti la dose di principio attivo rilasciata nel tempo e con essa la relativa concentrazione sanguigna. Il primo sistema transdermico a rilascio controllato di farmaco, basato sulle ricerche appena riportate, fu Transderm Scop® (Alza Corporation, California [29], approvato negli Stati Uniti dalla Food and Drug Administration e registrato nel 1976: progettato per prevenire la nausea durante gli spostamenti con automobile o aereo, viene applicato sotto un orecchio e rilascia gradualmente per un tempo massimo di tre giorni la scopolamina, un alcaloide [30, 31, 32].



Fig. 1.6 - Confezione contenente i cerotti Transderm Scop®

Questo cerotto medicato è costituito da quattro strati [33]:

- un layer esterno di poliestere e alluminio (che non permette la diffusione del principio attivo verso l'esterno e dell'acqua verso l'interno);
- uno strato di riserva per la scopolamina, contenuta in un gel di paraffina e poliisobutilene;

- una membrana microporosa di polipropilene controllante la velocità di rilascio del principio attivo - che diffonde attraverso di essa dallo strato superiore;
- adesivo composto da un gel (diverso da quello del secondo strato) di poliisobutilene, paraffina e ulteriore principio attivo - rilasciato immediatamente in seguito all'applicazione.

Negli ultimi decenni sono stati raggiunti importanti risultati in questo ambito di ricerca, che come abbiamo visto coinvolge numerosi settori scientifici quali la farmacologia, la medicina, le scienze biologiche e istologiche, l'ingegneria chimica e la scienza dei materiali. Un grande sviluppo è stato ottenuto negli avanzamenti relativi alle tecniche sperimentali utilizzate per studiare quantitativamente e qualitativamente questi fenomeni. Per quanto concerne il rilascio di principio attivo sulla cute, esso può essere quantificato *in vitro* su simulazioni dei sistemi biologici, *ex vivo* su porzioni asportate da esseri viventi o *in vivo* su cavie, misurandone la concentrazione sanguigna (sistemica o locale) o nelle urine dopo un certo periodo di tempo. Negli ultimi decenni la tecnologia legata al rilascio controllato transdermico ha subito ulteriori sviluppi, a partire dal miglioramento delle tecniche di analisi per la tracciabilità e la quantificazione del principio attivo diffuso nella pelle in tempo reale:

- tramite ad esempio l'utilizzo di sostanze radioattive [34];
- con tecniche spettroscopiche avanzate [35, 36, 37];
- con l'utilizzo di apparati sperimentali in grado di simulare la cute e il relativo sistema circolatorio [38] o *in vivo* / *ex vivo* su animali [36, 39].

In seguito approfondiremo più nel dettaglio le principali tecniche analitiche attualmente utilizzate negli studi del rilascio controllato di farmaco, soffermandoci maggiormente sui temi trattati dal corrente lavoro.

I recenti studi nel campo dei sistemi transdermici ha portato a numerose innovazioni, parallelamente allo sviluppo di tipologie di cerotti medicati studiate per garantire un flusso costante di principio attivo attraverso la membrana per un intervallo temporale dell'ordine della decina di ore - che può essere vantaggioso per pazienti affetti da disturbi cronici: dopo una fase iniziale dove il rilascio può essere impulsivo (se il farmaco si è accumulato negli strati inferiori) o nullo (se la diffusione non è ancora iniziata), in funzione del suo spessore e della concentrazione di principio attivo immagazzinato, esso diffonderà seguendo una cinetica di diffusione cutanea dipendente dai parametri visti nel capitolo precedente.

Vediamo ora la classificazione più comune [6] per i sistemi transdermici a rilascio di farmaco, basata sulla differente funzionalizzazione dei materiali con il principio attivo da rilasciare:

1. *A riserva*, ovvero sistemi contenenti uno strato, liquido o geliforme, dove è sciolto o disperso in modo omogeneo il principio attivo: questo strato di riserva è collocato tra un layer esterno impermeabile (come nel caso dei cerotti tradizionali) e una membrana semipermeabile - tipicamente microporosa - nei confronti del principio attivo, che ne controlla la velocità di rilascio verso la pelle tramite fenomeni diffusivi. Esempi applicativi: Transderm-scop [29], Clonidine-patch [40].

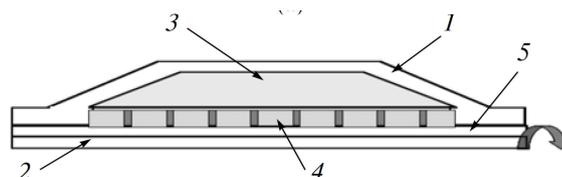


Fig. 1.7 - Schema rappresentative di un sistema transdermico a riserva di farmaco: 1) film esterno impermeabile all'acqua e al farmaco; 2) film protettivo da rimuovere prima dell'uso; 3) riserva del farmaco; 4) membrana; 5) strato adesivo.

2. *A diffusione controllata dall'adesivo*, ovvero dove lo strato a diretto contatto con la cute svolge sia la funzione adesiva che di matrice contenente il principio attivo, attraverso la quale avverrà la diffusione: rispetto al caso precedente, gli spessori e la dispersione sono maggiori. Esempi: Daytrana [41], Habitrol [42].

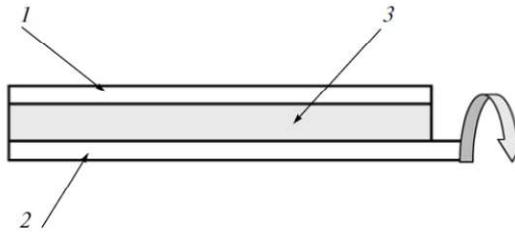


Fig. 1.8 - Schema rappresentativo di un sistema transdermico a diffusione di farmaco controllata dall'adesivo: 1) film esterno impermeabile all'acqua e al farmaco; 2) film protettivo, da rimuovere prima dell'uso; 3) strato adesivo polimerico contenente il principio attivo.

3. *A diffusione diretta dalla matrice*: la matrice, contenente il principio attivo, è posta a diretto contatto con la pelle e circondata esternamente da uno strato di adesivo. La molecola interessata diffonderà direttamente sulla pelle a partire dalla matrice. Rispetto ai casi precedenti, è più frequente il verificarsi di un accumulo eccessivo di principio attivo negli strati inferiori, specialmente se l'applicazione avviene molto tempo in seguito alla produzione, con un possibile dosaggio iniziale molto alto. Esempi: Nitrodur. [43]

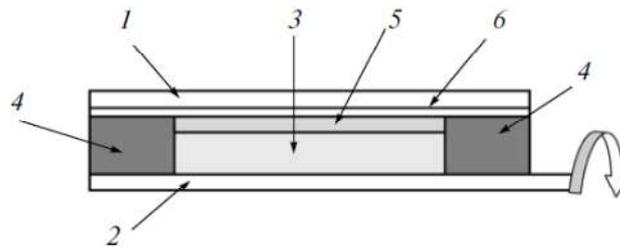


Fig. 1.9 - Schema rappresentativo di un sistema transdermico a diffusione diretta del principio attivo dalla matrice: 1) film esterno impermeabile all'acqua e al farmaco; 2) film protettivo, da rimuovere prima dell'uso; 3) matrice polimerica contenente il principio attivo; 4) strato adesivo periferico ad anello; 5) disco oclusivo; 6) strato di fissaggio.

4. *A micro-riserva*, ovvero contenente sistemi polimerici micrometrici omogeneamente dispersi in un adesivo (Fig. 1.10-a) o in una matrice non adesiva, circondata da un polimero in grado di assicurare il fissaggio alla cute (Fig. 1.10-b). L'utilizzo di carrier micrometrici consente un migliore controllo temporale del rilascio, in quanto il farmaco dovrà anche diffondere attraverso di essi, prima di incontrare la membrana polimerica e poi la cute. Esempi: Androderm® [44].

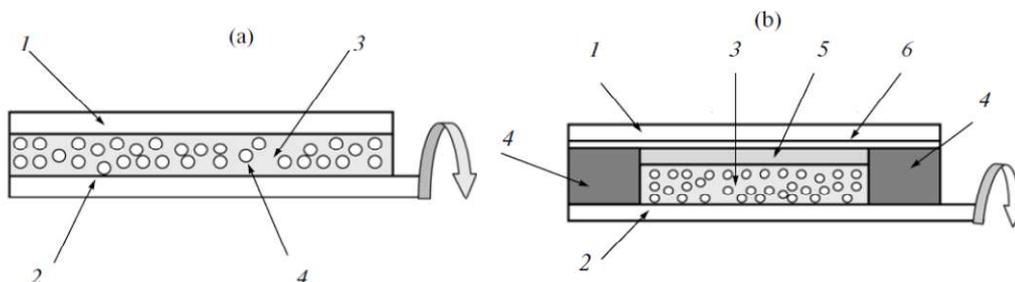


Fig. 1.10 - Schemi rappresentativi di sistemi per il rilascio transdermico a riserva. a): 1) film esterno impermeabile all'acqua e al principio attivo; 2) film protettivo, da rimuovere prima dell'uso; 3) adesivo polimerico contenente il principio attivo in carrier micrometrici (4). b) Sistema analogo ma con adesivo periferico esterno (4), disco oclusivo (5) e strato di fissaggio (6).

I vari strati costituenti i cerotti medicati devono rispettare adeguate norme igienico-sanitarie<sup>1</sup>, e sono costituiti dei seguenti materiali [6, 39, 46]:

- Strato impermeabile esterno, in grado di impedire la diffusione di acqua (dall'esterno) e principio attivo (dall'interno), deve presentare buona flessibilità e sufficiente resistenza a trazione: i materiali tipici sono elastomeri (che garantiscono maggiore adattamento al movimento del corpo da rivestire) o poliesteri, eventualmente metallizzati;
- Pellicola protettiva, che protegge integri nel tempo il principio attivo e il polimero adesivo, tipicamente in polietilene o carta;
- Adesivi a pressione, compatibili con la pelle, in grado di dare una forte adesione con essa dopo una semplice applicazione manuale, ma facili da rimuovere e non lasciando residui: i materiali tipici sono poliacrilato, poliisobutilene e polisilossano;
- Riserva polimerica: i materiali tipici sono il petrolato, polietilenglicole, etilvinilacetato etilcellulosa, polivinilpirrolidone, idrossipropil meticellulosa, gomme siliconiche, poliuretani, poliisobutilene. Il farmaco si trova disperso in essa (se il suo stato di aggregazione è quello di un gel) o sciolto (se è un liquido molto viscoso);
- Principio attivo (ed eventuali incentivatori dell'assorbimento) responsabile di varie azioni, come quelle ormonali, antisettiche, antinfiammatorie, antidepressive o per curare dipendenze come quella dalla nicotina.

### 1.3 La caffeina



Fig. 1.11 - Struttura della molecola di caffeina [47]

Per il corrente studio sperimentale si è scelto di adottare la caffeina [47] come principio attivo nella diffusione da nanoparticelle polimeriche. Indicata in nomenclatura IUPAC come 1,3,7-trimetilxantina, ha formula  $C_8H_{10}N_4O_2$  (peso molecolare 194.2 Da) e possiede a pressione ambiente un punto di fusione a 238 °C. In letteratura si trovano diversi valori di solubilità della caffeina in acqua a 25°C, compresi tra 16 mg/mL [47] e 21.7 mg/mL [48]; a temperature crescenti, la solubilità aumenta raggiungendo i 30.1 mg/mL a 35 °C, 79.1 mg/mL a 45 °C, 200 mg/mL a 80°C, 666 mg/mL a 100°C [47].

Per quanto riguarda il suo comportamento nei confronti dell'acqua o dei grassi, presenta valori intermedi di affinità con entrambi, un buon compromesso per un'applicazione transdermica dove la molecola diffondente incontra ambienti dalle proprietà chimiche molto differenti. Per calcolare il grado di ripartizione della caffeina tra acqua e una sostanza apolare, si utilizza la *coefficiente di ripartizione tra acqua e 1-ottanolo* [49], tipicamente espresso in forma logaritmica come:

<sup>1</sup> Regolamento UE 2017/746 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 5 aprile 2017, relativo ai dispositivi medico-diagnostici in vitro e che abroga la direttiva 98/79/CE e la decisione 2010/227/UE della Commissione; tale regolamento è entrato in vigore in Italia nel maggio 2017 [45].

$$(4) \log_{10}P = \log_{10} \left( \frac{[\text{caffeina}]_{1\text{-ottanolo}}}{[\text{caffeina}]_{\text{acqua}}} \right)$$

Nel caso in analisi:

$$(5) \log_{10}P = -0.07 [48] \rightarrow P = \frac{[\text{caffeina}]_{1\text{-ottanolo}}}{[\text{caffeina}]_{\text{acqua}}} = 10^{-0.07} = 0.851$$

Ciò implica che in un volume unitario, il 54% della caffeina sarà sciolta in acqua, mentre la restante parte in 1-ottanolo. Presumibilmente, nel caso di una membrana lipidica questa differenza sarà importante e potrà limitare l'assorbimento di tale molecola, vista la presenza di catene idrocarburiche notevolmente più lunghe (un discorso analogo lo si può effettuare nei confronti del materiale polimerico costituente il carrier che andrà a contenerla).

In numerosi studi [50, 51, 52, 53, 54, 55], risulta che la caffeina presenta interessanti proprietà: antitumorali, antiossidanti, coadiuvanti nel trattamento della pannicolopatia edemato fibrosa, nota come cellulite (stimolando la mobilizzazione degli acidi grassi nel tessuto adiposo e la rimozione dei liquidi derivanti dalla adipolisi, rottura delle catene lipidiche in eccesso nel tessuto interessato), e protettive nei confronti dei raggi ultravioletti. Il picco di assorbimento della caffeina nell'UV a 273nm [47] è sfruttabile nella quantificazione della sua concentrazione con questa tecnica spettrofotometrica. Inoltre, questa proprietà fisica potrebbe risultare molto utile in sistemi transdermici per la protezione solare della cute, in quanto ne garantirebbe la protezione da radiazioni dannose.

Nella relativa sezione sperimentale, la caffeina verrà posta in due modalità sulle fibre utilizzate per la diffusione controllata, per confrontarne le cinetiche e le efficienze di rilascio:

- un set di tessuti verrà funzionalizzato con caffeina libera, ovvero si utilizzerà per il trattamento delle fibre una soluzione di caffeina in acqua;
- un analogo set di tessuti verrà funzionalizzato con caffeina contenuta in un sistema polimerico nanometrico di policaprolattone, prodotto tramite un reattore a getti collidenti confinati (Confined Impinging Jet Reactor, CIJM [56]).

## 1.4 Tessuti funzionalizzati

In questa sezione affronteremo il discorso relativo ai tessuti, supporti di comune utilizzo per il drug delivery transdermico. Si è scelto di utilizzare tre materiali cellulósici differenti che verranno descritti in seguito, forniti dalla sede distaccata di Biella del Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia del Politecnico di Torino. Verranno preparati dei sistemi con solo uno strato coinvolto nei fenomeni diffusivi, non come nel caso delle tipologie di cerotti medicati visti nella sezione precedente, per poter valutare meglio le variabili in gioco e analizzare più nel dettaglio i singoli sistemi.

### 1.4.1 Preparazione dei tessuti

Per la funzionalizzazione dei tessuti, è necessario effettuare alcuni trattamenti di preparazione superficiale poiché nella produzione delle fibre cellulósiche si utilizzano numerosi agenti chimici [57, 58, 59]: essi sono coinvolti tra le operazioni meccaniche, quali la filatura (in inglese *spinning*) e l'intreccio delle fibre (in inglese *knitting*) - come agenti pulenti (per eliminare le impurità) o protettivi (applicazione di *mordenti* o agenti di *appretto*). Inoltre, sovente le fibre vengono sottoposte a processi chimici quali l'ossidazione o più in generale a una finitura, nota anche con il termine di *finissaggio* [58, 59].

Un pre-trattamento [57, 59] ad alta temperatura di pulizia delle fibre di cotone è pertanto essenziale per rimuovere le componenti superficiali diverse dalla cellulosa, organiche o inorganiche (come impurità minerali o vegetali provenienti dalla fase di raccolta, cere, oli, amido o solventi), che pregiudicherebbero la bagnabilità, l'assorbimento di acqua e l'adesione di molecole organiche come i coloranti, o nel nostro caso di un principio attivo o di un carrier polimerico. Analogamente la caffeina tenderà ad allontanarsi dalla fibra nel momento in cui il tessuto verrà bagnato dalla soluzione utilizzata per il rilascio, pertanto l'idrofilia risulta un parametro molto importante anche per l'efficacia di rilascio dalle fibre. La presenza di tali impurità rende la superficie del materiale tendenzialmente idrofoba [57]: dopo i pretrattamenti idonei delle fibre, il contenuto non cellulosico rimanente risulta inferiore all'1%. Nel caso della funzionalizzazione delle fibre con agenti dispersi o disciolti in acqua quali coloranti, caffeina o carrier polimerici, è fondamentale un comportamento idrofilo delle interfacce coinvolte: in questo modo nell'impregnazione ci saranno le adeguate interazioni con il solvente, e quindi con la soluzione contenente l'agente funzionalizzante. Inoltre, l'idrofilia sarà anche essenziale nella fase di rilascio del principio attivo da noi considerato, visto che, come spiegheremo in seguito, nello strumento utilizzato le fibre devono essere costantemente bagnate.

Nel caso dei coloranti, gli studi prima riportati affermano l'instaurarsi di legami idrogeno tra le catene idrocarburiche delle fibre e le molecole da dover legare ad esse: tendenzialmente, un gruppo donatore di idrogeno presente sulle prime si legherà con un doppietto elettronico di un ossigeno appartenente a un gruppo idrossilico di una catena cellulosa. Nel caso della caffeina e dei sistemi nanometrici di PCL, non vi sono gruppi donatori di idrogeno, pertanto i legami che si formeranno saranno prevalentemente fisici: questo è un parametro molto importante nel successivo rilascio di farmaco, perché non essendo né il principio attivo né il carrier legati covalentemente alle fibre di supporto ci sarà prevalenza di legami fisici ed elettrostatici, con un più semplice ed efficace rilascio nel tempo. Occorre valutare l'efficacia di deposizione, dipendente anche dalla forza dei legami: questo parametro, come spiegato nel capitolo a esso dedicato, verrà misurato lavando accuratamente i contenitori dove avverrà la funzionalizzazione e valutando quantitativamente la caffeina in essi residua.

Nelle prossime righe affronteremo a livello teorico i passaggi utilizzati per il lavaggio e il pretrattamento delle fibre organiche, facendo sempre riferimento alle fonti citate all'inizio della sezione (nella parte sperimentale, verrà proposta una loro applicazione concreta):

- Il trattamento di *desizing* vede l'eliminazione, tramite ossidazione o idrolisi, dell'appretto, riempitivo polimerico utilizzato per prevenire la rottura delle fibre durante le lavorazioni meccaniche: in questo modo tali composti polimerici diventano solubili in acqua e possono essere allontanati dal materiale. Gli agenti tipicamente utilizzati sono l'acido solforico, enzimi, perossido di idrogeno. Al termine del processo, si può controllare se è presente ancora amido tra le fibre con una soluzione a base di iodio: come mostrato in Fig. 1.12, in base all'eventuale colorazione assunta dalle fibre, tramite tabelle qualitative si può valutare l'efficienza del *desizing*.

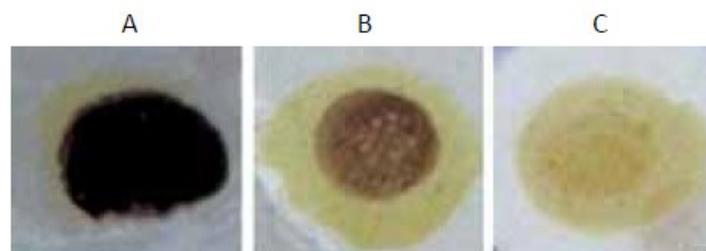


Fig. 1.12 - Tre possibili risultati qualitativi dopo l'applicazione della soluzione a base di iodio sui tessuti precedentemente trattati, con rendimento di trattamento crescente dalla figura A alla figura C. [60]

- Il trattamento di *scouring* vede l'allontanamento dei residui oleosi dello spinning, e della cera. Si può ancora distinguere lo *scouring* alcalino, che rimuove grassi, proteine e pectina (parti idrofobe dell'appretto non rimosse nel desizing) con reazioni di saponificazione o rottura delle catene ammidiche, dallo *scouring* acido, che rimuove i residui minerali e riporta il pH a 7. Gli agenti utilizzabili sono classificabili come:

- *Agenti alcalini*: idrossido di sodio, idrossido di potassio, carbonato di sodio, ammoniaca, fosfati e silicati di sodio;
- *Tensioattivi*, di natura anionica o non ionica, per aumentare la bagnabilità del tessuto;
- *Agenti emulsificanti*, in grado di mantenere disperse in sospensione le impurità (tipicamente minerali), per prevenirne una nuova deposizione sul tessuto;
- *Agenti sequestranti*, in grado di allontanare ioni metallici tramite la formazione di complessi metallorganici (il più comune è l'acido etilendiamminotetraacetico - EDTA);
- *Solventi organici*: a base cloro (1,1,1-tricloroetano, tetracloruro di carbonio, tricloroetilene), di natura idrocarburica (benzene, benzina o gasolio industriali, acqua ragia);
- *Acidi*: acido cloridrico, acido solforico.

- Il trattamento di *bleaching* vede lo sbiancamento completo del tessuto tramite agenti ossidativi o riducenti - procedura che non verrà utilizzata nella parte sperimentale del presente lavoro.

Le masse richieste nelle ricette utilizzate per i vari passaggi, tipicamente vengono espresse come percentuale sulla massa del tessuto - % *on weigh of fabric*; il volume di acqua richiesto è invece indicato con il *liquor ratio*, ovvero il rapporto tra il volume in millilitri di solvente utilizzato e la massa in grammi del tessuto da trattare.

Nello studio sperimentale svolto, si è scelto di operare i trattamenti di desizing e *scouring* basico in un primo passaggio, seguito da un lavaggio di *scouring* acido; inoltre, gli studi prima riportati affermano che i materiali utilizzati sono resistenti a condizioni relativamente sia acide che basiche, pertanto si sono utilizzati sia pH prossimi a 2 che prossimi a 13 quando richiesto dalle procedure operative, per assicurare una pulizia adeguata dei materiali. L'efficienza dei vari processi può essere calcolata mediante una valutazione dell'aumento dell'idrofilia, quali il test della goccia, dell'angolo di contatto o di assorbimento di umidità: come vedremo nella sezione apposita, si è scelto di utilizzare il test della goccia come parametro per confrontare l'efficienza del pretrattamento con tessuti differenti

#### 1.4.2 Carrier polimerici per i principi attivi

In questa sezione analizzeremo le principali proposte nel campo del rilascio controllato di farmaco per i carrier contenenti un principio attivo, concentrandoci sui sistemi polimerici. Numerosi studi hanno preso in considerazione i sistemi nanometrici e micrometrici tipicamente utilizzati per il drug delivery, valutandone anche la possibile applicabilità a un rilascio controllato transdermico.

Si può effettuare una prima distinzione in due macrogruppi di carrier, ovvero quello dei sistemi ottenuti da polimeri sintetici (come il policaprolattone o il polietilenglicole) e quello dei sistemi naturali (come i carboidrati, le proteine o i liposomi). I polimeri sintetici offrono vantaggi rispetto ai carrier a base naturale: vista la possibilità di studio e ingegnerizzazione delle strutture, in genere possono essere stoccati per un tempo superiore senza subire cambiamenti, possono incapsulare o adsorbire sia composti idrofili che idrofobi e se ne può variare la funzionalizzazione e la lunghezza, controllando così le proprietà fisico-chimiche per ottimizzare il rilascio controllato del farmaco; inoltre, se biodegradabili o metabolizzabili, non lasciano residui eventualmente dannosi.

Numerose ricerche si sono focalizzate sulla produzione di capsule o particelle di dimensioni nanometriche o micrometriche. Entrambe le famiglie di sistemi polimerici comprendono principalmente tre categorie di metodi di sintesi e funzionalizzazione con il principio attivo desiderato:

- metodi *chimici*, con la formazione della capsula tridimensionale intorno al principio attivo da contenere, a seguito di reazioni all'interno del reattore contenente le fasi reagenti [61]: i carrier vengono sintetizzati a partire da precursori monomerici, coadiuvati da eventuali catalizzatori in grado di modificarne la cinetica di reazione ed eventualmente la taglia o la forma;
- metodi *fisico-chimici*, come le tecniche sol-gel [62], la coacervazione complessa [63, 64, 65, 66, 67], l'allontanamento [68] o lo spostamento [69, 70, 71] di solvente: tutte queste metodologie vedono la formazione di fasi polimeriche tridimensionali immiscibili, che inglobano il principio attivo dalla soluzione e precipitano come capsule o particelle funzionalizzate. La differenza principale rispetto al precedente gruppo di metodologie consiste nella natura delle interazioni, che in questo caso sarà principalmente un'aggregazione fisico-chimica e potrà coinvolgere solo in parte reazioni di polimerizzazione. Con queste metodologie di sintesi si sono ottenuti buoni risultati, soprattutto riguardo l'incapsulamento e la migrazione degli oli incapsulati per applicazioni dermiche. [65]
- metodi *fisico-meccanici*, che possono vedere l'evaporazione di solvente [72], il freeze-drying / spray-drying [73, 74], o ricoprimenti in letto fluido [75]: nei vari casi il polimero costituente la parte massiva del carrier solidifica con trasformazioni puramente fisiche intorno alla molecola da incapsulare; può essere prevista anche una fase aggiuntiva di indurimento chimico, per migliorarne le proprietà meccaniche e la stabilità.

I principali fattori che possono influenzare l'efficienza di immagazzinamento di principio attivo sono i seguenti [74, 76]:

- affinità del polimero costituente i carrier nei solventi organici utilizzati - e di tale solvente con l'acqua: polimeri molto solubili (affini al solvente, o dal basso peso molecolare) impiegheranno più tempo a solidificare e inglobano meno principio attivo;
- concentrazione iniziale dei precursori nel reattore, al crescere della quale si avrà una deposizione interfacciale più veloce - per via della più alta frequenza di urti utili e viscosità del sistema;
- velocità di miscelazione e di allontanamento del solvente, proporzionali alla dimensione del nucleo delle capsule ottenute;
- interazione del principio attivo con il polimero che costituirà il carrier, al quale deve essere affine, e con i solventi, dai quali deve tendere ad allontanarsi per poter essere inglobato nella struttura polimerica in formazione. Un altro studio [77] afferma che all'aumentare del peso molecolare del polimero di partenza l'incapsulamento diminuisce, per via dell'inerzia delle catene (parametro in competizione rispetto a quello del primo punto del corrente elenco).

Le applicazioni dei *sistemi micrometrici* di origine sintetica al rilascio controllato di farmaco, vedono principalmente microcapsule [66], microsfele [78, 79], microaghi [80] e microfibre [81, 82, 83, 84]. Le prime due famiglie comprendono i carrier più utilizzati in ambito transdermico, mentre gli aghi vedono un utilizzo differente nel campo del drug delivery: dopo la loro applicazione sulla pelle, essi sono in grado di attraversare lo strato corneo senza perdita di principio attivo [80], ma non sono applicabili a un sistema transdermico basato su tessuti. Per quanto concerne le microfibre, invece, in letteratura non sono ancora state considerate per possibili applicazioni transdermiche, ma presentano buone potenzialità al pari delle particelle o delle capsule. Le fibre con diametro micrometrico, utilizzabili come filamenti di sutura, nei cerotti medicati o negli scaffold, possono essere prodotte tramite varie tecnologie: le più utilizzate sono l'elettrospinning

[81], il wet spinning [82] o tecniche microfluidiche [83, 84]. L'elettrospinning vede la filatura di fibre dal diametro controllato a partire da polimeri precursori allo stato fuso o contenuti in soluzione, ai quali viene applicato un campo elettrico nel momento in cui fuoriescono dall'ugello del macchinario, in modo da causare repulsioni elettrostatiche insieme alla solidificazione in aria del filamento; visto che non sono richieste elevate temperature nel processo, i principi attivi (liberi o contenuti in appositi carrier) per un'applicazione di tali fibre in un rilascio controllato possono essere contenuti nei precursori e inglobati nella struttura polimerica finale. Il metodo del wet spinning, invece, vede la fuoriuscita del polimero allo stato fuso in un bagno liquido, in grado di darne l'immediata solidificazione, e la filatura a velocità controllata dei rulli esterni. In questo caso il principio attivo (libero o meno) da inglobare nelle fibre sarà contenuto nel fuso polimerico, occorre pertanto prestare attenzione alla sua stabilità termica. L'ultima tecnologia, tipicamente utilizzata per scaffold rigenerativi nei tessuti, permette la produzione di microfibre organizzate in strutture tridimensionali senza un danneggiamento termico del farmaco coinvolto [83, 84]: il funzionamento è basato sulla microfluidica e sullo scambio di solvente tra le fasi liquide (nelle quali è sciolto anche il principio attivo), nel momento in cui uno dei due flussi è forzato a rivestire quello interno che solidificherà dando la fibra funzionalizzata.

I carrier sintetici per uso transdermico con dimensioni *nanometriche* sono tipicamente progettati per una penetrazione all'interno della cute umana, e comprendono sistemi come nanoparticelle e nanocapsule [85, 86, 87, 88], nanoaghi [89], nanospugne [90] o i nanogeli [91]. Per quanto riguarda le tecniche di sintesi, le considerazioni sono analoghe a quelle dei paragrafi precedenti, con alcune differenze per quanto concerne le caratteristiche operative, che dovranno essere calibrate e studiate in maniera tale da permettere la produzione di carrier di taglia inferiore. I principali vantaggi che riguardano questa famiglia di sistemi polimerici risiedono nella possibilità di direzionarne l'azione nei confronti delle cellule da coinvolgere nell'azione terapeutica, e nella diminuzione degli effetti collaterali rispetto ad applicazioni più sistemiche [92].

I materiali utilizzati per i carrier non devono produrre conseguenze indesiderate sul corpo umano e risultare biodegradabili (o eventualmente metabolizzabili) se vengono assorbiti. I polimeri più utilizzati per la produzione di sistemi per il rilascio controllato di farmaco sono: acido poli(lattico-co-glicolico) [79], acido polilattico [79], policaprolattone [70, 71, 74], chitosano [93] (utilizzabile anche come strato superficiale in grado di incrementare l'adesione dei carrier [94]), zeina [95], seta e suoi derivati [86, 96, 97, 98].

Un supporto costituito da fibre (aventi diametro tra 10  $\mu\text{m}$  e 25 $\mu\text{m}$ ) o microfibre (con diametro inferiore ai 10  $\mu\text{m}$ ) può essere funzionalizzato con i carrier visti in questa sezione, o può essere caricato direttamente con la molecola interessata tramite impregnazione o imbibizione con soluzioni di precursori. Quest'ultimo caso attualmente non è interessato da numerosi studi per via della perdita dei vantaggi derivanti dall'uso di sistemi a rilascio controllato<sup>2</sup>; tuttavia, solo in pochi studi è riportato il confronto di controllo con il rilascio del principio attivo dai tessuti direttamente funzionalizzati con tale molecola [16, 90]: le metodologie sperimentali del corrente lavoro sono state a essi ispirate, per poter avere un confronto quantitativo e qualitativo dei risultati ottenuti, anche in relazione al rilascio dai tessuti contenenti i carrier scelti.

Per le simulazioni di rilascio transdermico da tessuti, si è scelto di utilizzare nanoparticelle funzionalizzate con caffeina: esse sono state prodotte in policaprolattone (PCL) [99], un polimero semicristallino, idrofobo, biocompatibile e biodegradabile [100], ottenuto dall'apertura dell'anello della struttura dell' $\epsilon$ -caprolattone e dalla sua polimerizzazione. Sintetizzato per la prima volta negli anni '30 [101], è stato da sempre largamente utilizzato nel campo del drug delivery [102] in svariate modalità per via delle basse temperature caratteristiche (temperatura di fusione di 60°C, temperatura di transizione vetrosa di -60°C), facilità di sintesi e funzionalizzazione, peso molecolare medio variabile tra 3000 g/mol e 80000 g/mol, buona solubilità nella maggior parte dei solventi organici (tranne alcol etilico ed etere dietilico), buone proprietà di rilascio di principi attivi

---

<sup>2</sup> I tessuti funzionalizzati con caffeina potrebbero essere considerati come un sistema macroscopico di rilascio di farmaco.

(con annessa permeabilità) e biodegradazione tramite idrolisi lenta ma senza sottoprodotti tossici (proprietà utile in un eventuale rilascio prolungato nel tempo).

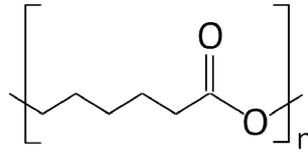


Fig. 1.13 - Struttura del policaprolattone

Le nanoparticelle di policaprolattone contenenti caffeina sono state prodotte traendo ispirazione dalle metodologie riportate negli studi di Mossotti [70] e Zelenková [74]. Esse sono basate su interazioni chimico-fisiche che sfruttano il fenomeno dello spostamento di solvente - in inglese *solvent displacement*, ovvero la nanoprecipitazione di un polimero insieme al farmaco da caricarvi al suo interno: ciò è possibile in seguito a una miscelazione molto rapida con un suo antisolvente, in grado di causare aggregazione dei carrier polimerici: nel caso in analisi, il policaprolattone, sciolto in un suo solvente, nella turbolenta con un suo antisolvente (ad esempio l'acqua) vede una sua sovrasaturazione, e pertanto aggrega per dare strutture tridimensionali sferiche inglobando il farmaco, anch'esso presente in soluzione [103,104, 105,106]. Alla base di questa tecnologia vi sono una miscelazione controllata [107] e la formazione di un'interfaccia tra solvente e antisolvente, con differenti tensioni superficiali: in tale zona si creano micro vortici [108], con rapida diffusione del solvente [109] e deposizione interfacciale con precipitazione del polimero. Conseguentemente alla nucleazione, esso vedrà una crescita in tempi brevi grazie alle altre molecole migrate all'interfaccia, dando aggregati nanometrici, che verrà bloccata con un'immersione immediata nel medesimo antisolvente - operazione nota con il termine *quenching*.

La strumentazione utilizzata per effettuare la nanoprecipitazione è il reattore a getti collidenti confinati (*confined impinging jets reactor*) [56, 106], strumento in grado di combinare micro e meso-miscelazioni per ottenere la precipitazione delle nanoparticelle polimeriche.

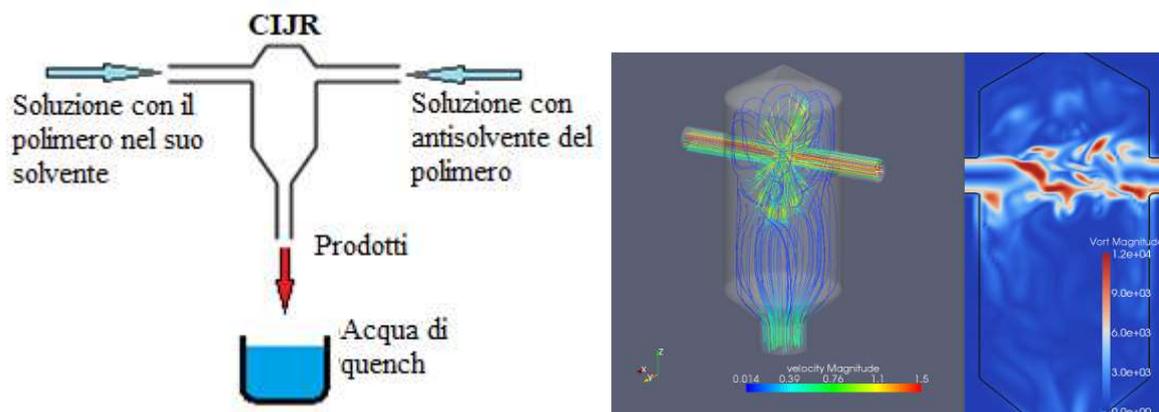


Fig. 1.14 - Schema del funzionamento del reattore a getti collidenti confinati e simulazione grafica dei vortici al suo interno. Immagini tratte da [110]

In ingresso contemporaneo nel reattore vi sono due fasi liquide, provenienti da due siringhe collocate in un'apposita pompa in grado di farle avanzare contemporaneamente: nella camera principale del reattore si avrà la miscelazione controllata delle fasi liquide, con la formazione dei carrier polimerici solidi. Come spiegato in Fig. 1.14, da un lato vi è l'ingresso della soluzione contenente il polimero nel suo solvente, mentre dal lato opposto entra il relativo antisolvente, in grado di dare il meccanismo crescita prima spiegato. Un ulteriore parametro importante per le

operazioni descritte è il rapporto in massa tra il principio attivo e il polimero sciolti in un volume unitario di soluzione - *mass ratio*, *MR*: al variare di tale rapporto, potranno variare le interazioni tra le specie chimiche coinvolte.

Una volta ottenuta la sospensione colloidale, essa uscirà dalla parte inferiore del reattore per essere raccolta in un contenitore con acqua di quench mantenuta in agitazione: la fase colloidale ottenuta è costituita dalle nanoparticelle polimeriche disperse in un surnatante composto dai due solventi utilizzati. Occorrerà in seguito allontanare il solvente del polimero, mentre l'antisolvente sarà necessario a mantenere la separazione di fase: per effettuare questa operazione si utilizza un evaporatore rotante (*rotovapor* - Fig. 1.15) in grado di allontanare le fasi liquide volatili, tramite riscaldamento della soluzione sotto vuoto e fuoriuscita dei vapori generatisi da una valvola di sfiato. Nel caso che analizzeremo, il solvente del policaprolattone sarà l'acetone, mentre l'antisolvente sarà l'acqua: il primo, rispetto alla seconda, ha una temperatura di ebollizione di 56 °C a pressione atmosferica, pertanto sotto vuoto passerà allo stato vapore a una temperatura ragionevolmente bassa rispetto a quella dell'acqua. Per poter valutare quantitativamente la produzione del sistema nanometrico, è fondamentale misurare la massa della sospensione tra le varie fasi di sintesi e la caffeina libera nei solventi, in modo da poter calcolare in seguito la massa di carrier e il principio attivo da essi contenuto.



Fig. 1.15 - Rotovapor utilizzato nel laboratorio del Politecnico di Torino

Uno dei problemi maggiori nell'utilizzo di tale sistema nanometrico disperso è la previsione di dove il principio attivo verrà immagazzinato, poiché intervengono fenomeni dalla difficile modellazione che comprendono la velocità di miscelazione, le tensioni superficiali delle nanoparticelle e delle fasi liquide, la solubilità del principio attivo nel polimero e nei relativi solventi utilizzati. Parte della caffeina verrà incapsulata o rimarrà ancorata sulla superficie delle nanoparticelle, mentre la restante parte rimarrà libera nel surnatante della sospensione. Per poter misurare il principio attivo non incapsulatosi, si effettua una centrifugazione delle sospensioni in modo da separare efficacemente la fase solida da quella liquida: asportando un volume noto di surnatante e lasciandone il resto per l'impregnazione dei tessuti, si misura la massa di principio attivo libero nel liquido con spettrometria uv-visibile, e si calcola la massa incapsulatasi per differenza da quella di partenza.

La frazione di principio attivo legata alle nanoparticelle (superficialmente o all'interno di esse), viene quantificata come *efficienza di incapsulamento*, calcolata confrontando la massa di principio attivo di partenza con quella residua nella fase liquida della sospensione:

$$(6) \quad ee_{\%} = \left( \frac{m_{partenza} - m_{residua}}{m_{partenza}} \cdot 100 \right) \%$$

### 1.4.3 Funzionalizzazione dei tessuti

I tessuti utilizzati per il rilascio controllato di farmaco necessitano di un trattamento atto alla deposizione del farmaco sul materiale di supporto: in generale, per la funzionalizzazione con carrier o molecole in soluzione, si possono adottare le medesime premesse teoriche riguardanti i processi di colorazione dei tessuti, che vedono l'ancoraggio chimico o fisico di molecole organiche sulla superficie esterna delle fibre. In letteratura si trovano molti articoli riguardanti la tecnica del *padding* [66, 70, 111, 112], che vede l'utilizzo di una fase liquida per modificare i tessuti: questa metodologia, riportata in Fig. 1.16, è ormai assodata in ambito industriale [113], e vede un'impregnazione con il controllo dell'assorbimento della soluzione colorante, seguita da strizzatura; un'analogia su scala ridotta [74] potrebbe riguardare l'uso di soluzioni o sospensioni funzionalizzanti con un'immersione in un bagno con agitazione costante, oppure una deposizione controllata su aree limitate o tramite spruzzatura. Per trattare le fibre a disposizione, si è scelto di operare imbibizioni localizzate di volumi noti della fase liquida sui tessuti. In seguito ai vari processi che utilizzano fasi liquide, seguono sempre asciugatura ed essiccamento - forzati (uno studio [90] ha usato 60°C per 48h, in modo da non rovinare il materiale ma allontanare solo l'acqua) o naturali (in un lavoro differente [66] ha asciugato i materiali per 24 ore a temperatura ambiente): nel caso sperimentale del corrente lavoro, si è adottata un'asciugatura a temperatura ambiente in atmosfera controllata e ventilazione forzata per 3 ore. Nella progettazione dei metodi di funzionalizzazione, un'attenzione particolare va sempre posta nei confronti della stabilità dei carrier e del principio attivo in essi contenuto.

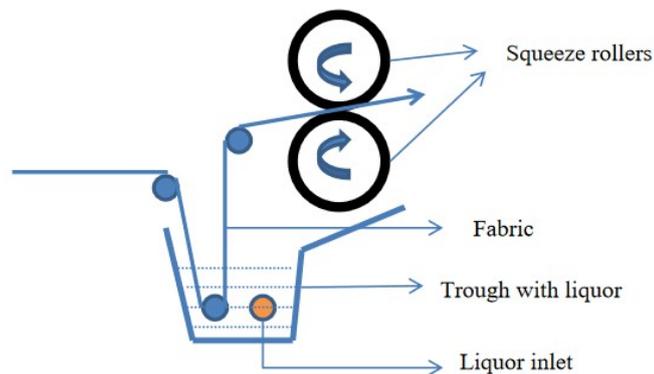


Fig. 1.16 - Schema rappresentativo di un processo di colorazione di fibre. [113]

In modo analogo al discorso effettuato sull'efficienza di pretrattamento delle fibre, si possono calcolare diversi parametri in grado di quantificare il quantitativo impregnatosi, soprattutto con grandi masse in gioco [66, 111, 114]. Nel caso sperimentale che analizzeremo, le masse in gioco sono molto piccole, pertanto una valutazione dell'efficienza di deposizione non potrà essere effettuata misurando direttamente la massa dei materiali non caricati sui tessuti; inoltre, i materiali a disposizione, essendo igroscopici, tendono ad assorbire l'umidità dando una grande variabilità nella massa misurata: come spiegheremo in seguito, si effettuerà una pulizia spinta dei contenitori utilizzati per l'impregnazione, e da analisi spettrofotometriche si ricaverà la massa di caffeina (libera o contenuta nelle nanoparticelle di policaprolattone) non rimasta sulle fibre, e da essa l'efficienza di deposizione.

Le analisi che tipicamente vengono fatte per valutare l'efficienza dei processi di funzionalizzazione dei sistemi transdermici, basati su tessuti contenenti carrier per il drug delivery, possono essere classificate in due gruppi: tecniche di caratterizzazione e analisi dei tessuti oppure dei principi attivi utilizzati nel rilascio. Nei seguenti paragrafi ci concentreremo maggiormente sulle metodologie utilizzate nella parte sperimentale del corrente lavoro.

Per quanto riguarda le fibre coinvolte nel drug delivery, esse possono essere studiate con le seguenti tecniche:

- Microscopio elettronico a scansione (SEM) [66, 70, 90, 115], basato sugli elettroni secondari emessi dalla superficie del campione in seguito all'interazione con un fascio primario. Viene utilizzato per valutare la morfologia delle fibre ed eventualmente osservare i principi attivi o i carrier su di esse - come riportato in Fig. 1.17:



Fig. 1.17 - Immagini di campioni di cotone funzionalizzati con nanosfere di policaprolattone contenenti mentolo. [70]

- Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) in riflettanza totale attenuata [66, 70, 90], per valutare l'eventuale formazione o modifica di legami e gruppi superficiali nei sistemi funzionalizzati rispetto a quelli vergini: questa metodologia spettroscopica è in grado di valutare la risposta dei legami chimici superficiali, in seguito all'interazione con radiazioni incidenti, che potranno dare specifiche transizioni energetiche in funzione della frequenza incidente. Analizzando l'assorbanza del campione al variare della frequenza della radiazione, si possono determinare i legami presenti sulla sua superficie e quindi le specie chimiche a essa legate o la modifica del carrier di partenza. In Fig. 1.18 è riportato il grafico di confronto tra tre spettri misurati su un campione di cotone funzionalizzato con una sospensione di policaprolattone, sulla sospensione stessa e sul tessuto non ancora trattato: si nota chiaramente la differenza tra il primo e il terzo, per via della formazione di nuovi legami in superficie.

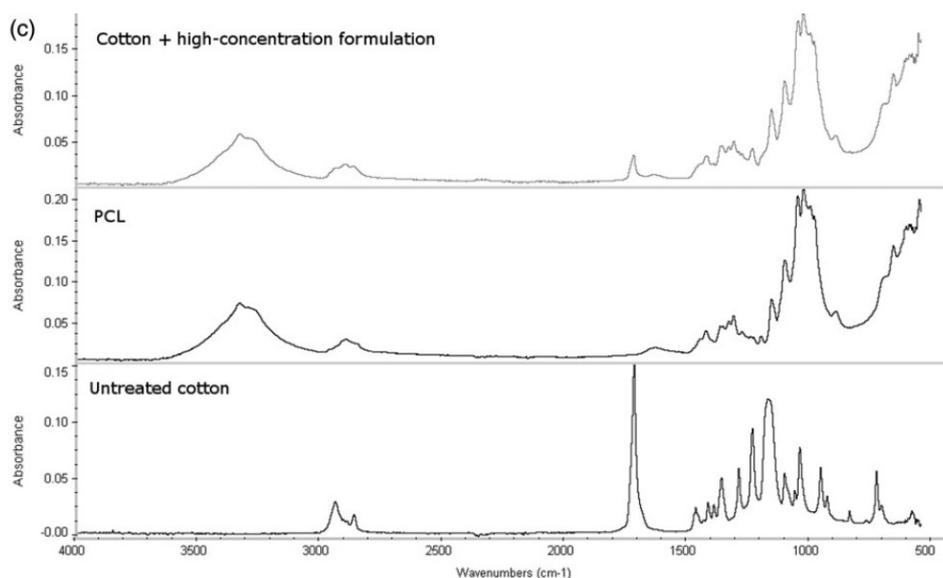


Fig. 1.18 - Spettri ATR FT-IR (spettroscopia FT-IR in riflettanza totale attenuata) - dall'alto: cotone trattato con microcapsule, PCL e cotone non trattato. [70]

- Spettrofotometria in riflessione, valutata con il modello Kubelka-Munk [116]. In seguito all'interazione di un fascio luminoso monocromatico incidente con la superficie di un campione, esso subirà assorbimento, scattering, riflessione e trasmissione. Il modello Kubelka-Munk è valido per campioni opachi, caratterizzati da riflessione superiore al 50% e trasmissione inferiore al 20%: tale modello studia la risposta del materiale in funzione del colore (e dell'eventuale presenza ravvicinata di aree colorate diversamente), dello spessore del tessuto, del diametro e della geometria delle fibre. La relazione proposta correla la frazione riflessa, quella assorbita e quella che ha subito scattering all'interno del campione: all'aumentare della riflessione, si ha una diminuzione (non lineare) del rapporto tra la frazione assorbita e quella che ha subito scattering. Questa teoria è largamente utilizzata nel campo dei coloranti per i tessuti, in quanto permette di valutarne il comportamento con la luce al variare della lunghezza d'onda incidente: si può applicare tale modello alla funzionalizzazione di fibre con carrier, valutando la variazione della luce riflessa al variare della concentrazione superficiale di aggregati polimerici.

- Calorimetria differenziale a scansione (DSC) [66, 70, 90], che valuta il diverso aumento della temperatura fornendo la stessa quantità di calore al campione da analizzare e a un crogiolo di riferimento: in questo modo si possono vedere le temperature caratteristiche delle eventuali transizioni termiche del sistema analizzato, come la formazione o fusione di fasi cristalline, comparando gli spettri dei tessuti prima e dopo la funzionalizzazione con i termogrammi effettuati sulle nanoparticelle isolate. In Fig. 1.19 riportiamo il grafico contenente gli spettri effettuati su due campioni di cotone funzionalizzati con due differenti sospensioni di policaprolattone a concentrazione di polimero crescente, e si evidenzia chiaramente un andamento differente della curva in temperatura.

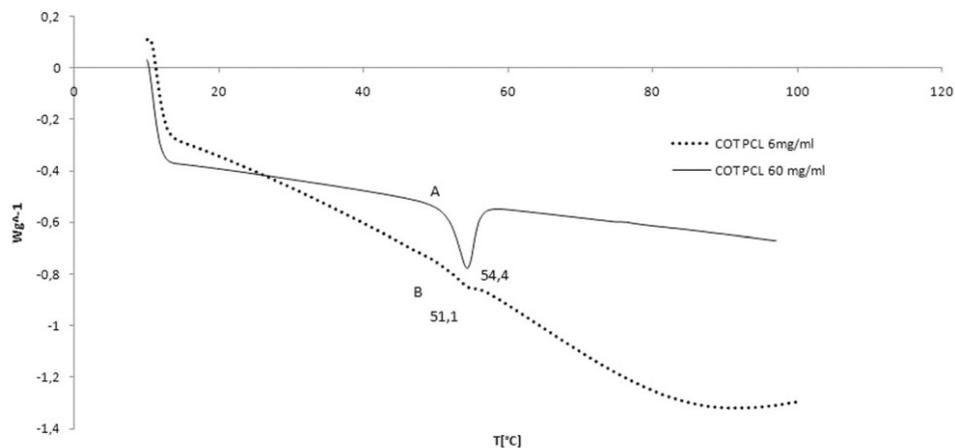


Fig. 1.19 - Spettri DSC di due tessuti trattati a concentrazione crescente di polimero nella preparazione dei carrier [70]

- Test della goccia [117]: nel campo dei materiali è importante studiare tre proprietà relative al loro comportamento con dei liquidi: assorbimento, bagnabilità e idrofilia. Quando un materiale viene in contatto con un liquido, si forma un'interfaccia tra le due fasi contraddistinta da un angolo di contatto superficiale specifico del materiale e del liquido considerati, funzione delle tensioni superficiali tra le fasi coinvolte: la bagnabilità è tanto più alta quanto minore è l'angolo che si forma tra la fase liquida e il supporto solido.

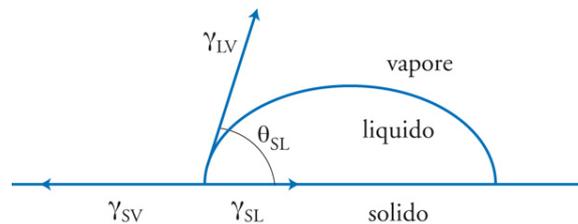


Fig. 1.20 - Schema rappresentativo delle interfacce che si formano nella deposizione di una goccia liquida su una superficie solida. [118]

Nel caso in cui si consideri il comportamento di un liquido penetrante in un materiale si parla di assorbimento, misurato tramite il tempo che impiega una goccia per essere assorbita dal materiale: l'assorbimento sarà in parte funzione della bagnabilità e delle tensioni superficiali instauratesi tra il materiale e il liquido considerati, ma dipenderà in misura preponderante dalle proprietà massive del substrato, che tenderà o meno ad assorbire il liquido. Infine, si parla di idrofilia o idrofobia quando tali proprietà vengono considerate relativamente all'acqua in contatto con la superficie di materiali differenti [119, 120]. L'assorbimento è pertanto la propensione di un materiale ad assorbire e trattenere un liquido al suo interno: questa proprietà è importantissima per un tessuto e le relative fibre intessute in un determinato modo, in quanto ne descrive il comportamento nei confronti dei liquidi con il quale è a contatto. Essi tenderanno o meno a penetrare all'interno del materiale in un certo intervallo di tempo, oppure rimarranno sotto forma di goccia sulla superficie, la cui sfericità sarà invece funzione della bagnabilità superficiale. Tale proprietà inciderà notevolmente nei processi industriali che coinvolgono le fibre, come i pretrattamenti, la colorazione e la funzionalizzazione, e nel comportamento nei confronti dell'ambiente. Il metodo ufficiale per valutare l'assorbimento di un materiale è basato sul tempo di vita di una goccia di acqua depositata sulla superficie del tessuto piana e mantenuta in tensione: dal momento della deposizione, *il tempo di bagnabilità* è il tempo necessario alla goccia per non mostrare più riflessione speculare, ovvero il tempo oltre il quale la goccia inizia a dare diffusione della luce o non è più visibile.

Per studiare i principi attivi coinvolti nel rilascio controllato, sono tipicamente utilizzate le seguenti tecniche analitiche:

- Spettrofluorimetria a fluorescenza [37], che è in grado di tracciare le molecole studiate tramite la loro interazione con determinate lunghezze d'onda in grado di dare fluorescenza. Questa tecnica vede l'utilizzo di molecole traccianti depositate su di una superficie come libere o caricate in eventuali carrier: una volta rilasciate sui materiali interessati dal rilascio controllato, come ad esempio campioni di pelle ex-vivo o membrane sintetiche, se ne possono valutare le tempistiche e la localizzazione di diffusione al loro interno. Ciò è possibile inviando radiazioni in grado di dare specifiche transizioni elettroniche nelle molecole traccianti, e conseguente emissione di radiazioni fluorescenti, rilevabili dallo strumento. Per poter valutare le tempistiche di diffusione, si possono effettuare varie prove con differenti tempi di applicazione delle molecole traccianti e misurarne la fluorescenza in una sezione asportata dal campione. Nella Fig. 1.21 si confrontano tre campioni differenti: rispetto alla pelle vergine, si nota una localizzazione maggiore della sonda nella terza immagine, dove essa è legata a un carrier in grado di migrare preferenzialmente verso le regioni intercellulari.

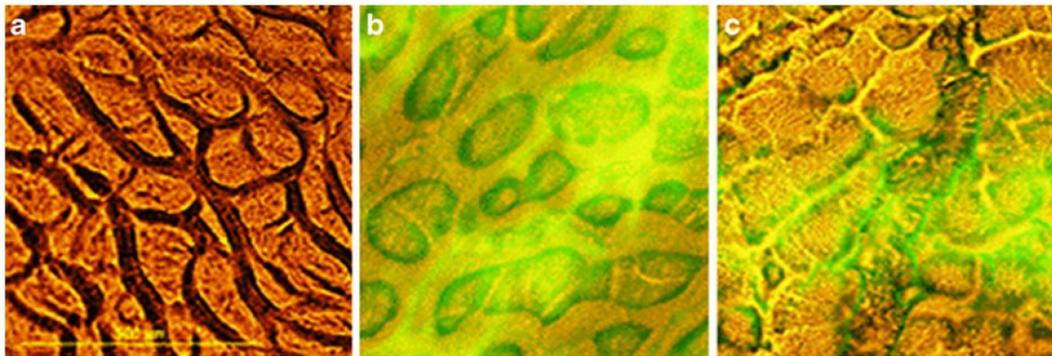


Fig. 1.21 - Tre immagini di microscopia a fluorescenza di campioni di pelle porcina: a) campione vergine; b) campione trattato con la molecola tracciante libera; c) campione trattato con la molecola tracciante legata a un carrier - si nota come la distribuzione sia preferenzialmente localizzata nelle regioni intercellulari [37]

• Spettroscopia fotoelettronica a raggi X, con la quale è possibile valutare quantitativamente la penetrazione nel tempo di una molecola sonda all'interno di un materiale [121], oppure studiarne la composizione chimica superficiale - particolarmente utile nel caso di supporti eterogenei come i tessuti [122]. Una sorgente monocromatica di raggi X invia una radiazione sul materiale causando specifiche transizioni energetiche negli atomi degli strati più esterni, che potranno dare l'emissione di elettroni: l'energia cinetica degli elettroni emessi dipende direttamente dall'energia di legame con gli atomi coinvolti, e pertanto è possibile caratterizzare le specie presenti - comprese le molecole sonda dalla configurazione elettronica nota. In Fig. 1.22, a titolo di esempio, riportiamo il risultato di una spettroscopia a raggi X effettuata su di un campione di cute umana in seguito alla deposizione di un principio attivo.

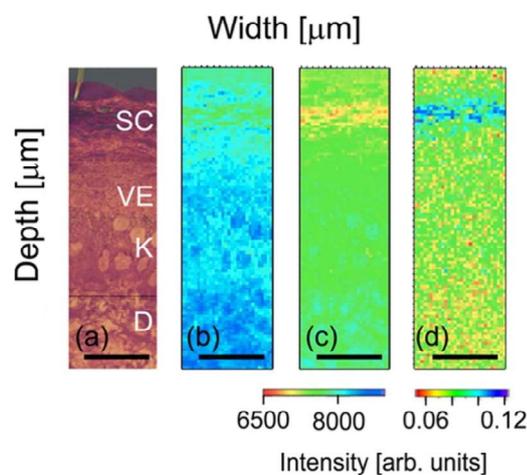


Fig. 1.22 - Valutazione della penetrazione di desametasone attraverso la pelle, analizzata tramite spettroscopia fotoelettronica a raggi X soffici (SC strato corneo, VE strato granuloso - viable epidermis, K nuclei di cheratinociti - cellule presenti nell'epidermide, D derma): a) microscopia ottica di una sezione verticale della pelle; b),c) assorbimenti a 528.0eV e 530.6eV; d) distribuzione delle molecole sonda in funzione della profondità della cute. La scala è indicata dalla linea nera, corrispondente a 20 $\mu$ m. [121]

- Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) [123], tecnica che permette di separare diverse sostanze liquide sciolte in un solvente. Il principio di funzionamento è basato sulla diversa affinità delle sostanze coinvolte con una fase solida stazionaria (aggregati micrometrici) e una fase mobile liquida presenti nello strumento, costituito da una colonna cromatografica: al crescere dell'affinità della sostanza studiata con la fase stazionaria, essa impiegherà più tempo per attraversare la colonna, guidata dalla fase mobile in pressione. Al fondo della colonna possono essere collocate varie tipologie di rivelatori, quali spettrofotometri, rivelatori elettrochimici o uno spettrometro di massa, in grado di identificare le specie presenti nella soluzione iniziale, che impiegheranno tempistiche differenti per attraversare la colonna cromatografica: tramite una valutazione temporale dei grafici elaborati dalle strumentazioni, è possibile caratterizzare la soluzione analizzata. Lo strumento dai segnali in input elabora un cromatogramma, nel quale le varie specie uscenti dalla colonna vengono classificate nel tempo in funzione del segnale rilevato. Nel caso del rilascio controllato di farmaco, si può applicare questa tecnica di analisi a tutte le soluzioni coinvolte nelle operazioni, come ad esempio le fasi verso le quali avviene il rilascio o i liquidi di lavaggio della strumentazione. In Fig. 1.23 riportiamo un esempio di cromatogramma, risultante dalla filtrazione di una soluzione di urina contenente principi attivi, a opera di fibre cave micrometriche.

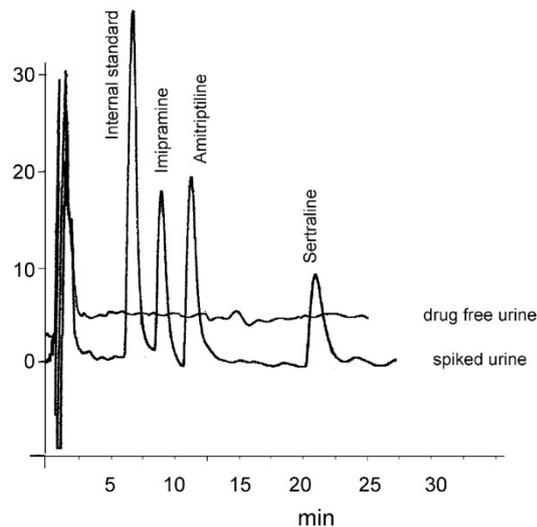


Fig. 1.23 - Cromatogramma risultante dalla separazione di due soluzioni di urina con HPLC [123]

- Gascromatografia [124]: basata su principi analoghi alla tecnica precedente, vede il riscaldamento di un campione e il flussaggio delle specie gassose da esso allontanate in una colonna cromatografica. Il campione deve essere sufficientemente volatile nell'intervallo di temperatura raggiungibile dallo strumento, e per separare i gas ottenuti essi sono forzati ad attraversare una fase fissa (liquida o solida), guidati da una fase mobile costituita da un gas inerte. In base alla differente affinità con la fase fissa e mobile, le fasi gassose impiegheranno tempi diversi per fuoriuscire dallo strumento. All'estremità della colonna cromatografica sono posti dei sensori in grado di caratterizzare le specie uscenti nel tempo: i più utilizzati sono lo spettrometro di massa, i rivelatori a ionizzazione di fiamma e a conducibilità termica, per dare in output un cromatogramma. In Fig. 1.24 è riportato un cromatogramma relativo allo studio di plasma umano contenente del principio attivo. Si possono effettuare discorsi analoghi alla tecnica precedente in elenco, per quanto concerne le applicazioni nel campo del rilascio controllato di farmaco da sistemi transdermici.

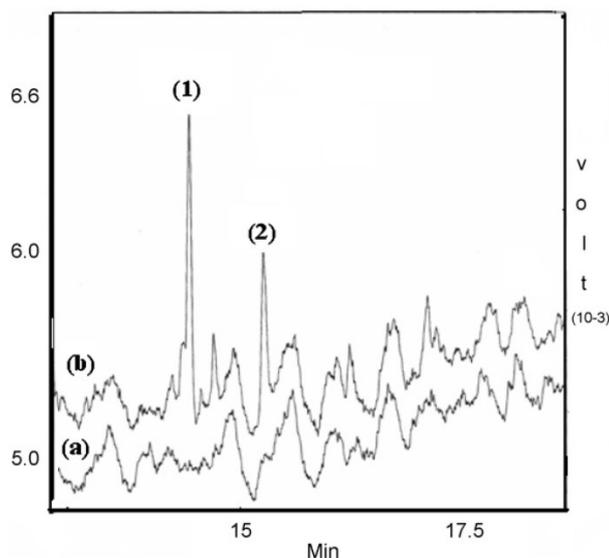


Fig. 1.24 - Cromatogramma di plasma umano senza principio attivo (a) e plasma contenente due principi attivi (b) [124]

- Spettrofotometria UV-visibile [66, 90, 115, 125] sui sistemi liquidi in gioco, per misurare le concentrazioni dei principi attivi considerati: basata sugli studi in campo spettrofotometrico e chimico dei fisici J. H. Lambert e A. Beer del XVIII e XIX secolo [126], vede l'invio di un fascio di luce monocromatica sul campione (di intensità  $I_0$ ) e la misura dell'intensità del fascio trasmesso (di intensità  $I_T$ ): in questo modo si valuta una grandezza rappresentativa della quantità di luce esso assorbita, l'assorbanza  $A$ , attraversando il campione lungo  $l$  e contenente l'analita caratterizzato dalla concentrazione  $C$  e da un coefficiente di estinzione molare  $\epsilon$ . La relazione utilizzata da questa tecnica analitica è la seguente:

$$(7) \quad \log_{10} \frac{I_0}{I_T} = A = \epsilon l C$$

La formula prima espressa è valida solo nel regime di linearità tra assorbanza e concentrazione: per concentrazioni estremamente basse si ha un errore dato dalla precisione dello strumento, mentre per concentrazioni eccessive si esce dalle linearità dell'equazione: in quest'ultimo caso, in particolari per valori di assorbanza misurata maggiori di 1.5 sarà necessario effettuare delle diluizioni - che verranno inserite nella formula per determinare la massa di soluto

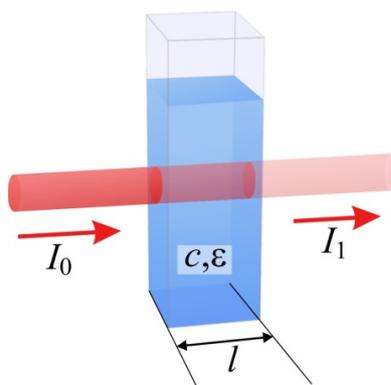


Fig. 1.25 - Schema di funzionamento della tecnica di spettroscopia UV-visibile [127]

Il raggio entrante avrà diverse lunghezze d'onda, e verrà assorbito in corrispondenza di quelle in grado di interagire con i possibili soluti, dando nel grafico un picco di assorbanza (in corrispondenza di quella che è nota come  $\lambda_{max}$ ): essi sono caratterizzati da degli specifici gruppi cromofori, contenenti elettroni di legame in grado di dare determinate transizioni energetiche se eccitati da radiazioni luminose. L'altezza del picco di assorbanza in corrispondenza di tale lunghezza d'onda è proporzionale alla concentrazione di tale molecola, pertanto in questo modo si può determinare la massa di soluto presente nel volume analizzato. Per rendere quantitativa la misura di assorbanza al variare della lunghezza d'onda del raggio incidente, bisogna confrontare l'assorbanza della soluzione con l'assorbanza del solvente puro. Lo strumento è fornito di due postazioni per due cuvette attraversate entrambe da due raggi distinti. E' necessaria pertanto una misura preliminare con il cosiddetto *bianco*, ovvero tarare lo strumento ponendo nelle due celle il solvente della soluzione da analizzare, in modo che i picchi del solvente non vengano più riportati e nelle misure seguenti risultino solo quelli del soluto. Nelle misure successive, la cuvette con il bianco dovrà essere mantenuta nell'apposita sede, mentre nella seconda cuvette andranno posti i campioni da analizzare: il grafico di raccolta dati dello strumento vedrà l'andamento dell'assorbanza in funzione della lunghezza d'onda.

Variando la concentrazione di un soluto nel medesimo solvente tra valori noti, si può misurare la variazione dell'assorbanza e costruire una retta di taratura: la pendenza di tale retta permette di ricavare da un qualsiasi valore misurato di assorbanza la massa di soluto sciolta in un volume  $V$ , senza dover conoscere il coefficiente di estinzione molare alla lunghezza d'onda  $\lambda$  e lo spessore del portacampione.

$$(8) \quad m_{SOLUTO} = \frac{A \cdot V \cdot \text{diluizion}}{\text{pendenza}_{RETTA \ TARATURA}}$$

La caffeina, molecola utilizzata per questo studio di drug delivery, presenta un picco di assorbimento massimo nel vicino UV, a 273nm, ed è molto attiva già a basse concentrazioni, quindi presumibilmente andranno sovente effettuate diluizioni.

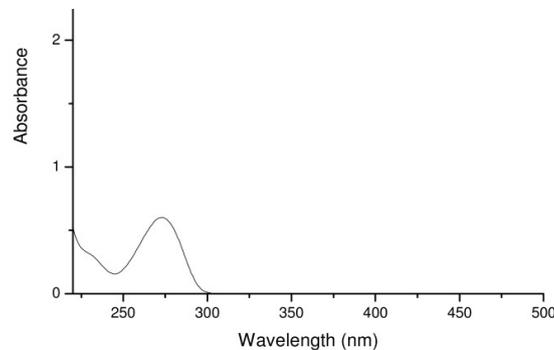


Fig. 1.26 - Esempio di spettro di assorbimento della caffeina, caratterizzato da un picco a 273nm [128]

Un discorso analogo è applicabile allo studio della colorazione di tessuti [125], dove si confrontano gli spettri UV della fase liquida prima e dopo il trattamento delle fibre: l'efficienza di fissaggio del colorante è stata valutata dalla differenza di altezza del picco di assorbanza, prima e dopo il trattamento, in corrispondenza della lunghezza d'onda caratteristica del colorante,  $\lambda_{max}$ .

Nel caso dei sistemi transdermici a rilascio controllato di farmaco:

- si possono misurare le concentrazioni del principio attivo contenuto nella fase liquida funzionalizzante prima e dopo il trattamento (per avere un dato di efficienza del processo);
- durante il rilascio controllato, lo si può quantificare misurando la sua concentrazione nelle soluzioni di raccolta dopo specifici intervalli temporali;
- infine, si può estrarre con apposito solvente il principio attivo residuo dai materiali esausti.

- Diffusione dinamica della luce (*Dynamic Light Scattering - DLS*) [66, 70,74] : tramite l'analisi con DLS si può determinare la taglia delle particelle in una sospensione colloidale e la loro distribuzione in massa. Questa tipologia di analisi prevede l'irraggiamento del sistema da analizzare con radiazioni di determinate frequenze: in questo modo si ottiene una loro dispersione in seguito all'interazione con gli aggregati solidi, caratterizzati da un moto browniano dentro al liquido. Questo tipo di moto causa pertanto scattering e variazioni nel tempo dell'intensità di luce diffusa misurata dal detector, dove la rapidità di variazione risulta inversamente proporzionale alla massa della fase dispersa. Il coefficiente di diffusione di materia  $D$  (il potenziale scalare della velocità delle particelle nel mezzo all'interno del quale esse si trovano) si ricava da quest'ultimo parametro con una funzione di correlazione, e tramite l'equazione di Stokes-Einstein [129] è possibile valutare le dimensioni caratteristiche dei solidi  $r$  (diametro idrodinamico):

$$(9) \quad r = \frac{k_B T}{6\pi\eta D},$$

con  $k_B$  la costante di Boltzmann,  $T$  la temperatura e la viscosità del fluido  $\eta$ .



Fig. 1.27 - Macchinario per l'analisi DLS, analogo a quello utilizzato nel corrente lavoro [130]

Lo strumento utilizzato permette anche di calcolare l'indice di polidispersità (relativo all'uniformità di distribuzione dei pesi molecolari ottenuti) e il potenziale zeta -  $\zeta$  -, derivante dalla formazione di un doppio strato elettrico in una sospensione colloidale caratterizzata da un moto Browniano: tale potenziale influirà direttamente la stabilità della fase dispersa rispetto all'aggregazione, derivante da interazioni elettrostatiche. Nel caso di sospensioni di nanoparticelle, un valore di potenziale zeta elevato (in modulo maggiore di 30mV) implica la reciproca repulsione tra di esse, prevenendone l'aggregazione e quindi il relativo aumento di massa: nello studio in considerazione, si è voluto produrre un sistema liquido contenente nanoparticelle disperse di PCL caricate con caffeina, pertanto i parametri del raggio medio, della polidispersità e del potenziale zeta sono stati valutati con particolare attenzione. [131]

Le modalità operative programmate per il presente lavoro prevedono la sintesi di due frazioni diverse di nanoparticelle, con la funzionalizzazione con caffeina solo nel secondo caso: in questo modo si potrà confrontare la sintesi di nanoparticelle senza caffeina con una seconda sintesi con il principio attivo, in modo da poter ricavare parametri importanti per lo studio quali l'efficienza di incapsulamento, l'influenza della caffeina in parametri fisici delle nanoparticelle come il diametro e la distribuzione in taglia. Lavorando con una sospensione di nanoparticelle contenenti caffeina, come prima accennato il principio attivo si distribuirà nel seguente modo:

- parte del principio attivo rimarrà libera nel solvente - quantificabile sottoponendo il surnatante a un'analisi UV-visibile, misurando l'altezza del picco relativo alla caffeina nello spettro;
- la restante parte, pari alla differenza tra la caffeina presente nella soluzione di partenza utilizzata nel reattore e quella presente nel surnatante, sarà contenuta nelle nanoparticelle o legata alla loro superficie.

Una volta stabilito il volume di sospensione da depositare sul tessuto, la caffeina che presente sul materiale è facilmente calcolabile facendo la proporzione relativamente ai precedenti calcoli.

In seguito alla funzionalizzazione per imbibizione e asciugatura dei tessuti, sono stati raccolti i dati relativi all'efficienza dei processi di trattamento e al rilascio controllato di caffeina nel tempo, eseguito su membrane in grado di simulare la pelle in apposite celle per il drug delivery: la quantificazione di principio attivo viene eseguita con analisi di spettroscopia uv-visibile. Nei grafici che verranno elaborati si cercherà di distinguere tra il rilascio di caffeina dovuto a quella libera sulle fibre di tessuto (derivante dal surnatante) e quella legata alle nanoparticelle: ciò sarà possibile perché i due fenomeni seguono due cinetiche nettamente diverse, e il fenomeno controllante sarà presumibilmente il secondo, perché la caffeina libera sul tessuto potrà diffondere molto più velocemente di quella incapsulata.

#### 1.4.4 Il cotone e la viscosa

I tessuti a disposizione per la caratterizzazione del rilascio di caffeina da nanoparticelle di policaprolattone, sono stati i seguenti:

- Cotone 100%;
- Cotone 50%, viscosa 50%;
- Viscosa 100%.

Per un confronto ottimale, i tessuti scelti per la funzionalizzazione sono caratterizzati dalla medesima struttura *single jersey* (Fig. 1.28): nello studio di Li [115], si confronta la funzionalizzazione di tessuti del medesimo materiale con trame differenti. I materiali utilizzati per la funzionalizzazione del corrente lavoro presentano proprietà chimico-fisiche differenti, principalmente in relazione al diametro delle fibre e alla loro natura. Come prima accennato, due serie delle tre tipologie di tessuti verranno funzionalizzate nelle medesime condizioni operative, con due sistemi differenti - caffeina libera o incapsulata in nanoparticelle di policaprolattone: in questo modo verranno valutati i parametri coinvolti nel rilascio controllato, a partire dall'efficienza di funzionalizzazione, fino alla cinetica effettiva di diffusione del principio attivo.

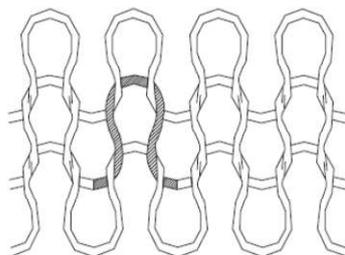


Fig. 1.28 - Struttura single jersey [57]

Le fibre utilizzate sono tutte costituite da cellulosa, ma differiscono in quanto il cotone vede come materia prima il fiore della omonima pianta (*bambagia*), mentre la viscosa si ottiene da trattamenti chimico-meccanici della polpa lignea [57, 58, 132].

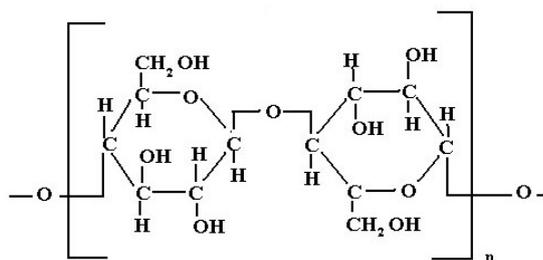


Fig. 1.29 - Unità strutturale della cellulosa [133]

Il cotone [122, 132, 134] è composto dalle seguenti componenti<sup>3</sup> :

- 88.0-96.5% cellulosa;
- 1.0-1.9% proteine;
- 0.4-1.2% cere;
- 0.4-1.2% polisaccaridi;
- 0.7-1.6% residui inorganici;
- 0.5-8% altre sostanze.

All'apertura dei fiori della pianta di cotone, da essi si separano i semi e la bambagia: quest'ultima, un involucro bianco e fibroso, subisce una serie di operazioni meccaniche preliminari prima di dare origine a fibre corte, che verranno poi filate per dare origine alle fibre lunghe di cotone.

La viscosa [132, 134] si ottiene invece dalla rigenerazione di polpa o fibre cellulosiche (come il cotone), processo che coinvolge trattamenti chimici (con solfuro di carbonio, soluzioni di idrossido di sodio, ossidazione e idrolisi) e meccanici (pressatura, triturazione, filtrazione, deaerazione) che portano all'estrusione e alla sua filatura in acido solforico dell'intermedio noto come *rayon* viscosa. Successivi processi meccanici, analoghi a quelli del cotone, vedono il lavaggio, la filatura e la formazione delle fibre lunghe di viscosa. Modificando adeguatamente i parametri di processo si ottiene il *modal*, un tipo di fibra di viscosa caratterizzato in generale da migliori proprietà rispetto alla viscosa rayon: nel campione di viscosa utilizzato nel presente lavoro, la percentuale di fibre modal è del 100%. Tipicamente, i valori percentuali di cellulosa nella viscosa si assestano intorno a quelli caratteristici del cotone, e in funzione delle operazioni effettuate varieranno le percentuali di componenti non cellulosici, comprensivi anche dei reagenti utilizzati nei trattamenti. Sono possibili trattamenti chimici molto drastici per lasciare solo la componente cellulosica, ma ciò può causare una riduzione delle proprietà meccaniche [57]. Come spiegato nella sezione relativa ai pretrattamenti da noi adottati, essi sono in grado di operare una pulizia sufficiente ad aumentare l'idrofilia e quindi l'efficienza nella funzionalizzazione e nel rilascio controllato di un principio attivo. Le fibre di viscosa presentano aspetto e proprietà chimico-fisiche diverse dal cotone [132]: nel caso in analisi, vanno considerati i notevoli aumenti di bagnabilità, idrofilia e assorbimento di acqua (possono assorbirne fino al 100% della loro massa). La morfologia delle fibre di cotone [58] risulta nettamente differente rispetto a quella della viscosa [135]: nel primo caso la parte più esterna delle fibre è costituita da microfibrille intrecciate e altre componenti non cellulosiche, che si dispongono naturalmente in un'architettura convoluta ad elica; nel caso della viscosa, essendo prodotta artificialmente per estrusione e filatura dopo eliminazione delle componenti non cellulosiche, la morfologia risulta priva di convoluzioni nella direzione principale della fibra. Potendo controllare il diametro in uscita delle fibre di viscosa, esse possono essere prodotte come microfibre, ovvero caratterizzate da una massa inferiore o uguale a 1 grammo ogni 10 km di lunghezza.<sup>4</sup>

---

<sup>3</sup> La composizione delle fibre organiche vegetali varia molto in funzione dei parametri ambientali di crescita della pianta.

<sup>4</sup> Il *titolo* di un filato è una modalità per esprimerne la densità lineare, dove 1 Decitex (dtex) = 1 grammo ogni 10 km di filo (sottomultiplo del Tex). [132]

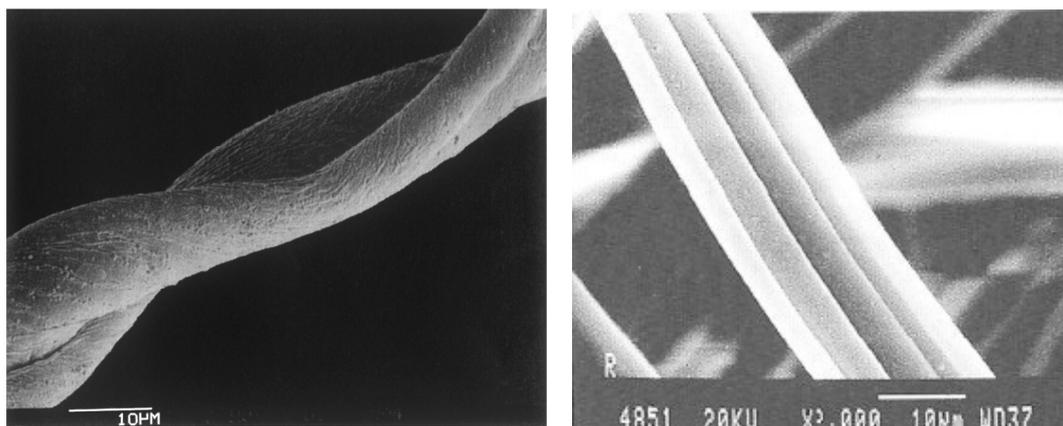


Fig. 1.30 - Immagini ottenute da osservazioni con microscopio elettronico a scansione di (A) cotone e (B) viscosa. [58,135]

Il terzo campione che verrà utilizzato è costituito dal 50% di fibre di cotone e dal 50% di fibre di modal, delle quali il 30% in microfibra. Gli studi sperimentali affrontati in questo lavoro saranno rivolti principalmente alla caratterizzazione dei rilasci da parte di nanosistemi ancorati alle tre tipologie di fibre appena descritte, in modo da valutarne l'effetto della tortuosità nel caso del cotone (che potrebbe risultare utile nel trattenere maggiormente i carrier al substrato) e dell'elevata area superficiale nel caso della viscosa (che risulta in un maggior numero di siti esposti sia all'ancoraggio che al rilascio in fase liquida). Nello studio di Pola [78], si evidenzia che una combinazione di fibre differenti permette un controllo maggiore sulla velocità di rilascio di principio attivo, prolungando l'effetto terapeutico del materiale funzionalizzato.

Il diametro delle fibre influenza in modo notevole il comportamento del materiale sia a livello fisico che chimico, in virtù della maggiore densità della trama ottenibile insieme a un incremento della superficie specifica: in particolare, questo parametro è di notevole importanza nel comportamento del materiale nei confronti dell'acqua o di altre sostanze funzionalizzanti. L'ordine di grandezza del diametro delle fibre<sup>5</sup> è compreso tra 15  $\mu\text{m}$  e i 30  $\mu\text{m}$  per le fibre macroscopiche, minore di 10  $\mu\text{m}$  nel caso del micromodal: in quest'ultimo caso, la superficie specifica esposta dalle fibre potrà essere di estensione maggiore fino a un ordine di grandezza.

In generale, i tessuti cellulosici immersi in acqua vedono un riarrangiamento delle cariche esterne sulle catene affacciate al liquido, che porta a una carica superficiale negativa (valutabile tramite il potenziale zeta) [136]: ciò potrà influenzare le dinamiche di funzionalizzazione e rilascio del farmaco considerato.

#### 1.4.5 Simulazione e quantificazione del rilascio

Per simulare un rilascio controllato di farmaco, è necessaria una strumentazione che imiti i fenomeni di diffusione cutanea: un esempio di apparato sperimentale largamente utilizzato [16, 37, 70, 78] in questo ambito di ricerca è la cella di Franz [38]. La cella di Franz permette la caratterizzazione della diffusione di un principio attivo attraverso una membrana semipermeabile, che simula la pelle.

Come indicato in Fig. 1.31, questa tipologia di cella di diffusione è dotata di:

- un vano recettore, riscaldato alla temperatura corporea di 33°C da una camicia esterna, che contiene un volume noto di soluzione fosfato salina, in grado di simulare le concentrazioni saline del sangue umano. Il volume interno è pari a 11.4mL, e un magnete ne garantisce la miscelazione continua, in modo da prevenire gradienti di concentrazione;

<sup>5</sup> Sono state utilizzate le tabelle di conversione nelle fonti riportate, che considerano le diverse densità dei materiali cellulosici, per dare una scala del diametro in funzione della relativa densità lineare ottenibile.

- di un vano donatore, attraverso il quale si avrà il passaggio del farmaco del quale si vuole caratterizzare il rilascio transdermico. Il diametro esterno del vano donatore è di 3cm, quello interno di 1.5cm.

Tra questi due contenitori è posizionata la membrana semipermeabile, che sarà continuamente bagnata dal liquido sottostante per dare diffusione del principio attivo verso la soluzione del vano recettore. Delle pinze metalliche permettono la chiusura in pressione dei due vani, in modo che lateralmente alla membrana filtrante non si abbia uscita di liquido.

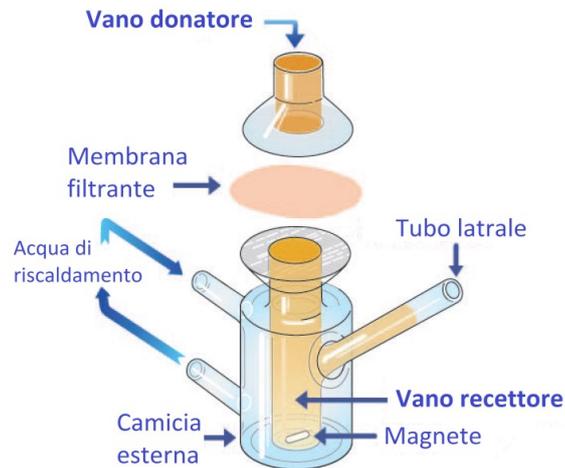


Fig. 1.31 - Schema della cella di Franz - Immagine adattata da [137]

Il principio attivo può essere introdotto nel vano donatore in vari modi, come soluto in un liquido o come solido depositato sulla membrana o su di un ulteriore strato di diffusione (come ad esempio il tessuto di un cerotto medicato).



Fig. 1.32 - Celle di Franz presso il laboratorio del Politecnico di Torino

Tramite prelievi periodici è possibile valutare la variazione di massa in funzione della variazione di assorbanza della soluzione nel vano recettore, dovuta alla diffusione del principio attivo attraverso la membrana: nel riportare a volume aggiungendo soluzione tampone vergine, andrà considerata la massa di principio attivo asportata a quel dato istante, e la massa complessivamente rilasciata sarà calcolata con una somma cumulativa.

## 2. Materiali e metodi

Nel corrente lavoro è stata svolta una parte sperimentale in parallelo a quella bibliografica relativa ai sistemi di drug delivery, studiando una tecnica di funzionalizzazione di fibre per un rilascio transdermico di farmaco. Nelle seguenti sezioni analizzeremo nel dettaglio la nanoprecipitazione di policaprolattone funzionalizzato con caffeina, prodotto tramite lo spostamento di solvente, e descriveremo anche altri parametri coinvolti nella sua sintesi, come la dimensione e la stabilità degli aggregati polimerici contenenti il principio attivo. Tratteremo poi nel dettaglio il pretrattamento di pulizia e la funzionalizzazione di tre tipologie di tessuti di natura cellulosica, impregnati con due differenti fasi funzionalizzanti: la sospensione di nanoparticelle di policaprolattone contenente caffeina precedentemente prodotta, e una soluzione acquosa a concentrazione nota di caffeina. In questo modo si effettuerà un confronto quantitativo dell'efficienza di funzionalizzazione e delle operazioni successive, che vedranno la quantificazione del rilascio di caffeina dai tessuti funzionalizzati. Con le analisi proposte sarà possibile simulare un rilascio transdermico da tessuti contenenti del principio attivo immobilizzato in un sistema nanometrico, per valutarne l'efficienza di rilascio e confrontare tre differenti tessuti di natura cellulosica, trattati nelle medesime condizioni. Le analisi svolte sono state effettuate in vista di ricerche future, per indagare le variabili in gioco e le possibili problematiche da considerare.

### 2.2 Pretrattamento tessuti

#### 2.2.1 Trattamenti di *desizing* e *scouring*

In questa sezione approfondiremo il metodo di pulizia di pretrattamento adottato per i tre tipi di tessuti il macchinario utilizzato è la Mathis LABOMAT [138], munito di 8 cilindri metallici dal volume interno di 400mL, isolati e sottoposti ai medesimi cicli di rotazione e temperatura. I tessuti a disposizione sono stati tagliati per ottenere dimensioni di 20cm x 40cm, con massa media misurata pari a 16g.



Fig. 2.1 - MathisLABOMAT e relativi cilindri metallici, presso il laboratorio della sede di Biella del Politecnico di Torino

Nel pretrattamento si è scelto di confrontare le ricette descritte in *Tab. 1*, che vedono una combinazione di agenti di desizing e di scouring.

**Tab. 1** - Valori delle ricette di pretrattamento adottata

<u><b>Ricetta A</b></u>		<u><b>Ricetta B</b></u>	
<i>Liquor ratio</i>	20:1	<i>Liquor ratio</i>	20:1
<b>SERAWASH N-NWA</b> <i>(liquido)</i>	1 g/L	<b>INVADINE DA-02</b> <i>(liquido)</i>	3 mL/L
<b>SERAWASH C-NEC</b> <i>(liquido)</i>	0.5 g/L	<b>INVATEX CS</b> <i>(liquido)</i>	1 mL/L
<b>SERASPERSE C-SN</b> <i>(liquido)</i>	1 g/L	<b>NaOH</b> <i>(solido)</i>	3 g/L
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (solido)</b>	4 g/L		

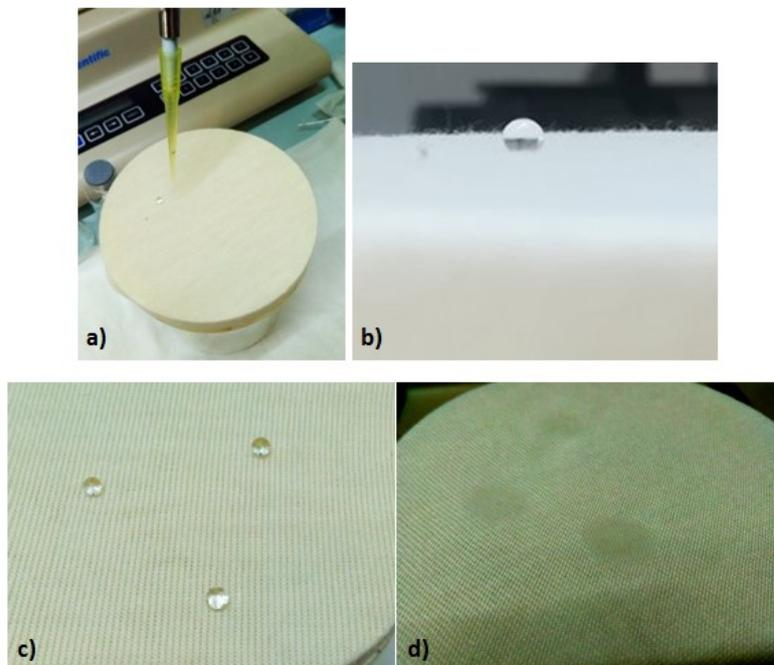
I tessuti da trattare sono stati tagliati in lembi da 20g, in modo da poter rispettare il liquor ratio in tabella con un volume del cilindro di trattamento pari a 400 mL. Una volta preparati i volumi di soluzione necessari per i cilindri in utilizzo della MathisLABOMAT, versarli in essi e controllare che il pH sia maggiore di 9; piegando i tessuti, immergerli in ciascun cilindro e collocarli in modo simmetrico nelle rispettive sedi del macchinario. Il ciclo scelto per il pretrattamento ha una durata di 35 minuti e una temperatura di mantenimento pari a 95°C, con rotazioni orarie e antiorarie per omogeneizzare il bagno di pulizia. Dopo il trattamento, il pH del liquido rimanente tra le fibre risulta fortemente basico, pertanto si è deciso di effettuare un post-trattamento manuale in soluzione di acido citrico 2.2 g/L per operare una neutralizzazione; al fine inoltre di non rovinare le fibre con eventuali residui dei prodotti utilizzati, esse necessitano di un lavaggio in acqua.



*Fig. 2.2* - In figura sono riportati in alto i tre tessuti di partenza, e in basso gli stessi materiali dopo pretrattamento con la ricetta A (seconda riga) o con la ricetta B (terza riga), e asciugatura - in ordine da sinistra: 100% Cotone, 50% Cotone 50% Viscosa; 100% Viscosa

## 2.2.2 Test della goccia

Nel confronto tra i tessuti studiati, è stato scelto l'assorbimento come fattore discriminante per l'applicazione del liquido contenente caffeina, in soluzione o in sospensione: migliore sarà tale proprietà, migliore in termini quantitativi e di omogeneità risulterà la funzionalizzazione da noi operata. La procedura descritta per misurare il tempo di bagnabilità dei campioni è in grado di fornire un metro di confronto pseudo-quantitativo tra diversi tessuti e tra varie zone di uno stesso materiale. Per eseguire il test della goccia è necessario porre in completa planarità il tessuto da testare, portandolo in tensione: lasciando cadere su di esso da una micropipetta una goccia di acqua bidistillata, va misurato l'intervallo di tempo dove essa risulta visibile, ovvero prima che essa non mostri più riflessione speculare sotto alla luce artificiale. Il tempo necessario affinché essa diventi una macchia sulla superficie delle fibre è un parametro di confronto per la bagnabilità dei diversi materiali: come indicato in *Fig. 2.3*, tessuti bagnabili vedranno tempi vita delle gocce prossimi a zero, al contrario su tessuti scarsamente bagnabili le gocce impiegheranno di più a scomparire.



*Fig. 2.3 - Nelle quattro fotografie sono riportate le procedure sperimentali del test della goccia, in particolare riportando in a) e b) un tessuto non bagnabile, mentre in c) un tessuto bagnabile (per visualizzare meglio la presenza delle macchie umide, è stato aumentato notevolmente il contrasto della fotografia)*

## 2.3 I sistemi liquidi per la funzionalizzazione superficiale dei tessuti

Per valutare l'effetto dei carrier nanometrici di policaprolattone sui tre tessuti studiati, sono state confrontate due tipologie di sistemi basati rispettivamente su fibre caricate con caffeina libera e le seconde con aggregati polimerici contenenti il medesimo principio attivo. Come prima introdotto, le metodologie sperimentali relative all'impregnazione di fibre si sono ispirate a un articolo di Rubio [16], riguardante il trattamento di tessuti a temperatura ambiente con caffeina in soluzione acquosa: in questo studio si è utilizzata una concentrazione di 9 mg/mL di caffeina in acqua - lontana dalla concentrazione di saturazione. Per poter confrontare i risultati con quelli riportati in letteratura, i tre tessuti da confrontare verranno trattati con due sistemi liquidi differenti:

- soluzione di caffeina libera con concentrazione 9mg/mL;
- sospensione caffeina contenuta in nanoparticelle di policaprolattone.

Nel secondo caso, la concentrazione di caffeina nella sospensione da utilizzare differirà da quella della soluzione di partenza, per via dell'efficienza di incapsulamento nel solido formatosi.

Per la sintesi delle sospensioni nanometriche contenenti caffeina si è utilizzato un reattore a getti collidenti confinati, con in ingresso da un lato acqua bidistillata e dall'altro una soluzione in acetone di policaprolattone 6 mg/mL e caffeina 9 mg/mL. Per allontanare il volume utilizzato di acetone, si riscalda in depressione l'ampolla contenente la fase liquida con un rotovapor, valutando l'efficienza del processo misurando la differenza di massa nel tempo. Successivamente all'allontanamento di acetone, il sistema sarà costituito da una sospensione di carrier polimerici contenenti caffeina e dispersi in acqua. Per poter avere un bianco analitico nella misura uv-visibile e valutare l'efficienza di sintesi del reattore, si è prodotta anche una sospensione di nanoparticelle prive di caffeina, utilizzando una soluzione di policaprolattone 6 mg/mL in acetone. Una volta prodotto un volume noto di sospensione, si procede con la sua centrifugazione per ottenere una separazione tra la fase solida e quella liquida: in questo modo è possibile asportare parte del surnatante per ottenere nanoparticelle contenenti caffeina incapsulata e libera nella rimanente fase liquida. Per il calcolo della caffeina complessivamente contenuta nella sospensione finale, distribuita tra le nanoparticelle e il surnatante, va eseguita una misura in uv-visibile del surnatante, nota la massa sciolta nella soluzione iniziale. Infine, tramite un'analisi con DLS si misura la dimensione media degli aggregati nanometrici.

### 2.3.2 Analisi con DLS

L'analisi DLS viene effettuata tramite un macchinario Zetasizer Malvern, collegato a un computer con apposito software di elaborazione dati: nelle relative cuvette va posto un volume di 100  $\mu$ l di sospensione da analizzare insieme a 1mL di acqua bidistillata. Lo strumento, tramite i fenomeni alla base dell'analisi prima descritti, fornisce dati relativi alla distribuzione in massa del raggio idrodinamico degli aggregati solidi e al potenziale zeta della sospensione.

### 2.3.3 Analisi con spettrometria UV

L'analisi UV-visibile viene svolta su soluzioni campione, eventualmente diluite, poste in cuvette da 3 mL di volume: la strumentazione è collegata a un software di analisi online, in grado di riportare a video gli spettri misurati. Utilizzando la consolle, è possibile misurare l'altezza dei picchi in assorbanza specifici del principio attivo e da essa calcolare la massa di tale molecola presente in soluzione.

Le soluzioni che verranno analizzate nella sezione sperimentale saranno le seguenti:

- Caffeina in acqua: Pendenza retta di taratura = 59.381
- Caffeina in soluzione fosfato salina: Pendenza retta di taratura = 53.104
- Caffeina in acetonitrile: Pendenza retta di taratura = 47.024

## 2.4 Imbibizione dei tessuti

Per la funzionalizzazione delle tre tipologie di tessuti verranno utilizzate la soluzione di caffeina e la sospensione di nanoparticelle di policaprolattone contenenti caffeina prima descritte; per entrambi i sistemi si è scelto di utilizzare la medesima metodologia di deposizione. In ogni ciclo di deposizione si trattano quattro campioni circolari del medesimo tessuto, ritagliati secondo il profilo esterno del vano superiore delle celle di Franz - in modo da avere una corretta superficie esposta al vano recettore. Per evitare la perdita eccessiva di principio attivo nella deposizione, ciascun tessuto è posto sulla relativa membrana cellulosica utilizzata in seguito nel rilascio: prima di eseguire la deposizione, è fondamentale un loro trattamento in acqua bollente, in modo da rimuovere residui di appretto - come il glicerolo -, che ne limitano l'idrofilia. Prima e dopo tale lavaggio, occorre valutare l'aumento di idrofilia lasciando scivolare una goccia di acqua bidistillata sulla superficie: la bagnabilità della membrana serve tra quest'ultima e il tessuto, per usare il liquido come mezzo di trasporto; nel caso in analisi, interessa il trasporto selettivo del soluto (caffeina) e non del solvente (acqua) dal vano donatore tramite la membrana cellulosica, che però deve essere bagnabile per interagire con la soluzione

Utilizzando una micropipetta, si opera la funzionalizzazione del set di tessuti con il medesimo volume di fase liquida, 0.5 mL, che conterrà lo stesso quantitativo di caffeina: la deposizione dei sistemi liquidi deve essere eseguita con attenzione, per evitare che si perda del liquido nel contenitore sottostante. Si è scelto di effettuare un lavaggio in acetonitrile dei contenitori dove sono collocati membrane e tessuti, in modo da quantificare l'efficienza del processo. Nel caso dell'utilizzo della sospensione, essendo un sistema eterogeneo, una complicazione risiede nell'effettuare prelievi omogenei di nanoparticelle disperse in un liquido, per caricare nello stesso modo tutti i tessuti. Conoscendo la concentrazione della caffeina incapsulata (tramite la formula dell'efficienza di incapsulamento) e di quella libera nel surnatante asportato (misurata con lo spettrofotometro), si ricava la caffeina totale contenuta nella sospensione residua. Infine, per l'aspirazione dei volumi omogenei per la deposizione, occorre scuotere la provetta sigillata disperdendo la fase solida: in questo modo si effettuerà un prelievo più riproducibile nei confronti delle frazioni di solido e liquido. Occorre prestare particolare attenzione alla separazione tra surnatante e nanoparticelle, una volta trascorso il tempo necessario alla sedimentazione di queste ultime: per trattare nello stesso modo tutti i campioni, è necessario prelevare volumi ipoteticamente omogenei di sospensione con le stesse frazioni di liquido e solido. In risposta a questo problema, si è scelto di agitare la provetta contenente la sospensione funzionalizzante prima del suo utilizzo. Per quanto riguarda il quantitativo di caffeina presente sui tessuti, essa dipenderà pertanto dalla massa di caffeina libera nel surnatante (misurata tramite spettroscopia uv-visibile dopo centrifugazione) e dal quantitativo medio incapsulato nella frazione solida della sospensione (calcolato tramite l'efficienza di incapsulamento). Durante le fasi di impregnazione nelle quali è suddiviso il volume da utilizzare, i tessuti vengono sottoposti ad asciugatura forzata in atmosfera controllata.



Fig. 2.4 - Strumentazione in uso nella funzionalizzazione dei tessuti.

Durante i trattamenti di impregnazione, parte del liquido può andare in contatto con le pareti della capsula e portare a perdite di caffeina: occorre pertanto sottrarre alla massa depositata sui quattro campioni di partenza, nota, il quantitativo rimasto sul fondo del contenitore di imbibizione - e pertanto non presente sui quattro tessuti -, misurato con l'UV del liquido di lavaggio della capsula. In questo modo è possibile valutare la massa di principio attivo effettivamente caricata su ciascun campione. Il lavaggio dei contenitori dove erano posizionate le membrane e i tessuti viene eseguito con le seguenti metodologie:

- nel caso della caffeina libera, porre un volume noto di acqua bidistillata nella capsula di Petri utilizzata per la preparazione dei tessuti, agitare manualmente per 1 minuto per sciogliere gli eventuali residui di caffeina e analizzarne 3 mL con l'UV;
- nel caso di fibre funzionalizzate con nanocapsule di policaprolattone contenenti caffeina, il quantitativo non depositatosi andrà determinato in modo analogo, sciogliendo il residuo sul fondo e facendone la spettrometria. Per fare ciò occorre utilizzare l'acetone, un solvente del polimero. Per l'utilizzo di tale solvente, munirsi di guanti e siringa apposite, prestando attenzione a lavare i contenitori polimerici per un tempo limitato.

## *2.5 Rilascio di caffeina da tessuti funzionalizzati*

Le metodologie sperimentali riguardanti la quantificazione del rilascio controllato di caffeina a partire dai tessuti funzionalizzati sono basate sugli studi già citati compiuti con le celle di Franz [16, 37, 70, 78]. Nel caso in analisi, verranno studiate le singole cinetiche di rilascio dei vari sistemi, per poterne valutare l'efficienza del drug delivery.

Per ciascuno dei tre tessuti avremo due tipologie di funzionalizzazione, con caffeina libera o contenuta in nanoparticelle, per un totale di sei combinazioni: lavoreremo nei singoli rilasci con quattro celle in parallelo, per poter costruire una barra di errore tramite la valutazione della deviazione standard delle misure di assorbanza delle quattro diverse soluzioni recettive - ricavando poi una curva dell'evoluzione temporale dell'assorbanza media. Per simulare in modo corretto un'applicazione di un sistema transdermico sulla pelle, prima dell'utilizzo dei tessuti si è scelto di capovolgerli in modo che la parte imbibita sia affacciata alla membrana.

Dopo aver riempito il vano recettore delle celle con la soluzione tampone, porre su ciascuno di essi il sistema membrana/tessuto - prestando attenzione ad averne la completa bagnabilità. Prima di iniziare il ciclo di rilascio è necessario avviare il sistema di riscaldamento delle celle a 33 °C (valore standardizzato per le prove di rilascio con questo macchinario [137]) e la relativa miscelazione: una volta applicato il tappo dello strumento sul tessuto, assicurandone la pressione con il sistema di chiusura, ha inizio la diffusione di caffeina da parte delle fibre, comprensiva di quella libera e di quella proveniente dalle nanoparticelle. A intervalli prestabiliti vengono effettuati dei campionamenti della soluzione nel vano recettore, in modo da quantificare la diffusione del principio attivo nel tempo con spettrofotometria uv-visibile: per eseguire il prelievo di liquido si è scelto di sollevare il tappo con i materiali coinvolti, per poter inserire nel centro del contenitore una pipetta, e asportare un campione omogeneo di soluzione. Per ottenere di nuovo il contatto dei materiali funzionalizzati con il liquido nel vano recettore è necessario portare a volume con nuova soluzione tampone, prestando attenzione a evitare la formazione di bolle in ogni passaggio sperimentale.

Viste le temperature operative, nel tempo il livello del liquido tende a diminuire, pertanto è necessario controllarlo periodicamente e aggiungerne il quantitativo eventualmente necessario affinché non si arrestino i fenomeni diffusivi. Si è scelto un campionamento per ogni campione ogni 10 minuti durante la prima ora, ogni mezz'ora nelle due ore successive, ogni ora fino alle 6 ore di rilascio e alle 24 ore dall'inizio dell'esperimento; la cella verrà spenta dopo 24 ore, che è stato valutato come il tempo di utilizzo medio di un cerotto medicato.

E' necessaria una caratterizzazione preliminare delle membrane cellulosiche, in modo da valutare in modo indipendente la loro interferenza nella cinetica complessiva di rilascio dal tessuto: una grande influenza la si avrà presumibilmente sulle velocità di diffusione e sulla caffeina complessivamente rilasciata all'equilibrio, che conseguentemente sarà il valore massimo raggiungibile con le fibre funzionalizzate - che potranno ad esempio trattenerne in parte. Per raccogliere i dati di questa caratterizzazione vanno eseguite le stesse operazioni sperimentali prima descritte, aggiungendo alcune accortezze:

- la fase donatrice sarà liquida, essendo impraticabile una impregnazione analoga a quella delle fibre. E' necessario pertanto prestare molta attenzione in tutte le fasi che implicano una movimentazione dello strumento;
- i prelievi nel tempo devono essere eseguiti unicamente dal tubo laterale, inserendovi una pipetta Pasteur. Nel caso si generino delle bolle nella camera principale della cella: è necessario farle uscire in seguito tenendo saldamente fermo il contatto con le pinze e ruotando il contenitore in modo da avere il tubo laterale rivolto verso l'alto, orientandole verso l'attaccatura del canale; portare nuovamente a volume nel tubo laterale ma inserendovi la pipetta solo in cima;

Una volta raccolti i dati relativi alle assorbanze misurate nel tempo, è possibile ricavare l'evoluzione temporale della concentrazione di caffeina nel vano recettore delle varie celle e la massa cumulativa diffusa dai tessuti. Al termine dei cicli di rilascio, occorre portare in soluzione il principio attivo rimasto non diffuso nelle membrane e nei tessuti utilizzati nelle celle di Franz, per valutare un bilancio di massa:

- effettuare in lavaggio in 50 mL di acqua bollente per 1 ora per i tessuti e le membrane precedentemente funzionalizzati con caffeina libera (posti in becher differenti, prestando attenzione a ricoprirli con un vetrino per evitare eccessiva evaporazione);
- porre in singoli becher contenenti 25 mL di acetonitrile i tessuti precedentemente funzionalizzati con nanoparticelle e le relative membrane, per sciogliere quelle eventualmente rimaste in esse bloccate <sup>1</sup>.

In seguito alle operazioni appena descritte, raccogliere 10 mL dei vari liquidi di analisi in vials di vetro e analizzarli all'UV, effettuando la calibrazione con i bianchi dei relativi solventi.

## 2.6 Tampone fosfato salino - PBS

Nel rilascio controllato con la cella di Franz si utilizza la soluzione PBS per simulare i fluidi dell'organismo. Essa deve avere un pH pari a 7.4 e possiede la seguente composizione:

**Tab. 2** - Composizione della soluzione tampone fosfato salina [18]

<i>Sale</i>	<i>Concentrazione</i> [mmol/L]	<i>Concentrazione</i> [mg/mL]
<i>NaCl</i>	137	8,00
<i>KCl</i>	2,7	0,20
<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O</i>	8,1	1,44
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	1,76	0,24

<sup>1</sup> E' necessario utilizzare gli strumenti di protezione per la movimentazione del solvente in uso (guanti in nitrile e siringa per perforare la membrana igroscopica del contenitore del solvente), e agitare per qualche secondo con una bacchetta di vetro prestando attenzione a non sciogliere il contenitore polimerico.



### 3. Risultati e discussioni

Nelle seguenti tabelle e nei relativi grafici, ciascun materiale è riportato con la sua sigla - *100%C*, *50%C-50%V*, *100%V-*, mentre le due tipologie di funzionalizzazione sono indicate rispettivamente con *Caf*, nel caso di tessuti trattati con soluzione di caffeina libera, e *NP* nel caso dei campioni trattati con sospensione di nanoparticelle di policaprolattone contenenti caffeina. I grafici e le tabelle complete sono presenti nella parte di *Appendice*.

#### 3.1 Pretrattamento tessuti

##### 3.1.1 Composizione soluzioni di desizing e scouring

In *Tab. 3* riportiamo i valori dei volumi e delle masse utilizzate nel ciclo di pulizia dei tessuti, calcolati in funzione delle concentrazioni previste dalle due formulazioni.

**Tab. 3** - Composizione delle soluzioni di desizing e scouring

<b><u>Ricetta A</u></b>	
<b><i>Liquor Ratio</i></b>	20:1
<b><i>Massa media tessuti</i></b>	16g
<b><i>Volume acqua necessaria</i></b>	328 mL $\approx$ 0.33 L
<b><i>Massa SERAWASH N-HWA</i></b>	$1 \text{ g/L} \cdot 0.33 \text{ L} = 0.33 \text{ g}$
<b><i>Massa SERAWASH C-NEC</i></b>	$0.5 \text{ g/L} \cdot 0.33 \text{ L} = 0.175 \text{ g}$
<b><i>Massa SERASPERSE C-SN</i></b>	$1 \text{ g/L} \cdot 0.33 \text{ L} = 0.33 \text{ g}$
<b><i>Massa carbonato di sodio</i></b>	$4 \text{ g/L} \cdot 0.33 \text{ L} = 1.32 \text{ g}$
<b><i>pH (misurato)</i></b>	10.5
<b><u>Ricetta B</u></b>	
<b><i>Liquor Ratio</i></b>	20:1
<b><i>Massa media tessuti</i></b>	16g
<b><i>Volume acqua necessaria</i></b>	328 mL $\approx$ 0.33L
<b><i>Volume INVADINE DA-02</i></b>	$3 \text{ mL/L} \cdot 0.33 \text{ L} = 0.99 \text{ mL}$
<b><i>Volume INVATEX CS</i></b>	$1 \text{ mL/L} \cdot 0.33 \text{ L} = 0.33 \text{ mL}$
<b><i>Massa idrossido di sodio</i></b>	$3 \text{ g/L} \cdot 0.33 \text{ L} = 0.99 \text{ g}$
<b><i>pH (misurato)</i></b>	12

### 3.1.2 Test della goccia

Per valutare il comportamento complessivo di un campione nei confronti della soluzione funzionalizzante, si è deciso di bagnarlo in cinque punti differenti, calcolando la media dei tempi di assorbimento di cinque gocce lasciate cadere in altrettanti punti del materiale: più il tempo misurato risulterà breve, maggiore sarà il grado di assorbimento del tessuto nei confronti dell'acqua bidistillata.

**Tab. 4** - Risultati sperimentali del test della goccia sui tessuti pretrattati

<i>Materiale</i>	$t_1$ [s]	$t_2$ [s]	$t_3$ [s]	$t_4$ [s]	$t_5$ [s]
<b>100% C non trattato</b>	60+	60+	60+	60+	60+
<b>50% C-50% V non trattato</b>	35	28	38	56	30
<b>100% V non trattato</b>	0	0	0	0	0
<b>100% C Ricetta A</b>	0	0	0	0	0
<b>50% C-50% V Ricetta A</b>	0	0	0	0	0
<b>100% V Ricetta A</b>	0	0	0	0	0
<b>100% C Ricetta B</b>	0	0	0	0	0
<b>50% C-50% V Ricetta B</b>	0	0	0	0	0
<b>100% V Ricetta B</b>	0	0	0	0	0

Notiamo che i materiali 100% cotone e 50% cotone - 50% viscosa non trattati mostrano tempi di assorbimento della goccia elevati, indice di idrofobia maggiore rispetto agli stessi materiali che hanno subito i trattamenti di desizing e scouring, mentre la viscosa presentava un elevato assorbimento già in partenza: questi dati confermano l'idoneità della metodologia di pretrattamento scelta.

Ottenendo in tutti i campioni il completo assorbimento della goccia, possiamo concludere che potranno comportarsi in modo ottimale nella funzionalizzazione e nel successivo rilascio del principio attivo; non avendo ottenuto risultati confrontabili, essi non possono essere utilizzati come metro di paragone per scegliere i più idonei nell'applicazione di un layer contenente principio attivo o nanosfere. Inoltre, un assorbimento pressoché immediato non è direttamente un indice del corretto rilascio del principio attivo, in quanto potrebbe anche rilasciarlo troppo velocemente (in modo analogo a come viene assorbito velocemente) e le nanosfere potrebbero non rimanere legate alle fibre: tramite lo studio dei depositi residui nei contenitori utilizzati per le deposizioni, si potrà quantificare la massa non depositata sulle fibre. Servono ulteriori test quantitativi di idrofilia (come l'angolo di contatto [139] e *moisture management test* [140] - in grado di fornire una valutazione complessiva del comportamento di un tessuto con l'acqua) per vedere quale tessuto abbia il comportamento migliore nei confronti di un colorante, e quindi di una soluzione impregnante contenente principio attivo e/o carrier. Per la scelta della soluzione di pulizia migliore per i tessuti da funzionalizzare, si è utilizzata pertanto una valutazione visiva del grado di pulizia e sbiancamento: i campioni trattati con la ricetta A risultano migliori rispetto a quelli del secondo gruppo.

### 3.2 Funzionalizzazione dei tessuti

Per la produzione delle sospensioni si utilizzeranno nel primo caso una soluzione di PCL 6 mg/mL e caffeina 9 mg/mL in acetone, nel secondo una soluzione 6 mg/mL di PCL in acetone, entrambe da fare miscelare nel CIRJ con acqua bidistillata. In tutte le prove che effettueremo verrà allontanato tutto l'acetone presente in sospensione con il rotovapor: la massa di ciascun sistema liquido diminuirà pertanto di un valore pari al volume di acetone (3 mL in ciascun ciclo) moltiplicato per la sua densità (0.786 g/mL).

#### 3.2.1 Nanoparticelle senza caffeina

Otteniamo 11.325 g di sospensione, costituita da 8.325 g di nanoparticelle di PCL.

Effettuando le prove al DLS solo PCL, si misura è misurato un diametro medio degli aggregati pari a 311.6 nm e un indice di polidispersità medio pari a 0.0317.

#### 3.2.2 Nanoparticelle con caffeina

Le tre sospensioni prodotte hanno massa rispettivamente pari a 8.37 g, 8.56 g, 8.42 g - comprensive di nanoparticelle, caffeina e acqua antisolvente: impostando il volume di avanzamento delle siringhe pari a 3 mL nella sospensione prodotta si avranno 27 mg di caffeina e 18 mg di policaprolattone. Al termine dei tre cicli di produzione, le sospensioni vengono miscelate insieme, per dare una massa complessiva di 24.33 g. Effettuando le prove al DLS sui tre sistemi prodotti, si è misurato un diametro medio pari a 353.71 nm e un indice di polidispersità medio pari a 0.135.

Dopo il trattamento di evaporazione dell'acetone, nei vari casi prodotti la massa finale è pari a:

- 5.982 g nel caso della sospensione senza caffeina;
- 17.11 g nel caso della sospensione con caffeina.

Per quantificare la caffeina rimasta libera nel surnatante sono state misurate le tre relative assorbanze con l'UV, e la massa di principio attivo è stata calcolata con la precedente relazione (8): la retta di taratura utilizzata è stata quella della caffeina in acqua, la diluizione è stata pari a 250 volte e il volume iniziale di 9 mL, comprensivo anche dell'acqua di quench presente prima della nanoprecipitazione. Essendo in ciascun campione la massa di partenza pari a 27 mg, dai valori prima misurati si possono ricavare le efficienze di incapsulamento e la caffeina presente nelle nanoparticelle.

Prima di effettuare l'impregnazione vanno asportati 7 mL di surnatante in ciascuna sospensione, pertanto i valori effettivi di caffeina risultano i seguenti:

**Tab. 5** - Valori di caffeina libera e incapsulata nei tre campioni prelevati

<i>Campione</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
<i>Assorbanza</i>	0.647	0.607	0.572
<i>Efficienza di incapsulamento</i>	9.2%	14.8%	19.7%
<i>Massa di caffeina libera iniziale [mg]</i>	24.515	23.000	21.674
<i>Massa di caffeina libera finale [mg]</i>	5.447	5.111	4.813
<i>Massa di caffeina incapsulata [mg]</i>	2.485	4.000	5.326
<i>Massa di caffeina totale [mg]</i>	7.932	9.111	10.139

Miscelando le tre sospensioni residue in una complessiva da 6 mL, saranno pertanto contenuti in totale 27.182 mg di caffeina suddivisi in:

- 15.371 mg di caffeina libera;
- 11.811 mg di caffeina incapsulata.

Nel momento in cui si aspira il volume di imbibizione, pari a 0.5 mL, andrà pertanto considerata sia la caffeina presente in soluzione che quella incapsulata nel sistema nanometrico - visto che entrambe si depositeranno sulle fibre. In media su ciascuno dei dodici tessuti avverrà la deposizione di 2.265 mg di caffeina, suddivisa in:

- 1.281 mg di caffeina libera, pari al 56.6%;
- 0.984 mg di caffeina incapsulata, pari al 43.4%.

Nella sezione relativa al calcolo del rilascio nel tempo di caffeina, tali valori verranno poi utilizzati per l'elaborazione temporale delle curve.

### 3.3.2 Imbibizione dei tessuti

I tre tipi di materiali - 100% cotone, 50% cotone / 50% viscosa e 100% viscosa - sono stati trattati con due fasi liquide differenti:

- 0.5 mL di caffeina 9 mg/mL in acqua, contenenti in media 4.5 mg di caffeina;
- 0.5 mL di sospensione acquosa di nanoparticelle di PCL, contenenti in media 2.265 mg di caffeina.

Dalle misure di assorbanza del fondo di imbibizione, risulta un'elevata efficienza del processo con la perdita in media per ciascun tessuto di:

- 0.079 mg di caffeina nel caso dei campioni trattati con caffeina in soluzione, pari all'1.76% della massa iniziale;
- 0.003 mg di caffeina nel caso dei campioni trattati con la sospensione di nanoparticelle e caffeina, pari allo 0.14% della massa iniziale.

### 3.2.3 Commenti

Nelle fasi di produzione dei sistemi contenenti caffeina e nel loro utilizzo per il trattamento dei tessuti, si possono effettuare alcune osservazioni:

- visti i volumi e le masse in gioco dell'ordine relativamente dei millilitri e dei milligrammi, si sono probabilmente verificati errori strumentali dovuti alla sensibilità delle apparecchiature, quali la micropipetta o la bilancia elettronica;
- un possibile errore è causato dal volume utilizzato nel calcolo dell'assorbanza del surnatante delle sospensioni, visto che non essendo possibile conoscere il volume occupato dalle nanoparticelle si è approssimato il volume complessivo a quello del liquido;
- la deposizione causa sempre del residuo di fondo, anche se i tessuti da trattare vengono posti a cavallo tra due rialzi - quali ad esempio i puntali da micropipetta;
- le deposizioni del sistema disperso non sono mai perfettamente omogenee, anche eseguendo miscele spinte e prelievi sempre sul fondo delle provette;
- essendo la deposizione manuale poco precisa nella localizzazione del liquido iniettato, vi sarà una variabilità nella densità superficiale di caffeina nelle fibre: ciò non è un problema, in quanto nello studio del rilascio il liquido del vano donatore bagnerà in modo omogeneo tutta la membrana cellulosica a contatto con il tessuto;

- un errore sperimentale può consistere nei tempi limitati per portare in soluzione la caffeina sul fondo con acqua o acetonitrile, con una conseguente sovrastima della caffeina caricata sui tessuti.

### 3.3 Simulazione di rilascio transdermico con celle di Franz

I dodici gruppi di campioni, costituiti ciascuno da quattro ritagli circolari trattati con le stesse modalità, sono stati sottoposti a cicli di rilascio da un giorno intero nelle celle di Franz. Per quantificare la caffeina complessivamente rilasciata a ogni intervallo di campionamento  $t_n$  si è utilizzata una formula in grado di calcolare la massa cumulativa diffusa nel vano recettore delle celle:

$$(11) \text{ massa}_{cumulativa}(t_n) = C(t_n) * 11.4mL + \sum_{i=1}^{n-1} C(t_i) * 1mL$$

dove  $C(t_n)$  è la concentrazione di caffeina misurata nel prelievo al tempo  $t_n$ , che va logicamente moltiplicata per il volume totale della soluzione, mentre  $C(t_i)$  sono le concentrazioni misurate nei campionamenti precedenti, moltiplicate per il volume asportato ogni volta - 1m L.

In ciascun grafico è indicata la barra di errore in ogni campionamento, calcolata tramite la deviazione standard delle misure in quadruplicato; le tabelle contenenti i valori misurati di assorbanza ai vari intervalli di campionamento sono contenute in *Appendice*. I grafici sono stati elaborati facendo riferimento alla massa effettivamente rilasciata dai singoli campioni.

#### 3.3.1 Caratterizzazione delle membrane cellulosiche

Per poter valutare l'influenza delle membrane cellulosiche nel rilascio da tessuti funzionalizzati, si è effettuata una misura preliminare senza di essi ma con fase donatrice liquida a contatto con la membrana. Per l'analisi del rilascio si è utilizzata una soluzione da 0.5 mL di caffeina 9 mg/mL in acqua, posta nel vano donatore della cella di Franz. Si è evidenziato un massimo di rilascio medio pari a 2.521 mg, ovvero il 56% del carico iniziale di principio attivo.

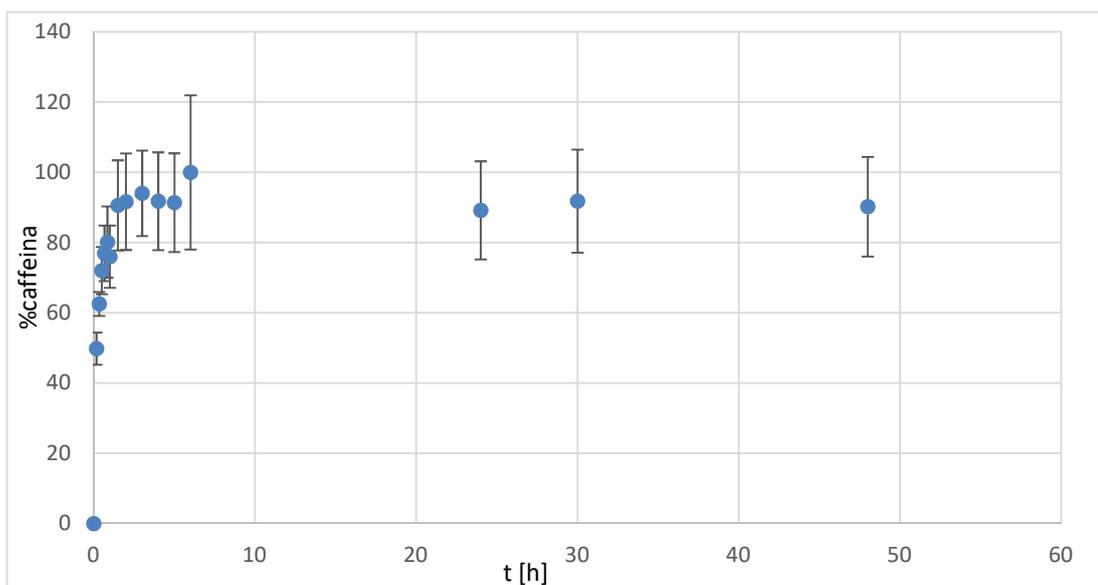


Fig. 3.1 - Caratterizzazione della membrana cellulosica, valutata nell'arco di 48 ore

### 3.3.2 Rilascio da tessuti con caffeina libera

Nei singoli casi, la caffeina totale mediamente rilasciata è stata:

- 1.848 mg dal 100% cotone, pari al 41.7 % della massa iniziale;
- 1.477 mg dal 50%cotone - 50%viscosa, pari al 33.7 % della massa iniziale;
- 2.159 mg dal 100% viscosa, pari al 48,5 % della massa iniziale.

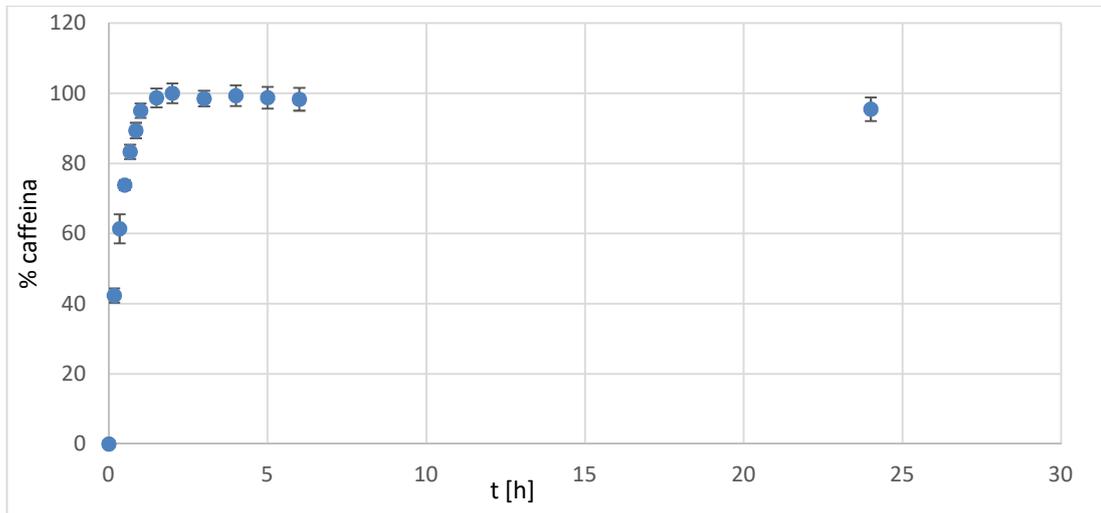


Fig. 3.2 - Curva di rilascio da 100% cotone funzionalizzato con caffeina

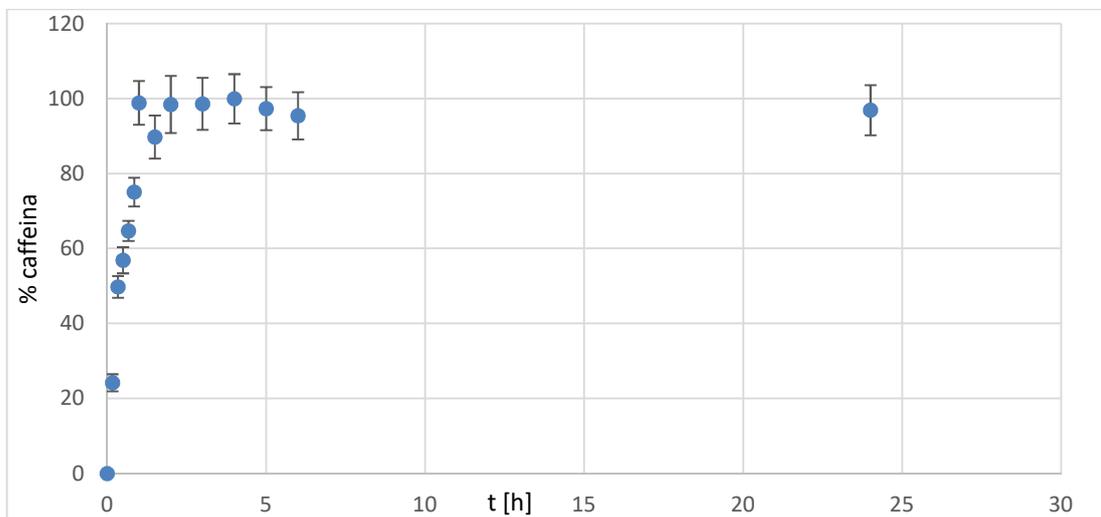


Fig. 3.3 - Curva di rilascio da 50% cotone / 50 % viscosa funzionalizzato con caffeina

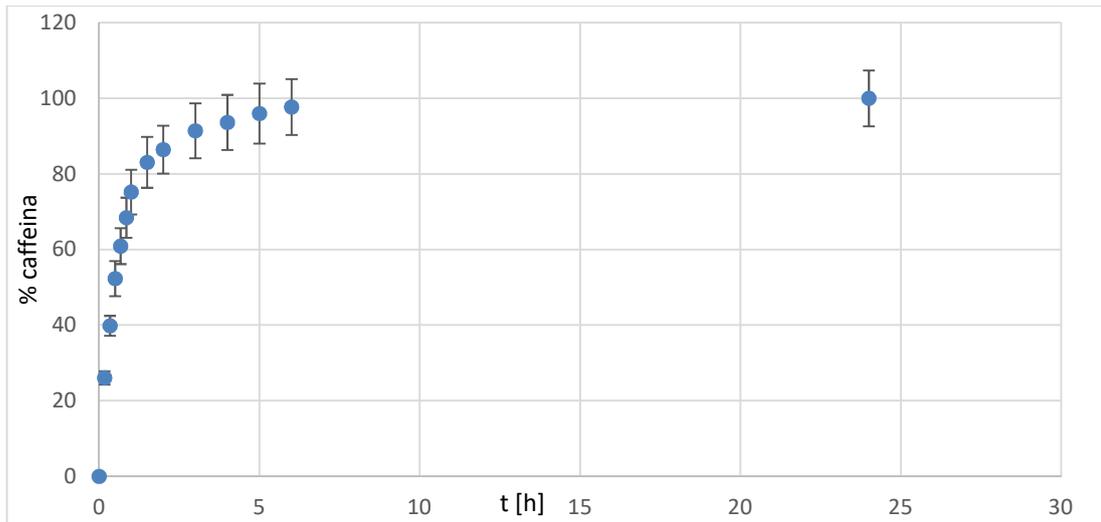


Fig. 3.4 - Curva di rilascio da 100% viscosa funzionalizzato con caffeina

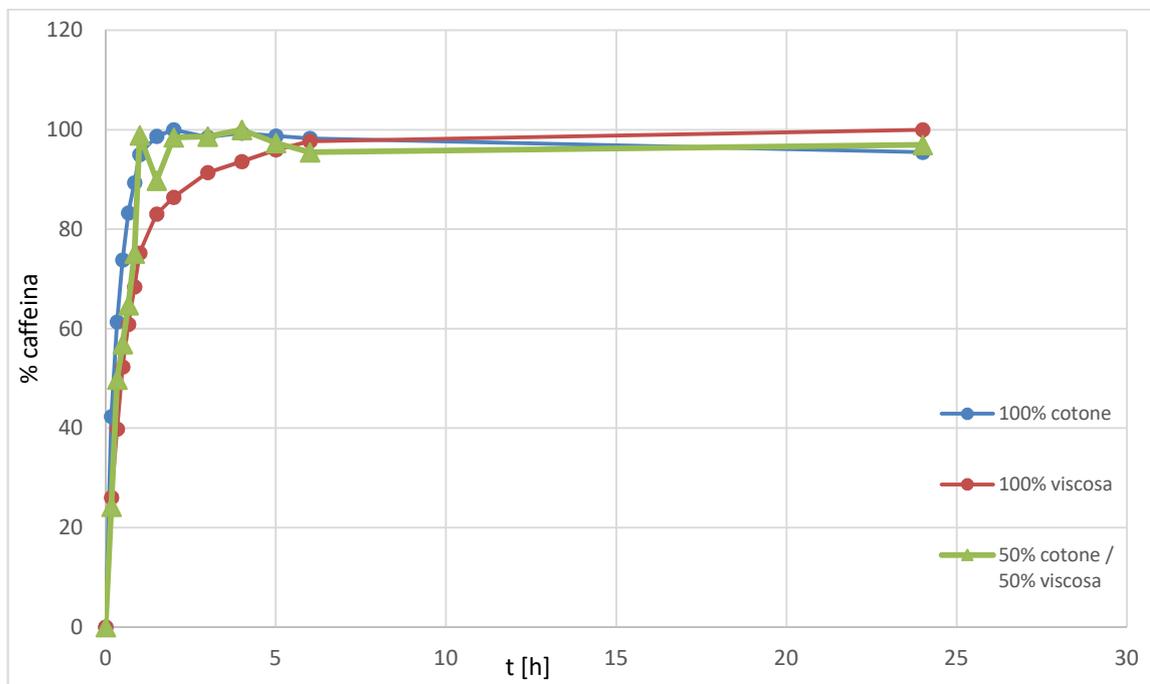


Fig. 3.5 - Curve di rilascio dei tre materiali contenenti caffeina libera

Dai dati raccolti il comportamento migliore nel rilascio controllato di caffeina libera sulle fibre è mostrato dalla viscosa:

- essa presenta il rapporto massimo tra la caffeina rilasciata e quella teoricamente presente sulle fibre in partenza;
- dal terzo grafico risulta chiaramente un rilascio più graduale e costante: nel caso del cotone e del tessuto di cotone/viscosa si ha una diffusione impulsiva nelle prime due ore - dove si raggiunge il 100% -, mentre nel caso della viscosa il plateau è raggiunto dopo cinque ore di rilascio. Ciò implica anche pendenze notevolmente differenti nelle tre curve: in un caso applicativo di rilascio transdermico, la curva con le caratteristiche migliori risulta proprio quella ottenuta dall'analisi della diffusione a partire dal tessuto di viscosa.

### 3.3.3 Rilascio da tessuti con caffeina in nanoparticelle

Nei singoli casi, la caffeina totale mediamente rilasciata è stata:

- 0.592 mg dal 100% cotone, pari al 26.1% della massa iniziale;
- 0.540 mg dal 50% cotone - 50%viscosa, pari al 23.9% della massa iniziale;
- 0.525 mg dal 100% viscosa, pari al 23.2% della massa iniziale.

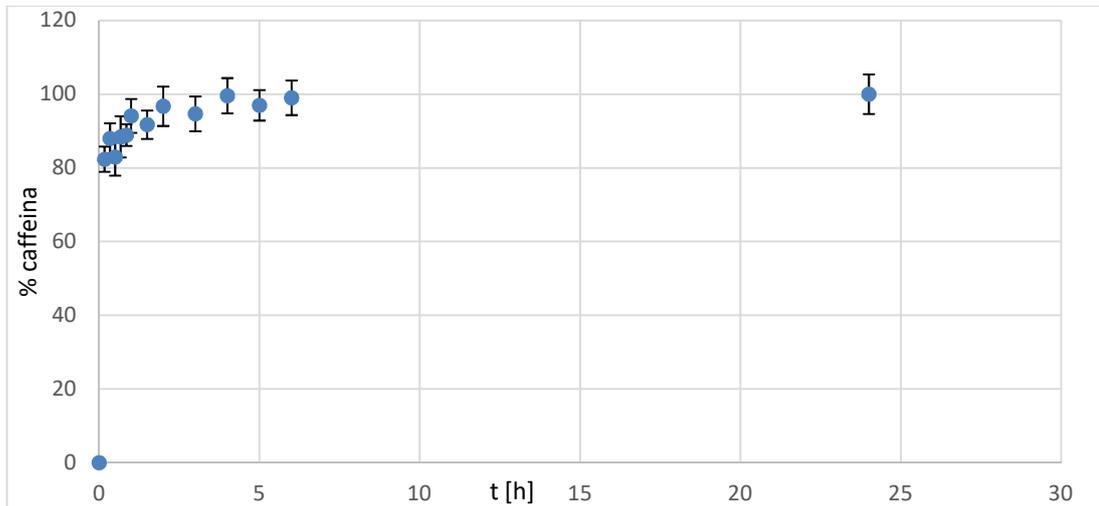


Fig. 3.6 - Curva di rilascio da 100% cotone funzionalizzato con nanoparticelle contenenti caffeina

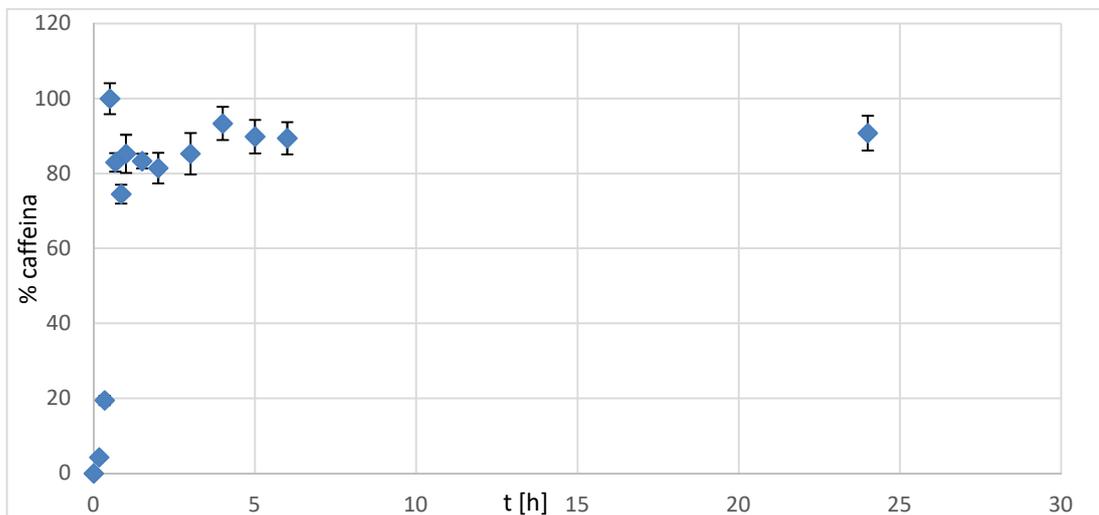


Fig. 3.7 - Curva di rilascio da 50% cotone / 50 % viscosa funzionalizzato con nanoparticelle contenenti caffeina

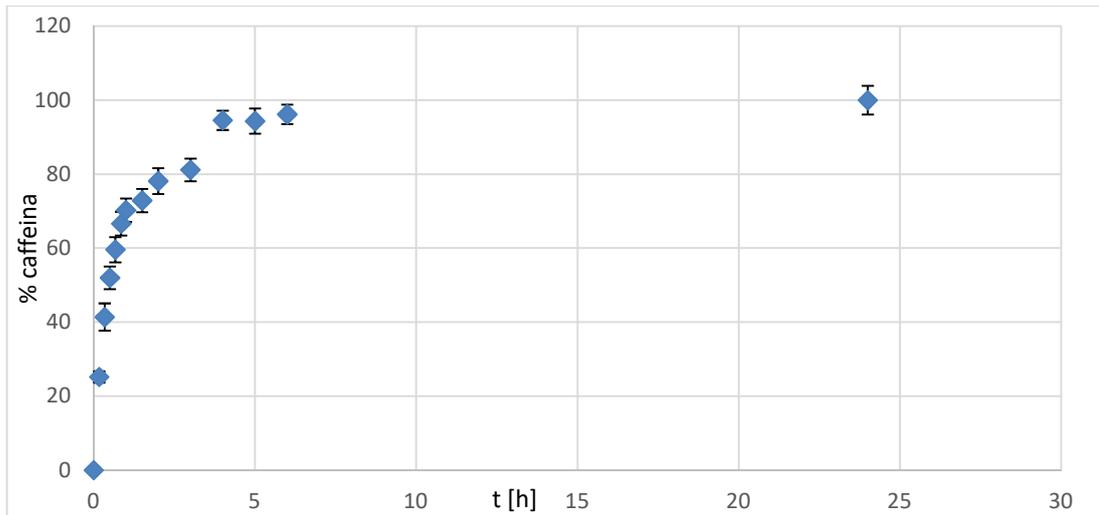


Fig. 3.8 - Curva di rilascio da 100% viscosa funzionalizzato con nanoparticelle contenenti caffeina

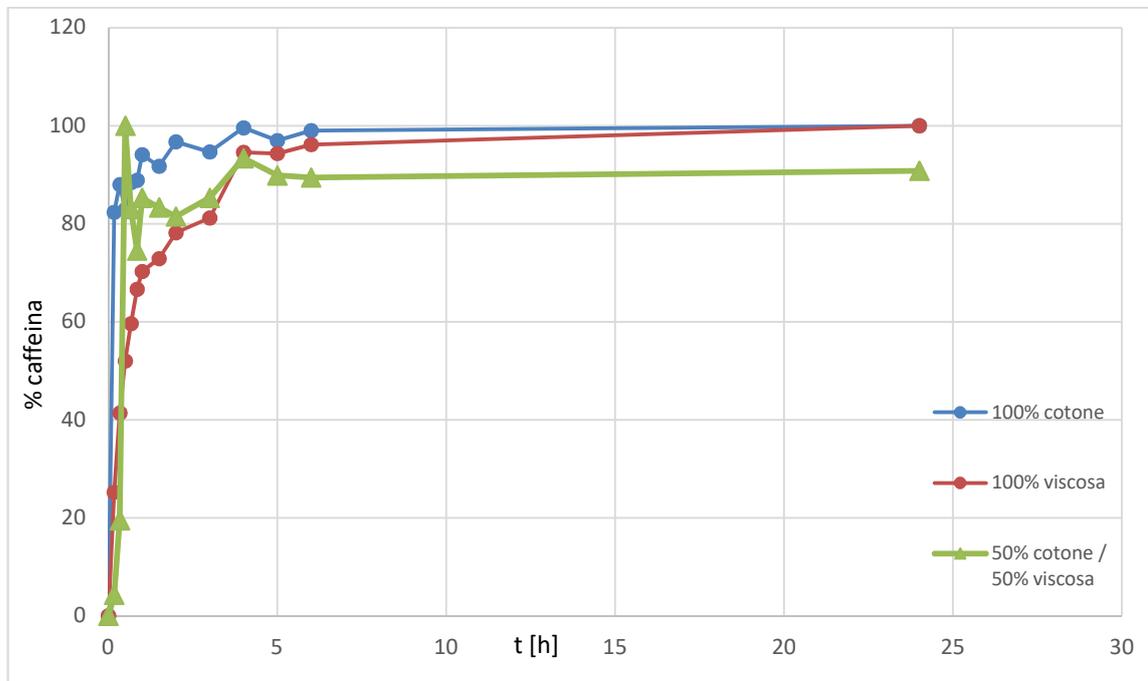


Fig. 3.9 - Curve di rilascio dei tre materiali funzionalizzati con nanoparticelle contenenti caffeina

Visto che in tutti i rilasci cumulativi non viene raggiunto il valore medio di caffeina libera sulle fibre, possiamo solo ipotizzare che vi sia un passaggio tra la cinetica di rilascio controllata dalla caffeina libera e quella controllata dalla caffeina contenuta nelle nanoparticelle nel momento in cui cambia la pendenza delle curve.

Dai dati elaborati si possono trarre le seguenti osservazioni:

- il rilascio maggiore si è riscontrato con i tessuti contenenti cotone, che però vedono una cinetica caratterizzata da una diffusione predominante nei primi minuti - analogamente al discorso fatto precedentemente con la funzionalizzazione di caffeina libera;

- nel caso del tessuto 50% cotone / 50% viscosa si nota una variabilità eccessiva nella misurazione dell'assorbanza nel tempo, con una diminuzione della caffeina anche dopo il raggiungimento del plateau e un conseguente accumulo di errori al termine delle prove;
- la viscosa presenta nuovamente proprietà migliori di rilascio controllato, perché vede barre di errore molto strette e una cinetica di diffusione ancora crescente nell'intervallo tra le 6 e le 24 ore: probabilmente, il rilascio potrebbe non essersi arrestato nelle prime ore di trattamento, come si evidenzia invece negli altri casi; inoltre, la diffusione potrebbe continuare ulteriormente oltre le 24 ore di applicazione.

### 3.3.4 Bilanci di materia

In *Tab. 6* sono riportati i valori di caffeina residua sul fondo dei contenitori di impregnazione, che pertanto non è stata coinvolta nei cicli diffusivi.

**Tab. 6** - Rendimento dei processi di imbibizione

<i>MATERIALI</i>	<i>Massa sul fondo residua media [mg]</i>	<i>Perdita nella deposizione</i>	<i>Massa effettiva caricata [mg]</i>
<i>100% C - Caf</i>	0,065	1,44%	4,435
<i>100% V - Caf</i>	0,052	1,15%	4,448
<i>50% C - 50% V - Caf</i>	0,121	2,70%	4,379
<i>100% C - NP</i>	0,003	0,14%	2,262
<i>100% V - NP</i>	0,002	0,09%	2,263
<i>50% C - 50% V - NP</i>	0,005	0,20%	2,261

Riportiamo nella tabella seguente la caffeina media residua nel caso dei materiali esausti dopo i cicli di rilascio controllato in ciascuna tipologia di campione:

**Tab. 7** - Valori di massa residua di principio attivo dopo i cicli di rilascio controllato.

<i>MATERIALI</i>	<i>100% C - Caf</i>	<i>100% V - Caf</i>	<i>50% C - 50% V - Caf</i>	<i>100% C - NP</i>	<i>100% V - NP</i>	<i>50% C - 50% V - NP</i>
<i>Massa residua Tessuti [mg]</i>	0,097	0,036	0,045	0,001	0,007	0,030
<i>Massa residua Membrane [mg]</i>	0,186	0,256	0,183	0,362	0,433	0,325
<i>Massa residua complessiva [mg]</i>	0,283	0,292	0,228	0,363	0,440	0,355
<i>% Massa non rilasciata<sup>1</sup></i>	6,4 %	6,6 %	5,2 %	16,0 %	19,4 %	15,7 %

<sup>1</sup> Percentuale calcolata rispetto alla massa effettiva di caffeina caricata sui tessuti

In base ai dati raccolti nei vari cicli di rilascio, costituiti da misure in quadruplicato, possiamo ora riportare una tabella rappresentativa delle efficienze dell'esecuzione sperimentale:

**Tab. 8 - Bilancio di massa relativo complessivo dei sistemi transdermici utilizzati**

<b>MATERIALI</b>		<i>100% C - Caf</i>	<i>100% V - Caf</i>	<i>50%C- 50%V - Caf</i>	<i>100% C - NP</i>	<i>100% V - NP</i>	<i>50%C- 50%V - NP</i>
<b>Massa di partenza effettiva</b>	[mg]	4,435	4,448	4,379	2,262	2,263	2,261
<b>Residuo medio in tessuti e membrane</b>	[mg]	0,283	0,292	0,228	0,363	0,440	0,355
<b>Rilascio medio</b>	[mg]	1,848	2,159	1,477	0,592	0,525	0,540
<b>% Rilascio medio, residui esclusi</b>		44,5%	51,9%	35,6%	31,2%	28,8%	28,3%

### 3.3.5 Commenti

Durante il rilascio e il campionamento dei liquidi caratteristici degli intervalli studiati, si causano diversi errori sperimentali:

- nel caso dell'attivazione della membrana cellulosica, essa va bollita per almeno 30 min in modo da rimuovere il glicerolo e altri glicoli presenti tra le fibre - residuo di lavorazione, in modo analogo al pretrattamento dei tessuti atto a rimuoverne l'appretto superficiale: un livello non completo di idrofilia causa incompleta bagnabilità della membrana, con riduzione dei fenomeni diffusivi;
- durante il campionamento della soluzione nel vano recettore, si causa un'assenza di contatto tra la soluzione e la membrana in intervalli di tempo relativamente lunghi, con interruzione dei fenomeni diffusivi (circa 50 secondi rispetto ai 10 minuti di durata dei primi intervalli): se tali fenomeni non hanno inizio o vengono arrestati, si nota uno spostamento temporale dei dati di assorbanza misurati coerente con l'andamento caratteristico di tale cinetica di rilascio;
- si è osservata frequentemente un'evaporazione della soluzione tampone, che può portare al mancato contatto tra la membrana e tale liquido recettore, con l'interruzione temporanea dei fenomeni diffusivi: tale fenomeno è ricorrente soprattutto durante i cicli superiori alla durata di un'ora, in particolare in quelli notturni. Sigillare esternamente le celle con del parafilm non sempre risulta efficace, mentre l'applicazione di alcune gocce di acqua bidistillata sui tessuti è in grado di prevenirla parzialmente, per via dell'aumento di umidità del sistema;
- in quasi tutti i cicli operati si è osservata la formazione di bolle durante i prelievi, con diminuzione della superficie del liquido esposta alla membrana sovrastante; la non completa bagnabilità delle membrane, anche se trattate in acqua bollente, causa inevitabilmente delle bolle di aria, che fanno diminuire l'area utile vista dal vano recettore tra la soluzione tampone e la membrana - l'aria è chiaramente identificabile come area più chiara rispetto alla membrana bagnata, e occupa fino al 40% dell'area circolare. Le bolle sotto la superficie sono in movimento per via del mescolamento continuo sottostante, e dopo ogni prelievo la membrana non è posizionata teoricamente nella stessa posizione precedente, quindi si può ipotizzare che la superficie del tessuto esposta cambi con continuità;
- è possibile avere una fuoriuscita della soluzione tampone dalla cella, a causa della sua movimentazione o dell'inserimento di liquido nuovo per riportare il sistema a volume; parte del

liquido rimane stagnante in prossimità del vano superiore o all'interno delle pieghe del parafilm, con conseguente alterazione della concentrazione di caffeina nel vano recettore;

- nonostante vi sia un sistema di miscelazione magnetica, si osserva un incompleto rimescolamento della soluzione tampone in prossimità della membrana;
- si causano errori sistematici cumulativi nelle ripetute diluizioni per le analisi spettrofotometriche, per via del numero elevato di prelievi ravvicinati con la medesima pipetta - che può risultare non più tarata;
- dai dati riportati in tabella si evince che le membrane in media trattengono l'87.2% della caffeina residua estratta alla fine dei cicli di rilascio: nel caso dei sistemi funzionalizzati con nanoparticelle, tale percentuale è ancora maggiore perché probabilmente queste ultime, dal diametro medio di circa 350 nm, durante la diffusione si allontanano dalle fibre occludendo i pori di dimensioni a esse paragonabili. Oltre a ciò, questo può causare una diminuzione della caffeina quantificata con lo spettrofotometro, perché schermata dal polimero della nanoparticella. Probabilmente le membrane sono il fattore limitante nella diffusione di caffeina, e pertanto gli andamenti riportati nei grafici di rilascio assumono andamenti simili; inoltre, dalla caratterizzazione di tali membrane si evidenzia un plateau che non raggiunge la massa caricata nel vano donatore;
- essendo i carrier di scala nanometrica, è possibile che essi rimangano tra le fibre o nelle membrane senza causare un rilascio nelle tempistiche programmate nel corrente studio; presumibilmente, alcune di esse non sono passate in soluzione durante i cicli di lavaggio dei materiali esausti, senza pertanto poter misurare la caffeina al loro interno nei bilanci di massa. Per quanto concerne la caffeina libera rimasta nelle fibre si può fare un discorso analogo, pertanto i tempi e le temperature di lavaggio dei tessuti e delle membrane utilizzate andrebbero aumentati, in modo da ottenere una migliore estrazione del principio attivo.

Considerando i dati relativi alla quantificazione del residuo di impregnazione, si può concludere che il processo è stato effettuato in modo corretto, con un limitato quantitativo percentuale di massa non legata alle fibre. Le metodiche relative al rilascio, alla sua quantificazione e all'estrazione di principio attivo residuo risultano ripetibili, in quanto i dati ottenuti sono tutti coerenti e seguono il medesimo andamento nelle varie classi di materiali analizzati.

## 4. Conclusioni

Nei capitoli iniziali del presente studio si sono analizzate le recenti innovazioni e scoperte nel campo del drug delivery, in particolare concentrando l'attenzione sui sistemi transdermici a rilascio controllato di farmaco. Dagli studi riportati in bibliografia sono emerse interessanti potenzialità relative ai carrier polimerici, in grado di essere funzionalizzati con principi attivi: da una loro applicazione su materiali tessili sono inoltre in via di sviluppo tecnologie molto promettenti in questo campo ingegneristico e medico.

Nella parte sperimentale sono stati prodotti carrier nanometrici di poliacrolattone contenenti caffeina, utilizzando la tecnica dello spostamento di solvente con il reattore a getti collidenti confinati. Con le sospensioni ottenute sono stati impregnati tessuti costituiti da fibre di natura cellulosica, adeguatamente pretrattati, per produrre dei sistemi transdermici a rilascio controllato di caffeina. Successivamente, se ne è quantificata in vitro la diffusione attraverso membrane in grado di simulare la pelle, tramite le celle di Franz. In tutte le metodologie sperimentali che includono una quantificazione del principio attivo contenuto nelle soluzioni coinvolte, si è utilizzata la tecnica di spettrofotometria uv-visibile. Come riportato nelle tabelle e nei grafici in *Appendice*, l'andamento dei dati raccolti risulta in linea con le premesse effettuate, ovvero nel caso dei tessuti funzionalizzati con nanoparticelle si osserva un rilascio più graduale e prolungato nel tempo. I dati ottenuti dai rilasci controllati sono molto più omogenei rispetto a quelli della caratterizzazione della membrana: le deviazioni standard sono pressoché costanti e intorno al 6%. Come si può notare nelle tabelle riportate in quadruplicato in *Appendice*, esse risultano sempre stratificate rispetto alla massa cumulativa nel vano recettore, ma presentano andamenti simili: ciò significa che i set composti da quattro campioni seguono lo stesso andamento nella cinetica di rilascio, ma la massa complessivamente accumulata è diversa - probabilmente a causa delle lievi differenze geometriche nelle ampole dello strumento.

Tra i materiali analizzati, la viscosa contenente nanoparticelle risulta la migliore per un rilascio transdermico di farmaco, perché mostra un raggiungimento graduale del plateau nella curva di diffusione; inoltre, il rilascio potrebbe non arrestarsi alle prime ore dall'applicazione ma continuare con una diminuzione graduale della pendenza della curva anche oltre le 24 ore. Queste ultime considerazioni sono molto interessanti se associate all'osservazione precedentemente svolta sul comportamento delle microfibre nel drug delivery, che possono dare un rilascio prolungato anche per diverse settimane [82]: a partire dalle conoscenze attuali sull'applicazione di sistemi nanometrici sulle fibre, con l'obiettivo di migliorarne le proprietà termiche, meccaniche e di resistenza ad agenti esterni [141, 142, 143, 144, 145, 146], sono in corso ricerche sulla loro funzionalizzazione per applicazioni in medicazioni e indumenti, in grado di dare un rilascio graduale e prolungato del principio attivo per svariati giorni dall'applicazione [147, 148, 149, 150].

Come considerazione finale, insieme a quelle precedenti relative alle operazioni manuali richieste per le analisi svolte, va tenuto conto che i dati misurati sono provenienti da simulazioni di sistemi biologici, difficili da progettare e modellizzare: tali simulazioni alterano i meccanismi che avverrebbero normalmente sulla pelle, e non sono in grado di considerare contemporaneamente tutti i numerosi fattori interdipendenti coinvolti. Nei successivi studi che verranno svolti in questo ambito di ricerca, occorrerà ottimizzare la produzione e la funzionalizzazione dei sistemi nanometrici utilizzati per i tessuti da trattare; al contempo sarà necessario perseguire modalità operative che simulino e quantifichino nel modo più ottimale possibile i sistemi biologici e i relativi meccanismi di somministrazione farmacologica, prestando particolare attenzione allo studio delle varie fasi delle quali sono costituiti i fenomeni di rilascio.





## Riferimenti bibliografici e sitografici

1. Park, Kinam, e Anya M Hillery. *Drug Delivery: Fundamentals & Applications*. Boca Raton: CRC Press, 2017.
2. Ministero della Salute. «Che cos'è un medicinale». Consultato 4 novembre 2017. [http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_6.jsp?id=3615&area=farmaci&menu=med](http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?id=3615&area=farmaci&menu=med).
3. AIFA - Agenzia Italiana del Farmaco. «Cos'è un farmaco». Consultato 4 novembre 2017. <http://www.agenziafarmaco.gov.it/content/cose-un-farmaco-0>.
4. Shaw, J.E., S.K. Chandrasekaran, e P. Campbell. «Percutaneous Absorption: Controlled Drug Delivery For Topical or Systemic Therapy». *Journal of Investigative Dermatology* 67, n. 5 (novembre 1976): 677–78. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12544519>.
5. Kwan, K. C. «Oral Bioavailability and First-Pass Effects». *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 25, n. 12 (dicembre 1997): 1329–36.
6. Zadymova, N. M. «Colloidochemical Aspects of Transdermal Drug Delivery (Review)». *Colloid Journal* 75, n. 5 (settembre 2013): 491–503. <https://doi.org/10.1134/S1061933X13050189>.
7. Marcello Guidotti. «Tecnica e Legislazione Farmaceutiche (UNIROMA1)». Consultato 4 novembre 2017. <http://dctf.uniroma1.it/galenotech/>.
8. Online, Kluwer. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*. New York : [Plenum Pub. Corp.], 1973: pp. 3-4. <http://trove.nla.gov.au/version/44946762>.
9. McDonald, Marguerite, Gerard D'Aversa, Henry D. Perry, John R. Wittpenn, Eric D. Donnenfeld, e Donald S. Nelinson. «Hydroxypropyl Cellulose Ophthalmic Inserts (Lacrisert) Reduce the Signs and Symptoms of Dry Eye Syndrome and Improve Patient Quality of Life». *Transactions of the American Ophthalmological Society* 107 (dicembre 2009): 214–21.
10. Pollack, I. P., H. A. Quigley, e T. S. Harbin. «The Ocusert Pilocarpine System: Advantages and Disadvantages». *Southern Medical Journal* 69, n. 10 (ottobre 1976): 1296–98.
11. Bansal, Reema, Pooja Bansal, Pandurang Kulkarni, Vishali Gupta, Aman Sharma, e Amod Gupta. «Wandering Ozurdex(®) Implant». *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection* 2, n. 1 (marzo 2012): 1–5. <https://doi.org/10.1007/s12348-011-0042-x>.
12. Amleto De Santanna, Fabio Ghiotto, Alessandro Moretta. «Atlante di Istologia». Consultato 5 novembre 2017. <http://www.istologia.unige.it/>.
13. Bos, Jan D., e Marcus M. H. M. Meinardi. «The 500 Dalton Rule for the Skin Penetration of Chemical Compounds and Drugs». *Experimental Dermatology* 9, n. 3 (1 giugno 2000): 165–69. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2000.009003165.x>.
14. Siepmann, Juergen, e Nicholas A. Peppas. «Higuchi Equation: Derivation, Applications, Use and Misuse». *International Journal of Pharmaceutics* 418, n. 1 (10 ottobre 2011): 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.051>.
15. Higuchi, Takeru. «Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 50, n. 10 (ottobre 1961): 874–75. <https://doi.org/10.1002/jps.2600501018>.
16. Rubio, Laia, Cristina Alonso, L Coderch, José Luis Parra, Meritxell Martí, Juan Cebrían, Juan Antonio Navarro, Manuel Lis, e Josep Valldeperas-Morell. «Skin Delivery of Caffeine Contained in Biofunctional Textiles». *Textile Research Journal* 80 (1 luglio 2010): 1214–21. <https://doi.org/10.1177/0040517509358798>.
17. Bhaskar, Kesavan, Jayaraman Anbu, Velayutham Ravichandiran, Vobalaboina Venkateswarlu, e Yamsani Madhusudan Rao. «Lipid nanoparticles for transdermal delivery of flurbiprofen:

- formulation, in vitro, ex vivo and in vivo studies». *Lipids in Health and Disease* 8 (26 febbraio 2009): 6. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-8-6>.
18. «Phosphate-Buffered Saline (PBS)». *Cold Spring Harbor Protocols* 2006, n. 1 (6 gennaio 2006): pdb.rec8247. <https://doi.org/10.1101/pdb.rec8247>.
  19. Chien, Yie W. «Development of Transdermal Drug Delivery Systems». *Drug Development and Industrial Pharmacy* 13, n. 4–5 (gennaio 1987): 589–651. <https://doi.org/10.3109/03639048709105212>.
  20. Muehlberger, C. W. «Shoe dye poisoning». *Journal of the American Medical Association* 84, n. 26 (27 giugno 1925): 1987–91. <https://doi.org/10.1001/jama.1925.02660520015007>.
  21. «Poisoning by cutaneous absorption of aniline» *The Lancet* 159, n. 4094 (15 febbraio 1902): 463–64. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)81024-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)81024-2).
  22. «BAND-AID® Brand History & Heritage». BAND-AID® Brand Adhesive Bandages. Consultato 5 novembre 2017. <https://www.band-aid.com/brand-heritage>.
  23. Earle, Dickson Ensign. «Surgical dressing». US1612267 A, filed 29 dicembre 1925, e issued 28 dicembre 1926. <http://google.com/patents/US1612267>.
  24. «Congratulations, Earle Dickson, Inventor of the BAND-AID® Brand Adhesive Bandage!» Kilmer House. Consultato 5 novembre 2017. <https://www.kilmerhouse.com/2017/05/congratulations-earle-dickson-inventor-of-the-band-aidr-brand-adhesive-bandage>.
  25. Zaffaroni, A. «Bandage for the administration of drug by controlled metering through microporous materials». Google Patents, 1974. <https://www.google.com/patents/US3797494>.
  26. Beckett, A. H., J. W. Gorrod, e D. C. Taylor. «Comparison of Oral and Percutaneous Routes in Man for the Systemic Administration of “Ephedrine”». *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 24 (dicembre 1972): Suppl:65P-70P.
  27. Riegelman, S. «Pharmacokinetics. Pharmacokinetic Factors Affecting Epidermal Penetration and Percutaneous Adsorption». *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 16, n. 5 Part 2 (novembre 1974): 873–83.
  28. Zaffaroni, A. «Bandage for administering drugs», issued 1 aprile 1969. <https://patents.google.com/patent/US3598123A/en>.
  29. «Prevent Motion Sickness - Transderm Scop® - Clinically Proven Motion Sickness Patches». Consultato 5 novembre 2017. <http://www.transdermscop.com/index.htm>.
  30. Michaels, A. S., S. K. Chandrasekaran, e J. E. Shaw. «Drug Permeation through Human Skin: Theory and In vitro Experimental Measurement». *AIChE Journal* 21, n. 5 (1 settembre 1975): 985–96. <https://doi.org/10.1002/aic.690210522>.
  31. Chandrasekaran, S. K., A. S. Michaels, P. S. Campbell, e J. E. Shaw. «Scopolamine Permeation through Human Skin in Vitro». *AIChE Journal* 22, n. 5 (settembre 1976): 828–32. <https://doi.org/10.1002/aic.690220503>.
  32. Shaw, Jane, e John Urquhart. «Programmed, Systemic Drug Delivery by the Transdermal Route». *Trends in Pharmacological Sciences* 1, n. 1 (gennaio 1979): 208–11. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(79\)90073-7](https://doi.org/10.1016/0165-6147(79)90073-7).
  33. Urquhart, John, Santosh K. Chandrasekaran, e Jane E. Shaw. «Therapeutic system for administering scopolamine transdermally». CA1059909 A, filed 5 febbraio 1976, e issued 7 agosto 1979. <http://www.google.com/patents/CA1059909A>.
  34. Hadgraft, J. W., G. F. Somers, e H. S. Williams. «Percutaneous Absorption Using Diiodofluorescein 131I». *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 8, n. 12 (dicembre 1956): 1027–33.

35. Freudiger, Christian W., Wei Min, Brian G. Saar, Sijia Lu, Gary R. Holtom, Chengwei He, Jason C. Tsai, Jing X. Kang, e X. Sunney Xie. «Label-Free Biomedical Imaging with High Sensitivity by Stimulated Raman Scattering Microscopy». *Science (New York, N.Y.)* 322, n. 5909 (19 dicembre 2008): 1857–61. <https://doi.org/10.1126/science.1165758>.
36. Evans, Conor L., Eric O. Potma, Mehron Puoris'haag, Daniel Côté, Charles P. Lin, e X. Sunney Xie. «Chemical Imaging of Tissue in Vivo with Video-Rate Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, n. 46 (15 novembre 2005): 16807–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508282102>.
37. Venuganti, Venkata Vamsi, Preety Sahdev, Michael Hildreth, Xiangming Guan, e Omathanu Perumal. «Structure-Skin Permeability Relationship of Dendrimers». *Pharmaceutical Research* 28, n. 9 (settembre 2011): 2246–60. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0455-0>.
38. Franz, T. J. «Percutaneous Absorption on the Relevance of in Vitro Data». *The Journal of Investigative Dermatology* 64, n. 3 (marzo 1975): 190–95.
39. Patel, Mayurkumar, Abhay Joshi, Hana Hassanzadeth, Ravi Juluru, e Grazia Stagni. «Quantification of Dermal and Transdermal Delivery of Meloxicam Gels in Rabbits». *Drug Development and Industrial Pharmacy* 37, n. 5 (maggio 2011): 613–17. <https://doi.org/10.3109/03639045.2010.534098>.
40. Sica, Domenic A., e Rebecca Grubbs. «Transdermal Clonidine: Therapeutic Considerations». *The Journal of Clinical Hypertension* 7, n. 9 (1 settembre 2005): 558–62. <https://doi.org/10.1111/j.1524-6175.2005.04133.x>.
41. Methylphenidate transdermal compositions with rubber-based adhesives. Consultato 5 novembre 2017. <http://www.google.com/patents/US20140271792>.
42. «Habitrol Nicotine Patch Transdermal System | Habitrol». Consultato 5 novembre 2017. <http://www.habitrol.com/>.
43. «Nitro-Dur - FDA prescribing information, side effects and uses». *Drugs.com*. Consultato 5 novembre 2017. <https://www.drugs.com/pro/nitro-dur.html>.
44. «Androderm® (testosterone transdermal system) | Official Patient Website». Consultato 5 novembre 2017. <https://www.androderm.com/>.
45. «EUR-Lex - 32017R0746 - EN - EUR-Lex». Consultato 5 novembre 2017. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A32017R0746>.
46. Saroha K, Yadav B., Sharma B., «Transdermal patch: A discrete dosage form». *International Journal of Current Pharmaceutical Research* (giugno 2011) Consultato 5 novembre 2017. [http://www.academia.edu/2361464/Transdermal\\_patch\\_A\\_discrete\\_dosage\\_form](http://www.academia.edu/2361464/Transdermal_patch_A_discrete_dosage_form).
47. «Caffeine C0750». Sigma-Aldrich. Consultato 5 novembre 2017. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/c0750>.
48. «ICSC 0405 - CAFFEINE». Consultato 5 novembre 2017. <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0405.htm>.
49. Younggil, Kwon. «Handbook of Essential Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists», *Springer* (2001): 44. Consultato 5 novembre 2017. <http://www.springer.com/la/book/9780306462344>.
50. Conney, Allan H., Yao-Ping Lu, You-Rong Lou, e Mou-Tuan Huang. «Inhibitory Effects of Tea and Caffeine on UV-Induced Carcinogenesis: Relationship to Enhanced Apoptosis and Decreased Tissue Fat». *European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* 11 Suppl 2 (agosto 2002): S28-36.
51. Lee, C. «Antioxidant Ability of Caffeine and Its Metabolites Based on the Study of Oxygen Radical Absorbing Capacity and Inhibition of LDL Peroxidation». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 295, n. 1–2 (maggio 2000): 141–54.

52. Wang, Ling, e Luo Lu. «Pathway-Specific Effect of Caffeine on Protection against UV Irradiation-Induced Apoptosis in Corneal Epithelial Cells». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48, n. 2 (1 febbraio 2007): 652. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-1007>.
53. Lu, Yao-Ping, You-Rong Lou, Yong Lin, Weichung Joe Shih, Mou-Tuan Huang, Chung S. Yang, e Allan H. Conney. «Inhibitory Effects of Orally Administered Green Tea, Black Tea, and Caffeine on Skin Carcinogenesis in Mice Previously Treated with Ultraviolet B Light (High-Risk Mice): Relationship to Decreased Tissue Fat». *Cancer Research* 61, n.13 (1 luglio 2001): 5002–9.
54. Lupi, Omar, Ivan Jorge Semenovitch, Curt Treu, Daniel Bottino, e Eliete Bouskela. «Evaluation of the Effects of Caffeine in the Microcirculation and Edema on Thighs and Buttocks Using the Orthogonal Polarization Spectral Imaging and Clinical Parameters». *Journal of Cosmetic Dermatology* 6, n. 2 (giugno 2007): 102–7. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2007.00304.x>.
55. Dupont, Eric, Michel Journet, Marie-Laure Oula, Juan Gomez, Claude Léveillé, Estelle Loing, e Diane Bilodeau. «An Integral Topical Gel for Cellulite Reduction: Results from a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Evaluation of Efficacy». *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 7 (2014): 73–88. <https://doi.org/10.2147/CCID.S53580>.
56. Siddiqui, Shad W., Yinan Zhao, Alena Kukukova, e Suzanne M. Kresta. «Characteristics of a Confined Impinging Jet Reactor: Energy Dissipation, Homogeneous and Heterogeneous Reaction Products, and Effect of Unequal Flow». *Industrial & Engineering Chemistry Research* 48, n. 17 (2 settembre 2009): 7945–58. <https://doi.org/10.1021/ie801562y>.
57. Gordon, Stuart, You-Lo Hsieh, e Textile Institute, a c. di. «Cotton: Science and Technology». *Woodhead Publishing Series in Textiles* 59. Boca Raton, Fla.: CRC Press (2007): 3-57, 353, 358
58. Wakelyn, P. J., a c. di. «Cotton fiber chemistry and technology». *International fiber science and technology series* 17. Boca Raton: CRC Press (2007): 13-119
59. Karmakar, S. R. «Chemical technology in the pre-treatment processes of textiles». *1st ed. Textile science and technology*, v. 12. Amsterdam ; New York: Elsevier (1999): 3-5, 22-26, 49-106, 160-172, 452, 453.
60. «Pre-treatment of cotton fabric». Consultato 5 novembre 2017. <http://www.handprintingguiderajasthan.in/science-behind-preparatory-processes-for-hand-printing/pre-treatment-of-cotton-fabric/>.
61. Saihi, D., I. Vroman, S. Giraud, e S. Bourbigot. «Microencapsulation of Ammonium Phosphate with a Polyurethane Shell. Part II. Interfacial Polymerization Technique». *Reactive and Functional Polymers* 66, n. 10 (ottobre 2006): 1118–25. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2006.02.001>.
62. Dashnyam, Khandmaa, Guang-Zhen Jin, Joong-Hyun Kim, Roman Perez, Jun-Hyeog Jang, e Hae-Won Kim. «Promoting Angiogenesis with Mesoporous Microcarriers through a Synergistic Action of Delivered Silicon Ion and VEGF». *Biomaterials* 116 (febbraio 2017): 145–57. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.11.053>.
63. Wang, Bo, Benu Adhikari, e Colin J. Barrow. «Optimisation of the Microencapsulation of Tuna Oil in Gelatin-Sodium Hexametaphosphate Using Complex Coacervation». *Food Chemistry* 158 (1 settembre 2014): 358–65. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.135>.
64. Leclercq, Segolene, Kristin R. Harlander, e Gary A. Reineccius. «Formation and Characterization of Microcapsules by Complex Coacervation with Liquid or Solid Aroma Cores». *Flavour and Fragrance Journal* 24, n. 1 (1 gennaio 2009): 17–24. <https://doi.org/10.1002/ffj.1911>.
65. Piacentini, Emma, Lidietta Giorno, Marijana Dragosavac, Goran Vladislavljević, e Richard Holdich. «Microencapsulation of oil droplets using cold water fish gelatine/gum arabic complex coacervation by membrane emulsification». *Food Research International* 53 (1 gennaio 2013): 362–72.

66. Bezerra, Fabricio Maestá, Oscar Garcia Carmona, Carlos Garcia Carmona, Manuel José Lis, e Flavio Faria de Moraes. «Controlled Release of Microencapsulated Citronella Essential Oil on Cotton and Polyester Matrices». *Cellulose* 23, n. 2 (1 aprile 2016): 1459–70. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0882-5>.
67. Santos, Jose Luis, Yong Ren, John Vandermark, Maani M. Archang, John-Michael Williford, Heng-Wen Liu, Jason Lee, Tza-Huei Wang, e Hai-Quan Mao. «DNA Nanoparticles: Continuous Production of Discrete Plasmid DNA-Polycation Nanoparticles Using Flash Nanocomplexation (Small 45/2016)». *Small* 12, n. 45 (1 dicembre 2016): 6177–6177. <https://doi.org/10.1002/sml.201670233>.
68. Falk, R. F., e T. W. Randolph. «Process Variable Implications for Residual Solvent Removal and Polymer Morphology in the Formation of Gentamycin-Loaded Poly (L-Lactide) Microparticles». *Pharmaceutical Research* 15, n. 8 (agosto 1998): 1233–37.
69. Horn, Dieter, e Jens Rieger. «Organic Nanoparticles in the Aqueous Phase-Theory, Experiment, and Use». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 40, n. 23 (3 dicembre 2001): 4330–61.
70. Mossotti, Raffaella, Ada Ferri, Riccardo Innocenti, Tereza Zelenková, Francesca Dotti, Daniele L. Marchisio, e Antonello A. Barresi. «Cotton Fabric Functionalisation with Menthol/PCL Micro- and Nano-Capsules for Comfort Improvement». *Journal of Microencapsulation* 32, n. 7 (2015): 650–60.
71. Badri, Waisudin, Karim Miladi, Qand Agha Nazari, Hatem Fessi, e Abdelhamid Elaissari. «Effect of Process and Formulation Parameters on Polycaprolactone Nanoparticles Prepared by Solvent Displacement». *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 516 (marzo 2017): 238–44. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.12.029>.
72. Hoa, Le Thi Mai, Nguyen Tai Chi, Nguyen Minh Triet, Le Ngoc Thanh Nhan, e Dang Mau Chien. «Preparation of Drug Nanoparticles by Emulsion Evaporation Method». *Journal of Physics: Conference Series* 187, n. 1 (2009): 012047. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/187/1/012047>.
73. Bora, Divyakumar, Priyanka Borude, e Kiran Bhise. «Taste Masking by Spray-Drying Technique». *AAPS PharmSciTech* 9, n. 4 (19 novembre 2008): 1159–64. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9154-5>.
74. Zelenková, Tereza, Davide Fissore, Daniele L. Marchisio, e Antonello A. Barresi. «Size Control in Production and Freeze-Drying of Poly-ε-Caprolactone Nanoparticles». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 103, n. 6 (giugno 2014): 1839–50. <https://doi.org/10.1002/jps.23960>.
75. Leeke, Gary A., Tiejun Lu, Rachel H. Bridson, e Jonathan P. K. Seville. «Application of nanoparticle coatings to carrier particles using an integrated fluidized bed supercritical fluid precipitation process». *The Journal of Supercritical Fluids* 91, n. Supplement C (1 luglio 2014): 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.03.012>.
76. Mehta, Rahul C., B.C. Thanoo, e Patrick P. Deluca. «Peptide Containing Microspheres from Low Molecular Weight and Hydrophilic Poly(d,l-Lactide-Co-Glycolide)». *Journal of Controlled Release* 41, n. 3 (settembre 1996): 249–57. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(96\)01332-6](https://doi.org/10.1016/0168-3659(96)01332-6).
77. Fu, X., Q. Ping, e Y. Gao. «Effects of Formulation Factors on Encapsulation Efficiency and Release Behaviour in Vitro of Huperzine A-PLGA Microspheres». *Journal of Microencapsulation* 22, n. 7 (novembre 2005): 705–14. <https://doi.org/10.1080/02652040500162196>.
78. Pola, S., B. V. Krishna, V. Vijayanthi, S. K. Uma Devi, S. Padmapriya, e V. Ravichandiran. «Formulation and Evaluation of Flurbiprofen Loaded Microspheres for Transdermal Delivery». *Biosciences Biotechnology Research Asia* 7, n. 1 (5 maggio 2016): 219–30.
79. Shive, null, e null Anderson. «Biodegradation and Biocompatibility of PLA and PLGA Microspheres». *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, n. 1 (13 ottobre 1997): 5–24.

80. Cheung, Karmen, e Diganta B. Das. «Microneedles for Drug Delivery: Trends and Progress». *Drug Delivery*, 23 dicembre 2014, 1–17. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.986309>.
81. Pham, Quynh P., Upma Sharma, e Antonios G. Mikos. «Electrospun Poly(Epsilon-Caprolactone) Microfiber and Multilayer Nanofiber/Microfiber Scaffolds: Characterization of Scaffolds and Measurement of Cellular Infiltration». *Biomacromolecules* 7, n. 10 (ottobre 2006): 2796–2805. <https://doi.org/10.1021/bm060680j>.
82. Lavin, Danya M., Robert M. Stefani, Linda Zhang, Stacia Furtado, Richard A. Hopkins, e Edith Mathiowitz. «Multifunctional Polymeric Microfibers with Prolonged Drug Delivery and Structural Support Capabilities». *Acta Biomaterialia* 8, n. 5 (maggio 2012): 1891–1900. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.01.019>.
83. Hwang, Chang Mo, Ali Khademhosseini, Yongdoo Park, Kyung Sun, e Sang-Hoon Lee. «Microfluidic Chip-Based Fabrication of PLGA Microfiber Scaffolds for Tissue Engineering». *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 24, n. 13 (1 giugno 2008): 6845–51. <https://doi.org/10.1021/la800253b>.
84. Shin, Su-Jung, Ji-Young Park, Jin-Young Lee, Ho Park, Yong-Doo Park, Kyu-Back Lee, Chang-Mo Whang, e Sang-Hoon Lee. «“On the Fly” Continuous Generation of Alginate Fibers Using a Microfluidic Device». *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 23, n. 17 (14 agosto 2007): 9104–8. <https://doi.org/10.1021/la700818q>.
85. Quintanar, David, Eric Allémann, Eric Doelker, e Hatem Fessi. «Preparation and Characterization of Nanocapsules from Preformed Polymers by a New Process Based on Emulsification-Diffusion Technique». *Pharmaceutical Research* 15 (7 gennaio 1998): 1056–62. <https://doi.org/10.1023/A:1011934328471>.
86. Wang, Xiaoqin, Tuna Yucel, Qiang Lu, Xiao Hu, e David L. Kaplan. «Silk Nanospheres and Microspheres from Silk/Pva Blend Films for Drug Delivery». *Biomaterials* 31, n. 6 (febbraio 2010): 1025–35. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.002>.
87. Shin, Jinseob, Kyomin Shin, Hanna Lee, Jeong-Beom Nam, Jae-Eun Jung, Jee-Hyun Ryu, Joo-Hyun Han, et al. «Non-Invasive Transdermal Delivery Route Using Electrostatically Interactive Biocompatible Nanocapsules». *Advanced Materials* 22, n. 6 (9 febbraio 2010): 739–43. <https://doi.org/10.1002/adma.200902079>.
88. Zhai, Yingjie, Xiaoye Yang, Lili Zhao, Zimin Wang, e Guangxi Zhai. «Lipid Nanocapsules for Transdermal Delivery of Ropivacaine: In Vitro and in Vivo Evaluation». *International Journal of Pharmaceutics* 471, n. 1–2 (25 agosto 2014): 103–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.05.035>.
89. Kolhar, Poornima, Nishit Doshi, e Samir Mitragotri. «Polymer Nanoneedle-Mediated Intracellular Drug Delivery». *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 7, n. 14 (18 luglio 2011): 2094–2100. <https://doi.org/10.1002/sml.201100497>.
90. Mihailiasa, Manuela, Fabrizio Caldera, Jiemeng Li, Roberta Peila, Ada Ferri, e Francesco Trotta. «Preparation of Functionalized Cotton Fabrics by Means of Melatonin Loaded  $\beta$ -Cyclodextrin Nanosponges». *Carbohydrate Polymers* 142 (20 maggio 2016): 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.024>.
91. Kumar, Vikash, Hema Chaudhary, e Geeta Aggarwal. «Design, Optimize and Characterize Granisetron HCl Loaded Nano-Gel for Transdermal Delivery». *Pharmaceutical Nanotechnology*, 15 settembre 2017. <https://doi.org/10.2174/2211738505666170915151118>.
92. Pople, Pallavi V., e Kamalinder K. Singh. «Development and Evaluation of Colloidal Modified Nanolipid Carrier: Application to Topical Delivery of Tacrolimus». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 79, n. 1 (settembre 2011): 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.02.016>.

93. Ali, S. Wazed, S. Rajendran, e Mangala Joshi. «Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester». *Carbohydrate Polymers* 83, n. 2 (10 gennaio 2011): 438–46. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.004>.
94. Sauperl, Olivera, Mirjana Kostic, Jovana Milanovic, e Lidija Zemljič. «Chemical Binding of Chitosan and Chitosan Nanoparticles onto Oxidized Cellulose». *Journal of engineered fibers and fabrics* Vol. 10 (gennaio 2015): 70-77.
95. Zhang, Yong, Lili Cui, Feng Li, Nianqiu Shi, Chunlei Li, Xianghui Yu, Yan Chen, e Wei Kong. «Design, Fabrication and Biomedical Applications of Zein-Based Nano/Micro-Carrier Systems». *International Journal of Pharmaceutics* 513, n. 1–2 (20 novembre 2016): 191–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.023>.
96. Li, Chunmei, Charu Vepari, Hyoung-Joon Jin, Hyeon Joo Kim, e David L. Kaplan. «Electrospun Silk-BMP-2 Scaffolds for Bone Tissue Engineering». *Biomaterials* 27, n. 16 (giugno 2006): 3115–24. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.022>.
97. Gupta, Vishal, Abraham Aseh, Carmen N Ríos, Bharat B Aggarwal, e Anshu B Mathur. «Fabrication and characterization of silk fibroin-derived curcumin nanoparticles for cancer therapy». *International Journal of Nanomedicine* 4 (2009): 115–22.
98. Wang, Xiaoqin, Esther Wenk, Xiaohui Zhang, Lorenz Meinel, Gordana Vunjak-Novakovic, e David L. Kaplan. «Growth Factor Gradients via Microsphere Delivery in Biopolymer Scaffolds for Osteochondral Tissue Engineering». *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 134, n. 2 (4 marzo 2009): 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.10.021>.
99. «Polycaprolactone 440744». Sigma-Aldrich. Consultato 6 novembre 2017. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/440744>.
100. Goldberg, D. «A Review of the Biodegradability and Utility of Poly(Caprolactone)». *Journal of Environmental Polymer Degradation* 3, n. 2 (1 aprile 1995): 61–67. <https://doi.org/10.1007/BF02067481>.
101. Natta, Frank J. van, Julian W. Hill, e Wallace H. Carothers. «Studies of Polymerization and Ring Formation. XXIII.1  $\epsilon$ -Caprolactone and its Polymers». *Journal of the American Chemical Society* 56, n. 2 (1 febbraio 1934): 455–57. <https://doi.org/10.1021/ja01317a053>.
102. Woodruff, Maria Ann, e Dietmar Werner Hutmacher. «The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century». *Progress in Polymer Science* 35, n. 10 (1 ottobre 2010): 1217–56. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>.
103. Fessi, Hatem, Francis Puisieux, e Jean-Philippe Devissaguet. «Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance, sous forme de nanocapsules». EP0274961 A1, filled 28 december 1987, issued 20 july 1988. <http://www.google.ch/patents/EP0274961A1>.
104. Piñón-Segundo, Elizabeth, Adriana Ganem-Quintanar, Juan Rafael Garibay-Bermúdez, José Juan Escobar-Chávez, Miriam López-Cervantes, e David Quintanar-Guerrero. «Preparation of Nanoparticles by Solvent Displacement Using a Novel Recirculation System». *Pharmaceutical Development and Technology* 11, n. 4 (gennaio 2006): 493–501. <https://doi.org/10.1080/10837450600940824>.
105. Liu, Ying, Zhen Tong, e Robert K. Prud'homme. «Stabilized Polymeric Nanoparticles for Controlled and Efficient Release of Bifenthrin». *Pest Management Science* 64, n. 8 (agosto 2008): 808–12. <https://doi.org/10.1002/ps.1566>.
106. Han, Jing, Zhengxi Zhu, Haitao Qian, Adam R. Wohl, Charles J. Beaman, Thomas R. Hoyer, e Christopher W. Macosko. «A Simple Confined Impingement Jets Mixer for Flash Nanoprecipitation». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101, n. 10 (ottobre 2012): 4018–23. <https://doi.org/10.1002/jps.23259>.

107. Lince, Marchisio, Barresi. «Strategies to Control the Particle Size Distribution of Poly-Epsilon-Caprolactone Nanoparticles for Pharmaceutical Applications». *Journal of Colloid and Interface Science* 322, n. 2 (15 giugno 2008): 505–15. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.03.033>.
108. Mora-Huertas, C.E., H. Fessi, e A. Elaissari. «Polymer-Based Nanocapsules for Drug Delivery». *International Journal of Pharmaceutics* 385, n. 1–2 (gennaio 2010): 113–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>
109. Quintanar-Guerrero, D., E. Allémann, H. Fessi, e E. Doelker. «Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers». *Drug Development and Industrial Pharmacy* 24, n. 12 (dicembre 1998): 1113–28. <https://doi.org/10.3109/03639049809108571>.
110. <http://ascomp.ch/services/industry-division/process-engineering/>.
111. Ratnapandian, S., e S. Ratnapandian. «Application of natural dyes by padding technique on textiles», 2013. <https://researchbank.rmit.edu.au/view/rmit:160486>.
112. Martí, Meritxell, Vanessa Martínez, Manuel J. Lis, Josep Valldeperas, Alfons de la Maza, José L. Parra, e Luisa Coderch. «Gallic acid vehiculized through liposomes or mixed micelles in biofunctional textiles». *The Journal of The Textile Institute* 105, n. 2 (1 febbraio 2014): 175–86. <https://doi.org/10.1080/00405000.2013.833690>.
113. Broadbent, Arthur D. «Basic Principles of Textile Coloration». Bradford, West Yorkshire: Society of Dyers and Colourists (2001): 20-33, 174-196.
114. Carreras, N., V. Acuña, M. Martí, e M. J. Lis. «Drug Release System of Ibuprofen in PCL-Microspheres». *Colloid and Polymer Science* 291, n. 1 (gennaio 2013): 157–65. <https://doi.org/10.1007/s00396-012-2768-x>
115. Li, Li, Liu Song, Tao Hua, Wai Man Au, e Kwok Shing Wong. «Characteristics of weaving parameters in microcapsule fabrics and their influence on loading capability». *Textile Research Journal* 83, n. 2 (1 gennaio 2013): 113–21. <https://doi.org/10.1177/0040517512454184>.
116. Joaneli, M.I., D.P. Ostetman, e D Golob. «Textile surface structure importance and Kubelka-Munk theory use in colour match calculations», *Colourage* vol. 53, 4 Supplement (2006): 59-67
117. *Aatcc Technical Manual*. Research Triangle Park: Amer Assn Of Textile Chem, 2015. Test method 59-2007.
118. [http://images.treccani.it/enc/media/share/images/orig/system/galleries/Enciclopedia\\_della\\_Scienza\\_e\\_della\\_Tecnica/VOL\\_3/3\\_Ade\\_4.jpg](http://images.treccani.it/enc/media/share/images/orig/system/galleries/Enciclopedia_della_Scienza_e_della_Tecnica/VOL_3/3_Ade_4.jpg).
119. Reyhan, Keskin, Palamutcu Sema, e Kara Serkan. «Absorbency characteristics of peshtamals: traditional torkish woven clothes». *Annals of the University of Oradea: Fascicle of Textiles, Leatherwork* XV, n. 1 (1 maggio 2014): 41–46
120. Brojeswari Das, Ph.D., Ph.D. Apurba Das, V Kothari, Raul Fanguero, e Ph.D. Mario D. Araujo. «Moisture Flow through Blended Fabrics– Effect of Hydrophilicity». *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* 4 (1 dicembre 2009).
121. Yamamoto, K., R. Flesch, T. Ohigashi, S. Hedtrich, A. Klossek, P. Patoka, G. Ulrich, et al. «Selective Probing of the Penetration of Dexamethasone into Human Skin by Soft X-ray Spectromicroscopy». *Analytical Chemistry* 87, n. 12 (16 giugno 2015): 6173–79. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00800>.
122. Mitchell, R., C. M. Carr, M. Parfitt, J. C. Vickerman, e C. Jones. «Surface Chemical Analysis of Raw Cotton Fibres and Associated Materials». *Cellulose* 12, n. 6 (dicembre 2005): 629–39. <https://doi.org/10.1007/s10570-005-9000-9>
123. Esrafil, Ali, Yadollah Yamini, e Shahab Shariati. «Hollow Fiber-Based Liquid Phase Microextraction Combined with High-Performance Liquid Chromatography for Extraction and

- Determination of Some Antidepressant Drugs in Biological Fluids». *Analytica Chimica Acta* 604, n. 2 (dicembre 2007): 127–33. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.10.012>
124. Yazdi, A, N Razavi, e S Yazdinejad. «Separation and Determination of Amitriptyline and Nortriptyline by Dispersive Liquid–liquid Microextraction Combined with Gas Chromatography Flame Ionization Detection». *Talanta* 75, n. 5 (15 giugno 2008): 1293–99. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.039>
125. Agnhage, Tove, Anne Perwuelz, e Nimeshwaree Behary. «Eco-Innovative Coloration and Surface Modification of Woven Polyester Fabric Using Bio-Based Materials and Plasma Technology». *Industrial Crops and Products* 86 (agosto 2016): 334–41. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.016>.
126. Swinehart, D. F. «The Beer-Lambert Law». *Journal of Chemical Education* 39, n. 7 (luglio 1962): 333. <https://doi.org/10.1021/ed039p333>.
127. <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/ABiokemiaEsMolekularisBiologiaAlapjai/images/image189.jpg>.
128. Atomssa, Tadelech, e A V Gholap. «Characterization of caffeine and determination of caffeine in tea leaves using UV-visible spectrometer». *Afr. J. Pure Appl. Chem.* 5 (1 gennaio 2011).
129. Edward, John T. «Molecular Volumes and the Stokes-Einstein Equation». *Journal of Chemical Education* 47, n. 4 (aprile 1970): 261. <https://doi.org/10.1021/ed047p261>.
130. <https://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range>.
131. Bingham, N.H., e Bruce Dunham. «Estimating Diffusion Coefficients From Count Data: Einstein-Smoluchowski Theory Revisited». *Annals of the Institute of Statistical Mathematics* 49, n. 4 (dicembre 1997): 667–79. <https://doi.org/10.1023/A:1003214209227>.
132. Clark. «Handbook of Textile and Industrial Dyeing». *Woodhead Publishing* (2011): 1-56, 218.
133. <http://www.definetextile.com/2013/09/cellulose.html>.
134. Goldthwait, C.F. and Guthrie, J.D. «Matthew's Textile Fibers», ed. by H. R. Mauersberger, 6th Ed., p. 219-256. John Wiley and Sons, New York (1954).
135. Kaur, Inderjeet, Neelam Sharma, e Vandna Kumari. «Modification of fiber properties through grafting of acrylonitrile to rayon by chemical and radiation methods». *Journal of Advanced Research* 4, n. 6 (1 novembre 2013): 547–57. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2012.11.003>.
136. Ribitsch, V., e K. Stana-Kleinscheck. «Characterizing Textile Fiber Surfaces with Streaming Potential Measurements». *Textile Research Journal* 68, n. 10 (1 ottobre 1998): 701–7. <https://doi.org/10.1177/004051759806801001>.
137. [www.permeagear.com](http://www.permeagear.com).
138. [http://www.mathisag.com/en/product\\_detail.php?txtProductID=123110](http://www.mathisag.com/en/product_detail.php?txtProductID=123110)
139. ASTM D7490-13, «Standard Test Method for Measurement of the Surface Tension of Solid Coatings, Substrates and Pigments using Contact Angle Measurements», ASTM International, West Conshohocken, PA, 2013, [www.astm.org](http://www.astm.org).
140. *Aatcc Technical Manual*. Research Triangle Park: Amer Assn Of Textile Chem, 2015. Test method 195-2012
141. Budden, Graham. «New impact protection textile provides defense and comfort». *AATCC Review* 6, n. 7 (2006): 29–31
142. Sawhney, A.P.S., B. Condon, K.V. Singh, S.S. Pang, G. Li, e David Hui. «Modern Applications of Nanotechnology in Textiles». *Textile Research Journal* 78, n. 8 (1 agosto 2008): 731–39. <https://doi.org/10.1177/0040517508091066>

143. Ristic, Tijana, Lidija Zemljič, Monika Novak Babič, Marjetka Kralj Kuncic, Silva Sonjak, Nina Gunde-cimerman, e Simona Strnad. «Antimicrobial efficiency of functionalized cellulose fibres as potential medical textiles». *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* - Formatex Research Center (2011): 37-51.
144. El-Hady, M. M., A. Farouk, e S. Sharaf. «Flame Retardancy and UV Protection of Cotton Based Fabrics Using Nano ZnO and Polycarboxylic Acids.» *Carbohydrate Polymers* 92, n. 1 (gennaio 2013): 400–406. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.085>.
145. Frunza, Ligia, Nicoleta Preda, Elena Matei, Stefan Frunza, Constantin Paul Ganea, Aurel Mihai Vlaicu, Lucian Diamandescu, e Angela Dorogan. «Synthetic Fabrics Coated with Zinc Oxide Nanoparticles by Electroless Deposition: Structural Characterization and Wetting Properties». *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 51, n. 19 (1 ottobre 2013): 1427–37. <https://doi.org/10.1002/polb.23346>.
146. Pallás, Isabel, Maria D. Marcos, Ramón Martínez-Máñez, e Jose V. Ros-Lis. «Development of a Textile Nanocomposite as Naked Eye Indicator of the Exposition to Strong Acids». *Sensors (Basel, Switzerland)* 17, n. 9 (16 settembre 2017). <https://doi.org/10.3390/s17092134>.
147. Katti, Dharendra S., Kyle W. Robinson, Frank K. Ko, e Cato T. Laurencin. «Bioresorbable Nanofiber-Based Systems for Wound Healing and Drug Delivery: Optimization of Fabrication Parameters». *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* 70, n. 2 (15 agosto 2004): 286–96. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30041>.
148. Wang, C. X., e Sh. L. Chen. «Fragrance-release Property of  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Compounds and their Application in Aromatherapy». *Journal of Industrial Textiles* 34, n. 3 (1 gennaio 2005): 157–66. <https://doi.org/10.1177/1528083705049050>.
149. Gerhardt, L.-C., R. Lottenbach, R. M. Rossi, e S. Derler. «Tribological Investigation of a Functional Medical Textile with Lubricating Drug-Delivery Finishing». *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 108 (1 agosto 2013): 103–9. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.01.055>.
150. Mostafalu, Pooria, Gita Kiaee, Giorgio Giatsidis, Akbar Khalilpour, Mahboobeh Nabavinia, Mehmet R. Dokmeci, Sameer Sonkusale, Dennis P. Orgill, Ali Tamayol, e Ali Khademhosseini. «A Textile Dressing for Temporal and Dosage Controlled Drug Delivery». *Advanced Functional Materials* 27, n. 41 (novembre 2017): 1702399. <https://doi.org/10.1002/adfm.201702399>.

## Appendice

Nelle tabelle riportate in questa sezione si utilizzeranno i seguenti simboli:

- $t$  = tempo
- $A$  = assorbanza
- $C$  = concentrazione di caffeina nel vano recettore
- $m\ cum$  = massa cumulativa di caffeina nel vano recettore
- $D\ std$  = deviazione standard
- $e$  = errore

Nei grafici le curve sono riportate alla massa complessivamente rilasciata dai singoli campioni.

**Tabella 1 (appendice) - Caratterizzazione delle membrane cellulosiche**

<i>t</i> [h]	<i>A 1</i>	<i>A 2</i>	<i>A 3</i>	<i>A 4</i>	<i>A Media</i>	<i>C</i> [mg/ml]	<i>m cum</i> [mg]	% Caffeina rilasciata	<i>D std (A)</i>	<i>e (C)</i> [mg/mL]	<i>e (m cum)</i> [mg]	<i>e %</i>
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0	0,000	0,000	0,000	0,0
0,17	0,888	0,896	0,901	1,216	0,975	0,110	1,256	49,8	0,161	0,018	0,207	4,6
0,34	1,044	1,146	1,083	1,282	1,139	0,129	1,577	62,6	0,104	0,012	0,153	3,4
0,5	0,956	1,279	1,196	1,466	1,224	0,138	1,816	72,0	0,211	0,024	0,302	6,7
0,67	0,885	1,321	1,220	1,426	1,213	0,137	1,940	76,9	0,234	0,026	0,356	7,9
0,85	0,776	1,320	1,134	1,448	1,170	0,132	2,021	80,2	0,292	0,033	0,457	10,2
1	0,673	1,125	0,982	1,160	0,985	0,111	1,915	76,0	0,222	0,025	0,399	8,9
1,5	0,741	1,328	1,130	1,542	1,185	0,134	2,284	90,6	0,341	0,038	0,577	12,8
2	0,667	1,228	1,031	1,480	1,102	0,124	2,310	91,6	0,343	0,039	0,619	13,7
3	0,757	1,134	0,954	1,361	1,052	0,119	2,370	94,0	0,257	0,029	0,547	12,2
4	0,543	1,014	0,856	1,249	0,916	0,103	2,314	91,8	0,296	0,033	0,626	13,9
5	0,481	0,918	0,773	1,137	0,827	0,093	2,304	91,4	0,275	0,031	0,633	14,1
6	0,455	0,860	0,706	1,672	0,923	0,104	<b>2,521</b>	<b>100,0</b>	0,526	0,059	0,987	21,9
24	0,373	0,727	0,582	0,841	0,631	0,071	2,248	89,2	0,202	0,023	0,629	14,0
30	0,347	0,714	0,608	0,838	0,627	0,071	2,315	91,8	0,209	0,024	0,661	14,7
48	0,320	0,642	0,493	0,709	0,541	0,061	2,275	90,2	0,173	0,020	0,638	14,2

**Tabella 2 (appendice) - Rilascio da tessuto 100% cotone funzionalizzato con caffeina libera**

<i>t</i> [h]	<i>A 1</i>	<i>A 2</i>	<i>A 3</i>	<i>A 4</i>	<i>A Media</i>	<i>C</i> [mg/ml]	<i>m cum</i> [mg]	% Caffeina rilasciata	<i>D std (A)</i>	<i>e (C)</i> [mg/mL]	<i>e (m cum)</i> [mg]	<i>e %</i>
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0	0,000	0,000	0,000	0,0
0,17	0,621	0,693	0,521	0,595	0,608	0,069	0,782	42,3	0,071	0,008	0,091	2,0
0,34	0,694	0,860	1,008	0,747	0,827	0,093	1,134	61,4	0,139	0,016	0,187	4,2
0,5	0,928	0,977	0,910	0,918	0,933	0,105	1,364	73,8	0,030	0,003	0,062	1,4
0,67	0,912	1,019	1,007	1,011	0,987	0,112	1,539	83,3	0,050	0,006	0,092	2,0
0,85	0,912	1,002	1,030	1,007	0,988	0,112	1,651	89,4	0,052	0,006	0,100	2,2
1	0,930	0,975	0,993	1,031	0,982	0,111	1,756	95,0	0,042	0,005	0,093	2,1
1,5	0,886	0,910	1,007	0,992	0,949	0,107	1,824	98,7	0,060	0,007	0,120	2,7
2	0,831	0,839	0,951	0,916	0,884	0,100	<b>1,848</b>	<b>100,0</b>	0,059	0,007	0,126	2,8
3	0,765	0,765	0,774	0,836	0,785	0,089	1,820	98,5	0,034	0,004	0,101	2,2
4	0,673	0,688	0,790	0,761	0,728	0,082	1,835	99,3	0,056	0,006	0,133	3,0
5	0,605	0,610	0,709	0,700	0,656	0,074	1,825	98,7	0,056	0,006	0,139	3,1
6	0,539	0,548	0,647	0,633	0,592	0,067	1,816	98,3	0,056	0,006	0,146	3,2
24	0,454	0,462	0,576	0,506	0,500	0,056	1,764	95,5	0,056	0,006	0,152	3,4

**Tabella 3 (appendice) - Rilascio da tessuto 50% cotone / 50% viscosa funzionalizzato con caffeina libera**

<i>t</i> [h]	<i>A 1</i>	<i>A 2</i>	<i>A 3</i>	<i>A 4</i>	<i>A Media</i>	<i>C</i> [mg/ml]	<i>m cum</i> [mg]	% Caffeina rilasciata	<i>D std (A)</i>	<i>e (C)</i> [mg/mL]	<i>e (m cum)</i> [mg]	<i>e %</i>
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0	0,000	0,000	0,000	0,0
0,17	0,388	0,269	0,254	0,200	0,278	0,031	0,358	24,2	0,079	0,009	0,102	2,3
0,34	0,685	0,477	0,525	0,500	0,547	0,062	0,736	49,8	0,094	0,011	0,130	2,9
0,5	0,640	0,474	0,699	0,508	0,580	0,066	0,841	56,9	0,107	0,012	0,157	3,5
0,67	0,611	0,553	0,716	0,597	0,619	0,070	0,956	64,7	0,069	0,008	0,121	2,7
0,85	0,695	0,535	0,752	0,753	0,684	0,077	1,109	75,1	0,103	0,012	0,172	3,8
1	0,689	0,848	1,062	0,987	0,897	0,101	1,461	98,9	0,164	0,019	0,263	5,8
1,5	0,732	0,549	0,902	0,671	0,714	0,081	1,326	89,8	0,147	0,017	0,259	5,8
2	0,739	0,509	0,996	0,758	0,751	0,085	1,455	98,5	0,199	0,022	0,343	7,6
3	0,738	0,526	0,884	0,598	0,687	0,078	1,457	98,6	0,158	0,018	0,313	6,9
4	0,668	0,547	0,817	0,536	0,642	0,073	<b>1,477</b>	<b>100,0</b>	0,131	0,015	0,295	6,6
5	0,543	0,492	0,688	0,499	0,556	0,063	1,438	97,4	0,091	0,010	0,259	5,8
6	0,438	0,389	0,627	0,486	0,485	0,055	1,410	95,5	0,103	0,012	0,284	6,3
24	0,445	0,369	0,614	0,410	0,460	0,052	1,432	97,0	0,108	0,012	0,302	6,7

**Tabella 4 (appendice) - Rilascio da tessuto 100% viscosa funzionalizzato con caffeina libera**

<i>t</i> [h]	<i>A 1</i>	<i>A 2</i>	<i>A 3</i>	<i>A 4</i>	<i>A Media</i>	<i>C</i> [mg/ml]	<i>m cum</i> [mg]	% Caffeina rilasciata	<i>D std (A)</i>	<i>e (C)</i> [mg/mL]	<i>e (m cum)</i> [mg]	<i>e %</i>
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0	0,000	0,000	0,000	0,0
0,17	0,364	0,409	0,498	0,477	0,437	0,049	0,563	26,1	0,062	0,007	0,080	1,8
0,34	0,575	0,540	0,678	0,725	0,630	0,071	0,860	39,8	0,087	0,010	0,118	2,6
0,5	0,715	0,605	0,906	0,908	0,784	0,089	1,130	52,3	0,150	0,017	0,209	4,7
0,67	0,778	0,708	0,937	1,011	0,859	0,097	1,315	60,9	0,140	0,016	0,214	4,7
0,85	0,852	0,732	0,999	1,055	0,910	0,103	1,477	68,4	0,146	0,017	0,238	5,3
1	0,854	0,772	1,092	1,056	0,944	0,107	1,624	75,2	0,155	0,018	0,266	5,9
1,5	0,888	0,811	1,171	1,099	0,992	0,112	1,793	83,1	0,170	0,019	0,303	6,7
2	0,888	0,810	1,127	1,022	0,962	0,109	1,866	86,4	0,141	0,016	0,284	6,3
3	0,864	0,792	1,149	1,038	0,961	0,109	1,974	91,4	0,163	0,018	0,328	7,3
4	0,840	0,747	1,079	0,988	0,914	0,103	2,021	93,6	0,148	0,017	0,328	7,3
5	0,795	0,691	1,032	0,974	0,873	0,099	2,072	96,0	0,158	0,018	0,357	7,9
6	0,753	0,689	0,958	0,901	0,825	0,093	2,110	97,7	0,125	0,014	0,333	7,4
24	0,731	0,668	0,923	0,844	0,792	0,089	<b>2,159</b>	<b>100,0</b>	0,114	0,013	0,333	7,4

**Tabella 5 (appendice) - Rilascio da tessuto 100% cotone funzionalizzato con nanoparticelle di policaprolattone contenenti caffeina**

<i>t</i> [h]	<i>A 1</i>	<i>A 2</i>	<i>A 3</i>	<i>A 4</i>	<i>A Media</i>	<i>C</i> [mg/ml]	<i>m cum</i> [mg]	% Caffeina rilasciata	<i>D std (A)</i>	<i>e (C)</i> [mg/mL]	<i>e (m cum)</i> [mg]	<i>e %</i>
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0	0,000	0,000	0,000	0,0
0,17	0,362	0,310	0,454	0,387	0,378	0,043	0,487	82,3	0,060	0,007	0,077	3,4
0,34	0,319	0,339	0,468	0,358	0,371	0,042	0,521	88,0	0,067	0,008	0,093	4,1
0,5	0,269	0,340	0,413	0,239	0,315	0,036	0,491	82,9	0,078	0,009	0,114	5,1
0,67	0,363	0,324	0,368	0,196	0,313	0,035	0,523	88,4	0,080	0,009	0,126	5,5
0,85	0,268	0,316	0,304	0,262	0,288	0,032	0,526	88,9	0,027	0,003	0,066	2,9
1	0,289	0,348	0,291	0,217	0,286	0,032	0,557	94,1	0,054	0,006	0,104	4,6
1,5	0,221	0,295	0,263	0,222	0,250	0,028	0,543	91,7	0,036	0,004	0,087	3,8
2	0,227	0,299	0,300	0,179	0,251	0,028	0,572	96,7	0,059	0,007	0,121	5,4
3	0,195	0,271	0,237	0,176	0,220	0,025	0,560	94,7	0,043	0,005	0,107	4,7
4	0,196	0,268	0,245	0,183	0,223	0,025	0,589	99,6	0,040	0,005	0,108	4,8
5	0,168	0,204	0,221	0,173	0,192	0,022	0,574	97,0	0,025	0,003	0,094	4,1
6	0,187	0,222	0,185	0,142	0,184	0,021	0,586	99,0	0,033	0,004	0,106	4,7
24	0,165	0,230	0,165	0,130	0,173	0,019	<b>0,592</b>	<b>100,0</b>	<b>0,042</b>	<b>0,005</b>	<b>0,122</b>	<b>5,4</b>

**Tabella 6 (appendice) - Rilascio da tessuto 50% cotone / 50% viscosa funzionalizzato con nanoparticelle di policaprolattone contenenti caffeina**

<i>t</i> [h]	<i>A 1</i>	<i>A 2</i>	<i>A 3</i>	<i>A 4</i>	<i>A Media</i>	<i>C</i> [mg/ml]	<i>m cum</i> [mg]	% Caffeina rilasciata	<i>D std (A)</i>	<i>e (C)</i> [mg/mL]	<i>e (m cum)</i> [mg]	<i>e %</i>
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0	0,000	0,000	0,000	0,0
0,17	0,026	0,012	0,012	0,022	0,018	0,002	0,023	4,3	0,007	0,001	0,009	0,4
0,34	0,069	0,106	0,058	0,088	0,080	0,009	0,105	19,5	0,021	0,002	0,028	1,2
0,5	0,370	0,438	0,339	0,496	0,411	0,046	<b>0,540</b>	<b>100,0</b>	0,070	0,008	0,094	4,1
0,67	0,341	0,316	0,258	0,299	0,304	0,034	0,448	83,0	0,035	0,004	0,056	2,5
0,85	0,215	0,248	0,217	0,285	0,241	0,027	0,403	74,5	0,033	0,004	0,057	2,5
1	0,223	0,319	0,182	0,337	0,265	0,030	0,461	85,3	0,075	0,008	0,115	5,1
1,5	0,224	0,251	0,223	0,237	0,234	0,026	0,450	83,3	0,013	0,001	0,044	2,0
2	0,183	0,276	0,200	0,163	0,206	0,023	0,440	81,4	0,049	0,006	0,092	4,1
3	0,134	0,301	0,175	0,204	0,204	0,023	0,461	85,3	0,071	0,008	0,126	5,6
4	0,175	0,277	0,194	0,232	0,220	0,025	0,504	93,4	0,045	0,005	0,100	4,4
5	0,130	0,232	0,190	0,190	0,186	0,021	0,485	89,9	0,042	0,005	0,101	4,5
6	0,124	0,209	0,165	0,172	0,168	0,019	0,483	89,4	0,035	0,004	0,097	4,3
24	0,132	0,215	0,142	0,145	0,159	0,018	0,490	90,8	0,038	0,004	0,105	4,6

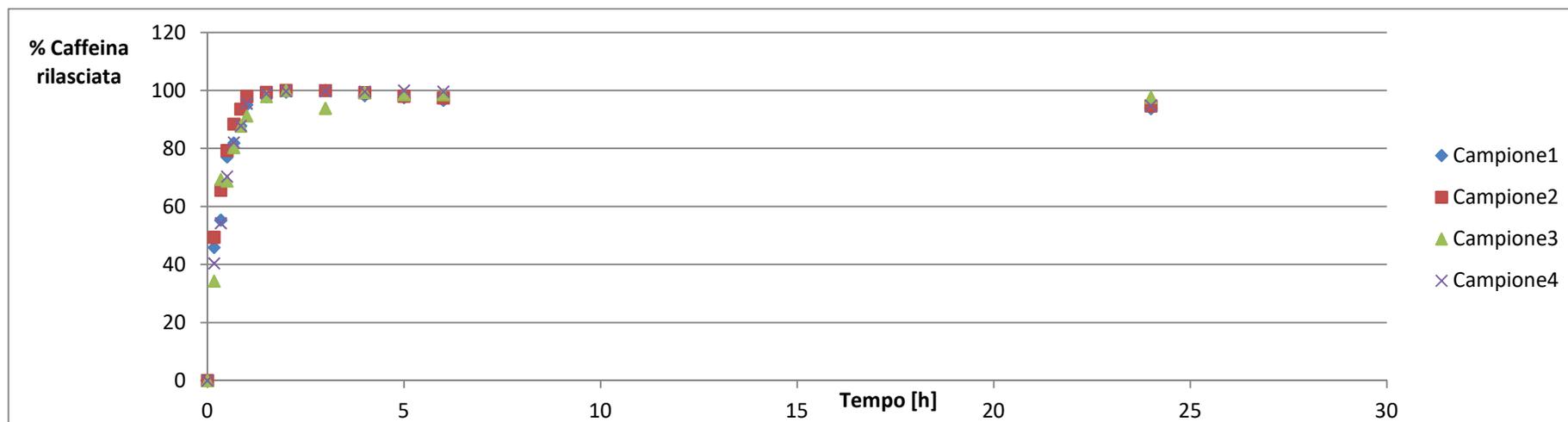
**Tabella 7 (appendice) - Rilascio da tessuto 100% viscosa funzionalizzato con nanoparticelle di policaprolattone contenenti caffeina**

<i>t</i> [h]	<i>A 1</i>	<i>A 2</i>	<i>A 3</i>	<i>A 4</i>	<i>A Media</i>	<i>C</i> [mg/ml]	<i>m cum</i> [mg]	% Caffeina rilasciata	<i>D std (A)</i>	<i>e (C)</i> [mg/mL]	<i>e (m cum)</i> [mg]	<i>e %</i>
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0	0,000	0,000	0,000	0,0
0,17	0,118	0,130	0,092	0,071	0,103	0,012	0,132	25,2	0,026	0,003	0,034	1,5
0,34	0,153	0,249	0,133	0,104	0,160	0,018	0,217	41,4	0,063	0,007	0,084	3,7
0,5	0,178	0,256	0,150	0,172	0,189	0,021	0,273	52,0	0,046	0,005	0,070	3,1
0,67	0,189	0,274	0,166	0,185	0,204	0,023	0,313	59,6	0,048	0,005	0,077	3,4
0,85	0,187	0,269	0,180	0,221	0,214	0,024	0,350	66,6	0,041	0,005	0,073	3,2
1	0,195	0,263	0,183	0,200	0,210	0,024	0,369	70,3	0,036	0,004	0,072	3,2
1,5	0,194	0,250	0,184	0,182	0,203	0,023	0,383	72,9	0,032	0,004	0,071	3,1
2	0,213	0,254	0,179	0,179	0,206	0,023	0,411	78,2	0,036	0,004	0,079	3,5
3	0,199	0,236	0,188	0,179	0,201	0,023	0,426	81,2	0,025	0,003	0,069	3,1
4	0,238	0,251	0,245	0,216	0,238	0,027	0,497	94,6	0,015	0,002	0,060	2,6
5	0,190	0,240	0,239	0,194	0,216	0,024	0,496	94,3	0,027	0,003	0,077	3,4
6	0,200	0,219	0,206	0,192	0,204	0,023	0,505	96,2	0,011	0,001	0,059	2,6
24	0,177	0,233	0,227	0,171	0,202	0,023	<b>0,525</b>	<b>100,0</b>	0,033	0,004	0,088	3,9

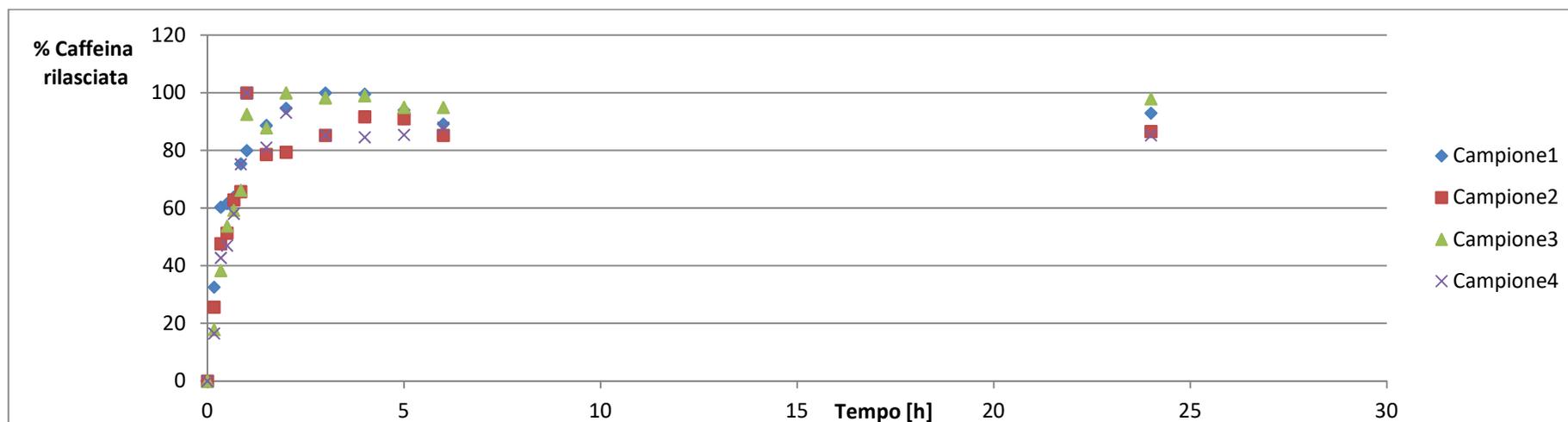
**Tabella 8 (appendice) - Valori di assorbanza (*a*) e massa (*m*) misurate nelle singole membrane (*M*) e tessuti (*T*) esauste, elencate con i numeri romani nei relativi set di rilascio.**

	<i>I T,</i> <i>a</i>	<i>I T,</i> <i>m [mg]</i>	<i>I M,</i> <i>a</i>	<i>I M,</i> <i>m [mg]</i>	<i>II T,</i> <i>a</i>	<i>II T,</i> <i>m [mg]</i>	<i>II M,</i> <i>a</i>	<i>II M,</i> <i>m [mg]</i>	<i>III T,</i> <i>a</i>	<i>III T,</i> <i>m [mg]</i>	<i>III M,</i> <i>a</i>	<i>III M,</i> <i>m [mg]</i>	<i>IV T,</i> <i>a</i>	<i>IV T,</i> <i>m [mg]</i>	<i>IV M,</i> <i>a</i>	<i>IV M,</i> <i>m [mg]</i>
<b>100 C - Caf</b>	0,112	0,094	0,185	0,156	0,138	0,116	0,228	0,192	0,095	0,080	0,183	0,154	0,115	0,097	0,287	0,242
<b>100 V - Caf</b>	0,030	0,025	0,263	0,221	0,025	0,021	0,237	0,200	0,065	0,055	0,418	0,352	0,051	0,043	0,297	0,250
<b>50C-50V - Caf</b>	0,048	0,040	0,255	0,215	0,052	0,044	0,210	0,177	0,068	0,057	0,197	0,166	0,044	0,037	0,208	0,175
<b>100 C - NP</b>	0,001	0,001	0,277	0,295	0,000	0,000	0,437	0,465	0,004	0,004	0,341	0,363	0,000	0,000	0,305	0,324
<b>100 V - NP</b>	0,000	0,000	0,845	0,449	0,026	0,014	0,820	0,436	0,022	0,012	0,841	0,447	0,007	0,004	0,750	0,399
<b>50C50V - NP</b>	0,017	0,009	0,650	0,346	0,047	0,025	0,573	0,305	0,050	0,027	0,516	0,274	0,110	0,058	0,706	0,375

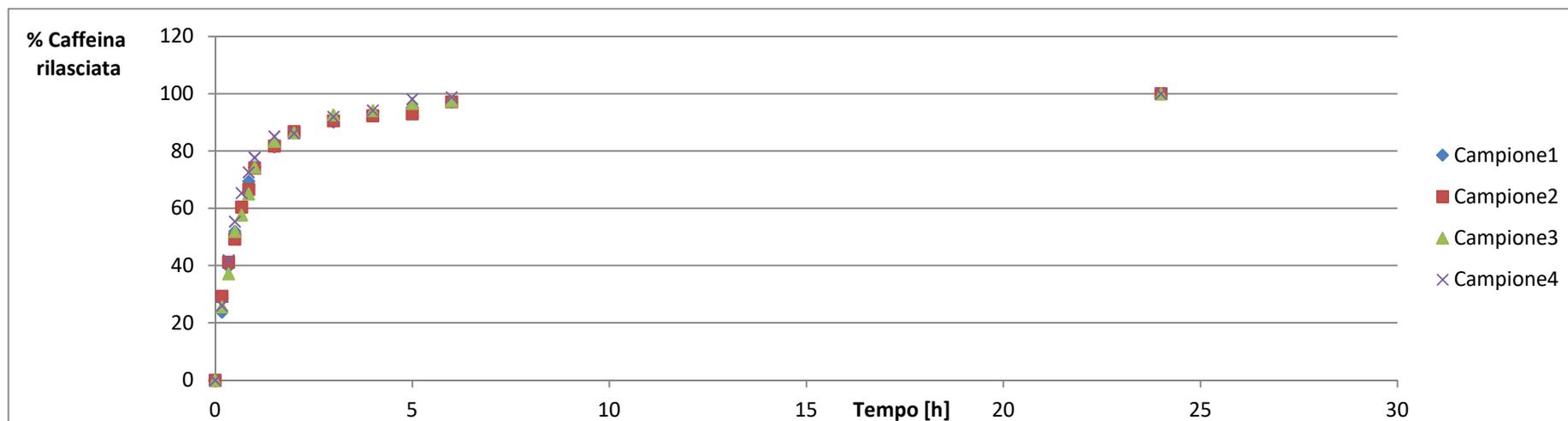
**Fig. 1 (appendice)** - Rilascio da tessuto 100% cotone funzionalizzato con caffeina libera



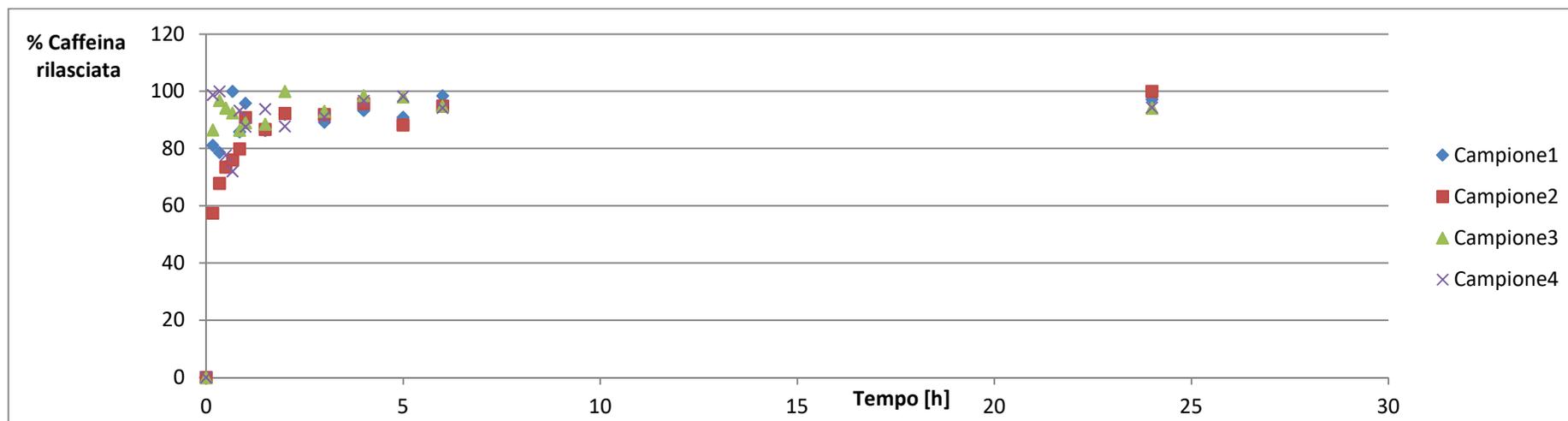
**Fig. 2 (appendice)** - Rilascio da tessuto 50% cotone / 50% viscosa funzionalizzato con caffeina libera



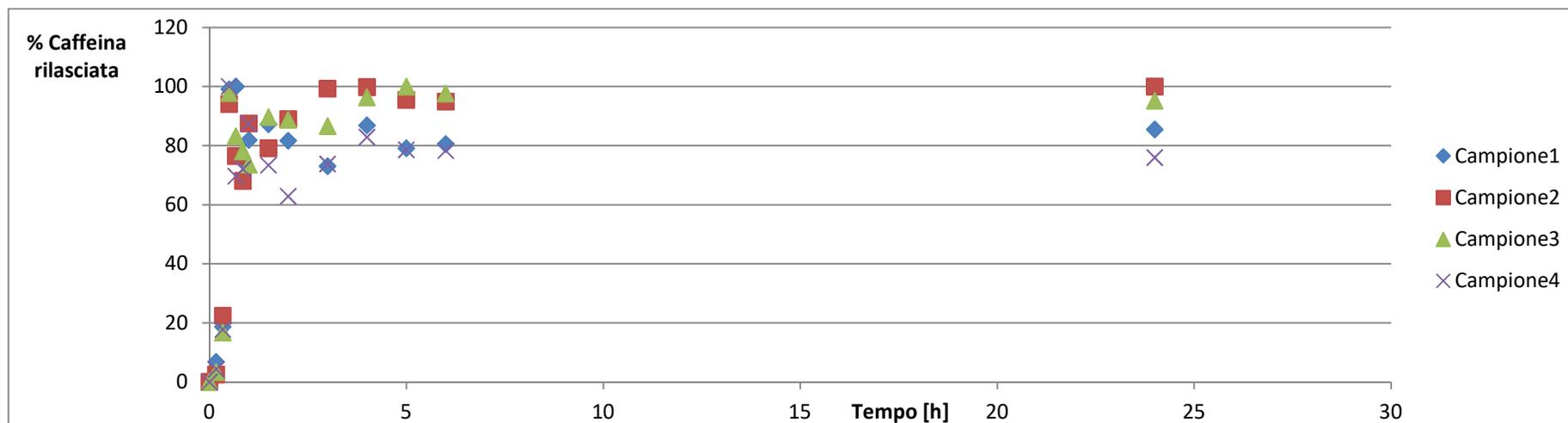
**Fig. 3 (appendice)** - Rilascio da tessuto 100% viscosa funzionalizzato con caffeina libera



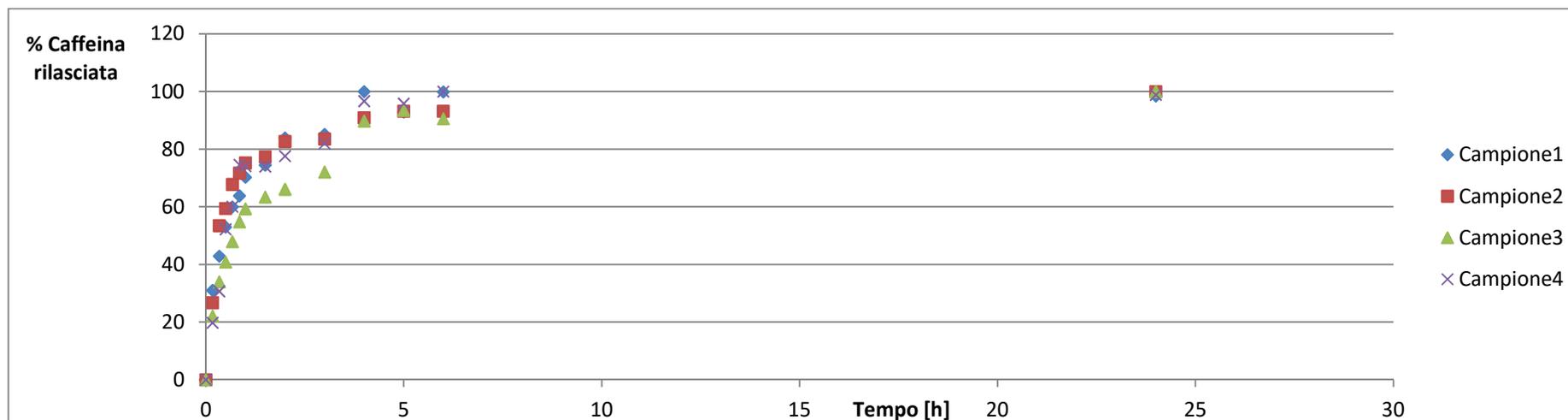
**Fig. 4** - Rilascio da tessuto 100% cotone funzionalizzato con nanoparticelle di policaprolattone contenenti caffeina



*Fig. 5 (appendice) - Rilascio da tessuto 50% cotone - 50% viscosa funzionalizzato con nanoparticelle di policaprolattone contenenti caffeina*



*Fig. 6 (appendice) - Rilascio da tessuto 100% viscosa funzionalizzato con nanoparticelle di policaprolattone contenenti caffeina*





## **Ringraziamenti**

Giunto al termine di questo lavoro vorrei ricordare tutte le persone che sono state per me luce in questi anni, come stimolo a cambiare o continuare: la mia famiglia, i miei amici sparsi per il mondo e anche gli sconosciuti incrociati per caso nella mia strada. Il cammino politecnico è stata una parentesi e una palestra di vita per i miei giorni a venire. "Grandi orizzonti e tanto coraggio", disse un giorno Papa Francesco.

Grazie.

*Torino, 05/12/2017*

*Matteo*