

Fibre

antimicrobiche per applicazioni chirurgiche

di Luigi Botta, Roberto Scaffaro, Francesco Paolo La Mantia*

La contaminazione batterica è un problema che investe una grande varietà di materiali utilizzati per le applicazioni biomedicali. Molti di questi manufatti polimerici vengono sterilizzati per il loro utilizzo finale ma, ciononostante, è comunque elevata la possibilità di una contaminazione batterica una volta esposti all'atmosfera. Inoltre, l'inserimento di materiale estraneo nell'organismo suscita sempre una reazione immunitaria e/o infiammatoria più o meno intensa.

I fili da sutura, per esempio, si ricoprono di fluidi molto ricchi di proteine creando l'ambiente perfetto per la proliferazione batterica. Una volta che la sutura è contaminata, il sistema immunitario innesca sistemi di disinfezione locali che risultano spesso inefficaci e causano l'insorgere di reazioni infiammatorie più o meno gravi. Con queste premesse, risulta evidente l'interesse crescente e la necessità di realizzare fili da sutura con proprietà antimicrobiche.

Metodi di produzione

Il conferimento di proprietà antibatteriche al filo da sutura può essere effettuato attraverso diversi metodi e può modificare o meno la struttura del polimero. Bisogna,

comunque, verificare che l'introduzione dell'antimicrobico non modifichi significativamente le proprietà meccaniche del materiale. I metodi attualmente utilizzati per la produzione di fili con proprietà antibatteriche sono essenzialmente il coating e il grafting, e molto più raramente l'incorporazione da fuso, dell'agente antibatterico.

La tecnica del coating viene effettuata immergendo il materiale in una soluzione che contiene la sostanza che si desidera depositare sulla superficie del filo polimerico. In questo modo il filo risulterà ricoperto da un film sottile, il cui spessore dipende da numerosi fattori tra cui

la viscosità della soluzione, la velocità di estrazione, la tensione superficiale e l'accelerazione di gravità. In letteratura sono riportati diversi casi di preparazione di fili antimicrobici per mezzo del coating, in cui il filo da sutura viene immerso in una soluzione contenente l'antimicrobico.

Il grafting consiste invece nell'introduzione di particolari gruppi chimici nella catena polimerica, in modo tale da conferire al materiale proprietà che prima non aveva. Solitamente l'innesto si realizza introducendo il polimero in una soluzione, in condizioni di temperatura e di pH tali da favorire l'innesto dei gruppi funzionali desiderati nella catena polimerica. La percentuale di innesto può essere controllata facilmente variando le condizioni operative.

L'incorporazione da fuso, infine, consiste nel miscelare la sostanza antimicrobica con la matrice polimerica allo stato fuso. È ovvio che, in questo processo, il rischio di degradazione dell'antibatterico sia molto maggiore rispetto alle altre tecniche, in quanto le temperature di lavorazione del materiale

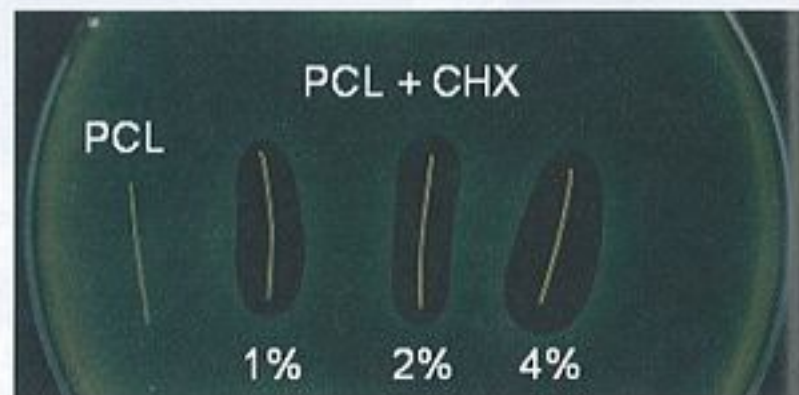


Fig. 2 - Test d'inibizione in terreno solido contro *M. luteus* per le fibre di PCL e PCL con clorexidina. All'aumentare dell'attività antimicrobica, aumenta l'alone intorno al filo

sono decisamente elevate per molti antimicrobici. Tuttavia, una volta trovato il giusto accoppiamento tra polimero e antimicrobico, il processo offre senza dubbio enormi vantaggi economici e applicativi, in quanto consente di inserire la sostanza antimicrobica direttamente nella fase di estrusione e non richiede l'utilizzo di solventi, per cui i costi di produzione risultano notevolmente ridotti.

La realizzazione di fili con proprietà antimicrobiche è tuttora oggetto di studio. La difficoltà maggiore sta nel trovare un buon compromesso tra l'efficacia antimicrobica del filo, la facilità di produzione e il suo costo, aspetto certamente da non trascurare. Se, da un lato, l'utilizzo di fili antimicrobici ridurrebbe o eliminerebbe del tutto le spese dei farmaci da assumere durante il periodo post operatorio (senza, ovviamente, considerare i costi umani), dall'altro i costi di produzione devono essere tali da garantire un prezzo accessibile.

Parte sperimentale: preparazione di fibre di PCL antimicrobiche

Una volta introdotto l'antibatterico nel filo, con uno dei metodi illustrati precedentemente, è necessario: verificare che il ma-



Fig. 1 - La nuova apparecchiatura SpinRheo (Idealnstr, Italia) permette di misurare le proprietà reologiche in flusso elongazionale non isoterma e, contemporaneamente, preparare le miscele e raccogliere le fibre prodotte a diversi valori del rapporto di stiro

teriale sia rimasto filabile nonostante l'introduzione della carica; testare le proprietà meccaniche del materiale, in particolare il carico di rottura; verificare le proprietà antimicrobiche del filo; studiare la cinetica di rilascio della sostanza. Nei laboratori del dipartimento di Ingegneria dei Materiali dell'Università di Palermo è stata studiata la possibilità di preparare fibre di policaprolattone (PCL) con proprietà antimicrobiche per applicazioni in fili da sutura. In particolare, i fili sono stati dotati di proprietà antimicrobiche incorporando da fuso la clorexidina nella matrice polimerica durante un'operazione di estrusione [1].

Il policaprolattone è un poliestere alifatico sintetico biodegradabile molto usato per applicazioni biomedicali, quali: sistemi per il rilascio controllato dei farmaci, fili da sutura assorbibili e strutture per applicazioni in ingegneria tissutale [2]. La clorexidina (CHX) è un agente battericida ad ampio spettro d'azione, attivo verso Gram positivi, Gram negativi e anche verso miceti. Viene impiegata principalmente per la sua azione disinfettante e antisettica nella disinfezione delle ferite, in diversi prodotti per l'igiene orale e, in generale, in varie applicazioni odontoiatriche [3]. Sia la clorexidina (sottoforma di diacetato) sia il PCL utilizzati in questo lavoro sono materiali commerciali forniti dalla società Sigma Aldrich.

La clorexidina è stata incorporata nel PCL a diverse concentrazioni (1%, 2% e 4% in peso) durante l'operazione di estrusione effettuata con un estrusore bivate controrotante e un profilo di temperatura di 40-50-70-100 °C. Le fibre sono state prodotte in linea usando una nuova apparecchiatura - SpinRheo (Idealnstr, Italia) - posta a valle dell'estrusore, costituendo così un vero e proprio impianto pilota per la produzione di fibre. L'apparecchiatura, mostrata in **figura 1**, è composta da un sistema di pulegge che afferra il filamento e lo convoglia verso un rullo, rotante a velocità costante o ad accelerazione costante, su cui viene avvolto il filamento stesso. Quindi, variando opportunamente la velocità di avvolgimento della bobina e la portata dell'estrusore è possibile ottenere fibre del diametro desiderato. Le fibre prodotte in questo lavoro hanno un diametro medio di 250 µm.

La caratterizzazione in flusso elongazionale non isoterma è stata condotta utilizzando la stessa apparecchiatura, che è dotata, infatti, di una cella di carico che permette di misurare la forza agente sul filamento. Alla rottura del filo, viene quindi registrata la forza (MS: Melt Strength) e la velocità a cui è avvenuta la rottura. Il rapporto fra tale velocità e la velocità di estrusione (BSR: Breaking Stretching Ratio) è l'allungamento massimo che il fuso può subire in quelle

determinate condizioni sperimentali. L'apparecchiatura permette quindi di misurare le proprietà reologiche in flusso elongazionale non isoterma e, contemporaneamente, di preparare le miscele e raccogliere le fibre prodotte a diversi valori del rapporto di stiro. Le proprietà meccaniche delle fibre sono state valutate mediante prove di trazione eseguite con un dinamometro Instron (ITW, Torino).

L'attività antibatterica dei fili prodotti è stata verificata attraverso test di diffusione in agar. L'inibizione nei confronti di due Gram positivi (*M. luteus* e *B. subtilis*) e di un Gram negativo (*E. coli*) è stata studiata valutando la zona d'inibizione attorno alle fibre. Questa tipologia di test prevede l'allestimento di piastre con idoneo terreno

solido, inoculate con una quantità di batteri sufficiente a dare uno sviluppo confluento che provochi una patina uniforme sul terreno. Subito dopo l'inoculo, si depono sulla superficie della piastra una serie di dischetti ritagliati dai materiali di cui si desidera testare l'attività antimicrobica. Si pongono le piastre in incubatore a 37°C per 18-24 ore. Se il microorganismo cresce normalmente significa che è resistente, se invece è sensibile si rende visibile attorno al disco un

alone di inibizione.

Sono state condotte inoltre prove di inibizione alla crescita batterica in un terreno liquido. Il rilascio di CHX dalle fibre in acqua distillata è stato valutato attraverso uno spettrofotometro UV-visibile.

Risultati

Tutte le fibre contenenti clorexidina hanno mostrato un chiaro alone d'inibizione nei confronti di entrambi i tipi di batteri. Ciò si-

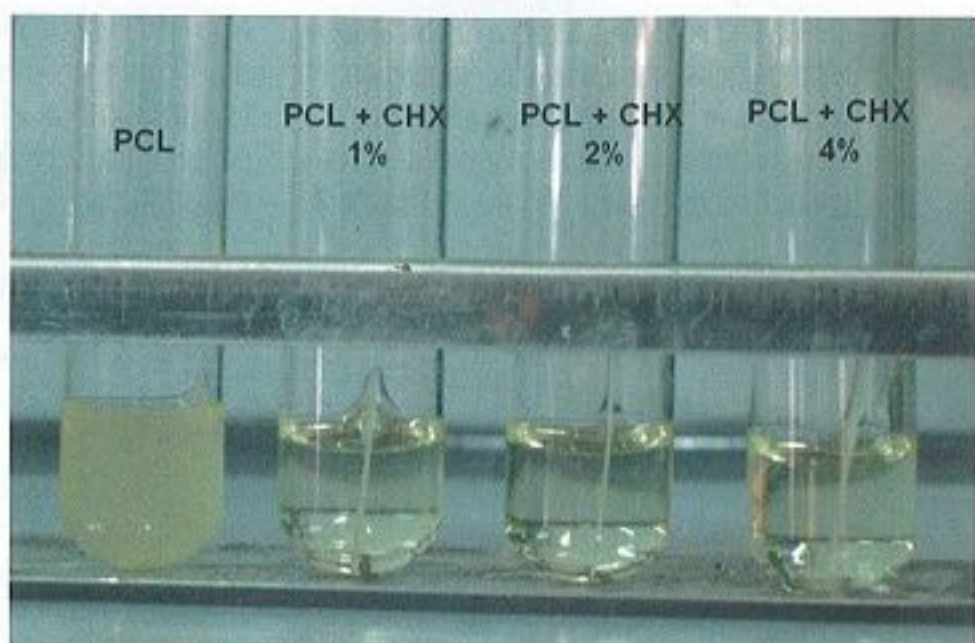


Fig. 3 - Test d'inibizione in terreno liquido contro *M. luteus* per le fibre di PCL e PCL con clorexidina. Al crescere dell'attività antibatterica, diminuisce la torbidità del sistema

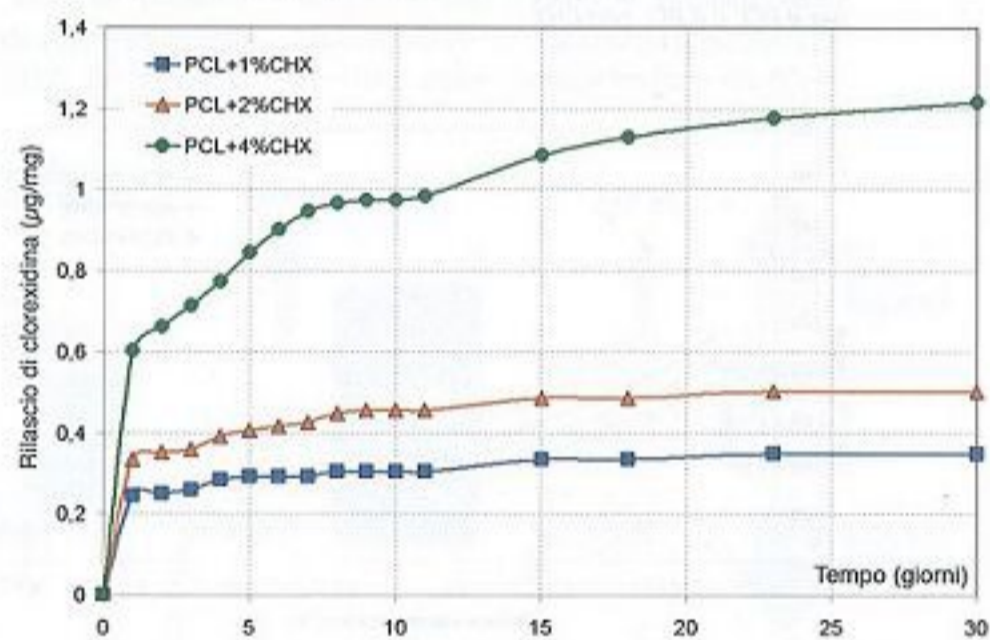


Fig. 4 - Rilascio cumulativo di CHX in acqua distillata in funzione del tempo

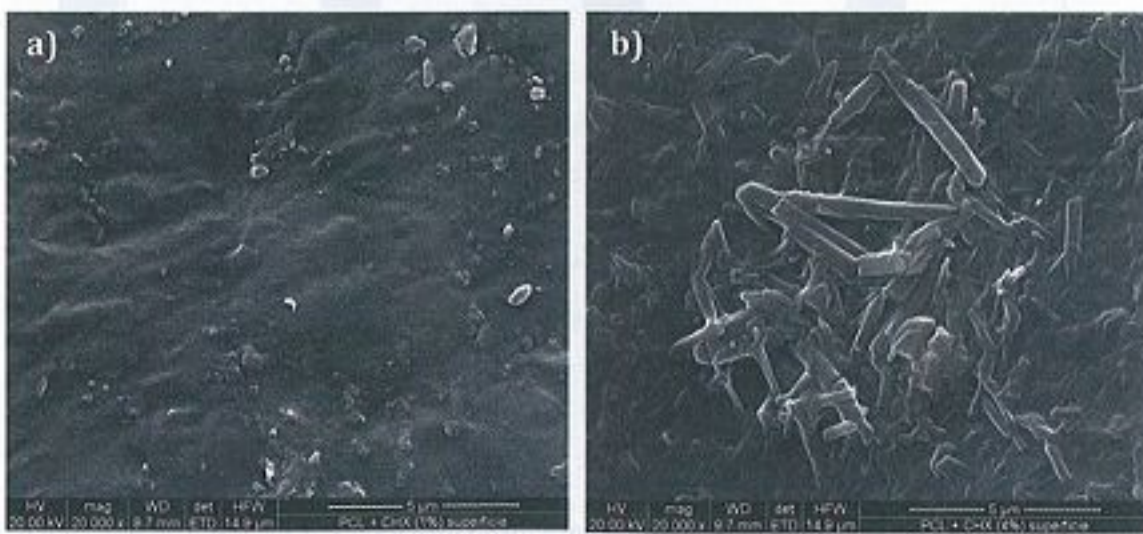


Fig. 5 - Micrografie SEM della superficie delle fibre di: a) PCL + 1% CHX; b) PCL + 4% CHX

gnifica che la proliferazione microbica viene fermata dalla presenza della clorexidina. Al contrario, le fibre di PCL tal quale, come atteso, non hanno mostrato nessuna attività antibatterica, come è visibile in **figura 2**,

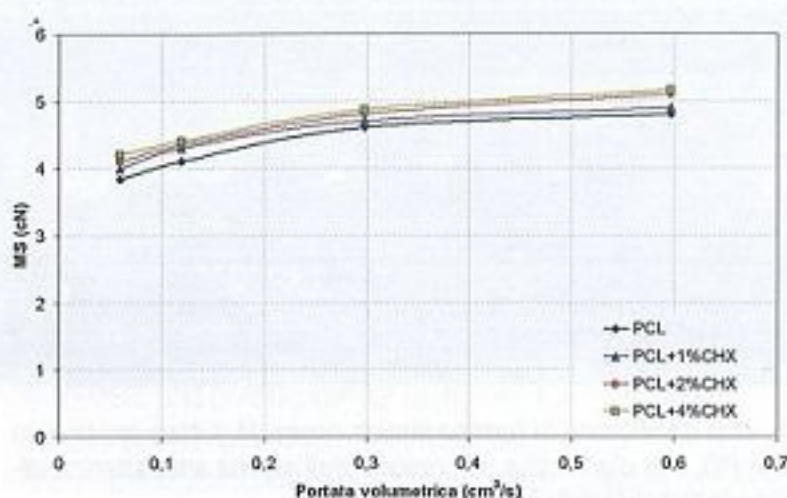


Fig. 6 - Melt Strength (MS) in funzione della portata volumetrica per il PCL e il PCL con CHX

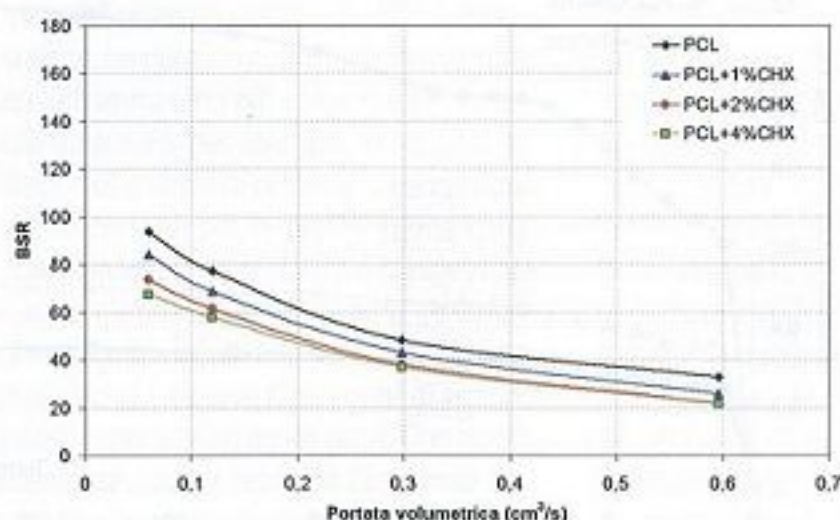


Fig. 7 - Breaking Stretching Ratio (BSR) in funzione della portata volumetrica per il PCL e il PCL con CHX

nel caso di un test condotto contro il *M. luteus*. L'alone d'inibizione cresce all'aumentare della quantità di CHX incorporata nel PCL, anche se già la fibra contenente la più bassa concentrazione di agente antimicro-

bico (1% in peso) mostra una marcata zona d'inibizione alla crescita batterica. Anche i test d'inibizione in terreno liquido hanno confermato la chiara attività antibatterica espletata dai fili preparati con clorexidina,

come si può constatare osservando la **figura 3**.

Lo studio del rilascio di clorexidina dalle fibre ha mostrato, come previsto, che all'aumentare della quantità di agente antibatterico incorporato aumenta la quantità rilasciata (**figura 4**). Inoltre, all'aumentare della concentrazione di CHX incorporata, aumenta il rilascio immediato (effetto burst) di agente antimicrobico. Ciò è legato molto probabilmente alla maggiore disponibilità di clorexidina sulla superficie delle fibre a maggiore concentrazione, come è evidenziato dalle micrografie SEM riportate in **figura 5**.

I materiali prodotti sono stati caratterizzati in flusso elongazionale non isoterma

per studiare gli effetti dell'introduzione della carica sulla filabilità del materiale. In **figura 6** sono riportati i valori di MS in funzione della portata volumetrica (cm³/s) per tutti i materiali prodotti. All'aumentare della per-

centuale di antimicrobico introdotto si nota un lieve aumento della melt strength, la cui entità è così bassa da potersi considerare trascurabile.

La **figura 7** mostra il valore di BSR degli stessi materiali in funzione della portata volumetrica. I valori di BSR diminuiscono lievemente all'aumentare della concentrazione dell'agente antimicrobico introdotto. Comunque, anche per lo stiro, le variazioni dovute all'incorporazione dell'agente antimicrobico possono considerarsi trascurabili.

Infine, al fine di verificare se l'incorporazione della CHX abbia modificato le proprietà meccaniche dei materiali prodotti, inficiandone così la possibilità di utilizzo nonostante l'acquisita proprietà antibatterica, le fibre sono state sottoposte a prove di trazione.

L'aggiunta della CHX (**figura 8**) non influenza in maniera rilevante le proprietà a trazione delle fibre, nemmeno alla concentrazione più elevata di CHX. Il modulo elastico cresce leggermente all'aumentare della concentrazione di CHX, invece entrambe le proprietà a rottura diminuiscono solo molto lievemente e comunque in modo non significativo rispetto alla fibra pura. Questo risultato è dovuto molto probabilmente alla presenza della carica solida incorporata, che irrigidisce lievemente il materiale aumentandone di conseguenza il modulo e riducendo la deformabilità, seppur in modo trascurabile.

Conclusioni

Attraverso l'incorporazione da fuso, è stato possibile preparare fibre di PCL contenenti CHX che mostrano un'evidente attività antibatterica. Tale attività cresce all'aumentare della concentrazione di agente antimicrobico incorporato. Lo studio del rilascio di CHX dalle fibre ha mostrato che all'aumentare della quantità di agente antibatterico incorporato aumenta la quantità rilasciata. Le proprietà meccaniche e la filabilità delle fibre contenenti CHX sono rimaste praticamente invariate rispetto a quelle della fibre tal quali.

*Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale, Aerospaziale, dei Materiali, Università di Palermo

Riferimenti bibliografici

- [1] R. Scaffaro, L. Botta, M. Sanfilippo, G. Gallo, G. Palazzolo, A. M. Puglia. *Biotechnol.* (2012). DOI 10.1007/s00253-012-4283-x. In Press.
- [2] E. Y. Teo, S.-Y. Ong, M. S. K. Chong, Z. Zhang, J. Lu, S. Mochhala, B. Ho, S.-H. Teoh. *Biomaterials* 32 (2011) 279.
- [3] R. R. Arnold, Hong Hong Wei, E. Simmons, P. Tallury, D. A. Barrow, S. Kalachandra. *Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 86B (2008) 506.

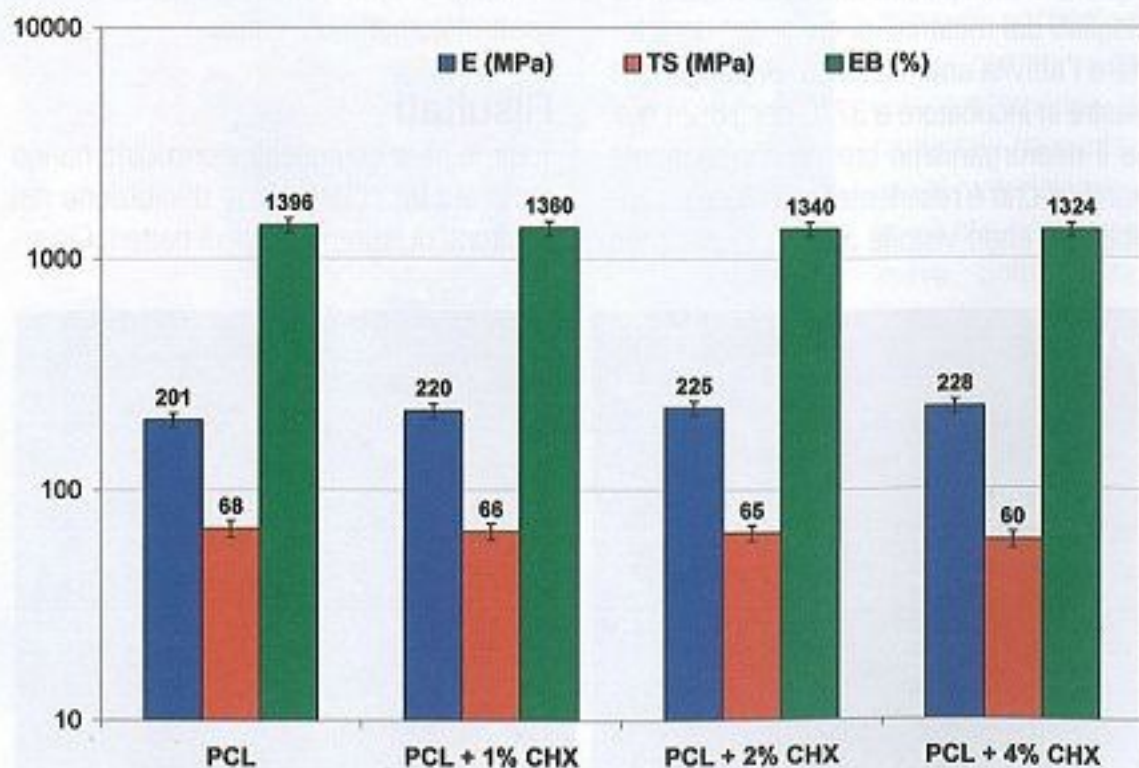


Fig. 8 - Modulo elastico (E), tensione a rottura (TS) e allungamento a rottura (EB) delle fibre di PCL e PCL con CHX