

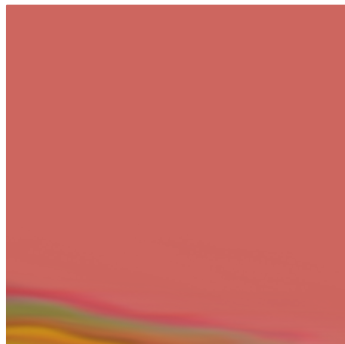
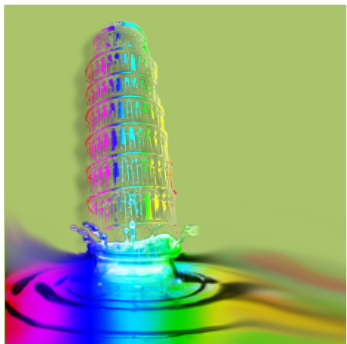
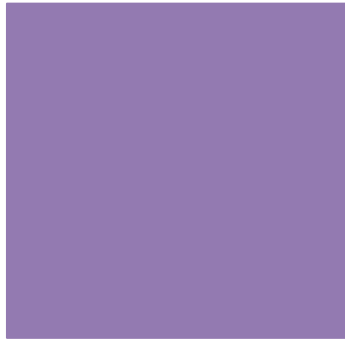


CENTRO E. PIAGGIO

Bioengineering and Robotics Research Center

Electrospinning

G. Vozzi

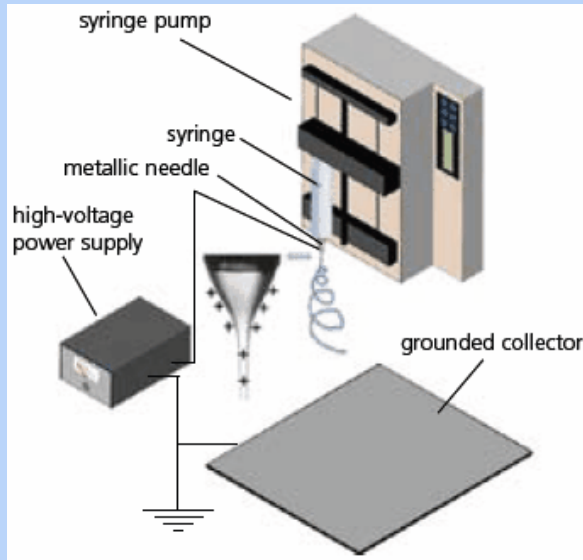


+ Electrospinning

... brevi cenni sulla storia della tecnica

- **16° secolo** : Sir William Gilbert osserva per la prima volta la formazione di una cresta d'acqua sulla punta di un ago a cui si avvicina un frammento d'ambra opportunamente elettrizzato: osserva la formazione di piccole gocce e la loro successiva emissione. Si considera il primo esperimento di electrospraying
- **1902** : J.F. Cooley e W.J. Morton brevettano i primi sistemi per electrospinning (U.S. Patent 692,631; U.S. Patent 705,691)
- **1914** : John Zeleny pubblica un lavoro circa il comportamento delle gocce di fluido in punta a capillari metallici e inizia la modellazione matematica del comportamento dei fluidi sottoposti a forze elettrostatiche
- **Dal 1934 al 1944** : Anton Formhals registra una serie di brevetti relativi alla produzione di filati polimerici attraverso l'uso di forze elettrostatiche. Il primo brevetto depositato consiste nella produzione di un filato attraverso l'applicazione di una tensione di 57 kV ad una soluzione di acetato di cellulosa in una miscela di acetone ed etilene glicol
- **1936** : C.L. Norton brevetta il primo sistema per electrospinning da fuso invece che da soluzione
- **1938** : N.D Rozenblum and I.V Petryanov-Sokolov, ricercatori presso il gruppo del Prof. N.A. Fuks agli Aerosol Laboratory del L.Ya Karpov Institute (USSR) creano fibre elettrospinnate a partire da acetato di cellulosa in soluzione in una miscela di dicloroetano ed etanolo, con cui sviluppano materiali filtranti noti come filtri di Petryanov
- **1952** : Vonnegut e Newbauer sviluppano un sistema per l'atomizzazione elettrica e la produzione di flussi uniformi di gocce elettrificate
- **1955** : Drozin studia la dispersione di una serie di liquidi sottoforma di aerosoli attraverso l'uso di potenziali elettrici elevati
- **Tra il 1964 e il 1969** : Sir G.I. Taylor pone le basi teoriche dell'electrospinning sviluppando il modello matematico che descrive la forma delle creste che si staccano dal fluido sottoposto ad un campo elettrico (note come coni di Taylor) successivamente affiancato dal leaky dielectric model per liquidi conduttivi al quale lavora con Melcher
- **Dagli anni '80** : veloce sviluppo della tecnica grazie all'interesse di numerosissimi gruppi di ricerca e delineamento dei nuovi orizzonti applicativi

Set up standard per electrospinning di laboratorio



- Spinneret
- Generatore di corrente DC ad alta tensione (5 a 50 kV) da connettere allo spinneret
- Syringe pump
- Grounded collector

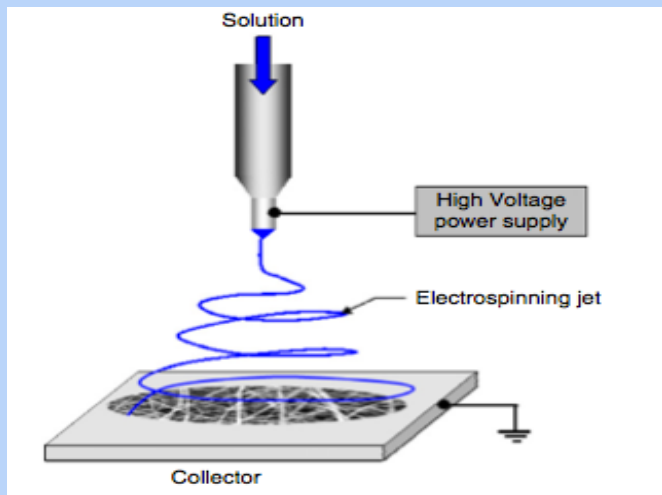
Alcuni produttori:

<http://www.inovenso.com/products/laboratory-electrospinning-equipments/>

<http://www.mpstrumenti.eu/site/strumenti.php?con=113>

<http://www.linaribiomedical.com/index.php/it/gamma-prodotti.html>

<http://espinnanotech.com>

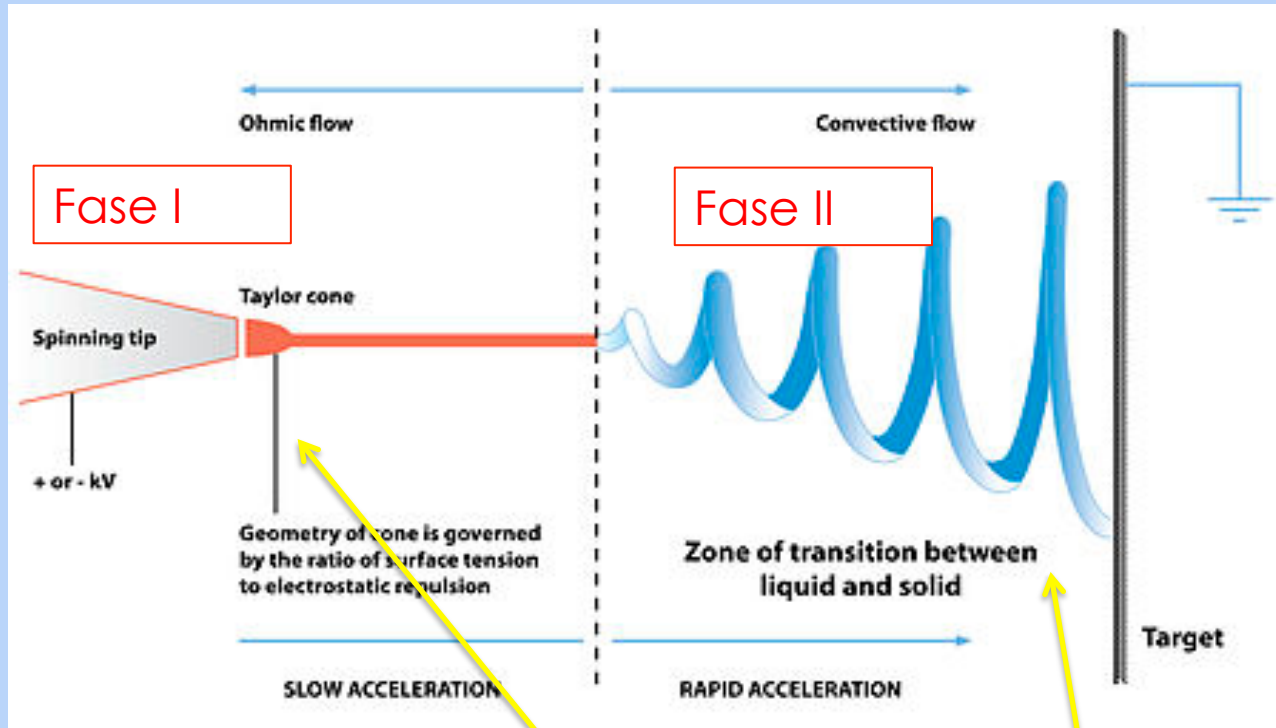


Questo sistema consente di estrarre dalla punta dell'ago polimeri in fase sol-gel, sospensioni particolati o fusi polimerici caricati nella camera della siringa ad una velocità costante attraverso una syringe pump. Alternativamente la goccia sulla punta dello spinneret può essere fornita da un leader tank a pressione costante, questo tipo di alimentazione lavora però solo con soluzioni bassa viscosità.

I processi più comuni sono:

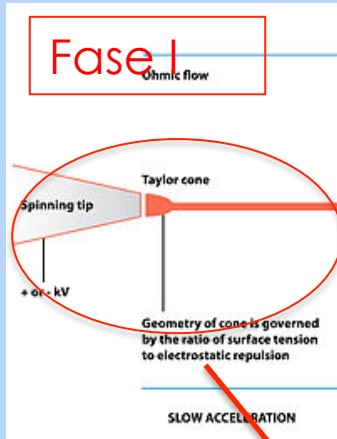
- **Solution electrospinning** (impiega un sistema binario polimero-solvente)
- **Melt electrospinning** (impiega polimero fuso)

Principio di funzionamento (1)



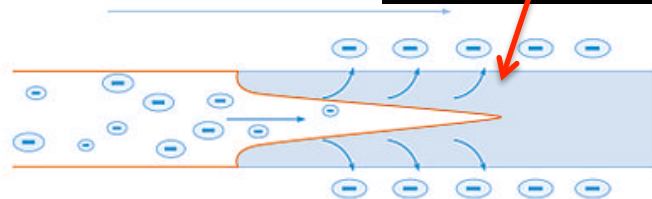
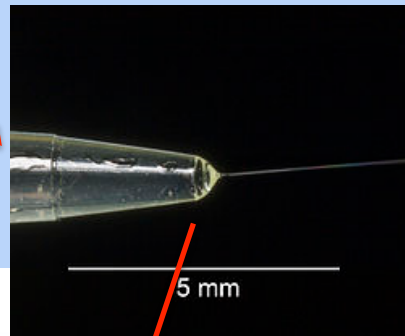
L'electrospinning è una tecnica di filatura che impiega forze elettrostatiche per produrre fibre di dimensioni sub-millimetriche (dai 2nm a qualche micrometro) per stretching uniaassiale di una soluzione o un fuso viscoelastico.

Si può pensare come una sorta di **merging tra ELECTROSPRAYING e SOLUTION DRY SPINNING** con l'obiettivo di **produrre un getto continuo immobilizzando cariche sulla superficie di una goccia liquida**. A differenza della altre tecniche in electrospinning il campo elettrico è impiegato per stretchare le fibre durante la loro solidificazione.



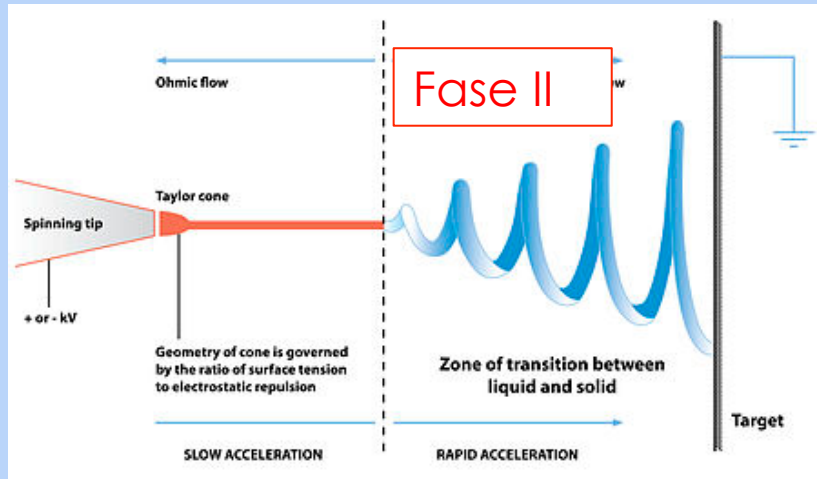
Fase I

Una riserva di materiale precursore ad alta coesione molecolare, fuso o in soluzione, è immerso in un campo elettrico per aumentarne il potenziale elettrostatico. Innalzando il potenziale elettrostatico aumenta la carica superficiale del fluido. Il volume di fluido contenuto nella punta dell'ago, grazie alla carica superficiale acquisita riesce a vincere la tensione superficiale che ne influenza la forma e ad assumere la conformazione nota come **CONO DI TAYLOR**.



Come in ogni struttura appuntita di un conduttore, lo stress elettrico si concentra sulla punta del cono di Taylor e il fluido tende ad essere eiettato per l'attrazione esercitata dal campo esterno che risulta maggiore sulla punta rispetto al bulk. A differenza dell'electrospraying in cui il fluido viene atomizzato, in un processo di electrospinning si desidera un getto continuo. Per questo è necessario evitare il fattore di instabilità asimmetrico Plateau-Rayleigh che determina appunto l'atomizzazione.

Principio di funzionamento (3)



Fase II:

Il getto creato nella fase I è portatore di carica ed è quindi indirizzato nel senso del campo elettrico esterno. Dopo un certo percorso il getto sarà vulnerabile a fattori di instabilità. In particolare l'instabilità per bending è dovuta alle perturbazioni che intercorrono nella traiettoria lineare della fibra agenti sull'asse della fibra stessa tramite una forza perpendicolare generata dalla repulsione tra le cariche che nasce quando viene persa la perfetta simmetria della struttura, cioè quando la fibra si allunga e quindi assottiglia

Mentre nelle prime fasi di volo questa forza è trascurabile perché bilanciata dalla natura viscoelastica della soluzione che oppone resistenza al riassetamento della forma e ne mantiene la forma originale, in posizioni più avanzate questo bilancio diventa negativo e determina la distorsione del getto.

Contemporaneamente l'ampia area superficiale permette una veloce evaporazione del solvente e quindi la solidificazione della fibra nonostante il breve tempo di volo.

Si osserva una notevole cristallinità delle fibre polimeriche ottenute per e.s. sia per l'allineamento delle fibre polimeriche operato dal campo elettrico sia per l'elevata draw ratio delle fibre in fase di volo.

Principio di funzionamento (4)

Fasi del processo

<http://www.jove.com/video/2494/electrospinning-fundamentals-optimizing-solution-apparatus>

- **Applicazione di un voltaggio** ad una goccia di liquido per renderla polare: la repulsione elettrostatica controbilancia la tensione superficiale e la goccia è tesa fino al punto critico di espulsione dalla superficie del liquido (TAYLOR CONE)
- **Nascita del getto:** grazie ad una coesione molecolare elevata non si verifica il distacco della cresta (come si desidera per l'electrospraying) e si determina un getto **continuo** di liquido carico
- **Raccolta:** quando il getto si asciuga durante la fase di volo il flusso di corrente passa da ohmico a convettivo poichè la carica migra verso la superficie della fibra. Il getto quindi si allunga per effetto di un processo di whipping determinato dalla repulsione elettrostatica iniziata da una piccola flessione iniziale e tale processo continua durante tutta la fase di volo per terminare sul ground collector. Questo allungamento e quindi assottigliamento della fibra indotto dall'instabilità della tensione porta alla formazione di fibre uniformi di diametro nanometrico.

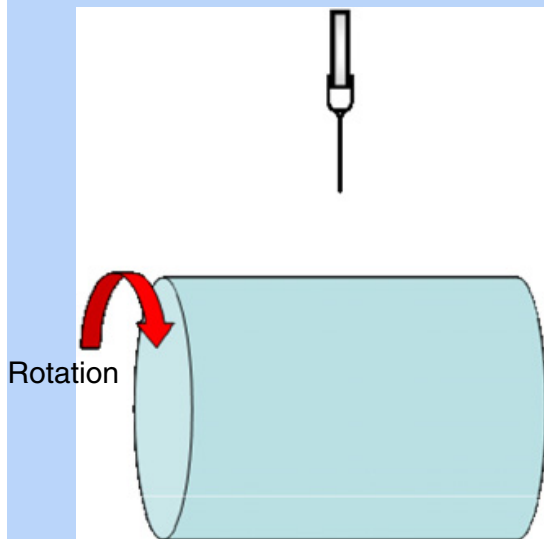
Senza uno specifico controllo le fibre elettrofilate sono deposte sul collettore sotto forma di fogli di fibre non intrecciate disposte casualmente. Sono state sviluppate diverse tecniche per disporre ordinatamente le fibre, sia come fibre allineate sia sotto forma di array 2D o 3D. Nel primo caso ad esempio la soluzione più semplice è la sostituzione del singolo collettore con una coppia separata da uno spazio vuoto. Dall'altro lato si possono generare architetture molto complicate applicando in sequenza alti voltaggi a pattern di elettrodi disposti in maniera da ottenere una particolare geometria.

Ciò consente di soddisfare le singole necessità realizzative con soluzioni custom made scegliendo opportuni elettrodi collettori e/o guida e il sistema di alimentazione del materiale (solution delivery system).

Electrospinning set-ups per ottenere assemblaggi di fibre ordinate

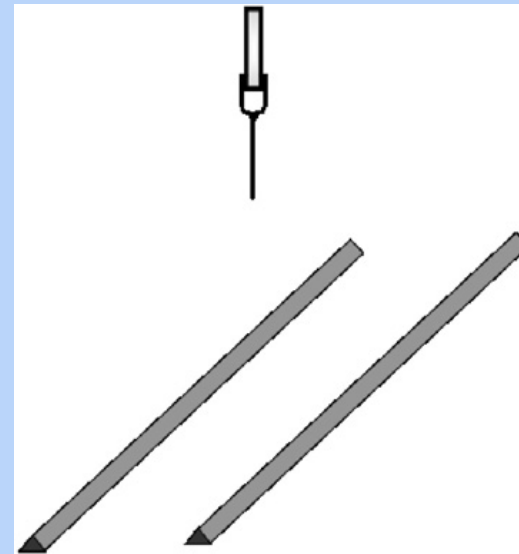
- Assembly aligned fibrous mesh (1)

A. Rotating drum



- Set-up semplice
- Possibilità di copertura di vaste aree
- Difficoltà nella fabbricazione di fibre altamente allineate
- Possibilità di rottura delle fibre a velocità di rotazione del collettore troppo elevate

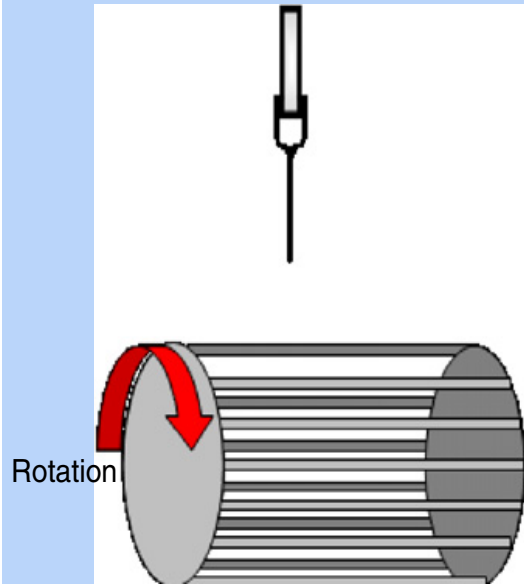
B. Parallel electrodes



- Set-up di semplice realizzazione
- Semplicità nella realizzazione di fibre altamente allineate
- Facilità di trasferimento delle fibre su di un altro substrato
- Impossibilità di ottenere strati spessi di fibre
- Limitazione nella lunghezza delle fibre allineate

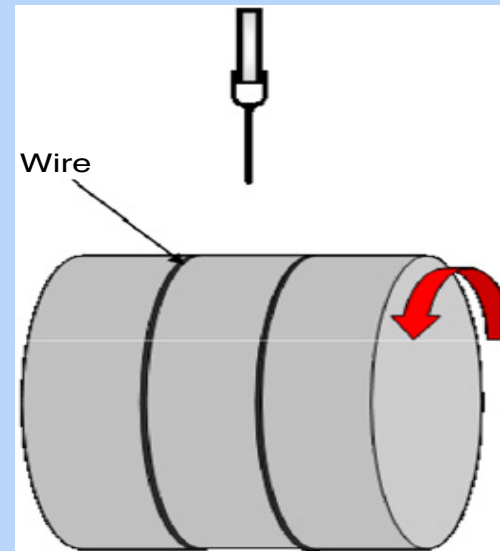
- Assembly aligned fibrous mesh (2)

C. Rotating wire drum collector



- Set-up di semplice realizzazione
- Semplicità nella realizzazione di fibre altamente allineate
- Impossibilità di ottenere strati spessi di fibre
- Fibre potenzialmente non allineate sull'intera struttura

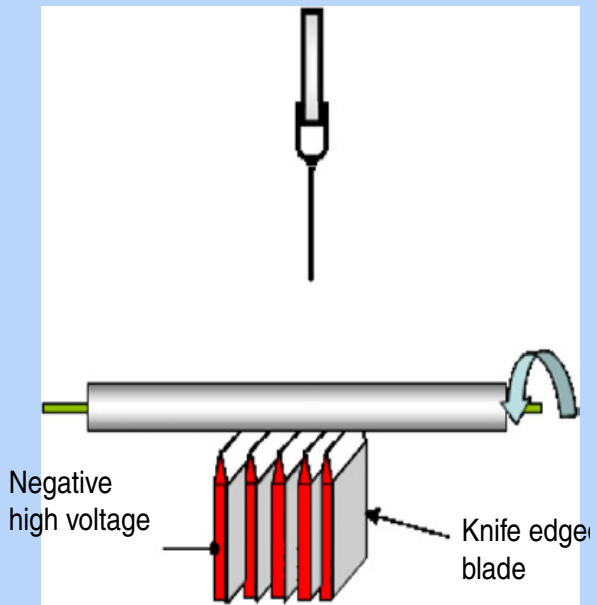
D. Drum collector with wire around it



- Set-up di semplice realizzazione
- Semplicità nella realizzazione di fibre altamente allineate
- Le fibre allineate sono concentrate sul cavo del collettore invece che sul tamburo

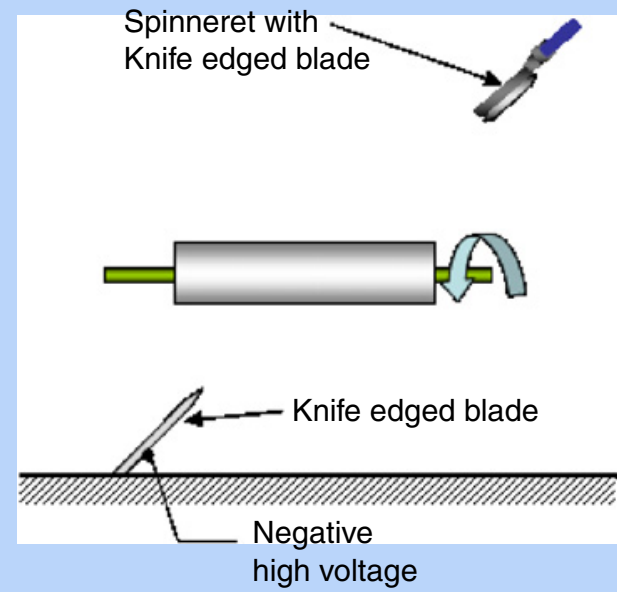
• Assembly aligned fibrous mesh (3)

E. Rotating tube collector with knife-edge electrodes below



- Possibilità di copertura dell'intero tubo con fibre altamente allineate
- Possibilità strati spessi di fibre allineate
- Necessità di un elettrodo negativo
- Il processo è possibile con tubi di piccolo calibro

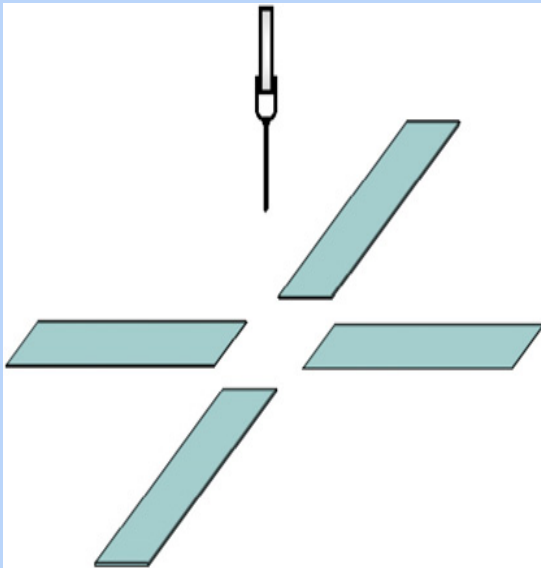
F. Controlling electrospinning jet using knife-edge electrodes



- Possibilità di controllare la direzione dell'allineamento delle fibre sul tubo
- Possibilità strati spessi di fibre altamente allineate
- Necessità di un elettrodo negativo
- Il processo è possibile con tubi di piccolo calibro

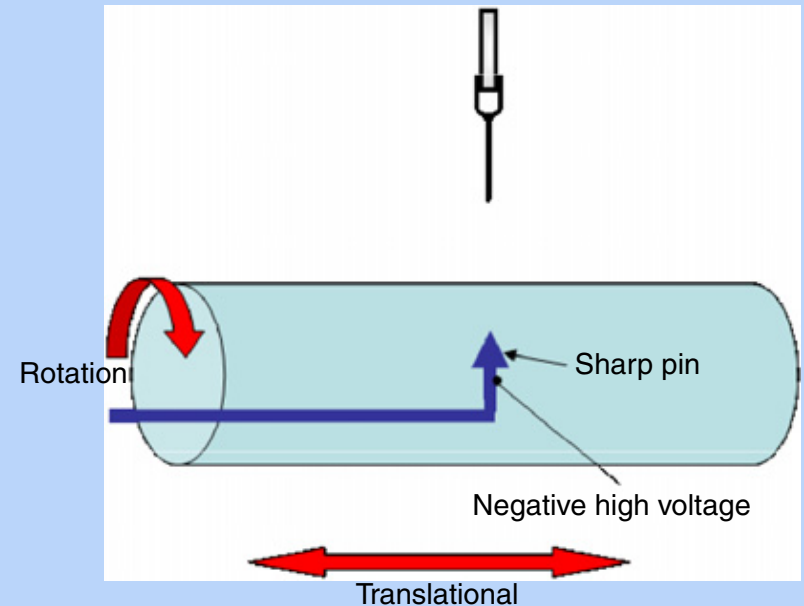
• Assembly fiber array (1)

A. Array of counter electrodes



- Set up semplice
- Il pattern delle fibre non è coerente su tutta la struttura
- L'area coperta dal costrutto è limitata
- Non è possibile raggiungere spessori rilevanti

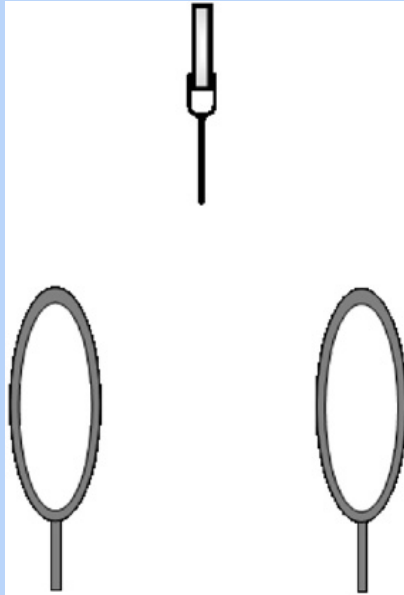
B. Rotating drum with sharp pin inside



- Possibilità di fabbricare array di fibre su vaste aree
- Set-up complesso
- Non è possibile ottenere spessori elevati di array di fibre sovrapposti

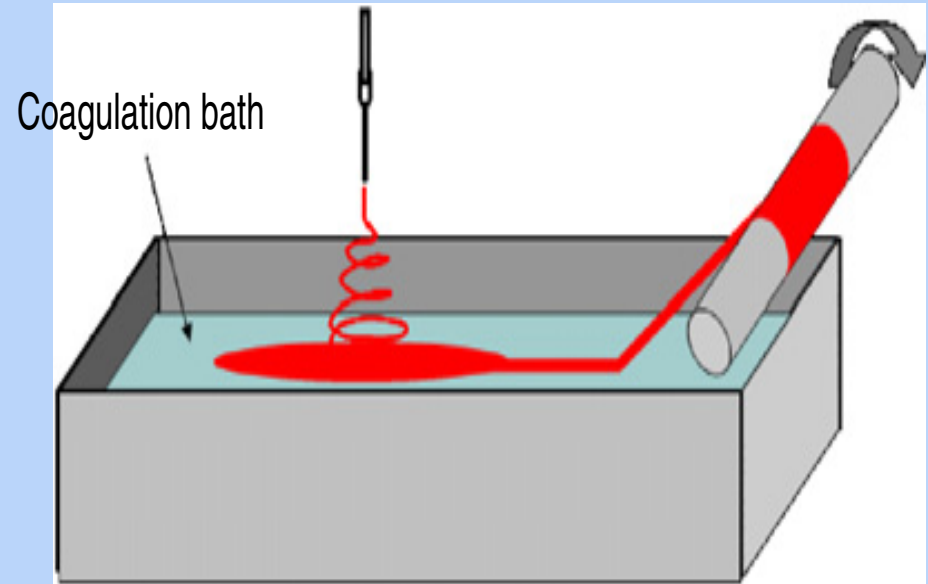
• Assembly yarn (1)

A. Ring collector placed in parallel



- Set up semplice
- Produzione di filati attorcigliati
- La lunghezza del filato prodotto è limitata
- Uno degli anelli deve essere posto in rotazione per consentire l'avvolgimento del filato

B. Yarn collection using water bath(*)

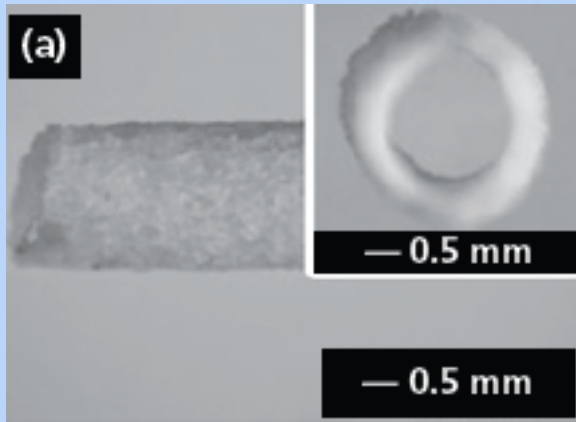


- Set-up semplice
- Possibilità di fabbricare filati continui molto lunghi con buon allineamento delle fibre
- La velocità di raccolta delle fibre è relativamente lenta

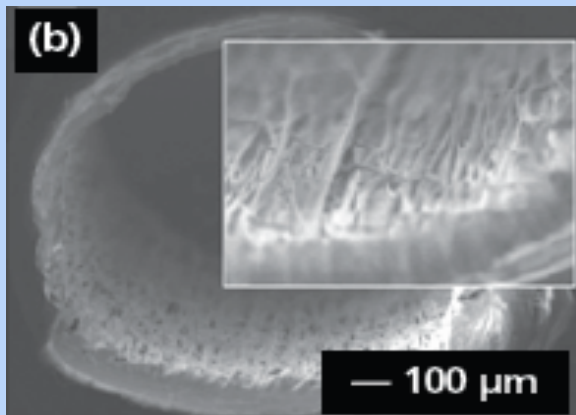
(*) Questo set-up non prevede un collettore solido bensì liquido. Sebbene le fibre elettrofilate risultano disposte disordinatamente sulla superficie del liquido di coagulo, la maglia di fibre tende ad allungarsi quando è stirata sulla superficie del liquido. La tensione superficiale causa il collasso della maglia di fibre in un filato quando questa è sollevata dal pelo del liquido verso il collettore esterno

Altri tipi di assemblaggio di fibre elettrofilate in strutture ordinate

È possibile depositare direttamente le nanofibre elettrofilate su oggetti di forma diversa per ottenere costrutti nanofibrosi tridimensionali di forma e dimensioni controllate o processare manualmente in vari tipi di costrutti membrane di fibre elettrofilate allineate o orientate casualmente.



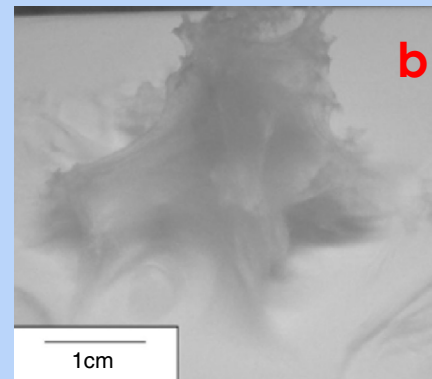
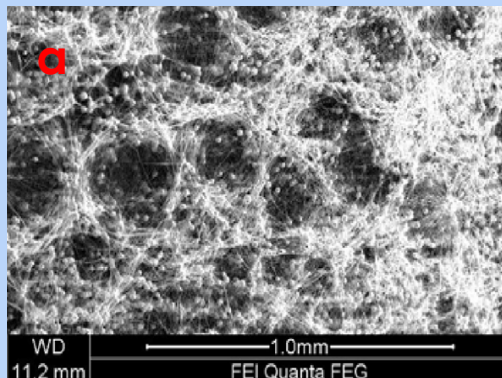
La fig.(a) mostra un vaso di PPC-poly(propilene carbonato) di 2mm di diametro ottenuto per deposizione di fibre elettrofilate su di una bacchetta cilindrica rimossa successivamente alla solidificazione



La fig.(b) mostra la sezione di un vaso composto da fibre allineate contenenti fattori neurotrofici derivanti da cellule gliali GDNF, G1410 ottenuto arrotolando una membrana nanofibrosa elettrofilata e saldandone le estremità con diclorometano

Altri tipi di assemblaggio di fibre elettrofilate

È possibile ottenere costrutti nanofibrosi tridimensionali usando un collettore statico senza l'uso di elettrodi ausiliari. Sono stati ottenuti costrutti **tridimensionali a nido d'ape (a)** o **di forme casuali (b)**. Ciò è attribuito all'insorgenza di cariche elettrostatiche sul collettore che prevengono la deposizione diretta delle fibre sul collettore stesso. Inoltre sebbene le condizioni precise per cui ciò avviene siano ancora ignote si pensa che l'assenza di forze che legano tra loro le fibre mentre sono depositate consenta loro di avvolgersi mentre subiscono perdite di carica o mentre decelerano a causa delle forze repulsive esercitate dalle cariche residue presenti nelle fibre già depositate.



Parametri del processo

I parametri che governano il processo di electrospinning possono essere classificati in 3 gruppi:

1. Solution/Melt parameters (*)

- Concentrazione
- Peso molecolare
- Viscosità
- Tensione superficiale
- Conduttività/densità superficiale di carica

2. Processing parameters

2. Voltaggio applicato e forma del campo
3. Feed/flow rate
4. Tipo di collettore
5. Distanza tra punta dell'ago e collettore e calibro dell'ago

3. Ambient parameters

3. Temperatura
4. Umidità

(*)Questo gruppo di parametri, a parte il parametro concentrazione, ha senso, sia in processi di electrospinning che impiegano **soluzioni polimeriche (solution electrospinning)** sia in quelli che impiegano **fusi polimerici (melt electrospinning)** ma devono essere valutati in maniera diversa

Solution parameters (1)

Concentrazione

Per ottenere un risultato è necessario che la concentrazione della soluzione di partenza vari entro un range utile. Si ha infatti che per concentrazioni inferiori ad un minimo si ottiene un insieme di fibre e granelli (beads) mentre oltre una concentrazione massima diventa impossibile mantenere un flusso costante a livello della punta dell'ago. All'interno del range esiste una concentrazione ottimale che consente di ottenere fibre in quantità e dimensioni desiderate. I tentativi di trovare una relazione tra concentrazione e diametro delle fibre hanno portato alla formulazione di una legge di potenza: all'interno del range utile al crescere della concentrazione cresce il diametro della fibra.

Peso molecolare

Influisce sulle proprietà elettriche e reologiche e quindi sulle caratteristiche morfologiche della fibra. Il p.m. infatti riflette il numero di legami tra le catene polimeriche in soluzione. Si osserva generalmente che al crescere del peso molecolare delle catene si riduce la formazione di granelli e aumenta il diametro finale della fibra.

Tuttavia si è osservato che non sempre un alto peso molecolare è essenziale per il processo di electrospinning se sono presenti un numero sufficiente di interazioni intermolecolari in grado di sopperire alla connettività intercatena caratteristica delle soluzioni ad alto peso molecolare (McKee et al. "Oligomer-sized phospholipids from lecithin solution into non-woven membranes through electrospinning")

Viscosità

Anche la viscosità della soluzione o del fuso deve variare in un range: il minimo indica la viscosità sotto la quale non si ottengono più fibre continue mentre il massimo il valore oltre il quale non è più possibile estrarre agevolmente il materiale. Il range dipende fortemente dal tipo di materiale impiegato, ad esempio studi sul PEO hanno riportato range tra 1 e 20 poise come utili per la formazione di nanofibre. Bisogna cmq tenere presente che la viscosità è fortemente dipendente dal peso molecolare e dalla concentrazione e viceversa da cui la possibilità di ottenere fibre continue.

Solution parameters (2)

Tensione superficiale

Dipende sostanzialmente dal tipo di solvente; riducendo la tensione superficiale è possibile ottenere fibre prive di granuli ed operare con campi elettrici inferiori.

Conducibilità/densità superficiale di carica

Ad eccezione di alcuni dielettrici la maggior parte dei polimeri impiegati sono conduttori e gli ioni presenti nella soluzione polimerica sono altamente determinanti nelle dinamiche di formazione delle fibre e nella determinazione delle dimensioni della stessa, infatti all'aumentare della conducibilità elettrica della soluzione si verifica un significativo aumento del diametro della nanofibra elettrospinnata. Al contrario una conducibilità insufficiente comporta una altrettanto insufficiente forza elettrica che non consente l'elongazione del getto e la formazione di una fibra uniforme, per questo si possono osservare granuli. Anche soluzioni altamente conduttive risultano instabili in presenza di campi elettrici elevati per l'insorgenza di elevati sforzi di bending e distribuzioni di diametri molto più ampie. È stato osservato che il raggio del getto varia inversamente con la radice cubica della conducibilità elettrica della soluzione.

Per variare la conducibilità della soluzione vengono talvolta impiegati ioni di sali; in questo modo si tenta di raggiungere in maniera controllata il target dimensionale fissato ed aumentare l'uniformità della fibra prodotta (es. sali di KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 o NaCl in soluzione per aumentare la conducibilità di soluzioni di PEO o PVP o PAA etc...)

Processing parameters (1)

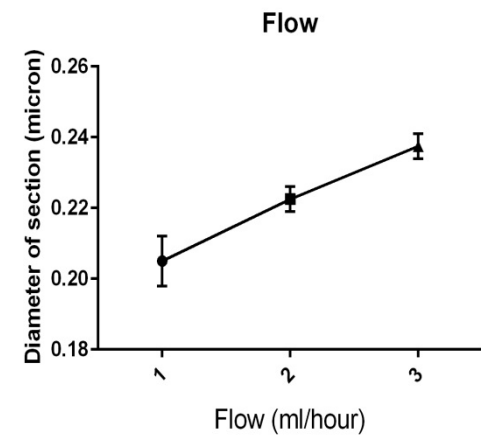
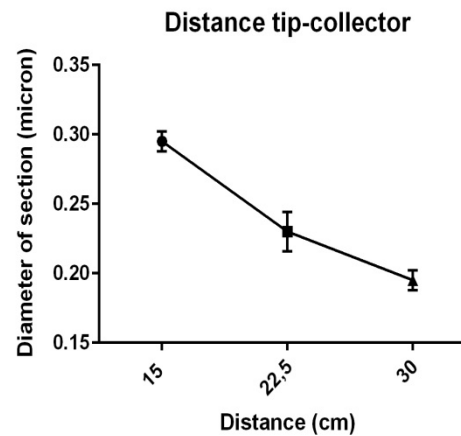
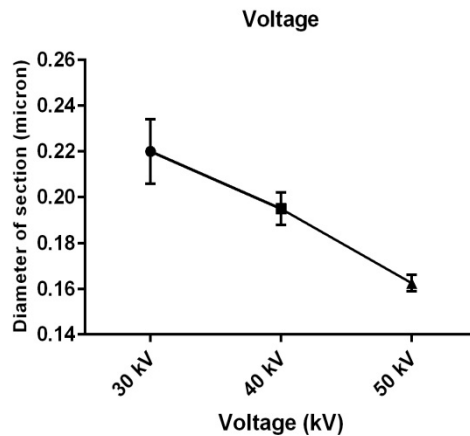
Applied voltage:

Il processo di electrospinning inizia ad una tensione soglia in grado di indurre la polarizzazione del pelo del fluido o della soluzione. Per quanto riguarda gli effetti della variazione della tensione applicata oltre il valore soglia è in corso un dibattito tra chi sostiene che non c'è un effetto sostanziale sul diametro della fibra, chi invece sostiene che ad un incremento della tensione applicata segue un incremento nella quantità di materiale eiettato e ciò porta alla formazione di fibre di diametro maggiore e chi, infine, sostiene che un aumento della tensione applicata determina l'aumento delle forze repulsive nel fluido e quindi in ultima istanza favorisce l'assottigliamento della fibra ed un'accelerazione dell'evaporazione del solvente. La significatività con cui si verifica quest'effetto risulta sempre dipendere dalla distanza tra ago e collettore.

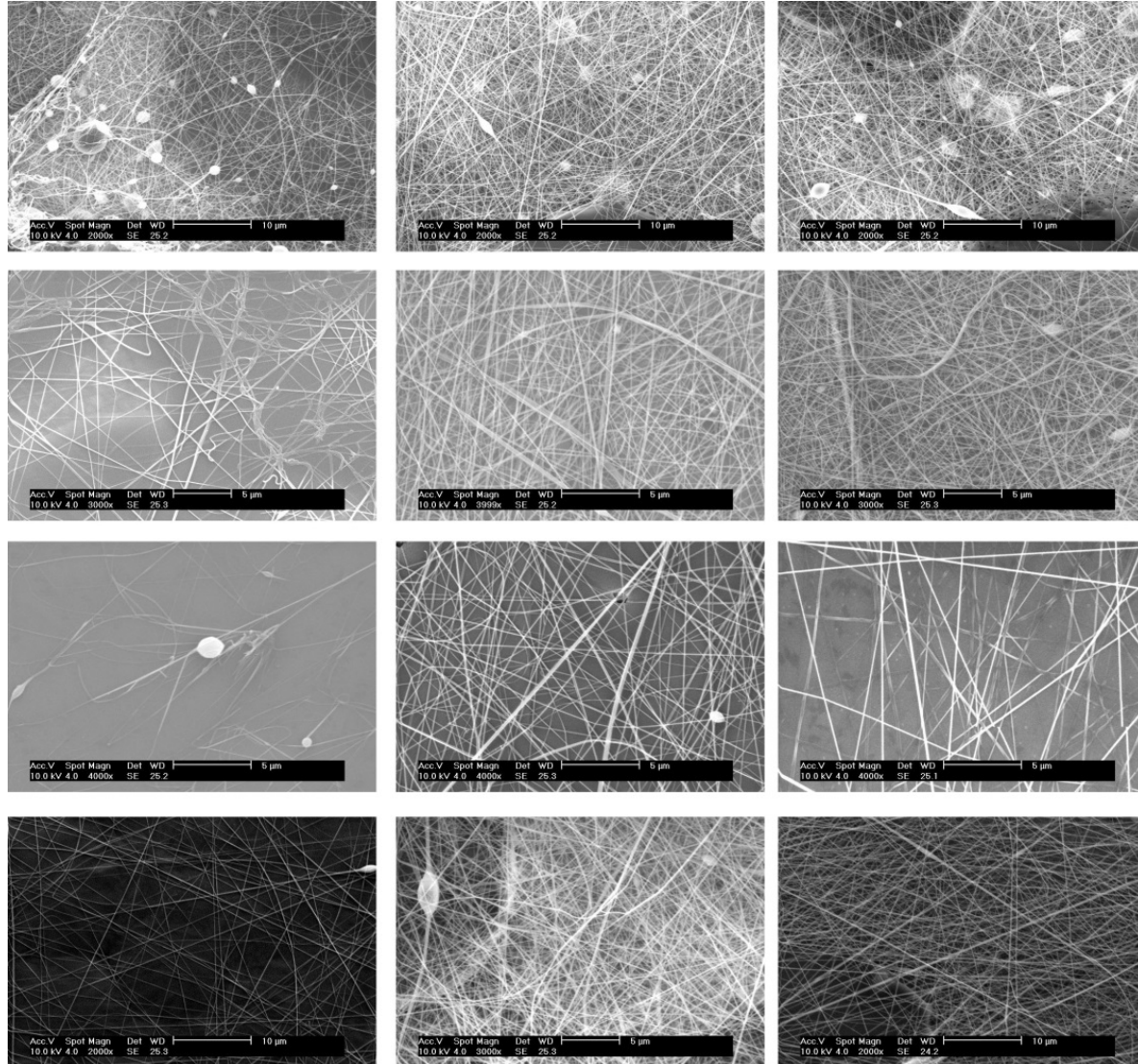
Infine sebbene un collettore collegato a massa sia in grado di esercitare un controllo sulla deposizione delle fibre elettrofilate, è più comune usare uno o più elettrodi ausiliari con cariche della stessa polarità del getto o con polarità opposta per avere effetto diretto sul getto stesso. È necessario controllare la forma, posizione e la polarità delle cariche applicate agli elettrodi di controllo in modo da **manipolare il campo elettrico esterno** e controllare attraverso di esso la posizione del getto. Si parla in questo caso di **controlled deposition**.

Electrospinning results

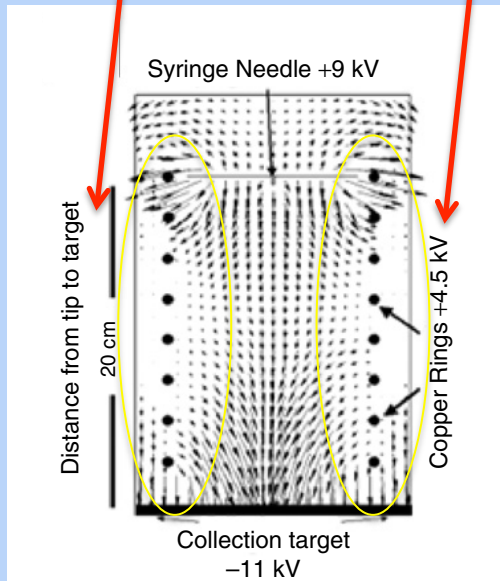
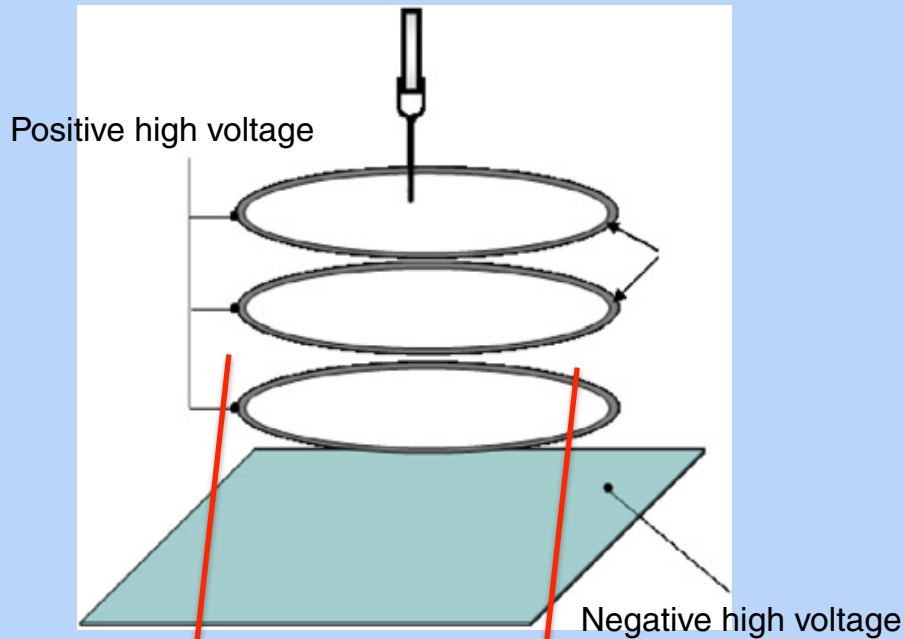
- Electrospinning parameters:
 - Voltage: 30- 40- 50 kV
 - Distance tip-collector: 15- 22,5- 30 cm
 - Flow: 1 - 2 - 3 ml/hour



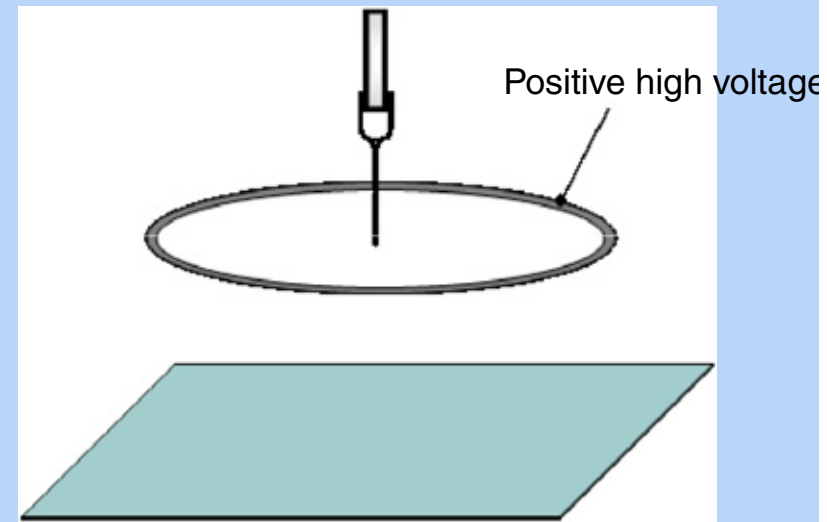
Electrospinning results



A. Controlled deposition using ring electrodes



B. Controlled deposition using single ring



È possibile ottenere la deposizione desiderata studiando il comportamento del getto all'interno del campo elettrico creato, come alternativa all'uso di un collettore dinamico. Negli esempi riportati sopra gli anelli producono una distorsione delle linee di campo generate tra punta dell'ago a 9kV e collettore target a -11kV come descritto dalla figura a lato.

Tuttavia poiché sia la manipolazione del campo elettrico sia l'uso di collettori dinamici si sono rivelati dei metodi validi per ottenere insiemi di fibre ordinate, sono stati fatti dei tentativi di combinare i due metodi per ottenere risultati ancora migliori

Processing parameters (2)

Feed/Flow rate:

La velocità con cui viene alimentata la siringa influenza la velocità del getto e il processo di evaporazione del solvente. Generalmente basse velocità di alimentazione sono maggiormente desiderabili poiché il solvente ha più tempo per evaporare, flussi troppo elevati si risolvono nella formazione di fibre granulose per l'inadeguatezza del livello di evaporazione raggiunto.

Tip to collector distance

È necessaria una distanza minima per consentire l'evaporazione del solvente dalla fibra prima che questa raggiunga il collettore, evitando in questo modo la formazione di granuli indesiderati nella struttura finale. Non influenza significativamente altri aspetti realizzativi.

Tipi di collettore:

Il collettore funge da substrato conduttivo per la raccolta delle fibre prodotte. I più comuni sono fogli di alluminio e relative declinazioni determinate dalle diverse necessità realizzative quali l'ottenimento di fibre parallele o granulari. Alternative sono fogli di carta o tessuti conduttivi, wire meshes, pins, parallel o grided bars, cilindri rotanti, torni, bagni liquidi di non solventi (ad esempio bagni di coagulazione di metanolo). **Fare riferimento ai set-up per ottenere strutture nanofibrose ordinate**

Ambient parameters

Umidità:

Influisce sulla volatilità e quindi sulla velocità di evaporazione del solvente. Quest'ultimo parametro influisce infine sulla porosità e sulla dimensione finale dei pori che si formano. È stato verificato che al diminuire dei tassi di umidità la velocità di evaporazione del solvente aumenta fino a superare la velocità di estrusione dalla punta dell'ago rendendo il processo di elettrofilatura impossibile per ostruzione dell'ago, mentre all'aumentare della stessa dapprima si formano piccoli pori circolari superficiali che poi coalescono.

L'umidità influisce infine sulla carica e sulla tensione superficiale promuovendo la scarica della fibra estrusa.

Temperatura:

La temperatura influenza il processo agendo sulla viscosità del soluto o del fuso. Ad un aumento della temperatura segue una diminuzione della viscosità e ciò comporta una diminuzione del diametro della fibra.

Parametri del processo e loro effetto sulla morfologia della fibra

Parameters	Effect on fiber morphology
<i>Solution parameters</i>	
Viscosity	Low-beads generation, high-increase in fiber diameter , disappearance of beads.
Polymer concentration	Increase in fiber diameter with increase of concentration.
Molecular weight of polymer	Reduction in the number of beads and droplets with increase of molecular weight.
Conductivity	Decrease in fiber diameter with increase in conductivity.
Surface tension	No conclusive link with fiber morphology, high surface tension results in instability of jets.
<i>Processing parameters</i>	
Applied voltage	Decrease in fiber diameter with increase in voltage.
Distance between tip and collector	Generation of beads with too small and too large distance, minimum distance required for uniform fibers.
Feed rate/Flow rate	Decrease in fiber diameter with decrease in flow rate, generation of beads with too high flow rate.
<i>Ambient parameters</i>	
Humidity	High humidity results in circular pores on the fibers.
Temperature	Increase in temperature results in decrease in fiber diameter.

Materiali sottoposti ad electrospinning

Le classi di materiali ad oggi sottoposti ad electrospinning sono:

- Polimeri naturali
- Polimeri sintetici (etenici e da condensazione)
- Compositi
- Ceramiche
- Semiconduttori

Di questi solo i polimeri, i compositi polimerici e loro soluzioni sono direttamente elettrofilabili mentre gli altri necessitano di post processing delle fibre, in particolare, dopo essere state elettrofilate le nanofibre di materiale ceramico vanno sottoposte a sinterizzazione.

Polimeri naturali

Questa classe di materiali è impiegata principalmente in ingegneria tissutale per la presenza di gruppi funzionali superficiali quali la sequenza RGD (arginina, glicina, acido aspartico) in grado di complessare le proteine di legame della membrana cellulare e quindi promuovere il processo di adesione cellulare (non a caso la maggior parte di questi materiali è un componente della ECM stessa). È stata talvolta notata una parziale denaturazione delle proteine superficiali come conseguenza sia del processo di electrospinning e/o all'uso di fluoroalcoli come solventi, in particolare nella lavorazione del collagene. Questa classe di polimeri è prevalentemente impiegata in solution electrospinning.

I polimeri naturali principalmente impiegati sono:

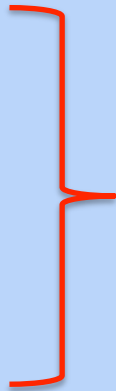
- Fibroina della seta
- Chitosano
- Collagene
- Acido ialuronico
- Gelatina
- Fibrinogeno

Polimeri sintetici

I polimeri sintetici vengono impiegati in sostituzione di quelli naturali perché possono essere sviluppati ad hoc in modo che presentino le caratteristiche desiderate per la particolare applicazione (caratteristiche meccaniche, velocità di degradazione, etc...)

Polimeri sintetici tipicamente impiegati in applicazioni biomediche sono:

- PGA
- PLA
- PCL
- PU
- PP
- PET
- PE
- PMMA
- PS
- Nylon



Questi polimeri sono stati soddisfacentemente impiegati anche in melt electrospinning

Solventi usati in solution electrospinning

Sostanzialmente un solvente svolge due funzioni nel processo di electrospinning:

- La prima è dissolvere le molecole polimeriche per formare il getto elettrificato, a questo scopo in primo luogo il solvente deve essere adatto al tipo di polimero che si vuole dissolvere e si devono valutare le interazioni intermolecolari tra i due componenti del sistema binario polimero-soluzione che possono essere attrattive o repulsive a seconda del solvente scelto
- La seconda è condurre le molecole dissolte verso il collettore. In questa fase intervengono le caratteristiche di volatilità, tensione di vapore, tensione superficiale e punto di evaporazione a determinare in ultima analisi la morfologia della fibra ottenuta, infatti:
 - la **tensione di vapore** influenza la velocità e quindi il tempo di evaporazione
 - La **volatilità** del solvente determina la formazione di nanostrutture poiché influenza il processo di separazione di fase e la sua velocità
 - La **tensione superficiale** influenza la dimensione del diametro della fibra, minore è la tensione superficiale minore risulta il diametro della fibra prodotta. Questa caratteristica dipende però sia dal tipo di solvente che dalla concentrazione di polimero

Proprietà di alcuni solventi impiegati in electrospinning

Solvents	Surface tension (mN/m)	Dielectric constant	Boiling point (°C)	Density (g/ml)
Chloroform	26.5	4.8	61.6	1.498
Dimethyl formamide	37.1	38.3	153	0.994
Hexafluoro isopropanol	16.1	16.70	58.2	1.596
Tetrahydrofuran				
Trifluoro ethanol	26.4	7.5	66	0.886
Acetone	21.1	27	78	1.393
Water	25.20	21	56.1	0.786
Methanol	72.8	80	100	1.000
Acetic acid	22.3	33	64.5	0.791
Formic acid	26.9	6.2	118.1	1.049
Dichloro methane	37	58	100	1.21
Ethanol	27.2	9.1	40	1.326
Tri fluoro acetic acid	21.9	24	78.3	0.789
	13.5	8.4	72.4	1.525

Solventi comunemente impiegati in electrospinning

Polymers	Solvents	Fiber diameter (nm)	Applications
Silk fibroin/PEO	Water	590 ± 60	Bone tissue engineering
Gelatin	Acetic/Formic acid	109–761	Biomaterial scaffold
Collagen type I	HFP ^a	100–600	Materials science and engineering
Collagen type II	HFP	496	Cartilage engineering
Gelatin/PVA	Formic acid	133–447	Controlled release of drugs
Chitosan	Acetic acid	130	Biomedical applications
PVA	Water	250–300	Drug delivery
Chitosan/PVA	Formic acid , TFA ^b , HCl	330	Tissue engineering
Cellulose acetate	Acetone, DMF ^c , Trifluoroethylene (3:1:1)	200–1000	Filtration
HA/Gelatin	DMF/Water	190–500	Tissue engineering
Fibrinogen	HFP	80 ± 30	Wound repair
Polyamide-6	m-Cresol + Formic acid	98.3 ± 8.2	Biomedical applications
Polyurathane	Water	100–500	Tissue engineering
Polycaprolactone	DMF + Methylene chloride	200	Wound healing
Collagen/chitosan	HFP/TFA	300–500	Biomaterial scaffolds
Chitin	HFP	163	Wound healing
PCL/Gelatin	TFE ^d	470 ± 120	Wound healing
Polyaniline/Gelatin	HFP	61 ± 13	Tissue engineering

^a Hexafluoro isopropanol.

^b Trifluoro acetic acid.

^c Dimethyl formamide.

^d Trifluoro ethylene.

Sistemi di solution delivery per solution electrospinning (1)

Oltre alla messa a punto di diversi set-up per ottenere fibre con particolari conformazioni, esistono studi finalizzati alla soluzione di altre limitazioni insite nel processo standard e alle caratteristiche delle fibre ottenute. Tra questi sono significativi in particolare:

- **Needleless electrospinning**

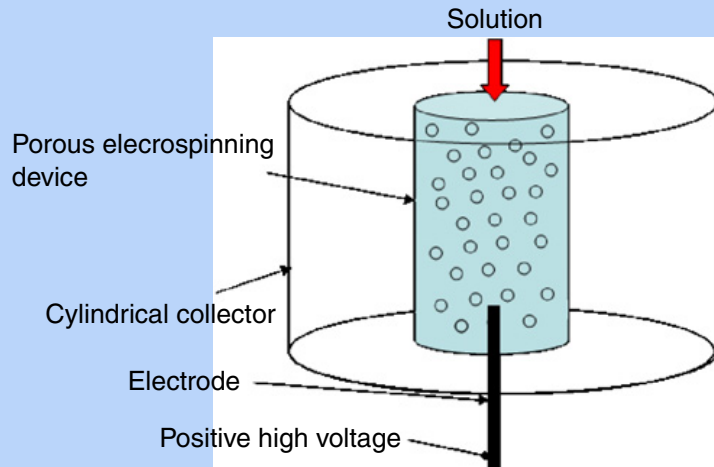
Costituisce una possibile soluzione al problema legato alla velocità di produzione delle fibre elettrofilate che è molto inferiore al rate medio delle altre tre tecniche di filatura. Un modo per velocizzare il processo è aumentare il numero di spinneret (porous electrospinning source: cilindro poroso concentrico ad un collettore cilindrico). Per evitare il problema legato all'ostruzione nei sistemi multiple jet si ricorre all'eliminazione fisica dello spinneret. A questo scopo si impiegano fluidi magnetizzati attraverso polvere di magnetite dispersa in olio di silicone e campi magnetici esterni che producono creste sul pelo del fluido magnetico. La soluzione polimerica da elettrofilare è quindi lentamente addizionata al fluido magnetico a formare una pellicola. Annegando un elettrodo nella soluzione polimerica ed applicando un alto voltaggio in combinazione con un controlettrodo a pettine, si ottengono migliaia di getti dalla superficie del fluido magnetico (multiple spikes electrospinning source)

- **Spinneret modificato**

Consente di introdurre ulteriori peculiarità alle nanofibre. Tra le altre soluzioni, l'uso di spinneret coassiali consente di elettrofilare anche soluzioni normalmente non processabili a causa della tensione superficiale troppo alta o della bassa conducibilità del solvente come costituente interno di un sistema coassiale in cui la soluzione esterna elettrofilabile trasporta quella interna semplicemente estrusa. Rimuovendo lo strato esterno si può ottenere una nanofibra di un materiale normalmente non elettrofilabile. Concetto simile si può applicare per ottenere fibre cave. Attraverso l'uso di un getto gassoso esterno è possibile ottenere fibre con superfici molto lisce senza la necessità di variare il voltaggio applicato. Variando la pressione del getto gassoso è inoltre possibile controllare il diametro delle fibre.

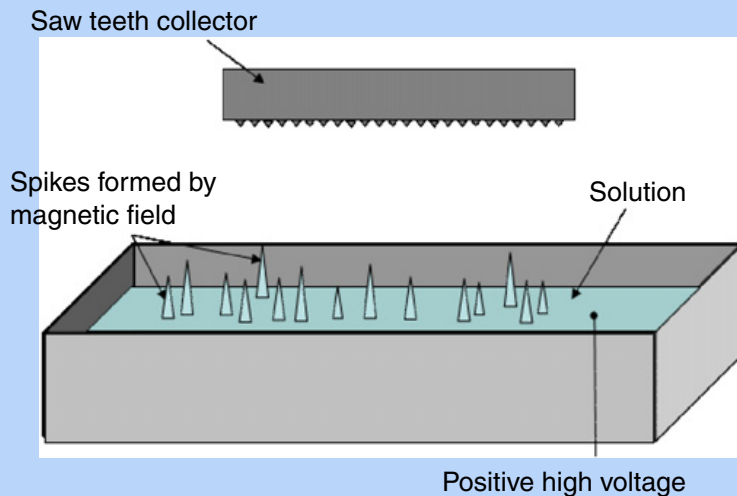
Sistemi di solution delivery per solution electrospinning (2)

- **Needleless electrospinning**



A. Porous electrospinning source:

- Elevato rate di produzione
- Elevata dispersione delle dimensioni del diametro

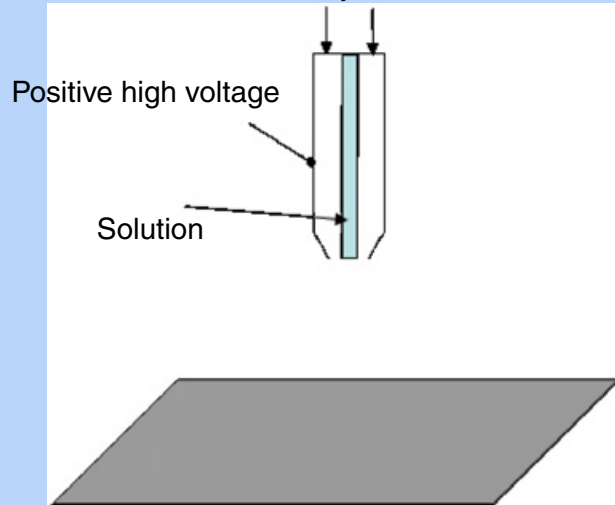
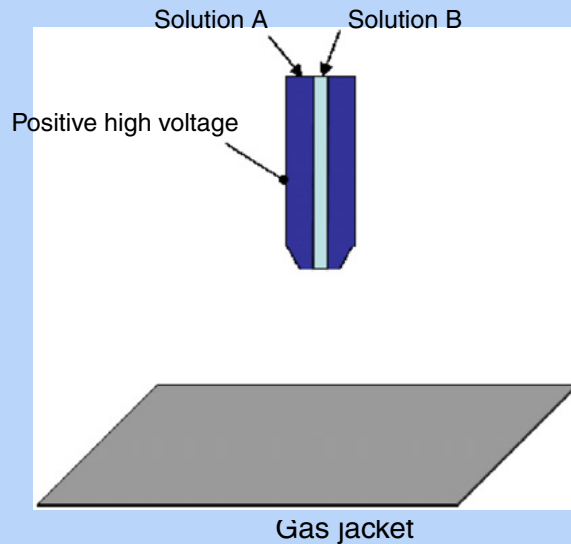


B. Multiple spikes electrospinning source

- Assenza di ostruzioni a livello della sorgente
- Elevato rate di produzione
- Set-up complesso
- Possibile consistente variazione della dimensione del diametro delle fibre

Sistemi di solution delivery per solution electrospinning (3)

• Modifiche delle spinneret convenzionale



A. Spinneret coassiale

- Possibilità di estrarre fibre composte da due materiali diversi
- Possibilità di ottenere fibre cave eliminando il materiale costituente il core
- Materiali normalmente non elettrofilabili possono essere conformati sotto forma di nanofibre usando un materiale esterno elettrofilabile
- I materiali devono essere scelti accuratamente per evitare una loro miscelazione indesiderata

B. Gas jacket electrospinning

- Il getto gassoso aiuta la formazione di superfici lisce
- La velocità del gas insufflato deve essere controllata accuratamente

Melt electrospinning

Il processo di electrospinning da fuso differisce dal solution electrospinning sostanzialmente per l'uso di un feed di fuso polimerico e la necessità di condurre il processo sotto vuoto.

Vantaggi:

- Eliminazione delle limitazioni legate all'uso di solventi (in particolare organici) quali la tossicità dei residui e la conseguente necessità di rimozione e riciclaggio
- Abbassamento dei costi del solvente e del trattamento dei suoi residui
- Aumento della produttività senza perdita di massa per evaporazione del solvente
- Generazione di fibre sub-micrometriche a temperatura ambiente senza necessità di solventi

Svantaggi:

- Viscosità troppo elevata (anche di più di 3 ordini di grandezza superiore alla viscosità delle soluzioni impiegate in solution electrospinning)
- Temperature troppo elevate per mantenere il polimero fluido
- Incapacità di ottenere fibre nel range nanometrico

Questi svantaggi precludono a possibilità di processare un gran numero di materiali attraverso questa tecnica

Polimeri usati per electrospinning da fuso polimerico

Polymer	Processing temperature (°C)
Polypropylene	220–240
Poly(ethylene terephthalate)	270
Poly-(ethylene glycol-block- ϵ -caprolactone)	58.2
Polyethylene	200–220
Poly(methyl methacrylate)	130–157
Polyamides (nylon)	220
Polystyrene	240

Caratterizzazione delle fibre ottenute per electrospinning

La caratterizzazione delle fibre ottenute per electrospinning è un procedimento molto complicato poiché la probabilità di ottenere una singola fibra è molto rara.

In generale vengono studiate:

- **Caratteristiche geometriche (fisiche e strutturali)**
- **Caratteristiche meccaniche**
- **Caratteristiche chimiche**

Caratterizzazione geometrica

Le proprietà morfologiche e strutturali di interesse sono:

- **Forma e diametro della sezione della fibra**
- **Orientamento della fibra**
- **Rugosità della superficie**
- **Porosità e dimensione dei pori**
- **Cristallinità**

Per l'analisi vengono impiegati generalmente microscopi a scansione (SEM), microscopi elettronici a scansione di campo (FESEM), microscopi a trasmissione (TEM), o microscopi a forza atomica (AFM). Di questi strumenti i microscopi a forza atomica sono i migliori per ottenere una descrizione precisa ed esatta della superficie di qualsiasi fibra.

L'analisi della cristallinità si avvale di tecniche di diffrazione ai raggi X ad ampia e piccola angolatura o calorimetria a scansione differenziale (DSC); queste tecniche necessitano di un materiale di riferimento a cristallinità nota per condurre la misura.

Per quanto riguarda lo studio della porosità, che è un parametro fondamentale a seconda dell'applicazione, questo può essere condotto attraverso porosimetri a flusso capillare o in porosimetri a mercurio. Generalmente le fibre prodotte per electrospinning sono molto altamente porose (fino al 91,63%), le dimensioni dei pori però possono non essere sufficienti a seconda dell'impiego del prodotto.

Caratterizzazione meccanica

La caratterizzazione meccanica è condotta su provini di singole fibre ottenute da grovigli di fibre ultrasottili fabbricati attraverso electrospinning e maneggiati con estrema cura per evitarne il danneggiamento in particolare durante il montaggio.

Comuni test di caratterizzazione meccanica su fibre ottenute per electrospinning sono la **nanoindentazione**, **bending tests**, **misure di frequenza di risonanza**, **test di tensione alla microscala**. Tutte queste misure si avvalgono di AFM, in particolare delle interazioni tra gusci atomici caratteristiche su scala nanometrica. Un bending test ad esempio consiste nella misura della deflessione della punta dello strumento causata dalla sua interazione con gli atomi della nanofibra.

L'eventuale anisotropia delle fibre dipende dal tipo di collettore impiegato, per esempio le fibre raccolte con un tamburo rotante sentono la velocità di rotazione in una direzione preferenziale e ciò ne determina l'anisotropia assiale che non caratterizza invece fibre raccolte su un collettore statico.

È stata talvolta evidenziata una dipendenza delle caratteristiche meccaniche dalla dimensione della fibra: il modulo elastico tendeva a diminuire al diminuire del diametro della fibra.

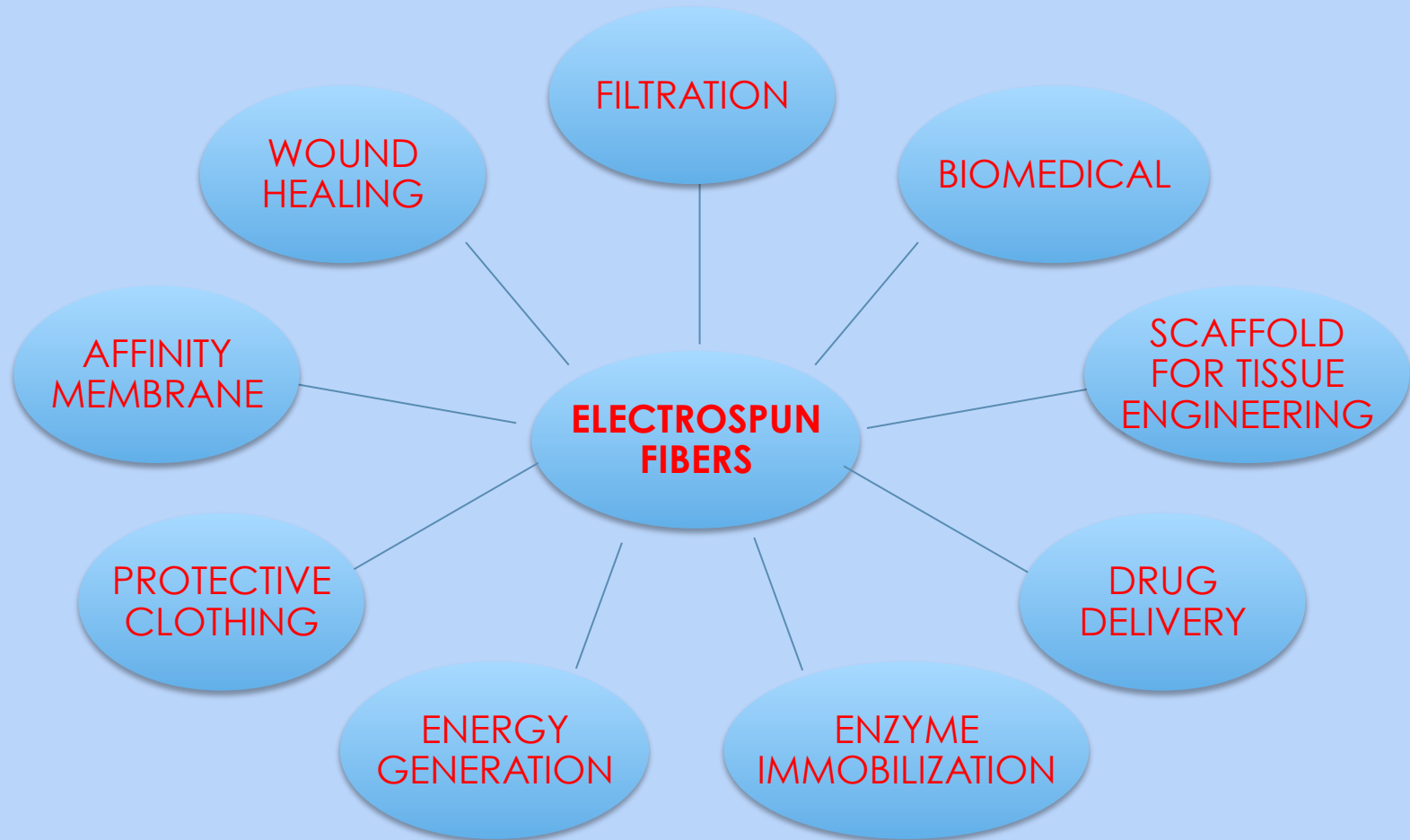
Polymers	Ultimate strength
Collagen II	3.3 ± 0.3 MPa
poly(ϵ -caprolactone)	40 ± 10 MPa
Gelatin	4.79 MPa
Cross-linked gelatin	12.62 ± 1.28 MPa
Silk fibroin	7.25 MPa
Poly(vinylchloride)/Polyurethane (25/75)	6.30 MPa
Polyethylene oxide	10 ± 0.2 MPa

Caratterizzazione chimica

La caratterizzazione della struttura molecolare della nanofibra viene operata normalmente attraverso **FTIR-Fourier transform infra red** e **NMR-nuclear magnetic resonance**. Queste tecniche sono in grado di evidenziare anche la composizione e le interazioni intermolecolari di blend polimerici.

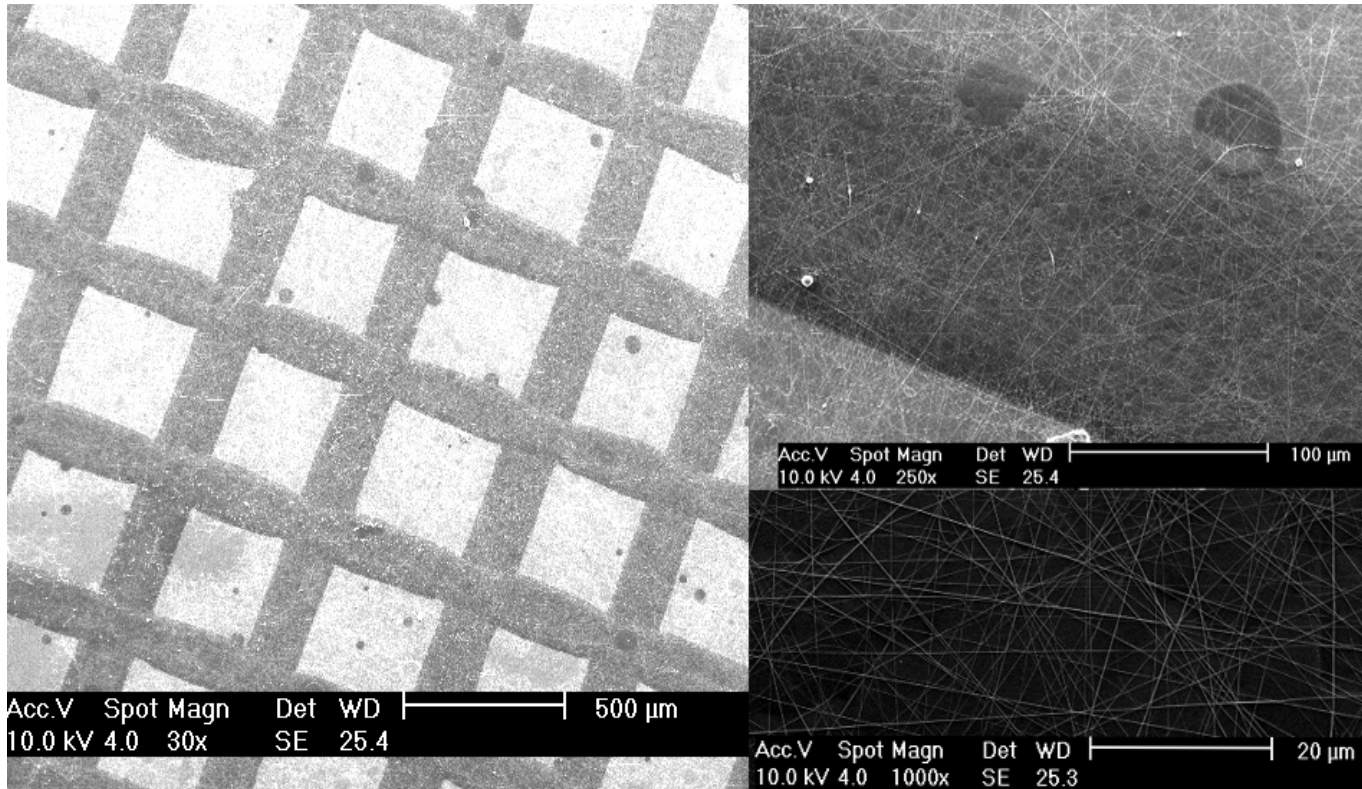
Per quanto riguarda lo studio delle proprietà chimiche superficiali, queste possono essere rilevate attraverso lo studio dell'angolo di contatto con solventi polari e/o apolari (interazioni idrofiliche o idrofobiche).

Applicazioni dell'electrospinning



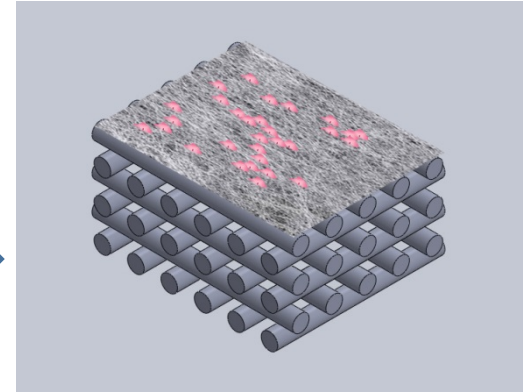
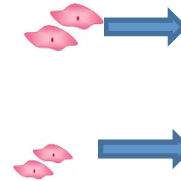
Circa due terzi dei brevetti depositati riguardanti applicazioni dell'electrospinning si collocano in **ambito biomedico**. Metà del rimanente terzo riguarda applicazioni per la **filtrazione**. Di seguito sono riportate considerazioni su questi due principali ambiti applicativi

PAM²-Electrospinning

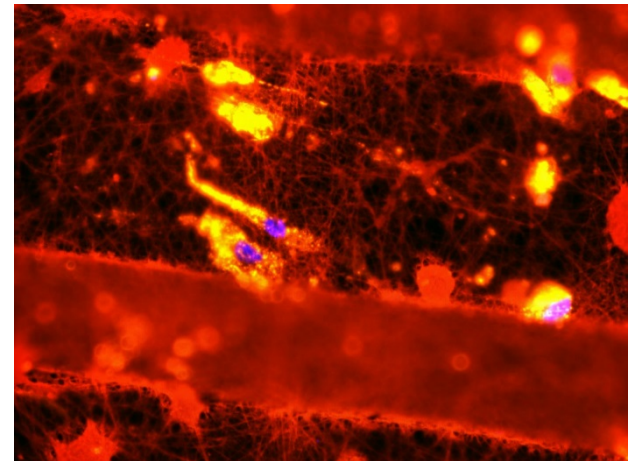
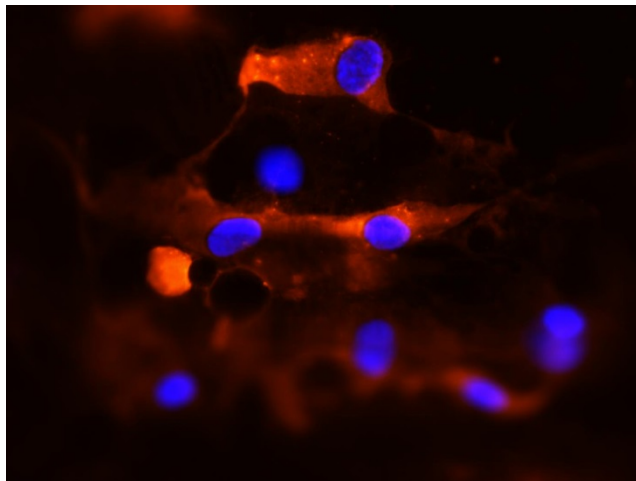


In-vitro assay

- Cell Density
- Viability Assay: MTS assay
- Proliferation Assay: EDU



Used cells: Saphenous Vein Pericytes

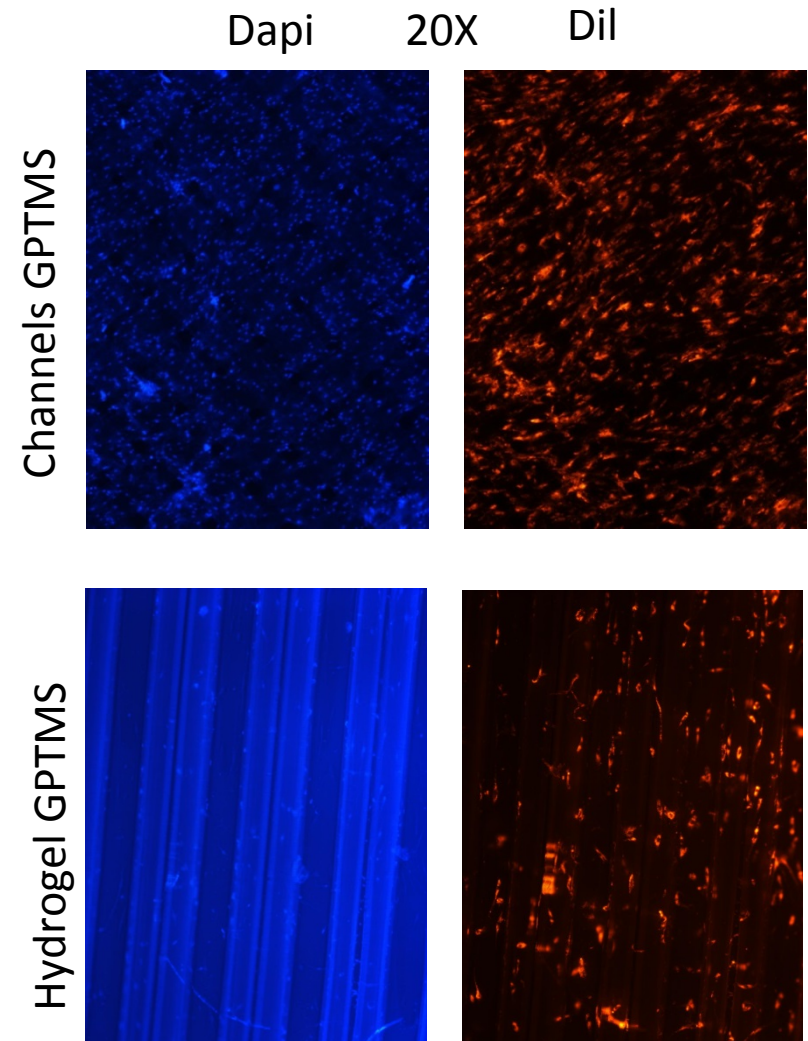
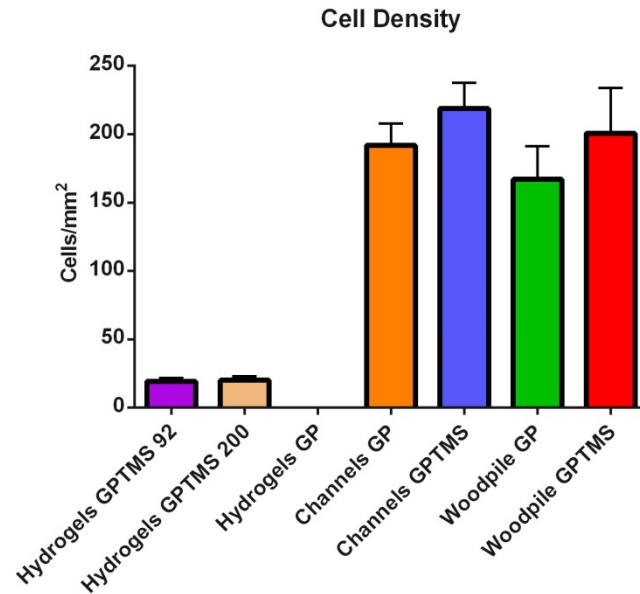


In-vitro assay

Cell Density

Cells marked with:

- Dapi: Nuclei
- Dil: Membranes

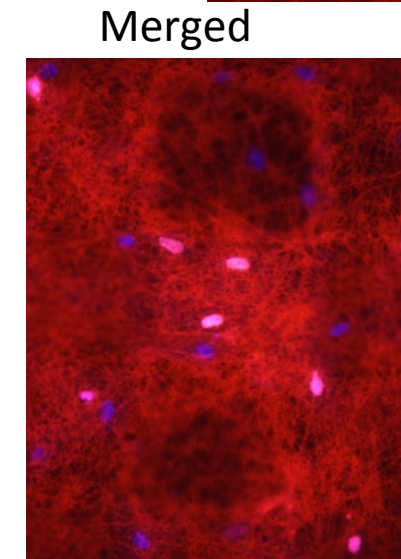
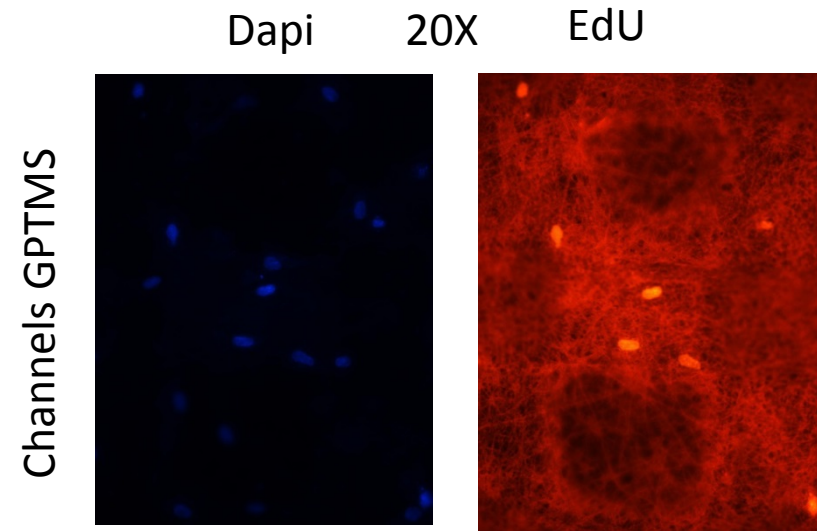
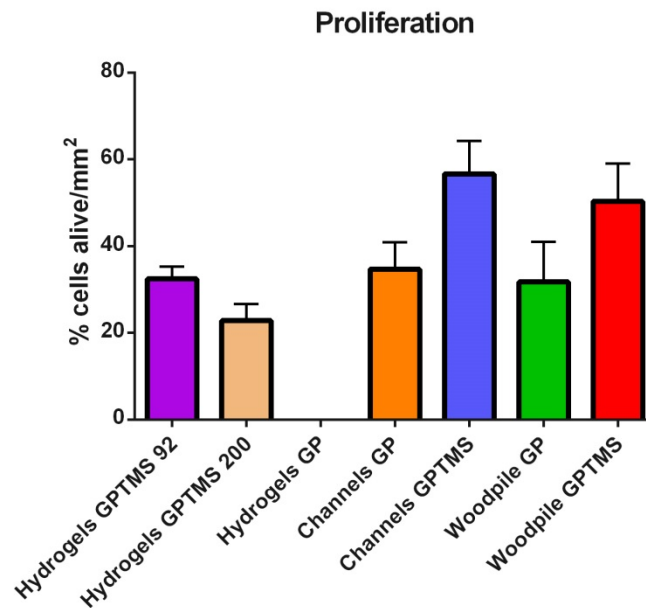


In-vitro assay

Proliferation

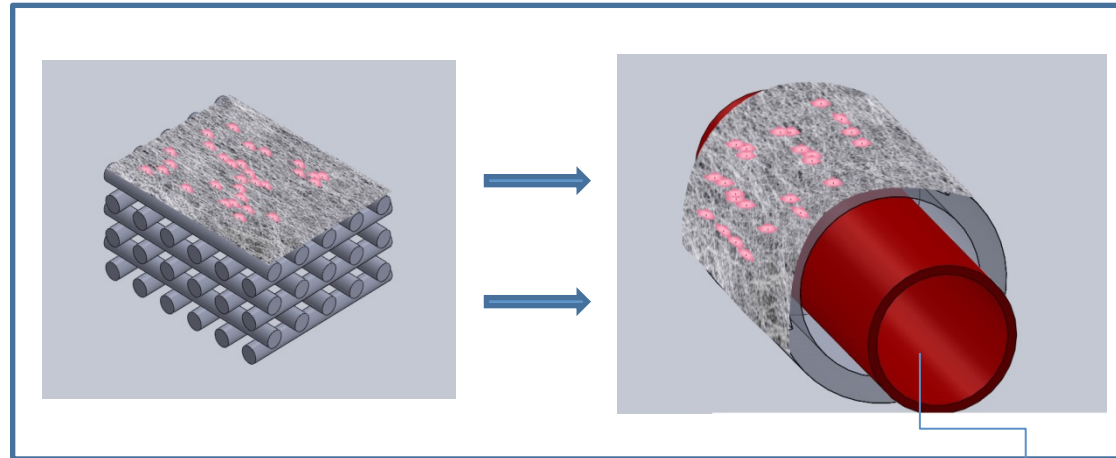
Cells marked with:

- Dapi: Nuclei
- EdU: proliferative Nuclei



In-vivo assay

- In vivo assays



Occluded artery

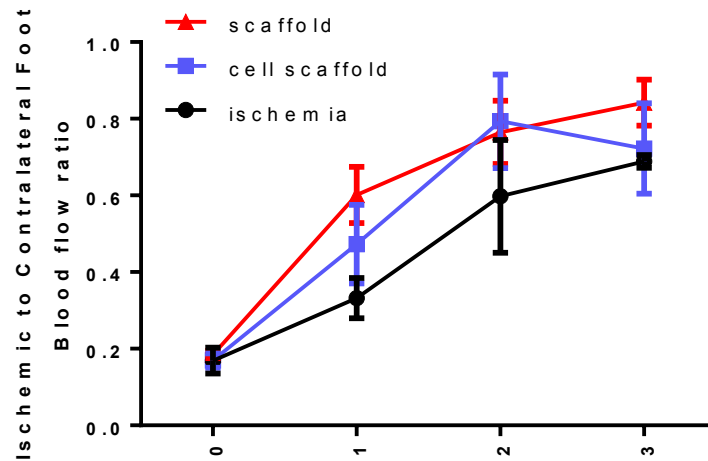
3 groups of CD1 mice:

1. Mice subject only to Limb Ischemia
2. Mice with scaffold implantation
3. Mice with seeded cells scaffold implantation

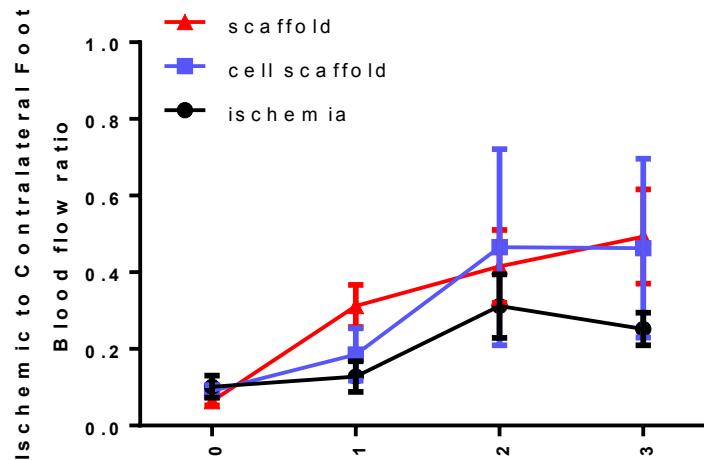
Evaluation after
3 weeks of
implantation

In-vivo assay

Doppler analysis



Area of Scaffold
implantation

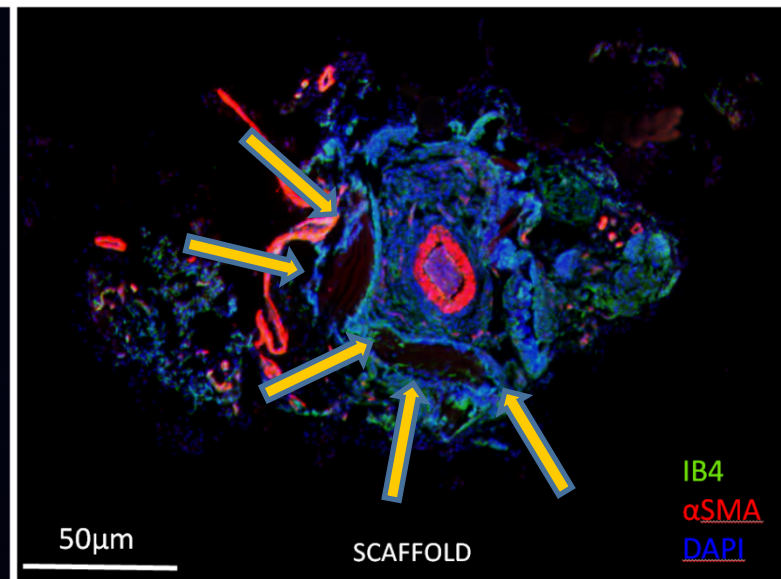
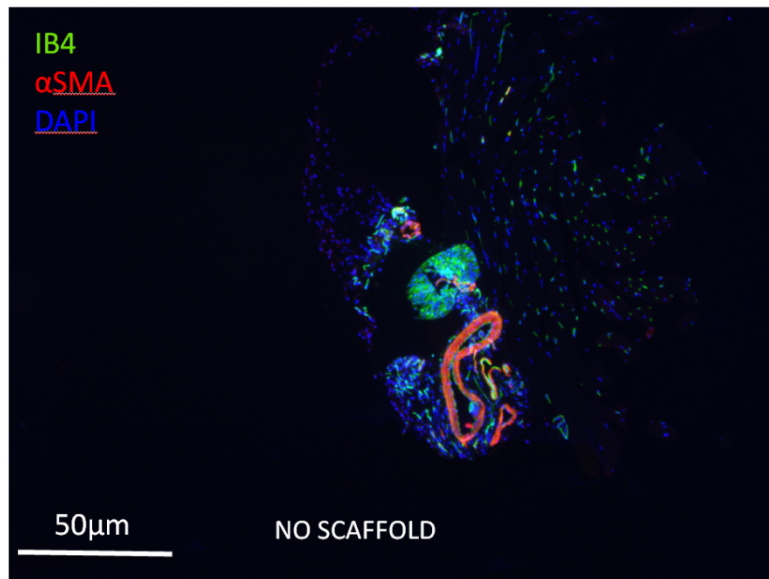


Foot

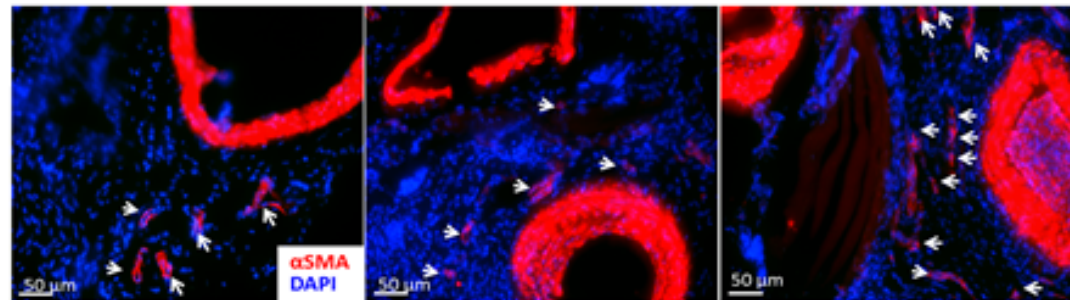
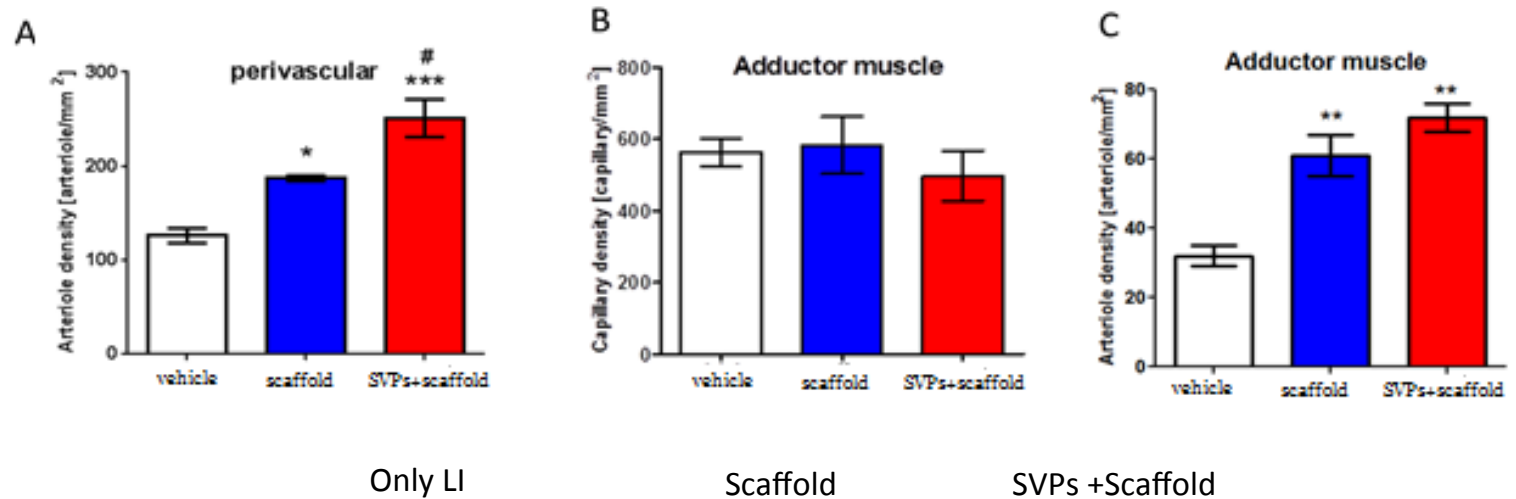
In-vivo assay

Only Limb Ischemia

Scaff+SVPs



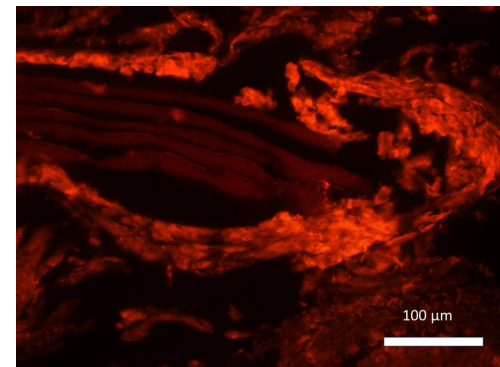
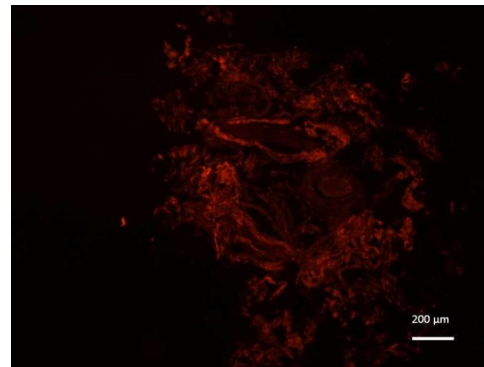
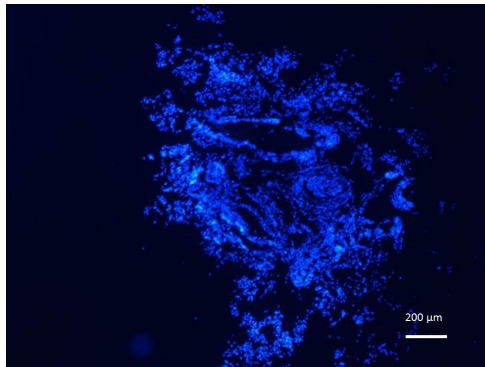
In-vivo assay



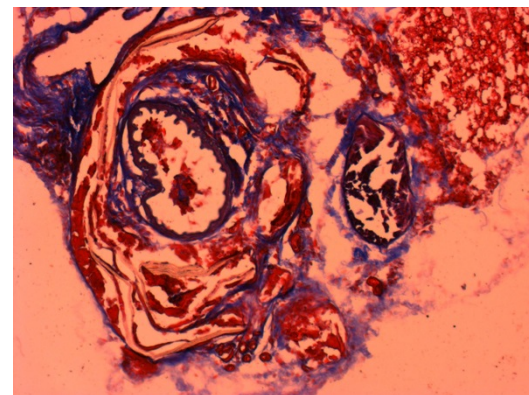
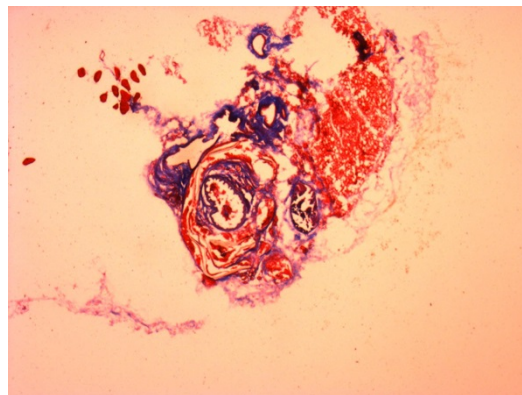
In-vivo assay

Inflammation and fibrosis assessment

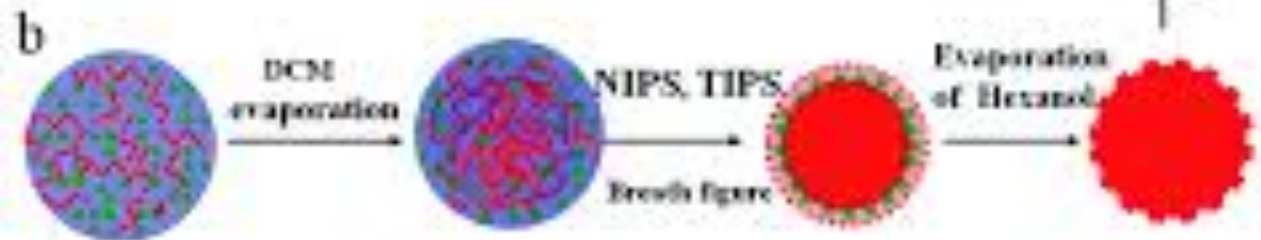
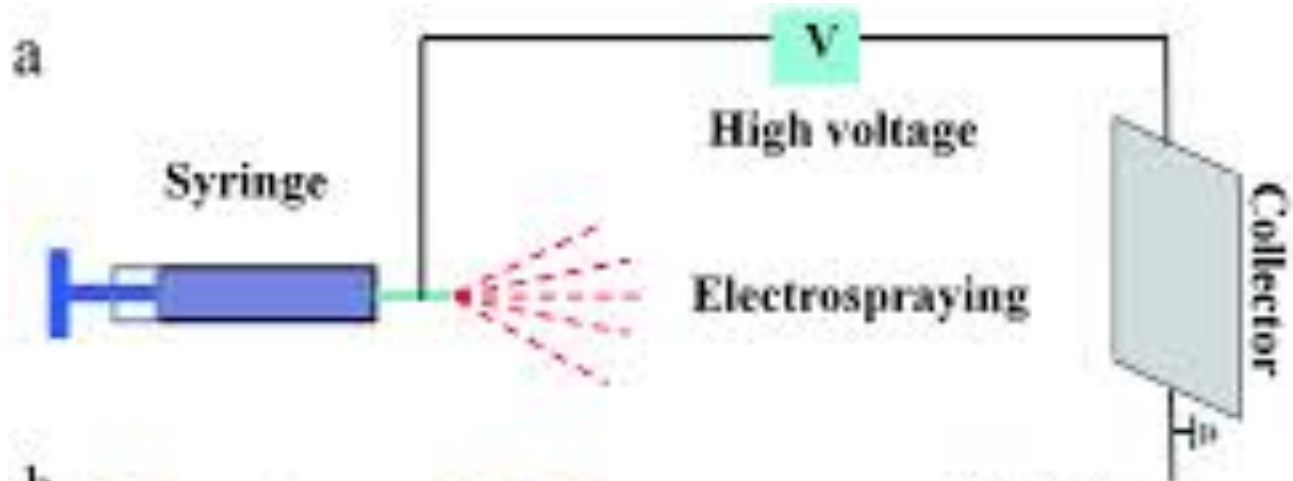
Macrophages detection



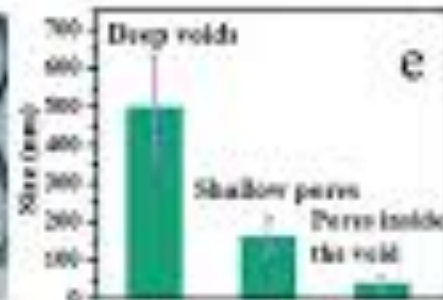
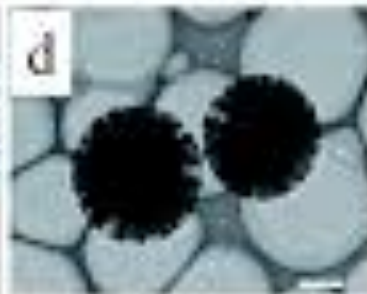
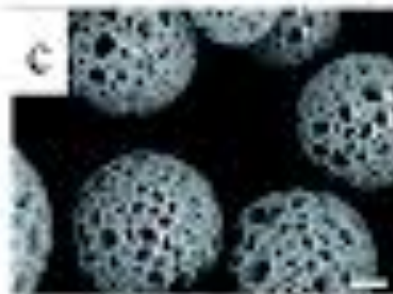
Fibrosis detection



Electrospraying



• Solvent: DCM • Hexanol ($C_6H_{12}O$) :  • Polymer 



Electrospraying

