



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL
FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE**

SVILUPPO E CARATTERIZZAZIONE DI MICRONEEDLES
A BASE DI BIOMATERIALI INNOVATIVI COME
DISPOSITIVI PER IL TRATTAMENTO DI CICATRICI
PATOLOGICHE

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Silvia Stefania Rossi

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di

Giulia Zublena
Matricola 478335

Anno Accademico 2023/2024

Alla mia famiglia

Introduzione	1
1. PROCESSO DI GUARIGIONE DELLE FERITE	2
2. CICATRICI PATOLOGICHE	4
2.1 Cicatrici ipertrofiche	6
2.2 Cheloidi	6
3. TRATTAMENTO DELLE CICATRICI ANORMALI	7
3.1 Trattamenti farmacologici	8
3.1.1 Corticosteroidi	8
3.1.2 5-fluorouracile	9
3.1.3 Mitomicina-C	9
3.1.4 Gel di silicone	10
3.1.5 Verapamil	11
3.1.6 Tossina botulinica di tipo A	11
3.2 Trattamenti non farmacologici	12
3.2.1 Laser	12
3.2.2 Crioterapia	13
3.2.3 Chirurgia	13
3.2.4 Radioterapia	14
3.2.5 Microneedles	14
4. MICRONEEDLES	16
4.1 Applicazioni dei MN	18
4.2 Caratteristiche dei MN	20
4.2.1 Geometria dei MN	20
4.2.2 Diametro e affilatezza della punta	21
4.2.3 Lunghezza	22
4.2.4 Densità e distanza dei MN	22
5. TIPOLOGIE DI MICRONEEDLES	23
5.1 MN solidi	24
5.2 MN cavi	25
5.3 MN rivestiti	26
5.4 MN solubili	27
5.5 MN formanti-idrogel	27

5.6 MN Stimuli-responsive	28
6. METODI DI PRODUZIONE	31
6.1 Ablazione laser	31
6.2 Insufflaggio di aria	31
6.3 Litografia.....	32
6.4 Micromolding.....	32
6.5 Stampa 3D.....	33
7. MATERIALI	33
7.1 Ceramica	34
7.2 Metalli	34
7.3 Polimeri.....	35
7.4 Silicone.....	37
7.5 Vetro	38
8. BIOMATERIALI	40
8.1 Chitosano.....	42
8.1.1 Trimetil chitosano.....	44
8.2 Proteine del siero del latte.....	46
8.3 Complessi chitosano-proteine del siero del latte.....	50
Scopo della tesi	53
Parte sperimentale.....	56
9. MATERIALI	56
10. METODI	58
10.1 Preparazione delle miscele.....	58
10.1.1 Preparazione miscele chitosano-proteine del siero del latte isolato.....	58
10.1.2 Preparazione miscele trimetilchitosano-proteine del siero del latte isolato	59
10.2 Preparazione dei film	59
10.3 Caratterizzazione dei film	60
10.3.1 Microscopia elettronica a scansione.....	60
10.3.2 Proprietà meccaniche	61
10.3.3 Perdita e contenuto di solvente	62
10.3.4 Proprietà di idratazione	62
10.3.5 Proprietà di bioadesione.....	63

10.4 Preparazione dei MN.....	64
10.5 Caratterizzazione MN	66
10.5.1 Microscopia ottica.....	66
10.5.2 Microscopia elettronica a scansione.....	66
10.5.3 Proprietà meccaniche	67
10.5.4 Perdita di solvente.....	67
10.5.5 Proprietà di bioadesione.....	68
10.5.6 Test di inserzione nel Parafilm®	68
10.5.7 Test di inserzione in modello di pelle umana.....	69
10.5.8 Dissoluzione.....	70
10.5.9 Proprietà di rigonfiamento	71
10.5.10 Proprietà di degradazione.....	72
10.6 Biocompatibilità <i>in vivo</i>	72
10.7 Test in vitro su fibroblasti.....	73
10.7.1 Coltura di fibroblasti del derma umano	73
10.7.2 Tripsinizzazione delle cellule.....	74
10.7.3 Conta cellulare	75
10.7.4 Fibroblast-Populated Collagen Lattice System.....	75
10.7.5 Misure di viscoelasticità.....	76
10.8 Analisi statistica	77
<i>Risultati e discussione</i>	78
<i>Conclusioni</i>	114
<i>Bibliografia</i>	115

Introduzione

1. PROCESSO DI GUARIGIONE DELLE FERITE

La cute, o pelle, è il più grande organo del corpo umano e agisce come barriera meccanica primaria tra l'organismo e l'ambiente esterno. La struttura morfologica della pelle comprende due strati: epidermide e derma.

L'epidermide è lo strato più esterno, suddiviso a sua volta in quattro o cinque substrati, a seconda della regione del corpo. Il derma è lo strato di tessuto connettivo che supporta l'epidermide; esso è costituito prevalentemente da proteine, sintetizzate dai fibroblasti, le quali compongono la matrice extracellulare (ECM), come collagene, elastina, proteoglicano e glicosamminoglicano. Quando si verifica una lesione di uno o entrambi gli strati della cute, l'organismo avvia il processo di guarigione per rigenerare l'area danneggiata (Gushiken et al., 2021).

Il processo di guarigione di una ferita è un processo complesso e dinamico che si articola in quattro fasi coordinate e sovrapponibili: emostasi, infiammazione, proliferazione e rimodellamento (Figura 1) (Peña et al., 2024).

La fase iniziale è l'emostasi, il cui scopo principale è l'arresto del sanguinamento e la formazione di una ECM provvisoria. Questa fase è caratterizzata da vasocostrizione e dall'avvio della cascata coagulativa che favorisce la formazione di un tappo piastrinico, il quale impedisce la perdita di sangue. La matrice provvisoria, oltre a riempire la lesione tissutale, consente la migrazione delle cellule necessarie per il processo di guarigione, tra cui quelle in grado di rilasciare citochine. Le citochine e i fattori di crescita rilasciati, tra cui l'interleuchina-1 β (IL-1 β), il *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) e i fattori di crescita derivanti da piastrine (PDGF), contribuiscono ad attrarre fibroblasti, cellule endoteliali e cellule immunitarie necessarie alla riparazione tissutale (Domingues et al., 2024).

A seguito dell'emostasi, contemporaneamente al rilascio di fattori chemiotattici, ha inizio la fase infiammatoria, caratterizzata dall'infiltrazione di cellule immunitarie e dalla rimozione dei detriti. I neutrofili sono i primi che accorrono al sito danneggiato, fagocitano i batteri e i tessuti danneggiati. Successivamente i macrofagi svolgono un ruolo cruciale nell'eliminazione dei detriti cellulari e nella modulazione della risposta immunitaria. La qualità e la durata della risposta infiammatoria influenzano significativamente il progresso di guarigione della ferita; una fase infiammatoria

prolungata può ostacolare la guarigione e portare allo sviluppo di ulcere croniche (Choudhary et al., 2024).

Durante la fase di proliferazione si ha la formazione del tessuto di granulazione e la rigenerazione tissutale. I fibroblasti migrano nel sito della ferita, producendo collagene di tipo III, il principale componente della ECM, che forma la struttura portante del tessuto in riparazione. Le cellule endoteliali promuovono l'angiogenesi, creando una robusta rete vascolare per sostenere la formazione del nuovo tessuto. I cheratinociti ai bordi della ferita proliferano e migrano, consentendo la chiusura della stessa attraverso la riepitelizzazione. I diversi fattori di crescita, tra cui il *transforming growth factor-β* (TGF-β1) e PDGF, stimolano la migrazione, la proliferazione e la sintesi dei componenti della ECM (Gushiken et al., 2021).

Nella fase finale di rimodellamento si ha la sostituzione della ECM provvisoria formata durante l'emostasi, con un tessuto cicatriziale riorganizzato. Le fibre di collagene di tipo III vengono sostituite con fibre di collagene di tipo I, più forti e resistenti; la resistenza tensile del tessuto aumenta con la formazione di legami crociati del collagene; inoltre, si ha l'apoptosi delle cellule in eccesso che hanno contribuito alla formazione del tessuto di granulazione. La forza tensile del tessuto aumenta all'aumentare della reticolazione del collagene, contribuendo alla stabilità della cicatrice (Choudhary et al., 2024; Kim et al., 2022).

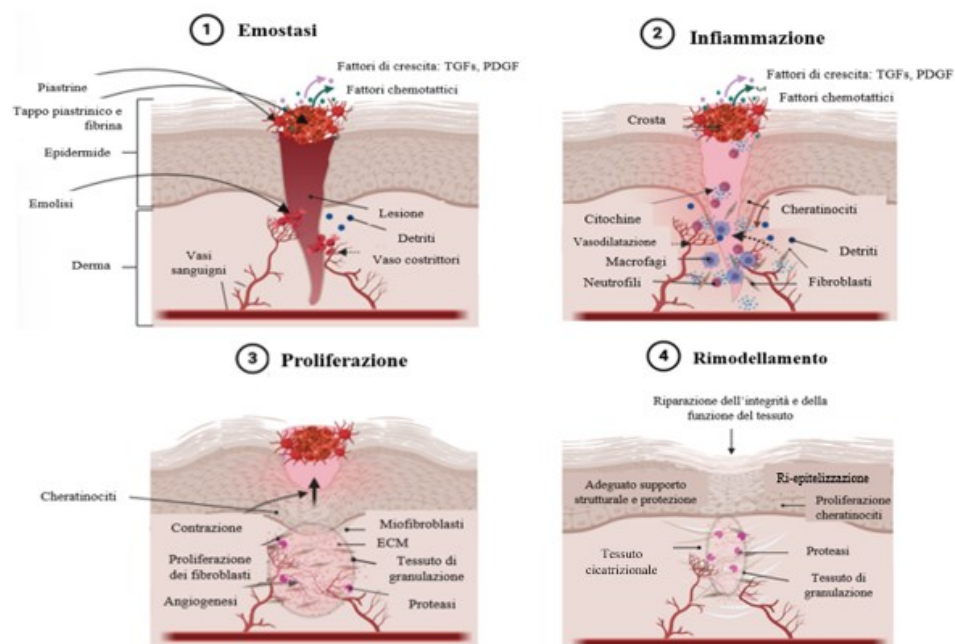


Figura 1 - Le quattro fasi del processo di guarigione delle ferite (Choudhary et al., 2024).

2. CICATRICI PATOLOGICHE

Le cicatrici sono definite come il risultato di lesioni traumatiche che coinvolgono gli strati profondi del derma, in cui si forma tessuto fibroso permanente.

Le cicatrici patologiche, o anormali, sono caratterizzate da una crescita eccessiva di tessuto e sono causate dalla disfunzione dei processi rigenerativi (Riedemann et al., 2023). Si tratta quindi di un processo di guarigione anomalo, spesso caratterizzato da proliferazione e trans-differenziazione eccessive dei fibroblasti, nonché da un eccessivo accumulo della ECM (Ma et al., 2023).

La patogenesi delle cicatrici anormali non è ancora completamente compresa. Le risposte infiammatorie, lo stress meccanico, le condizioni di ipossia e la genetica sono tutti fattori che giocano un ruolo nel loro sviluppo. Ogni fattore causa anomalie nei fibroblasti a vari gradi, tuttavia, questi fattori non sono indipendenti l'uno dall'altro (Ma et al., 2023). La persistenza di una aumentata attività infiammatoria (locale e sistemica) oltre le fasi iniziali della guarigione della ferita è un fattore critico; infatti, il rilascio di citochine pro-infiammatorie porta all'espressione di fattori di crescita che attirano i macrofagi. Questi ultimi attivano i fibroblasti, che si differenziano in miofibroblasti e controllano i processi anormali di rimodellamento. Oltre ai processi infiammatori, sono coinvolti processi di rimodellamento disturbati. Questi derivano da una ridotta attività delle collagenasi e da una mancanza di apoptosi, portando a una fibrosi progressiva (Riedemann et al., 2023).

Le cicatrici anormali possono essere causate da ustioni, tagli, abrasioni, piercing, vaccinazioni e interventi chirurgici (Bakhtyar et al., 2022). Infatti, in seguito a stress meccanici, i fibroblasti sviluppano un fenotipo attivato, i miofibroblasti, che mostrano una specifica contrazione. Inoltre, risultano sovra-espressi il TGF- β 1, il fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF), il collagene di tipo I e la fibronectina secreta dai miofibroblasti. L'eccessiva deposizione e disorganizzazione della ECM, compresi collagene e fibronectina, porta alla formazione di cicatrici patologiche (Zhang et al., 2022). L'ipossia eccessiva causa un'inflammatione cronica persistente, che promuove la proliferazione anormale dei fibroblasti e delle cellule endoteliali, così come l'espressione di TGF- β , portando alla formazione anormale dei vasi sanguigni e alla deposizione di collagene (COL), aggravando ulteriormente

l'ipossia (Ma et al., 2023). Due tipi di cicatrici anormali sono comunemente riconosciuti: cicatrici ipertrofiche e cheloidi (Figura 2), entrambi questi tipi comportano un'eccessiva deposizione di collagene che porta alla formazione di tessuto cicatriziale sollevato (Limandjaja et al., 2021). Queste colpiscono milioni di individui in tutto il mondo e possono causare dolore e malessere, risultare esteticamente sgradevoli e compromettere la qualità della vita dei pazienti (Bakhtyar et al., 2022). Sono stati identificati alcuni fattori di rischio che possono incrementare la probabilità di sviluppare cicatrici anormali. Ad esempio, tra gli 11 e i 30 anni si osserva un aumento significativo del rischio, attribuibile alla maggiore risposta infiammatoria della pelle e all'elevata concentrazione di ormoni legata alla pubertà (Frech et al., 2023). Non sono state evidenziate disparità nel processo di formazione delle cicatrici tra i due sessi, ma è stata notata una predisposizione genetica alla loro formazione (Bakhtyar et al., 2022). Inoltre, si è notata una maggiore incidenza di cheloidi in Africa, a seguire in Asia, mentre in Europa si verificano pochi casi (Shan et al., 2022).

Le cicatrici ipertrofiche e i cheloidi sono stati a lungo un argomento di dibattito tra i ricercatori, con esperti divisi sul fatto che queste cicatrici anormali siano due facce della stessa medaglia o entità distinte (Limandjaja et al., 2021). La distinzione primaria tra le due risiede nel fatto che i cheloidi si estendono oltre i margini della ferita originale mentre le cicatrici ipertrofiche rimangono confinate all'interno dei margini stessi (Tian et al., 2023). Differenze cliniche essenziali sono state osservate tra le due tipologie riguardo il modello di crescita, la progressione naturale nel tempo e l'associazione con la contrattura della cicatrice (Limandjaja et al., 2021).



Figura 2 - Illustrazione di una cicatrice ipertrofica (a sinistra) e di un cheloide (a destra) (Limandjaja et al., 2021).

2.1 Cicatrici ipertrofiche

Le cicatrici ipertrofiche sono aree ispessite di tessuto fibrotico nel sito della ferita, con una crescita limitata ai margini della lesione originale (Riedemann et al., 2023). Le cicatrici ipertrofiche solitamente insorgono entro 4-8 settimane dalla chiusura della ferita, si sviluppano nei successivi 6-8 mesi, dopo di che la progressione solitamente si arresta e diventano quiescenti (Menashe et al., 2024). Esse si verificano a seguito di una lesione a carico degli strati più profondi della pelle dovuta a ustioni, traumi e interventi chirurgici. Possono essere depigmentate, eritematose, dolorose, pruriginose e psicologicamente invalidanti. Queste cicatrici possono compromettere la contrazione, specialmente quando si formano in prossimità delle articolazioni (Molina et al., 2022).

Le cicatrici ipertrofiche si distinguono per la presenza di fibre di collagene sottili, organizzate in modo sistematico e parallelo con andamento ondulato. Sono caratterizzate da una significativa quantità di α -actina (α -SMA), responsabile della produzione di miofibroblasti; inoltre, contengono una quantità di collagene di tipo III superiore rispetto al collagene di tipo I. Questo le differenzia dai cheloidi che contengono collagene di tipo I e di tipo III in quantità pressoché simili (Bakhtyar et al., 2022).

Anatomicamente, le cicatrici ipertrofiche si sviluppano in aree soggette ad alte tensioni e mobilità, come collo, spalle, gomiti, polsi, dorso della mano, ginocchia e caviglie (Limandjaja et al., 2021).

2.2 Cheloidi

I cheloidi, invece, sono cicatrici anormali che possono espandersi oltre i margini della ferita originale (Bell et al., 2021). Al contrario delle cicatrici ipertrofiche, i cheloidi possono svilupparsi da tre mesi a diversi anni dopo l'infortunio, raramente maturano e non seguono lo stesso schema di evoluzione, stabilizzazione e involuzione delle cicatrici normotrofiche e ipertrofiche. Si sviluppano in seguito a lievi traumi come follicolite, acne, vaccinazioni, piercing o tagli cesari con esordio che si verifica dopo diversi mesi dall'infortunio e possono permanere per un periodo di tempo esteso (Turobi et al., 2024).

I cheloidi sono caratterizzati da un deposito eccessivo di ECM e da elevata vascolarizzazione. Nonostante siano classificati come crescite del derma benigne, presentano proprietà biologiche simili a tumori maligni, come l'iperproliferazione e la resistenza all'apoptosi (Liu et al., 2022). Sono caratterizzati da alti livelli di proliferazione cellulare e da fibre di collagene larghe e sottili, indicanti uno schema più disorganizzato rispetto alle cicatrici ipertrofiche (Bakhtyar et al., 2022). La crescita orizzontale invasiva rimane la caratteristica più peculiare sulla quale si basa la diagnosi clinica di un cheloide, in contrasto con la crescita non invasiva delle cicatrici ipertrofiche contenuta entro o appena intorno ai bordi della ferita originale. È possibile suddividere i cheloidi in: cheloidi esofitici, hanno una forma tipica a bulbo e in superficie possono apparire lisci o presentare solchi; e cheloidi che crescono superficialmente, i quali inizialmente appaiono come piccoli noduli o come placche piatte, successivamente tendono ad allungarsi longitudinalmente fino ad ottenere la caratteristica forma di uno pseudopodio (Turobi et al., 2024).

I cheloidi spesso si sviluppano in determinati siti di predilezione anatomica, la maggior parte dei quali sono associati alla parte superiore del torso. Queste aree di predilezione sono state anche collegate a una maggiore tensione cutanea e all'allungamento costante durante i normali movimenti (Limandjaja et al., 2021).

3. TRATTAMENTO DELLE CICATRICI ANORMALI

Esistono diversi trattamenti per le cicatrici patologiche con vari gradi di efficienza in base alla tipologia e alla gravità (Menashe et al., 2024). L'obiettivo principale dei trattamenti è migliorare sia la funzionalità della zona coinvolta che l'aspetto, e cercare di ridurre al minimo il rischio di recidiva (Frech et al., 2023).

Esistono numerosi approcci terapeutici per diminuire la tensione a livello della cicatrice, ma, nonostante ciò, si è ancora distanti dalla perfezione (Zhang et al., 2022).

3.1 Trattamenti farmacologici

3.1.1 Corticosteroidi

I corticosteroidi rappresentano la terapia di prima linea per il trattamento delle cicatrici anormali. Questi farmaci possono essere somministrati sia per via intra-lesionale che trans-dermica. Il triamcinolone acetonide (TAC) e il betametasone sono tra i corticosteroidi maggiormente utilizzati grazie alla loro lunga durata d'azione e alle eccellenti proprietà antinfiammatorie a bassi dosaggi (Sheng et al., 2023). Le iniezioni di TAC agiscono in diverse modalità: innanzitutto, la loro natura antinfiammatoria inibisce la migrazione dei leucociti e la fagocitosi; inoltre, la loro azione antimitotica contribuisce a inibire la proliferazione di fibroblasti e cheratinociti. In aggiunta, i corticosteroidi in quanto vasocostrittori, riducono il trasporto di ossigeno alla cicatrice. Infine, sono in grado di abbassare i livelli di espressione di TGF- β 1 e degli inibitori della collagenasi, come l' α -globulina. Questo insieme di azioni porta alla degenerazione dei fibroblasti e del collagene, migliorando così l'aspetto della cicatrice (Karina et al., 2023). Le iniezioni intra-lesionali di TAC portano a un miglioramento nel 50-100% dei casi (Figura 3); tuttavia, si verifica una ricaduta nel 33-50% dei casi (Zhang et al., 2023).

I dosaggi solitamente utilizzati per le iniezioni intra-lesionali di TAC sono di 10-40 mg/mL ogni 4-6 settimane. Effetti avversi a livello sistemico non sono osservati con l'uso di bassi dosaggi; tuttavia, somministrazioni ripetute nel tempo possono causare ipertensione, insufficienza cardiaca e diabete. Inoltre, la somministrazione intra-lesionale viene associata a effetti collaterali precoci quali sanguinamento, lividi, infezioni e compromissione della guarigione della ferita (Barone et al., 2021).



Figura 3 - Cicatrice ipertrofica pretrattamento (sinistra) e a seguito di trattamento con corticosteroidi (destra) (Ogawa et al., 2022).

3.1.2 5-fluorouracile

Il 5-fluorouracile (5-FU) è un analogo fluorurato della pirimidina che inibisce la sintesi degli acidi nucleici e la proliferazione cellulare. La sua azione si manifesta attraverso l'inibizione dell'enzima timidilato sintasi, riducendo così la proliferazione aberrante dei fibroblasti, comune nelle cicatrici anormali (Elsaie et al., 2021). Studi *in vivo* e *in vitro* hanno dimostrato che il 5-FU è in grado di bloccare la proliferazione dei fibroblasti, l'angiogenesi e l'espressione del collagene di tipo I indotta dal TGF- β 1 e di indurre l'apoptosi dei fibroblasti (Figura 4) (Yang et al., 2021). I principali effetti collaterali a livello cutaneo includono dolore, arrossamento, iperpigmentazione transitoria, sensazione di bruciore ed eritema cutaneo mentre non sono state segnalate complicazioni a livello sistemico (Elsaie et al., 2021).

La terapia combinata di TAC e 5-FU ha dimostrato una maggiore efficacia nel trattamento dei cheloidi rispetto alle monoterapie, con una diminuzione dei possibili effetti collaterali causati dai corticosteroidi come atrofia, ipopigmentazione e teleangectasia. Un *trial* clinico randomizzato ha evidenziato che il tasso di atrofia e teleangectasia con la monoterapia di TAC è rispettivamente del 44% e 50% mentre utilizzando la terapia combinata di TAC e 5-FU si riduce all'8% e 21% (Frech et al., 2023).

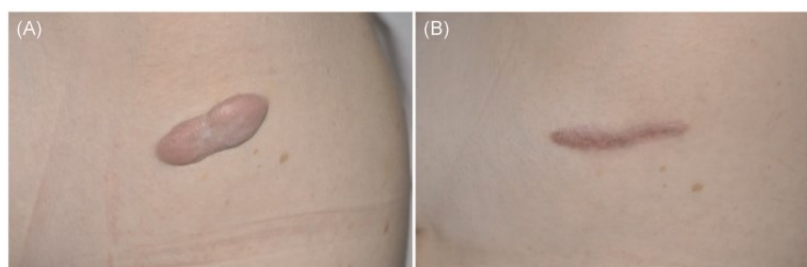


Figura 4 - (A) Cheloide prima del trattamento e (B) dopo due sedute di iniezione di 5-FU, in una paziente di 32 anni (Gianatasio et al., 2021).

3.1.3 Mitomicina-C

La mitomicina-C è un antibiotico naturale isolato nel 1958 derivato dalla fermentazione dello *Streptomyces caespitosus*. È considerata una terapia alternativa per la prevenzione della recidiva dei cheloidi (Frech et al., 2023). Questo farmaco è caratterizzato da proprietà antineoplastiche e antiproliferative; inoltre, la mitomicina-C risulta essere meno tossica delle altre mitomicine (Kim et al., 2021). Essa agisce

alchilando e *cross-linkando* il DNA, in questo modo inibisce la sintesi proteica. Il trattamento con questo antibiotico riduce quindi la sintesi del DNA nei fibroblasti e ne diminuisce la densità rispetto ad altri trattamenti. La mitomicina-C, quindi, va a inibire la proliferazione cellulare e diminuire la fibrosi a livello della ferita. Quando applicata per via topica, non comporta effetti collaterali gravi (Mandour et al., 2021). Nonostante ciò, sono stati segnalati casi di ipopigmentazione e dolore post trattamento (Betarbet et al., 2020).

3.1.4 Gel di silicone

I gel di silicone sono stati sviluppati come alternativa ai rivestimenti di silicone, particolarmente utili nelle aree dove l'applicazione dei cerotti risulta essere complicata o indesiderata. Numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia dei gel di silicone nel trattamento delle cicatrici ipertrofiche e dei cheloidi (Frech et al., 2023). Questi gel mimano le proprietà occlusive dello strato corneo integro per ristabilire la normale idratazione nella zona della ferita, prevenendo un aumento della regolazione delle citochine infiammatorie e un aumento della sintesi e deposizione di collagene. Possono ridurre al minimo la formazione di cicatrici distribuendo uniformemente la tensione, riducendo così le forze meccaniche concentrate su punti specifici, che porterebbero altrimenti alla formazione di cicatrici più evidenti (Nguyen et al., 2023).

Recentemente sono stati introdotti sul mercato diversi prodotti a base di gel di silicone, alcuni di questi sono modificati e combinati con acido ipocloroso (Celacyn; Sonoma Pharmaceuticals, Woodstock, GA, USA), risultando efficaci, ben tollerati e sicuri per il trattamento delle cicatrici anormali. L'acido ipocloroso, infatti, agisce come agente antinfiammatorio, antimicrobico e antipruriginoso, svolgendo un ruolo fondamentale nel processo di guarigione della ferita (Frech et al., 2023). In commercio, inoltre, sono disponibili gel di silicone contenenti estratti di cipolla. La quercetina ricavata dalla cipolla, infatti, sembra ridurre l'attività dei fibroblasti e la sintesi di collagene oltre che modulare la produzione di tessuto cicatriziale (De Decker et al., 2022). I principali effetti collaterali associati a questo trattamento sono reazioni della pelle come prurito, infezioni superficiali della pelle, dermatiti e iperpigmentazione. Quando utilizzati in combinazione con estratti di cipolla si

possono formare delle pustole, risolvibili con una cura antibiotica (Nguyen et al., 2023).

3.1.5 Verapamil

Il verapamil è un calcio-antagonista diidropiridinico impiegato nel trattamento dell'ipertensione, dell'angina instabile e della tachicardia sopraventricolare (Frech et al., 2023). La sua somministrazione per via iniettiva stimola la produzione di collagenasi nel tessuto interessato, favorendo la degradazione del collagene. Oltre a ciò, il verapamil presenta diverse proprietà benefiche, in quanto inibisce la migrazione e la proliferazione dei fibroblasti, ne promuove l'apoptosi e riduce la produzione di IL-6 e di vari fattori di crescita sovra-espressi nelle cicatrici anormali. Inoltre, inibisce la sintesi di diverse sostanze coinvolte nella formazione della ECM. L'insieme di questi meccanismi contribuisce alla riduzione delle dimensioni della cicatrice (Klomprens et al., 2022).

L'utilizzo di verapamil per il trattamento di cicatrici anormali è vantaggioso poiché non presenta gli effetti collaterali associati all'uso del TAC (Zhang et al., 2023). Tuttavia, vi sono studi in letteratura che non mostrano alcuna efficacia del verapamil nel trattamento delle cicatrici ipertrofiche. La presenza di dati contraddittori, pertanto, sottolinea la necessità di ulteriori ricerche (Kim et al., 2021).

3.1.6 Tossina botulinica di tipo A

La tossina botulinica di tipo A (BoNT-A) è un'esotossina prodotta dal batterio *Clostridium botulinum*. La BoNT-A ha la capacità di inibire la crescita dei fibroblasti e il processo di cicatrizzazione attraverso la riduzione della produzione di collagene. Inoltre, può prevenire la contrazione muscolare nelle vicinanze della cicatrice, contribuendo a ridurre la tensione durante il processo di guarigione della ferita (Elsaie et al., 2021). La BoNT-A blocca i fibroblasti in una fase non proliferativa, lo stadio G0 o G1, diminuendo così l'espressione di TGF- β 1 e riducendo la tensione ai lembi della ferita, inibendo la formazione della cicatrice (Yang et al., 2021).

Studi hanno dimostrato che l'utilizzo combinato di BoNT-A e corticosteroidi produce risultati più rapidi ed efficaci rispetto alla somministrazione separata delle due

terapie. Inoltre, questa combinazione permette anche di ridurre gli effetti collaterali associati ai corticosteroidi (Liu et al., 2021).

Pertanto, la BoNT-A si è dimostrata un metodo promettente per il trattamento di cicatrici ipertrofiche e cheloidi. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi su larga scala per determinare l'efficacia effettiva della monoterapia o della terapia combinata, oltre a identificare il metodo di iniezione più appropriato, la dose e i tempi di somministrazione (Frech et al., 2023).

3.2 Trattamenti non farmacologici

3.2.1 Laser

Laser è l'acronimo di *light amplification by stimulated emission of radiation*. Il trattamento laser per le cicatrici anormali è una procedura medica che utilizza la luce laser per migliorare l'aspetto delle cicatrici e ridurre i sintomi associati. Una caratteristica distintiva del laser è la capacità di colpire l'area danneggiata senza andare a compromettere i tessuti circostanti, questo fenomeno è noto come fototermolisi selettiva. La fototermolisi selettiva è il principio per cui l'energia laser viene mirata e assorbita selettivamente da specifiche strutture o cromofori (come melanina, emoglobina o acqua) nella pelle, causando danni termici controllati a queste strutture senza danneggiare i tessuti circostanti (Elsaie et al., 2021).

Il *dye* laser pulsato (PDL) emette una luce assorbita selettivamente dall'ossiemoglobina, permettendo così una fototermolisi selettiva del tessuto vascolare danneggiato. Per questo motivo, il PDL viene utilizzato come terapia di prima linea per problemi cutanei (Figura 5) (Frech et al., 2023). Riduce l'eritema e il prurito della cicatrice perché, raggiungendo la regione angiogenica grazie alla sua lunghezza d'onda (585-595nm), il calore permette di ridurre il flusso sanguigno e, di conseguenza, l'infiammazione (Ogawa et al., 2022).

I laser frazionati ablativi, noti come *erbium-doped yttrium aluminium garnet* e CO₂ laser, sono stati presi in considerazione per il trattamento delle cicatrici anormali. Questa tipologia di laser esercita il suo effetto prendendo come target le molecole d'acqua all'interno del tessuto cutaneo e promuovendo la distruzione dell'ambiente locale. Il trattamento con laser CO₂ frazionati favorisce la sostituzione del collagene

irregolare con nuovo collagene organizzato e riduce l'espressione di TGF- β 1. È stato dimostrato che il trattamento laser migliora l'aspetto, lo spessore e la superficie della cicatrice (Frech et al., 2023).

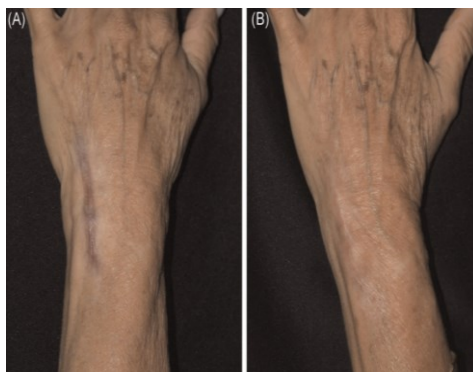


Figura 5 - Cicatrice ipertrofica pretrattamento (sinistra) e a seguito di trattamento con dye laser pulsati (destra) (Gianasio et al., 2021).

3.2.2 Crioterapia

La crioterapia è stata introdotta all'inizio degli anni '90 come un potenziale approccio terapeutico sicuro per la cura di cicatrici ipertrofiche e cheloidi. Esistono diversi metodi di applicazione, tra cui l'uso di spray, di un *probe* a contatto, che viene posto a contatto con la zona da trattare, o di un *probe* intra-lesionale, che viene inserito all'interno della lesione per agire in profondità (Frech et al., 2023). Questa tecnica utilizza azoto liquido per abbassare la temperatura all'interno dell'area cicatriziale. Un ago collegato a una bombola di azoto liquido viene applicato direttamente sulla cicatrice. I benefici includono una riduzione del volume della cicatrice del 51,4% dopo una sola seduta, riducendo così la necessità di ulteriori trattamenti (Barone et al., 2021). I principali effetti collaterali, invece, sono dolore, ipopigmentazione, depigmentazione, il possibile sviluppo di infezioni e la formazione di vesciche (Frech et al., 2023).

3.2.3 Chirurgia

Il paziente viene sottoposto a intervento chirurgico quando la cicatrice è altamente invalidante o quando le terapie meno invasive non riportano dei risultati risolutivi. Tuttavia, lo svantaggio principale dell'incisione chirurgica è la possibilità di recidiva in oltre il 50% dei casi (Elsaie et al., 2021). La combinazione dell'intervento

chirurgico con altre terapie, come l'iniezione intra-lesione di corticosteroidi o 5-FU, la crioterapia o la radioterapia, può ridurre significativamente la probabilità di recidiva fino all'8,6% (Barone et al., 2021; Kim et al., 2021).

3.2.4 Radioterapia

La radioterapia rappresenta un trattamento che può essere somministrato attraverso radiazioni esterne, radiazioni interne o cerotti cutanei radioattivi. Tuttavia, in aree sensibili come la testa, il collo e in pazienti inferiori ai 18 anni, è necessario procedere con cautela a causa dell'aumentato rischio di cancerogenesi. Questa terapia possiede proprietà anti-angiogeniche e antinfiammatorie, contribuendo a ridurre l'attività dei fibroblasti (Barone et al., 2021). Attualmente, esistono tre modalità principali di radiazione: la radioterapia con fasci di elettroni, la terapia a raggi X e la brachiterapia. La radioterapia con fasci di elettroni impiega un acceleratore lineare per erogare fasci di fotoni ad alta energia alle strutture superficiali, minimizzando la dose al tessuto sottostante. Questa modalità presenta il vantaggio del trattamento di aree estese e dell'erogazione uniforme della dose. La brachiterapia, invece, utilizza sorgenti radioattive per emettere raggi gamma verso i tessuti bersaglio. Può essere classificata come interstiziale o di superficie, a seconda della posizione della sorgente, se situata all'interno o sopra la ferita (Frech et al., 2023).

3.2.5 Microneedles

I *microneedles*, o microaghi (MN), costituiscono un approccio efficace e innovativo nel trattamento delle cicatrici anormali, consentendo la formazione di microfori nella cute danneggiata per favorire la deposizione di nuovo collagene e la guarigione della ferita (Figura 6). Esistono diversi dispositivi in commercio come Dermaroller® (Dermaroller GmbH); Dermapen™ (Equipmed) e Derma-Stamps™ (Dermaroller) che impiegano MN di silicone, titanio o polimeri (Elsaie et al., 2021). Rispetto ai metodi convenzionali, offrono notevoli vantaggi nella somministrazione di farmaci, migliorando l'efficacia rispetto ad altri approcci transdermici (Mbituyimana et al., 2023; Peng et al., 2023). Grazie alla loro struttura, i MN sono in grado di influenzare le proprietà meccaniche della pelle in due modi: (i) mediante stimoli meccanici

durante l'inserimento, che promuovono il deposito e la riorganizzazione del collagene; e (ii) attraverso una variazione dello stress nella zona trattata, portando a benefici nella riduzione delle cicatrici. Le interazioni meccaniche sono un approccio efficiente per diminuire lo stress meccanico in modo da inibire l'attivazione dei fibroblasti e diminuire l'espressione delle citochine (Lyu et al., 2023).

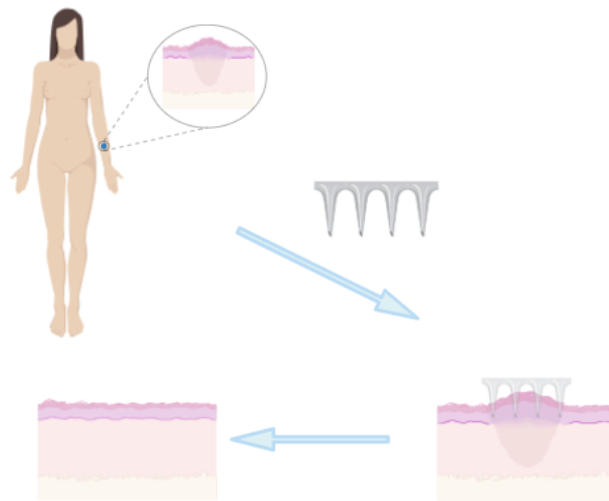


Figura 6 – Illustrazione schematica dell'applicazione di MN per il trattamento di una cicatrice anormale (BioRender.com).

Zhang et al., hanno dimostrato che i MN sono in grado di influenzare la biomeccanica e la struttura del tessuto attraverso la penetrazione nel derma, la creazione di microfori e l'interazione meccanica locale. Essi hanno condotto dei test *in vivo* utilizzando dei modelli di cicatrici ipertrofiche di ratti. Dopo 60 giorni di trattamento, i MN avevano significativamente migliorato l'aspetto della cicatrice riducendone lo spessore, la durezza e la resistenza alla trazione. L'analisi istologica ha rivelato una riduzione della concentrazione di collagene e una riduzione dell'espressione di TGF- β 1 e α -SMA. Attraverso un test *in vitro* con un modello di fibroblasti e collagene, hanno dimostrato che i MN possono interrompere le comunicazioni meccaniche nel tessuto cicatriziale, con conseguente riduzione dello stress che porta a una riduzione della cicatrice (Zhang et al., 2022).

Oltre all'utilizzo di MN non caricati con farmaci, è possibile utilizzare MN solubili caricati con agenti terapeutici. Yang et al., ad esempio, hanno proposto l'utilizzo di MN solubili caricati con TAC e 5-FU per il trattamento di cicatrici anormali. Studi istologici hanno permesso di osservare una diminuzione dello spessore

dell'epidermide e del derma e un ritorno alla normale regolazione dei fibroblasti. Le fibre di collagene, ridotte in termini di densità e disposte in modo più regolare, hanno indicato una soppressione della proliferazione anormale dei fibroblasti e della deposizione di collagene (Lyu et al., 2023; Yang et al., 2021).

4. MICRONEEDLES

I *microneedles*, o microaghi (MN), sono aghi di dimensioni micrometriche generalmente di lunghezza tra i 25 e i 2500 μm , larghezza tra i 20 e i 250 μm e un diametro della punta tra 1 e 25 μm che possono essere utilizzati come singoli aghi o raggruppati su una base solida, chiamata *patch* (Alimardani et al., 2021; Le et al., 2023).

I MN creano un'interruzione fisica nello strato corneo dell'epidermide con la formazione di microcanali che permettono di migliorare la permeabilità cutanea e il rilascio del farmaco attraverso la cute. Essi penetrano solo gli strati superficiali della cute, evitando le terminazioni nervose profonde, riducendo così significativamente il dolore, il sanguinamento e possibili infezioni, rispetto alle iniezioni convenzionali (Shriky et al., 2023).

Questi dispositivi nascono per superare alcune delle principali limitazioni associate alla somministrazione tradizionale di farmaci, offrendo i vantaggi della somministrazione transdermica e superandone i limiti. Donnelly et al. sostiene che il 30% della letteratura scientifica più recente sulla "tecnologia di somministrazione transdermica" riguarda studi sui MN (Donnelly et al., 2015).

Questi dispositivi in quanto progettati per una via di somministrazione transdermica, offrono il vantaggio di evitare il metabolismo epatico di primo passaggio. Inoltre, eliminando il dolore associato alle iniezioni endovenose, sono considerati la scelta migliore per i pazienti che soffrono di tripanofobia, la paura degli aghi. Un ulteriore vantaggio è che l'applicazione di questi *patch* non richiede personale addestrato, facilitandone così l'uso e riducendo il rischio di trasmissione di infezioni (Figura 7). Gli svantaggi associati ai MN riguardano la necessità di un'applicazione prolungata e di numerosi *patch* per il trattamento di aree estese (Aldawood et al., 2021).

Uno degli aspetti fondamentali da considerare per garantire la sicurezza dei MN nell'uso clinico è la biocompatibilità; una volta applicati non devono comportare effetti indesiderati a livello locale o sistemico (Dabholkar et al., 2021). A tal fine, vengono condotti vari studi per valutarne la biocompatibilità attraverso prove di contatto che durano da 24 a oltre 30 ore. Inoltre, vengono eseguiti test per valutare la citotossicità, l'irritazione, la reattività intracutanea e la genotossicità. L'utilizzo di materiali biodegradabili nella produzione di MN è preferibile, poiché questi materiali possono essere degradati ed eliminati in modo sicuro dall'organismo (Avcil et al., 2021).

Nel corso degli anni, si è assistito a un passaggio dall'utilizzo di aghi di grosse dimensioni al concetto attuale di microaghi. Nel 1921, Chambers ha introdotto per la prima volta l'utilizzo dei MN in letteratura, impiegandoli per l'iniezione intranucleare di un uovo (Chambers et al., 1921; Aldawood et al., 2021). I MN vengono per la prima volta pensati come dispositivi per la veicolazione di farmaci per via transdermica negli anni '70; nel 1979, è stato approvato il primo sistema transdermico contenente scopolamina per il trattamento della cinetosi, segnando un momento cruciale nella somministrazione per via transdermica di farmaci come alternativa alla somministrazione per via parenterale e orale (Sirbubalo et al., 2021). Nel 1998, Henry utilizzò per la prima volta i MN per l'applicazione transdermica di calcaina, aumentandone la permeabilità di quattro ordini di grandezza rispetto all'applicazione tramite crema (Henry et al., 1998; Peng et al., 2023). Il 2004 ha visto l'impiego per la prima volta dei MN nella somministrazione transdermica di farmaci. Da allora, il numero di studi sperimentali su tali sistemi è cresciuto in modo significativo, portando a considerevoli progressi nelle tecniche di fabbricazione e nella valutazione dei MN per l'utilizzo clinico (Avcil et al., 2021). Nel 2008, Wermeling ha condotto i primi studi clinici sull'uomo, dimostrando la possibilità della somministrazione di molecole idrofiliche tramite MN (Wermeling et al., 2008). Da allora, i ricercatori hanno ampliato il campo di applicazione ad altre vie di somministrazione dei MN oltre quella cutanea, tra cui quella orale, buccale, intramiocardica e oculare (Le et al., 2023).

La *Food and Drug Administration*, FDA, suddivide i MN in due categorie: dispositivi medici e prodotti non considerati dispositivi. Ai sensi della sezione 201(h) del

Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FDC Act), un dispositivo medico è definito come “qualsiasi strumento, macchina, congegno, impianto, reagente *in vitro*, destinato a trattare, curare, prevenire e diagnosticare malattie”. Pertanto, i MN considerati dispositivi medici devono sottostare a questa regolamentazione. Un'altra possibile categoria di MN include quelli destinati a migliorare l'aspetto di cicatrici da acne, rughe e cicatrici anormali. Questi prodotti vengono esaminati da FDA, che valuta la sicurezza e l'efficacia per l'uso come *DeNovos* (nuovi dispositivi medici) seguendo la procedura 510(k) (Kulkarni et al., 2023).

Il 27 giugno 2018, l'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA), in accordo con FDA, ha pubblicato un *Notification Detail* (European Commission (europa.eu)) che classifica il dispositivo di *microneedling* per uso estetico come dispositivi medici di classe II (controlli speciali). I dispositivi medici di classe II e i relativi controlli sono descritti nel Nuovo Regolamento (UE) 2017/745 del Parlamento europeo e del Consiglio del 5 aprile 2017, in vigore dal 26 maggio 2021.

4.1 Applicazioni dei MN

L'applicazione dei MN in ambito medico può essere suddivisa in due categorie: terapia, in quanto possono essere utilizzati per la veicolazione transdermica di farmaci; e diagnosi, in quanto i MN possono essere utilizzati per l'estrazione e l'analisi del fluido interstiziale (ISF) e del sangue (Figura 7) (J. Xu et al., 2021).

I MN si sono rivelati efficaci nella somministrazione di agenti chemioterapici. I farmaci possono essere incorporati direttamente nella matrice dei MN oppure incapsulati in nanoparticelle, consentendo una penetrazione mirata nei tessuti interessati. Rispetto all'iniezione tradizionale, l'uso di MN carichi con agenti chemioterapici può ridurre significativamente la perdita di peso corporeo dovuta alla tossicità durante la chemioterapia. Inoltre, i farmaci chemioterapici incapsulati in nanoparticelle hanno mostrato una maggiore internalizzazione cellulare e un'efficacia antitumorale superiore dopo una somministrazione localizzata attraverso MN (Le et al., 2023).

I MN solubili rappresentano la principale tipologia utilizzata per la veicolazione di vaccini, sostituendo l'iniezione ipodermica tradizionale. In particolare, questi

vengono impiegati per la somministrazione di vaccini contro malaria, difterite, influenza, epatite B, HIV e poliomielite (Aldawood et al., 2021).

I MN, inoltre, si sono rivelati efficaci nel trattamento di infiammazioni cutanee, come la psoriasi. L'applicazione di questi dispositivi contenenti metotressato, ad esempio, ha dimostrato una maggiore efficacia rispetto alla somministrazione orale a parità di dosaggio. Inoltre, l'uso di MN consente di ridurre la tossicità gastrointestinale associata al trattamento (Le et al., 2023).

La diagnosi di patologie e il monitoraggio dell'efficacia terapeutica possono essere effettuati prelevando campioni corporei ed eseguendo saggi specifici. I MN cavi offrono la possibilità di diagnosticare diverse malattie, tra cui cancro, diabete e Alzheimer (Aldawood et al., 2021). Infatti, possono essere impiegati per estrarre ISF e sangue, consentendo il monitoraggio delle condizioni di salute dell'individuo. L'ISF può essere utilizzato per rivelare biomarcatori e farmaci, rappresentando una valida alternativa al prelievo del sangue classico. Inoltre, l'estrazione di ISF evita la presenza di globuli rossi e piastrine, che possono interferire con i metodi analitici (Cárcamo-Martínez et al., 2021).

I MN sono ampiamente utilizzati per la somministrazione di proteine, antigeni, anticorpi, lisozimi ed enzimi. L'uso di MN per la somministrazione di insulina è stato proposto come metodo non invasivo, indolore e semplice per monitorare la concentrazione di glucosio nei pazienti diabetici (Alimardani et al., 2021). Per questi pazienti, infatti, si è resa urgente la necessità di sviluppare sistemi innovativi di somministrazione di farmaci, in grado di rilasciare il medicinale in risposta a stimoli endogeni o esogeni, evitando gli effetti indesiderati delle iniezioni sottocutanee di insulina. Gli stimoli endogeni associati alla progressione del diabete diventano quindi il target per lo sviluppo di MN *stimuli-responsive*. Sono stati sviluppati MN in grado di controllare i livelli di glucosio *in vivo*. Per il trattamento del diabete mellito, sono stati prodotti MN con buona biocompatibilità, capaci di rilasciare rapidamente il farmaco in presenza di alti livelli di glucosio, mimando così l'azione delle cellule β per ripristinare i normali livelli di glucosio (Le et al., 2023).

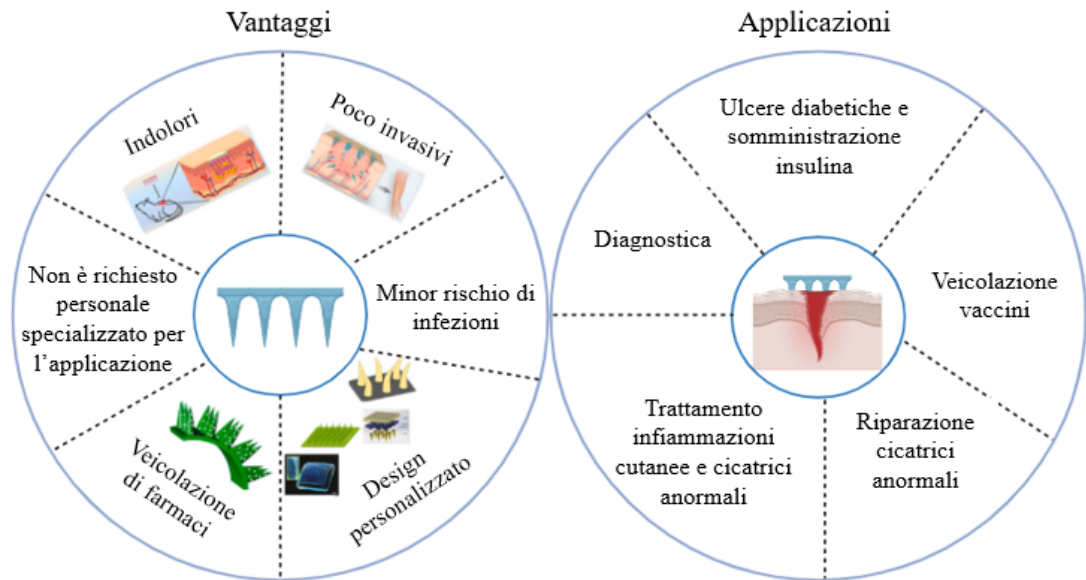


Figura 7 - Vantaggi e possibili applicazioni dei MN (BioRender.com).

4.2 Caratteristiche dei MN

Una progettazione ottimale dei MN è necessaria per garantire la loro efficacia in seguito all'applicazione. Per ottenere questo è necessario prendere in considerazione i seguenti fattori: la geometria dei MN, il diametro e l'affiltezza della punta, la lunghezza, la densità e la distanza tra due punte.

4.2.1 Geometria dei MN

La geometria dei MN, che include lo spazio tra gli aghi, la forma e il diametro dell'ago, sia alla punta che alla base, deve essere attentamente valutata perché influenza la forza meccanica, l'efficienza di penetrazione e la *compliance* del paziente (Mansoor et al., 2022). Tipicamente, i MN presentano una forma conica o piramidale, con proporzioni 1:1 o 1:3 larghezza-altezza (Choi et al., 2021). Studi indicano che l'aumento del numero di spigoli di ogni ago, che può essere esagonale, quadrato, cilindrico, conico o triangolare, porta a un miglioramento delle sue proprietà meccaniche (Figura 8). Tuttavia, un aumento degli spigoli riduce la capacità di penetrazione del MN nella pelle. Di conseguenza, si ritiene che i MN quadrati e triangolari siano più efficaci nella penetrazione cutanea rispetto a quelli esagonali (Makvandi et al., 2021).

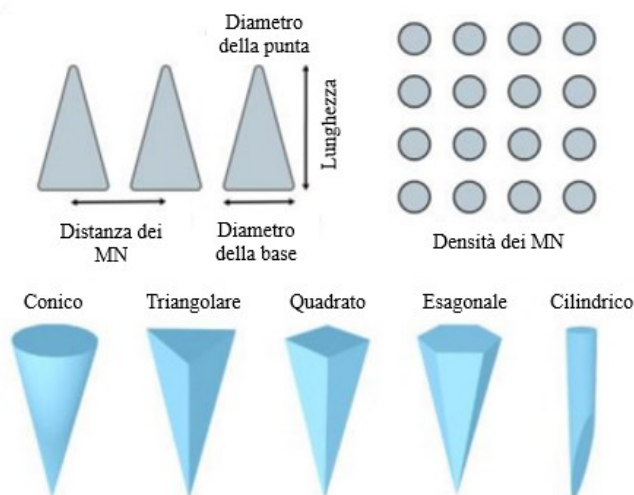


Figura 8 - Geometria dei MN (Le et al., 2023).

4.2.2 Diametro e affilatezza della punta

Il diametro della punta influenza l'area di contatto tra il MN e la pelle e, di conseguenza, la forza di inserzione (Xiu et al., 2022). MN smussati, con un diametro della punta compreso tra 60 μm e 160 μm , richiedono una notevole forza di inserzione, variabile tra 0,08 N e 3,04 N, per essere controllati durante l'applicazione. È stato dimostrato che i MN con un diametro della punta inferiore a 15 μm penetrano la pelle con maggiore facilità rispetto a quelli con un diametro maggiore (Avcil et al., 2021). Römgens capì che l'affilatezza delle punte e la forza di inserzione seguono una relazione lineare con il raggio della punta (r) (Xiu et al., 2022). Quando il MN comprime la superficie cutanea, questa si deforma, generando stress nell'area a contatto con la punta degli aghi. Le dimensioni del foro circolare nella cute corrispondono alla circonferenza della punta, che a sua volta è proporzionale a r . Inoltre, il tessuto circostante la punta dell'ago genera una forza elastica proporzionale al volume di deformazione, che a sua volta è proporzionale a r^2 . Nel caso in cui le punte abbiano un diametro piccolo, la deformazione della pelle è minima, con la pressione superficiale che prevale; al contrario, nel caso di punte con diametro maggiore prevale la forza elastica nel tessuto circostante, rendendo più difficile l'inserzione del MN nella cute (Figura 9) (Xiu et al., 2022).

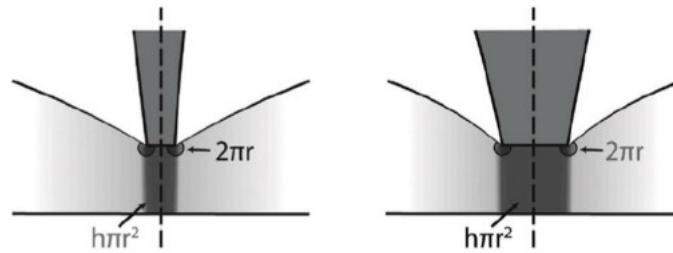


Figura 9 - Diagramma schematico della relazione tra forza di inserzione e diametro della punta (Xiu et al., 2022).

4.2.3 Lunghezza

La lunghezza dei MN dovrebbe essere adattata ad ogni agente terapeutico. Nel caso di farmaci ad alta diffusione, si possono utilizzare MN più corti. Tuttavia, se la velocità di somministrazione è l'obiettivo principale della terapia, è preferibile utilizzare MN più lunghi per raggiungere il derma, dove sono localizzati i vasi sanguigni (Mansoor et al., 2022). La profondità di penetrazione dei MN dovrebbe superare i 150 μm per raggiungere l'epidermide o il derma (Le et al., 2023). Tuttavia, è importante considerare che lo strato corneo ha uno spessore pari a 10-20 μm , quindi MN troppo corti non lo possono attraversare, mentre MN troppo lunghi aumentano il rischio di contatto con i nervi, causando dolore, o con i capillari, causando sanguinamento. Questo può ridurre la *compliance* da parte del paziente (Xiu et al., 2022).

4.2.4 Densità e distanza dei MN

La distanza tra gli aghi incide sulla forza di inserzione di un singolo ago, influenzando la penetrazione dell'intero *patch* (Xiu et al., 2022). Un elevato numero di pori si ottiene utilizzando MN con un'elevata densità di aghi, più di 500 aghi/ cm^2 . All'aumentare della densità e del numero di aghi, è richiesta una maggiore forza per l'applicazione dei MN sulla pelle. Ciò si traduce in una sensazione più intensa da parte del paziente e richiede l'utilizzo di dispositivi per l'applicazione più grandi e robusti (Avcil et al., 2021). L'inserzione del MN è inibita dall'effetto "letto di chiodi"; secondo questo effetto, se la distanza tra gli aghi è troppo ridotta, la pelle non può essere perforata poiché la forza richiesta per l'inserzione dev'essere distribuita su tutti gli aghi. Di conseguenza, è necessaria una maggiore pressione per

l'inserzione (Xiu et al., 2022). Questo effetto può essere annullato andando ad applicare MN di lunghezze differenti con un unico *patch* (Mansoor et al., 2022).

5. TIPOLOGIE DI MICRONEEDLES

I MN possono essere classificati a seconda della loro struttura, del metodo di fabbricazione, dei materiali utilizzati, della forma e dell'approccio impiegato per la veicolazione del farmaco (Avcil et al., 2021).

Per la veicolazione dei farmaci, infatti, sono stati proposti inizialmente i seguenti approcci (Figura 10) (Alimardani et al., 2021):

- La strategia “*poke and patch*” è utilizzata per produrre i MN solidi. Prevede l'applicazione di numerosi MN per creare fori nella pelle come pretrattamento, seguita dall'applicazione di una formulazione farmaceutica a livello topico;
- La strategia “*poke and flow*” è sfruttata per la produzione di MN cavi. Prevede la presenza di una cavità nella struttura del MN per consentire il flusso del farmaco attraverso la pelle;
- La strategia “*coat and poke*” si utilizza per la produzione di MN rivestiti. Questa strategia comporta il rivestimento della superficie del MN con una soluzione acquosa di farmaco, che si dissolve nel tessuto cutaneo depositando il principio attivo;
- La strategia “*poke and dissolve*” è utilizzata per la produzione di MN solubili. Essa include l'utilizzo di agenti solubili in ambiente acquoso o biodegradabili, dove i MN si dissolvono rilasciando l'agente terapeutico incapsulato;
- La strategia “*poke and release*” è, anch'essa, sfruttata per i MN solubili. Consiste nell'applicazione di MN solubili in ambienti acquosi, dove gli agenti terapeutici incapsulati vengono rilasciati lentamente mentre il *patch* rimane applicato sulla pelle.

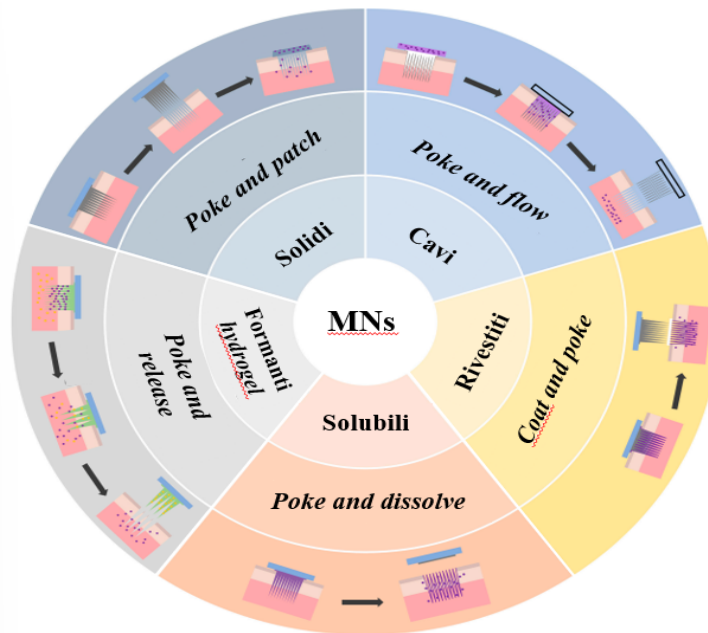


Figura 10 - Classificazione dei MN (Wang et al., 2023).

5.1 MN solidi

I MN solidi sono *patch* costituiti da aghi composti da un singolo materiale, non contengono farmaci o eccipienti. I MN solidi perforano lo strato corneo e vengono rimossi pochi minuti dopo l'applicazione (Figura 11). Successivamente vengono applicate forme farmaceutiche convenzionali, come creme, lozioni, gel o *patch* (Aldawood et al., 2021). Ciò facilita il superamento dello strato corneo alla formulazione e la penetrazione nell'epidermide o nel derma, migliorando così la biodisponibilità del farmaco tramite la via transdermica (Gowda et al., 2022).

I MN solidi devono presentare buone proprietà meccaniche, al fine di evitare la rottura degli aghi durante l'applicazione transdermica; in questo caso, il corpo dell'ago potrà rimanere intrappolato nella pelle, con potenziali rischi per la salute del paziente (Wang et al., 2023).

I MN solidi possono essere utilizzati per la somministrazione di peptidi, proteine, ormoni di crescita, insulina, e forme farmaceutiche semisolidi. Inoltre, possono rilevare *biomarkers* nel monitoraggio di ferite grazie al rivestimento degli aghi con particolari molecole come lattosio e glucosio (Tabella I) (Kulkarni et al., 2023).

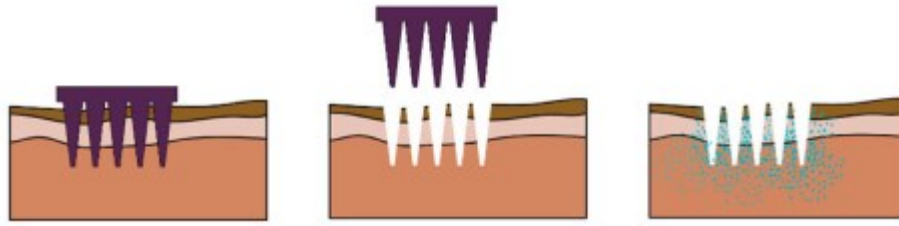


Figura 11 - Illustrazione MN solidi (Sonetha et al., 2022).

5.2 MN cavi

I MN cavi sono costituiti da un nucleo cavo, vuoto, nel quale viene iniettato il farmaco (Figura 12). Questa configurazione consente un controllo più preciso nel tempo del rilascio del farmaco attraverso la diffusione passiva (Tabella I) (Aldawood et al., 2021).

I MN cavi possono dispensare una quantità maggiore di farmaci rispetto ai MN solidi, rivestiti e solubili. Possono essere realizzati con diversi materiali, tra cui metalli, vetro, polimeri e ceramiche. Grazie alla loro punta affilata e alla struttura cava vengono utilizzati anche per il prelievo di sangue e di fluido corporeo. Tuttavia, questa tipologia di MN richiede una resistenza meccanica maggiore e una tecnologia di produzione più avanzata (Wang et al., 2023). Per riuscire a produrre questa tipologia di MN sono necessari metodi di fabbricazione specifici, come la litografia, la stampa 3D e il sistema microelettromeccanico (MEMS) (Cárcamo-Martínez et al., 2021).

Analogamente agli aghi ipodermici, i MN cavi vengono progettati per consentire la modulazione della portata e della pressione. I parametri di processo quali il rapporto tra altezza e diametro della base dell'ago può essere controllato al fine di ottenere un rilascio rapido, un'infusione lenta e una velocità di erogazione del farmaco variabile nel tempo. Nel corso degli anni i MN cavi hanno trovato notevole impiego per la veicolazione di vaccini (Tabella I) (Aldawood et al., 2021).

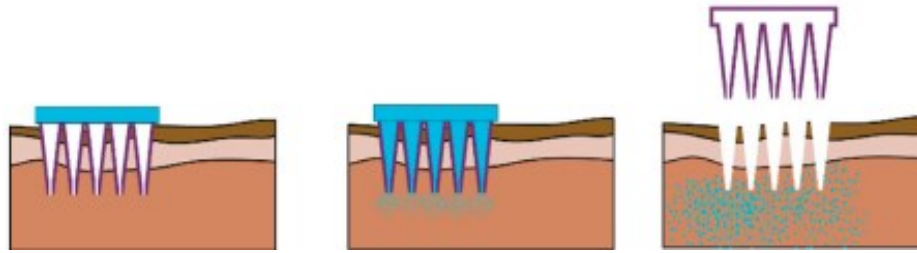


Figura 12 - Illustrazione MN cavi (Sonetha et al., 2022).

5.3 MN rivestiti

I MN rivestiti presentano la superficie rivestita da una matrice solubile in acqua in modo che il farmaco riesca a dissolvere facilmente in seguito all'inserzione nella pelle (Figura 13). La miscela di rivestimento forma un film sulla superficie del MN utile a mantenere l'adesione alla pelle durante l'inserzione, per fare questo la formulazione di rivestimento deve avere un'adeguata viscosità (Jung et al., 2021).

Vengono utilizzati meno rispetto alle tipologie elencate precedentemente, in quanto offrono una superficie inferiore per l'assorbimento del farmaco (Menon et al., 2021).

Uno dei parametri da tenere in considerazione per la produzione di questi MN è il rivestimento omogeneo della superficie del MN e il rilascio controllato e preciso del farmaco, che dev'essere caratterizzato da una stabilità prolungata. Sono stati presi in considerazione diverse tecniche per il rivestimento dei MN, tra cui il *dip coating* e lo *spray coating*. Nello *spray coating*, le goccioline vanno a rivestire interamente la superficie degli aghi ed è un metodo più riproducibile su larga scala per la produzione dei MN rivestiti rispetto al *dip coating* (Damiri et al., 2022).

I MN rivestiti risultano particolarmente utili per la veicolazione di proteine e DNA in maniera non invasiva (Tabella I) (Aldawood et al., 2021).

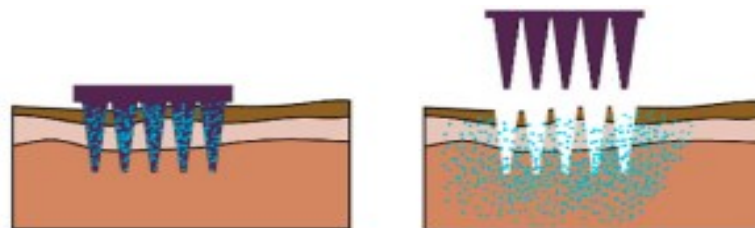


Figura 13 - Illustrazione MN rivestiti (Sonetha et al., 2022).

5.4 MN solubili

I MN solubili sono delle preparazioni uniche in cui il farmaco viene miscelato con il polimero (Figura 14). Dopo l'applicazione sulla pelle, il dispositivo non viene rimosso, consentendo il rilascio del farmaco, mentre il MN si degrada (Gorantla et al., 2021). Gli aspetti da tenere in considerazione per la fabbricazione di MN solubili sono la tipologia di polimero utilizzata, le caratteristiche farmacocinetiche, la capacità di caricamento del farmaco e la cinetica di rilascio (Kulkarni et al., 2023).

L'inserzione di MN solubili nella pelle non porta alla formazione di pori in quanto questi dissolvono rapidamente o si disintegrano a contatto con la pelle (Jung et al., 2021). Solitamente, sono costituiti da materiali biocompatibili e biodegradabili, come polimeri e zuccheri (Tabella I). Rispetto ai MN solidi e ai MN cavi, i metodi di fabbricazione sono più semplici, vengono prodotti principalmente mediante *micro-molding*. Inoltre, sono vantaggiosi perché la loro applicazione prevede un singolo passaggio (Menon et al., 2021).

Il rendimento dei MN è influenzato dalla loro natura igroscopica. Se i MN dissolvessero troppo velocemente, il corpo non riuscirebbe ad assorbire il farmaco. Al contrario, se si dissolvono troppo lentamente, potrebbero causare irritazione cutanea. Per questo motivo, gli scienziati stanno cercando di sviluppare MN in grado di dissolvere a una velocità ottimale (Kulkarni et al., 2023).

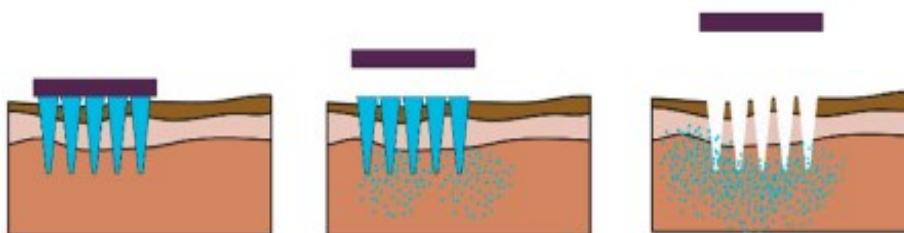


Figura 14 - Illustrazione MN solubili (Sonetha et al., 2022).

5.5 MN formanti-idrogel

I MN formanti-idrogel, una volta applicati sulla pelle, vengono idratati dal fluido interstiziale formando un idrogel (Shriky et al., 2023). L'idratazione provoca il rigonfiamento del polimero, creando microcanali contenenti l'idrogel che facilitano la diffusione del farmaco (Figura 15) (Li et al., 2023). La produzione di questi MN è

influenzata dal peso molecolare del polimero, dallo *swelling index* e dalla presenza di agenti schiumogeni (Damiri et al., 2022).

Questi MN rappresentano una scelta eccellente per la somministrazione prolungata di farmaci (Tabella I), da poche ore fino a giorni (Gowda et al., 2022).

I MN formanti-idrogel sono stati progettati per facilitare la chiusura di ferite mediante la loro capacità di rigonfiare durante l'inserimento proteggendo il tessuto da stress meccanici e promuovendo la guarigione della ferita. I materiali utilizzati per i MN formanti-idrogel sono biocompatibili, il che previene la comparsa di effetti collaterali dovuti a eventuali rotture del dispositivo. In caso di danni durante l'applicazione, eventuali perdite di materiale non causano effetti collaterali poiché il materiale viene degradato attraverso processi corporei naturali (Turner et al., 2021).

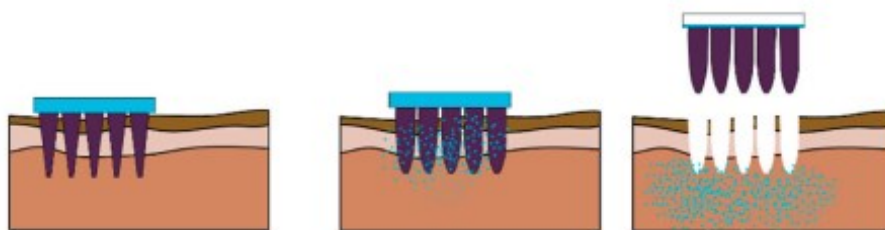


Figura 15 – Illustrazione MN formanti-idrogel (Sonetha et al., 2022).

5.6 MN Stimuli-responsive

I MN *stimuli-responsive* consentono il rilascio del farmaco solo in risposta a cambiamenti endogeni o esogeni (Tabella I). Vengono fabbricati utilizzando materiali polimerici capaci di rigonfiarsi, disintegrarsi o dissolversi solo in risposta a stimoli specifici. Gli stimoli endogeni possono essere variazioni di pH, di temperatura, la presenza di batteri, specie reattive dell'ossigeno, glucosio o insulina. Ad esempio, nelle ferite, la temperatura è più elevata rispetto alla temperatura della pelle integra; pertanto, se si sviluppano MN che rispondono alla temperatura, rileveranno la variazione di temperatura e inizieranno a rilasciare il farmaco nella zona interessata (Gowda et al., 2022). Tra gli stimoli esogeni, invece, è possibile applicare quando necessario forze meccaniche, luce, campo magnetico, corrente elettrica o calore. Tuttavia, nella maggior parte dei casi, per MN che rispondono a stimoli esogeni, è richiesto un dispositivo supplementare per innescare il rilascio del farmaco (Makvandi et al., 2021). Lee et al. propose dei MN *thermo-responsive* per il

monitoraggio del glucosio basandosi sul sudore. Nell'applicazione il dispositivo venne utilizzato su roditori diabetici, degli attuatori termici permettevano il rilascio transcutaneo di un farmaco utile a ridurre i livelli ematici di glucosio (Turner et al., 2021; Lee et al., 2017).

Tabella I - Vantaggi, svantaggi e applicazioni delle diverse tipologie di MN (modificata da Aldawood et al., 2021).

<i>Tipologia di MN</i>	<i>Vantaggi</i>	<i>Svantaggi</i>	<i>Applicazioni</i>
Solidi	Semplici da produrre.	Procedura di somministrazione a due step; non si possono somministrare dosaggi esatti di farmaco.	Veicolazione di insulina, vaccini, peptidi; monitoraggio dei livelli di glucosio e lattato; trattamento di cicatrici anormali.
Rivestiti	Forza meccanica adeguata dopo il rivestimento; possibilità di somministrare dosaggi precisi.	È necessario trovare un metodo di rivestimento appropriato, limitato a basse dosi di farmaco.	Veicolazione di vaccini, insulina, proteine, ormoni; prelievo di ISF e analisi di biomarcatori.
Cavi	Velocità di rilascio del farmaco controllabile; dosaggi del farmaco precisi.	Bassa forza meccanica.	Veicolazione di vaccini, insulina, DNA e RNA; estrazione di ISF e analisi di biomarcatori.
Solubili	Economici; dosaggi di farmaco precisi.	Durante la produzione è possibile perdere parte di farmaco; bassa forza meccanica; bassa capacità di penetrazione.	Veicolazione di vaccini, insulina, DNA e RNA; estrazione di ISF e analisi di biomarcatori; trattamento cicatrici anormali.
Formanti-idrogel	Biocompatibili; veicolazione prolungata di farmaci; degradazione del materiale attraverso processi corporei.	Bassa forza meccanica, bassa capacità di penetrazione e produzione influenzata da diversi fattori.	Veicolazione di vaccini, insulina, DNA e RNA; estrazione di ISF e analisi di biomarcatori; trattamento cicatrici anormali.
<i>Stimuli-responsive</i>	Consentono il rilascio del farmaco solo in seguito a stimoli.	Richiesti dispositivi per innescare il rilascio del farmaco.	Monitoraggio delle ferite; rilascio di glucosio.

6. METODI DI PRODUZIONE

6.1 Ablazione laser

L'ablazione laser è una tecnica avanzata utilizzata nella produzione di MN, rapida ed efficiente, che prevede l'utilizzo di un laser ad alta intensità per ablatare, nonché, eliminare, il materiale in eccesso da un substrato solido. Il processo prevede la messa a fuoco del raggio laser sulla superficie del substrato, tipicamente polimerica o metallica, e il movimento del raggio per creare il *pattern* desiderato di MN. Il processo di ablazione laser consente un'elevata precisione e personalizzazione della geometria dei MN, e può essere utilizzato per creare *array* di MN con forme e dimensioni variabili. La tecnica è anche in grado di creare MN con punte estremamente affilate, che possono facilitare la penetrazione cutanea. Fattori che possono limitare l'uso di questa tecnica sono il costo e la complessità del sistema laser richiesto (Aldawood et al., 2021; Kulkarni et al., 2023).

6.2 Insufflaggio di aria

Il principio del metodo di produzione dei MN per insufflaggio di aria (*blowing air*) è che le goccioline di polimero, formanti il MN, in seguito all'insufflaggio di aria solidificano. I principali passaggi della tecnica sono: i) disperdere le gocce di polimero su una piastra piana, posta inferiormente; ii) mettere a contatto le goccioline di polimero con un'altra piastra, posta superiormente; iii) controllare la lunghezza dei MN muovendo la piastra superiore verso l'alto; iv) insufflare aria permettendo alle goccioline di diventare appuntite e sottili; v) separare le due piastre in modo da formare due file di MN sopra entrambe (Figura 16) (Luo et al., 2023).

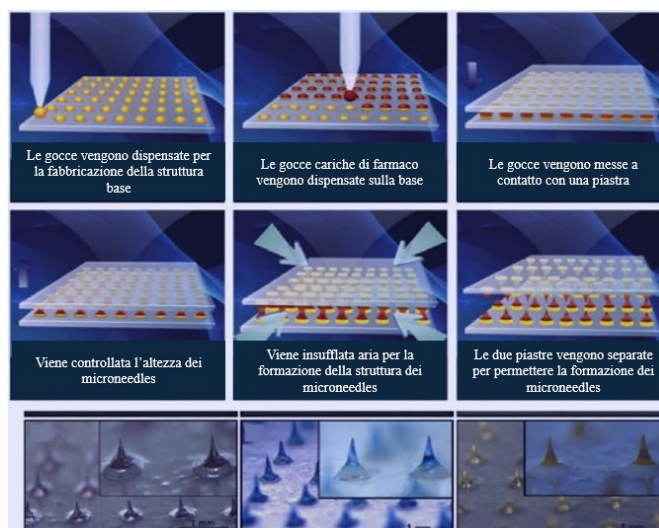


Figura 16 – Produzione dei MN attraverso l’insufflaggio di aria (Luo et al., 2023).

6.3 Litografia

La litografia è una tecnica che sfrutta le proprietà di trazione e allungamento di fluidi viscosi (Luo et al., 2023). In particolare, questa tecnica viene utilizzata per trasferire la forma geometrica desiderata su una superficie di substrato, consentendo l’ottenimento di strutture precise con pareti lisce e omogenee. Lo svantaggio principale di questa tecnica sono i lunghi tempi di produzione (Aldawood et al., 2021). La struttura dei MN si ottiene mettendo in contatto e allungando le gocce di materiale viscoso. Il processo prevede il rivestimento di un substrato con uno strato di materiale fotoresistente. Questo materiale viene esposto alla luce UV attraverso una maschera contenente il modello di MN desiderato. Le aree esposte vengono rimosse chimicamente, permettendo di ottenere il modello di MN sul substrato. Questo può essere poi rivestito con diversi materiali, tra cui metalli o polimeri, per creare il *patch* di MN finale (Kulkarni et al., 2023).

6.4 Micromolding

Il *micromolding* è il metodo più comunemente utilizzato per la produzione di MN. Per questo metodo è necessario disporre di uno stampo, generalmente in polidimetilsilossano (PDMS) con determinate specifiche. Il processo prevede di riempire lo stampo con il materiale utilizzato per la preparazione dei MN e

successivamente lasciarlo asciugare (J. Xu et al., 2021). L'uso di una forza esterna, come il vuoto o la centrifugazione, assicura che la soluzione riempia completamente lo stampo, determinando così la forma dei MN (Wang et al., 2023).

I vantaggi che contraddistinguono questa tecnica sono la semplicità del metodo, il basso costo e l'alta riproducibilità. Tuttavia, soluzioni ad alta viscosità producono bolle dopo il riempimento dello stampo, mentre soluzioni a bassa viscosità possono portare a MN fragili, con scarse proprietà fisiche. Lo svantaggio di questo metodo risiede nella tensione superficiale dei liquidi utilizzati per riempire lo stampo, la quale impedisce alla soluzione di riempire interamente le cavità dello stampo (Lyu et al., 2023).

6.5 Stampa 3D

La stampa tridimensionale, 3D, è una tecnica di produzione emergente basata su modelli 3D progettati al computer; utilizza un metodo di accumulo di materiale strato su strato (*layer-by-layer*). I vantaggi di questa tecnica sono l'alta accuratezza, precisione e flessibilità. Nel 2019 Johnson et al., fu il primo a produrre MN con la stampante 3D (Johnson & Procopio et al., 2019; Aldawood et al., 2021). Questo metodo permette di studiare la geometria dei MN desiderata attraverso un *software* che permette l'avvio della stampa. Questo consente una riduzione dei tempi e dei costi di produzione, ma anche un aumento della produttività (Luo et al., 2023).

Un altro vantaggio importante della stampa 3D nella produzione di MN è la possibilità di creare *patch* con aghi di lunghezze differenti, permettendo un elevato grado di personalizzazione e precisione sulla base del paziente (medicina di precisione) (Kulkarni et al., 2023).

7. MATERIALI

Le agenzie regolatorie, FDA ed EMA, hanno requisiti rigorosi per quanto concerne la sicurezza e l'efficacia dei dispositivi e prodotti medici. Quando vengono selezionati i materiali per la produzione di MN, è necessario garantire che biocompatibilità, sicurezza ed efficacia soddisfino questi requisiti clinici (Luo et al., 2023).

7.1 Ceramica

Le ceramiche vengono impiegate per la produzione di MN grazie alle loro importanti proprietà chimiche e la buona resistenza alla compressione. Per realizzare MN con questa tipologia di materiale si utilizza il metodo del *micromolding*, in cui lo stampo viene riempito con la miscela e successivamente segue uno step di essiccazione, durante il quale il solvente evapora, questo però potrebbe formare una superficie grezza, causando difetti nella struttura (Tabella II) (Aldawood et al., 2021). Inoltre, le ceramiche biocompatibili offrono una resistenza meccanica superiore e una maggiore stabilità ad alte temperature e a umidità rispetto alla maggior parte dei polimeri. Un ulteriore vantaggio è dato dalla capacità della superficie delle ceramiche di interagire attraverso forze elettrostatiche con le biomolecole, migliorando la capacità del MN di penetrare nella cute (Luo et al., 2023). In aggiunta, l'utilizzo di MN di ceramica permette una cinetica di rilascio del farmaco controllata dalla porosità del materiale stesso (Le et al., 2023).

L'allumina (Al_2O_3) è la più utilizzata tra le ceramiche grazie alla sua notevole resistenza chimica, forma degli ossidi stabili dovuti ai legami ad elevata energia tra gli atomi di Al e O e, inoltre, rimane inalterata a seguito di eventuali cambiamenti ambientali e possibile corrosione (Damiri et al., 2022).

7.2 Metalli

I metalli offrono numerosi vantaggi (Tabella II) per la produzione di MN, tra cui eccellenti proprietà fisiche e meccaniche, resistenza alla rottura, costo contenuto e biocompatibilità (Luo et al., 2023). L'acciaio inossidabile è stato il primo metallo impiegato per la fabbricazione di MN, seguito dal titanio. Il titanio viene molto utilizzato grazie alle sue proprietà, tra cui resistenza ad alte temperature, stabilità chimica, resistenza sia in ambiente basico che acido e bassa densità. Oltre a questi metalli, viene impiegato anche l'alluminio nella produzione di MN, che rappresenta il metallo più economico e offre vantaggi quali duttilità, leggerezza e resistenza alla corrosione (Luo et al., 2023). Tuttavia, nonostante la buona capacità di penetrare la pelle, l'uso di MN in metallo può causare reazioni allergiche (Aldawood et al., 2021).

7.3 Polimeri

I polimeri costituiscono una classe molto importante nell'ambito della produzione di MN. I materiali polimerici stanno attualmente ricevendo grande interesse grazie alla loro biocompatibilità, le eccellenti proprietà meccaniche, i bassi costi e la biodegradabilità. I polimeri vengono utilizzati principalmente per produrre MN solidi, solubili e formanti-idrogel (Tabella II) (Le et al., 2023). I polimeri possono essere classificati in polimeri naturali (come gelatina, destrano, acido ialuronico, chitosano, chitina e pullulano) e polimeri sintetici (come acido polilattico, idrossimetilcellulosa, HPMC, polistirolo e alcol polivinilico, PVA) (Figura 17). I polimeri naturali sono materiali ecosostenibili che possono essere utilizzati nella loro forma naturale o in seguito a modificazioni chimiche o fisiche e i relativi metaboliti non risultano essere tossici, ma vengono eliminati dall'organismo in modo sicuro. I polimeri sintetici, invece, vengono preparati attraverso processi chimici o biochimici (Kulkarni et al., 2023). Un importante vantaggio di questi materiali nell'ambito del rilascio di farmaci è la possibilità di modulare la cinetica di rilascio modificando la loro concentrazione, il peso molecolare, la densità di *cross-linking* e la carica totale. Inoltre, i polimeri possono essere combinati tra loro e con nanoparticelle, farmaci, sostanze chimiche e biologiche (Xue et al., 2024). Il metodo più utilizzato per la preparazione di MN polimerici è il *micromolding* (Jung et al., 2021).

Il pullulano è un polimero lineare idrofilo ottenuto dall'*Aureobasidium pullulans* e composto da residui di α -1,6-maltotrioso, data la presenza di gruppi ossidrilici risulta facile da derivatizzare. È caratterizzato dalla capacità di rigonfiare in acqua e da ottime proprietà meccaniche, per questo è fondamentale in ambito biomedico. Viene degradato dalle α -amilasi secrete dalle ghiandole salivari e dal pancreas. Come il chitosano, anche il pullulano è stato dichiarato GRAS (Dabholkar et al., 2021).

Il PVA è un materiale di notevole interesse per la produzione di MN, i quali hanno una capacità di penetrazione della pelle superiore rispetto ad altri materiali polimerici e sono vantaggiosi per la veicolazione di numerosi farmaci, tra cui vaccini, proteine e piccole molecole. Oltre a questo, risultano essere sicuri e ben tollerati dai pazienti (Kulkarni et al., 2023).

Tra i polimeri, si trovano i carboidrati che vengono comunemente utilizzati per produrre MN a basso costo (Damiri et al., 2022). Tra i carboidrati impiegati vi sono

zuccheri, quali l'acido ialuronico (HA), l'idrossipropilcellulosa (HPMC) e la carbossimetilcellulosa (CMC), utilizzabili sia singolarmente che in combinazione. Questi presentano una struttura simile alla ECM e vengono prontamente riconosciuti dal corpo umano (Bhadale et al., 2021). Rappresentano una buona alternativa agli altri materiali perché sono sicuri per il corpo umano (Damiri et al., 2022).

La cellulosa si ottiene principalmente dal legno, dal cotone e in misura minore da alghe e batteri, consiste di monomeri di glucosio uniti da legami β -1,4. Gli eteri della cellulosa si contraddistinguono per diverse proprietà come la solubilità, la viscosità, la tensione superficiale e la stabilità. La CMC, ad esempio, ha un'elevata solubilità in acqua e produce una soluzione chiara che permette di considerarla accettabile dal punto di vista farmaceutico. Gli esteri della cellulosa, invece, sono insolubili in acqua e rigonfiano formando un film. Esempi di esteri di cellulosa sono l'acetato di cellulosa e la nitrocellulosa (Dabholkar et al., 2021).

L'HPMC è un materiale che presenta numerosi vantaggi nella produzione di MN: la sua elevata forza meccanica consente di creare MN stabili e duraturi che non si rompono durante l'inserzione; la sua grande capacità di rigonfiamento migliora la permeazione attraverso la pelle; infine, essendo solubile in acqua, facilita la preparazione delle formulazioni utili per formare i MN (Kulkarni et al., 2023).

Il maltosio è lo zucchero più utilizzato per la produzione di MN, seguito da mannitolo, galattosio e xilitolo. In alcuni casi è bene combinare lo zucchero con altri polimeri in modo da migliorare la forza meccanica e la stabilità del MN. L'acido ialuronico è un glicosamminoglicano non solforato lineare formato da N-acetilglicosammina e acido D-glucuronico uniti da legami β -1,4 glicosidici, rappresenta uno dei costituenti della ECM e della cartilagine, con proprietà mucoadesive (Bhadale et al., 2021). Alte concentrazioni di HA e un elevato peso molecolare permettono di incrementare il *network* polimerico e, di conseguenza, la forza del MN. È un materiale particolarmente utile per la produzione di MN, inoltre, anche per la sua biocompatibilità e biodegradabilità (Dabholkar et al., 2021).

Il chitosano e la chitina, oltre ai derivati della cellulosa, sono i biopolimeri più utilizzati. FDA ha identificato il chitosano come *generally recognized as safe* (GRAS), utilizzandolo per la riparazione delle ferite, la riparazione della cartilagine e per la produzione di MN. Il chitosano è vantaggioso per la produzione di MN grazie

alla sua biodisponibilità, biocompatibilità, sicurezza e per le sue proprietà antimicrobiche ed emostatiche. I MN di chitina, invece, sono insolubili in acqua, piuttosto robusti e fisiologicamente inerti e presentano uno *swelling index* inferiore rispetto ai MN di chitosano (Bhadale et al., 2021). In letteratura è noto che MN a base di chitosano sono coinvolti in diversi meccanismi, come il controllo dell'infiammazione, la deposizione di collagene, la formazione di vasi sanguigni e la promozione della fase di granulazione e proliferazione cellulare per la riparazione di ferite (Kulkarni et al., 2023).

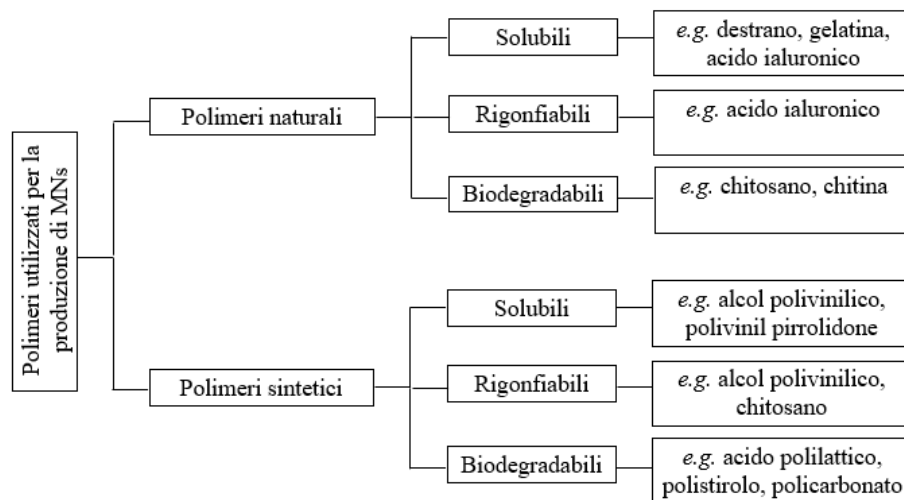


Figura 17 - Polimeri utilizzati per la produzione di MN (Kulkarni et al., 2023)

7.4 Silicone

Il silicone e i materiali a base di silicone sono caratterizzati da una eccellente resistenza meccanica, stabilità chimica e termica. I primi MN solidi in silicone risalgono al 1998 e sono stati prodotti dal gruppo di ricerca Henry et al. (Henry et al., 1998); questo materiale viene utilizzato per produrre anche MN cavi e rivestiti (Aldawood et al., 2021). Tuttavia, il loro principale svantaggio è la natura fragile che può comportare la rottura dell'ago in seguito all'applicazione, il quale rimane nel corpo e porta a reazioni avverse, come infiammazione (Tabella II) (Luo et al., 2023).

7.5 Vetro

Il vetro, un altro materiale utilizzato per la produzione di MN, per la sua adeguata resistenza all'applicazione sulla cute, una lavorazione agevole che permette di ottenere aghi dalla forma desiderata. L'utilizzo del vetro per la produzione di MN, però, è limitato in campo laboratoriale e per scopi di ricerca, non per una possibile commercializzazione (Damiri et al., 2022). Questo perché il suo svantaggio principale è la fragilità che può comportare la rottura della punta degli aghi, che rimanendo nel tessuto, potrebbero causare infiammazione. Nonostante ciò, la sua fragilità permette la produzione di MN di diverse geometrie o in esperimenti su scala nanometrica, inoltre è caratterizzato da inerzia chimica e basso costo (Babu et al., 2024). È semplice da sterilizzare, poiché sopporta alti valori di temperatura e pressione (Jung et al., 2021).

Tabella II - Vantaggi, svantaggi, metodi di produzione e tipologie di MN con i vari materiali (modificata da Kulkarni et al., 2023).

<i>Tipologia di materiale</i>	<i>Vantaggi</i>	<i>Svantaggi</i>	<i>Metodi di fabbricazione</i>	<i>Tipologia di MN</i>
Ceramica	Resistenza alla compressione e ai processi chimici.	Bassa forza tensile.	Micromolding, litografia.	Solidi e cavi.
Metallo	Biocompatibilità, buone proprietà meccaniche, resistenza alla rottura.	Costi elevati, necessità di processi post-fabbricazione, reazioni allergiche.	Ablazione laser, micromolding.	Solidi e cavi.
Polimeri	Buona biocompatibilità, bassa tossicità, economici.	Scarse proprietà meccaniche.	Ablazione laser, litografia, micromolding.	Solidi, cavi, rivestiti, solubili e formanti-idrogel.
Silicone	Flessibilità di forma e dimensioni.	Lunghi tempi di produzione, costi elevati, fragilità.	Micromolding.	Solidi, cavi e rivestiti.
Vetro	Buona biocompatibilità, stabilità ad alte temperature, economico.	Fragilità e infiammazione.	Litografia, micromolding.	Solidi e cavi.

8. BIOMATERIALI

Un biomateriale è definito come qualsiasi sostanza o combinazione di sostanze, prive di azione farmacologica, adatte a trattare, accrescere o sostituire un tessuto, un organo o una funzione dell'organismo, da sola o in seguito all'inclusione in un sistema in modo da mantenere o migliorare la qualità della vita dell'individuo (Rahmati et al., 2020). Negli ultimi decenni, lo sviluppo di biomateriali in campo biomedico ha compiuto un avanzamento notevole a causa della sua fondamentale importanza nella rigenerazione cutanea e nella gestione delle ferite (Tiwari et al., 2023).

L'ingegneria tissutale, campo di ricerca multidisciplinare, è stata introdotta alla fine degli anni '80 in America dalla *National Science Foundation*. La prima pubblicazione che utilizzava il termine ingegneria tissutale come viene oggi considerato riguarda un articolo pubblicato nel 1991 dal titolo "*Functional Organ Replacement: The New Technology of Tissue Engineering*" (Vacanti et al., 1991). L'ingegneria tissutale si pone come obiettivo la riparazione di tessuti danneggiati utilizzando materiali biomimetici, che non solo si prestano ad essere un ambiente favorevole allo sviluppo di un nuovo tessuto, ma fungono anche da base e guida strutturale per l'adesione e la proliferazione cellulare, favorendo la deposizione di nuova matrice extracellulare fino al completo ripristino del tessuto (Das et al., 2023). Nel campo della medicina rigenerativa, dunque, i biomateriali rivestono un ruolo cruciale per la fabbricazione di *scaffold*, questi possono essere fatti di biomateriali sintetici o naturali (Das et al., 2023).

I biopolimeri rappresentano sostanze di origine naturale sintetizzate da batteri, piante o animali, impiegate come biomateriali per la rigenerazione tissutale. Sono caratterizzati da biocompatibilità, capacità di supportare la crescita cellulare, potenziare la rigenerazione, biodegradabilità e durabilità, rendendoli ampiamente applicabili. Inoltre, numerosi studi hanno dimostrato che il loro utilizzo comporta una risoluzione rapida ed efficace delle ferite così come una riduzione nell'insorgenza di infezioni batteriche (Tiwari et al., 2023). I biopolimeri devono essere biocompatibili per prevenire una risposta immunitaria, sterilizzabili per essere

incorporati in modo sicuro nel tessuto lesso e bioattivi per stimolare una risposta tissutale (Eldeeb et al., 2022).

Le medicazioni a base di biopolimeri rappresentano un avanzamento rispetto agli approcci tradizionali per la riparazione tissutale. Questi biomateriali, infatti, facilitano la rimozione autolitica del tessuto danneggiato, mantengono l'area della ferita umida sufficientemente da evitare la macerazione del tessuto attraverso la rimozione dell'essudato in eccesso dal letto della ferita; promuovono la proliferazione cellulare e permettono inoltre la vascolarizzazione e la riepitelizzazione.

I biopolimeri possono essere classificati in funzione della loro origine in polimeri naturali (*e.g.* polisaccaridi, proteine) e polimeri sintetici biodegradabili (*e.g.* polietilene); a seconda della loro carica superficiale invece si classificano in cationici (chitosano, gelatina, cheratina), anionici (acido ialuronico, alginato, gomma xantana) e non ionici (destrano e pullulano) (Tiwari et al., 2023).

In particolare, i polimeri naturali sono preferiti ai polimeri di origine sintetica, non solo per una maggiore biocompatibilità e biodegradabilità, ma anche perché caratterizzati da sostenibilità, stabilità alle variazioni di pH, scarsa immunogenicità, natura idrofilica e infine una buona similarità all'ECM, fondamentale per il supporto e la crescita cellulare (Raina et al., 2022).

I polimeri naturali sono molecole organiche, sintetizzate da organismi viventi quali piante (*e.g.* cellulosa e gomma), animali (*e.g.* collagene, acido ialuronico, chitosano), funghi (*e.g.* chitina) o alghe (*e.g.* alginato), che consistono in una sequenza di monomeri (unità ripetute di amminoacidi, monosaccaridi, nucleotidi) che, mediante legami covalenti, sono uniti a produrre molecole ad alto peso molecolare come peptidi, proteine, polisaccaridi o polifenoli (Tiwari et al., 2023). Si stanno studiando biopolimeri di origine vegetale in modo da sostituirli a quelli di derivazione animale date le problematiche etiche e ambientali; inoltre, i prodotti di origine animale richiedono costi più elevati perché necessitano di prodotti di estrazione e purificazione (Eldeeb et al., 2022).

In aggiunta, i biopolimeri sono caratterizzati da proprietà quali attività angiogenica, antimicrobica, antibatterica, antinfiammatoria, antiossidante, immunogenica, che

aggiungendosi alla biocompatibilità, forniscono un'ottima base per il trattamento e la guarigione delle ferite (Arif et al., 2021).

8.1 Chitosano

Il chitosano (CS) è un polisaccaride (PL) di origine naturale derivato dalla chitina e consiste in unità ripetute di glucosamina e N-acetil-glucosamina unite da legami β -1,4-glicolilici; è il secondo biopolimero più diffuso in natura dopo la cellulosa (Shriky et al., 2023). Chimicamente il CS si ottiene dalla parziale deacetilazione della chitina, un biopolimero estratto da funghi, crostacei, insetti, lieviti e parassiti. Quando la chitina contiene una quantità di unità deacetilate di glucosamina inferiore al 50% si parla di CS (Figura 18) (Gorantla et al., 2021).

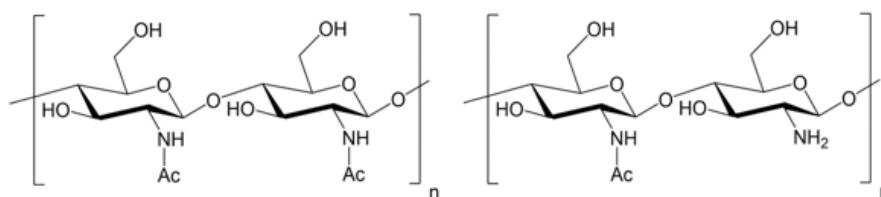


Figura 18 - Struttura della chitina (sinistra) e struttura del chitosano (destra) (Tang et al., 2023).

La biodegradabilità del CS, l'ottima capacità di adesione, la biocompatibilità e l'atossicità, insieme alla sua capacità di promuovere il processo di emostasi, rendono questo biopolimero un'ottima scelta per la rigenerazione tissutale (Raina et al., 2022). Alcune proprietà del CS, come il peso molecolare, il grado di deacetilazione e il contenuto di acqua determinano la solubilità, la stabilità e la degradazione del materiale. Infatti, il CS a basso e medio peso molecolare viene degradato in monomeri dalla N-acetil- β -D-glucosaminidasi ed eliminato per via epatica; mentre, il CS ad alto peso molecolare, invece, viene degradato in frammenti dalle proteasi ed eliminato per via renale (Dabholkar et al., 2021). Per quanto riguarda la solubilità, il CS ad alto peso molecolare (310-375 kDa) è solubile solo in mezzo fortemente acido e insolubile in mezzi neutri o basici, limitando la sua applicabilità in condizioni fisiologiche con pH di 7,4; questo è vero anche per il CS a medio e basso peso molecolare, che risultano però solubili in soluzione acquosa debolmente acida (Tiwari et al., 2023). Per superare questa problematica sono stati sviluppati numerosi derivati del CS che presentano un miglioramento della solubilità.

Il CS è bioassorbibile, si comporta come un *hydrogel* in quanto assorbe e trattiene un'elevata quantità di acqua riuscendo a rigonfiarsi senza dissolvere completamente (Dabholkar et al., 2021).

In aggiunta, il CS sembra stimolare la proliferazione dei fibroblasti e possiede proprietà antimicrobica, antifungina, di mucoadesione, ma ha anche il vantaggio di non innescare fenomeni infiammatori dopo la collocazione in sede di ferita, al contrario, risulta favorire il processo di emostasi che dà avvio al processo di guarigione (Raina et al., 2022).

In letteratura sono presenti diversi articoli che attribuiscono proprietà antimicrobiche al CS; esso può agire attraverso effetti extracellulari, tipici del CS ad alto peso molecolare e tramite effetti intracellulari, caratteristici del CS a basso peso molecolare.

Il CS ad alto peso molecolare è generalmente incapace di attraversare la parete cellulare batterica, per questo la sua azione antimicrobica è dovuta esclusivamente ad effetti extracellulari come la chelazione di metalli essenziali, impedendo l'assorbimento dei nutrienti e alterando la permeabilità cellulare. Al contrario, il CS a basso peso molecolare non ha solamente attività antimicrobica extracellulare ma anche intracellulare, alterando l'RNA, la sintesi proteica e le funzioni mitocondriali del batterio (Ke et al., 2021).

Tra le numerose proprietà che ne favoriscono l'impiego vanno poi menzionate la capacità di alleviare il dolore, in quanto blocca le terminazioni nervose nel letto della ferita; l'azione preventiva sulla formazione di cicatrice mediata l'attivazione dei macrofagi; il supporto all'attivazione e adesione delle piastrine; mentre, a livello topico è in grado di accelerare la proliferazione dei fibroblasti e promuovere la formazione di tessuto granuloso e il rimodellamento del tessuto danneggiato in ferite aperte di grandi dimensioni. Tutto questo, ancora una volta, concorre a rendere questo biopolimero un perfetto candidato per indagini e studi di formulazioni ad applicazione cutanea (Tiwari et al., 2023). Studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che il CS possiede proprietà antiossidanti per la sua capacità di inibire specie reattive dell'ossigeno (ROS), di prevenire l'ossidazione dei lipidi grazie alla riduzione significativa delle concentrazioni di acidi grassi liberi e di aumentare gli enzimi antiossidanti intracellulari nei sistemi biologici (Ivanova et al., 2020).

In conclusione, alle buone proprietà chimico-fisiche si aggiungono molte proprietà e caratteristiche ideali per un biomateriale, queste permettono al CS di essere un eccellente candidato, facilmente utilizzabile per la creazione di geli, spugne, membrane, fibre o strutture porose, sia come tale che derivatizzato o in associazione con altri biomateriali (*i.e.* polimeri, proteine, lipidi) o più in generale composti organici e inorganici.

8.1.1 Trimetil chitosano

La scarsa solubilità di chitina e CS in soluzione acquosa neutra o debolmente basica limita significativamente il loro utilizzo in campo farmaceutico e biomedico. Per superare questa limitazione, sono state studiate numerose derivatizzazioni del CS, al fine di migliorarne la solubilità (Kang et al., 2021). Tra le modifiche chimiche messe a punto vi sono l'acetilazione (inserendo l'anidride clorica o il cloruro di acetile), l'alchilazione, la carbossilazione, la quaternizzazione e l'eterificazione. Queste modifiche hanno contribuito a un miglioramento delle proprietà chimico-fisiche, come solubilità e biodisponibilità; e delle proprietà biologiche, come l'azione antimicrobica, antiossidante, la mucoadesione e la capacità di penetrare attraverso la membrana cellulare (Pathak et al., 2021).

L'N,N,N-trimetil chitosano (TMC) rappresenta un derivato quaternario del CS, in cui i gruppi amminici primari in posizione C2 sono stati sostituiti da gruppi amminici quaternari (Figura 19). Questo derivato non solo mostra una maggiore solubilità in un ampio range di pH, ma anche biodegradabilità e biocompatibilità, oltre ad un miglioramento di alcune delle proprietà attribuite al CS stesso. Pertanto, anche il TMC risulta un ottimo candidato come biomateriale nel settore medico e farmaceutico (Hou et al., 2022).

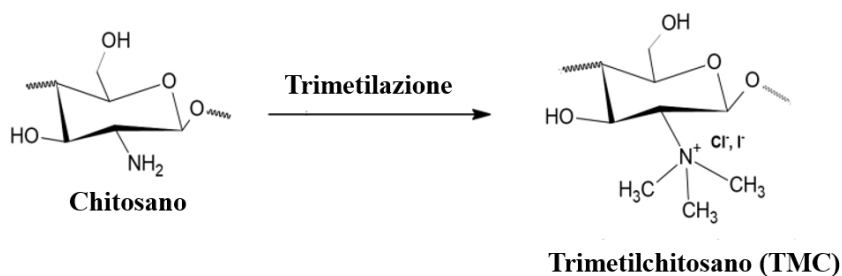


Figura 19 – Derivatizzazione del chitosano a TMC.

Il TMC è un policatione con densità di carica positiva variabile in funzione del grado di quaternizzazione (GQ), ha, inoltre, una natura anfifilica per la presenza sia di gruppi idrofilici che idrofobici. Il grado di quaternizzazione (GQ), infatti, permette di aumentare la solubilità del polimero, la carica e le proprietà antibatteriche. Un maggior GQ causa una diminuzione della viscosità intrinseca del TMC e una riduzione della flessibilità delle catene di polimero in soluzione (Pathak et al., 2021). In letteratura la sintesi del TMC prevede metodi a uno o due step utilizzando reagenti di metilazione, come lo ioduro di metile, il dimetilsolfato e il dimetilcarbonato in diversi solventi. Il protocollo della sintesi influenza fortemente la struttura del TMC con conseguente influenza sulle proprietà chimico-fisiche e biologiche (Kang et al., 2021).

Il TMC mostra ottime capacità di interazione con diversi tessuti e possiede un potenziale mucoadesivo, attribuibile alla presenza di gruppi amminici cationici che interagiscono con le porzioni anioniche di acido sialico e solfonico nella mucina. Inoltre, grazie alla sua natura policationica, favorisce la penetrazione interagendo con le cariche negative presenti sulla membrana cellulare, facilitando di conseguenza l'internalizzazione e il trasporto attivo di nanoparticelle. Il TMC aumenta il trasporto di molecole idrofiliche di piccole dimensioni attraverso la via paracellulare, in quanto è in grado di aprire reversibilmente le *tight junctions* tra le cellule epiteliali (Hou et al., 2022).

In letteratura è riportato che il TMC risulta avere attività antibatterica maggiore rispetto al CS, in un ampio range di pH. L'attività antibatterica, in particolare, aumenta con l'aumentare della densità di carica cationica data dalla presenza dei gruppi quaternari. Il TMC è stato dimostrato avere proprietà antibatterica sia contro i Gram-negativi, come *E. Coli* e *P. Aeruginosa*, che contro i Gram-positivi, come *S. Aeurus* (Rathinam et al., 2020). Per quanto concerne l'attività contro i Gram-positivi, Sadeghi et al. riporta che derivati del TMC con alto potenziale zeta presentano valori della concentrazione minima inibente elevati (Sadeghi et al., 2008); questo è probabilmente causato dal fatto che la carica positiva aumenta la capacità del polimero di legarsi alle cariche negative del peptidoglicano sulla parete cellulare batterica e, inoltre, aumentano la probabilità di autolisi (Freitas et al., 2020).

Abueva et al. hanno dimostrato, inoltre, che il TMC svolge un ruolo importante nella guarigione delle ferite andando a regolare il rilascio di citochine antinfiammatorie. Infatti, questo polimero è in grado di modulare la risposta infiammatoria andando a ridurre il rilascio di citochine pro-infiammatorie e incrementando l'espressione di citochine antinfiammatorie (Abueva et al., 2022).

Le caratteristiche chimico-fisiche implementate, a cui si aggiunge una notevole bioattività, biocompatibilità, biodegradabilità e citotossicità adeguate, rendono, in conclusione, il TMC un ottimo candidato per applicazioni biomediche e farmaceutiche.

8.2 Proteine del siero del latte

Il siero è un componente fondamentale del latte, ottenuto come sottoprodotto dalla lavorazione casearia. Questa sostanza si presenta come un liquido acquoso ricco di proteine, in particolare le proteine del siero del latte, che costituiscono circa il 15-20% del contenuto proteico totale e possiedono un elevato valore nutrizionale (Slota et al., 2021). Le proteine del siero del latte (WP – *whey protein*) sono un gruppo eterogeneo di proteine globulari, principalmente composte da β -lattoglobulina e α -lattoalbumina, con l'aggiunta di lattoferrina, albumina sierica bovina (BSA), immunoglobuline, lisozima e altre proteine o peptidi presenti in frazioni minori (Zandona et al., 2021).

A livello commerciale, le WP si distinguono generalmente in tre forme: concentrate (WPC – *whey protein concentrate*), isolate (WPI – *whey protein isolate*) e idrolizzate (WPH – *whey protein hydrolysate*). Le WPC contengono una percentuale proteica che può arrivare al massimo fino all'80%. Attraverso processi di microfiltrazione, ultrafiltrazione su membrana o scambio ionico, seguiti da concentrazione e asciugatura attraverso *spray drying*, si ottengono le WPI, un prodotto processato, privo di grasso e lattosio (Slota et al., 2021).

Le WPC e le WPI sono biocompatibili e biodegradabili, essendo un insieme di diverse proteine risultano complete in amminoacidi essenziali (e.g. leucina, isoleucina, valina, cisteina, arginina), hanno alto valore nutrizionale e sono una fonte ricca di peptidi bioattivi, caratteristiche che ne hanno permesso ampio studio e interesse sia per applicazioni nell'industria alimentare che in quella biomedica (Pino

et al., 2021). Gli amminoacidi contenuti nelle WPI sono essenziali nella guarigione tissutale; ad esempio, la prolina è considerata essenziale per la biosintesi di collagene (Pino et al., 2024); l'arginina è fondamentale nel processo di guarigione tissutale perché coinvolta nella produzione di poliammine, necessarie per la proliferazione cellulare, di ornitina e prolina, necessarie per la sintesi di collagene; inoltre è coinvolta nella sintesi dell'ossido nitrico, fondamentale nella guarigione tissutale perché regola la proliferazione cellulare, la formazione di collagene e la contrazione muscolare (Minj & Anand et al., 2020).

Le WPI mostrano un'ottima solubilità in acqua e, grazie alla loro capacità di gelificazione, sono in grado di formare legami tra le diverse proteine che portano alla creazione di una struttura reticolata, un idrogel, senza aggiunta di agenti cross linkanti, che risultano spesso poco biocompatibili. Inoltre, le WPI possiedono capacità di incapsulazione di farmaci, adeguate proprietà meccaniche, capacità di assorbimento di acqua e anche proprietà di barriera nei confronti dei gas. Queste caratteristiche evidenziano il potenziale utilizzo delle WPI in campo biomedico, farmaceutico e nella rigenerazione tissutale (Pino et al., 2021; Slota et al., 2021).

Le WPI sono state proposte come biomateriale utile per la rigenerazione tissutale, la riparazione di ferite e la veicolazione di farmaci grazie alle proprietà antinfiammatorie e antiossidanti (Genç et al., 2023). Le WPI sono precursori del glutathione, un potente antiossidante e mostrano un'importante attività antiossidante attraverso gli effetti avversi dei fattori di stress. Il rilascio di peptidi bioattivi da parte delle WPI ha evidenziato un aumento dei livelli di glutathione intracellulare e una riduzione dei livelli di alcune interleuchine, tra cui l'interleuchina IL-8, e degli effetti di ROS. Inoltre, andando a studiare i peptidi, si è notato che le WPI sono anche caratterizzate da proprietà antitumorali, antipertensive, antidiabetiche e aiutano a ridurre il colesterolo (Minj et al., 2020). Sono caratterizzate da un contenuto proteico superiore al 90% e un basso contenuto di grassi. Le componenti proteiche presenti maggiormente sono la β -lattoglobulina, la α -lattoalbumina e la siero albumina. Oltre a queste, sono presenti anche lisozimi, lattoperossidasi, lattoferrina, immunoglobuline, contenenti amminoacidi essenziali e non essenziali, e glutammina, importante per la crescita cellulare (Agwa et al., 2022).

La β -lattoglobulina (β -Lg) è la proteina predominante nel siero del latte, caratterizzata da una struttura globulare con PM di circa 18,4 kDa e punto isoelettrico (pI) di 5,2. Ciascun monomero è costituito da 162 amminoacidi, tra i quali ci sono due residui di triptofano e cinque di cisteina, che presenta un gruppo tiolico libero e quattro coinvolti nella formazione di ponti disolfuro in grado di stabilizzare la struttura quaternaria (Kazimierska et al., 2021). Questa proteina possiede una struttura anfifilica, conferendo così proprietà tensioattive alle WPI. La temperatura di denaturazione della β -Lg varia tra 67,5-78°C, durante il riscaldamento la struttura si dispiega, esponendo i gruppi tiolici presenti internamente. Quando la temperatura di denaturazione supera i 78°C, si verifica l'aggregazione tra le diverse proteine, grazie a delle forti interazioni idrofobiche e dell'indebolimento dei legami idrogeno e delle interazioni elettrostatiche (Du et al., 2022).

La denaturazione provoca un cambiamento nella struttura terziaria e quaternaria della proteina, con la rottura e il riarrangiamento dei legami non polari e dei ponti di solfuro, provocando l'aumento dell'adsorbimento superficiale di farmaci.

Grazie alla sua capacità di legare ioni ferro, la β -Lg mostra proprietà antimicrobiche, in particolare è in grado di inibire l'adesione dei patogeni sulle superfici prevenendo così la colonizzazione batterica. L'azione batterica è stata individuata sia contro batteri Gram-positivi, quali *B. subtilis* e *S. aureus*, che nei confronti di batteri Gram-negativi, quali *E. coli* (Kazimierska et al., 2021).

L' α -lattoalbumina (α -La) è un'albumina idrofilica, altamente solubile in acqua e anch'essa avente struttura globulare. La sua catena peptidica singola è composta da 123 amminoacidi, comprendente quattro legami disolfuro tra residui di cisteina, ma senza gruppi tiolici liberi. Questa proteina ha un pI compreso tra 4,5-4,8 e un PM di circa 14,1 kDa. L' α -La funziona come coenzima nella biosintesi del lattosio e ha la funzione di trasportare gli ioni calcio. Inoltre, è una buona fonte di peptidi oppioidi, *i.e.* sostanze endogene che legandosi a recettori specifici agiscono come modulatori delle sensazioni dolorifiche e fattori di trascrizione, e ha la capacità di ridurre lo stress e gli stati depressivi, aumentando i livelli di triptofano e serotonina. L' α -La non ha di per sé attività antibatterica al contrario di alcuni peptidi isolati a partire dalla sua sequenza (Kazimierska et al., 2021).

Sia β -Lg che α -La sembrano possedere proprietà immunomodulatorie. Insieme ad altri componenti delle WPI, mostrano effetti benefici nei pazienti con un sistema immunitario indebolito o affetti da patologie quali diabete, inoltre sono promotori della mineralizzazione ossea (Slota et al., 2021).

Le immunoglobuline (Ig) sono proteine globulari ad alto PM (150-1000 kDa) aventi ruolo immunitario e sono divise in cinque classi, *i.e.* IgG, IgA, IgM, IgE e IgD; ogni classe ha una struttura simile, composta da quattro subunità polipeptidiche. IgG, IgA e IgM sono le principali immunoglobuline presenti nel latte bovino e nel siero. Le immunoglobuline costituiscono il 10-15% delle WPI, hanno un pI compreso tra 5,5-8,3 e sono termolabili ad alte temperature; infatti, vengono denaturate dopo soli 30 secondi di riscaldamento a 100°C. Il loro legame con l'antigene permette di stimolare la fagocitosi, hanno azione preventiva sull'adesione dei patogeni, sono in grado di inibire il metabolismo batterico (*e.g.* partecipano alla distruzione di *E. coli*) e di neutralizzare le tossine (Kazimierska et al., 2021).

La lattoferrina (LF) è resistente ad elevate temperature ed enzimi proteolitici, ha pI pari a 9,0 ed PM di circa 80 kDa. Di particolare interesse è la sua capacità di legare ioni ferro, simile a quella delle transferrine, che le conferisce effetti batteriostatici in un ampio range e su numerosi patogeni quali batteri, funghi e virus. La LF possiede anche proprietà antimicrobiche ed è in grado di contrastare la formazione di biofilm grazie alla sua capacità di legarsi direttamente alla membrana batterica, causandone così la rottura. Questa proteina è un componente dei neutrofili, i quali la rilasciano nel circolo sanguigno durante traumi, infiammazioni o infezioni (Kazimierska et al., 2021).

Le WPI rappresentano un biomateriale promettente data la sua biodegradabilità e la sua bioattività. Contiene alti livelli di amminoacidi come arginina, glicina, leucina, isoleucina e valina, che sono essenziali nella guarigione delle ferite, e prolina, che è fondamentale per la biosintesi del collagene e la sua struttura e consistenza (Pino et al., 2024).

Tra le numerose applicazioni biomediche e farmaceutiche che ne derivano, spiccano la capacità di stabilizzare nanoemulsioni e nanosospensioni, migliorando così la biodisponibilità orale di farmaci poco idrosolubili, oltre a offrire maggior resistenza al trattamento termico e una migliore conservazione nel tempo. Le WPI possono

essere utilizzate per la preparazione di idrogel, strutture reticolate tridimensionali in grado di assorbire elevati quantitativi di acqua o fluidi biologici, che mostrano ottima biocompatibilità, non tossicità e biodegradabilità. Le WPI vengono idrolizzate dalle proteasi risultando in peptidi biocompatibili e spesso con proprietà migliorate rispetto alle proteine stesse. È inoltre possibile produrre nanoparticelle, compresse, dispersioni solide e nanofibre sempre con l'obiettivo di migliorare la stabilità di principi attivi poco solubili in acqua (Zandona et al., 2021).

8.3 Complessi chitosano-proteine del siero del latte

Le interazioni tra CS e WPI sono oggetto di studio al fine di capire come polisaccaridi e proteine interagissero tra loro e quali sono le caratteristiche del biomateriale risultante.

La formazione di complessi proteina-polisaccaride è influenzata da diversi fattori, come le caratteristiche del biopolimero (*i.e.* peso molecolare, conformazione, densità di carica e rigidità), il rapporto tra i componenti, la concentrazione di biopolimero totale il tempo di miscelazione e la temperatura, che sembra avere un impatto positivo sulla formazione dei complessi [CS:WPI] (Tavares et al., 2021).

Il pH ha una notevole incidenza sulla formazione di complessi [CS:WPI] in quanto, oltre a influenzare il grado di ionizzazione del CS, ha anche un impatto sulla carica netta delle proteine (Ding et al., 2023). Al fine di poter generare complessi mediante interazioni elettrostatiche è importante che il pI delle proteine sia inferiore alla pKa del CS; nel caso di CS e WPI questa condizione si verifica, in quanto il pI medio delle WPI è compreso tra 4,7-4,9, mentre la pKa del CS è circa 6,3.

Quando le WPI sono cariche negativamente, riescono a interagire elettrostaticamente con i gruppi amminici presenti nel CS e con i gruppi carichi positivamente del TMC, permettendo la formazione di complessi. Oltre ai legami elettrostatici altre interazioni, come i legami a idrogeno, le forze di Van der Waals, le interazioni dipolo-dipolo e le interazioni idrofobiche, contribuiscono alla formazione dei complessi (Lopes et al., 2021).

Le componenti principali delle WPI sono caratterizzate da punti isoelettrici diversi tra loro, esempi sono la β -Lg (pI ~ 5,2), l' α -La (pI ~ 4,4) e le Ig (pI da 5,5 a 8,3),

rendendo molto complesso il loro comportamento al variare del pH (Lopes et al., 2021).

Si suppone che la formazione di complessi tra il CS e le WPI avvenga in un range di pH tra 5 e 7, ovvero quando la carica dei due biopolimeri è netta (Pang et al., 2024). Quando il CS è solubilizzato in una soluzione acquosa a pH inferiore a 6,5, esso è carico positivamente ed è in grado di interagire con la carica negativa delle proteine (Ding et al., 2023).

Per capire come il processo di riscaldamento abbia influenza sulla formazione dei complessi è necessario prima analizzare il comportamento al calore delle diverse proteine che compongono le WPI. La β -Lg ha una conformazione pH-dipendente che vede una struttura monomerica per valori di pH acidi ($\text{pH} < 2$) o superiori a pH 8. Aumentando la temperatura però gli equilibri si spostano in favore della struttura monomerica, ad una temperatura di circa 80°C per 20 minuti si ottiene la denaturazione della PR e successivi fenomeni aggregativi.

Grazie alla presenza di gruppi idrofilici e di ioni calcio, intrinsecamente legati alla sua struttura, l' α -La presenta maggiore stabilità al calore, nonostante abbia una temperatura di denaturazione intorno a 62°C. Questa maggior stabilità rispetto a β -Lg è dovuta all'assenza di gruppi tiolici liberi e questa assenza fa sì che non si verifichi aggregazione qualora l' α -La venga riscaldata da sola; al contrario, si assiste alla formazione di aggregati quando viene scaldata in presenza di β -Lg o BSA.

Le altre proteine minoritarie presenti nelle WPI sono le immunoglobuline dove le più sensibili al calore sono le IgM mentre la tipologia più stabile sono le IgG (Setiowati et al., 2020).

Nonostante i comportamenti peculiari di ciascuna tipologia proteica, è ragionevole considerare il comportamento delle WPI al calore come quello della β -lattoglobulina, con una temperatura di denaturazione di circa 70°C per 20 minuti (Pino et al., 2021). A una temperatura di 60°C, infatti, la β -lattoglobulina si denatura in modo reversibile con perdita parziale della struttura delle proteine; se scaldate a temperature superiori, invece, la struttura terziaria viene persa rapidamente e si formano legami tra le proteine (Genç et al., 2023).

A questo punto le strutture secondaria e terziaria delle proteine del siero del latte vengono perse e le proteine risultano dispiegate esponendo così gruppi reattivi quali

gruppi amminici laterali e gruppi tiolici (-SH) che normalmente sono nascosti dall'interno dei ripiegamenti proteici; in questo modo i gruppi tiolici sono dunque in grado di formare ponti disolfuro con altre molecole e conseguentemente le WPI sono maggiormente predisposte all'interazione con il CS (Setiowati et al., 2020).

Scopo della tesi

Le cicatrici patologiche rappresentano un'anomalia nel processo di guarigione cutanea, spesso caratterizzata da un'eccessiva proliferazione e trans-differenziazione dei fibroblasti, oltre che da un'eccessiva deposizione della matrice extracellulare. Queste cicatrici si distinguono principalmente in due categorie: cicatrici ipertrofiche e cheloidi. Le cicatrici ipertrofiche sono ispessimenti fibrosi che rimangono confinati all'interno dei margini della ferita originale, mentre i cheloidi possono espandersi oltre i margini della ferita, invadendo il tessuto circostante. Attualmente, il trattamento di queste cicatrici include sia approcci farmacologici che non farmacologici, con l'obiettivo di ridurre l'eccesso di tessuto cicatriziale e migliorare l'estetica e la funzionalità della pelle. Tuttavia, la loro patogenesi non è ancora completamente compresa e non esistono cure definitive.

Una soluzione emergente nel trattamento delle cicatrici patologiche è rappresentata dai microneedles (MN), o microaghi, che offrono una doppia funzionalità: veicolare farmaci in modo mirato e/o agire come dispositivi meccanici. I MN, infatti, sono in grado di ostacolare la proliferazione dei fibroblasti, riducendo così la crescita delle cicatrici, grazie a un effetto noto come inibizione da contatto. Infatti, i MN interrompono la comunicazione meccanica tra i fibroblasti e la matrice extracellulare; questa interruzione è considerata il principale meccanismo terapeutico, definito come approccio meccanoterapeutico.

Lo scopo del presente lavoro è lo sviluppo e la caratterizzazione di MN preparati con biomateriali innovativi come dispositivi per il trattamento di cicatrici patologiche attraverso un approccio meccanoterapeutico. I biomateriali impiegati sono costituiti da sospensioni di complessi tra il chitosano a basso peso molecolare (bCS) o il suo derivato trimetilchitosano (TMC) combinati con le proteine del siero del latte (WPI). Questi materiali sono ampiamente utilizzati in ambito biomedico e farmaceutico per le loro proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità e bassa tossicità, rendendoli ideali per applicazioni terapeutiche sulla pelle.

Il lavoro di ricerca si è articolato in due fasi.

Nella prima fase sono stati preparati, utilizzando il metodo di *solvent casting*, quattro film a base di i) miscele di bCS o TMC con WPI denaturate a 70°C per 20 minuti e

ii) miscele trattate termicamente a 70°C per 20 minuti di bCS o TMC con WPI, utilizzando il metodo di *solvent casting*. I film ottenuti sono stati analizzati dal punto di vista morfologico e successivamente sottoposti a una serie di analisi per valutarne le proprietà meccaniche, la perdita di solvente durante il processo di *casting*, la capacità di rigonfiamento e la bioadesione. Questi test preliminari sono stati condotti per comprendere il comportamento dei materiali con il metodo di preparazione indicato, fornendo un'indicazione del loro potenziale impiego nella preparazione dei MN.

Nella seconda fase, i MN sono stati realizzati con le stesse miscele impiegate per preparare i film. Il metodo di preparazione utilizzato è stato il *solvent casting* che ha previsto l'impiego di tre diverse tipologie di stampi in PDMS, contenenti cavità piramidali: i) 10x10 H600, ii) 10x10 H800 e iii) 15x15 H600. Dopo aver analizzato dal punto di vista morfologico i MN ottenuti, la prima caratterizzazione ha riguardato le proprietà meccaniche, con l'obiettivo di selezionare le combinazioni di materiali e stampi più promettenti per garantire robustezza e funzionalità dei MN. Successivamente, sono state analizzate la perdita di solvente, le proprietà di bioadesione e la capacità dei MN di penetrare substrati simulanti la pelle. Allo scopo di classificare i MN ottenuti in una delle principali cinque categorie (solidi, rivestiti, cavi, solubili e formanti-idrogel) sono stati condotti studi di dissoluzione, capacità di rigonfiamento e degradazione dei MN. Un modello *in vitro*, rappresentato da un sistema a reticolo di collagene popolato da fibroblasti, è stato utilizzato per condurre studi preliminari sull'efficacia dei MN ovvero sulla loro capacità di inibire la contrazione della matrice di collagene.

Infine, sono stati condotti studi *in vivo* per valutare la biocompatibilità dei MN su un modello animale.

Parte sperimentale

9. MATERIALI

Polimeri

Per la preparazione delle miscele oggetto di questa tesi è stato utilizzato chitosano a basso peso molecolare (bCS; PM 50-190 kDa; grado di deacetilazione 76%; lotto BCCC6282), acquistato da Sigma-Aldrich, Italia, e trimetilchitosano (TMC; grado di quaternizzazione $\geq 80\%$; lotto 0212), acquistato da ChitoLutic, Reliable Chitosan, Canada. Le proteine del siero del latte isolate (*Whey Protein Isolate*, WPI) sono state gentilmente fornite da Milei GmbH, Germania, in collaborazione la Professoressa Francesca Bosco, Politecnico di Torino.

Reagenti e solventi

Sono stati utilizzati i seguenti reagenti: acido acetico glaciale (CH_3COOH ; lotto P2A109022B), acido cloridrico (HCl ; lotto Q5M092245M), potassio cloruro (KCl ; lotto 9M179290I), formaldeide (HCHO ; lotto 3850688146811) acquistati da Carlo Erba Reagents Italia. Sodio idrossido (NaOH ; lotto 70650) fornito da Riedel-de Haën, North Carolina, US. Gelatina 175g-Bloom tipo A (lotto G5226500G), kit acido bicinconinico (lotto SLCH8859), bicarbonato di sodio (NaHCO_3 ; lotto S5761), fosfato di sodio monobasico (NaH_2PO_4 ; lotto S0751), cloruro di sodio (NaCl ; lotto SLBZ8529) acquistati da Sigma-Aldrich, Italia. ProlipidTM 141 (lotto 0002564715), NatrosolTM 250M Pharm (lotto X0681) acquistati da Ashland.

Studi in vitro su modelli cellulari

Per gli esperimenti sulla linea cellulare di fibroblasti di derma umano (*Normal Human Dermal Fibroblasts*, NHDF; PromoCell® GmbH, VWR, Italia) sono stati utilizzati i seguenti materiali: Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose (DMEM-HG), soluzione di tripsina-EDTA, sale di tetrazolio (MTT, [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro]), sono stati acquistati da Sigma-Aldrich, Italia. Il siero fetale bovino (Fetal Bovine Serum, FBS) proviene da VWR International S.r.l., Italia; gli antibiotici e antimicotici (penicillina 10000 unità/mL, streptomicina 10 mg/mL e amfotericina B 25 mg/mL) sono stati acquistati da Merk Life Science S.r.l., Italia, mentre la soluzione di Trypan Blue proviene da Biological Industries, Israele. Dimetilsolfossido (DMSO, lotto P8G647208G) è stato acquistato

da Carlo Erba Reagenti, Italia, e la soluzione di tampone fosfato (PBS 10X, Phosphate Buffer Solution) da VWR Chemicals, LLC, USA. Collagene da tendine di ratto acquistato da Sigma-Aldrich, Italia.

10. METODI

10.1 Preparazione delle miscele

10.1.1 Preparazione di miscela chitosano-proteine del siero del latte isolato

Le due miscele [bCS:WPI^M_D] e [bCS:WPI^M]_D sono state ottenute a partire da due madri di bCS al 4% p/v (soluzione A) e di WPI al 4% p/v (sospensione B). Per la preparazione della soluzione A, il bCS è stato disciolto in acido acetico 0,5 M a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica vigorosa *overnight*. In seguito a completa dissoluzione del polimero, la soluzione è stata centrifugata a 8000 rpm (Centrifuga Hermle Z326K) per 10 minuti a 20°C al fine di rimuovere i residui di lavorazione del polimero.

La sospensione B è stata, invece, ottenuta disperdendo le WPI in H₂O MilliQ a temperatura ambiente, mantenendo per circa 3 ore una blanda agitazione magnetica, date le proprietà schiumogene della proteina; successivamente, la soluzione B è stata basificata con NaOH 2 M fino a pH 7,5 (pHmetro Seven Compact, Mettler Toledo).

Infine, le miscele sono state preparate unendo le madri A e B in rapporto 1:1 p/p, secondo due diverse condizioni: i) per la miscela $[bCS:WPI^M_D]$, la sospensione B è stata denaturata a 70°C per 20 minuti, sotto blanda agitazione magnetica, e successivamente è stata aggiunta alla soluzione A; la miscela così ottenuta è stata agitata per un'ora a temperatura ambiente (Figura 20A); ii) per la miscela $[bCS:WPI^M]_D$, la sospensione B è stata aggiunta alla soluzione A, la miscela è stata lasciata agitare per un'ora a temperatura ambiente, successivamente è stata trattata termicamente a 70°C per 20 minuti, sotto blanda agitazione magnetica (Figura 20B).

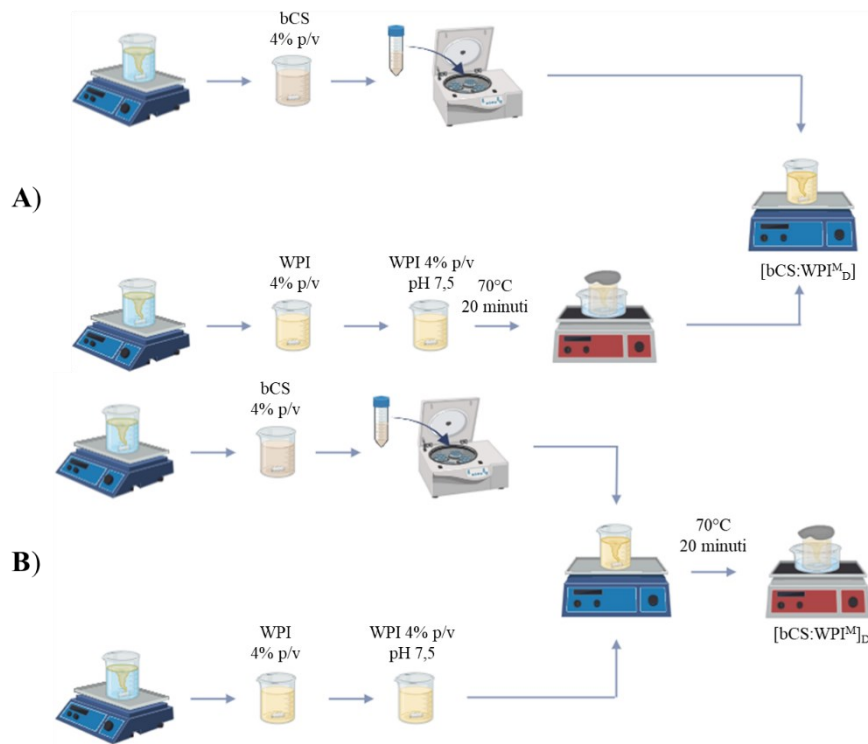


Figura 20 – Schema di preparazione della miscela (A) $[bCS:WPI^M_D]$ e (B) $[bCS:WPI^M]_D$ (Biorender.com).

10.1.2 Preparazione di miscele trimetilchitosano-proteine del siero del latte isolato

Le due miscele $[TMC:WPI_D]$ e $[TMC:WPI]_D$ sono state preparate a partire da due madri di TMC al 4% p/V (soluzione A) e di WPI al 4% p/V (sospensione B). La soluzione A è stata preparata andando a solubilizzare il TMC in H_2O MilliQ a temperatura ambiente e sotto agitazione magnetica vigorosa *overnight*. La sospensione B, invece, è stata ottenuta come descritto nel Paragrafo 10.1.1.

Le due madri, A e B, sono state miscelate in rapporto 1:1 p/p secondo due diverse condizioni: i) per la miscela $[TMC:WPI]_D$, la sospensione B è stata denaturata a 70°C per 20 minuti, sotto blanda agitazione magnetica, e successivamente è stata aggiunta alla soluzione A; la miscela così ottenuta è stata agitata per un'ora a temperatura ambiente (Figura 21A); ii) per la miscela $[TMC:WPI]_D$, la sospensione B è stata aggiunta alla soluzione A, la miscela è stata lasciata ad agitare per un'ora a temperatura ambiente, successivamente è stata trattata termicamente a 70°C per 20 minuti, sotto blanda agitazione magnetica (Figura 21B).

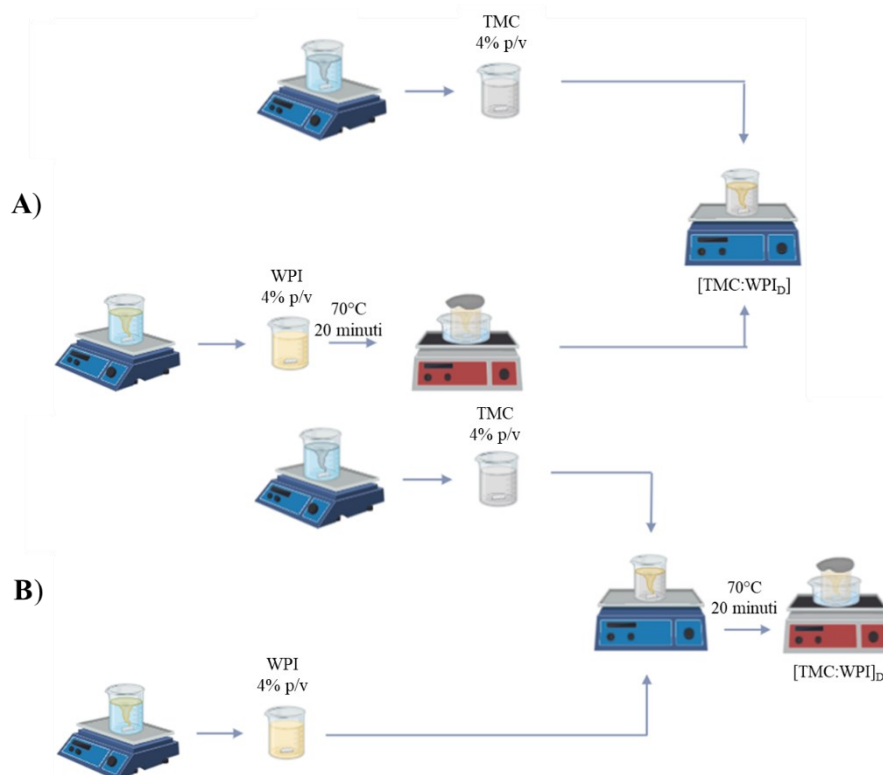


Figura 21 – Schema di preparazione della miscela (A) $[TMC:WPI]_D$ e (B) $[TMC:WPI]_D$ (Biorender.com).

10.2 Preparazione dei film

Per la preparazione dei film a base delle quattro miscele $[bCS:WPI]_D^M$, $[bCS:WPI]_D^M$, $[TMC:WPI]_D$, $[TMC:WPI]_D$ è stato utilizzato il metodo del *solvent casting* (Figura 22). Per ogni film sono stati impiegati 4 mL di ciascuna miscela, distribuiti all'interno di uno stampo in silicone ($\varnothing = 3,5$ cm) evitando la formazione di bolle che potrebbero interferire con l'ottenimento di film omogenei. Successivamente, lo stampo è stato posto sotto cappa chimica (Labosystem Typhoon,

velocità di aspirazione di 0,5 m/s) con aspirazione accesa per 48 ore, in modo tale da favorire l'evaporazione del solvente e, di conseguenza, la formazione del film.

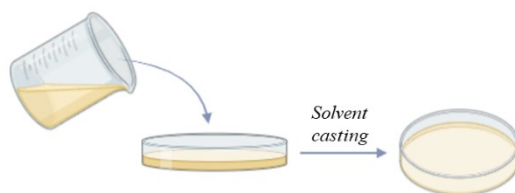


Figura 22 - Preparazione film mediante il metodo del solvent casting (Biorender.com).

10.3 Caratterizzazione dei film

10.3.1 Microscopia elettronica a scansione

L'analisi morfologica microscopica dei film è stata condotta mediante microscopio elettronico a scansione (*Scanning Electron Microscope, SEM*), un microscopio che utilizza come sorgente di radiazioni un fascio di elettroni primari focalizzati che colpiscono il campione. Il fascio di elettroni primario, interagendo con gli atomi del campione, determina l'emissione di un fascio di elettroni secondario che viene raccolto da un rivelatore e convertito in un'immagine in bianco e nero ad elevata risoluzione e grande profondità di campo. La sorgente di elettroni di un microscopio elettronico a scansione è generalmente un filamento di tungsteno. Durante l'analisi microscopica, il campione è tenuto sottovuoto, poiché l'aria impedirebbe la generazione del fascio. Inoltre, il campione deve essere reso conduttivo, altrimenti produrrebbe cariche elettrostatiche che disturberebbero la rivelazione del segnale. Le misure di microscopia elettronica a scansione sono state eseguite con un microscopio elettronico a scansione *SEM Thermoscientific Phenom Pure* (Figura 23).

I campioni sono stati resi conduttivi mediante deposizione di oro da fase vapore sottovuoto attraverso l'apparecchiatura *Luxor 61us putter coater*.

Le immagini sono state acquisite ad un alto voltaggio, in alto vuoto, a temperatura ambiente e a diversi ingrandimenti: 1000X, 5000X, 10000X.



Figura 23 – SEM Thermoscientific Phenom Pure (sinistra) e Luxor 62us sputter coater (destra).

10.3.2 Proprietà meccaniche

Le proprietà meccaniche dei film sono state valutate attraverso un test di trazione eseguito mediante l'utilizzo del *TA.XT plus Texture Analyzer* (Stable Micro Systems, Godalming, UK) munito di una cella di carico da 5 kg e di un sistema di misura della trazione costituito da due morsetti fissati all'apparecchiatura tramite apposite viti (Figura 24). I film vengono tagliati in modo da ottenere una dimensione riproducibile per eseguire l'analisi (1 cm x 3 cm) e viene misurato lo spessore mediante lo spessimetro a quadrante (Sicutool 3955G-50). Il film viene successivamente posizionato tra le due ganasce poste ad una distanza iniziale di 1 cm; all'avvio dell'analisi, il braccio mobile dello strumento si muove verso l'alto ad una velocità pari a 1,8 mm/min (*pre-test speed* 60 mm/min, *post-test speed* 300 mm/min e una distanza massima di trazione pari a 50 mm). Per ogni campione sono state eseguite quindici repliche.

La seguente analisi ha permesso di calcolare la forza tensile, cioè la forza sopportabile dal film prima della sua rottura, e l'allungamento %, cioè la differenza tra la lunghezza iniziale e finale del film a seguito della rottura, calcolati come:

$$\text{Allungamento \%} = 100 \cdot \left(\frac{l_{\max} - l_{\text{iniziale}}}{l_{\text{iniziale}}} \right)$$

$$\text{Forza tensile} = \frac{F_{\max}}{\text{cross area}}$$



Figura 24 - TA.XT plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Godalming UK).

10.3.3 Perdita e contenuto di solvente

La perdita di solvente % (*solvent loss*, SL) durante il processo di formazione del film è pari alla quantità di solvente necessaria per idratare il film alla forma originale e si riferisce alla quantità di essudato che può essere assorbita dal film prima che si trasformi in un gel a flusso libero che può essere lavato via dalla superficie della ferita (Savencu et al., 2021). Nota la perdita di solvente è stato possibile calcolare la percentuale di acqua rimasta nella struttura del film (contenuto di solvente residuo).

Per il seguente esperimento, sono stati dispensati 4 mL per la formazione di ciascun film in una Petri ($\varnothing = 3,5$ cm) ed è stato registrato il peso iniziale. Dopo 48 ore di essiccamento sotto cappa a flusso laminare (Labosystem Typhoon, velocità di aspirazione di 0,5 m/s), si procede a pesare la Petri contenente il film asciutto e si annota il peso finale. Per ogni campione sono state eseguite tre repliche.

La perdita di solvente % è stata calcolato come:

$$\text{Perdita di solvente \%} = \frac{\text{peso iniziale} - \text{peso finale}}{\text{peso iniziale}} \cdot 100$$

Mentre la percentuale di acqua residua nella struttura del film come:

$$\text{Contenuto di solvente residuo (\%)} = 100 - SL$$

10.3.4 Proprietà di idratazione

Per valutare le proprietà di idratazione dei film, è stato calcolato l'indice di rigonfiamento (*Swelling Index*, SI) dei film in un ambiente simulante la ferita (Ahmad et al., 2020). Per l'analisi, si prepara una soluzione di gelatina al 4% p/V utilizzata come mezzo di rigonfiamento; in breve, si solubilizza a caldo (65°C) la gelatina in H₂O MilliQ sotto blanda agitazione magnetica. Si distribuiscono 20 mL di

questa soluzione in una piastra Petri ($\varnothing = 5$ cm) e si lascia riposare a temperatura ambiente durante la notte. Per l'esecuzione del test ogni film, con un diametro iniziale (\varnothing_{t0}) standardizzato pari a 2,4 cm, è stato posto al centro della piastra Petri. Successivamente, è stato misurato il diametro dei film ai seguenti intervalli di tempo (\varnothing_t): 15, 30, 300 minuti e 1, 2, 3, 4, 6 ore. Per ogni campione sono state eseguite tre repliche.

L'indice di rigonfiamento (SI) è stato calcolato utilizzando la seguente equazione:

$$SI (\%) = \frac{\varnothing_t - \varnothing_{t0}}{\varnothing_{t0}} \cdot 100$$

10.3.5 Proprietà di bioadesione

La bioadesione dei film è stata valutata utilizzando lo strumento *TA.XT plus Texture Analyzer* descritto nel Paragrafo 10.3.2.

Un gel di gelatina 10% p/v è stato preparato solubilizzando a caldo (65°C) la gelatina in H₂O MilliQ sotto blanda agitazione magnetica. Si dispensano 20 mL di questa soluzione in una piastra Petri ($\varnothing = 5$ cm) e si lascia riposare a temperatura ambiente durante la notte. Una volta asciutto, il gel di gelatina è stato condizionato con un fluido simulante l'essudato (*Simulated Wound Fluid – SWF*), contenente 0,68 g NaCl, 0,22 g KCl, 0,35 g NaH₂PO₄, 2,5 g NaHCO₃ in 100 mL di H₂O MilliQ (pH = 8,3±0,01). Le misure sono state condotte alla temperatura costante di 32°C, per mezzo di un bagnetto termostato (Boateng et al., 2015).

I film sono stati fissati alla sonda P/0,5R con l'ausilio di nastro biadesivo. La sonda con il film adesivo viene abbassata per mettere a contatto il campione con il substrato. L'analisi è stata condotta impostando i seguenti parametri sperimentali: *pre-test speed* 0,5 mm/s, *test speed* 0,5 mm/s, *post-test speed* 1,00 mm/s e applicando una forza di precarico di 1 N per 600 s. Trascorsi i 600 s, la sonda è stata alzata fino a completa separazione dell'interfaccia bioadesiva, nonché “distacco” del film dal substrato biologico. Per ogni campione sono state eseguite quattro repliche. Il lavoro totale di adesione è stato calcolato utilizzando il software Texture Exponent.

10.4 Preparazione dei MN

Per la preparazione dei MN sono stati utilizzati gli stampi *MPatchTM Microneedle Templates* (Micropoint Technologies, Singapore). Questi stampi sono realizzati andando a colare una soluzione di polidimetilsilossano (PDMS) in stampi di acciaio inossidabile. Gli stampi utilizzati per questo progetto sono tre, caratterizzati da dimensioni e numero di aghi differenti:

- Stampo 15x15 H600, caratterizzato da un *array* di aghi 15x15, dimensione del *patch* 8 mm x 8 mm, profondità dell'ago 600 μm , base dell'ago 200 μm e distanza tra due punte pari a 500 μm (Figura 25)
- Stampo 10x10 H600, caratterizzato da un *array* di aghi 10x10, dimensione del *patch* 8 mm x 8 mm, profondità dell'ago 600 μm , base dell'ago 200 μm e distanza tra due punte pari a 500 μm (Figura 25)
- Stampo 10x10 H800, caratterizzato da un *array* di aghi 10x10, dimensione del *patch* 8 mm x 8 mm, profondità dell'ago 800 μm , base dell'ago 200 μm e distanza tra due punte pari a 500 μm (Figura 25)



Figura 25 - Stampi *MPatchTM Microneedle Templates* 15x15 H600 (sinistra), 10x10 H600 (centro), 10x10 H800 (destra).

I MN sono stati preparati attraverso il metodo di *solvent casting* (Figura 26) utilizzando le quattro miscele di [bCS:WPI^M_D], [bCS:WPI^M]_D, [TMC:WPI]_D, [TMC:WPI]_D.

Per conoscere il volume di miscela necessario al fine di riempire interamente lo stampo è stato calcolato il volume degli aghi per ogni stampo stampi:

$$\text{Volume totale stampi } 15 \times 15 \text{ H600} = \frac{200^2 \cdot 600}{3} \cdot 225 = 1,8 \text{ mL}$$

$$\text{Volume totale stampi } 10 \times 10 \text{ H600} = \frac{200^2 \cdot 600}{3} \cdot 100 = 0,8 \text{ mL}$$

$$\text{Volume totale stampi } 10 \times 10 \text{ H800} = \frac{200^2 \cdot 800}{3} \cdot 225 = 1 \text{ mL}$$

$$\text{Volume backing layer} = 8 \cdot 8 \cdot 1 = 64 \text{ mm}^3 = 64 \mu\text{L} \sim 100 \mu\text{L}$$

Per rendere più efficiente e riproducibile la preparazione dei MN, il volume totale da dispensare è stato suddiviso in iniezioni da 200 μL ciascuna.

Prima di procedere, ogni miscela è stata sonicata per 10 minuti con degas a temperatura ambiente in modo da eliminare eventuali bolle d'aria presenti; successivamente, sono stati dispensati 200 μL di miscela nello stampo, che è stato posizionato all'interno di una Falcon in plastica per la fase di centrifugazione. La centrifugazione è stata eseguita per 5 minuti dopo ogni iniezione, al fine di assicurare il completo riempimento della cavità da parte della soluzione, utilizzando i seguenti parametri: 5900 rpm, temperatura 25°C e velocità 8. Questa operazione è stata ripetuta 4 volte per lo stampo 10x10 H600, 5 volte per lo stampo 10x10 H800 e 9 volte per lo stampo 15x15 H600. Una volta terminata la fase di riempimento degli aghi, si dispensano 100 μL per la formazione del *backing layer*. Gli stampi sono poi stati lasciati ad asciugare sotto cappa a flusso laminare tutta la notte prima di procedere alla rimozione dei MN formati.

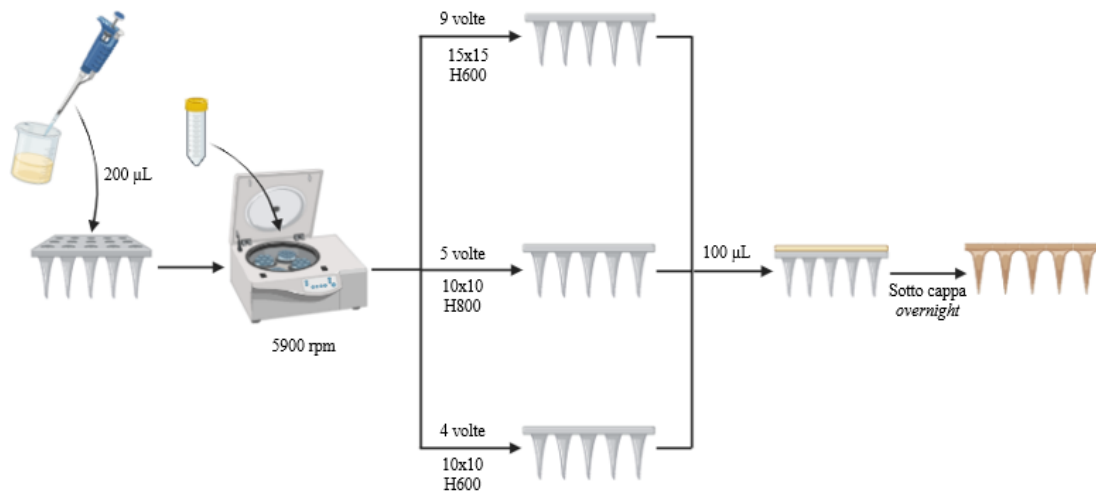


Figura 26 – Metodo di preparazione dei MN (Biorender.com).

10.5 Caratterizzazione MN

10.5.1 Microscopia ottica

L'analisi morfologica dei MN è stata condotta mediante microscopio ottico, uno strumento composto da un sistema ottico e un sistema di illuminazione. Il sistema ottico comprende due lenti e il tubo in cui sono inserite. Le due lenti sono l'oculare,

che è la lente in cui si appoggia l'occhio, e l'obiettivo, situato vicino all'oggetto da osservare. Il sistema di illuminazione, invece, è costituito da uno specchio che, se orientato adeguatamente, permette al raggio di luce, proveniente dalla sorgente, di riflettere sull'oggetto. Il campione viene posto su un vetrino collocato sul tavolino portaoggetti, che ha un foro che consente il passaggio della luce proveniente dallo specchio. Il campione, quindi, viene attraversato dalla luce proveniente dallo specchio dal basso verso l'alto e la sua immagine viene poi ingrandita dal sistema ottico.

Le misure di microscopia ottica sono state eseguite con un microscopio ottico *Leica DM-2000* a un ingrandimento 4X (Figura 27).



Figura 27 – *Microscopio ottico Leica DM-2000.*

10.5.2 Microscopia elettronica a scansione

La valutazione morfologica microscopica dei MN è stata condotta mediante microscopia elettronica a scansione (*Scanning Electron Microscope, SEM*). Come descritto nel Paragrafo 10.3.1, i campioni sono stati resi conduttivi mediante deposizione di 15 nm di oro da fase vapore sottovuoto. Le immagini sono state acquistate ad un alto voltaggio, in alto vuoto, a temperatura ambiente e a diversi ingrandimenti: 1000X, 5000X, 10000X.

Per alcuni campioni selezionati sono state ottenute immagini SEM con un microscopio elettronico a scansione a fascio ionico plasma focalizzato ad alte prestazioni Dual Beam AMBER X (FIB-SEM) (Tescan Group a.s., Brno – Kohoutovice, Repubblica Ceca), equipaggiato con una sorgente di elettroni a emissione di campo Schottky (catodo caldo). I campioni sono stati rivestiti con carbonio mediante un sistema di sputtering Nanotech Polaron-SEMPREP2 (Polaron

Equipment Ltd., Watford, Regno Unito) prima di essere esaminati. Questo strumento ha permesso di catturare le immagini con un piano di inclinazione di 55°.

10.5.3 Proprietà meccaniche

Le proprietà meccaniche sono state valutate attraverso il test di compressione, effettuato mediante lo strumento *TA.XT plus Texture Analyzer* (Stable Micro Systems, Godalming, UK) dotato di cella di carico da 5 kg e sistema di misura cilindrico con diametro di 13 mm (P/0,5R) in grado di scendere e comprimere il campione percorrendo una distanza pari all'80% dell'altezza dello stesso. Per l'analisi sono stati impostati i seguenti parametri di processo: *pre-test speed* 1,0 mm/s, *test speed* 0,01 mm/s, *post-test speed* 0,5 mm/s (Fonseca et al., 2020).

Lo strumento ha permesso di misurare la forza necessaria ad impartire una deformazione nel campione pari all'80% dell'altezza dello stesso. Per ogni campione sono state eseguite sei repliche.

10.5.4 Perdita di solvente

La perdita di solvente (*solvent loss*, SL) è stata valutata per stimare l'evaporazione del solvente durante l'asciugatura del MN sotto cappa.

Il MN è stato prodotto come riportato nel Paragrafo 10.4 e lo stampo è stato pesato prima (massa iniziale, M_i) e dopo l'asciugatura sotto cappa a flusso laminare (massa finale, M_f). Per ogni campione sono state eseguite tre repliche. Noto il peso iniziale e finale del MN è possibile calcolare il *solvent loss* secondo la seguente equazione:

$$SL (\%) = \frac{M_i - M_f}{M_i} \cdot 100$$

10.5.5 Proprietà di bioadesione

Le proprietà di bioadesione dei MN sono state valutate utilizzando lo strumento *TA.XT plus Texture Analyzer* (Stable Micro Systems, Godalming, UK), come descritto nel Paragrafo 10.3.5. Per ogni campione sono state eseguite quattro repliche. Il lavoro totale di adesione è stato calcolato utilizzando il software *Texture Exponent* (Boateng et al., 2015).

10.5.6 Test di inserzione nel Parafilm®

Per gli studi di inserzione dei MN nella cute, la letteratura scientifica propone approcci alternativi volti a superare le limitazioni dei test *in vitro*, come omogeneità e riproducibilità, sostituendo i tessuti biologici con membrane sintetiche come il Parafilm® (Chen et al., 2022). Il Parafilm® ha proprietà fisiche simili alla pelle suina e può sostituire i campioni biologici; pertanto, è stato utilizzato come barriera cutanea modello per condurre il test di inserzione.

Per l'esperimento, il Parafilm® (Laboratory Film, USA) è stato piegato in otto strati per simulare lo spessore della pelle escissa, ~1,6 mm, seguendo un metodo precedentemente riportato (Larrañeta et al., 2014°). I MN utilizzati per questo test sono stati quindi inseriti negli strati di Parafilm® utilizzando *TA.XT plus Texture Analyzer* (Stable Micro Systems, Regno Unito) con probe P/20P e applicando una forza di 40 N per 30 secondi (Figura 28). Per l'analisi sono stati impostati i seguenti parametri di processo: *pre-test speed* 1,0 mm/s, *test speed* 0,01 mm/s, *post-test speed* 0,5 mm/s. Per misurare il rapporto e la profondità di inserimento, ogni strato di Parafilm® è stato esaminato al microscopio ottico e il numero di fori è stato conteggiato.

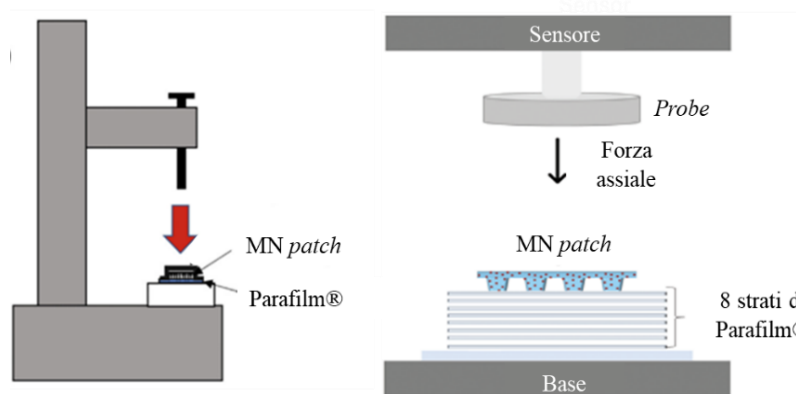


Figura 28 – Schematica illustrazione del test di inserzione del MN utilizzando il *TA.XT plus Texture Analyzer* (Larrañeta et al., 2014).

10.5.7 Test di inserzione in modello di pelle umana

Per valutare la capacità di inserimento dei MN nella pelle è stato realizzato un modello, noto in letteratura e ideato da Lir et al., 2007, che simula le proprietà meccaniche e superficiali della pelle umana. Si tratta di una composizione proteico-lipidica dotata di capacità di formare un film. La composizione è a base di gelatina

plasticizzata con glicerolo, polisaccaridi e una miscela di lipidi che imita la struttura lipidica della pelle e crea una superficie idrofobica. Per migliorare la stabilità idrolitica del materiale, la composizione è stata reticolata con formaldeide, producendo una matrice rigonfiabile in acqua, ma insolubile.

Per la preparazione del modello mimante la pelle umana: 5 g di gelatina 175g-Bloom sono stati dissolti in 95 mL di H₂O MilliQ a 55°C; la soluzione è stata portata a pH 9,0 con NaOH 1 M. Successivamente, 8 g di Natrosol sono stati dissolti nella soluzione di gelatina con 0,2 g di glicerolo. Dopo di che, 0,4 g di Prolipid™ 141 (Ashland, Svizzera) sono stati dissolti in 2 mL di etanolo caldo a 60°C per 5 minuti e miscelati con la soluzione di gelatina ottenendo una dispersione bianca. Infine, vengono aggiunti 2 mL di formaldeide per reticolare il materiale. Dopo essere stata miscelata, la soluzione ottenuta viene disposta su una piastra Petri (Ø = 9 cm) e lasciata asciugare sotto cappa a flusso laminare.

Il modello mimante la pelle umana così ottenuto è stato utilizzato per il test di inserimento dei MN come segue: si applica il MN con l'ausilio dell'apposito applicatore Mpatch™ Micro Applicator (Micropoint Technologies, Singapore). Per ogni campione sono state effettuate tre repliche.

Si osserva il substrato al microscopio ottico (Leica DM-2000), come descritto nel Paragrafo 10.5.1, in modo da calcolare il *penetration ratio*% (PR%) secondo la seguente formula:

$$PR\% = \frac{\text{Numero fori formati}}{\text{Numero fori possibili}} \cdot 100$$

10.5.8 Dissoluzione

I MN a base di [bCS:WPI^M]_D e di [TMC:WPI]_D sono stati sottoposti a studi di dissoluzione nel tempo. In particolare, il saggio dell'acido bicinconinico (BCA) è stato utilizzato per quantificare le WPI liberate da ciascun MN, nel tempo.

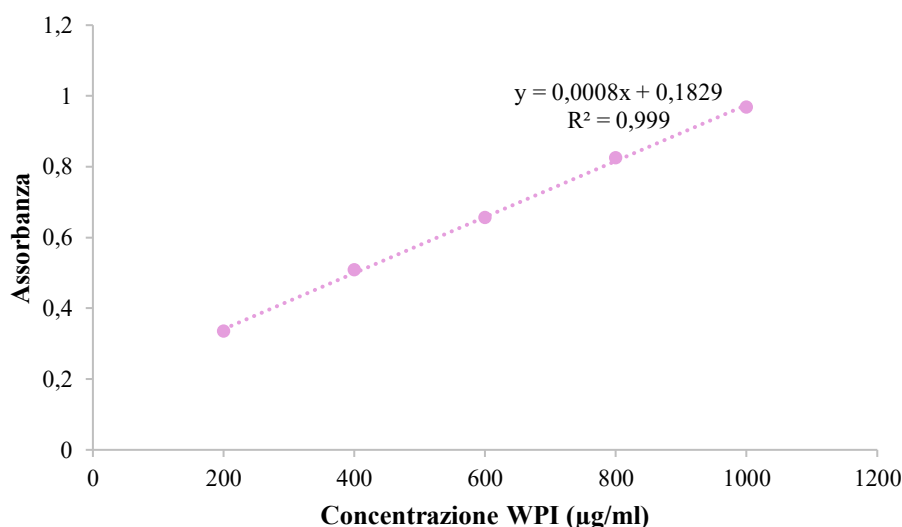
Per il test, è stata utilizzata una *multiwell* da 6 pozzetti contenenti 5 mL di NaCl 0,15 M ciascuno, come indicato sul manuale del kit BCA (Sigma Aldrich). Ogni MN è stato inserito all'interno di un pozzetto e a tempi crescenti (1, 2, 3, 5, 7, 10, 12, 15, 17 e 20 minuti) sono stati prelevati 25 µL, sostituiti ogni volta con NaCl fresco (Ryall et al., 2022). Ogni prelievo è stato fatto reagire con gli ioni rameosi e il

reagente di BCA; sono state eseguite cinque repliche per ogni campione. Il principio alla base di questo saggio prevede la formazione di un complesso Cu^{2+} -proteina in condizioni alcaline e dalla successiva reazione di ossido-riduzione del Cu^{2+} a Cu^{1+} , da parte di cisteina, triptofano, tirosina e legami peptidici presenti nelle WPI; di conseguenza la quantità del prodotto di riduzione è proporzionale alla quantità di proteina liberata. L'acido bicinconico forma un complesso viola-blu con Cu^{1+} in ambienti alcalini, fornendo la possibilità di monitorare la reazione, tramite la lettura dell'assorbanza a 562 nm.

L'analisi spettrofotometrica a 562 nm permette di determinare, quindi, la concentrazione del prodotto di riduzione (Cu^{1+}) in soluzione, proporzionale alla quantità di WPI liberate nel mezzo. Questa concentrazione viene calcolata per interpolazione grafica mediante l'equazione di una retta di calibrazione ottenuta per concentrazioni di WPI comprese tra 200 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$, utilizzate come standard di riferimento (Figura 29). Considerando che le WPI rappresentano la metà della composizione totale di biomateriale utilizzato per la preparazione di ciascun MN, è stata calcolata, come segue, la % di MN dissolto:

$$\% \text{ MN dissolto} = \frac{\text{mg reali di WPI}}{\text{mg teorici di WPI}}$$

Dove i mg reali di WPI corrispondono a quelle misurati con il saggio BCA; mentre i mg teorici di WPI sono rappresentati dalla metà del peso di ogni MN.



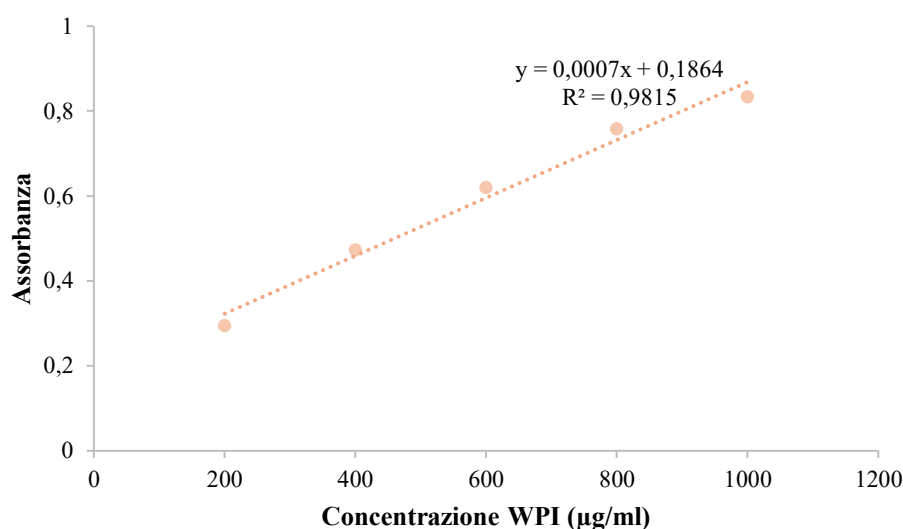


Figura 29 – Retta di calibrazione delle WPI nella miscela [TMC:WPI]_D (in alto) e nella miscela [bCS:WPI^M]_D (in basso).

10.5.9 Proprietà di rigonfiamento

Per testare la capacità di rigonfiamento dei MN a base di [bCS:WPI^M]_D 10x10 H600 e H800, ogni *patch* è pesato e poi immerso in 5 ml di PBS, che mima il fluido interstiziale epidermico ed è comunemente utilizzato in test di rigonfiamento simili (Ngadaonye et al., 2013; Ryall et al., 2022). Il *patch* è stato rimosso e pesato dopo 1, 3, 5, 10, 24 e 48 ore dall’immersione. Non è stato necessario proseguire con ulteriori misurazioni, poiché i MN hanno iniziato a perdere integrità strutturale. Le variazioni di peso dovute all’assorbimento d’acqua sono state registrate come percentuale del peso originale, utilizzando la formula riportata di seguito (Yu et al., 2021):

$$\text{Swelling ratio \%} = \frac{(\text{Peso al tempo } t - \text{Peso iniziale})}{\text{Peso iniziale}} \cdot 100$$

10.5.10 Proprietà di degradazione

Il test di degradazione dei MN [bCS:WPI^M]_D 10x10 H600 e H800 è stato eseguito ponendo i campioni a contatto con 5 ml di PBS, usato come mezzo di degradazione, a temperatura ambiente. Il parametro di risposta considerato è la variazione di peso dopo 10 ore di immersione e ogni 24 ore, per 14 giorni consecutivi (Z. Luo et al., 2019; Ryall et al., 2022). Per ciascun campione sono state eseguite cinque repliche.

La percentuale di MN degradato è stata calcolata come:

$$\% \text{ degradazione} = \frac{\text{Peso al tempo } t}{\text{Peso iniziale umido}} \cdot 100$$

10.6 Biocompatibilità *in vivo*

Allo scopo di valutare la sicurezza *in vivo*, i MN selezionati sono stati sottoposti a un saggio di biocompatibilità su un modello animale. Tutti gli esperimenti sugli animali sono stati eseguiti in piena conformità con le linee guida etiche internazionali standard (Direttiva del Consiglio delle Comunità Europee 2010/63/UE) approvate dal Ministero della Salute italiano (D.L. 116/92). Il protocollo seguito è stato approvato dal Comitato Etico Istituzionale Locale dell'Università di Pavia per l'uso di animali e dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS). In dettaglio, sei ratti maschi (Wistar 200–250 g, Envigo RMS S.r.l.) sono stati sottoposti a trattamento anestetico con equitensina a 3 mL/kg (39 mM pentobarbital, 256 mM cloralio, 86 mM MgSO₄, 10% v/v etanolo, e 39,6% v/v glicole propilenico), e il loro dorso è stato rasato per rimuovere tutti i peli. In vista dell'applicazione *in vivo*, i MN 10x10 H600 [bCS:WPI^M]_D e [TMC:WPI]_D e i MN 10x10 H800 [bCS:WPI^M]_D e [TMC:WPI]_D selezionati sono stati preparati in condizioni sterili sotto cappa a flusso laminare e sottoposti a cicli di radiazioni UV prima dell'applicazione. Successivamente, sono stati impiantati sottocute in un'incisione di 8 mm effettuata sulla schiena di ciascun ratto. Le incisioni sono state poi suturate utilizzando strip (Steri-Strip Suture, Italia). Le biopsie a tutto spessore sono state raccolte in corrispondenza delle incisioni 18 giorni dopo l'impianto, e un'analisi istologica è stata effettuata. Inoltre, è stata raccolta una biopsia di pelle sana per confronto. Alcune sezioni sono state colorate con ematossilina ed eosina (Hematoxylin&Eosin, H&E), mentre altre con rosso Picrosirius (PSR). Dopo la deparaffinizzazione, le sezioni sono state idratate, leggermente colorate con ematossilina di Weigert per identificare i nuclei, e poi colorate con PSR (1 ora). Il metodo di polarizzazione del PSR è una delle migliori tecniche di istochimica del collagene, ed è particolarmente utile per evidenziare l'organizzazione e l'eterogeneità delle fibre di collagene nei diversi tessuti connettivi. La valutazione in luce polarizzata della colorazione PSR ha identificato le vecchie fibre di collagene I spesse come arancione-rosso e le nuove fibre, ricche di

collagene III, come verdi. Successivamente, dopo la disidratazione, lo xilene è stato utilizzato per pulire ogni sezione, che è stata poi montata con un medium di montaggio DPX. Le sezioni colorate sono state osservate con un microscopio ottico (Carl Zeiss Axiophot). Una fotocamera digitale a 5 megapixel CCD Nikon DS-Fi2 è stata utilizzata per catturare le immagini.

10.7 Test in vitro su fibroblasti

10.7.1 Coltura di fibroblasti del derma umano

I fibroblasti sono stati mantenuti in coltura all'interno di *flask* di polistirene (Cellstar® *tissue culture flasks*, Grainer Bio-One, Italia) in terreno di coltura completo (CM), costituito da DMEM-HG addizionato del 10% v/v di FBS, precedentemente inattivato in bagno termostato a 56°C per 30 minuti, e dell'1% v/v di una soluzione a base di penicillina/streptomina/amfotericina 100X. I fibroblasti sono stati mantenuti in incubatore (CO₂ Incubator, PBI International, Italia) a 37°C, con umidità relativa pari al 95% e in presenza del 5% di CO₂.

La morfologia e la proliferazione delle cellule sono state valutate giornalmente mediante osservazione al microscopio a ottica inversa. La crescita delle cellule in coltura procede fino alla confluenza, ovvero il momento in cui le cellule occupano l'intera superficie disponibile e si ha la cosiddetta coltura confluyente; i fibroblasti raggiungono la confluenza circa 7 giorni dopo la semina, pertanto, dopo una settimana la crescita si arresta per il fenomeno di inibizione da contatto. Per evitare questo fenomeno, le cellule devono essere staccate dal fondo della *flask* e trasferite quando raggiungono il 70-80% di confluenza.

10.7.2 Tripsinizzazione delle cellule

La tripsinizzazione ha lo scopo di staccare le cellule tra loro e dal supporto di coltura; si tratta di un'operazione eseguita quando è necessario trasferire le cellule in coltura ovvero ogni qualvolta le cellule ricoprono circa l'80% della superficie a disposizione nella *flask*.

Una volta raggiunte condizioni di semi-confluenza, il terreno di coltura è rimosso e il monostrato cellulare lavato con PBS; al termine del lavaggio, il PBS viene rimosso e

una soluzione di tripsina-EDTA 2,5% viene aggiunta nella *flask*, in modo da entrare a contatto con le cellule. La tripsina (da cui prende il nome l'intera operazione di *splitting* delle cellule) è un enzima proteolitico in grado di degradare le proteine della matrice responsabili della promozione dell'adesione cellulare, mentre l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) è un chelante nei confronti degli ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} , indispensabili nei processi di adesione. Al fine di promuovere l'innesco del processo proteolitico, la *flask* viene trasferita in incubatore, a 37°C per 5 minuti; trascorso questo tempo, le cellule si distaccano dal supporto plastico e risultano in sospensione; per bloccare l'attività enzimatica, alle cellule in sospensione viene addizionato del terreno completo (in quantità doppia rispetto al volume di tripsina-EDTA impiegato). La sospensione cellulare viene infine trasferita in una provetta e centrifugata per 5 minuti a 1500 rpm (centrifuga Sorvall TC6; Sorvall Products, USA). Al termine della centrifugazione, il surnatante contenente la tripsina viene aspirato, prestando molta attenzione a non eliminare le cellule sedimentatesi sul fondo della provetta a formare un pellet. Al termine di queste operazioni le cellule sono risospese in terreno di coltura e contate; quindi, successivamente, seminate in una o più *flask* a seconda del loro numero e della velocità proliferativa.

I passaggi di tripsinizzazione (dove ogni operazione di tripsinizzazione viene definita passaggio) sopra descritti sono stati condotti sia per passare le cellule, una volta raggiunta la semi-confluenza, sia per staccarle in sede di esperimento.

10.7.3 Conta cellulare

La conta delle cellule in sospensione viene condotta utilizzando una camera conta globuli (Hycor Biomedical, USA). Un'aliquota di sospensione cellulare è diluita 1:1 v/v con una soluzione 0,5% p/V di Trypan Blue, un colorante che viene internalizzato solo dalle cellule morte, quindi trasferita nella camera conta globuli. L'osservazione al microscopio ad ottica inversa rende possibile la conta delle cellule vive. Una volta contate le cellule, per conoscere il numero totale di cellule in sospensione, si applica la formula riportata di seguito, dove 2 è il fattore di diluizione, 10000 è il fattore di correzione per il volume della camera conta globuli ed A il volume totale della sospensione di cellule.

$$\left(\frac{\text{cellule}}{\text{n}^\circ \text{ di quadranti}}\right) \cdot 2 \cdot 10000 \cdot A$$

10.7.4 Fibroblast-Populated Collagen Lattice System

I fibroblasti percepiscono la forza meccanica proveniente dal microambiente circostante durante la guarigione delle ferite e trasferiscono il segnale meccanico all'interno della cellula per prevenire l'apoptosi cellulare e promuovere la deposizione della ECM, il che può portare a fibrosi tissutale, un fattore chiave nello sviluppo delle cicatrici ipertrofiche. Per comprendere i meccanismi alla base dell'azione meccanoterapeutica dei MN sulle cicatrici patologiche, è stato creato un modello, nonché un sistema a reticolo di collagene popolato da fibroblasti (*Fibroblast-Populated Collagen Lattice System*, FPLC), per studiare gli effetti dei MN sulla contrazione dei fibroblasti (Q. Zhang et al., 2022).

Per la preparazione del modello FPLC è stato utilizzato collagene da tendine di coda di ratto (*collagen from rat tail tendon*, RTT – Sigma-Aldrich, Italia). Il collagene RTT è stato solubilizzato in CH₃COOH 20 mM per ottenere una concentrazione finale della soluzione pari a 5 mg/mL. Una volta idratato il collagene, è stato basificato con NaOH 1 M per arrivare a pH 7,4 (Q. Zhang et al., 2022).

Il modello tridimensionale di FPLC è stato preparato in una piastra da 12 pozzetti e in ogni pozzetto è stata dispensata una sospensione cellulare da 4 mL composta da: 2 mL di soluzione di collagene RTT 5 mg/ml addizionati a 1 mL di sospensione cellulare contenente 400 mila cellule e 1 mL di mezzo di coltura completo. La *multiwell* è stata incubata per 24 ore a 37°C, per promuovere la gelificazione del collagene. Dopo 1 giorno, si osserva la formazione di una matrice di collagene e si sostituisce il mezzo di coltura. Il mezzo viene cambiato anche dopo 48 e 72 ore.

Successivamente, con l'ausilio dell'applicatore MpatchTM Micro Applicator, il MN è stato applicato alla matrice di collagene. Il diametro della matrice di collagene è stato monitorato nel tempo fino a quando rimane costante (dopo 14 giorni) o si osservano sfaldamenti. Una volta ottenuti i diametri delle matrici è possibile andare a calcolare l'indice di contrazione come:

$$\text{Indice di contrazione} = 1 - \left(\frac{A}{A_0}\right)^2$$

Dove A è l'area della matrice di collagene al termine dell'esperimento e A_0 è l'area della matrice di collagene all'inizio dell'esperimento.

Inoltre, dopo 14 giorni, i modelli di FPLC sono stati sottoposti a misure di viscoelasticità attraverso il reometro rotazionale (*Modular Compact Rheometer 102*, Anton Paar s.r.l. Italia) con lo scopo di valutare il modulo elastico conservativo (G') nel sistema FPLC trattato e non trattato.

10.7.5 Misure di viscoelasticità

Il sistema FPLC, trattato e non trattato, è stato sottoposto a misure di *stress sweep* a 32°C , ad una frequenza (f) costante di 1 Hz e con un incremento dello *shear strain* da 0,1 a 20%, al fine di determinare la regione viscoelastica lineare (*linear-viscoelastic region*, LVE). Il valore di τ corrispondente ai 2/3 della porzione lineare rappresenta il massimo valore di sforzo di taglio applicabile sulla matrice per poter condurre misure di viscoelasticità in regime dinamico senza distrutturare il campione.

I campioni sono stati quindi sottoposti ad un *oscillation test*, impostando come sforzo di taglio il valore di τ scelto nella zona di viscoelasticità lineare. Le misure sono state condotte a temperatura costante (32°C) e a frequenza crescente, in un intervallo compreso tra 0,1 e 10 Hz. Per ciascuna matrice sono state eseguite tre repliche. I parametri presi in considerazione al fine della valutazione delle proprietà viscoelastiche sono stati il modulo elastico conservativo (G') e il modulo viscoso dissipativo (G'').

Tutte le misure di viscoelasticità sono state condotte mediante reometro rotazionale (*Modular Compact Rheometer 102*, Anton Paar s.r.l), utilizzando un sistema piatto-piatto (PP25; $O = 25 \text{ mm}$) (Figura 30).



Figura 30 – Reometro rotazionale Modular Compact Rheometer 102, Anton Paar s.r.l. Italia.

10.8 Analisi statistica

I valori sperimentali ottenuti dalle diverse misure sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante il *Multiple Range Rest* (MRT), effettuato con il pacchetto statistico *Statgraphics 5.0* (*Statistical Graphics Corporation*, Rockville MD, USA). Le differenze sono state considerate significative a $p < 0,05$.

Risultati e discussione

Nel presente lavoro di tesi sono state utilizzate miscele di WPI e chitosano (CS), o suo derivato l'N,N,N-trimetil chitosano (TMC), studiate e caratterizzate in un lavoro precedente. Si tratta di sostanze di origine naturale che si contraddistinguono per essere biocompatibili e biodegradabili e che condividono alcune somiglianze chimiche con i componenti della matrice extracellulare (Shelke et al., 2014). I polisaccaridi e le proteine mostrano una grande diversità strutturale e numerose proprietà intrinseche, che influenzano le proprietà meccaniche e la capacità di penetrazione dei MN, determinando anche la bioattività e la stabilità degli ingredienti farmaceutici, eventualmente veicolati (Quinn et al., 2015). A questa peculiarità, si aggiungono adeguate proprietà meccaniche, capacità di assorbimento di acqua, proprietà di barriera nei confronti dei gas e attività antibatterica; tutte caratteristiche che evidenziano la potenzialità d'impiego di queste sostanze in campo biomedico, farmaceutico e nella rigenerazione tissutale (Pino et al., 2021; Slota et al., 2021).

In una prima fase del lavoro, i biomateriali a base di CS a basso PM (bCS) o TMC e WPI, studiati in un precedente lavoro, sono stati utilizzati per lo sviluppo di film. Questi film sono stati ottenuti con il metodo del *solvent casting*; questo metodo verrà utilizzato anche nella seconda parte del lavoro per la preparazione di MN volti al trattamento delle cicatrici patologiche. È stata, quindi, condotta una caratterizzazione preliminare sui film per valutare il comportamento dei biomateriali in oggetto.

I risultati ottenuti nel lavoro precedente, hanno permesso di selezionare due condizioni sperimentali di preparazione delle miscele bCS/TMC-WPI: i) le miscele indicate con le sigle [bCS:WPI^M_D] e [TMC:WPI_D] sono state preparate a partire da una sospensione madre di WPI denaturata a 70°C per 20 minuti, che è stata successivamente aggiunta alla soluzione di polisaccaride (CS o TMC); ii) le miscele indicate con le sigle [bCS:WPI^M]_D e [TMC:WPI]_D, sono state preparate a partire da una sospensione madre di WPI non sottoposta al trattamento termico sopra citato, che è stato invece applicato alla miscela una volta preparata, come descritto nel Paragrafo 10.1.

A partire da queste miscele selezionate sono, inoltre, risultate essere biocompatibili *in vitro* e caratterizzate da proprietà antiossidante.

Utilizzando queste miscele sono stati preparati quattro diversi tipi di film, secondo il metodo descritto nel Paragrafo 10.2. È stato scelto il metodo del *solvent casting*, che

oltre ad essere lo stesso scelto per la preparazione dei MN, è anche una tecnica semplice, economica, che permette di ottenere dei film omogenei e uniformi, caratteristiche importanti in applicazioni come quelle biomediche (Borbolla-Jiménez et al., 2023).

In Figura 31 è possibile osservare che macroscopicamente i film appaiono omogenei e trasparenti; i film a base di bCS sono caratterizzati da un colore ambrato, mentre i film di TMC sono di colore più tenue (Leceta et al., 2013).

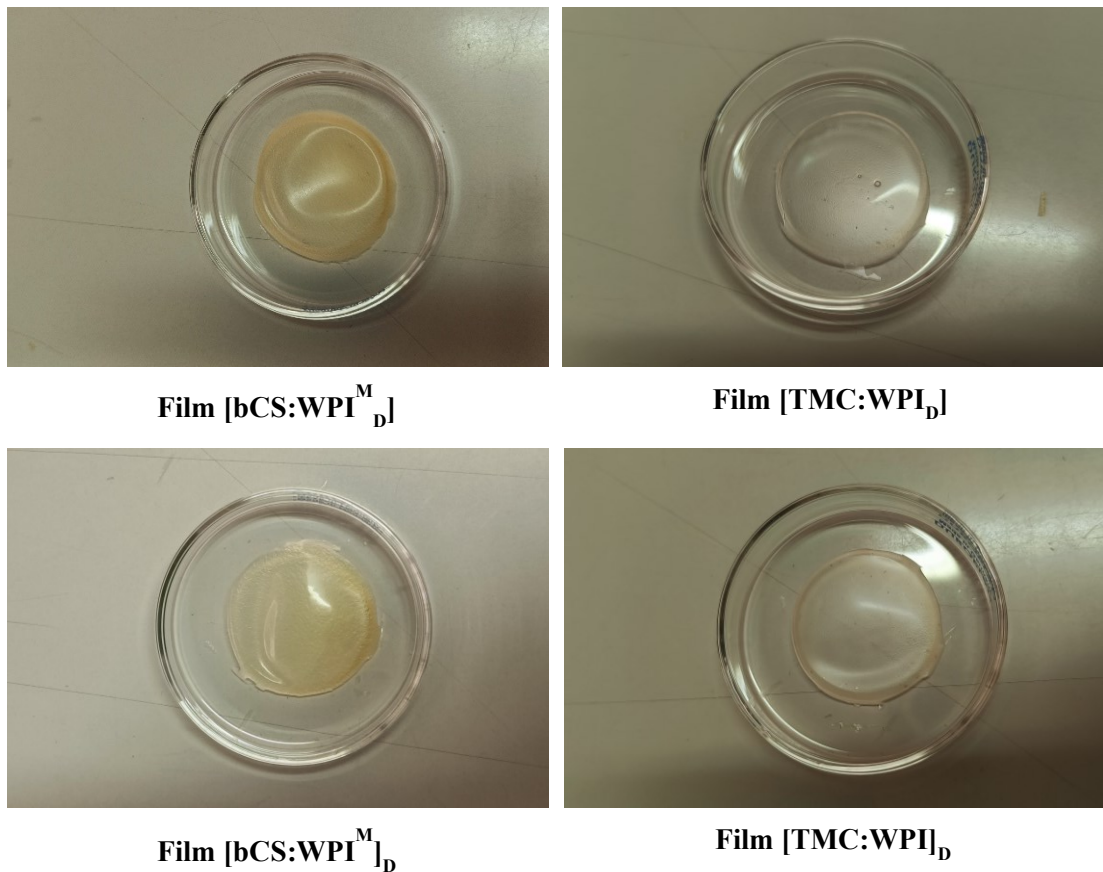
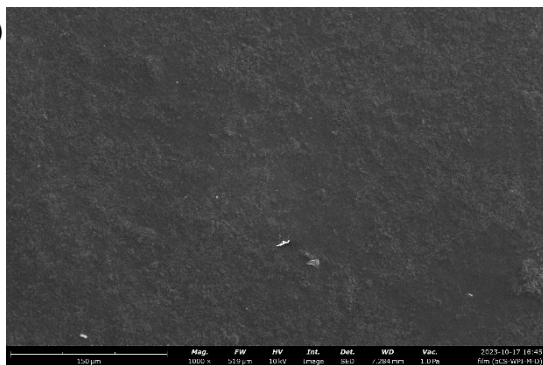


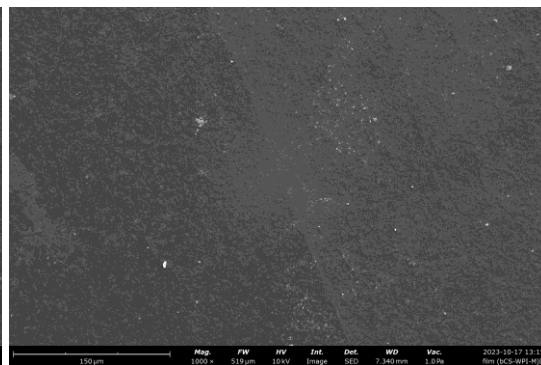
Figura 31 – Foto relative ai film $[bCS:WPI^M_D]$, $[bCS:WPI^M]_D$, $[TMC:WPI_D]$, $[TMC:WPI]_D$.

Le immagini SEM, in Figura 32A, mostrano la superficie dei film che appare continua, densa e senza la presenza di crepe o fratture. A livello microscopico, ad ingrandimenti 5000X e 10000X, rispettivamente in Figura 32B e C, si può osservare una evidente rugosità superficiale, dovuta alla presenza dei complessi PL-WPI, distribuiti omogeneamente su tutta la superficie (W. Xu et al., 2020). L'interazione tra le due macromolecole di carica opposta, infatti, produce un *network*, aumentando così la complessità della struttura (Huang et al., 2012).

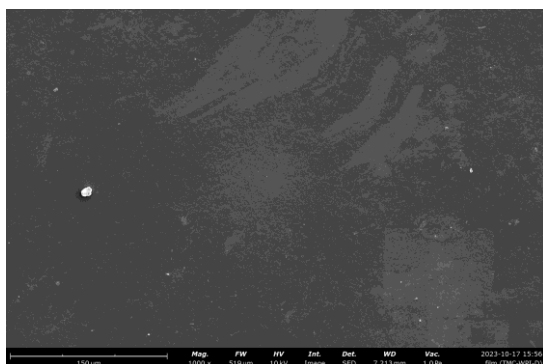
A)



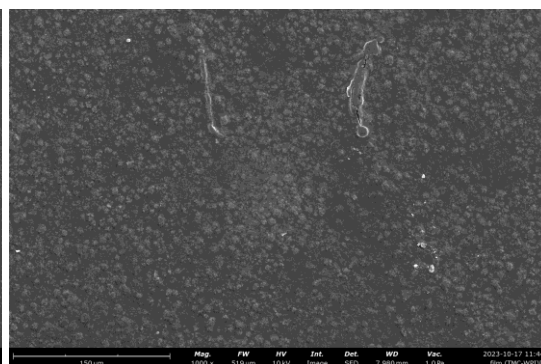
Film [bCS:WPI^M]_D



Film [bCS:WPI^M]_D

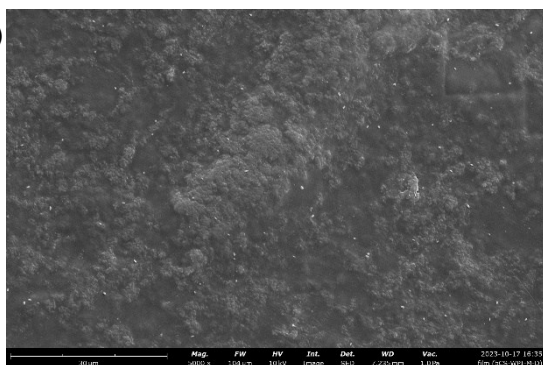


Film [TMC:WPI]_D

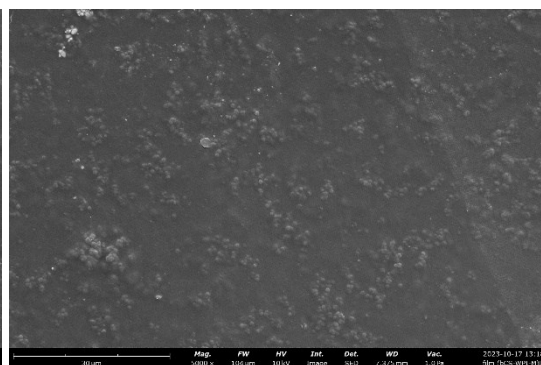


Film [TMC:WPI]_D

B)



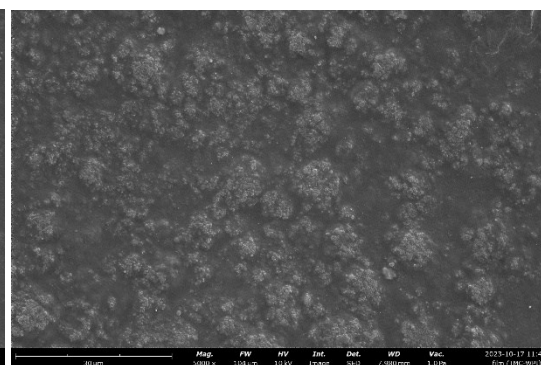
Film [bCS:WPI^M]_D



Film [bCS:WPI^M]_D



Film [TMC:WPI]_D



Film [TMC:WPI]_D

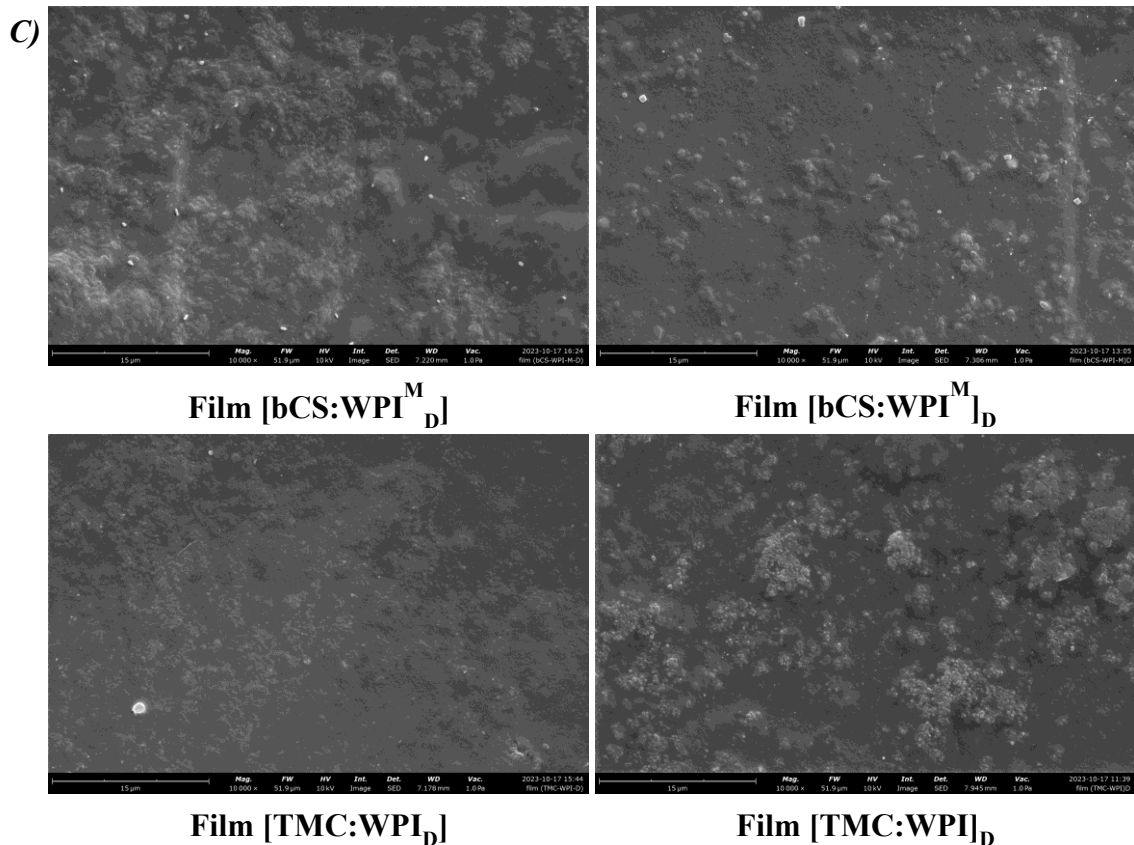


Figura 32 - Immagini SEM dei film [bCS:WPI^M]_D, [bCS:WPI^M]_D, [TMC:WPI]_D, [TMC:WPI]_D a diversi ingrandimenti: **A)** 1000X, **B)** 5000X, **C)** 10000X (SEM Thermoscientific Phenom Pure).

In Tabella III è riportato lo spessore di ogni film, misurato con lo spessimetro come descritto nel Paragrafo 10.3.1. I film devono essere caratterizzati da uno spessore uniforme per garantire, di conseguenza, proprietà meccaniche uniformi. Lo spessore è principalmente dovuto ad una omogenea distribuzione nello stampo del biomateriale utilizzato. A tal fine, è stata distribuita una quantità di biomateriale uguale per tutti e quattro i film, pari a 4 mL, e i film sono stati fatti asciugare nelle medesime condizioni su una superficie piana (Ahmad et al., 2020). Lo spessore dei film a base di TMC è inferiore, in linea con i risultati di forza tensile, di seguito discussi; questo risultato potrebbe essere dovuto a un peso molecolare del polisaccaride inferiore rispetto a bCS.

Tabella III - Valori di spessore dei film preparati attraverso il metodo di solvent casting (valori medi \pm d.s., $n=15$; ANOVA one-way; MRT (p -value $< 0,05$): a vs c, d; b vs c, d; c vs d).

Film	Spessore (mm)
^a [bCS:WPI ^M] _D	0,179 \pm 0,02

^b [bCS:WPI ^M] _D	0,178±0,02
^c [TMC:WPI] _D	0,155±0,01
^d [TMC:WPI] _D	0,130±0,03

Successivamente, i film ottenuti sono stati caratterizzati in termini di proprietà meccaniche, le quali giocano un ruolo fondamentale ai fini dell'applicazione cutanea. Infatti, i film devono essere in grado di resistere a sollecitazioni, senza rompersi durante l'applicazione e la rimozione. Le proprietà meccaniche dei film sono influenzate dalla distribuzione e dalla densità di legami intramolecolari e intermolecolari tra PL e PR nel *network* polimerico (Leceta et al., 2013). In Figura 33A, sono mostrati i risultati di forza tensile dei film studiati; questa rappresenta il massimo *stress*, forza per unità di area, che un materiale può sopportare quando viene sollecitato in modo uniforme lungo la sua lunghezza. Si può osservare che i film a base di bCS hanno valori di circa 25 MPa; mentre i film [TMC:WPI]_D e [TMC:WPI]_D hanno valori di $15,9 \pm 2,33$ MPa e $19,8 \pm 3,41$ MPa, rispettivamente. Le forti interazioni fisiche, dovute ai legami non-covalenti tra PL e WPI sono responsabili di questi valori di forza tensile (Chopra et al., 2022). In Figura 33B, invece, sono mostrati i risultati ottenuti dal calcolo dell'allungamento % dei film; questo parametro misura la capacità di un materiale di allungarsi prima di rompersi (Alavi et al., 2019). I quattro film presentano tutti valori di allungamento % inferiori al 10%, ad indicare una deformazione pari al solo 10% della loro lunghezza originale, questo risultato è in accordo con la composizione delle miscele utilizzate per la preparazione dei film, che non vede la presenza di agenti plasticizzanti che possono favorire un allungamento % maggiore. Film caratterizzati da elevati valori di forza tensile e bassi valori di allungamento % sono definiti *brittle* (Qiao et al., 2021). I risultati sono inoltre in linea con lo scopo di questo lavoro sperimentale, cioè quello di ottenere MN che siano in grado di perforare la cute, senza deformarsi o rompersi. (Qiao et al., 2021)

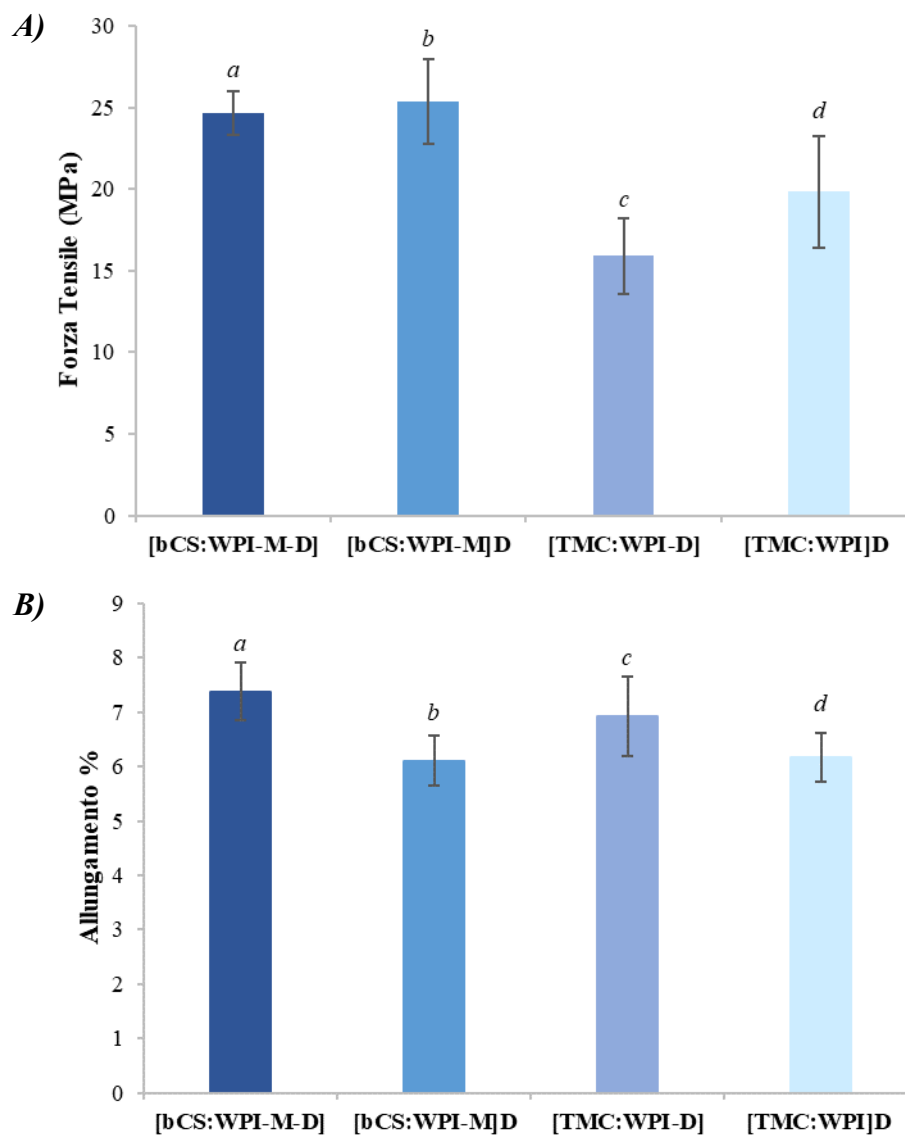


Figura 33 - Valori di **A)** forza tensile e **B)** allungamento % dei film realizzati con le quattro miscele (valori medi \pm e.s., $n=15$; ANOVA one-way; MRT (p -value $< 0,05$): **A)** a vs c; b vs c; **B)** non ci sono differenze statisticamente significative).

Per confermare il comportamento dei film, in Figura 34 sono riportate le curve relative alla forza in funzione della deformazione del film. Tutti e quattro i film sono caratterizzati da profili forza-distanza lineari; dopo aver raggiunto valori di deformazione relativamente bassi, il film si frattura improvvisamente. In accordo con i valori in Figura 33, è possibile definire i film a base di $[bCS:WPI^M]_D$ e $[TMC:WPI]_D$ più rigidi rispetto ai film a base di $[bCS:WPI^M]_D$ e $[TMC:WPI]_D$. La natura rigida del film $[bCS:WPI^M]_D$ è, inoltre, confermata dalla maggiore pendenza della retta risultante dalle curve forza-distanza, rispetto al film $[bCS:WPI^M]_D$ (Suyatma et al., 2005).

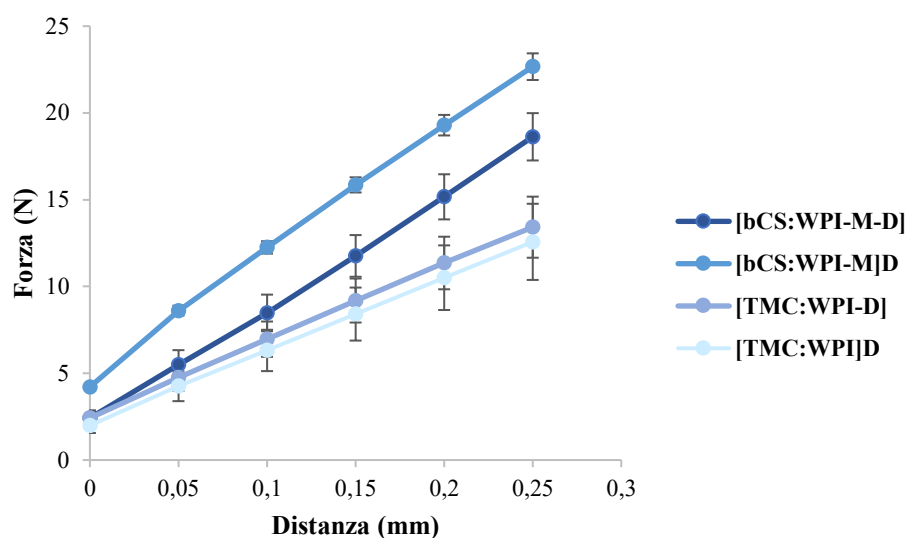


Figura 34 - Curve forza-distanza dei film realizzati con le quattro miscele (valori medi \pm e.s., $n=15$).

Durante la preparazione dei film è stato possibile calcolare la perdita di solvente %, di conseguenza, il valore complementare di contenuto residuo di solvente %, attraverso misure gravimetriche (Figura 35). È importante stimare la perdita di solvente durante il processo di essiccazione dei film, poiché fornisce informazioni sulla quantità di solvente necessaria per idratare i film nella loro forma originale e, quindi, sulla quantità di fluido biologico che può essere assorbita dal film prima che si idrati completamente (Ahmad et al., 2020). Poiché la quantità di biomateriale utilizzata per la preparazione dei film è costante, pari a 4 mL, il solvente dipenderà principalmente dalla quantità di solido nella formulazione. I valori di perdita di solvente % per tutte e quattro le formulazioni sono intorno al 95%, ciò suggerisce che saranno necessari circa 3,8 mL di fluido biologico per idratare completamente il film. I valori complementari di contenuto di solvente sono, di conseguenza, pari al 5%, rappresentato da acqua nei film a base di TMC e da una miscela 50:50 di $\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$ nei film a base di bCS. Questa percentuale di solvente residuo è rappresentata dalle molecole di solvente intrappolate per mezzo di legami non-covalenti nei complessi; in particolare, il CS e il suo derivato TMC, possiedono nelle loro catene polimeriche gruppi amminici e ossidrilici idrofilici, che potrebbero essere responsabili dell'assorbimento delle molecole di acqua in eccesso. Il contenuto di solvente residuo in un film, in particolare acqua, influisce direttamente sulla sua

plasticità, poiché l'acqua agisce come plasticizzante naturale, riducendo le forze intermolecolari tra le macromolecole (Karbowiak et al., 2006). Lo scopo del presente lavoro è la progettazione di film con una ridotta plasticità, in linea con i risultati ottenuti.

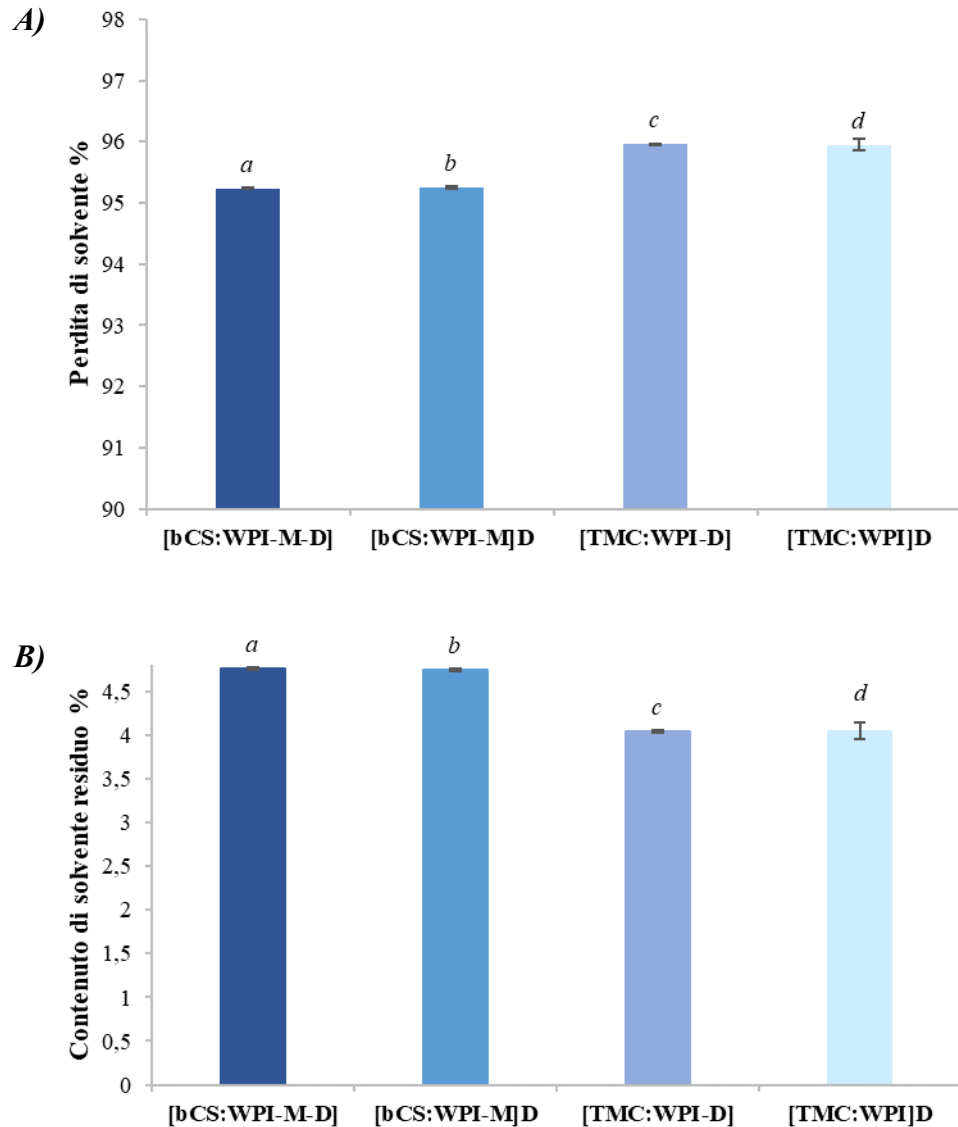


Figura 35 - Valori di **A)** perdita di solvente % e **B)** contenuto di solvente residuo % (valori medi \pm e.s., $n=3$; ANOVA one-way; MRT (p -value < 0,05): **A)** a vs c, d; b vs c, d; **B)** a vs c, d; b vs c, d).

In Figura 36 sono riportati i risultati dell'indice di rigonfiamento dei film, calcolato nell'arco di 24 ore, misurando la variazione del diametro dei film nel tempo, in un ambiente simulante la cute: un idrogel di gelatina 4% p/V. È utile andare a valutare il

rigonfiamento dei film, in quanto indica la quantità di fluido biologico che il film assorbe quando si espande una volta applicato (Savencu et al., 2021). I film di [bCS:WPI^M_D] e [bCS:WPI^M]_D presentano uno *swelling index* dopo 24 ore pari a $63,9 \pm 0,33$ % e $54,9 \pm 1,85$ %, rispettivamente; mentre i film di [TMC:WPI_D] e [TMC:WPI]_D presentano un indice di rigonfiamento massimo dopo 180 minuti pari a $15,0 \pm 0,58$ % e $18,0 \pm 0,33$ %, rispettivamente. Dopo 3 ore, i valori di SI% dei film a base di TMC diminuisce, indice del fatto che i film cominciano a dissolvere; questo fenomeno è dovuto alla maggiore solubilità del TMC in un ampio range di pH, in questo caso PBS pH 7,4; a differenza del CS insolubile a valori di pH > 5,5. In generale, i valori di SI% risultano essere notevolmente inferiori rispetto al quantitativo di solvente necessario affinché il film si idrati completamente. Questo permette, quindi, di definire i film adatti all'applicazione cutanea (Ahmad et al., 2020; Casey et al., 2015).

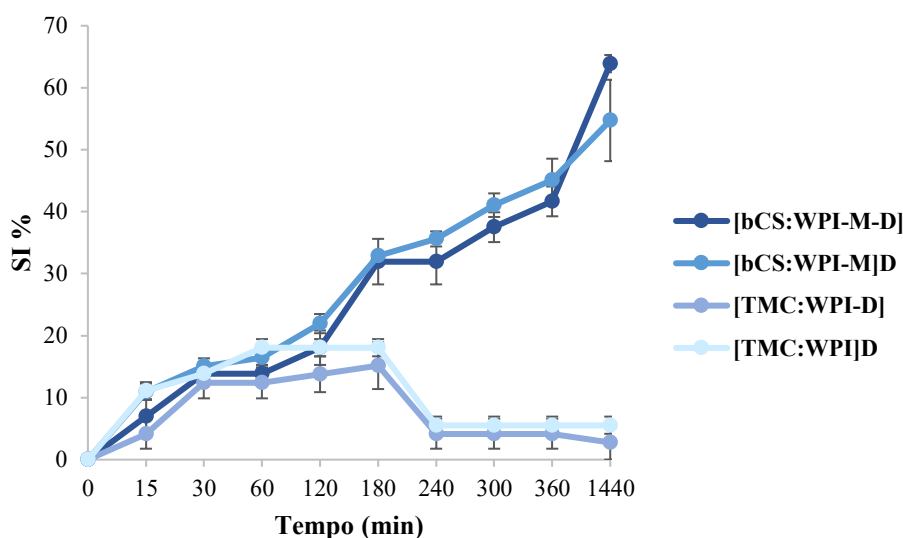


Figura 36 – Profili di *swelling index* % (SI%) nell’arco di 24 ore dei film [bCS:WPI^M_D], [bCS:WPI^M]_D, [TMC:WPI_D] e [TMC:WPI]_D (valori medi \pm e.s.; n=3).

In vista dell’applicazione cutanea dei biomateriali utilizzati per la preparazione dei film, è stata valutata la loro capacità di bioadesione su una matrice simulante la cicatrice patologica.

La formazione di un legame bioadesivo tra il film e la matrice simulante la cicatrice patologica implica l’assorbimento dell’essudato e il conseguente rigonfiamento del film a contatto con un substrato (Ahmad et al., 2020). Questo substrato è costituito da

una matrice di gelatina 10 % p/v, condizionata con un fluido simulante l'essudato, SWF. Tale processo favorisce la penetrazione e la creazione di legami tra le catene polimeriche del film e il substrato (Boateng et al., 2015). In Figura 37 sono mostrati i valori del lavoro di adesione di ogni film al substrato, calcolati come area sottesa alla curva forza massima di “distacco” rispetto alla distanza. Questo indice corrisponde al lavoro necessario per superare le forze attrattive tra il film e il substrato. In condizioni acquose leggermente acide, il CS possiede un'elevata densità di cariche positive che consente l'adesione ai tessuti (Duarte et al., 2016). Inoltre, sia bCS che TMC hanno gruppi capaci di formare forti legami idrogeno e una sufficiente flessibilità delle catene, che contribuiscono a migliorare le proprietà bioadesive della formulazione. Una volta stabilito il contatto tra formulazione ed il substrato (matrice di gelatina) idratato, come quello biologico, le catene polimeriche diffondono attraverso l'interfaccia di gelatina.

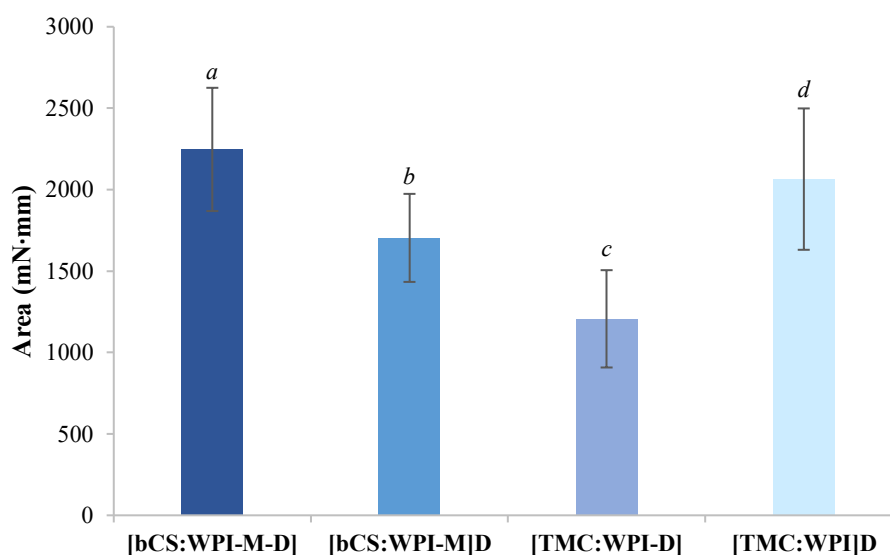
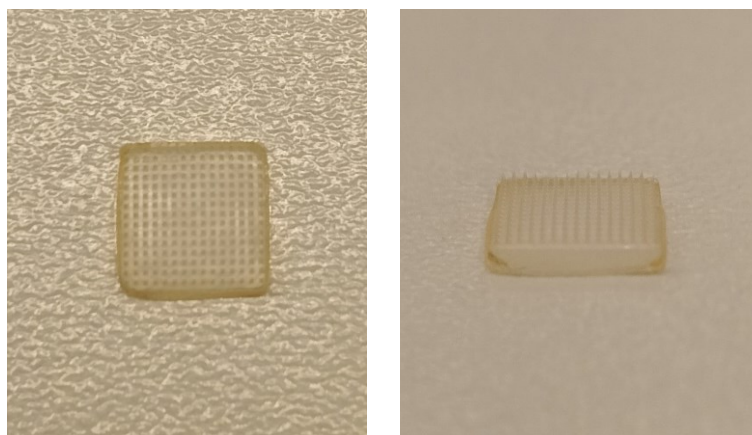


Figura 37 - Valori di lavoro di adesione necessario per rimuovere i film dal substrato di gelatina (valori medi \pm e.s., $n=6$; ANOVA one-way; MRT (p -value $< 0,05$): non ci sono differenze statisticamente significative).

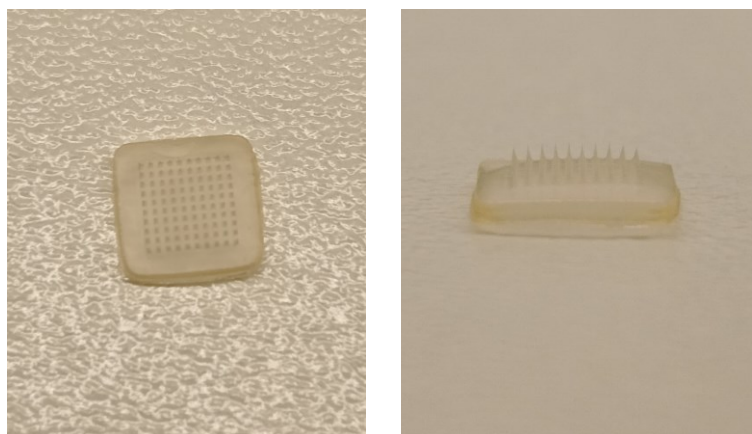
La seconda parte del lavoro ha previsto la realizzazione, e conseguente caratterizzazione, di MN per il trattamento delle cicatrici ipertrofiche con un approccio meccanico, in accordo con la vigente normativa europea sui dispositivi medici (REGOLAMENTO (UE) 2017/745 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 5 aprile 2017). La normativa attualmente in vigore, infatti definisce un dispositivo medico come uno strumento che “[...] non esercita nel o sul corpo

umano l'azione principale cui è destinato mediante mezzi farmacologici, immunologici o metabolici, ma la cui funzione può essere coadiuvata da tali mezzi". Il gruppo di ricerca Zhang et al., 2020 ha dimostrato che i MN possono modulare la biomeccanica e la struttura del tessuto penetrando attraverso l'epidermide fino al derma e creando una serie di microfori che generano così un ambiente privo di cicatrici in modo minimamente invasivo.

I MN (Figura 38) sono stati preparati con il metodo del *solvent casting*, come descritto nel Paragrafo 10.4, utilizzando gli stampi in PDMS, preventivamente acquistati. La preparazione dei MN è stata fatta utilizzando stampi piramidali, piuttosto che conici, poiché questi forniscono aghi con una maggiore resistenza meccanica, grazie alla loro maggiore area trasversale a parità di diametro di base (Lee et al., 2008). Inoltre, il PDMS è un materiale che presenta stabilità termica, è biologicamente e chimicamente compatibile, sicuro, estremamente flessibile, idrofobo, non igroscopico e inerte in condizioni fisiologiche, tutte caratteristiche che lo rendono adatto in campo biomedico (Demir et al., 2013). Nonostante la numerosità dei metodi di produzione dei MN, discussi precedentemente, è stata scelta la tecnica del *solvent casting*, a causa della semplicità del processo, unito ai bassi costi e al potenziale di produzione di massa a temperatura ambiente (Fonseca et al., 2019).



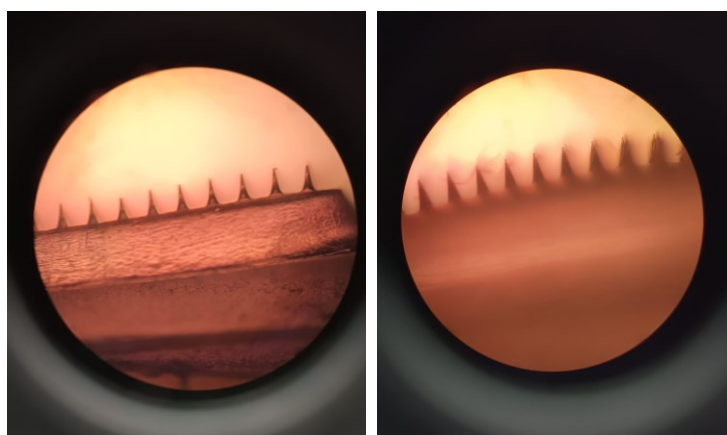
MN 15x15



MN 10x10

Figura 38 - Immagini dei MN ottenuti utilizzando gli stampi in PDMS e le miscele $[bCS:WPI^M_D]$, $[bCS:WPI^M]_D$, $[TMC:WPI_D]$, $[TMC:WPI]_D$ attraverso il metodo di solvent casting.

Una prima caratterizzazione dei MN consiste nell'analisi morfologica per mezzo della microscopia ottica (Figura 39) ed elettronica a scansione (Figura 40). In Figura 39, dalle immagini al microscopio ottico dei MN è possibile osservare la presenza di tutti gli aghi nei *patch* dei dodici MN preparati con le quattro miscele $[bCS:WPI^M_D]$, $[bCS:WPI^M]_D$, $[TMC:WPI_D]$ e $[TMC:WPI]_D$ e i tre diversi stampi. Non si presentano buchi vuoti ed è possibile vedere l'affilatezza delle punte, che non sono rotte o deformate.

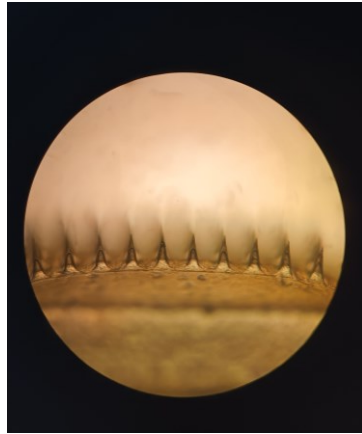


MN $[bCS:WPI^M_D]$

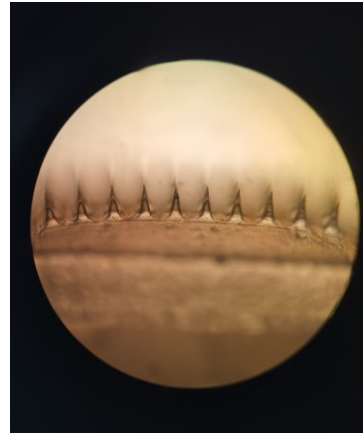
15x15 H600

MN $[bCS:WPI^M]_D$

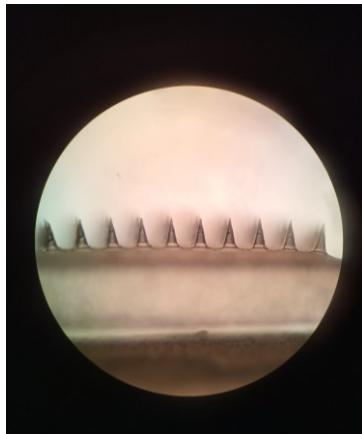
15x15 H600



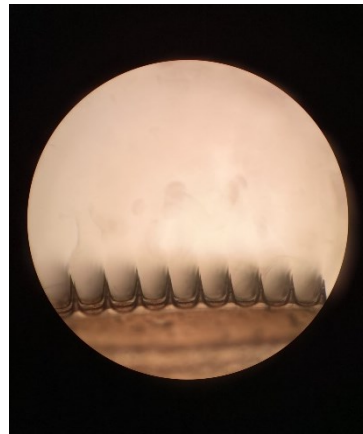
**MN [TMC:WPI]_D
15x15 H600**



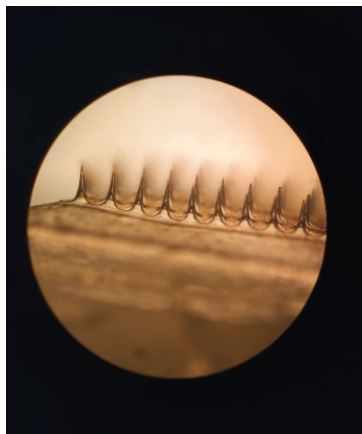
**MN [TMC:WPI]_D
15x15 H600**



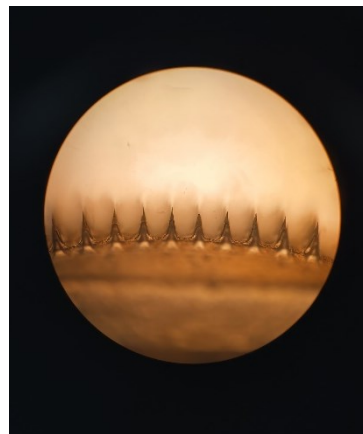
**MN [bCS:WPI^M]_D
10x10 H600**



**MN [bCS:WPI^M]_D
10x10 H600**



**MN [TMC:WPI]_D
10x10 H600**



**MN [TMC:WPI]_D
10x10 H600**

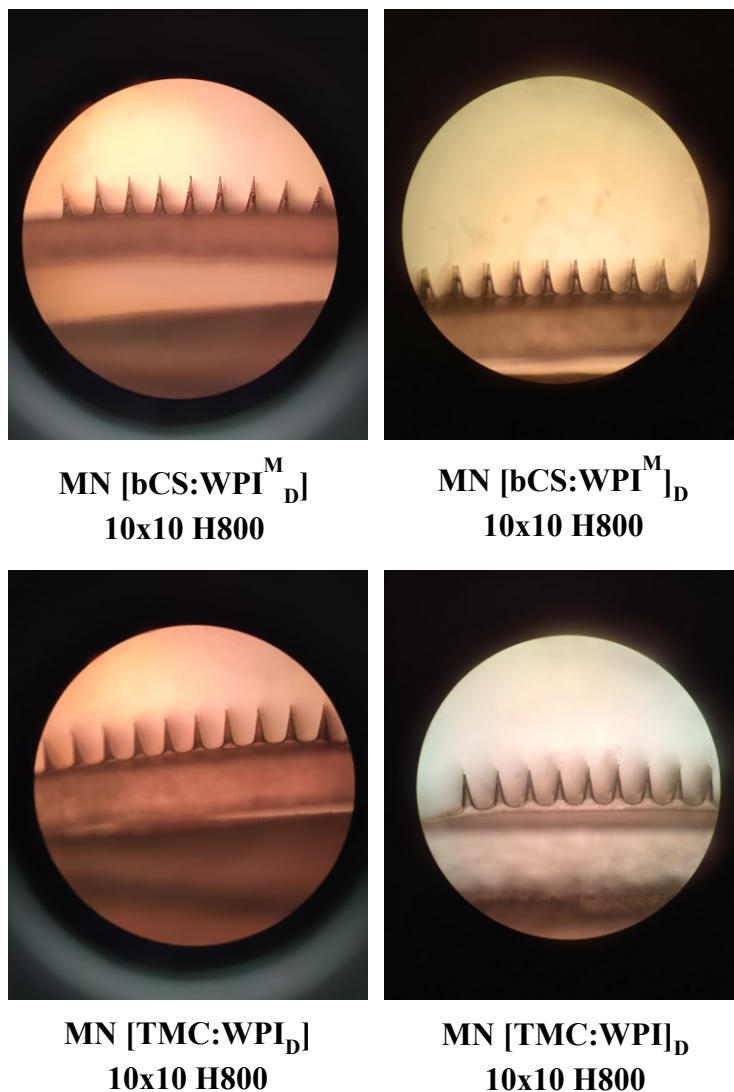
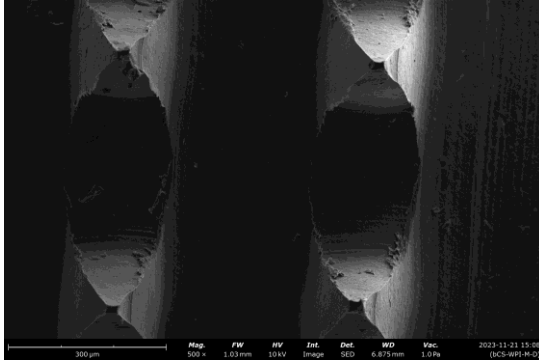


Figura 39 - Immagini al microscopio ottico dei MN [bCS:WPI^M_D], [bCS:WPI^M]_D, [TMC:WPI_D], [TMC:WPI]_D preparati con gli stampi 15x15 H600, 10x10 H600 e 10x10 H800.

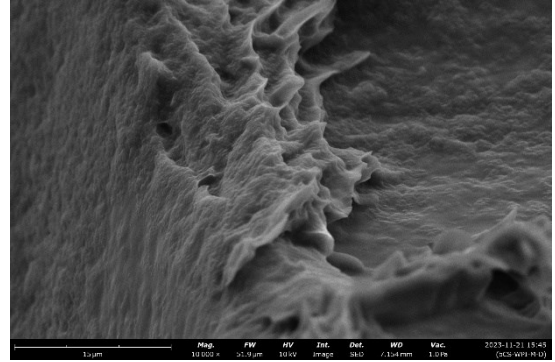
In Figura 40, le immagini SEM dei MN, ad ingrandimento 500X, evidenziano una morfologia piramidale degli aghi, che corrisponde alla forma delle cavità dello stampo in PDMS, con una struttura ben definita e senza fratture o discontinuità. Analizzando le immagini SEM ad ingrandimenti superiori, 10000X, è possibile osservare la superficie rugosa degli aghi, determinata dalla presenza dei complessi PL-PR, come riportato nel caso dei film.

500 X

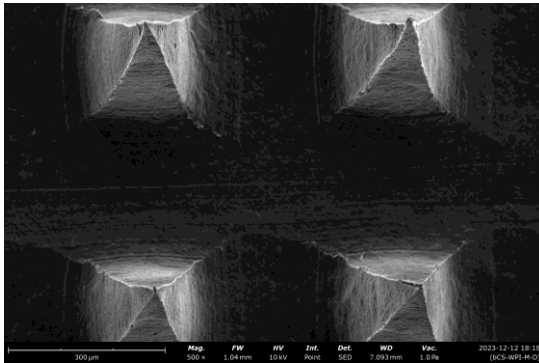


MN [bCS:WPI^M]_D 10x10 H600

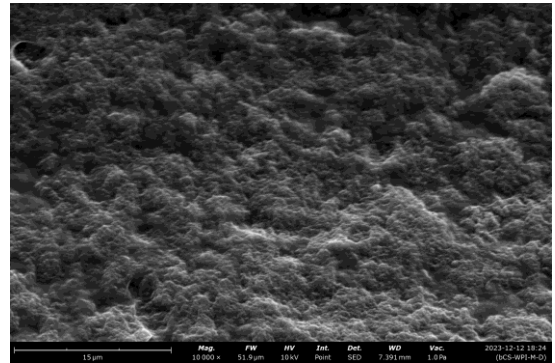
10000 X



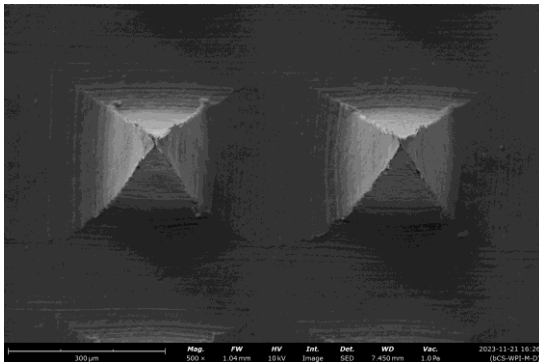
MN [bCS:WPI^M]_D 10x10 H600



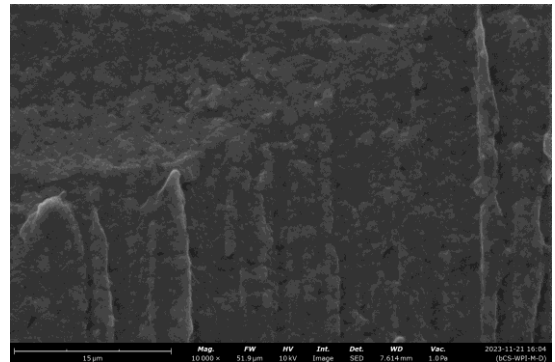
MN [bCS:WPI^M]_D 10x10 H800



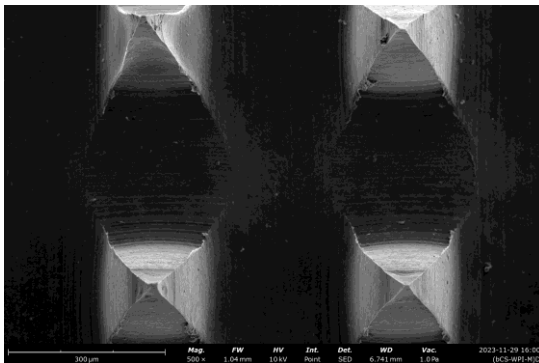
MN [bCS:WPI^M]_D 10x10 H800



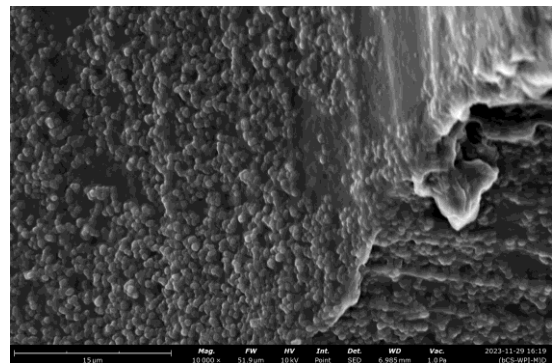
MN [bCS:WPI^M]_D 15x15 H600



MN [bCS:WPI^M]_D 15x15 H600

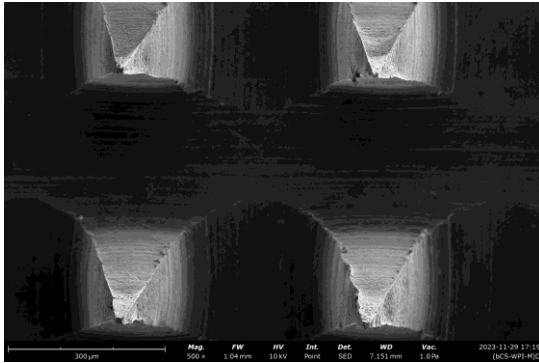


MN [bCS:WPI^M]_D 10x10 H600



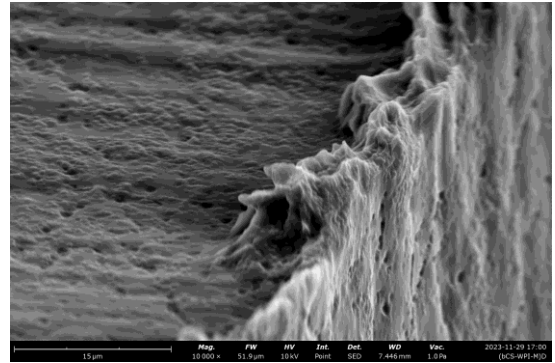
MN [bCS:WPI^M]_D 10x10 H600

500 X

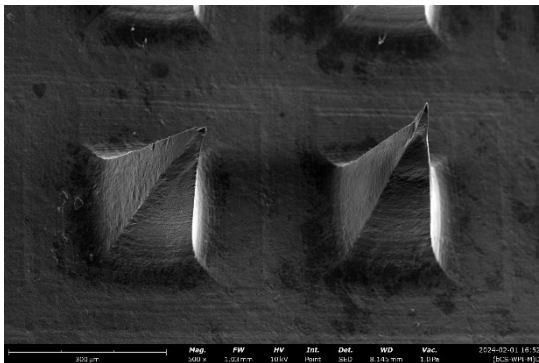


MN [bCS:WPI^M]_D 10x10 H800

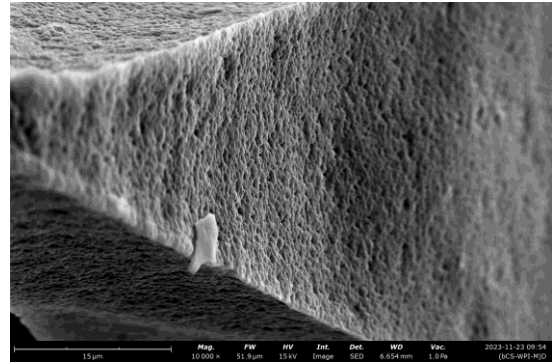
10000 X



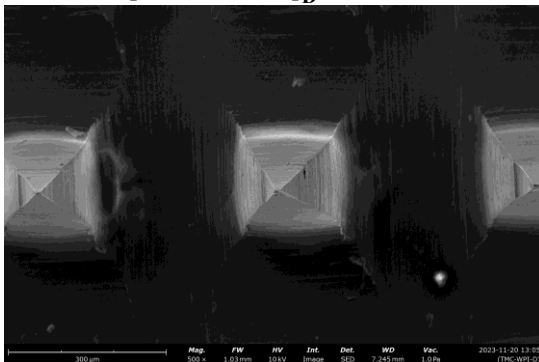
MN [bCS:WPI^M]_D 10x10 H800



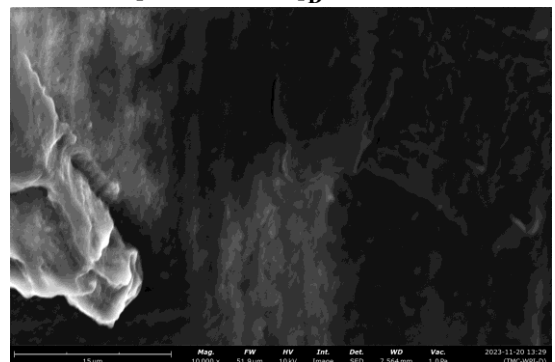
MN [bCS:WPI^M]_D 10x10 H800



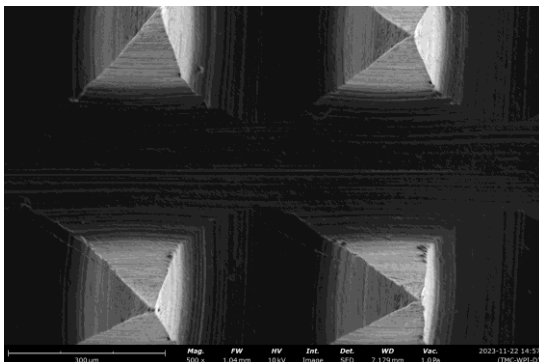
MN [bCS:WPI^M]_D 10x10 H800



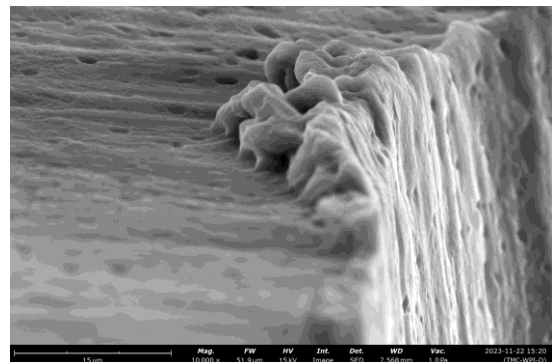
MN [TMC:WPI_D] 10x10 H600



MN [TMC:WPI_D] 10x10 H600

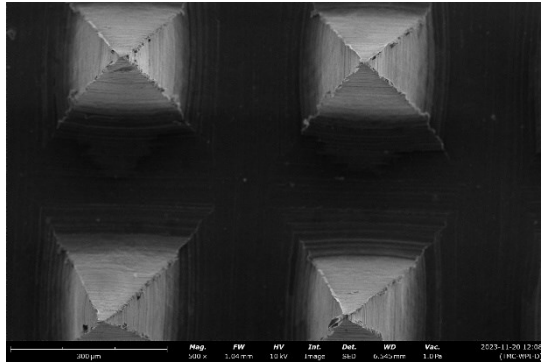


MN [TMC:WPI_D] 10x10 H800



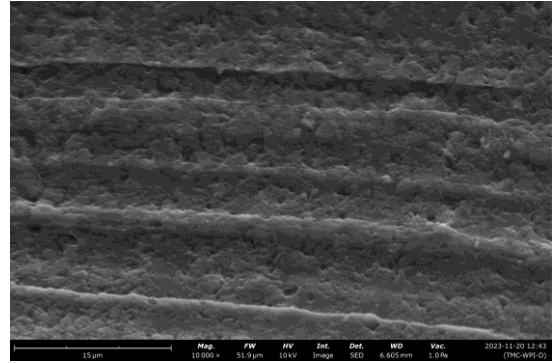
MN [TMC:WPI_D] 10x10 H800

500 X

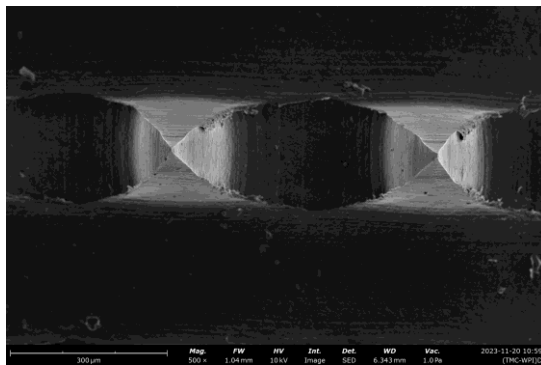


MN [TMC:WPI]_D 15x15 H600

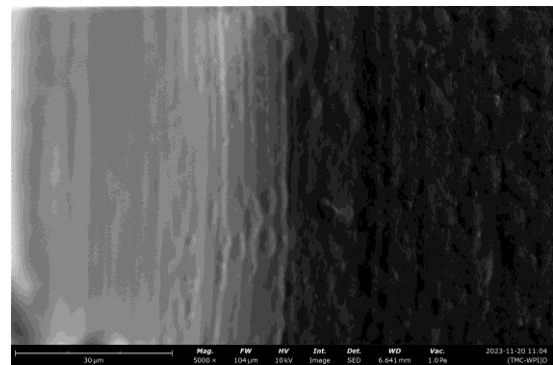
10000 X



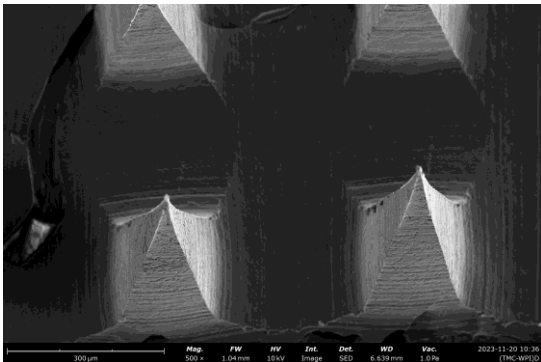
MN [TMC:WPI]_D 15x15 H600



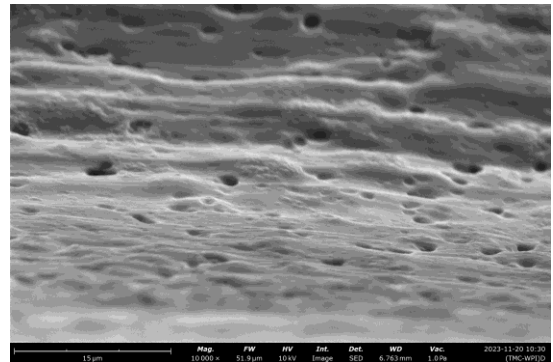
MN [TMC:WPI]_D 10x10 H600



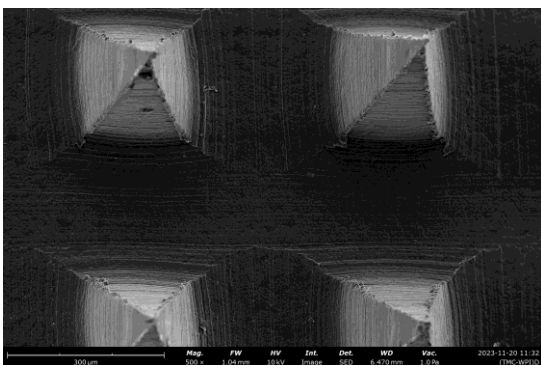
MN [TMC:WPI]_D 10x10 H600



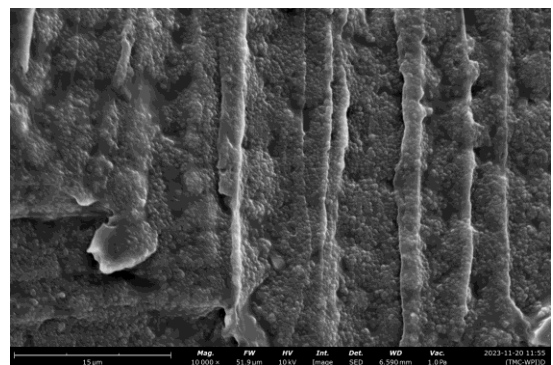
MN [TMC:WPI]_D 10x10 H800



MN [TMC:WPI]_D 10x10 H800



MN [TMC:WPI]_D 10x10 H800



MN [TMC:WPI]_D 10x10 H800

Figura 40 - Illustrazione SEM dei dodici MN ottenuti con il metodo di solvent casting a ingrandimento 500X e 10000X (SEM Thermoscientific Phenom Pure).

I MN devono avere una resistenza meccanica sufficientemente alta da consentire la loro somministrazione cutanea, senza deformarsi o rompersi (Fonseca et al., 2020). Le caratteristiche meccaniche dei MN a base dei complessi PL-PR sono state valutate in modalità compressione assiale, come descritto nel Paragrafo 10.5.3, registrando in continuo la forza di compressione, utilizzando una cella di carico da 5 Kg, in funzione di una deformazione massima pari all'80% dell'altezza dei MN. Come si può osservare dall'istogramma riportato in Figura 41, tutti i MN sono caratterizzati da una forza massima pari o superiori a 15 N.

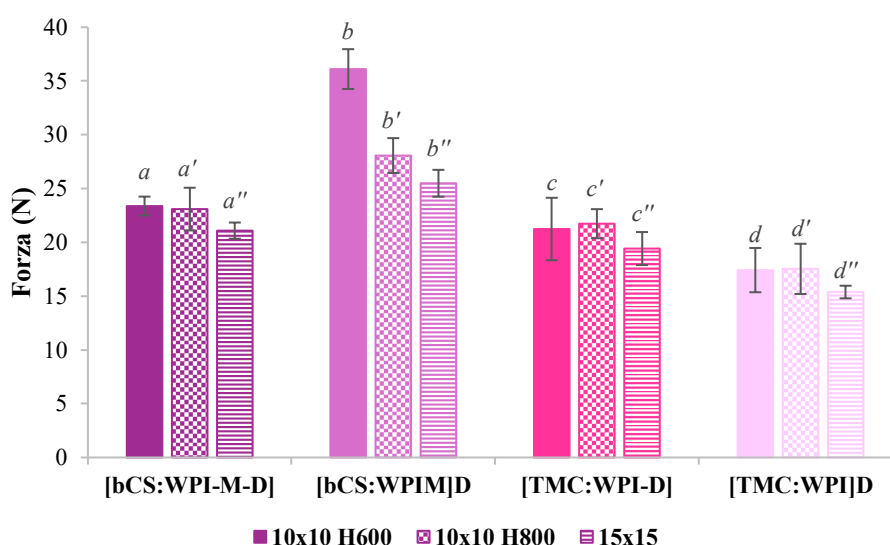


Figura 41 - Valori di forza massima di compressione misurati (valori medi \pm e.s.; $n=6$; ANOVA one-way; MRT (p value $< 0,05$): a vs b, d, d', d'' ; a' vs b, b', d, d', d'' ; a'' vs b, b'', d'' ; b vs $b', b'', c, c', c'', d, d', d''$; b' vs c, c', c'', d, d', d'' ; b'' vs c'', d, d', d'' ; c vs d'', c'' vs d'').

In Tabella IV sono riportati i valori di forza per ago che i MN preparati con i tre diversi stampi sono in grado di supportare. Questi risultati indicano che tutti e dodici i MN ottenuti sono in grado di sostenere i valori di forza, riportati in letteratura, per rompere lo strato superficiale della pelle, pari a 0,058 N (Silva et al., 2023). Inoltre, in letteratura è noto il valore minimo di forza, pari a 0,15 N per ago, che questi dispositivi devono possedere per il loro inserimento nella cute, senza rotture (Fonseca et al., 2020). I MN preparati con lo stampo 15x15 H600, contenente 225 aghi/patch, hanno valori inferiori a questo limite. Pertanto, queste formulazioni sono state escluse da ulteriori studi di caratterizzazione, in quanto richiedono una

ottimizzazione del biomateriale, ai fini del miglioramento delle proprietà meccaniche.

Tabella IV - Valori di forza (N)/ago dei dodici MN preparati (valori medi \pm e.s.; $n=6$).

Tipologia di MN	Stampo 10x10 H600	Stampo 10x10 H800	Stampo 15x15 H600
MN [bCS:WPI ^M _D]	0,23 N/ago	0,23 N/ago	0,093 N/ago
MN [bCS:WPI ^M] _D	0,36 N/ago	0,28 N/ago	0,11 N/ago
MN [TMC:WPI _D]	0,21 N/ago	0,21 N/ago	0,09 N/ago
MN [TMC:WPI] _D	0,17 N/ago	0,17 N/ago	0,07 N/ago

La valutazione delle proprietà meccaniche dei MN riveste un ruolo fondamentale nel loro sviluppo, poiché lo stress meccanico a cui sono soggetti durante l'inserimento nella pelle potrebbe causare il cedimento del sistema. A tal fine, sono stati analizzati i profili sforzo *vs* deformazione dei MN ottenuti con gli stampi 10x10 H600 e H800, per valutare se anche tra queste formulazioni fossero necessari ulteriori studi di ottimizzazione del biomateriale con lo scopo di migliorare il comportamento meccanico (Figura 43).

In Figura 43A, sono mostrati i profili dei MN preparati con lo stampo 10x10 H600, dove è possibile notare un brusco calo dello sforzo in corrispondenza al 70% di deformazione per i MN a base di [bCS:WPI^M_D] e di [TMC:WPI_D]. Per quanto riguarda i profili sforzo-deformazione dei MN preparati con lo stampo 10x10 H800, Figura 43B, si osserva una discontinuità per il MN [TMC:WPI]_D, ad una deformazione del 60%. Un brusco calo o una discontinuità nello sforzo è indice di rottura o deformazione di alcuni degli aghi del *patch*; la forza massima applicata immediatamente prima della diminuzione viene interpretata come la forza di rottura dell'ago (Park et al., 2005). Per tutti gli altri MN, è possibile osservare un aumento graduale dello sforzo, ad indicare che i MN sono in grado di subire deformazioni sempre maggiori all'aumentare dello sforzo, senza rompersi (Silva et al., 2023).

Le indagini relative alle proprietà meccaniche hanno permesso di selezionare solo quattro dei dodici MN preparati, per proseguire la caratterizzazione dello studio in oggetto.

In particolare, sono stati selezionati i MN, preparati con gli stampi 10x10 H600 e H800, preparati con la miscela [bCS:WPI^M]_D perché caratterizzati dai valori di forza/ago maggiori rispetto a quelli ottenuti dalla miscela [bCS:WPI^M]_D. Sono poi stati scelti i MN, preparati con gli stampi 10x10 H600 e H800, ottenuti dalla miscela [TMC:WPI]_D, poiché le rispettive curve di sforzo-deformazione non hanno mostrato alcun punto di discontinuità che indicasse cedimenti degli aghi costituenti il patch.

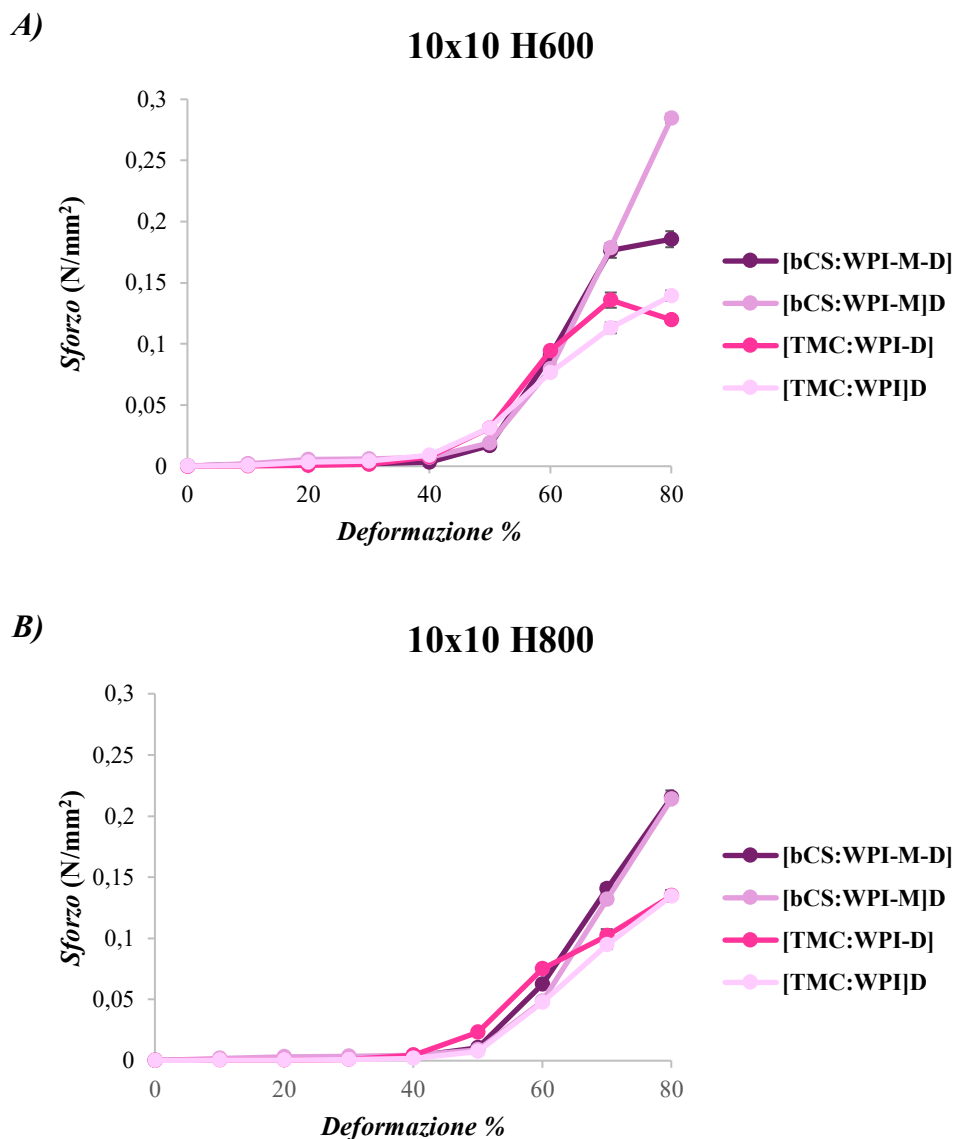
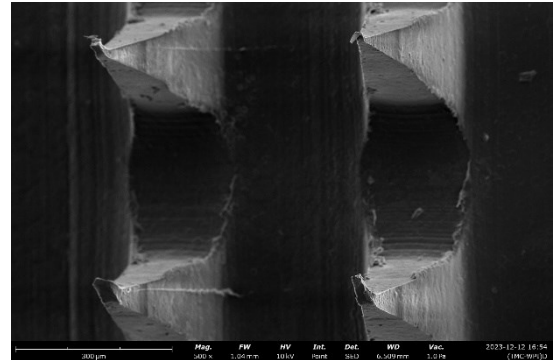
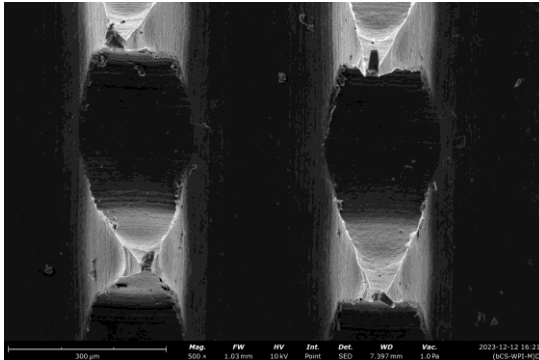


Figura 43 – Profili sforzo-deformazione dei MN preparati utilizzando lo stampo (A) 10x10 H600 e (B) 10x10 H800 (valore medio \pm d.s.; $n=6$).

In Figura 44 sono mostrate le immagini SEM ottenute in seguito al test di compressione assiale, relative ai MN selezionati, in cui si può osservare una evidente flessione delle punte.

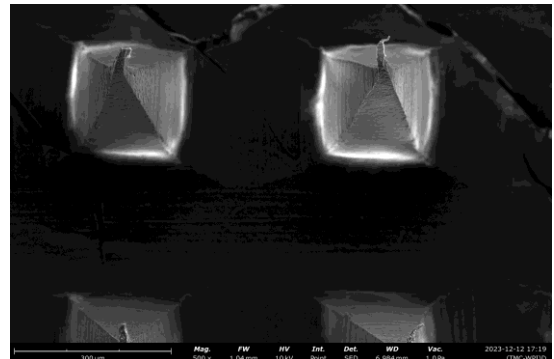
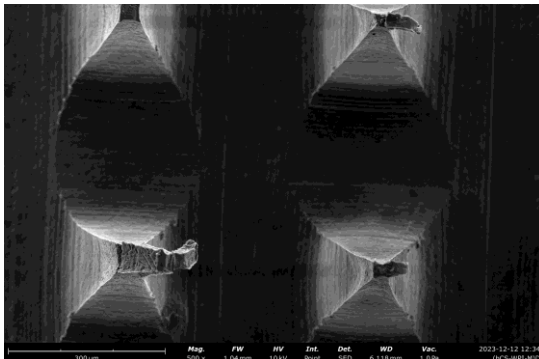
10 x 10 H600



MN [bCS:WPI]^M_D

MN [TMC:WPI]_D

10 x 10 H800

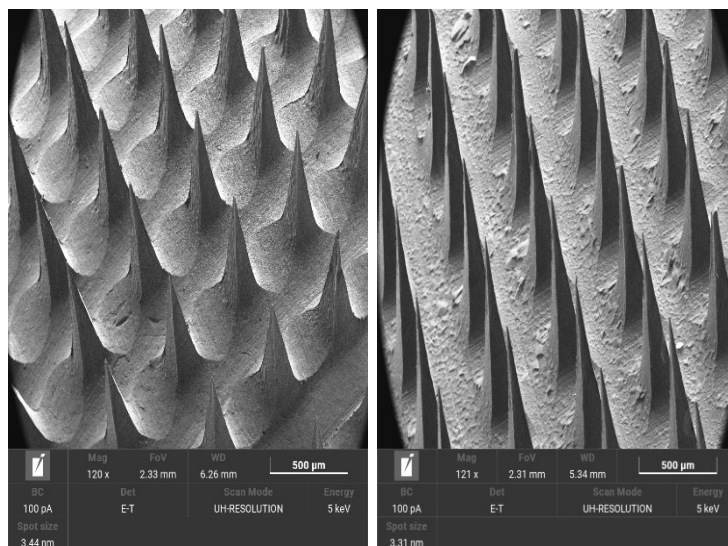


MN [bCS:WPI]^M_D

MN [TMC:WPI]_D

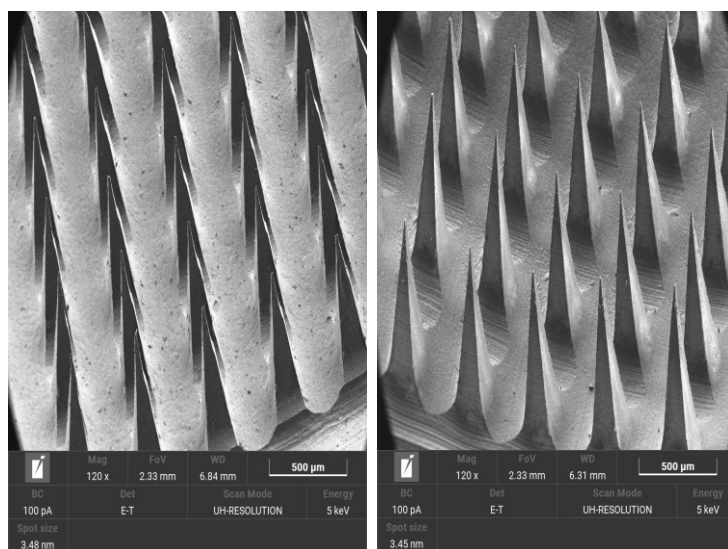
Figura 44 - Immagini SEM dei MN [bCS:WPI]^M_D e [TMC:WPI]_D, preparati con gli stampi 10x10 H600 e 10x10 H800, in seguito al test di compressione assiale (SEM Thermoscientific Phenom Pure).

In Figura 45 è possibile osservare le immagini SEM dei MN selezionati, ottenute con un piano di inclinazione di 55°. È evidente la maggiore altezza degli aghi ottenuti dallo stampo 10x10 H800 rispetto ai MN preparati con lo stampo 10x10 H600. Inoltre, le immagini permettono di evidenziare una struttura ben definita degli aghi, con punte ben affilate.



**MN [bCS:WPI]^M_D
10x10 H600**

**MN [bCS:WPI]^M_D
10x10 H800**



**MN [TMC:WPI]_D
10x10 H600**

**MN [TMC:WPI]_D
10x10 H800**

Figura 45 - Immagini SEM dei MN selezionati.

Nell'istogramma in Figura 46 sono mostrati i valori di perdita di solvente %. Sulla base delle dimensioni dello stampo, il volume teorico calcolato e utilizzato per produrre i MN 10x10 H600 è pari a 0,9 mL mentre per i MN 10x10 H800 è pari a 1 mL. Per quanto riguarda i MN a base di bCS il valore di perdita di solvente % è circa pari al 95%, mentre per i MN a base di TMC 96%, questo suggerisce che saranno necessari circa 0,95 mL di essudato per convertire i MN in un fluido.

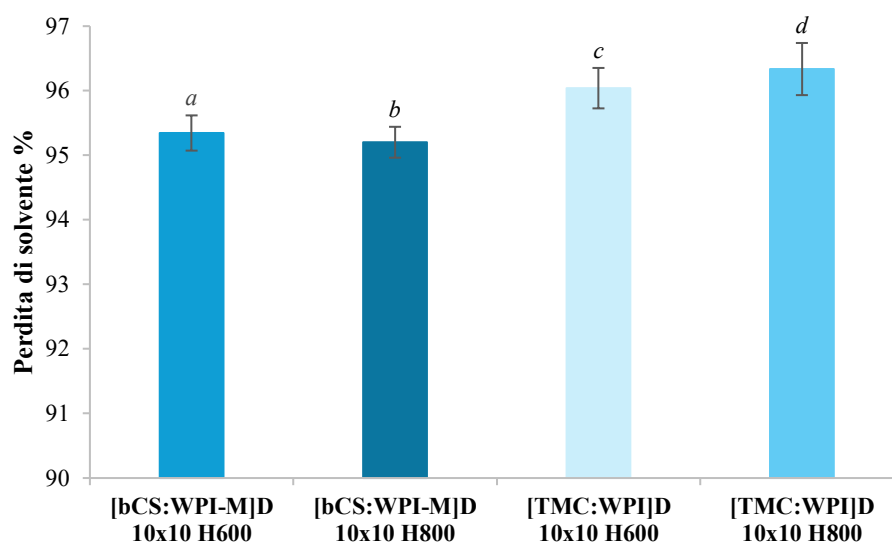


Figura 46 – Valori di perdita del solvente % dei MN 10x10 H600 [bCS:WPI^M]_D e [TMC:WPI]_D, 10x10 H800 [bCS:WPI^M]_D e [TMC:WPI]_D (valori medi ± e.s.; n=3; ANOVA one-way; MRT (p value < 0,05): b vs d).

Al fine di studiare la capacità di bioadesione dei MN al sito di applicazione, in Figura 47 si osservano i valori di lavoro necessari per rimuovere il MN da un substrato di gelatina, simulante la cute (Boateng et al., 2015). È possibile notare che non c'è differenza statisticamente significativa tra il MN [bCS:WPI^M]_D 10x10 H600 e 10x10 H800, che presentano valori di lavoro di adesione di $1523,5 \pm 206,28$ mN·mm e $1274,55 \pm 235,82$ mN·mm, rispettivamente; mentre si osserva una maggiore differenza tra il MN [TMC:WPI]_D 10x10 H600, lavoro di adesione pari a $2107,1 \pm 203,89$ mN·mm, rispetto alla stessa miscela utilizzata per il MN preparato con lo stampo 10x10 H800, il cui valore è pari a $491,9 \pm 150,38$ mN·mm.

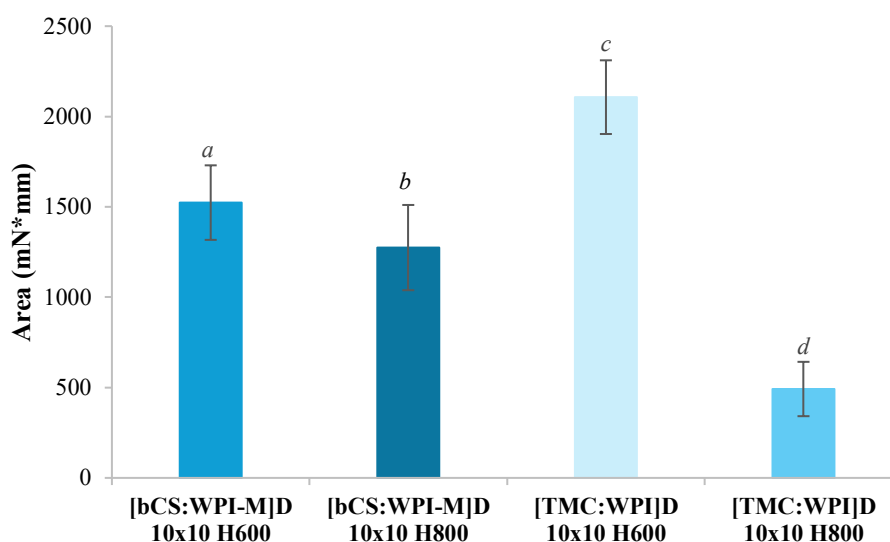


Figura 47 - Valori di area (mN*mm) dei MN (valori medi \pm e.s.; n=6; ANOVA one-way; MRT (p value < 0,05): a vs d; b vs c, d; c vs d).

Nel 2014, il gruppo di ricerca Larrañeta et al. ha proposto e validato l'utilizzo del Parafilm[®], un film polimerico commerciale, in un modello per studi di inserimento dei MN (Larrañeta et al., 2014b). Gli studi sull'inserimento dei MN sono tipicamente condotti su tessuti biologici, il che può presentare alcuni svantaggi, poiché i campioni di tessuto sono spesso eterogenei, instabili e difficili da ottenere. Inoltre, l'uso di materiali biologici può talvolta comportare problematiche legali. Pertanto, per le applicazioni di controllo qualità, è auspicabile superare queste limitazioni utilizzando un materiale artificiale al posto della pelle. Infatti, un aspetto importante nello sviluppo di questi dispositivi è la disponibilità di un metodo di controllo qualità rapido, semplice e standardizzato per determinare le caratteristiche di penetrazione e per confrontare diverse formulazioni candidate. La capacità di inserimento cutaneo dei MN è stata, infatti, studiata utilizzando un modello cutaneo composto da otto strati di Parafilm[®], a cui è stata applicata una forza di 40 N su ciascun *patch* per 30 secondi (Fonseca et al., 2020; Silva et al., 2023). In Figura 48, dalle foto relative al primo strato di Parafilm[®] è possibile notare come tutti i *patch* hanno perforato, per il 100%, la superficie della membrana polimerica, che corrisponde ad uno spessore pari a ~200 μ m. La stratificazione del Parafilm[®] ha permesso di visualizzare anche la profondità di penetrazione dei MN, che deve essere maggiore dello spessore dello strato corneo, da 2 a 20 μ m nelle diverse zone (Böhling et al., 2014). Un MN è

considerato efficace nel penetrare uno strato di Parafilm® se oltre il 20% dei suoi aghi crea fori visibili (Larrañeta et al., 2014).

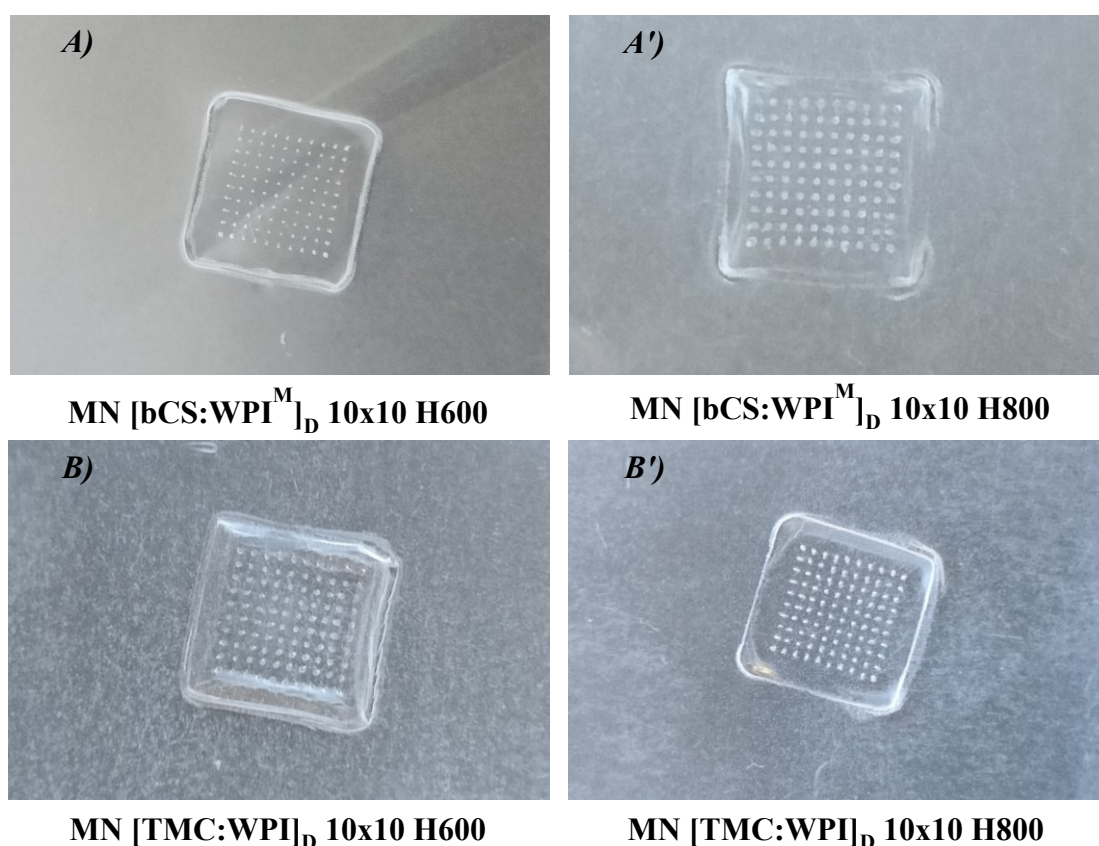


Figura 48 – Foto del primo strato di Parafilm® perforato dai MN **A)** [bCS:WPI^M]_D 10x10 H600, **A')** [bCS:WPI^M]_D 10x10 H800, **B)** [TMC:WPI]_D 10x10 H600, **B')** [TMC:WPI]_D 10x10 H800.

Nell'istogramma in Figura 49, si osserva come solo i MN ottenuti con lo stampo 10x10 H800 sono stati in grado di perforare anche il secondo strato, ~400 μm , per il 76,3% nel caso del MN [bCS:WPI^M]_D e il 53,5% per il MN [TMC:WPI]_D. Quindi, il numero di fori creati diminuisce con la profondità d'inserimento ed è maggiore per i MN più lunghi (Fonseca et al., 2020). Questo indica che i MN possono facilmente perforare lo strato corneo e raggiungere l'epidermide che ha uno spessore di circa 80 μm (Ryall et al., 2022; Sandby-Møller et al., 2003).

Nel primo caso il Parafilm® è stato piegato in otto strati, che mimano lo spessore della pelle (~1,6 mm). Per applicare il MN al Parafilm® è stato utilizzato il *TA.XT plus* dopo avere osservato che c'è corrispondenza del numero di fori tra l'applicazione del MN con l'applicatore MPatchTM Micro Applicator e il numero di fori creati attraverso l'inserzione del MN a 40 N, forza che verrà poi impostata al

TA.XT plus per eseguire il test (Larrañeta et al., 2014). Una volta applicato il MN al Parafilm® si valutano il numero di fori fatti in ogni strato e il numero di strati perforati.

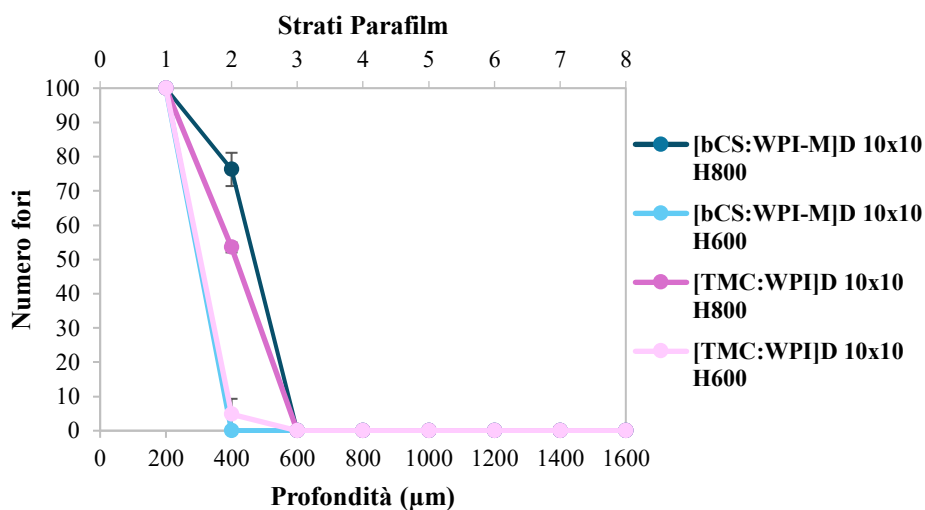


Figura 49 – Profili del numero di fori creati per i MN $[bCS:WPI^M]_D$ e $[TMC:WPI]_D$ 10x10 H600 e 10X10 H800, rispetto alla profondità e allo strato di Parafilm® (valori medi \pm e.s.; $n=6$).

Inoltre, la capacità di inserimento dei MN è stata investigata in un modello noto in letteratura che simula la pelle umana in termini di proprietà meccaniche e superficiali (Lir et al., 2007). Il modello cutaneo utilizzato è costituito principalmente da proteine strutturali, polisaccaridi e lipidi che imitano la struttura lipidica della cute, creando una superficie idrofobica. Inoltre, il modello simulante la pelle evita la variabilità associata ai campioni biologici e garantisce risultati che possono essere correlati alla pelle. I MN sono stati inseriti nel modello mimante la pelle umana con l'ausilio dell'apposito applicatore MPatch™ Micro Applicator (Micropoint Technologies, Singapore). Il substrato è stato poi esaminato con la microscopia ottica per valutare il numero di fori creati da ciascun *patch* e per calcolare il PR%. In Tabella V, i valori di PR% sono risultati essere tutti pari al 100%. Questi confermano nuovamente la capacità dei MN di resistere alla forza richiesta per l'inserimento nella pelle (Silva et al., 2023).

Tabella V - Valori di PR % dei MN inseriti nel modello simulante la cute (valori medi \pm e.s.; $n=3$).

Tipologia di MN	PR% stampo 10x10 H600	PR% stampo 10x10 H800
MN [bCS:WPI ^M] _D	100%	100%
MN [TMC:WPI] _D	100%	100%

In letteratura, i MN sono solitamente classificati in cinque categorie: solidi, rivestiti, cavi, solubili e formanti-idrogel (Shriky et al., 2023). I MN solubili e formanti-idrogel sono solitamente formulati con polimeri biocompatibili, abbastanza resistenti da penetrare la pelle, ma anche abbastanza flessibili da evitare la frattura degli aghi. È possibile definire solubili i MN in grado di dissolvere totalmente entro 30 minuti (Zhang et al., 2020). Per valutare, quindi, la dissoluzione dei MN nel tempo è stata misurata la quantità di WPI rilasciate, per mezzo del saggio BCA. I MN [bCS:WPI^M]_D e [TMC:WPI]_D, ottenuti con gli stampi 10x10 H600 e 10x10 H800, sono stati preparati utilizzando delle miscele PL:WPI 50:50 p/p. In Figura 51 sono mostrati i risultati relativi alla % di WPI dissolte nell'arco di 30 minuti. Per quanto riguarda i MN [bCS:WPI^M]_D 10x10 H600 e H800 non è stata rilevata la presenza di WPI nel mezzo di dissoluzione costituito da soluzione fisiologica, durante i primi 30 minuti; mentre i MN [TMC:WPI]_D 10x10 H600 e H800 hanno mostrato una % di WPI dissolte dopo 30 minuti pari a $89,2 \pm 2,2$ % e $96 \pm 1,9$ %, rispettivamente.

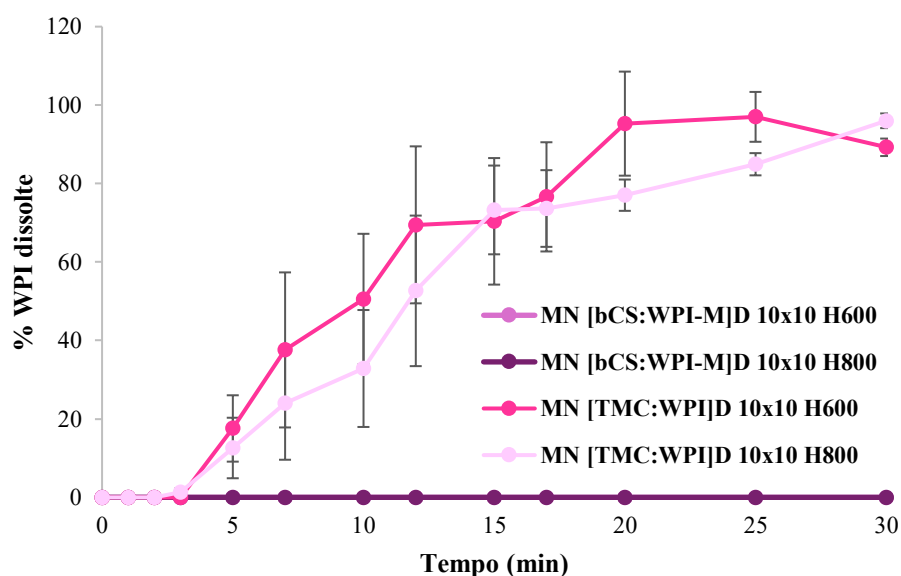
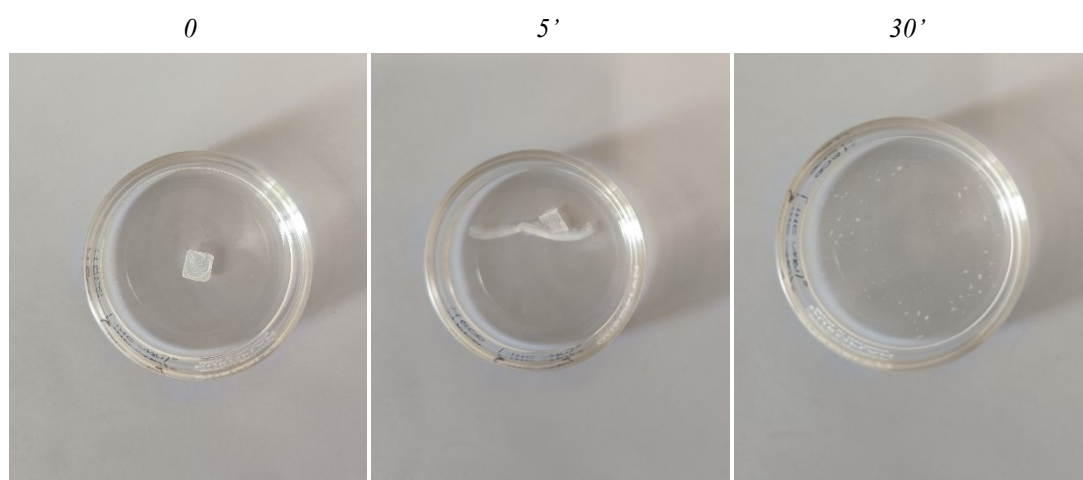
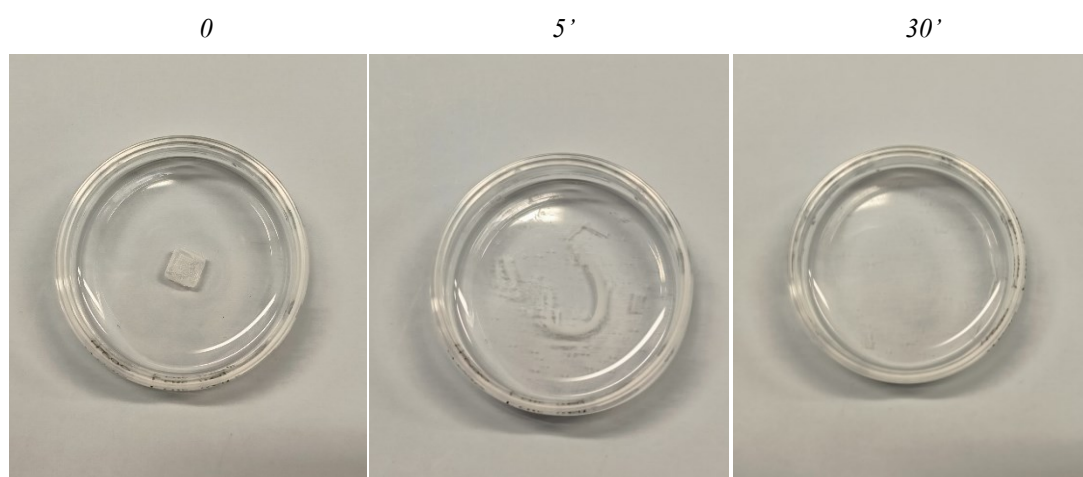


Figura 51 – Curve relative alla % di WPI dissolte nel tempo (valore medio \pm e.s.; $n=5$).

Le immagini in Figura 52 mostrano la struttura dei MN a base di TMC al tempo 0, dopo 5 e 30 minuti. Come è possibile notare dopo 30 minuti non è più visibile la struttura integra del dispositivo che invece è evidente nella prima immagine. Questi risultati sono in accordo con la letteratura in quanto il TMC, derivato quaternario del CS, è caratterizzato da una maggiore solubilità in un ampio range di pH (Kang et al., 2021). Da queste evidenze è, quindi, possibile classificare i MN ottenuti dalla miscela $[TMC:WPI]_D$ come MN solubili (X. Zhang et al., 2020).



MN $[TMC:WPI]_D$ 10x10 H600



MN $[TMC:WPI]_D$ 10x10 H800

Figura 52 – Immagini relative alla dissoluzione dei $[TMC:WPI]_D$ dopo 0, 5 e 30 minuti.

Al fine di classificare i MN a base di $[bCS:WPI^M]_D$ è stata indagata la loro capacità di rigonfiare in PBS (pH 7,4). Il grafico in Figura 53 riporta l'andamento dello *swelling ratio* % dei MN a base di bCS; la capacità di rigonfiamento è stata misurata quantitativamente attraverso la variazione di massa dei MN ed è mostrata come l'aumento percentuale rispetto al peso iniziale esposto alla soluzione di PBS. Come mostrato in Figura 53, entrambi i MN, preparati con lo stampo 10x10 H600 e H800, sono in grado di rigonfiare fino al raggiungimento di un massimo registrato dopo 10 ore, pari a ~20 volte il loro peso iniziale, per poi diminuire. Questi risultati permettono quindi di classificare i MN $[bCS:WPI^M]_D$ 10x10 H600 e H800 come MN formanti-idrogel; in accordo con quanto riportato in letteratura, infatti, le WPI possono essere utilizzate per la preparazione di idrogel, strutture reticolate tridimensionali in grado di assorbire elevati quantitativi di acqua o fluidi biologici, che mostrano ottima biocompatibilità, non tossicità e biodegradabilità (Zandona et al., 2021).

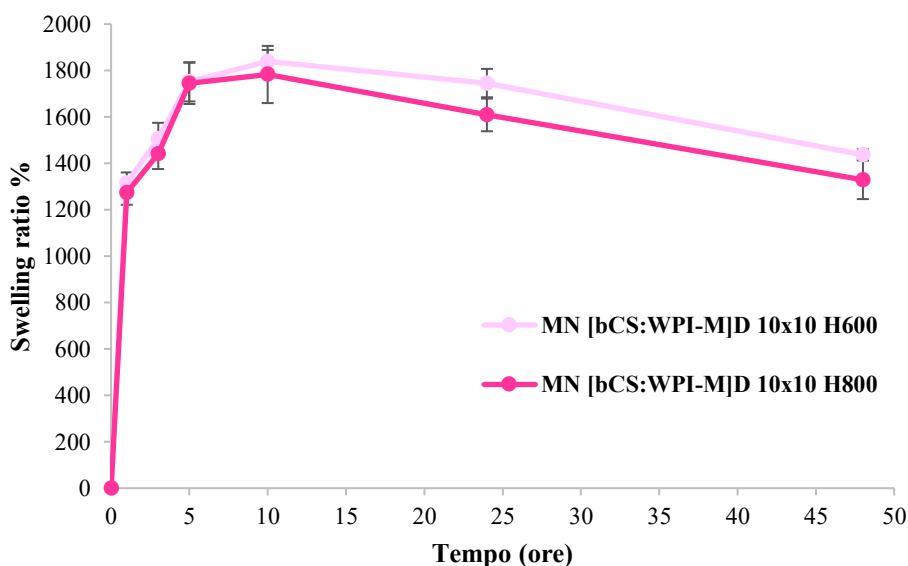


Figura 53 - Valori di *swelling ratio* % dei MN $[bCS:WPI^M]_D$ 10x10 H600 e H800, dopo 48 ore di idratazione con PBS (valori medi \pm e.s.; $n=5$).

I MN $[bCS:WPI^M]_D$ 10x10 H600 e H800 classificati come formanti-idrogel sono stati sottoposti a un test di degradazione in PBS, a temperatura ambiente. In Figura 54 sono riportati i profili relativi alla percentuale di degradazione, a partire dalle 10 ore di immersione, che rappresentano il tempo al quale dal test di rigonfiamento è evidente una perdita strutturale dei dispositivi. Si può notare come entrambi i

dispositivi richiedono circa 6 giorni (144 ore) per una degradazione del 50% del loro peso umido iniziale. Dopo 14 giorni (336 ore) la percentuale di MN [bCS:WPI^M]_D 10x10 H600 che rimane è pari al 12,67 ± 0,86%; mentre la percentuale di MN [bCS:WPI^M]_D 10x10 H800 è pari al 9,69 ± 0,56%. Ai fini dell'applicazione di questi MN per il trattamento delle cicatrici ipertrofiche con un approccio meccanico, quindi della creazione dei microcanali volti a interrompere la comunicazione tra i fibroblasti e la ECM, una lenta degradazione può consentire la manipolazione, nonché la rimozione di questi dispositivi dopo la loro applicazione. In aggiunta, in vista di una possibile veicolazione di un principio attivo nei dispositivi, questa degradazione potrebbe consentire il rilascio prolungato della molecola nel tempo.

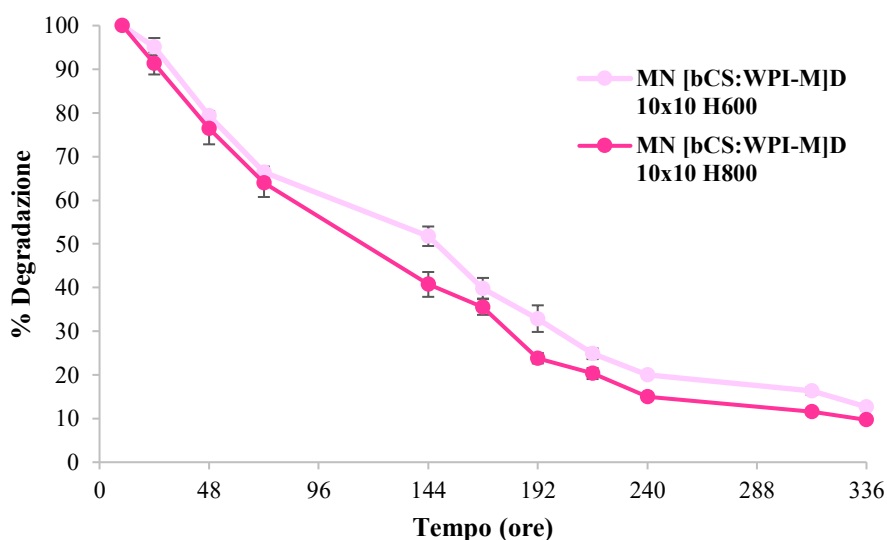
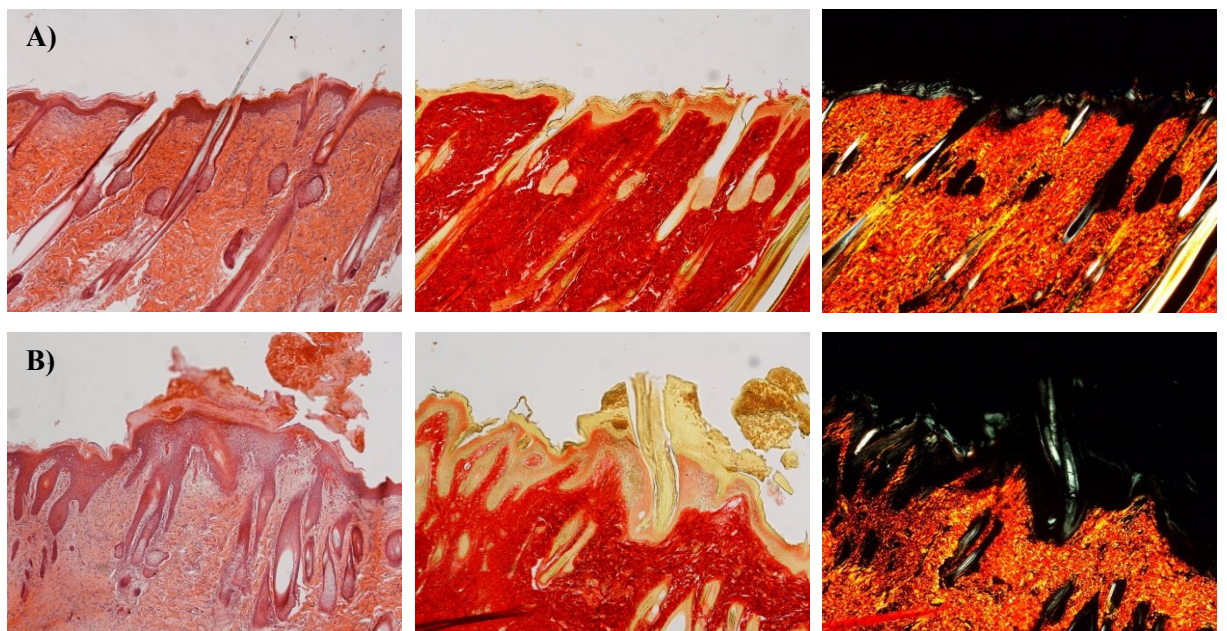


Figura 54 – Percentuale di degradazione dei MN [bCS:WPI^M]_D 10x10 H600 e H800 nell'arco di 14 giorni di immersione in PBS (valori medi ± e.s.; n=5).

I biomateriali innovativi [bCS:WPI^M]_D e [TMC:WPI]_D, utilizzati per la preparazione dei MN, sono stati testati *in vitro* su un modello cellulare di fibroblasti del derma umano. Il test di citocompatibilità diretto ha dimostrato la loro biocompatibilità *in vitro*. In vista della loro futura applicazione, i MN a base di [bCS:WPI^M]_D e [TMC:WPI]_D sono stati sottoposti a un test di biocompatibilità *in vivo*, su un modello animale. In Figura 55 sono mostrate le immagini relative all'analisi istologica delle biopsie a tutto spessore effettuate sulla pelle intatta e sulla pelle dopo l'impianto sottocutaneo dei MN. L'analisi istologica ha previsto la colorazione delle biopsie con ematossilina ed eosina (H&E) e picrosirius (PSR). L'ematossilina colora

i nuclei cellulari in blu-violaceo, mentre l'eosina colora la matrice extracellulare e il citoplasma in rosa. I modelli di colorazione generale forniscono una panoramica della struttura del campione di tessuto e mostrano la disposizione e distribuzione delle cellule. La colorazione con picrosirius si lega specificamente alle fibrille di collagene, rivelando l'organizzazione e l'eterogeneità delle fibrille di collagene all'interno del tessuto. In dettaglio, la colorazione PSR è in grado di identificare le fibre di collagene di tipo I, vecchie e di nuova deposizione, come filamenti da arancione a rosso, mentre le fibre di collagene di tipo III appaiono verdi.

Dopo 18 giorni dall'impianto dei MN [bCS:WPI^M]_D (Figura 55B e C) e [TMC:WPI]_D (Figura 55D e E) 10x10 H600 e H800, l'area della ferita è difficilmente riconoscibile rispetto alla pelle sana (Figura 55A). In Figura 55B e C, si osserva una completa rigenerazione sia dell'epidermide che del derma. In particolare, è stato identificato un epitelio squamoso cheratinizzato ben formato. La colorazione PSR ha mostrato fibre di collagene completamente rimodellate nell'epidermide e nel derma. Per quanto riguarda la Figura 55D ed E, si osserva una quasi completa rigenerazione, con i bulbi piliferi e le ghiandole sebacee completamente restaurati. Nel complesso non sono state osservate fibre di collagene di tipo III, ma solo fibre di collagene di tipo I da arancione a rosso, con un pattern identico a quello della pelle intatta, confermando la completa sicurezza dei MN.



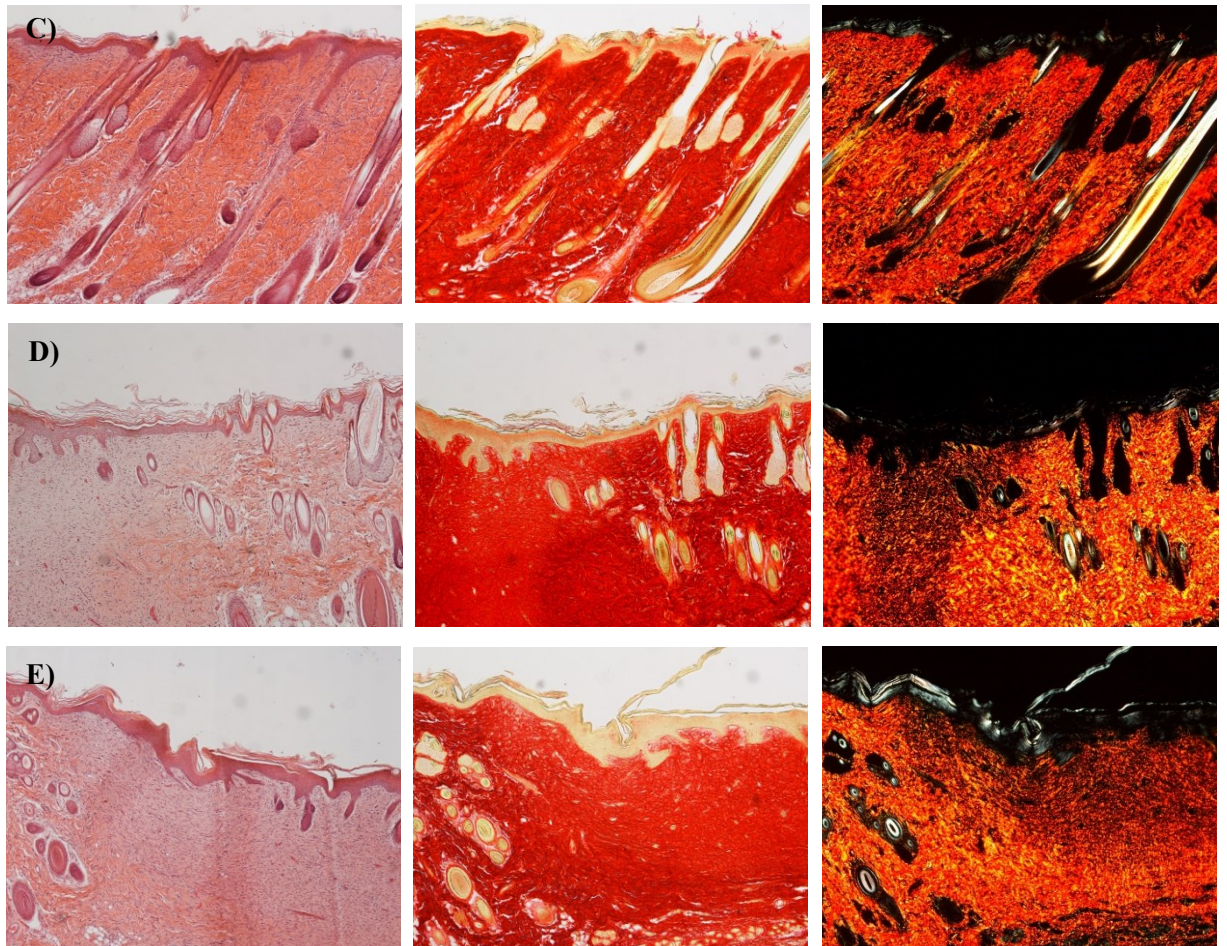


Figura 55 – Sezioni di ematossilina ed eosina (H&E) e PSR di (A) pelle sana (ingrandimento 5×); impianto sottocutaneo di (B) MN [bCS:WPIM]_D 10x10 H600, (C) MN [bCS:WPIM]_D 10x10 H800, (D) MN [TMC:WPI]_D 10x10 H600, (E) MN [TMC:WPI]_D 10x10 H600 (ingrandimento 5×).

Sono stati condotti anche studi preliminari per investigare l'efficacia *in vitro* dei seguenti MN: [bCS:WPI^M]_D 10x10 H600, [bCS:WPI^M]_D 10x10 H800 e [TMC:WPI]_D 10x10 H600. In particolare, i MN sono stati applicati con l'ausilio dell'applicatore MPatchTM Micro Applicator su un modello *in vitro*, noto in letteratura, che consiste in un reticolo di collagene popolato da fibroblasti (FPLC) per valutare la loro capacità di ridurre la contrazione di questo sistema, modificandone le proprietà viscoelastiche (Q. Zhang et al., 2022). Dall'istogramma in Figura 56, dopo 14 giorni di trattamento, è possibile osservare una riduzione dell'indice di contrazione del sistema FPLC in seguito all'applicazioni dei MN preparati con lo stampo 10x10 H800, rispetto al controllo non trattato. È infatti riportato in letteratura che i MN impediscono la comunicazione meccanica tra i fibroblasti e la matrice extracellulare (ECM), riducendo lo stress meccanico generato dai fibroblasti e quindi la crescita

delle cicatrici. Questa interruzione è considerata il principale meccanismo terapeutico, comunemente noto come approccio meccanoterapeutico (Q. Zhang et al., 2022).

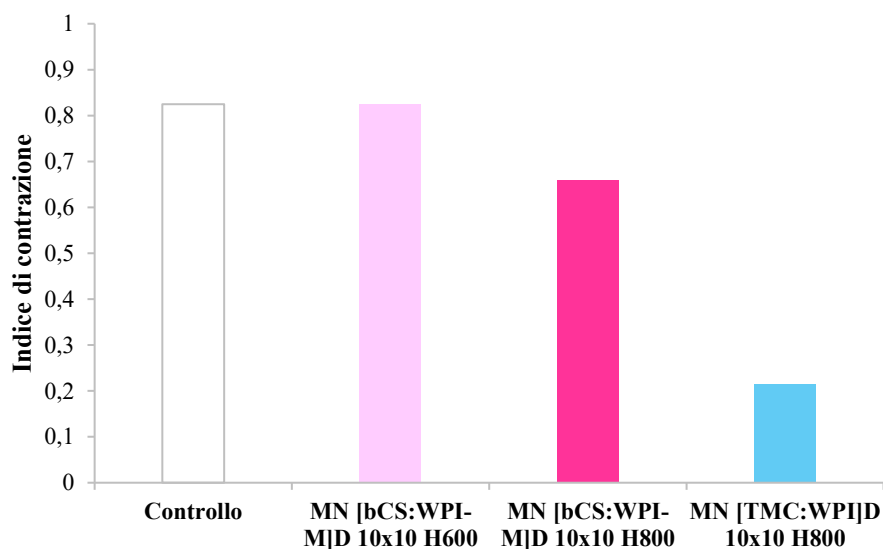


Figura 56 –Indice di contrazione del modello FPLC non trattato (controllo) e dopo 14 giorni di trattamento con i MN [bCS:WPIM]_D 10x10 H600, [bCS:WPIM]_D 10x10 H800 e [TMC:WPI]_D 10x10 H800 (CV < 10%).

I modelli FPLC, non trattato e dopo 14 giorni di trattamento, sono stati sottoposti a misure di viscoelasticità, per studiare il modulo elastico conservativo (G'). Come mostrato in Figura 57, il G' del modello FPLC di controllo, dopo 14 giorni, è circa 470 Pa; considerando, che in letteratura, il G' del controllo al giorno 0 è circa 237 Pa, l'incremento è da imputare all'aumento della proliferazione e contrazione cellulare. Tuttavia, solo il sistema FPLC trattato con il [bCS:WPI^M]_D 10x10 H800 mostra un G' ridotto, rispetto al controllo, e coerente con l'inibizione della contrazione. Ulteriori indagini e repliche sono necessarie per confermare i dati ottenuti.

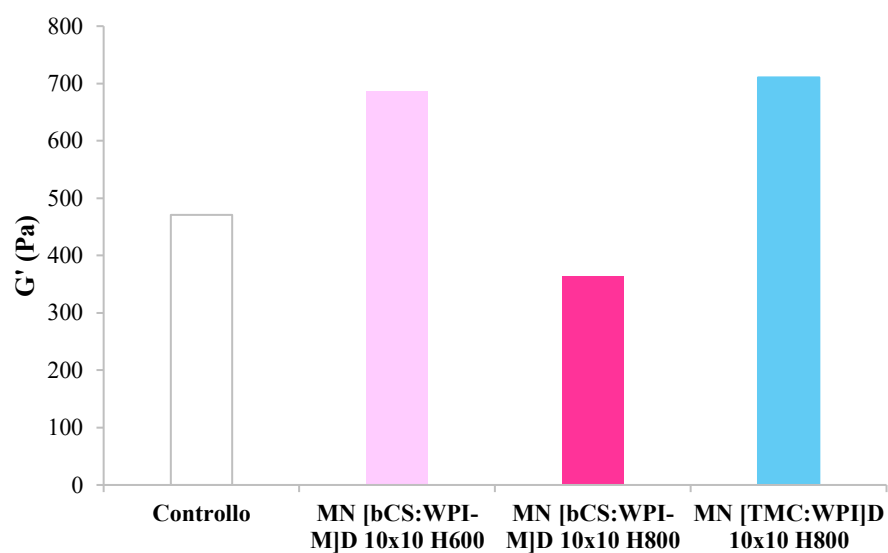


Figura 57 – Modulo elastico conservativo (G') a 10 Hz del sistema FPLC non trattato (controllo) e trattato con i MN [bCS:WPIM]_D 10x10 H600, [bCS:WPIM]_D 10x10 H800 e [TMC:WPI]_D 10x10 H800 ($CV < 10\%$).

Conclusioni

Nel presente lavoro di tesi sono stati preparati MN a base di biomateriali innovativi per il trattamento di cicatrici patologiche. I biomateriali innovativi utilizzati sono costituiti da complessi tra il chitosano a basso peso molecolare (bCS) o il suo derivato quaternario, il trimetilchitosano (TMC), combinati con le proteine del siero del latte (WPI). Le miscele a base di complessi, studiate e ottimizzate in un precedente lavoro, sono state preparate secondo due diverse condizioni sperimentali: i) per [bCS:WPI^M_D] e [TMC:WPI_D], la sospensione di WPI al 4% p/v è stata denaturata a 70°C per 20 minuti, sotto blanda agitazione magnetica, e successivamente è stata aggiunta alla soluzione polisaccaridica; ii) per [bCS:WPI^M]_D e [TMC:WPI]_D, la sospensione di WPI al 4% p/v è stata aggiunta alla soluzione di bCS o TMC, rispettivamente, dopo di che la miscela è stata trattata termicamente a 70°C per 20 minuti.

Nella prima fase del lavoro, la preparazione di film a base delle quattro miscele prese in esame è risultata utile per studiare preliminarmente il comportamento dei biomateriali con il metodo del *solvent casting*, utilizzato sia per la preparazione dei film che poi dei MN. Dai valori di forza tensile e di allungamento % è stato possibile definire i film con comportamento rigido, in linea con lo scopo del lavoro che è quello di ottenere MN in grado di perforare la cute senza rompersi. La valutazione del contenuto di solvente residuo è stata utile per quantificare il solvente rimasto nel *network* polimerico; che potrebbe avere la funzione di plasticizzante. Per valutare, infine, come i film si comportano in seguito a somministrazione è stata valutata la loro capacità di rigonfiamento (*swelling index*) e le proprietà di bioadesione. Si è compreso che i film di bCS (film [bCS:WPI^M_D] e [bCS:WPI^M]_D) rigonfiano maggiormente nell'arco delle 24 ore, a differenza dei film di TMC (film [TMC:WPI_D] e [TMC:WPI]_D) che dopo 3 ore iniziano a degradare. Nonostante questa differenza, i valori di *swelling index*, per tutti e quattro i film, risultano inferiori al quantitativo di solvente necessario per idratare completamente il film, indicando quindi i film come adatti all'applicazione cutanea. Per quanto riguarda le proprietà di bioadesione, invece, è possibile affermare che tutte le tipologie di film prese in considerazione sono in grado di rimanere adese al substrato biologico.

Durante la seconda fase del lavoro sono stati realizzati e caratterizzati i MN a base di biomateriali innovativi. Per la preparazione sono state utilizzate le quattro miscele a

base di complessi ([bCS:WPI^M]_D), [bCS:WPI^M]_D, [TMC:WPI]_D e [TMC:WPI]_D) e tre diversi tipi di stampi in PDMS (10x10 H600, 10x10 H800 e 15x15 H600). I MN preparati con il metodo del *solvent casting*, sono stati dapprima valutati morfologicamente: le immagini al microscopio ottico e SEM hanno mostrato una geometria ben definita degli aghi, con punte affilate e una superficie rugosa, dettata dalla presenza dei complessi PL-PR. Lo studio delle proprietà meccaniche ha permesso di selezionare soltanto due miscele e due stampi, risultati come ottimali per proseguire il lavoro. In particolare, sono stati selezionati i MN preparati con le miscele [bCS:WPI^M]_D e [TMC:WPI]_D e gli stampi 10x10 H800 e 10x10 H600, in quanto possiedono valori di forza superiori a 0,15 N per ago, che corrisponde al valore minimo riportato in letteratura che i MN devono avere per la somministrazione. Successivamente è stata valutata la capacità di inserzione dei MN in due modelli simulanti la pelle, nel primo modello è stato utilizzato il Parafilm[®] e nel secondo una miscela di proteine strutturali, polisaccaridi e lipidi. Attraverso questi due modelli si è potuto notare che i MN preparati con entrambe le miscele riescono a penetrare con successo, creando un numero di fori pari al 100% a una profondità di 200 µm. Soltanto i MN ottenuti dagli stampi 10x10 H800 sono in grado di raggiungere una profondità di penetrazione maggiore (400 µm), indice del fatto che il numero di fori creati diminuisce con la profondità di inserimento ed è maggiore per i MN più lunghi. Da questi dati si è potuta avere, quindi, ulteriore conferma che i MN siano in grado di resistere alla forza necessaria per l'inserimento nella pelle.

In seguito, sono state condotte analisi con lo scopo di classificare i MN in una delle cinque categorie (solidi, cavi, rivestiti, solubili e formanti-idrogel). Il saggio di dissoluzione ha permesso di classificare i MN di [TMC:WPI]_D 10x10 H600 e H800, come MN solubili, con dissoluzione completa nell'arco di 30 minuti. I MN a base di [bCS:WPI^M]_D 10x10 H600 e H800 sono stati, invece, classificati come formanti-idrogel; non dissolvendo nell'arco del tempo limite di 30 minuti, è stata valutata la loro capacità di rigonfiamento. Essi raggiungono dopo 10 ore la capacità di rigonfiamento massima, pari a 20 volte il loro peso iniziale, dopo di che cominciano a dissolvere, perdendo quindi integrità. La dissoluzione dei MN avviene lentamente,

infatti, dopo 14 giorni si ha una percentuale di MN residua pari al 12% e 9%, per i MN [bCS:WPI^M]_D 10x10 H600 e H800, rispettivamente.

Studi *in vivo* su un modello animale hanno permesso di identificare i MN 10x10 H600 e 10x10 H800 a base di [bCS:WPI^M]_D e [TMC:WPI]_D come biocompatibili e sicuri per l'applicazione. Infine, sono in corso studi per investigare l'efficacia *in vitro* dei MN individuati come più promettenti al fine di valutare la loro capacità di ridurre la contrazione di un sistema a reticolo di collagene popolato da fibroblasti (FPLC).

Bibliografia

- Abueva, C. D., Ryu, H. S., Park, S. Y., Lee, H., Padalhin, A. R., Min, J. W., Chung, P. S., & Woo, S. H. (2022). Trimethyl chitosan postoperative irrigation solution modulates inflammatory cytokines related to adhesion formation. *Carbohydrate Polymers*, 288. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119380>
- Agwa, M. M., Sabra, S., Atwa, N. A., Dahdooh, H. A., Lithy, R. M., & Elmotasem, H. (2022). Potential of frankincense essential oil-loaded whey protein nanoparticles embedded in frankincense resin as a wound healing film based on green technology. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 71. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103291>
- Ahmad, N., Tayyeb, D., Ali, I., K. Alruwaili, N., Ahmad, W., ur Rehman, A., Khan, A. H., & Iqbal, M. S. (2020). Development and Characterization of Hemicellulose-Based Films for Antibacterial Wound-Dressing Application. *Polymers*, 12(3), 548. <https://doi.org/10.3390/polym12030548>
- Alavi, T., Rezvanian, M., Ahmad, N., Mohamad, N., & Ng, S.-F. (2019). Pluronic-F127 composite film loaded with erythromycin for wound application: formulation, physicochemical and in vitro evaluations. *Drug Delivery and Translational Research*, 9(2), 508–519. <https://doi.org/10.1007/s13346-017-0450-z>
- Aldawood, F. K., Andar, A., & Desai, S. (2021). A comprehensive review of microneedles: Types, materials, processes, characterizations and applications. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym13162815>
- Alimardani, V., Abolmaali, S. S., Yousefi, G., Rahiminezhad, Z., Abedi, M., Tamaddon, A., & Ahadian, S. (2021). Microneedle arrays combined with nanomedicine approaches for transdermal delivery of therapeutics. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 10, Issue 2, pp. 1–33). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jcm10020181>
- Avcil, M., & Çelik, A. (2021). Microneedles in drug delivery: Progress and challenges. In *Micromachines* (Vol. 12, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/mi12111321>
- Babu, M. R., Vishwas, S., Khursheed, R., Harish, V., Sravani, A. B., Khan, F., Alotaibi, B., Binshaya, A., Disouza, J., Kumbhar, P. S., Patravale, V., Gupta, G.,

- Loebenberg, R., Arshad, M. F., Patel, A., Patel, S., Dua, K., & Singh, S. K. (2024). Unravelling the role of microneedles in drug delivery: Principle, perspectives, and practices. In *Drug Delivery and Translational Research* (Vol. 14, Issue 6, pp. 1393–1431). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13346-023-01475-9>
- Bakhtyar, N., Amini-Nik, S., & Jeschke, M. G. (2022). *OMICS Approaches Evaluating Keloid and Hypertrophic Scars*. <https://doi.org/10.1155/2022/1490492>
- Barone, N., Safran, T., Vorstenbosch, J., Davison, P. G., Cugno, S., & Murphy, A. M. (2021). Current Advances in Hypertrophic Scar and Keloid Management. In *Seminars in Plastic Surgery* (Vol. 35, Issue 3, pp. 145–152). Thieme Medical Publishers, Inc. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1731461>
- Bell, R. E., & Shaw, T. J. (2021). Keloid tissue analysis discredits a role for myofibroblasts in disease pathogenesis. *Wound Repair and Regeneration*, 29(4), 637–641. <https://doi.org/10.1111/wrr.12923>
- Betarbet, U., & Blalock, T. W. (2020). Keloids: A Review of Etiology, Prevention, and Treatment. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 13(2), 33–43.
- Bhadale, R. S., & Londhe, V. Y. (2021). A systematic review of carbohydrate-based microneedles: current status and future prospects. In *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (Vol. 32, Issue 8). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10856-021-06559-x>
- Boateng, J. S., Pawar, H. V., & Tetteh, J. (2015). Evaluation of in vitro wound adhesion characteristics of composite film and wafer based dressings using texture analysis and FTIR spectroscopy: A chemometrics factor analysis approach. *RSC Advances*, 5(129), 107064–107075. <https://doi.org/10.1039/c5ra20787h>
- Böhling, A., Bielfeldt, S., Himmelmann, A., Keskin, M., & Wilhelm, K. -P. (2014). Comparison of the stratum corneum thickness measured *in vivo* with confocal Raman spectroscopy and confocal reflectance microscopy. *Skin Research and Technology*, 20(1), 50–57. <https://doi.org/10.1111/srt.12082>

- Borbolla-Jiménez, F. V., Peña-Corona, S. I., Farah, S. J., Jiménez-Valdés, M. T., Pineda-Pérez, E., Romero-Montero, A., Del Prado-Audelo, M. L., Bernal-Chávez, S. A., Magaña, J. J., & Leyva-Gómez, G. (2023). Films for Wound Healing Fabricated Using a Solvent Casting Technique. *Pharmaceutics*, *15*(7), 1914. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071914>
- C. Duarte, A. R., Correló, V. M., Oliveira, J. M., & Reis, R. L. (2016). Recent Developments on Chitosan Applications in Regenerative Medicine. In *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies* (pp. 221–243). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119126218.ch14>
- Cárcamo-Martínez, Á., Mallon, B., Domínguez-Robles, J., Vora, L. K., Anjani, Q. K., & Donnelly, R. F. (2021). Hollow microneedles: A perspective in biomedical applications. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 599). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120455>
- Casey, L. S., & Wilson, L. D. (2015). Investigation of Chitosan-PVA Composite Films and Their Adsorption Properties. *Journal of Geoscience and Environment Protection*, *03*(02), 78–84. <https://doi.org/10.4236/gep.2015.32013>
- CHAMBERS, R. (1921). MICRODISSECTION STUDIES, III. SOME PROBLEMS IN THE MATURATION AND FERTILIZATION OF THE ECHINODERM EGG. *The Biological Bulletin*, *41*(6), 318–350. <https://doi.org/10.2307/1536756>
- Chen, Y. J., Cheng, H. W., Yen, W. Y., Tsai, J. H., Yeh, C. Y., Chen, C. J., Liu, J. T., Chen, S. Y., & Chang, S. J. (2022). The Treatment of Keloid Scars via Modulating Heterogeneous Gelatin-Structured Composite Microneedles to Control Transdermal Dual-Drug Release. *Polymers*, *14*(20). <https://doi.org/10.3390/polym14204436>
- Choi, I. J., Cha, H. R., Hwang, S. J., Baek, S. K., Lee, J. M., & Choi, S. O. (2021). Live vaccinia virus-coated microneedle array patches for smallpox vaccination and stockpiling. *Pharmaceutics*, *13*(2), 1–12. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020209>
- Chopra, H., Bibi, S., Kumar, S., Khan, M. S., Kumar, P., & Singh, I. (2022). Preparation and Evaluation of Chitosan/PVA Based Hydrogel Films Loaded with Honey for Wound Healing Application. *Gels*, *8*(2), 111. <https://doi.org/10.3390/gels8020111>

- Choudhary, V., Choudhary, M., & Bollag, W. B. (2024). Exploring Skin Wound Healing Models and the Impact of Natural Lipids on the Healing Process. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3790. <https://doi.org/10.3390/ijms25073790>
- Dabholkar, N., Gorantla, S., Waghule, T., Rapalli, V. K., Kothuru, A., Goel, S., & Singhvi, G. (2021). Biodegradable microneedles fabricated with carbohydrates and proteins: Revolutionary approach for transdermal drug delivery. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 170, pp. 602–621). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.177>
- Damiri, F., Kommineni, N., Ebhodaghe, S. O., Bulusu, R., Jyothi, V. G. S. S., Sayed, A. A., Awaji, A. A., Germoush, M. O., Al-Malky, H. S., Nasrullah, M. Z., Rahman, M. H., Abdel-Daim, M. M., & Berrada, M. (2022). Microneedle-Based Natural Polysaccharide for Drug Delivery Systems (DDS): Progress and Challenges. In *Pharmaceuticals* (Vol. 15, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ph15020190>
- Das, P., Manna, S., Roy, S., Nandi, S. K., & Basak, P. (2023). Polymeric biomaterials-based tissue engineering for wound healing: a systemic review. *Burns and Trauma*, 11. <https://doi.org/10.1093/burnst/tkac058>
- De Decker, I., Hoeksema, H., Verbelen, J., Vanlerberghe, E., De Coninck, P., Speeckaert, M. M., Blondeel, P., Monstrey, S., & Claes, K. E. Y. (2022). The use of fluid silicone gels in the prevention and treatment of hypertrophic scars: a systematic review and meta-analysis. In *Burns* (Vol. 48, Issue 3, pp. 491–509). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2022.03.004>
- Demir, Y. K., Akan, Z., & Kerimoglu, O. (2013). Characterization of Polymeric Microneedle Arrays for Transdermal Drug Delivery. *PLoS ONE*, 8(10), e77289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077289>
- Ding, S., Zhao, J., Jiang, Z., Mu, J., Huang, L., & Dai, C. (2023). Fabrication of whey protein isolate/chitosan complexes and its protective effect on allicin. *Journal of Applied Polymer Science*, 140(10). <https://doi.org/10.1002/app.53576>
- Domingues, R. B., von Rautenfeld, M., Kavalco, C. M., Caliari, C., Dellagiustina, C., da Fonseca, L. F., Costa, F. R., da Cruz Silva Reis, A., Santos, G. S., Azzini, G., de Faria, A. P. L., Santos, N., Pires, L., Huber, S. C., Mahmood, A., Dallo, I.,

- Everts, P., & Lana, J. F. (2024). The role of orthobiologics in chronic wound healing. *International Wound Journal*, 21(4). <https://doi.org/10.1111/iwj.14854>
- Donnelly, R., & Douroumis, D. (2015). Microneedles for drug and vaccine delivery and patient monitoring. *Drug Delivery and Translational Research*, 5(4), 311–312. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0250-2>
- Du, Q., Zhou, L., Lyu, F., Liu, J., & Ding, Y. (2021). *The complex of whey protein and pectin: Interactions, functional properties and applications in food colloidal systems-A review*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112253>
- Eldeeb, A. E., Salah, S., & Elkasabgy, N. A. (2022). Biomaterials for Tissue Engineering Applications and Current Updates in the Field: A Comprehensive Review. In *AAPS PharmSciTech* (Vol. 23, Issue 7). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1208/s12249-022-02419-1>
- Elsaie, M. L. (2021). Update on management of keloid and hypertrophic scars: A systemic review. In *Journal of Cosmetic Dermatology* (Vol. 20, Issue 9, pp. 2729–2738). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jocd.14310>
- Fonseca, D. F. S., Costa, P. C., Almeida, I. F., Dias-Pereira, P., Correia-Sá, I., Bastos, V., Oliveira, H., Duarte-Araújo, M., Morato, M., Vilela, C., Silvestre, A. J. D., & Freire, C. S. R. (2020). Pullulan microneedle patches for the efficient transdermal administration of insulin envisioning diabetes treatment. *Carbohydrate Polymers*, 241. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116314>
- Fonseca, D. F. S., Vilela, C., Silvestre, A. J. D., & Freire, C. S. R. (2019). A compendium of current developments on polysaccharide and protein-based microneedles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 704–728. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.163>
- Freitas, E. D., Moura, C. F., Kerwald, J., & Beppu, M. M. (2020). An overview of current knowledge on the properties, synthesis and applications of quaternary chitosan derivatives. In *Polymers* (Vol. 12, Issue 12, pp. 1–41). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym12122878>
- Genç, H., Friedrich, B., Alexiou, C., Pietryga, K., Cicha, I., & Douglas, T. E. L. (2023). Endothelialization of Whey Protein Isolate-Based Scaffolds for Tissue Regeneration. *Molecules*, 28(20). <https://doi.org/10.3390/molecules28207052>

- Gianatasio, C., Abrouk, M., & Waibel, J. S. (2021). Treatment approaches for treating hypertrophic scars and keloids. *Dermatological Reviews*, 2(1), 11–22. <https://doi.org/10.1002/der2.64>
- Gorantla, S., Dabholkar, N., Sharma, S., Rapalli, V. K., Alexander, A., & Singhvi, G. (2021). Chitosan-based microneedles as a potential platform for drug delivery through the skin: Trends and regulatory aspects. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 184, pp. 438–453). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.059>
- Gowda, B. H. J., Ahmed, M. G., Sahebkar, A., Riadi, Y., Shukla, R., & Kesharwani, P. (2022). Stimuli-Responsive Microneedles as a Transdermal Drug Delivery System: A Demand-Supply Strategy. In *Biomacromolecules* (Vol. 23, Issue 4, pp. 1519–1544). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c01691>
- Gushiken, L. F. S., Beserra, F. P., Bastos, J. K., Jackson, C. J., & Pellizzon, C. H. (2021). Cutaneous wound healing: An update from physiopathology to current therapies. In *Life* (Vol. 11, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/life11070665>
- Henry, S., McAllister, D. V., Allen, M. G., & Prausnitz, M. R. (1998). Microfabricated Microneedles: A Novel Approach to Transdermal Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(8), 922–925. <https://doi.org/10.1021/js980042+>
- Hou, G., Li, Y., Wang, Q., Zhang, H., Liang, S., Liu, B., & Shi, W. (2022). iRGD-grafted N-trimethyl chitosan-coated protein nanotubes enhanced the anticancer efficacy of curcumin and melittin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 222, 348–359. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.171>
- Huang, G.-Q., Sun, Y.-T., Xiao, J.-X., & Yang, J. (2012). Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. *Food Chemistry*, 135(2), 534–539. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.140>
- Ivanova, D. G., & Yaneva, Z. L. (2020). Antioxidant Properties and Redox-Modulating Activity of Chitosan and Its Derivatives: Biomaterials with Application in Cancer Therapy. *BioResearch Open Access*, 9(1), 64–72. <https://doi.org/10.1089/biores.2019.0028>

- Johnson, A. R., & Procopio, A. T. (2019). Low cost additive manufacturing of microneedle masters. *3D Printing in Medicine*, 5(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s41205-019-0039-x>
- Jung, J. H., & Jin, S. G. (2021). Microneedle for transdermal drug delivery: current trends and fabrication. In *Journal of Pharmaceutical Investigation* (Vol. 51, Issue 5, pp. 503–517). Springer. <https://doi.org/10.1007/s40005-021-00512-4>
- Kang, Y., Liu, Z., Long, Y., Wang, B., Yang, X., Sha, D., Shi, K., Ji, X., Li, B., & Liu, Y. (2021). Synthesis and structural characterization of N,N,N-trimethyl chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*. <https://doi.org/10.1002/app.51811>
- Karbowiak, T., Hervet, H., Léger, L., Champion, D., Debeaufort, F., & Voilley, A. (2006). Effect of Plasticizers (Water and Glycerol) on the Diffusion of a Small Molecule in Iota-Carrageenan Biopolymer Films for Edible Coating Application. *Biomacromolecules*, 7(6), 2011–2019. <https://doi.org/10.1021/bm060179r>
- Karina, K., Ekaputri, K., Andrew, H., & Biben, J. A. (2023). Microneedle Electroporation for Intralesional Administration of Corticosteroid Treatment of Keloid Scar. *Acta Dermato-Venereologica*, 103. <https://doi.org/10.2340/actadv.v103.13402>
- Kazimierska, K., & Kalinowska-Lis, U. (2021). Milk proteins-their biological activities and use in cosmetics and dermatology. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules26113253>
- Ke, C. L., Deng, F. S., Chuang, C. Y., & Lin, C. H. (2021). Antimicrobial actions and applications of Chitosan. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym13060904>
- Kim, E. Y., Hussain, A., & Khachemoune, A. (2022). Evidence-based management of keloids and hypertrophic scars in dermatology. *Archives of Dermatological Research*, 315(6), 1487–1495. <https://doi.org/10.1007/s00403-022-02509-x>
- Kim, S. W. (2021). Management of keloid scars: Noninvasive and invasive treatments. In *Archives of Plastic Surgery* (Vol. 48, Issue 2, pp. 149–157). Korean Society of Plastic and Reconstructive Surgeons. <https://doi.org/10.5999/aps.2020.01914>

- Klomprens, K., & Simman, R. (2022). Treatment of keloids: A Meta-analysis of Intralesional Triamcinolone, Verapamil, and Their Combination. *Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open*, 10(1), E4075. <https://doi.org/10.1097/GOX.00000000000004075>
- Kulkarni, D., Gadade, D., Chapaitkar, N., Shelke, S., Pekamwar, S., Aher, R., Ahire, A., Avhale, M., Badgule, R., Bansode, R., & Bobade, B. (2023). Polymeric Microneedles: An Emerging Paradigm for Advanced Biomedical Applications. In *Scientia Pharmaceutica* (Vol. 91, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/scipharm91020027>
- Larrañeta, E., Moore, J., Vicente-Pérez, E. M., González-Vázquez, P., Lutton, R., Woolfson, A. D., & Donnelly, R. F. (2014). A proposed model membrane and test method for microneedle insertion studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 472(1–2), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.05.042>
- Le, Z., Yu, J., Quek, Y. J., Bai, B., Li, X., Shou, Y., Myint, B., Xu, C., & Tay, A. (2023). Design principles of microneedles for drug delivery and sampling applications. In *Materials Today* (Vol. 63, pp. 137–169). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2022.10.025>
- Leceta, I., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2013). Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers*, 93(1), 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.031>
- Lee, J. W., Park, J.-H., & Prausnitz, M. R. (2008). Dissolving microneedles for transdermal drug delivery. *Biomaterials*, 29(13), 2113–2124. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.048>
- Li, Y., Bi, D., Hu, Z., Yang, Y., Liu, Y., & Leung, W. K. (2023). Hydrogel-Forming Microneedles with Applications in Oral Diseases Management. In *Materials* (Vol. 16, Issue 13). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ma16134805>
- Limandjaja, G. C., Niessen, F. B., Scheper, R. J., & Gibbs, S. (2021). Hypertrophic scars and keloids: Overview of the evidence and practical guide for differentiating between these abnormal scars. In *Experimental Dermatology* (Vol. 30, Issue 1, pp. 146–161). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/exd.14121>

- Lir, I., Haber, M., & Dodiuk-Kenig, H. (2007). Skin surface model material as a substrate for adhesion-to-skin testing. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 21(15), 1497–1512. <https://doi.org/10.1163/156856107782844783>
- Liu, X., Chen, W., Zeng, Q., Ma, B., Li, Z., Meng, T., Chen, J., Yu, N., Zhou, Z., & Long, X. (2022). Single-Cell RNA-Sequencing Reveals Lineage-Specific Regulatory Changes of Fibroblasts and Vascular Endothelial Cells in Keloids. *Journal of Investigative Dermatology*, 142(1), 124-135.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.06.010>
- Liu, X. gang, & Zhang, D. (2021). Evaluation of Efficacy of Corticosteroid and Corticosteroid Combined with Botulinum Toxin Type A in the Treatment of Keloid and Hypertrophic Scars: A Meta-Analysis. In *Aesthetic Plastic Surgery* (Vol. 45, Issue 6, pp. 3037–3044). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00266-021-02426-w>
- Lopes, I. S., Michelon, M., Duarte, L. G. R., Prediger, P., Cunha, R. L., & Picone, C. S. F. (2021). Effect of chitosan structure modification and complexation to whey protein isolate on oil/water interface stabilization. *Chemical Engineering Science*, 230. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2020.116124>
- Luo, X., Yang, L., & Cui, Y. (2023a). Microneedles: materials, fabrication, and biomedical applications. In *Biomedical Microdevices* (Vol. 25, Issue 3). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10544-023-00658-y>
- Luo, Z., Sun, W., Fang, J., Lee, K., Li, S., Gu, Z., Dokmeci, M. R., & Khademhosseini, A. (2019). Biodegradable Gelatin Methacryloyl Microneedles for Transdermal Drug Delivery. *Advanced Healthcare Materials*, 8(3). <https://doi.org/10.1002/adhm.201801054>
- Lyu, S., Dong, Z., Xu, X., Bei, H. P., Yuen, H. Y., James Cheung, C. W., Wong, M. S., He, Y., & Zhao, X. (2023). Going below and beyond the surface: Microneedle structure, materials, drugs, fabrication, and applications for wound healing and tissue regeneration. In *Bioactive Materials* (Vol. 27, pp. 303–326). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.04.003>
- Ma, Y., Liu, Z., Miao, L. L., Jiang, X., Ruan, H., Xuan, R., & Xu, S. (2023). Mechanisms underlying pathological scarring by fibroblasts during wound

- healing. *International Wound Journal*, 20(6), 2190–2206.
<https://doi.org/10.1111/IWJ.14097>
- Maaz Arif, M., Khan, S. M., Gull, N., Tabish, T. A., Zia, S., Ullah Khan, R., Awais, S. M., & Arif Butt, M. (2021). Polymer-based biomaterials for chronic wound management: Promises and challenges. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 598). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120270>
- Makvandi *et al.*, 2021. (n.d.).
- Makvandi, P., Kirkby, M., Hutton, A. R. J., Shabani, M., Yiu, C. K. Y., Baghbantargarhdari, Z., Jamaledin, R., Carlotti, M., Mazzolai, B., Mattoli, V., & Donnelly, R. F. (2021). Engineering Microneedle Patches for Improved Penetration: Analysis, Skin Models and Factors Affecting Needle Insertion. In *Nano-Micro Letters* (Vol. 13, Issue 1). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s40820-021-00611-9>
- Mandour, Y., Bake, H., Mofty, E., Ramadan, E., Gomaa, M., Akl, E., & Elrefae, A. (2021). Topical versus interlesional mitomycin C in auricular keloids. *Acta Otorrinolaringológica Española*, 72(5), 280–287.
- Mansoor, I., Eassa, H. A., Mohammed, K. H. A., Abd El-Fattah, M. A., Abdo, M. H., Rashad, E., Eassa, H. A., Saleh, A., Amin, O. M., Nounou, M. I., & Ghoneim, O. (2022). Microneedle-Based Vaccine Delivery: Review of an Emerging Technology. In *AAPS PharmSciTech* (Vol. 23, Issue 4). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1208/s12249-022-02250-8>
- Mbituyimana, B., Bukatuka, C. F., Qi, F., Ma, G., Shi, Z., & Yang, G. (2023). Microneedle-mediated drug delivery for scar prevention and treatment. In *Drug Discovery Today* (Vol. 28, Issue 11). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103801>
- Menashe, S., & Lior Heller, •. (n.d.). *Keloid and Hypertrophic Scars Treatment*.
<https://doi.org/10.1007/s00266-024-03869-7>
- Menon, I., Bagwe, P., Gomes, K. B., Bajaj, L., Gala, R., Uddin, M. N., D'souza, M. J., & Zughaier, S. M. (2021). Microneedles: A new generation vaccine delivery

- system. In *Micromachines* (Vol. 12, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/mi12040435>
- Minj, S., & Anand, S. (2020). Whey Proteins and Its Derivatives: Bioactivity, Functionality, and Current Applications. In *Dairy* (Vol. 1, Issue 3, pp. 233–258). MDPI. <https://doi.org/10.3390/dairy1030016>
- Molina, E. A., Hartmann, B., Oliver, M. A., Kirkpatrick, L. D., Keyloun, J. W., Moffatt, L. T., Shupp, J. W., Travis, T. E., & Carney, B. C. (2022). Angiogenic gene characterization and vessel permeability of dermal microvascular endothelial cells isolated from burn hypertrophic scar. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16376-z>
- Ngadaonye, J. I., Geever, L. M., Killion, J., & Higginbotham, C. L. (2013). Development of novel chitosan-poly(N,N-diethylacrylamide) IPN films for potential wound dressing and biomedical applications. *Journal of Polymer Research*, *20*(7), 161. <https://doi.org/10.1007/s10965-013-0161-1>
- Nguyen, A., Huynh, C., Goh, A., Co, A., Hassan, O., & Phan, S. (2023). A systematic review of the management of postoperative scars with silicone gel-based products in randomized controlled trials. In *Dermatology Online Journal* (Vol. 29, Issue 4). Dermatology Online Journal. <https://doi.org/10.5070/D329461860>
- Ogawa, R. (2022). The Most Current Algorithms for the Treatment and Prevention of Hypertrophic Scars and Keloids: A 2020 Update of the Algorithms Published 10 Years Ago. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *149*(1), 79E-94E. <https://doi.org/10.1097/PRS.00000000000008667>
- Pang, Z., Sun, M., Li, B., Bourouis, I., Chen, C., Huang, Y., Liu, X., & Wang, P. (2024). Morphology, surface characteristics and tribological properties of whey protein/chitosan composite particles and their fat replacing effect in O/W emulsion. *International Journal of Biological Macromolecules*, *259*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129301>
- Park, J.-H., Allen, M. G., & Prausnitz, M. R. (2005). Biodegradable polymer microneedles: Fabrication, mechanics and transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, *104*(1), 51–66. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.02.002>

- Pathak, K., Misra, S. K., Sehgal, A., Singh, S., Bungau, S., Najda, A., Gruszecki, R., & Behl, T. (2021). Biomedical applications of quaternized Chitosan. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 15). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym13152514>
- Peña, O. A., & Martin, P. (2024). Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25(8), 599–616. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00715-1>
- Peng, T., Chen, Y., Hu, W., Huang, Y., Zhang, M., Lu, C., Pan, X., & Wu, C. (2023b). Microneedles for Enhanced Topical Treatment of Skin Disorders: Applications, Challenges, and Prospects. In *Engineering* (Vol. 30, pp. 170–189). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.05.009>
- Pino, P., Ronchetti, S., Mollea, C., Sangermano, M., Onida, B., & Bosco, F. (2021). Whey proteins–zinc oxide bionanocomposite as antibacterial films. *Pharmaceutics*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091426>
- Pino, P., Vigani, B., Valentino, C., Ianev, D., Ruggeri, M., Boselli, C., Cornaglia, A. I., Grisoli, P., Onida, B., Bosco, F., Sandri, G., & Rossi, S. (2024). Sustainable whey proteins-nanostructured zinc oxide-based films for the treatment of chronic wounds: New insights from biopharmaceutical studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 263. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130655>
- Qiao, C., Ma, X., Wang, X., & Liu, L. (2021). Structure and properties of chitosan films: Effect of the type of solvent acid. *LWT*, 135, 109984. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109984>
- Quinn, H. L., Bonham, L., Hughes, C. M., & Donnelly, R. F. (2015). Design of a Dissolving Microneedle Platform for Transdermal Delivery of a Fixed-Dose Combination of Cardiovascular Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(10), 3490–3500. <https://doi.org/10.1002/jps.24563>
- Rahmati, M., Silva, E. A., Reseland, J. E., Heyward, C., & Haugen, H. J. (2020). Biological responses to physicochemical properties of biomaterial surface. *Chemical Society Reviews*, 49(15), 5178–5224. <https://doi.org/10.1039/D0CS00103A>

- Raina, N., Rani, R., Pahwa, R., & Gupta, M. (2022). Biopolymers and treatment strategies for wound healing: an insight view. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 71(5), 359–375.
- Rathinam, S., Ólafsdóttir, S., Jónsdóttir, S., Hjálmarsdóttir, M. Á., & Másson, M. (2020). Selective synthesis of N,N,N-trimethylated chitosan derivatives at different degree of substitution and investigation of structure-activity relationship for activity against *P. aeruginosa* and MRSA. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 548–557.
- Riedemann, H. I., Schmidt, M. F., & Baron, J. M. (2023). Therapy of pathological scars. *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 21(7), 761–776. <https://doi.org/10.1111/ddg.15088>
- Ryall, C., Chen, S., Duarah, S., & Wen, J. (2022). Chitosan-based microneedle arrays for dermal delivery of *Centella asiatica*. *International Journal of Pharmaceutics*, 627. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122221>
- Sadeghi, A. M. M., Dorkoosh, F. A., Avadi, M. R., Saadat, P., Rafiee-Tehrani, M., & Junginger, H. E. (2008). Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods. *International Journal of Pharmaceutics*, 355(1–2), 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.052>
- Sandby-Møller, J., Poulsen, T., & Wulf, H. C. (2003). Epidermal Thickness at Different Body Sites: Relationship to Age, Gender, Pigmentation, Blood Content, Skin Type and Smoking Habits. *Acta Dermato-Venereologica*, 83(6), 410–413. <https://doi.org/10.1080/00015550310015419>
- Savencu, I., Iurian, S., Porfire, A., Bogdan, C., & Tomuță, I. (2021). Review of advances in polymeric wound dressing films. In *Reactive and Functional Polymers* (Vol. 168). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105059>
- Setiowati, A. D., Wijaya, W., & Van der Meeren, P. (2020). Whey protein-polysaccharide conjugates obtained via dry heat treatment to improve the heat stability of whey protein stabilized emulsions. In *Trends in Food Science and*

- Technology* (Vol. 98, pp. 150–161). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.011>
- Shan, M., & Wang, Y. (2022). Viewing keloids within the immune microenvironment. In *Am J Transl Res* (Vol. 14, Issue 2). www.ajtr.org
- Shelke, N. B., James, R., Laurencin, C. T., & Kumbar, S. G. (2014). Polysaccharide biomaterials for drug delivery and regenerative engineering. *Polymers for Advanced Technologies*, 25(5), 448–460. <https://doi.org/10.1002/pat.3266>
- Sheng, M., Chen, Y., Li, H., Zhang, Y., & Zhang, Z. (2023). The application of corticosteroids for pathological scar prevention and treatment: current review and update. In *Burns and Trauma* (Vol. 11). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/burnst/tkad009>
- Shriky, B., Babenko, M., & Whiteside, B. R. (2023). Dissolving and Swelling Hydrogel-Based Microneedles: An Overview of Their Materials, Fabrication, Characterization Methods, and Challenges. In *Gels* (Vol. 9, Issue 10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/gels9100806>
- Silva, A. C. Q., Pereira, B., Lameirinhas, N. S., Costa, P. C., Almeida, I. F., Dias-Pereira, P., Correia-Sá, I., Oliveira, H., Silvestre, A. J. D., Vilela, C., & Freire, C. S. R. (2023). Dissolvable Carboxymethylcellulose Microneedles for Noninvasive and Rapid Administration of Diclofenac Sodium. *Macromolecular Bioscience*, 23(1). <https://doi.org/10.1002/mabi.202200323>
- Sirbubalo, M., Tucak, A., Muhamedagic, K., Hindija, L., Rahić, O., Hadžiabdić, J., Cekic, A., Begic-Hajdarevic, D., Husic, M. C., Dervišević, A., & Vranić, E. (2021). 3d printing—a “touch-button” approach to manufacture microneedles for transdermal drug delivery. In *Pharmaceutics* (Vol. 13, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070924>
- Slota, D., Głąb, M., Tyliczszak, B., Dogulas, T. E. L., Rudnicka, K., Miernik, K., Urbaniak, M. M., Rusek-Wala, P., & Sobczak-upiec, A. (2021). Composites based on hydroxyapatite and whey protein isolate for applications in bone regeneration. *Materials*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/ma14092317>
- Sonetha, V., Majumdar, S., & Shah, S. (2022). Step-wise micro-fabrication techniques of microneedle arrays with applications in transdermal drug

- delivery-A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 68, 103119. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103119>
- Stefano Frech, F., Hernandez, L., Urbonas, R., Abo Zaken, G., Dreyfuss, I., & Nouri, K. (123 C.E.). Hypertrophic Scars and Keloids: Advances in Treatment and Review of Established Therapies. *American Journal of Clinical Dermatology*, 24, 225–245. <https://doi.org/10.1007/s40257-022-00744-6>
- Suyatma, N. E., Tighzert, L., Copinet, A., & Coma, V. (2005). Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 3950–3957. <https://doi.org/10.1021/jf048790+>
- Tang, W., Wang, J., Hou, H., Li, Y., Wang, J., Fu, J., Lu, L., Gao, D., Liu, Z., Zhao, F., Gao, X., Ling, P., Wang, F., Sun, F., & Tan, H. (2023). Review: Application of chitosan and its derivatives in medical materials. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 240). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124398>
- Tavares, L., Souza, H. K. S., Gonçalves, M. P., & Rocha, C. M. R. (2021). Physicochemical and microstructural properties of composite edible film obtained by complex coacervation between chitosan and whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 113. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106471>
- Tian, J., Shi, D., Long, C., Ding, J., You, H., He, X., & Cheng, B. (2023). *Platelet concentrates may affect the formation of pathological scars by regulating epithelial to mesenchymal transition*. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2023.111227>
- Tiwari, N., Kumar, D., Priyadarshani, A., Jain, G. K., Mittal, G., Kesharwani, P., & Aggarwal, G. (2023). Recent progress in polymeric biomaterials and their potential applications in skin regeneration and wound care management. In *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (Vol. 82). Editions de Sante. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104319>
- Turner, J. G., White, L. R., Estrela, P., & Leese, H. S. (2021). Hydrogel-Forming Microneedles: Current Advancements and Future Trends. In *Macromolecular Bioscience* (Vol. 21, Issue 2). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/mabi.202000307>

- Turobi, N. B., Rahman, F., Fernanda, N., & Fawzy, A. (n.d.). *International Journal of Medical Science and Clinical Research Studies Clinical and Molecular Insights into Hypertrophic Scars and Keloids: A Literature Review*.
<https://doi.org/10.47191/ijmscrs/v4>
- Vacanti, C. A., & Vacanti, J. P. (1991). Functional Organ Replacement, The New Technology of Tissue Engineering. *Surgical Technology International, I*, 43–49.
- Wang, S., Zhao, M., Yan, Y., Li, P., & Huang, W. (2023b). Flexible Monitoring, Diagnosis, and Therapy by Microneedles with Versatile Materials and Devices toward Multifunction Scope. *Research, 6*.
<https://doi.org/10.34133/research.0128>
- Wermeling, D. P., Banks, S. L., Hudson, D. A., Gill, H. S., Gupta, J., Prausnitz, M. R., & Stinchcomb, A. L. (2008). Microneedles permit transdermal delivery of a skin-impermeant medication to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105*(6), 2058–2063.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0710355105/ASSET/4DA9B045-BDC0-43C3-A3FB-14DCBA2C65E2/ASSETS/GRAPHIC/ZPQ0050892890003.JPEG>
- Xiu, X., Gao, G., Liu, Y., & Ma, F. (2022). Drug delivery with dissolving microneedles: skin puncture, its influencing factors and improvement strategies. In *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (Vol. 76). Editions de Sante. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103653>
- Xu, J., Xu, D., Xuan, X., & He, H. (2021). Advances of microneedles in biomedical applications. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules26195912>
- Xu, W., Tang, Y., Yang, Y., Wang, G., & Zhou, S. (2020). Establishment of a stable complex formed from whey protein isolate and chitosan and its stability under environmental stresses. *International Journal of Biological Macromolecules, 165*, 2823–2833. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.130>
- Xue, Y., Chen, C., Mi, X., Tan, R., Wang, J., Wu, S., Wang, Y., Xiong, R., Chen, M., Tan, W. Q., & Lu, H. (2024). Transdermal Drug Delivery System: Current Status and Clinical Application of Microneedles. In *ACS Materials Letters* (Vol. 6, Issue 3, pp. 801–821). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsmaterialslett.3c01317>

- Yang, B., Dong, Y., Shen, Y., Hou, A., Quan, G., Pan, X., & Wu, C. (2021). Bilayer dissolving microneedle array containing 5-fluorouracil and triamcinolone with biphasic release profile for hypertrophic scar therapy. *Bioactive Materials*, 6(8), 2400–2411. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.01.014>
- Yang, S., Luo, Y. J., & Luo, C. (2021). Network Meta-Analysis of Different Clinical Commonly Used Drugs for the Treatment of Hypertrophic Scar and Keloid. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.691628>
- Yu, M., Lu, Z., Shi, Y., Du, Y., Chen, X., & Kong, M. (2021). Systematic comparisons of dissolving and swelling hyaluronic acid microneedles in transdermal drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 191, 783–791. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.161>
- Zandona, E., Blažić, M., & Jambrak, A. R. (n.d.). *Whey Utilisation: Sustainable Uses and Environmental Approach*. 59(2). <https://doi.org/10.17113/ftb.59.02.21.6968>
- Zhang, Q., Shi, L., He, H., Liu, X., Huang, Y., Xu, D., Yao, M., Zhang, N., Guo, Y., Lu, Y., Li, H., Zhou, J., Tan, J., Xing, M., & Luo, G. (2022). Down-Regulating Scar Formation by Microneedles Directly via a Mechanical Communication Pathway. *ACS Nano*, 16(7), 10163–10178. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c11016>
- Zhang, W., Li, X., & Li, X. (2023). Efficacy and Safety of Verapamil Versus Triamcinolone Acetonide in Treating Keloids and Hypertrophic Scars: A Systematic Review and Meta-Analysis. In *Aesthetic Plastic Surgery* (Vol. 47, Issue 1, pp. 473–482). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00266-022-03229-3>
- Zhang, X., Wang, Y., Chi, J., & Zhao, Y. (2020). Smart Microneedles for Therapy and Diagnosis. *Research*, 2020. <https://doi.org/10.34133/2020/7462915>