

ISSN 1723-168X
Prezzo € 5,00



La seta nel terzo millennio

tra scienza e innovazione

TAMARA POSATI e ROBERTO ZAMBONI, Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività (CNR-ISOF),
Area della Ricerca di Bologna

Le immagini che illustrano l'articolo
sono state fornite dagli autori



L' Imperatrice Leizu con i bachi
e i bozzoli presenti
nel giardino imperiale

MITO, RIVOLUZIONE INDUSTRIALE ED INNOVAZIONE

■ La scoperta e la lavorazione della seta a partire dal bozzolo del baco da seta “*Bombyx mori*” risale alle origini della civiltà cinese, secondo una narrazione in cui storia e mitologia sono strettamente intrecciate. Si racconta infatti che 5.000 anni fa, nel giardino imperiale del Grande Imperatore Giallo, un bozzolo di baco da seta cadde nella tazza di tè caldo dell'Imperatrice Leizu. Nel toglierlo dalla tazza, Leizu si accorse che il bozzolo non era più rigido, ma morbido e nel maneggiarlo colse il capo di un filo che svolse per tutta la chilometrica ampiezza del giardino. Incuriosita, ripeté l'esperimento con successo fino ad ottenere abbastanza filo e creare, infine, un tessuto lucente, fresco e morbido al tatto. Non paga, convinse il consorte, il Grande Imperatore Giallo, ad organizzare un allevamento di bachi, inventò un rocchetto per raccogliergli il filo ed un telaio per tesserlo. Leizu diede così origine alla sericoltura e divenne la Dea della Seta. Nella contea di Yuan'an è oggi presente un parco a lei dedicato.

I prodotti di seta si diffusero dalla Cina in Occidente, fino all'antico Egitto. Di fatto, nel corso dei secoli, in

Cina si svilupparono altri impieghi della seta, oltre alla realizzazione di tessuti. Fu utilizzata con successo per armi, strumenti musicali, carta, banconote, utensili quali lenze da pesca, ma anche in quanto tale, come valuta di scambio commerciale. Ciò che venne tenuto rigorosamente segreto, o almeno si fece di tutto perché rimanesse tale perfino con la minaccia della pena di morte per chi li avesse divulgati, fu l'origine del materiale seta e il processo per la sua lavorazione. Questa attitudine a occultare i metodi ed i processi di lavorazione la ritroviamo anche a Bologna, città leader europea nella produzione di filati e tessuti di seta dal XIV fino al XVIII secolo, con un sistema produttivo che Carlo Poni definisce “una grande industria prima della rivoluzione industriale”. La leadership di Bologna è in sintesi legata ad una innovazione tecnologica consistente nell'introduzione della ruota idraulica per la movimentazione del mulino da seta, denominato quindi “alla bolognese”. La grande macchina, posta all'interno di edifici-fabbrica a più piani, non era visibile dall'esterno. Come nel caso cinese, anche Bologna preservava il proprio vantaggio tecnologico celando le conoscenze relative ai macchinari e ai processi per ottenere i manufatti di seta. Per gli eventuali divulgatori dei segreti produttivi, era prevista la pena di morte.

Nel XVIII secolo, con un'operazione di spionaggio industriale ante litteram, John Lombe trafugò il segreto del mulino "exactly alla bolognese" impiantando in Inghilterra, a Derby, una vera e propria fabbrica che l'autore di Robinson Crusoe, Daniel Defoe, descrisse come un edificio di 500 piedi, alto 5 piani, con 460 finestre e macchine composte da 25.500 ruote e da 97.000 altri pezzi che producevano 73.000 braccia di filo di seta al giorno. La Rivoluzione Industriale del XVIII secolo era incipiente e da lì iniziò il declino della produzione di seta e dei manufatti di Bologna, ed in generale dell'Italia. Negli anni Venti del Novecento la produzione italiana di bozzoli di bachi da seta era pari a 38 milioni di chili, circa un decimo di quella mondiale, e mancava una leadership tecnologica. Oggi, le nanotecnologie e l'applicazione di un metodo, di cui parleremo più avanti, messo a punto dallo scienziato americano David Kaplan, che consente di ricavare una soluzione di seta a partire dal bozzolo di *Bombyx mori*, portano il materiale seta ad essere il protagonista di una vera e propria piattaforma tecnologica altamente innovativa che abilita la produzione di dispositivi biomedicali impiantabili nel corpo umano, dispositivi elettronici, optoelettronici e fotonici a base di seta. Di seguito sono descritte le ricerche in tale ambito, condotte al CNR-ISOF dell'Area della Ricerca di Bologna. Tali indagini sono svolte in collaborazione con enti nazionali ed internazionali, a partire da quella con David Kaplan e Fiorenzo Omenetto della Tuft University, con la quale, circa dieci anni or sono, ha avuto inizio il percorso della via della seta tecnologica del terzo millennio.

LA FIBROINA DELLA SETA

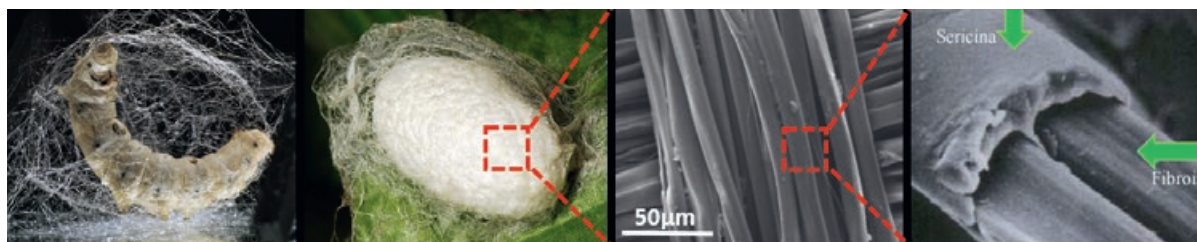
■ La fibroina della seta è una proteina naturale fibrosa prodotta principalmente dai ragni e dai bachi da seta. Tale proteina viene sintetizzata all'interno delle ghiandole degli insetti e prodotta sotto forma di fibre o filamenti attraverso un vero e proprio processo di filatura. La seta che più viene utilizzata nell'ambito dell'industria tessile è quella prodotta dal baco da seta addomesticato *Bombyx mori*, questo perché tale materiale rispetto, ad esempio, alla seta prodotta dai ragni presenta numerosi vantaggi come:

- la maggiore resa di fibra che è di circa 600-1.500 m da un singolo bozzolo di *Bombyx* contro i soli 12 m ricavabili da una ragnatela;
- le migliori proprietà meccaniche (resistenza, elasticità e flessibilità);
- l'eccellente biocompatibilità e biodegradabilità delle fibre, approvate dalla FDA (Food and Drug Administration) ed usate per decenni come fili di sutura in ambito chirurgico.



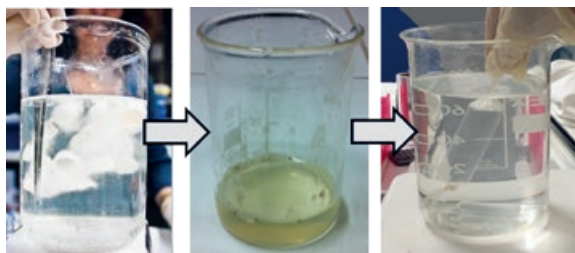
A destra, cesti con bozzoli in una rappresentazione immaginaria delle fasi di lavorazione della seta a Bologna, sec. XVIII (particolare)

La fibra del bozzolo prodotto dal *Bombyx mori* è costituita da due componenti proteiche. La prima è la fibroina (~70%) che costituisce il cuore del filamento; la seconda è la sericina (~30%), una proteina idrosolubile che tiene insieme due fibre di fibroina. Nello specifico, la fibroina è una proteina fibrosa e strutturale ad alto peso molecolare, caratterizzata da una catena pesante (H) (MW ≈ 350 kDa) ricca di amminoacidi idrofobici e da una catena leggera (L) (MW ≈ 26 kDa) più idrofila, tenute insieme da ponti di solfuro. I principali amminoacidi presenti nella fibroina sono la glicina (Gly) (~50 %),

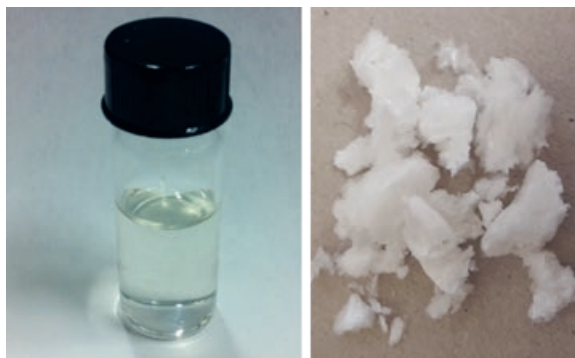


Da sinistra: baco da seta *Bombyx mori*, bozzolo, scansione elettronica al microscopio di fibre di seta, particolare di una fibra con le due proteine che la compongono

Tre fasi del processo di estrazione e purificazione della fibroina della seta



Soluzione acquosa di fibroina e polvere di fibroina liofilizzata



l'alanina (Ala) (~30%), la serina (Ser) (~10 %) e la tirosina (Tyr) (~5 %). Le catene polipeptidiche della fibroina mostrano una capacità di autoassemblaggio unica che consente di ottenere substrati con caratteristiche chimico-fisiche, biologiche e meccaniche eccezionali, rendendo tale proteina un materiale promettente e di prima scelta per applicazioni bio-tecnologiche innovative. Le catene di fibroina, a seconda del tipo e della percentuale di strutture secondarie, possono assumere tre diverse conformazioni:

- SILK I, solubile in acqua, caratterizzata dalla presenza di strutture secondarie amorfe ad alfa-elica e random-coil;
- SILK II, insolubile in acqua, ricca di strutture cristalline compatte beta-turns e foglietti beta;
- SILK III, una conformazione scoperta più recentemente caratterizzata da un'elica estesa a 3 pieghe che si forma all'interfaccia di soluzioni di fibroina (ad esempio interfaccia aria-acqua).

ESTRAZIONE DELLA FIBROINA DELLA SETA

■ Come la maggior parte dei polimeri naturali, la fibroina non è un materiale termoplastico, pertanto la sua manipolazione è possibile solo previa dissoluzione in un opportuno solvente organico.

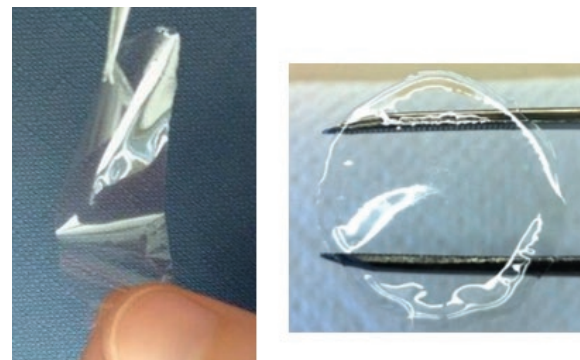
I metodi di estrazione della fibroina possono essere di due tipologie: diretti o indiretti. Il metodo diretto si basa sull'estrazione della fibroina dalla ghiandola posteriore del Bombyx mori durante lo stato larvale che precede la formazione del bozzolo; tale proteina viene pertanto definita "nativa". L'uso della fibroina nativa per la preparazione di biomateriali è limitato però dal fatto che il metodo di estrazione diretto è lungo e laborioso e presenta una bassa resa di estrazione. Inoltre, è stato osservato che tale tipologia di fibroina è caratterizzata da un elevato contenuto di strutture cristalline compatte a foglietto beta che la rendono poco solubile in acqua.

Per tutti i motivi sopraelencati la ricerca si è spostata verso lo studio e l'ottimizzazione di un metodo di estrazione più semplice ed efficiente. Nel 2011, infatti, il gruppo del Professor David Kaplan della Tuft University (Boston) ha sviluppato un processo indiretto di "reverse engineering" per l'estrazione e la purificazione della fibroina dai bozzoli del Bombyx completamente ecosostenibile, basato sull'acqua. Tale proteina viene definita "rigenerata" per distinguerla da quella nativa. Le principali fasi coinvolte in questo processo di estrazione e purificazione sono tre:

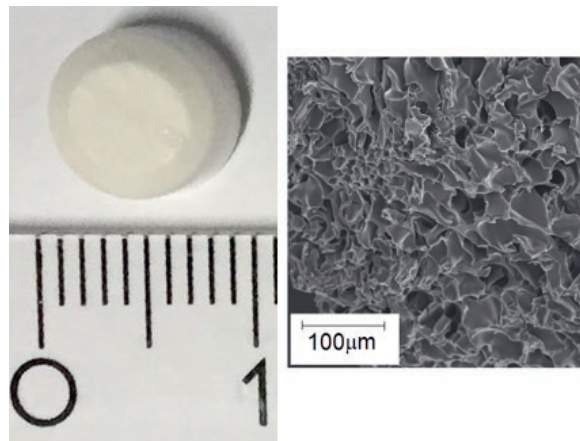
1. la prima fase viene definita "degommazione" (degumming) proprio perché mira ad eliminare quella che è la colla (gum) che tiene unite due fibre di fibroina, ossia la sericina. Tale fase è molto importante qualora si volesse utilizzare la fibroina in ambito biomedicale, in quanto è riportato in letteratura che residui di sericina possono provocare reazioni immunologiche ed infiammatorie. Generalmente la degommazione avviene in una soluzione acquosa di carbonato di sodio (Na_2CO_3) ad ebollizione per 45 minuti;
2. le fibre di fibroina vengono poi abbondantemente lavate in acqua, seccate all'aria a temperatura ambiente ed in seguito solubilizzate in una soluzione concentrata di Litio Bromuro (LiBr) per 4-6 ore in stufa a 60 °C;
3. la soluzione così ottenuta viene poi purificata per dialisi per 48 ore utilizzando membrane di cellulosa da 12-14.000 kDa ed infine centrifugata per ottenere una soluzione acquosa di proteina ad una concentrazione di circa 6% peso/volume. Tale soluzione può essere così conservata in frigo a 4 °C o opportunamente liofilizzata per ottenere una polvere.

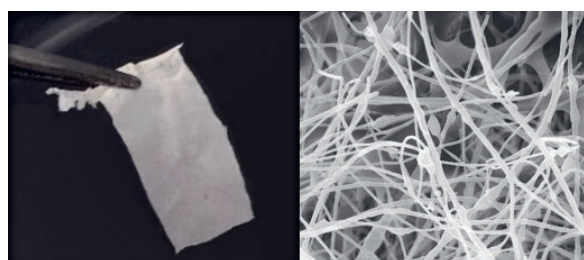
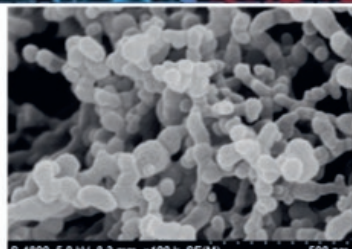
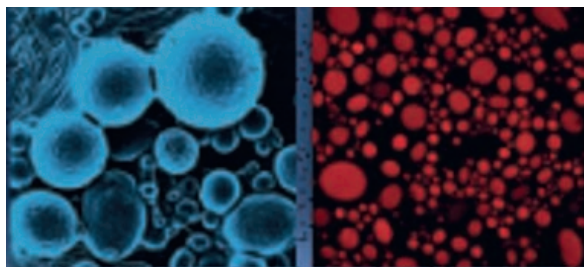
I parametri da tenere in considerazione e da monitorare per verificare che il processo di estrazione

Pellicole flessibili e trasparenti a base di fibroina



Spugne a base di fibroina





stia avvenendo in maniera ottimale, sono due, ossia la perdita in peso della fibra dopo la degommazione, che deve corrispondere alla quantità di sericina che è normalmente presente nel bozzolo (20-30%), e la concentrazione finale di proteina in acqua, che, come specificato precedentemente, deve aggirarsi intorno al 6% peso/volume.

MATERIALI A BASE DI FIBROINA

■ L'utilizzo della fibroina in ambito tecnologico richiede non solo un adeguato controllo del processo di estrazione del biopolimero, ma anche della sua manipolazione e delle sue proprietà chimico-fisiche. L'estremo interesse nei confronti di questa proteina naturale deriva infatti dal fatto che, utilizzando un'ampia varietà di tecniche di fabbricazione, la soluzione acquosa di fibroina estratta può essere facilmente processata in diversi formati/materiali come nanoparticelle, microsfele, capsule, spugne, nanofibre, schiume, idrogeli, scaffold 3D porosi e pellicole.

Tutti questi biomateriali mostrano interessanti e peculiari particolarità, come le eccellenti proprietà meccaniche, la facilità di funzionalizzazione, la biodegradabilità e la biocompatibilità/non tossicità testata su diverse linee cellulari tra cui le cellule del Sistema Nervoso Centrale (SNC), quali astrociti e neuroni, ma anche cellule della pelle o delle ossa (cheratinociti ed osteoblasti).

Per facilità di funzionalizzazione si intende sia la possibilità di integrare nella matrice proteica materiali di natura diversa, come argille e ossidi metallici, sia la possibilità di impartire proprietà aggiuntive ed innovative grazie alla sequenza di amminoacidi che presentano un'ampia varietà di gruppi chimici, come ammine,

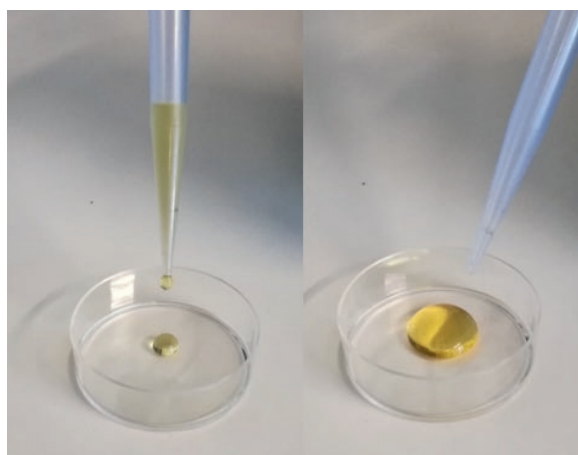
alcoli, fenoli, gruppi carbossilici e tioli che possono essere modificati chimicamente.

Le proprietà di questi biomateriali (idrofilicità/idrofobicità, biocompatibilità, biodegradabilità, flessibilità/rigidità, trasparenza, ecc.) possono essere modulate variando la conformazione della proteina, ossia il rapporto tra le sue strutture secondarie. Questo è possibile utilizzando diversi metodi di fabbricazione e/o parametri di processo (temperatura, uso di solventi organici, ecc.).

Tra i vari formati che si possono ottenere a partire da una soluzione acquosa di fibroina risultano particolarmente interessanti le pellicole e le micro/nanofibre. Le prime sono caratterizzate da un'elevata trasparenza nella regione visibile dello spettro elettromagnetico, da resistenza e flessibilità meccanica. Pellicole a base di fibroina possono essere realizzate utilizzando diverse tecniche. Le più comuni sono:

- Drop Casting, ossia il metodo della "goccia colata", in cui un volume noto di soluzione acquosa di proteina viene depositato su un substrato inerte come vetro o polidimetilsilossano (PDMS) e lasciato evaporare lentamente all'aria a temperatura ambiente o in stufa;
- Spin Coating, in cui un piccolo volume di soluzione viene posto su un substrato che viene ruotato ad alte velocità al fine di depositare il materiale sfruttando la forza centrifuga. Tale tecnica viene utilizzata per prove da laboratorio (scala di qualche cm²) e consente di ottenere pellicole molto sottili con una superficie molto omogenea;
- Doctor Blade, in cui il materiale viene "spalmato" tramite la formazione di un menisco di soluzione tra una lama in movimento ed un substrato sottostante. Diversamente dallo Spin Coating, il principio di funzionamento è compatibile e/o più facilmente trasferibile a metodi di deposizione su larga scala di rilevanza industriale (ad esempio roll to roll deposition). Tale tecnica consente infatti di lavorare su superfici più grandi come, ad esempio, un foglio A4.

Recentemente è stato osservato che l'aumento della temperatura durante la preparazione delle pellicole (dai 25 °C ai 60 °C) ed il trattamento di quelle già formate con solventi organici come il metanolo portano ad un aumento della stabilità delle pellicole di fibroina in termini di contenuto di strutture secondarie a foglietto beta, resistenza meccanica, dissoluzione in acqua e degradazione enzimatica.



Microcapsule e nanoproteine di fibroina

Micro e nanofibre di fibroina

Tecnica del Drop Casting

SILK IN THE THIRD MILLENNIUM BETWEEN SCIENCE AND INNOVATION

The discovery and processing of silk dates back to ancient China, where the historical memory is mixed with the mythological narrative linked to the empress Leizu. The spread of silk in the West sees the city of Bologna stand out, in the Modern Age, for the production of yarns and fabrics, thanks to an extraordinary machine, the "Bolognese" silk mill, an activity that came into crisis in the eighteenth century and ended with the advent of Napoleon.

Today, David Kaplan's studies on nanotechnology have returned an important role to silk which becomes the basis for innovative biomedical products, electronic, optoelectronic and photonic devices. The CNR-ISOF of Bologna, in collaboration with national and international subjects, is at the centre of important research projects that have given life to the "technological silk road of the third millennium".

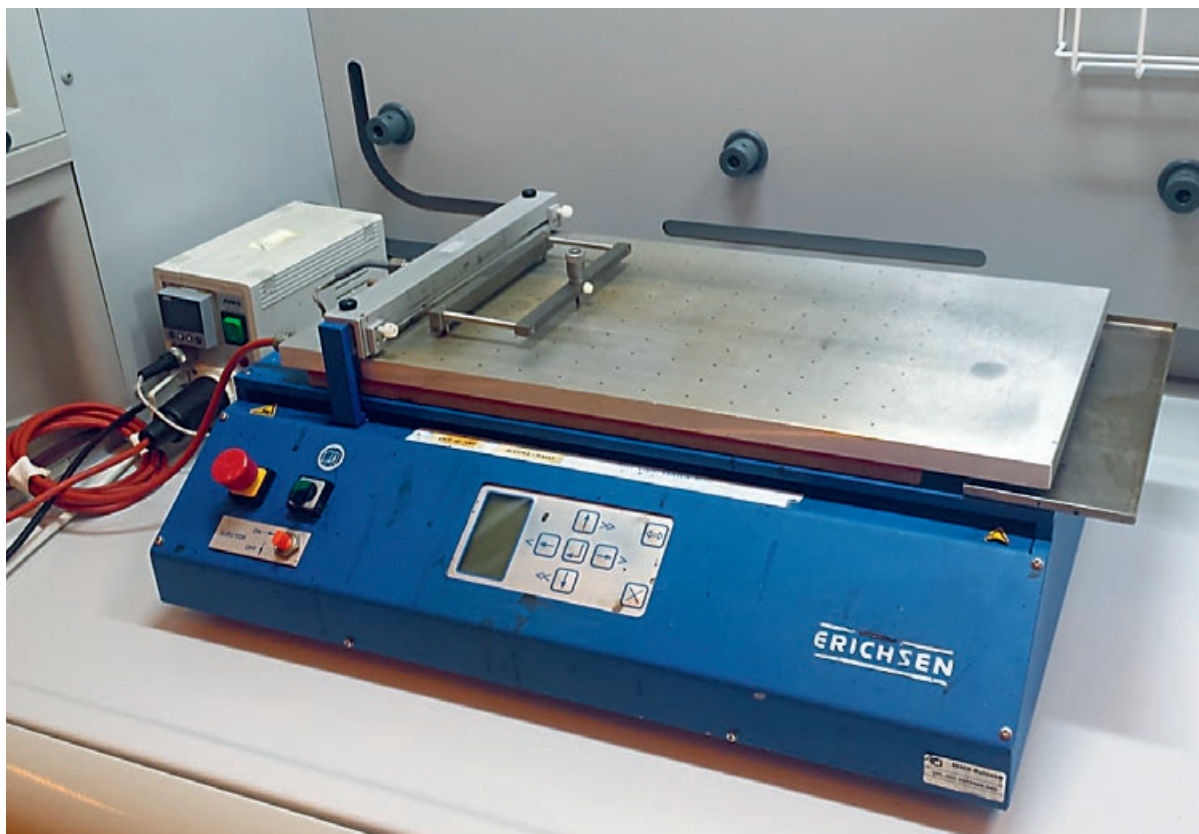


Per quanto riguarda fibre e nanofibre, recentemente presso l'Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività (ISOF-CNR) del CNR di Bologna è stato messo a punto un impianto di elettrofilatura su scala di laboratorio. In breve, l'elettrofilatura è un processo, usato anche a

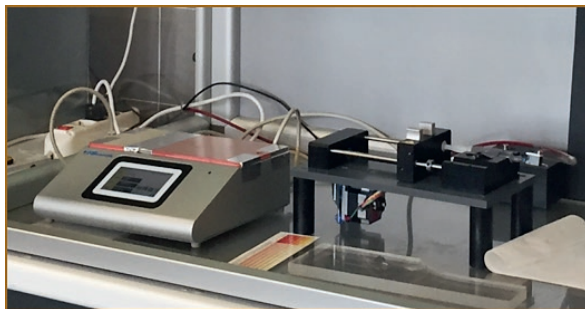
livello industriale, che consente di ottenere, a partire da un fluido polimerico, filamenti continui anche nell'ordine dei nanometri grazie all'azione di un elevato campo elettrico. L'impianto è costituito da una siringa dosatrice cui è collegato un capillare, una pompa volumetrica per regolare il flusso, un generatore di alta tensione ed un collettore metallico (dispositivo di raccolta). Un elettrodo dell'alimentatore è collegato all'ago mentre l'altro è collegato al collettore che generalmente è messo a terra. Nel processo di elettrofilatura l'applicazione di un campo elettrico genera una forza elettrostatica che permette la formazione di un getto polimerico elettricamente carico che parte dalla punta dell'ago e va verso il collettore di carica opposta. Il processo di elettrofilatura può essere influenzato da un elevato numero di variabili legate alle proprietà della soluzione, come viscosità, conducibilità, tensione superficiale, peso molecolare del polimero, volatilità del solvente, ecc., ed anche ad altre variabili, come intensità del campo elettrico, velocità del flusso, distanza tra ago e collettore, temperatura, umidità, ecc.

APPLICAZIONI TECNOLOGICHE DI MATERIALI A BASE DI FIBROINA

■ I numerosi studi che sono stati condotti sulla fibroina e sulle tecniche di manipolazione e di processo riguardanti tale polimero naturale hanno permesso quindi di ottenere materiali con diverse caratteristiche morfologiche e strutturali. I materiali descritti precedentemente hanno trovato interesse in diversi campi di applicazione che comprendono principalmente quattro grandi categorie.



Primo tra tutti è l'ambito biomedicale, dove grazie alla loro elevata biocompatibilità, biodegradabilità e flessibilità meccanica sono stati studiati come potenziali sistemi per il rilascio controllato di farmaci, strutture 3D per la rigenerazione dei tessuti come cornea, nervi, ossa, pelle, vasi sanguigni, cuore, legamenti e cartilagine ed infine come piattaforme biocompatibili per studi molecolari/funzionali in vitro di diverse colture cellulari.



Materiali a base di fibroina sono stati studiati anche come potenziali elementi ottici e biosensori fotonici grazie soprattutto alla possibilità di essere modificati chimicamente, ad esempio, con molecole fotoluminescenti, e di essere modellati in modo da ottenere strutture altamente ordinate su scala micro e nanometrica.



Un altro interessante e potenziale impiego, soprattutto delle pellicole a base di fibroina, riguarda i dispositivi elettronici ed optoelettronici, sia come materiale di supporto biodegradabile, trasparente e flessibile, sia come strato funzionale grazie alle

note proprietà dielettriche/isolanti della fibroina e alla elevata trasparenza nella regione visibile dello spettro elettromagnetico.

Infine, materiali a base di fibroina sono stati studiati anche come potenziali sistemi di depurazione delle acque e pulizia dell'aria.

La fibroina della seta estratta dal bozzolo del baco da seta *Bombyx mori* rappresenta quindi un promettente materiale di origine naturale per lo sviluppo di nuove tecnologie ecosostenibili destinate a diversi campi di applicazione. A tale riguardo ad esempio, l'ISOF-CNR di Bologna ha coordinato dal 2013 al 2015 il progetto bandiera SILK.IT (Silk Italian Technology for industrial biomanufacturing), nell'ambito della Flagship "Fabbrica del futuro", un programma di ricerca approvato dal Comitato interministeriale per la pianificazione economica (CIPE). L'obiettivo generale del progetto è stato quello di stabilire e controllare l'intera catena su cui si fonda la tecnologia a base di fibroina e di promuovere l'upscale dal laboratorio all'industria.

Tutt'oggi una parte dell'attività di ricerca in ISOF è focalizzata sullo studio e l'ottimizzazione di metodi e protocolli atti ad utilizzare questo biopolimero come materia prima rinnovabile e biodegradabile nel campo delle biotecnologie avanzate. Questo perché crediamo fortemente che le nostre ricerche contribuiranno, nel medio/lungo termine, allo sviluppo di sistemi sempre più sostenibili e con ridotto impatto ambientale.

Impianto di elettrofilatura realizzato dall'Istituto per la Sintesi Organica e Fotoreattiva-CNR, Area della Ricerca di Bologna

Applicazioni in ambito biomedicale di materiale a base di fibroina

Bibliografia

Benfenati V., Stahl K., Gomis-Perez C., Toffanin S., Sagnella A., Torp R., Kaplan D.L., Ruani G., Omenetto F.G., Zamboni R., Muccini M., *Biofunctional Silk/Neuron Interfaces*, "Advanced Functional Materials", 22, 2012, pp. 1871-1884

Nenci T. e F., *I Bachi da Seta*, Hoepli, Milano, 1922

Poni C., *La Seta in Italia. Una grande industria prima della rivoluzione industriale*, il Mulino, Bologna, 2009

Posati T., Benfenati V., Sagnella A., Pistone A., Nocchetti M., Donnadio A., Ruani G., Zamboni R., Muccini M., *Innovative Multifunctional Silk Fibroin and Hydrocalcite Nanocomposites: A Synergic Effect of the Components*, "Biomacromolecules", 15, 2014, pp. 158-168

Rockwood D.N., Preda R.C., Yücel T., Wang X., Lovett M.L., Kaplan D.L., *Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin*, "Nat Protocols", 6, 2011, pp. 1612-1631

Sagnella A., Chieco C., Benfenati V., Di Virgilio N., Toffanin S., Cavallini S., Posati T., Pistone A., Varchi G., Ruani G., Muccini M., Rossi F., Zamboni R., *SILK.IT project: Silk Italian Technology for industrial biomanufacturing*, "Composites: Part B", 68, 2015, pp. 281-287

Dispositivi elettronici ed optoelettronici a base di fibroina

