POLITENICO DI TORINO

Facoltà di Ingegneria

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale



REALIZZAZIONE DI MEMBRANE NANOFIBROSE IN CHITOSANO CON CAPACITÀ ANTIOSSIDANTI PER LA MODULAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO

Relatore

Prof. Gianluca Ciardelli

Corelatori

Candidato Gabriele Marino

Dott.ssa Chiara Tonda-Turo

Dott.ssa Michela Licciardello

Anno accademico 2018/2019

INDICE

Abstract1			
1.	Introduzione 2		
1.1 Sistema n	ervoso		
1.1.1	Cellule del sistema nervoso		
1.1.2	Patologie del sistema nervoso		
1.2 Ingegneri	a tissutale7		
1.2.1	Scaffold per l'ingegneria tissutale		
1.2.1.1	Electrospinning9		
1.2.2	Materiali per la realizzazione di scaffold10		
1.2.2.1	Materiali polimerici11		
1.2.2.2	Polimeri naturali		
1.2.2.3	Polimeri sintetici		
1.3 Nanopart	icelle antiossidanti 14		
1.3.1	Sintesi delle nanoparticelle di Ossido di Cerio15		
1.3.2	Attività antiossidante		
1.3.3	Tossicità		
1.3.4	Applicazioni		
1.3.5	Scaffold caricati con nanoceria		
2.	Materiali e metodi 21		
2.1	Materiali		
2.1.1	Chitosano		
2.1.2	Polietilenossido (PEO)		
2.1.3	Fosfato di sodio dibasico (DSP)24		
2.1.4	Dimetilsolfossido (DMSO)		
2.1.4	Nanoparticelle di ossido di cerio		
2.1.5	Cellule SH-SY5Y		

2.2	Metodi	
2.2.1 Prepa	arazione delle soluzioni	
2.2.1.1	Soluzione di solo Chitosano	
2.2.1.2	Soluzioni di chitosano e nanoceria	
2.2.2	Realizzazione di membrane con electrospinning	
2.2.2.1	Parametri di processo	
2.3	Caratterizzazione delle membrane	
2.3.1	Microscopia a scansione elettronica	
2.3.2	Analisi delle immagini	
2.3.2	Prove meccaniche	
2.3.3	Prove di degradazione	
2.3.4	Prove antiossidanti	
2.3.5	Prove cellulari	39
3.	Risultati e discussione	
3.1	Caratterizzazioni morfologiche delle membrane elettrofilate	41
3.1.1	Nanofibre di controllo	41
3.1.2	Nanofibre composite	43
3.1.3	Confronto tra fibre di controllo e fibre composite	45
3.2	Caratterizzazione meccanica	47
3.3	Prove di degradazione	49
3.4	Prove antiossidanti	52
3.5	Prove cellulari	53
4.	Conclusioni e sviluppi futuri	55
BIBLIOGI	RAFIA	58

Abstract

Tissue engineering (TE) is an interdisciplinary field that involves obtaining engineering substitute to replace or improve native tissues. Scaffold is the fundamental element in TE applications. The main aim of a scaffold is to mimic the extra-cellular matrix (ECM) structure and properties. Scaffolds are typically made of polymeric biomaterials that provide the structural support for cell attachment and tissue development. There are a lot of studies that use composite scaffolds loaded with nanoparticles in order to confer them specific properties. In particular, cerium oxide nanoparticles had displayed a powerful antioxidant activity because of mimic the behavior of important enzymatic agents that regulate the intracellular redox state. The aim of this work is to produce nanofibrous composite membranes of chitosan in which cerium oxide nanoparticles were incorporated. Four type of membranes were fabricated: chitosan membranes (CS), chitosan fibers loaded 1 mg/ml nanoceria (CSNC1), and chitosan fibers loaded 3 mg/ml nanoceria (CSNC3). The nanofibrous 3D-structure was obtained by electrospinning. The morphology of mats was evaluated by electron scanning microscopy (SEM) that shows a random configuration of fibers and the absence of defects. The mechanical characterization was also investigated. The presence of NC results in an increasing of mechanical properties in term of stiffness, ultimate tensile strength (UTS) and percentage elongation at break of the material. After degradation tests, control fibers appear to lose more weight compared to composite ones (60% against 46% of CSNC1 and 50% of CSNC3). Antioxidant colorimetric test shows that the increasing amount of cerium oxide nanoparticles loaded into the fibrous membranes leads into an increase in the composite membranes antioxidant capacity. Viability tests show that there are not significant differences between control fibers and composite fibers after 24 h, 48 h and 5 d of culture time: there is a reduced cellular metabolism in the composite fibers compared to the control ones, indicating a smaller number of cells present on them.

1. Introduzione

1.1 Sistema nervoso

Il sistema nervoso è definito come un'unità morfo-funzionale e strutturale composta da un tessuto biologico specializzato in ricevere, controllare, trasmettere ed elaborare stimoli interni ed esterni del corpo. Questo è possibile per mezzo di segnali bioelettrici e permette ad un organismo vivente di relazionarsi con l'ambiente. [1]

Il sistema nervoso negli esseri umani è suddiviso a livello anatomico in due parti:

- Sistema nervoso centrale (SNC),
- Sistema nervoso periferico (SNP).



Figura 6. Sistema nervoso centrale e sistema nervoso periferico

Il sistema nervoso centrale è contenuto nella scatola cranica e nel canale vertebrale per quanto riguarda rispettivamente l'encefalo e il midollo spinale. Il sistema nervoso periferico, invece, è composto da strutture nervose periferiche come le fibre nervose che compongono i nervi stessi, i gangli, i recettori sensoriali (tra i quali si hanno i termocettori, i propriocettori, i recettori del gusto, ecc.), organi sensoriali quali occhio, apparato vestibolare e apparato cocleare.

Il sistema nervoso centrale è costituito dall'encefalo (che a sua volta comprende cervello, cervelletto e midollo allungato) e dal midollo spinale. Questi sono rivestiti da tre membrane sovrapposte: le meningi.

I due sistemi hanno ruoli differenti. Il SNP raccoglie informazioni dall'ambiente esterno con cui l'organismo interagisce e le traduce in segnali nervosi che vengono poi inviati al SNC che le integra e risponde in maniera adeguata. Quest'ultimo si occupa a sua volta di inviare comandi motori tramite il SNP alla periferia facendo in modo che la risposta sia effettivamente adeguata.

Un'altra componente importante del sistema nervoso è quello autonomo che si occupa di gestire in maniera involontaria le risposte degli organi interni e il loro stato. Si divide in sistema simpatico e sistema parasimpatico (figura 7).



Figura 7. Sistema nervoso autonomo

1.1.1 Cellule del sistema nervoso

Il tessuto nervoso è composto da due tipologie di cellule differenti:

- Neuroni;
- Cellule gliali.

Le cellule del tessuto nervoso sono associate tra loro dal punto di vista non solo morfologico ma anche funzionale. I neuroni, infatti, si associano tra loro in modo tale da formare delle fibre nervose tra loro comunicanti. Il tessuto nervoso è un vero e proprio sincizio funzionale: i neuroni sono in grado di scambiarsi informazioni tramite le caratteristiche di eccitabilità e conducibilità. La prima è la capacità della cellula di reagire agli stimoli esterni che vengono poi convertiti in impulso nervoso. La seconda indica che l'impulso nervoso può essere trasmesso da una cellula all'altra, sotto forma di corrente elettrica che si trasmette in corrispondenza delle sinapsi (figura 8).

SINAPSI



Figura 8. Sinapsi

I **neuroni** (figura 9) sono caratterizzati dalla capacità di eccitarsi se vengono stimolati da un impulso di tipo elettrico. Morfologicamente sono composti da un corpo cellulare che prende il nome di *soma* dal quale si diramano due tipologie di prolungamenti: i dendriti e gli assoni [1].

I dendriti sono dei prolungamenti più corti e ramificati che si trovano in grande quantità sul corpo cellulare. La loro funzione è quella di prendere in consegna gli stimoli che arrivano dall'esterno o da altre cellule del tessuto nervoso. Questi messaggi vengono trasmessi verso il corpo cellulare.

L'assone è un filamento di dimensioni maggiori rispetto ai dendriti e ne è presente uno per ogni neurone. Il suo compito è quello di riportare l'informazione verso l'esterno ad altri dendriti o direttamente alle giunzioni neuromuscolari dei muscoli stessi. La direzione in cui l'impulso elettrico viaggia lungo l'assone è una sola: quella distale rispetto alla soma.

Non tutti i neuroni però rispettano la stessa morfologia: esistono per esempio i neuroni unipolari che non presentano dendriti. Inoltre, il citoplasma dei dendriti è uguale a quello del corpo cellulare mentre quello degli assoni è molto differente in quanto non presenta né ribosomi né vescicole di Golgi [1].



Figura 9. Neurone

Le **cellule gliali** sono cellule di forma variegata e funzione variabile. Non sono direttamente coinvolte nei processi di trasmissione delle informazioni ma hanno un ruolo indiretto fondamentale per la riuscita di questa trasmissione: costituiscono un sostegno ai neuroni, sia dal punto di vista strettamente strutturale che fornendo loro nutrimento e protezione dalle lesioni. Altro aspetto fondamentale è che fungono da isolante elettrico degli assoni, senza il quale non si potrebbe avere una propagazione del segnale elettrico.

1.1.2 Patologie del sistema nervoso

Le patologie di questo tipo sono molto variegate e possono presentarsi in qualsiasi età; alcune come l'epilessia sono più tipiche dell'età infantile e altre come la demenza di quella adulta.

Per frequenza e pericolosità, la patologia più importante da trattare è l'*ictus*: colpisce circa 15 milioni di persone ogni anno e causa circa 6 milioni di morti nello stesso periodo di tempo. Tra le più frequenti bisogna citare anche il *Morbo di Parkinson* e la *demenza*. Quest'ultima comprende anche il morbo di Alzheimer che ne racchiude il 65% dei casi totali.

Altre patologie conosciute sono l'*epilessia* e la *sclerosi multipla*. Quest'ultima è una malattia di tipo autoimmune che colpisce maggiormente le donne in età compresa tra i 20 e i 40 anni. Alcune delle patologie sopracitate sono dovute alla perdita di funzionalità dei neuroni. Nel caso della sclerosi multipla è dovuta a lesioni della struttura protettiva delle cellule nervose (mielina).

Recenti studi hanno trovato una correlazione tra le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e la nascita di patologie come l'ipertensione o patologie legate al sistema nervoso simpatico (SNS). La causa è stata identificata nel fatto che l'ossido di azoto (NO) agisce da inibitore dell'attività del sistema nervoso simpatico centrale. Un'aumentata produzione di ROS può causare una riduzione nell'attivazione di NO e risultare in una conseguente attivazione non voluta del SNS [2].

1.2 Ingegneria tissutale

Risale al 1993 la definizione data da Vacanti e Langer: "L'ingegneria dei tessuti è un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita allo scopo di sviluppare sostituti biologici che possono sostituire, mantenere o migliorare la funzione di tessuti o organi interi" [3].

Tutte le procedure adottate per il ripristino di tessuto mancante o danneggiato necessitano di strutture che fungano da rimpiazzo per l'area infortunata. I dispositivi utilizzati in questo caso sono tradizionalmente interamente artificiali (articolazioni), tessuti non viventi processati (valvole cardiache), o tessuti prelevati da un'altra zona del corpo del paziente stesso. Ora l'ingegneria tissutale rappresenta un'alternativa clinica: permette la sostituzione di tessuto vivente con altro tessuto vivente progettato e realizzato per venire incontro alle esigenze del singolo paziente. Si tratta di un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita, per sviluppare sostituti biologici che ricreino, mantengano o migliorino la funzione del tessuto [4].



Figura 1. Principi base dell'ingegneria tissutale

È stato possibile raggiungere traguardi significativi nel ripristino della morfologia e della funzionalità di tessuti danneggiati solo dopo aver migliorato le conoscenze legate ad altri ambiti come la biologia molecolare e la scienza dei biomateriali. Di conseguenza, è stato

possibile raggiungere traguardi importanti nell'ingegneria tissutale solo a seguito di sviluppi nella biologia cellulare che hanno reso possibile la produzione in larga scala di enzimi e sistemi come bioreattori (disponibili commercialmente), tramite i quali è possibile isolare e coltivare un ampio numero di cellule. I tessuti biologici sono costituiti da cellule viventi, matrice extracellulare e molecole, responsabili della proliferazione e differenziazione cellulare. Questo fenomeno ben descrive la triade che compone l'ingegneria tissutale: cellule viventi, scaffold e meccanismi di segnalazione che derivano da fattori di crescita e ormoni. È stato dimostrato che l'uso di cellule viventi stimoli la formazione di un tessuto finale migliore a livello funzionale rispetto a quello che si ottiene con l'uso di agenti chemiotattici, fattori di crescita o ormoni [5].

1.2.1 Scaffold per l'ingegneria tissutale

Per scaffold si intende un supporto tridimensionale poroso, realizzato con un materiale biocompatibile e bioriassorbibile, in grado di favorire l'adesione e la proliferazione cellulare fino alla formazione del nuovo tessuto.

Con l'avanzamento della ricerca nell'ambito dei biomateriali, emergono continuamente nuovi materiali e metodi innovativi per processarli. Lo scopo della terapia cellulare risiede nella capacità di riparare tessuti e organi danneggiati in vivo e allo stesso tempo di realizzare in vitro tessuti adatti ad un successivo trapianto. Lo sviluppo nel campo dell'ingegneria tissutale è limitato dalla necessità di gestire parallelamente un processo di angiogenesi in tessuti e organi per il trasporto di nutrienti, materiali di scarto ed ossigeno. Le strategie utili ad indurre la formazione di nuovi vasi sanguigni sono essenziali in tutti gli aspetti dell'ingegneria tissutale. In letteratura sono presenti molti lavori che investigano le migliorie che possono essere apportate al design e ai materiali utilizzati per favorire direttamente il processo di angiogenesi locale in vivo e promuovere la graduale penetrazione di questi vasi negli scaffold. Anche nel caso di scaffold ex vivo pre-vascolarizzati, un aggraffaggio corretto del *graft* al tessuto ospite dipende largamente dal successo nella formazione dei vasi e dalla corretta integrazione nel tessuto. Uno dei principali aspetti legati a questo approccio è la necessità di trasportare i fattori angiogenici direttamente tramite gli scaffold impiantati [6].

Le proprietà che uno scaffold, sintetico o naturale, deve avere comprendono vari aspetti tra cui garantire il trasporto ottimale di nutrienti, prodotti di scarto e molecole bioattive, un corretto grado di degradazione del materiale che compone lo scaffold, una chimica superficiale riconoscibile positivamente dalle cellule, caratteristiche meccaniche adeguate ed uniformi e l'abilità di promuovere percorsi di trasduzione del segnale.

La matrice extracellulare (ECM) è la parte del tessuto che non è composta da cellule, è l'ambiente nella quale esse si trovano. La ECM possiede una struttura molto complessa sia a livello macroscopico che microscopico. Una delle sfide dell'ingegneria tissutale è quella di mimare questa struttura 3D. Uno dei metodi maggiormente utilizzati per adempiere a questo scopo è quello dell'electrospinning, utilizzato per la realizzazione di membrane nanofibrose.

1.2.1.1 Electrospinning

L'electrospinning è un metodo semplice e versatile per la generazione di fibre ultrasottili a partire da una ricca varietà di materiali che comprendono polimeri, materiali compositi e ceramici [7].

Con questa tecnica è possibile produrre fibre polimeriche con diametri dell'ordine dei nanometri, differentemente dalle tecniche di filatura più convenzionali che si fermano a diametri micrometrici. Questo aspetto è importante perché permette di mimare la matrice extracellulare nativa e al contempo che le cellule possano aderire meglio [8].

Alla base della tecnica vi è l'applicazione di un campo elettrico ad elevata differenza di potenziale tra l'ugello di una siringa che contiene la soluzione polimerica che si vuole estrudere e un collettore su cui vengono raccolte le fibre. In questo modo la differenza di potenziale tra l'ugello e il collettore metallico fa sì che le fibre che attraversano questo campo elettrico siano raccolte sul collettore, compiendo così un percorso dal polo positivo a quello negativo.

La soluzione polimerica viene mantenuta dalla propria tensione superficiale alla fine dell'ugello ed è al contempo soggetta ad un campo elettrico. Quest'ultimo induce una carica sulla superficie del liquido. La repulsione delle cariche opposte causa una forza che si oppone alla tensione superficiale e, all'aumentare dell'intensità del campo elettrico, la superficie emisferica della soluzione sulla punta dell'ugello si allunga fino a formare una sorta di cono che prende il nome di ''cono di Taylor''. Quando il campo elettrico raggiunge un valore critico al quale le forze elettriche repulsive superano la tensione superficiale, un flusso di soluzione elettricamente carico viene espulso dalla punta del cono di Taylor. Finché questo flusso è carico, la sua traiettoria può essere controllata tramite il campo elettrico. Nel percorso tra ugello e collettore il solvente evapora, lasciando infine delle fibre polimeriche che si dispongono casualmente sul collettore metallico [9].

Le componenti principali necessarie all'attuazione di questo processo sono le seguenti:

- Siringa, nella quale è contenuta la soluzione polimerica;
- Pompa, il sistema che permette che ci sia un flusso di questa soluzione;
- Generatore di tensione, necessario per garantire la differenza di potenziale tra ugello e collettore;
- Collettore metallico, dove le fibre vengono raccolte.



Figura 2. Schema di funzionamento dell'electrospinning

1.2.2 Materiali per la realizzazione di scaffold

I materiali utilizzati per questo scopo ricadono nel macrogruppo dei biomateriali. Il termine 'Biomateriali' ha diverse definizioni; un significato tradizionalmente attribuitogli è che un biomateriale è una sostanza non-vivente utilizzata in dispositivi medici, come per esempio protesi articolari. La tecnologia dei biomateriali si è sviluppata gradualmente e la definizione estesa include nella precedente anche sostanze progettate per il controllo di un ecosistema biologico collegato a cellule e tessuti. Oltre che essere semplicemente compatibili con il tessuto ospite e compiere un ruolo di tipo strutturale, i biomateriali possono indirizzare le cellule verso un particolare comportamento. Strutture

3D realizzate a partire da biomateriali sono state il principale strumento utilizzato sia *in vitro* che *in vivo*. Queste strutture 3D potrebbero quindi rappresentare un substrato ideale per l'adesione e la proliferazione cellulare e la formazione di nuovo tessuto. Gli scaffold utilizzati per l'ingegneria tissutale compiono varie funzioni e il loro ruolo durante la formazione di tessuto è dipendente dalle caratteristiche dei biomateriali selezionati per l'impiego: è stato dimostrato che scaffold 3D inducono una differenziazione per cellule osteogeniche [10], ematopoietiche [11], neurali [6,7] e condrogeniche [14]. Inoltre, agendo da veicoli per il trasporto di biomolecole durante lo sviluppo del tessuto, i biomateriali promuovono l'adesione, la proliferazione, l'organizzazione e la differenziazione cellulare [3].

1.2.2.1 Materiali polimerici

Molti componenti chiave di dispositivi medici impiantabili sono composti da materiali polimerici. Le funzioni di questi materiali comprendono il supporto strutturale, la protezione di altri materiali dall'ambiente fisiologico e la biocompatibilità, così come altri compiti quali il trasporto di farmaci. La stabilità e integrità del polimero sono aspetti fondamentali affinché lo scaffold svolga il suo compito. Per molte applicazioni, la stabilità nel tempo è auspicabile, andando sempre alla ricerca di una degradazione e successiva scomparsa del polimero nei tempi previsti dalla specifica applicazione. È quindi di fondamentale importanza comprendere sia la chimica che porta alla degradazione che la cinetica che controlla queste reazioni. Idrolisi e ossidazione sono le due classi di reazioni che conducono alla degradazione dei polimeri [15].

Per prima cosa bisogna distinguere tra degradazione in massa (o in bulk) e degradazione in superficie. La degradazione in bulk è un meccanismo secondo il quale la forma del polimero rimane la stessa durante il processo mentre il peso molecolare del materiale diminuisce progressivamente, fino al punto in cui si ha un collasso della struttura improvviso dovuto al peso molecolare troppo basso. Il secondo meccanismo comprende una degradazione progressiva dall'esterno all'interno, risultando così in una variazione della forma e delle proprietà meccaniche del materiale nel tempo. I polimeri idrofili sono caratterizzati da una degradazione in massa mentre per i polimeri idrofibi si ha un processo di degradazione in superficie. Queste differenze esistono per via del fatto che i polimeri idrofili assorbono acqua al loro interno favorendo una degradazione dell'acqua che rimane circoscritta alle zone più superficiali del materiale.



Figura 3. Differenze tra meccanismo di degradazione superficiale e in massa

La prima reazione di degradazione che si prende in considerazione è quella idrolitica, in quanto è la più comune. Essa dipende dalla struttura della catena principale del polimero: perché questa sia possibile la catena deve contenere dei legami che possono essere rotti per idrolisi. In vivo, questa reazione viene catalizzata da ioni (es. PO₄³⁻) contenuti nella matrice extra-cellulare. Una seconda tipologia di reazione è quella ossidativa che può avvenire in diverse situazioni. Le sostanze ossidanti che innescano la reazione possono essere prodotte direttamente dall'organismo in risposta all'impianto di un biomateriale nell'organismo. Possono esserne responsabili anche ioni metallici rilasciati a seguito della corrosione di una parte metallica dell'impianto. Questa seconda tipologia degrada lo scaffold a partire dalla superficie. Anche il metodo successivo (degradazione enzimatica) riguarda la superficie del materiale e questa volta è legata alla presenza di catalizzatori nell'ambiente fisiologico che degradano i componenti della ECM, idrolasi per quanto riguarda materiali polimerici. Se si vuole sfruttare l'azione catalizzatrice di questi enzimi è necessario progettare lo scaffold in modo che esso possa essere riconosciuto dal catalizzatore.

1.2.2.2 Polimeri naturali

I biomateriali di origine naturale utilizzati per la produzione di scaffold includono componenti della matrice extracellulare (ECM) come collagene, fibrinogeno, acido ialuronico, glicosaminoglicani (GAGs), idrossiapatite (HA). Hanno la caratteristica di essere bioattivi, biocompatibili e possedere proprietà meccaniche comuni al tessuto nativo. In aggiunta ad essi vengono utilizzati altri materiali di origine naturale derivati da piante, insetti o animali (es. cellulosa, chitosano, fibroina della seta, etc.) che sono in grado di garantire un ambiente favorevole alla coltura di cellule, staminali comprese [16]. Gli inconvenienti dell'utilizzo di polimeri naturali piuttosto che sintetici sono l'impossibilità di controllare le loro proprietà fisico-chimiche, l'incapacità di moderare la velocità di degradazione, la maggiore difficoltà nell'applicazione di tecniche di sterilizzazione e purificazione e i problemi legati a virus e agenti patogeni quando vengono estratti da fonti differenti. I materiali naturali utilizzati nella produzione di scaffold 3D per l'ingegneria tissutale sono numerosi: tra i più utilizzati ci sono il chitosano, il Matrigel, l'acido ialuronico e la fibrina che sono diventati disponibili commercialmente, ben caratterizzati e dotati di proprietà riproducibili e controllate [17]. Il chitosano è un materiale ideale per la realizzazione di scaffold per applicazioni nei seguenti ambiti: pelle, ossa, cartilagine, fegato, tessuto nervoso, vasi sanguigni e cuore. Il chitosano è stato approvato dalla 'Food and Drug Administration' statunitense ed è largamente usato in molti ambiti dell'ingegneria tissutale e nel trasporto di farmaci. Dal chitosano si possono ottenere strutture porose, strutture nanofibrose e idrogel iniettabili. Questi ultimi sono in grado di rispondere ad una varietà di stimoli esterni come il pH, la luce e la temperatura. Un altro esempio è quello del chitosano termosensibile in combinazione col glicerofosfato (GP): un idrogelo iniettabile ricco di applicazioni a causa dei fattori bioattivi che possono esservi facilmente incorporati in soluzione (quali fattori di crescita, geni etc.). Successivamente, una volta esposto alla temperatura fisiologica (37°C), la soluzione polimerica è in grado di polimerizzare rapidamente in situ, circoscrivendo questi fattori nell'area d'interesse. Quest'abilità di polimerizzazione in situ rende il chitosano-GP una tipologia di scaffold dalla grande valenza clinica [6].

1.2.2.3 Polimeri sintetici

I materiali sintetici garantiscono la possibilità di creare strutture 3D con caratteristiche personalizzabili quali proprietà meccaniche, velocità di degradazione e porosità. In ogni caso, a fronte di questi benefici, essi hanno: una bioattività limitata (per esempio il polietilen glicol, PEG); sottoprodotti acidi (per esempio PGA, PLA O PLGA) ecc. Inoltre, un aspetto complicato dell'utilizzo di materiali di questo tipo è la criticità nel modificarli con composti biologici o chimici che possano portare ad una risposta cellulare positiva. Le proprietà fisiche di questi polimeri possono essere facilmente controllate cambiando il rapporto tra i componenti, il peso molecolare e la cristallinità. L'uso di scaffold compositi è un ulteriore approccio per mimare al meglio la nicchia fisiologica e ampliare le possibilità dell'ingegneria tissutale. Idrogeli naturali o sintetici ricalcano fedelmente la consistenza dei tessuti nativi, rendendosi appetibili per applicazioni nell'ingegneria tissutale '*soft*'. Tuttavia, ai materiali compositi con un'elevata rigidezza meccanica qualche volta è richiesto di mimare fedelmente le proprietà meccaniche del tessuto e di ottimizzare il proprio grado di degradazione. Per esempio, materiali di questo tipo possono essere modificati per migliorarne l'elasticità, rendendoli adatti ad applicazioni legate al tessuto connettivo. È possibile migliorare ulteriormente questa caratteristica con l'aggiunta di idrossiapatite [6].

1.3 Nanoparticelle antiossidanti

Numerosi studi hanno dimostrato che varie tipologie di nanoparticelle agiscono come agenti antiossidanti. Numerosi agenti patogeni sono tali a causa della loro capacità di produrre radicali liberi e danneggiare così le cellule del sistema immunitario. Le nanoparticelle con capacità antiossidanti sono in grado di contrastare questa azione patogena e, nel caso di microrganismi, la loro capacità di formare biofilm, legati anch'essi alla produzione di ROS. Per riuscire a minare la produzione di queste specie reattive e il relativo stress ossidativo bisogna focalizzare l'attenzione su tre aspetti: l'ospite, l'agente patogeno e la loro interazione. È richiesta una migliore comprensione della produzione dei radicali liberi e dei meccanismi antiossidanti di entrambi per essere in grado di controllare i disagi dovuti all'infiammazione tramite l'utilizzo di antiossidanti. Questi ultimi possono portare beneficio al paziente riducendo il danno tissutale dovuto allo stress ossidativo. Riducendo il danno da esso provocato si riduce anche la gravità dei sintomi e la possibilità che delle complicanze si vengano a verificare. L'uso di nanotecnologie nella scienza dei materiali e nell'ingegneria ha portato ad un significativo avanzamento nella capacità di raggiungere questi traguardi in applicazioni industriali. Recentemente, molte nanoparticelle antiossidanti hanno dimostrato un ottimo potenziale nella nanomedicina, in particolare, nanoparticelle di ossido di Cerio (CeO₂) [18].

I materiali maggiormente utilizzati per la realizzazione di nanoparticelle con effetto antiossidante sono:

• Argento;

- Oro;
- Ossido di Zinco;
- Diossido di Manganese;
- Ossido di Cerio.

Tra le altre sopracitate, le più utilizzate sono le nanoparticelle d'argento, anche in virtù della loro caratteristica battericida [19]. Dell'ultima tipologia si tratterà più approfonditamente in seguito.

1.3.1 Sintesi delle nanoparticelle di Ossido di Cerio

Le proprietà caratteristiche di queste nanoparticelle sono legate anche al metodo di sintesi utilizzato, tra le numerose tecniche e metodi si hanno quello idrotermico, la precipitazione acquosa, micelle inverse e decomposizione termica. La biocompatibilità della nanoceria è un fattore decisivo quando utilizzata in ambito biologico.

Un metodo di sintesi analizzato sfrutta la forma della proteina apoferritina. Questa viene usata come *biotemplate* per la sintesi di nanoparticelle di ossido di cerio. La reazione di formazione avviene nella cavità caratteristica della proteina. Le particelle così ottenute hanno dimensioni dell'ordine dei pochi nanometri [20].

Un'altra possibilità è quella di ottenere le nanoparticelle tramite decomposizione ad alta temperatura. I precursori del cerio vengono combinati con acidi organici e surfattanti aminici a temperature comprese tra i 260 e i 320°C. Si ottengono così nanoparticelle di ossido di cerio con diametri che variano dai 3 ai 10 nm [21].

1.3.2 Attività antiossidante

L'ossido di Cerio possiede una struttura che ricalca quella a facce centrate della fluorite cubica (CaF₂), come mostrato in figura 4(a) dove il catione Ce⁴⁺ è circondato da otto ioni equivalenti O²⁻ che formano l'angolo del cubo con ciascuno di questi anioni che coordina quattro cationi. La nanoceria mantiene questa struttura cubica anche in assenza dell'ossigeno (figura 4(b)). Quando il catione Ce³⁺ si ossida, l'ossigeno nello spazio tetraedrico sparisce e i due elettroni rimanenti vengono forniti dai due cationi Ce⁴⁺ che diventano Ce³⁺ (figura 5) [22].

La sua capacità di assorbire e rilasciare ossigeno tramite il ciclo redox Ce^{4+}/Ce^{3+} fa sì che la nanoceria sia in grado di mimare l'attività antiossidante di diversi enzimi, quali la catalasi e la superossido dismutasi. Questa capacità antiossidante è strettamente collegata alle sue proprietà fisiche e chimiche come le dimensioni della particella stessa, la distribuzione di carica superficiale e lo stato di valenza.



Figura 4. Cristalli di ceria con struttura intatta (a) e distorta (b)

Lo stato di valenza e la struttura dell'ossido di Cerio sono dinamici e possono cambiare spontaneamente o in risposta a parametri fisici come la temperatura, la presenza di altri ioni o la pressione parziale dell'ossigeno. Vari studi hanno mostrato che con una diminuzione delle dimensioni, nanoparticelle di questo tipo, presentano un maggior numero di vacanze d'ossigeno. Un aumento del rapporto area-volume nelle nanoparticelle permette di migliorare queste caratteristiche.



Figura 5. Formazione delle vacanze di ossigeno

Le nanoparticelle di ossido di cerio hanno un'elevata energia superficiale a causa dell'elevato rapporto superficie-volume. Questa proprietà permette loro di essere maggiormente reattive rispetto alla loro controparte che non si trova sotto forma di nanoparticelle. È stato già dimostrato che le dimensioni sono correlate negativamente al rapporto Ce^{3+}/Ce^{4+} . Quando questo ha un valore elevato è possibile ottenere un comportamento che mima l'attività catalitica della superossido dismutasi. Questa attività, garantita dalle vacanze esibite dalle nanoparticelle di ossido di cerio ingegnerizzate, è simile al meccanismo di protezione delle cellule contro i ROS; si ha infatti un aumento della vitalità cellulare a seguito di un trattamento con nanoceria. Questo nonostante non sia ancora del tutto chiaro quale sia il "sito attivo" responsabile di questo comportamento. Al momento si è solo in grado di associarlo ai meccanismi conosciuti della SOD. La reazione di quest'ultima è catalizzata dalla presenza di nanoparticelle di CeO₂ come segue:

$$O_2^{\bullet-} + Ce^{4+} \rightarrow O_2 + Ce^{3+}$$

 $O_2^{\bullet-} + Ce^{3+} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + Ce^{4+}$

1.3.3 Tossicità

L'internalizzazione e la localizzazione nell'ambiente fisiologico della nanoceria giocano un ruolo chiave nel profilo citotossico di queste nanoparticelle, esibiscono una tossicità significativa quando si localizzano nei lisosomi delle cellule cancerose. Di contro, hanno una tossicità minima quando si trovano nel citoplasma cellulare o quando rimangono all'esterno della cellula stessa [23].

Il primo aspetto da valutare è quello legato al fatto che si ha a che fare con nanoparticelle. La loro tossicità è ben conosciuta solo per un piccolo range di nanomateriali perché si tratta di un ambito relativamente nuovo. I materiali in forma di nanoparticelle tendono ad essere assorbiti in quantità maggiore rispetto alla loro controparte in "bulk" e in svariate modalità quali ingestione, inalazione, assorbimento o adsorbimento in superfici ecc.

In generale, vanno fatte due principali considerazioni riguardo la tossicità delle nanoparticelle che è legata principalmente alle dimensioni e alla funzionalizzazione superficiale. L'importanza delle dimensioni è legata all'elevato rapporto superficievolume che è dovuto al fatto che si ha un'elevata percentuale di atomi localizzati sulla superficie. Per nanoparticelle in argento, diossido di silicone e diossido di titanio è risaputo che particelle più piccole portano ad una maggiore tossicità rispetto a conformazioni differenti. Questa tendenza è più evidente quando entrano in contatto con i batteri perché le nanoparticelle hanno un'elevata affinità con le pareti cellulari dei batteri stessi.

Entrando nel dettaglio della nanoceria, recenti studi hanno dimostrato un comportamento bivalente: sono in grado di agire sia come antiossidante che di indurre la produzione di ROS. Le nanoparticelle di CeO₂ agiscono mimando la superossido dismutasi, principale catalizzatore in grado di ridurre la produzione di radicali liberi e i danni da essi causati. È stato dimostrato come siano inoltre in grado di inibire l'invecchiamento cellulare e di aumentare l'aspettativa di vita di cellule del sistema nervoso [24].

1.3.4 Applicazioni

La nanoceria viene utilizzata nella prevenzione di disagi alla retina che possono portare alla cecità [25]. Altre ricerche mostrano però un comportamento opposto da parte delle nanoparticelle di ossido di cerio: possono indurre e catalizzare la generazione di ROS in numerosi sistemi biologici. È stato dimostrato che la nanoceria sia in grado di portare ad un decremento nell'aspettativa di vita in nematodi, causare danni al fegato nei topi ed

esibire una moderata tossicità in molte cellule del tessuto muscolare umano, comprese quelle polmonari [26].

In altri studi la nanoceria è stata utilizzata per trattare cellule umane sane e tumorali durante radioterapia, esibendo delle capacità protettive delle cellule sane del tessuto mammario contro le radiazioni. Questa protezione non è stata riscontrata nel caso di cellule tumorali del tipo MCF-7. Da questo risultato si è compreso come la nanoceria abbia la capacità di "ripulire" il tessuto dai radicali liberi. Questo crea un precedente nell'utilizzo di questo materiale in applicazioni biologiche e ne ispira l'utilizzo in numerosi ambiti della ricerca [27].

Anche nell'ambito della realizzazione di biosensori si può incappare in studi che sfruttano le proprietà delle nanoparticelle d'ossido di cerio. La sua utilità non è dovuta solo alla sua capacità di rappresentare uno strumento di misura della presenza di biomolecole immediato e real-time ma anche perché presenta dei vantaggi notevoli rispetto all'utilizzo di biosensori organici. Tra questi aspetti si hanno la fluorescenza, la minore tossicità, il costo e il *rate* di degradazione [28].

Nell'ambito dell'impianto in vivo di un biomateriale si deve far fronte al "surgical stress response", un meccanismo fisiologico che causa, durante e dopo un intervento chirurgico, l'attivazione dello stato infiammatorio e di una conseguente risposta immunologica. Fa parte di questo meccanismo anche la produzione di stress ossidativo con conseguente presenza di specie reattive all'ossigeno o al nitrogeno che possono sovraccaricare il sistema immunitario dell'organismo. È stato dimostrato che la somministrazione di antiossidanti in contesti di questo tipo si traduce in una migliorata funzionalità degli organi, in una diminuzione dei tempi di convalescenza, della morbidità e della mortalità dovute all'intervento chirurgico [22].

Biovetri con struttura 3D trattati con nanoceria sono in grado di aumentare la produzione di collagene da parte di cellule staminali mesenchimali (HMSCs) in confronto a scaffold dello stesso tipo privi di nanoceria [29].

Per migliorare ulteriormente i risultati legati all'utilizzo di questa tipologia di nanomateriale bisogna lavorare principalmente su tre aspetti. Prima di tutto si deve lavorare sul migliorare i metodi di sviluppo e sintesi della nanoceria per rendere il processo perfettamente controllabile. Il secondo aspetto da migliorare è quello dell'interazione del nanomateriale con le cellule e il doppio strato lipidico: aspetto critico in applicazioni come la fototerapia, l'imaging e il trasporto di geni o farmaci. In ultimo,

riguardo l'effetto antiossidante, il rapporto Ce^{3+}/Ce^{4+} gioca un ruolo decisivo nelle terapie antiossidanti. Recenti studi hanno infatti scoperto che drogando la nanoceria con piccole quantità di Gadolinio si può non solo regolare questo rapporto, ma anche controllarne le proprietà ottiche, rendendo così possibile studiare i meccanismi molecolari di trasduzione del segnale intracellulare in cellule viventi [28].

Per valutare complessivamente l'effetto antiossidante in ambiente biologico della nanoceria c'è ancora bisogno di effettuare ulteriori studi in tessuti viventi ed animali a causa della nota complicatezza dei processi metabolici in vivo [22].

1.3.5 Scaffold caricati con nanoceria

Le nanoparticelle di ossido di cerio sono in grado di aumentare la vitalità di fotorecettori e cellule nervose, questo è uno dei motivi che ha portato al loro utilizzo nell'ambito dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa. Particelle di questo tipo, incorporate negli scaffold, sono state utilizzate per la rigenerazione di tessuti sia molli che duri, o applicate direttamente su delle ferite per promuoverne la guarigione.

Durante la crescita delle cellule si ha la formazione di radicali liberi che inducono la differenziazione cellulare. Il ruolo delle nanoparticelle di ossido di cerio in questo processo è quello di promuovere la crescita del tessuto tramite la propria azione antiossidante [30].

È stato dimostrato che la presenza di nanoparticelle di ossido di cerio può influenzare la differenziazione di cellule mesenchimali ematopoietiche grazie alle sue proprietà fisicochimiche e all'ambiente di coltura. In un ulteriore studio, le particelle sono state incorporate in scaffold per la coltura e la differenziazione di cellule cardiache [31].

Esistono una serie di studi in cui nanoparticelle di questo tipo sono state caricate in scaffold elettrofilati per differenti scopi: scaffold a base di gelatina caricati con nanoceria ed elettrofilati hanno rivelato delle spiccate capacità antiossidanti quando messi a contatto con cellule SH-SY5Y [32]. In un altro studio sono state realizzate delle fibre caricate con nanoceria tramite la tecnica dell'electrospinning e si è andato ad indagare la loro capacità antibatterica al fine di poter utilizzare queste fibre in differenti applicazioni biomedicali. Le fibre così ottenute hanno dimostrato una buona capacità antibatterica [33].

2. Materiali e metodi

Nel seguente capitolo verranno descritti nel dettaglio i materiali utilizzati nelle varie fasi della realizzazione delle membrane e i metodi necessari per ottenerle e in seguito caratterizzarle.

2.1 Materiali

2.1.1 Chitosano

Il chitosano è un polisaccaride naturale, lineare composto da D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina. Questi sono legati tra loro da legami β (1-4). Viene ottenuto trattando la chitina, generalmente ottenuta dall'esoscheletro dei crostacei (gamberi, granchi ecc.). La chitina è il secondo biopolimero per abbondanza in natura dopo la cellulosa. Il chitosano possiede un gran numero di legami inter e intramolecolari che sono in grado di conferire una struttura molto regolare.

Questo materiale è insolubile nella maggior parte dei solventi, ma a pH leggermente acidi (inferiori a 6) i gruppi amminici deacetilati vengono protonati e questo fa sì che la catena non sia più neutra e che si abbia un incremento della tendenza del materiale a solvatarsi. Il chitosano è un materiale altamente biocompatibile, biodegradabile e che possiede un'elevata capacità di assorbimento. È inoltre antigenico, il che significa che l'organismo lo percepisce come 'self'. Può essere utilizzato in ambito biomedico sotto forma di gel o come supporto, specialmente nell'ambito dell'ingegneria tissutale.

Una volta ottenuta la chitina dall'esoscheletro dei crostacei, essa viene trattata con NaOH al 50% ad una temperatura prossima ai 110°C per una durata di 3 ore. Questo consente di rimuovere dalla struttura della chitina il gruppo acetilico ed ottenere così chitosano. Questo processo di deacetilazione alcalina viene riassunto nella figura 6.



Figura 6. Ottenimento del chitosano a partire dalla chitina

Poiché si tratta di un polimero naturale, biodegradabile e non tossico, ha una notevole importanza in un gran numero di applicazioni in campo biomedico: realizzazione di membrane per emodialisi [34], fili per suture biodegradabili [35], processi di rilascio dell'insulina [36], agente curativo in caso di ustioni [37], sostituzione artificiale della pelle [38] e tante altre applicazioni.

Questo materiale ha un comportamento legato al pH della soluzione in cui si trova. Questo è utile in alcune applicazioni dell'ingegneria tissutale perché permette al chitosano di formare dei legami con biomolecole quali DNA o proteine di vario tipo. Si è già parlato di come sia in grado di solvatarsi per pH inferiori a 6, specie in soluzioni acide organiche quali acido formico, acido lattico e acido acetico (utilizzato nel corso di questo lavoro). Questa solvatazione è possibile grazie alla protonazione dei gruppi NH₂ presenti nella D-glucosammina: le forze repulsive che si vengono a creare favoriscono lo swelling perché l'acqua entra all'interno del materiale. Le caratteristiche principali del polimero sono il peso molecolare (misurato in Dalton e che varia da 10 kDa a 1.000 kDa) e il grado di deacetilazione (abbreviato con l'acronimo DD, Deacetylation Degree). Il secondo si calcola come il rapporto tra la D-glucosammina e la somma tra la stessa Dglucosammina e N-acetil-D-glucosammina. Questo parametro è importante perché il chitosano ottenuto, per essere considerato tale, deve avere un DD superiore al 60%.

Il	chitosano	utilizzato	in	questo	lavoro	è	commercializzato	dall'HMC ⁺	(prodotto	n.
24	704) ed ha	le seguen	ti c	aratteris	stiche:					

CS 95/100		
HMC ⁺		
Peso molecolare	100 – 250 kDa	
Grado di deacetilazione	≥ 92.6%	
Viscosità		
(soluzione 1% in 1% di acido acetico a 20°C)	71 – 150 mPas	

Tabella 1. Caratteristiche del chitosano utilizzato

2.1.2 Polietilenossido (PEO)

Il polietilenossido È un polimero di tipo sintetico biocompatibile, caratteristica che lo rende molto utilizzato per applicazioni di tipo biomedico. La sua struttura chimica è mostrata in figura 7. Il PEO non è altro che PEG con un peso molecolare superiore ai 20 kDa.

In diversi lavori è stato dimostrato che il PEO sia in grado di migliorare la "spinnabilità" delle soluzioni polimeriche a base di chitosano [39].

All'aumentare della quantità di PEO si ha una riduzione della viscosità della soluzione che diventa più facilmente processabile secondo il metodo dell'electrospinning [40]. Il PEO, inoltre, garantisce un maggior controllo nelle dimensioni delle fibre che si vengono ad ottenere e permette la formazione di fibre con diametri più elevati.



Figura 7. Struttura chimica del polietilenossido

La produzione industriale di questo polimero avviene a partire dall'anello di ossido di etilene che viene aperto e tramite un iniziatore viene innescata la polimerizzazione. Un esempio di iniziatore utilizzato può essere il glicole a basso peso molecolare.

Il PEO utilizzato in questo lavoro nel *blend* col chitosano è prodotto commercialmente dalla Sigma-Aldrich (prodotto n. 189456) ed ha le seguenti caratteristiche:

РЕО		
Sigma-Aldrich		
Peso molecolare medio	900 kDa	
Viscosità	8800 – 17600 cps	

Tabella 2. Caratteristiche del PEO utilizzato

Il polimero utilizzato era in forma di polvere.

2.1.3 Fosfato di sodio dibasico (DSP)

Il fosfato di sodio dibasico è un agente necessario per ottenere la reticolazione del chitosano. Questo si rende necessario in quanto, in soluzione acquosa, il chitosano non presenta una stabilità fisica e meccanica sufficiente.

Il fosfato di sodio dibasico (DSP) è un composto inorganico con formula chimica Na₂HPO₄. Si presenta sottoforma di polvere bianca ed è in grado di garantire il crosslinking delle catene di chitosano (figura 9).



Figura 8. Fosfato di sodio dibasico

Il DSP in soluzione acquosa si carica negativamente e questo gli permette di interagire elettrostaticamente con i gruppi protonati che si trovano sulla superficie delle catene del chitosano che a pH=6.5 presenta natura policationica Per evitare di peggiorare la morfologia delle fibre che si vogliono ottenere, viene aggiunto unicamente il DSP goccia a goccia alla soluzione da elettrofilare evitando così altri metodi che prevedono una reticolazione in più step. In questo modo si favorisce la spinnabilità della soluzione senza rischiare di ottenere fibre troppo spesse.



Figura 9. Ruolo del DSP nella reticolazione del chitosano

A seguito della reticolazione si ha un aumento della rigidezza delle fibre, oltre ad un aumento del pH della soluzione di chitosano, mantenendolo comunque al di sotto del valore di 6.5 dove permane la sua natura policationica [41].

Il fosfato di sodio dibasico utilizzato è commercializzato dalla Sigma-Aldrich ed ha un grado di purezza superiore al 99%. La polvere viene solvatata in acido acetico 0.5 M secondo il protocollo che verrà approfondito nel paragrafo riguardante i metodi.

2.1.4 Dimetilsolfossido (DMSO)

Il dimetilsolfossido è un composto organico che a temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore e inodore. È largamente impiegato come solvente (in questo lavoro è stato infatti utilizzato come co-solvente), sia in chimica organica, sia per applicazioni industriali in quanto è facilmente sintetizzabile ed economico.

Viene ottenuto per reazione del dimetilsolfuro e un eccesso di ossigeno alla temperatura di $15 - 50^{\circ}$ C in presenza di NO₂.



Figura 10. Dimetilsolfossido

Il DMSO è stato utilizzato allo scopo di aumentare la resa del processo di electrospinning, andando a ridurre l'*entanglement* delle catene polimeriche e a migliorare di conseguenza la "spinnabilità" della soluzione.

2.1.4 Nanoparticelle di ossido di cerio

Le nanoparticelle utilizzate sono commercializzate dalla Alfa Aesar (Thermo Fisher Scientific) e si presentano in una soluzione acquosa al 20% w/w.

Le caratteristiche principali sono riassunte nella tabella sottostante (tabella3).

Nanoceria			
Alfa Aesar			
Peso molecolare medio	172.12 Da		
Dimensioni particelle	< 5 nm		
Forma	liquida		

Tabella 3. Caratteristiche del PEO utilizzato

Le modalità di utilizzo delle nanoparticelle sono descritte nel dettaglio successivamente.

2.1.5 Cellule SH-SY5Y

Si tratta di cellule di derivazione umana utilizzate nell'ambito della ricerca scientifica. SH-SY5Y (figura 11) è una linea cellulare ottenuta da un'altra che prende il nome di SK-N-SH che è stata isolata da una biopsia del midollo osseo di un individuo di sesso femminile di quattro anni affetto da neuroblastoma. Vengono spesso utilizzate nella realizzazione di modelli in vitro che analizzino le funzionalità neuronali e la differenziazione di questo fenotipo cellulare.



Figura 11. Cellule SH-SY5Y

Le cellule di questo tipo vengono sempre coltivate a 37°C in una condizione di 95% aria e 5% diossido di carbonio. Viene inoltre consigliato di coltivare le cellule in fiaschette

ricoperte di materiale in grado di favorire l'adesione. In questo modo si indirizza la cellula verso la differenziazione e la formazione di dendriti. Questa tipologia di cellule è in generale molto resistente e tende a proliferare nella maggior parte dei mezzi di coltura solitamente utilizzati.

2.2 Metodi

2.2.1 Preparazione delle soluzioni

Di seguito verranno spiegati nel dettaglio i metodi di realizzazione delle soluzioni utilizzate, a partire da quelle di solo chitosano e concludendo con quelle in cui è stata dispersa una certa quantità di nanoceria.

2.2.1.1 Soluzione di solo Chitosano

Per la realizzazione delle soluzioni è stato seguito il protocollo proposto da Tonda-Turo e colleghi [42]. Sono state preparate separatamente due soluzioni:

- Chitosano 5% w/v in acido acetico 0.5M;
- Polietilenossido 3% w/v anch'esso in acido acetico 0.5M.

Entrambe vengono successivamente poste in agitazione ad una velocità di 50 rpm per circa 24h. Al termine di questo intervallo temporale si effettua il *blend* delle due soluzioni in rapporto 50:50 v/v e la soluzione così ottenuta viene posta nuovamente in agitazione per 2h, alla stessa velocità utilizzata in precedenza.

Il passo successivo è quello di aggiungere goccia a goccia in soluzione il DSP 1M al 7.5% v/v (il volume di DSP è rapportato al volume di chitosano). La soluzione, che ora contiene anche il reticolante viene mantenuta in agitazione per 1h prima di poter aggiungere in soluzione il DMSO 5% v/v (questa volta il volume di co-solvente è rapportato al volume totale della soluzione), 30 minuti prima di processare la soluzione tramite electrospinning.

L'intero protocollo è riassunto graficamente in figura 12.



Figura 12. Realizzazione di soluzioni di CS

2.2.1.2 Soluzioni di chitosano e nanoceria

Il protocollo precedentemente mostrato è stato modificato in alcuni suoi passaggi per ottenere delle soluzioni contenenti una concentrazione predeterminata di ossido di cerio.

Sono state indagate soluzioni a due differenti concentrazioni di nanoceria: rispettivamente 1 mg/ml e 3 mg/ml. Come descritto in precedenza, il nanomateriale si trova in soluzione acquosa, ad una concentrazione di 200 mg/ml. La differenza sostanziale col protocollo di solo chitosano è che la dispersione di nanoparticelle viene posta in soluzione (in quantità necessaria ad ottenere la concentrazione voluta in ciascuno dei due casi) con acido acetico 0.5 M nella fase iniziale del protocollo. A questa soluzione di nanoceria in acido acetico viene poi aggiunto il chitosano e le procedure successive sono le stesse viste nel caso precedente. L'intero protocollo è riassunto nella figura successiva.



Figura 13. Realizzazione di soluzioni di CS e nanoceria

2.2.2 Realizzazione di membrane con electrospinning

Il metodo utilizzato per la realizzazione delle membrane nanofibrose è quello dell'electrospinning. Questo sistema consiste in una serie di componenti che garantiscono il funzionamento dell'intero apparecchio e il controllo dei parametri di processo.

Il macchinario utilizzato è a disposizione all'interno dei laboratori del DIMEAS (Dipartimento di Ingegneria Meccanica e Aerospaziale) del Politecnico di Torino. È formato dai seguenti componenti:

- Generatore di tensione (Linari Engineering s.r.l.), in grado di garantire una differenza di potenziale variabile dai 0 kV ai 60 kV.
- Pompa volumetrica (Linari Engineering s.r.l.), necessaria per garantire l'estrusione della soluzione polimerica dalla siringa. La velocità di pompaggio è impostabile ed è espressa in termini di ml/h.

La pompa volumetrica è poi contenuta in una cappa all'interno della quale è possibile impostare la temperatura e la ventilazione (non utilizzata in questo lavoro di tesi). I parametri utilizzati sono descritti nel prossimo paragrafo.

Altri due componenti fondamentali sono:

- Siringa in plastica da 5 ml: viene posta a contatto col pistone della pompa volumetrica ed è dotata di un ago da 21 G con punta tagliata in modo tale da avere una sezione circolare. Sull'ago viene poi posto il morsetto positivo del generatore di tensione.
- Collettore piano su un supporto di plastica ricoperto con foglio di alluminio: su di esso vengono posizionati i due morsetti negativi del generatore di tensione. In questo modo si crea una differenza di potenziale tra l'ago della siringa e il collettore e il polimero viene trascinato dal polo positivo al polo negativo, depositandosi sottoforma di nanofibre.

Nella figura sottostante sono rappresentati tutti i componenti descritti.



Figura 14. (a) generatore di tensione. (b) pompa volumetrica. (c) controllo della temperatura. (d) siringa in plastica. (e) controllo della ventilazione. (f) collettore metallico.

2.2.2.1 Parametri di processo

I parametri di processo utilizzati derivano dall'ottimizzazione effettuata da Tonda-Turo e colleghi [42]. Di seguito sono riportati i valori relativi ad ogni parametro:

- Tensione: 30 kV
- Flusso: 1.8 ml/h
- Distanza ugello-collettore: 12 cm
- Temperatura: 40°C

2.3 Caratterizzazione delle membrane

Nei paragrafi successivi sono descritte nel dettaglio tutte le prove effettuate e i relativi macchinari utilizzati.

2.3.1 Microscopia a scansione elettronica

Per ottenere delle immagini che ci permettano di analizzare la morfologia delle fibre ottenute tramite la tecnica dell'electrospinning, si utilizza il microscopio elettronico a scansione (SEM). Tramite questo macchinario si è in grado di ottenere immagini con risoluzione fino ai 5 nm.

I componenti principali di questo sistema sono:

- Cannone elettronico: è il sistema di generazione del fascio elettronico, nello specifico genera il fascio primario di elettroni.
- Sistema di creazione del vuoto: necessario per l'accelerazione degli elettroni.
- Sistema di manipolazione del fascio: è importante per poter controllare tutti gli aspetti relativi alla focalizzazione e al diametro del fascio di elettroni sul campione. Per far questo il sistema si avvale dell'utilizzo di lenti elettromagnetiche, aperture e spirali.
- Camera di alloggio del campione: qui si ripone il supporto contenente il campione su cui dovrà posarsi il fascio di elettroni.
- Rivelatore: serve a raccogliere il segnale.
- Sistema di visualizzazione dell'immagine: è formato da un tubo catodico e rende possibile osservare l'immagine ''catturata'' dal rivelatore.



Figura 15. LEO 435VP SEM

Alla base del funzionamento c'è la produzione del fascio primario di elettroni che vengono generati a partire da una differenza di potenziale che viene applicata sul catodo, rappresentato da un filamento di tungsteno. Il fascio di elettroni così prodotto viene accelerato e convogliato all'interno di un anodo forato.

Il passo successivo è quello di riuscire a convogliare il fascio, riducendone il diametro. Per far questo si genera un campo magnetico tramite delle lenti di tipo elettromagnetico che ha lo scopo di deflettere gli elettroni che compongono il fascio. Quest'ultimo incontra nel suo percorso anche una serie di aperture utili anch'esse a diminuire il diametro del fascio che in questo modo decrementa fino ad un intervallo compreso tra 1 nm e 1 μ m quando arriva a contatto con la superficie del campione. L'operatore può inoltre utilizzare delle lenti che sono legate al sistema di scansione per focalizzare manualmente il fascio e gestire la scansione a livello del singolo punto del campione.

Dall'interazione col campione si generano elettroni secondari che sono quelli che forniscono le informazioni legate alla morfologia del campione in analisi. Un parametro importante è lo spessore di penetrazione del fascio sul campione che dipende dalla specie in esame. Questi elettroni vengono attratti dal rilevatore e convertiti in fotoni che vengono a loro volta raccolti da un fotomoltiplicatore. A questo punto si ha la conversione in un segnale di tipo elettrico che viene amplificato. Il tubo catodico lo rielabora e sul monitor diventa possibile visualizzare l'immagine del campione analizzato. L'analisi è effettuata sottovuoto spinto.

È inoltre possibile regolare i parametri che concorrono alla visualizzazione dell'immagine finale: luminosità, contrasto, ingrandimento e risoluzione.



Figura 16. Schema di funzionamento del SEM

Per poter effettuare l'analisi tramite SEM sulle fibre realizzate tramite tecnica dell'electrospinning, sono stati preparati dei campioni di area pari ad 1 cm² posti tramite del nastro conduttivo biadesivo su un supporto portacampioni metallico. Il passaggio successivo è stato quello di sottoporre a metallizzazione l'intera superficie del campione.

Per far ciò si è effettuato uno sputtering di ioni d'oro per 50 s tramite il macchinario Agar Auto Sputter Coater (riportato in figura 17) nel quale si è impostata una corrente di 30 mA, allo scopo di rendere conducibile il campione. Al termine di questa procedura si è effettuata la scansione tramite il macchinario LEO 435VP SEM (riportato in figura 15).



Figura 17. Agar Auto Sputter Coater

I parametri utilizzati nel processo di scansione al SEM sono i seguenti:

- Tensione: 20 kV;
- Distanza ultima lente-campione: 15 mm;
- Ingrandimenti: 1000x, 2000x, 5000x.

2.3.2 Analisi delle immagini

Le immagini ottenute tramite il SEM sono state utilizzate per poter fare una caratterizzazione del diametro delle fibre realizzate. Per far questo ci si è avvalsi di ImageJ (National Institutes of Healt, USA), un software che ha permesso di esaminare i diametri di ognuna delle tre tipologie di campione.

Dalle immagini ottenute al SEM sono stati acquisiti 50 campioni da immagini al più alto grado di ingrandimento (5000x) tramite il comando *Measure* messo a disposizione dal software. I dati così ottenuti sono stati poi riportati su un foglio Excel per determinare il diametro medio e la deviazione standard dei campioni selezionati.

2.3.2 Prove meccaniche

Sulle fibre ottenute sono state effettuate anche delle prove a trazione per valutare le caratteristiche meccaniche del materiale ottenuto. Per fare questo si è utilizzato il dispositivo MTS QTest/10 (figura 18) presente nei laboratori del DIMEAS presso il Politecnico di Torino, supportato dal software TestWorks 4 che permette di gestire la prova e allo stesso tempo visualizzare i risultati in *real time*.

Sono stati prelevati ed utilizzati per queste prove dei campioni rettangolari. Prima di sottoporli a trazione sono state misurate le dimensioni (spessore, altezza e larghezza) dei singoli campioni tramite un calibro digitale. Queste verranno poi utilizzate per poter normalizzare i valori ottenuti e quindi ricavare il grafico sforzo-deformazione per ogni tipologia di membrana ottenuta. Sono stati utilizzati 7 campioni per ogni tipologia di materiale.

Il macchinario utilizzato è dotato di due traverse: una superiore mobile e una inferiore fissa. Il campione viene posto tra le due traverse e tenuto fermo tramite due afferraggi ad esse legati. L'afferraggio superiore è a sua volta collegato ad una cella di carico; quella utilizzata in queste prove è una dal valore di 10N. Una volta che viene avviata la prova la traversa superiore sale, sottoponendo a trazione il campione che viene deformato e a sua volta esercita una forza opposta a quella che la traversa esercita su di esso. La cella di carico misura questi valori tramite un estensimetro che vi è contenuto. Una volta raggiunta la rottura del materiale, il test si interrompe automaticamente ed è possibile ottenere i dati relativi alla prova effettuata.

Tali dati sono stati inseriti in un foglio Excel e normalizzati per ottenere il grafico sforzodeformazione del materiale realizzato. Per ogni campione è stato poi calcolato il modulo di Young (E) relativo ed è stato definito un valore medio ed una deviazione standard per ogni tipologia di materiale.



Figura 18. MTS QTest/10 per le prove meccaniche

2.3.3 Prove di degradazione

Il passo successivo è stato quello di effettuare delle prove atte a valutare la degradazione idrolitica dei materiali realizzati. Questi test sono stati effettuati per tre diversi *step* temporali: 24h, 48h e 5g. Per prima cosa sono stati prelevati dei campioni uniformi dal peso di almeno 3 mg e sono stati posti in delle eppendorf. Per ogni tipologia di materiale sono stati analizzati 3 campioni per ogni intervallo temporale.

Questi sono stati immersi in 1 ml di PBS (tampone fosfato salino) ed incubati a 37°C per le durate temporali previste. Al termine di esse, i campioni risciacquati per 3 volte con acqua bidistillata. Prima di procedere alla liofilizzazione, sono stati riposti a -20°C per circa 24h.

Il liofilizzatore utilizzato (figura 19-a) impone una temperatura di -53°C e tramite una pompa da vuoto porta la pressione a valori fino a 0.01 mbar, ottenendo così la sublimazione del ghiaccio in vapore. Per ottenere questo cambio di stato si sfrutta la curva di pressione-temperatura mostrata in figura 19-b.



Figura 19. (a) liofilizzatore Scanvac Coolsafe 55-4; (b) curva pressionetemperatura dell'acqua.

Terminata la liofilizzazione, è stata fatta una caratterizzazione dei diametri delle fibre utilizzando le immagini fornite dal microscopio a scansione elettronica e il software ImageJ come descritto nei precedenti paragrafi.

L'ultimo passaggio è stato quello di valutare la perdita di peso percentuale dei campioni secondo la seguente formula:

$$\Delta W\% = \frac{W_0 - W_d}{W_0} * 100$$

In cui W_0 è la massa iniziale del campione, W_d è la massa del campione al termine del processo di degradazione e liofilizzazione. Si è valutata la media e la deviazione standard per ogni tipologia di materiale ed intervallo temporale analizzato.

2.3.4 Prove antiossidanti

Per verificare la capacità antiossidante delle fibre realizzate si è utilizzato il kit colorimetrico Total Antioxidant Capacity Assay (MAK187) commercializzato dalla Sigma-Aldrich. La ratio dietro questa metodologia è quella di andare a confrontare la capacità delle fibre analizzate di ridurre ioni rame Cu²⁺ in ioni Cu⁺ con quella del Trolox che viene utilizzato come standard. Il Trolox è un analogo della vitamina E con caratteristiche di idrosolubilità. Viene utilizzata una sonda colorimetrica che interagisce con gli ioni ridotti e genera un picco di assorbanza a 560 nm. Si va quindi a compiere un'analisi dell'assorbanza dei campioni, tramite il microplate reader Victor3 della Perkin Elmer (figura 20), disponibile nei laboratori del Politecnico di Torino siti ad Alessandria (TO).



Figura 20. Microplate reader Victor3

Inizialmente i reagenti del kit forniti dal produttore sono stati centrifugati a 1000 rpm per 5 minuti. Questi sono stati utilizzati per ottenere la *working solution* diluendo il Cu²⁺ reagent con l'Assay diluent secondo un rapporto 1:49.

Il protocollo utilizzato è quello descritto nel fascicolo tecnico del kit stesso e permette di ottenere delle soluzioni di Trolox a concentrazioni note che verranno poi utilizzate per la realizzazione della curva di calibrazione. Si è utilizzata una multiwell da 96 pozzetti per contenere gli eluati utili al tracciamento della suddetta curva. I campioni da analizzare di dimensioni 1 x 0,5 cm in tripla copia sono stati riposti in delle eppendorf. All'interno dei pozzetti sono stati poi inseriti 100 μ l di acqua e 100 μ l di protein mask. dopodiché si è posta la multiwell in agitazione per 90 minuti, in assenza di luce e a temperatura ambiente.

Al termine dei 90 minuti è stato analizzato tramite il microplate reader il sovranatante prelevato. È stata impostata un'assorbanza a 560 nm ed è stata avviata la prova.

Il microplate reader è uno strumento che è in grado, tramite analisi spettrofotometrica, di individuare elementi biologici o chimici all'interno di un campione posto in esame. Per far questo si avvale di una sorgente luminosa (lampada a xeno) e di filtri che rendono i raggi del fascio paralleli tra loro. Quest'ultimo viene indirizzato verso i pozzetti della multiwell andando ad eccitare gli elettroni degli orbitali più esterni. Si ha così un'energia finale inferiore a quella di partenza che viene catturata da un rilevatore ed elaborata da un apposito sistema che fornisce in uscita il valore di assorbanza relativo ad ogni campione analizzato.

Infine, i valori così ottenuti sono stati esportati in un foglio Excel dove, per ogni tipologia di materiale, sono state calcolate assorbanza media e deviazione standard sottraendo il bianco dai valori ottenuti. I valori di assorbanza relativi alle fibre sono stati rapportati alla curva di calibrazione precedentemente costruita ed è stato così possibile esprimere la capacità antiossidante in termini di nM equivalenti di Trolox.

2.3.5 Prove cellulari

Per i test cellulari sono state utilizzate le cellule SH-SY5Y descritte nei paragrafi precedenti. Le prove sono state svolte in duplicato sulle tre tipologie di materiale realizzato.

I campioni sono stati disposti su un vetrino circolare di diametro pari a 12 mm sul quale era stato posto del nastro biadesivo e sono stati disposti in multiwell da 24 pozzetti. Le cellule sono state seminate su di essi per 24h. Le analisi sulla vitalità cellulare sono state effettuate a tre diversi *timestep*: 24h, 48h e 5g.

Per poter determinare il numero di cellule vitali si è stata utilizzata una tecnica fluorimetrica tramite resazurina che permette di individuare le reazioni di ossidoriduzione che avvengono nei mitocondri cellulari. Attraverso il micro plate reader si è misurata l'emissione a 590 nm a seguito di un'eccitazione compresa tra i 530 e i 560 nm. Più il segnale è intenso, maggiore sarà la vitalità cellulare riscontrata.

3. Risultati e discussione

3.1 Caratterizzazioni morfologiche delle membrane elettrofilate

Seguendo i protocolli descritti in precedenza, sono state realizzate delle nanofibre di tre tipologie differenti:

- Chitosano (CS);
- Chitosano caricato con nanoceria ad una concentrazione di 1 mg/ml (CSNC1);
- Chitosano caricato con nanoceria ad una concentrazione di 3 mg/ml (CSNC3).

Nei paragrafi successivi sono mostrati i risultati relativi alla caratterizzazione morfologica per ognuna di queste categorie.

3.1.1 Nanofibre di controllo

Da questo momento in avanti le fibre di solo chitosano verranno indicate con la sigla **CS**. In figura 21 sono riportate le immagini ottenute al microscopio a scansione elettronica (SEM) ai tre livelli di ingrandimento indagati: 1000x, 2000x e 5000x.



Figura 21. (a) Fibre CS – 1000x; (b) Fibre CS – 2000x; (c) Fibre CS – 5000x.

Dalle immagini si può vedere come le fibre ottenute siano continue e disposte in maniera casuale. Queste verranno confrontate in seguito con le fibre composite.

Il passo successivo è stato quello di elaborare i dati ottenuti tramite ImageJ su Excel. I valori ottenuti sono i seguenti:

• Diametro 263.84 ± 56.667 nm.

La distribuzione dei diametri dei 50 campioni delle fibre analizzati è riassunta nell'istogramma riportato in figura 22.



Figura 22. Distribuzione dei diametri delle fibre CS

3.1.2 Nanofibre composite

Le altre due tipologie di fibre realizzate sono a base di chitosano, caricate con nanoceria a due differenti concentrazioni: 1 mg/ml (CSNC1) e 3 mg/ml (CSNC3). Anche in questo caso la caratterizzazione morfologica è stata effettuata a partire dalle immagini ottenute tramite microscopio a scansione elettronica.

Nel caso di fibre CSNC1 le immagini ottenute sono riportate in figura 23.



Figura 23. (a) Fibre CSNC1 – 1000x; (b) Fibre CSNC1 – 2000x; (c) Fibre CSNC1 – 5000x.

Da queste immagini sono stati ricavati i seguenti parametri relativi a fibre CSNC1:

• Diametro: 220.24 ± 65.232 nm.

Nell'istogramma successivo (figura 24) è riassunta la distribuzione dei 50 campioni di fibre CSNC1 utilizzati.



Figura 24. Distribuzione dei diametri delle fibre CSNC1

Le immagini relative alle fibre **CSNC3** sono riportate in figura 25 e sono il punto di partenza per la caratterizzazione morfologica delle fibre. Le fibre composite sono prive di difetti circolari ma presentano degli aggregati di nanoparticelle, come quello evidenziato dalla freccia rossa in figura 25 (a).



Figura 25. (a) Fibre CSNC3 – 1000x; (b) Fibre CSNC3 – 2000x; (c) Fibre CSNC3 – 5000x.

Anche in questo caso è stato possibile ricavare i valori relativi a diametro medio e deviazione standard tramite ImageJ e successivamente Excel. I valori ottenuti sono i seguenti:

• Diametro: 237.02 ± 58.771 nm.

La distribuzione dei diametri dei campioni è mostrata nel grafico di figura 26. I campioni di fibre utilizzati di cui sono stati misurati i diametri sono in numero pari a 50.



Figura 26. Distribuzione dei diametri delle fibre CSNC3

3.1.3 Confronto tra fibre di controllo e fibre composite

I valori relativi ai diametri medi delle fibre di controllo e composite sono riassunti nella tabella sottostante (tabella 4). I diametri delle fibre di controllo sono mediamente superiori rispetto a quelli delle fibre composite che a loro volta, aumentano di diametro all'aumentare della concentrazione di nanoceria in essi presente.

	Diametro medio delle fibre
	(nm)
CS	263 ± 56
CSNC1	220 ± 65
CSNC3	237 ± 58

Tabella 4. Confronto tra i diametri medi di CS, CSNC1 E CSNC3

Tutte le nanofibre realizzate (composite e non) hanno un diametro compreso tra i 100 e i 400 nm. I diametri sono maggiormente concentrati nell'intervallo di valori che va dai 200 ai 250 nm, anche se per quanto riguarda le fibre di controllo si ha una distribuzione più "piatta": non è infatti del tutto apprezzabile la differenza tra questo *range* di valori e quello che racchiude i diametri compresi tra 250 e 300 nm.

Dalle immagini al microscopio a scansione elettronica è possibile riscontrare un numero maggiore di difetti nelle fibre composite, specialmente all'aumentare della concentrazione di ossido di cerio in soluzione. La causa può essere ricercata nella formazione di aggregati di nanoceria durante il processo di elettrofilatura. È inoltre possibile che la presenza del suddetto materiale ceramico sia alla base del maggiore diametro delle fibre CSNC3 rispetto alle fibre CSNC1.

3.2 Caratterizzazione meccanica

Sono state effettuate delle prove a trazione sulle fibre realizzate per andare a valutare l'effetto della nanoceria sulle caratteristiche meccaniche del materiale. I dati ottenuti sono stati importati ed elaborati su Excel, al fine di definire il modulo di Young delle tre tipologie di materiale.

I valori di rigidezza ottenuti sono i seguenti:



	Modulo di Young medio E (MPa)
CS	65 ± 13
CSNC1	73 ± 8
CSNC3	75 ± 6

Figura 27. Confronto tra la rigidezza media di CS, CSNC1 e CSNC3

I risultati ottenuti sono coerenti con quanto si trova a riguardo in letteratura [43]. In questo studio la nanoceria è stata aggiunta in fibre di polipropilene, portando ad un aumento della rigidezza del materiale all'aumentare della concentrazione di nanoparticelle. Per questo motivo ci si aspettava che all'aumentare della concentrazione di ossido di cerio, la rigidezza delle fibre ottenute sarebbe aumentata. La deviazione standard ha valori molto limitati nel caso di fibre CSNC1 E CSNC3 rispetto alle fibre di controllo: questo è un aspetto molto positivo perché indica che, dal punto di vista meccanico, c'è una buona riproducibilità.

Dall'elaborazione dei dati ottenuti è stato possibile tracciare la curva sforzodeformazione dei materiali realizzati. Nel grafico di figura 28 sono mostrate curve rappresentative relative alle tre tipologie di fibre realizzate.



Figura 28. Curve sforzo-deformazione delle fibre CS, CSNC1 e CSNC3

Nella tabella 5 sono riportati i valori relativi alla tensione ultima a trazione (UTS) e alla deformazione percentuale di rottura.

	UTS (MPa)	ε (%)
CS	$1,5 \pm 1$	3 ± 1
CSNC1	1,8 ± 1	4 ± 2
CSNC3	2 ± 1	5 ± 2

Tabella 5. UTS e deformazione percentuale di rottura mediati delle fibre CS,CSNC1 e CSNC3.

Non si evidenziano cambiamenti significativi nei valori di UTS delle tre tipologie di fibre. Per quanto riguarda la deformazione percentuale, si hanno incrementi significativi nel caso di CSNC3 rispetto agli altri due casi.

Si può concludere dicendo che la presenza di nanoceria rende le fibre maggiormente rigide. All'aumentare della concentrazione di nanoparticelle si influenza anche la deformazione percentuale del materiale quando viene portato a rottura: questo aspetto diventa evidente ad una concentrazione di 3 mg/ml.

3.3 Prove di degradazione

Sono state effettuate delle prove di degradazione per andare a valutare la stabilità in ambiente fisiologico delle fibre realizzate. I campioni sono stati immersi in PBS (tampone fosfato salino) e al termine degli *step* temporali predefiniti sono state analizzate le caratteristiche morfologiche tramite l'elaborazione dei dati ottenuti dalle immagini al SEM. I dati ottenuti tramite ImageJ sono stati importati su Excel per valutare il diametro medio delle fibre degradate e poterlo confrontare con quello delle fibre non degradate. Le immagini ottenute al microscopio ad un ingrandimento di 5000x sono riportate in figura 29.



Figura 29. Immagini al SEM (5000x) delle fibre CS, CSNC1 e CSNC3 a seguito della degradazione.

Osservando le immagini è possibile notare che tutte le tipologie di fibre hanno un diametro maggiore rispetto alla loro controparte non degradata, gli effettivi valori sono riportati successivamente (figura 30). La causa di questo inspessimento delle fibre può essere trovata nel fenomeno di rigonfiamento (*swelling*). Si può notare come le fibre di

controllo presentino un aumento nella porosità, dovuti probabilmente alla degradazione in massa di questo tipo di materiale [44].

Le fibre composite presentano una serie di aggregati di nanoparticelle, particolarmente evidenti nelle immagini al microscopio a scansione elettronica. Le fibre con una concentrazione maggiore presentano un maggior numero di queste imperfezioni. Si può supporre che le interazioni tra le nanoparticelle e gli ioni fosfato ne possano essere la causa: essi sono in grado di interferire con le normali proprietà delle nanoparticelle, riducendone per esempio le capacità antiossidanti e la loro capacità di agire da schermo nei confronti dell'assorbimento di acqua nella membrana [45].



Figura 30. (a) $\Delta w\%$ delle fibre CS dopo 1, 2 e 5 giorni; (b) $\Delta w\%$ delle fibre CSNC1 dopo 1, 2 e 5 giorni; (c) $\Delta w\%$ delle fibre CSNC3 dopo 1, 2 e 5 giorni.

Dalla figura 30 si può notare come le fibre di controllo arrivino a perdere una percentuale di peso superiore rispetto alle fibre composite, arrivando a sfiorare il 60% della massa di partenza a fronte del 46% delle fibre CSNC1 e del 50% delle fibre CSNC3.

In tutti i casi analizzati, la maggior parte della massa si perde nelle prime 24 ore di incubazione, per mantenere poi un peso pressoché costante nei quattro giorni successivi in cui i campioni sono stati mantenuti all'interno dell'incubatore in PBS.

Nello specifico, la perdita di peso percentuale delle fibre post-degradazione è rispettivamente:

	24 h (%)	48 h (%)	5 g (%)
CS	51 ± 4	45 ± 9	55 ± 4
CSNC1	44 ± 3	43 ± 3	46 ± 3
CSNC3	43 ± 6	49 ± 5	44 ± 6

Tabella 6. Perdita di peso percentuale media delle fibre CS, CSNC1 e CSNC3rispettivamente dopo: 1, 2 e 5 giorni.

La degradazione nelle fibre composite è minore per via della presenza delle nanoparticelle che fungono da "barriera" verso il passaggio dell'acqua all'interno del materiale, rallentandone il fenomeno di *swelling* e conseguentemente anche la degradazione [46].

3.4 Prove antiossidanti

Per valutare la capacità antiossidante delle fibre realizzate, si è effettuato il "Total Antioxidant Capacity Assay" (MAK187). Come previsto da questo test, è stata tracciata una curva di calibrazione (figura 31).



Figura 31. Curva di calibrazione del kit TACA

A partire da questa curva di calibrazione, l'assorbanza è stata misurata in termini di nmol equivalenti di Trolox. I risultati ottenuti sono i seguenti (figura 32). I valori di assorbanza del campione sono stati prima privati del bianco, successivamente si è sottratta l'intercetta della curva di calibrazione e poi si è diviso il risultato così ottenuto per il coefficiente angolare della retta stessa.



	Trolox equivalenti (nmol)
CS	$0,831 \pm 0,003$
CSNC1	$0,896 \pm 0,005$
CSNC3	$2,32 \pm 0,006$

Tabella 7. Valori di assorbanza delle fibre CS, CSNC1 e CSNC3

Dal grafico si può notare come la capacità antiossidante aumenti all'aumentare della concentrazione di nanoceria presente. È noto che il chitosano abbia delle caratteristiche antiossidanti intrinseche (motivo per cui è stato scelto per questo studio), come dimostrato nello studio di Yen et al. [47]. Le fibre CSNC1 hanno una capacità paragonabile a quella delle fibre di controllo, per questo motivo si può supporre che una concentrazione così limitata non porti a dei vantaggi significativi rispetto al controllo in termini di capacità antiossidanti. Aumentando ulteriormente la concentrazione di ossido di cerio a 3 mg/ml questo effetto è sicuramente più evidente, a causa della quantità di nanoparticelle introdotta.

	Potere antiossidante (nmol di Trolox equivalenti)
CS	0.831 ± 0.002
CSNC1	0.896 ± 0.004
CSNC3	2.320 ± 0.006

I valori di nmol di Trolox equivalenti sono riassunti nella seguente tabella:

Tabella 8. Capacità antiossidante delle fibre CS, CSNC1 e CSNC3

3.5 Prove cellulari

Per le prove di vitalità cellulare sono state utilizzate le cellule della linea cellulare SHSY-5Y. I risultati per *timestep* rispettivamente di 24h, 48 h e 5 g sono riassunti nella figura 33 in basso.

Dal grafico si può vedere come non ci siano differenze significative tra le tre tipologie di materiale. Le fibre CS sono in grado di garantire una buona vitalità cellulare fino ai 5 giorni anche senza l'aggiunta di nanoceria e quelle caricate con nanoparticelle verranno rapportate al 100% rappresentato dal controllo. Le fibre composite non mostrano differenze tra loro dopo 24 ore. Già dopo 48 ore è possibile vedere una differenza tra le CSNC1 e le CSNC3: le prime presentano una vitalità maggiore rispetto alle seconde, si innesca inoltre una proliferazione cellulare leggermente marcata nelle CSNC1.

Queste prove al contempo dimostrano un ridotto metabolismo cellulare nelle fibre composite rispetto a quelle di controllo, indicando un minor numero di cellule presenti su di esse.



Figura 33. Percentuali di vitalità delle cellule nella linea SHSY-5Y su CS, CSNC1 e CSNC3 a 24h, 48h e 5g.

4. Conclusioni e sviluppi futuri

Il campo dell'ingegneria tissutale sfrutta cellule viventi al fine di riparare, mantenere o sostituire tessuti e organi [48]. Alla base dell'idea di ingegneria tissutale c'è la figura dello scaffold: un supporto tridimensionale e poroso che sia in grado di fornire alle cellule che su di esso verranno impiantate tutto ciò di cui avranno bisogno per rimanere in vita e, a seconda delle applicazioni, differenziarsi o proliferare. Nella progettazione dello scaffold un elemento importante è la biomimeticità ovvero la capacità di emulare e riprodurre strutture presenti in ambienti fisiologici: in questo caso lo scaffold vuole mimare le caratteristiche della matrice extracellulare. Tra le caratteristiche della ECM, morfologia e composizione sono quelle che più frequentemente vengono riprodotte nello scaffold, prevalentemente avvalendosi di materiali polimerici come componente di base. Quest'ampia categoria si divide tra polimeri naturali e polimeri sintetici, in grado di coprire un'ampia gamma di caratteristiche e proprietà. Nella progettazione e realizzazione di uno scaffold per l'ingegneria tissutale, bisogna tenere conto anche del degradation rate: spesso sarà gradito che il materiale non degradi per un intervallo di tempo molto lungo e altre volte sarà auspicabile e richiesto che lo scaffold si degradi in tempi brevi. Lo scaffold deve essere in grado di garantire alle cellule degli stimoli di tipo fisico e chimico tramite la scelta del materiale. Per ottenere i primi bisogna gestire la topografia alla micro e nanoscala, la porosità e la geometria 3D della struttura; per i secondi la chimica superficiale e l'adsorbimento delle proteine a seguito dell'impianto [10]. Il polimero di partenza utilizzato non è l'unico elemento da tenere in considerazione. Altri studi utilizzano materiali compositi: si va dagli scaffold con proprietà antibatteriche, a quelli con capacità antiossidanti (tra cui quelli compositi utilizzati in questo lavoro di tesi), fino a tante altre casistiche. Anche il metodo utilizzato per la realizzazione degli scaffold varia, e con esso anche la struttura dello scaffold stesso. La tecnica maggiormente utilizzata è quella dell'electrospinning che permette di ottenere fibre con diametri dell'ordine delle centinaia di nanometri ma non è in grado di processare ogni tipo di polimero.

In questo lavoro sono state utilizzate delle membrane nanofibrose realizzate tramite tecnica dell'electrospinning. Il polimero di base che è stato scelto è il chitosano (CS) a causa delle sue proprietà antiossidanti intrinseche e della sua ottima biocompatibilità e capacità di assorbimento. La capacità antiossidante è particolarmente importante perché

favorisce il metabolismo delle cellule sane andando a contrastare l'azione negativa dei ROS. Per accentuare ulteriormente questo effetto, le fibre di chitosano sono state arricchite con nanoparticelle di ossido di cerio, anch'esse antiossidanti. Per la realizzazione del materiale si è partiti dal protocollo pensato da Tonda-Turo e colleghi [42] e ottimizzato per questa applicazione nella tesi di Persico [49]. A partire da una soluzione di chitosano ed aggiungendo le nanoparticelle già diluite, si è proceduto con l'aggiunta prima di DSP e poi di DMSO, per poi concludere con l'elettrofilatura. Sono state così realizzate fibre di controllo di solo chitosano e fibre composite a due differenti concentrazioni di nanoceria: 1 mg/ml e 3 mg/ml.

Sulle membrane così realizzate sono state effettuate una serie di prove atte a caratterizzare il materiale in vari aspetti.

La prima tipologia effettuata è quella morfologica: avvalendosi del microscopio a scansione elettronica (SEM) sono state acquisite delle immagini ad alta risoluzione che mostrano la morfologia e lo spessore delle fibre ottenute. Dalla misura dei loro diametri tramite il software ImageJ e successivamente Excel è stato possibile constatare che la presenza di nanoceria nelle fibre composite ha portato ad un inspessimento rispetto a quelle di controllo.

Sui campioni dei materiali realizzati sono state effettuate successivamente delle prove di tipo meccanico: dei provini di dimensioni uguali tra loro sono stati sottoposti a trazione tramite MTS QTest/10 e dai dati ricavati è stato possibile tracciare le curve sforzodeformazione rispettivamente per le fibre di controllo e per quelle composite. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che la presenza di nanoceria all'interno del materiale provoca un aumento della rigidezza della membrana, espressa tramite un valore più alto del modulo di Young ricavato dalle curve sforzo-deformazione.

Per valutare la degradazione del materiale nel tempo, campioni delle fibre realizzate sono stati immersi in PBS e incubati per tre diversi *step* temporali: 24h, 48h e 5g. Questa prova ha messo in evidenza che la presenza delle nanoparticelle di ossido di cerio è in grado di rallentare la degradazione del materiale perché funge da barriera all'avanzamento del PBS all'interno delle fibre, rallentandone il fenomeno di *swelling* che è legato alla degradazione in massa del materiale [45]. La degradazione maggiore è avvenuta nelle

prime 24 ore di incubazione, per poi assestarsi intorno ad un unico valore fino ai 5 giorni successivi.

Prima di procedere alle prove cellulari sono state effettuate delle prove antiossidanti che hanno dimostrato che le fibre di controllo possiedono delle capacità antiossidanti intrinseche e che all'aumentare della concentrazione di nanoceria in quelle composite non si ha un aumento notevole per fibre CSNC1 mentre si ha un aumento molto marcato nelle fibre CSNC3. Questo perché nonostante la nanoceria sia fortemente antiossidante, la concentrazione di 1 mg/ml si è rivelata essere troppo bassa per migliorare in maniera tangibile questa proprietà delle fibre realizzate.

In ultimo sono state effettuate le prove cellulari utilizzando le cellule della linea SHSY-5Y che hanno dimostrato che il comportamento delle fibre composite non si discosta significativamente da quello delle fibre di controllo.

Per il futuro è auspicabile ripetere quest'insieme di prove su fibre con concentrazioni diverse di nanoceria per indagare gli effetti di questo cambiamento. Per poter poi utilizzare questa tipologia di membrane in applicazioni di tipo biomedico, la realizzazione di fibre allineate tramite l'utilizzo di un collettore rotante in fase di elettrofilatura è consigliata: in quanto scaffold con fibre orientate in questo modo possono portare a risultati migliori quando si interfacciano con cellule del tessuto nervoso che prediligono un orientamento di questo tipo.

BIBLIOGRAFIA

- [1] G. Anastasi, *Trattato di Anatomia Umana*. 2007.
- [2] V. M. Campese, S. Ye, H. Zhong, V. Yanamadala, Z. Ye, and J. Chiu, "Reactive oxygen species stimulate central and peripheral sympathetic nervous system activity," *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, vol. 287, no. 2 56-2, pp. 695–703, 2004.
- [3] Vacanti, Principles of Tissue Engineering. .
- [4] S. Levenberg and R. Langer, "Advances in Tissue Engineering," *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 61, pp. 113–134, 2004.
- [5] S. S. Kulkarni, R. Orth, M. Ferrari, and N. I. Moldovan, "Micropatterning of endothelial cells by guided stimulation with angiogenic factors," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 19, no. 11, pp. 1401–1407, 2004.
- [6] T. E. Biomaterials, "Review paper: Critical Issues in Tissue Engineering: Biomaterials, Cell Sources, Angiogenesis, and Drug Delivery Systems," vol. 26, no. November 2011, pp. 383–417.
- [7] D. Li and Y. Xia, "Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel?," *Adv. Mater.*, vol. 16, no. 14, pp. 1151–1170, 2004.
- [8] S. Srouji, T. Kizhner, E. Suss-Tobi, E. Livne, and E. Zussman, "3-D Nanofibrous electrospun multilayered construct is an alternative ECM mimicking scaffold," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 3, pp. 1249–1255, 2008.
- [9] E. Process, J. Doshi, and D. H. Reneker, "Proceedings of the 1993 IEEE Industry Applications Society Meeting," *J. Electrostat.*, vol. 35, no. 2–3, pp. 151–296, 1995.
- [10] E. Garreta, D. Gasset, C. Semino, and S. Borrós, "Fabrication of a three-dimensional nanostructured biomaterial for tissue engineering of bone," *Biomol. Eng.*, vol. 24, no. 1 SPEC. ISS., pp. 75–80, 2007.
- [11] A. Berthold et al., "Biocompatible porous ceramics for the cultivation of

hematopoietic cells," J. Mater. Sci. Mater. Med., vol. 18, no. 7, pp. 1333–1338, 2007.

- [12] S. M. Willerth, K. J. Arendas, D. I. Gottlieb, and S. E. Sakiyama-Elbert,
 "Optimization of fibrin scaffolds for differentiation of murine embryonic stem cells into neural lineage cells," *Biomaterials*, vol. 27, no. 36, pp. 5990–6003, 2006.
- [13] S. M. Willerth and S. E. Sakiyama-Elbert, "Approaches to neural tissue engineering using scaffolds for drug delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 4–5, pp. 325– 338, 2007.
- [14] N.-C. Cheng, B. T. Estes, H. A. Awad, and F. Guilak, "Chondrogenic Differentiation of Adipose-Derived Adult Stem Cells by a Porous Scaffold Derived from Native Articular Cartilage Extracellular Matrix," *Tissue Eng. Part A*, vol. 15, no. 2, pp. 231–241, 2008.
- [15] S. Lyu and D. Untereker, "Degradability of Polymers for Implantable Biomedical Devices," pp. 4033–4065, 2009.
- [16] G. Kogan, L. Šoltés, R. Stern, and P. Gemeiner, "Hyaluronic acid: A natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications," *Biotechnol. Lett.*, vol. 29, no. 1, pp. 17–25, 2007.
- [17] A. Subramanian, U. M. Krishnan, and S. Sethuraman, "Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration.," J. Biomed. Sci., vol. 16, p. 108, 2009.
- [18] S. Elswaifi, J. Palmieri, K. Hockey, and B. Rzigalinski, "Antioxidant Nanoparticles for Control of Infectious Disease," *Infect. Disord. - Drug Targets*, vol. 9, no. 4, pp. 445–452, 2012.
- [19] J. R. Morones *et al.*, "The bactericidal effect of silver nanoparticles," *Nanotechnology*, vol. 16, no. 10, pp. 2346–2353, 2005.
- [20] M. Okuda et al, "Bioinspired Synthesis of Homogenous Cerium Oxide Nanoparticles and Two- or Three-Dimensional Nanoparticle Arrays Using Protein Supramolecules," *Cryst. Growth Des.*, 2011.
- [21] S. Soo Lee et al, "High Temperature Decomposition of Cerium Precursors To Form Ceria Nanocrystal Libraries for Biological Applications," *Chem. Mater.*, 2011.

- [22] C. Li, X. Shi, Q. Shen, C. Guo, Z. Hou, and J. Zhang, "Hot topics and challenges of regenerative nanoceria in application of antioxidant therapy," *J. Nanomater.*, vol. 2018, 2018.
- [23] A. Asati et al, "Surface-Charge-Dependent Cell Localization and Cytotoxicity of Cerium Oxide Nanoparticles," ACS Nano, 2010.
- [24] J. T. Dahle and Y. Arai, "Environmental geochemistry of cerium: Applications and toxicology of cerium oxide nanoparticles," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 12, no. 2, pp. 1253–1278, 2015.
- [25] J. Chen et al, "Nanoceria Particles Prevent ROI-Induced Blindness," *Recent Adv. Retin. Degener.*, 2008.
- [26] B. J. Smith, G. M. Phillip, and M. E. Sweeney, "Environmental science," *Environ. Sci.*, pp. 1–502, 2014.
- [27] A. S. Karakoti *et al.*, "Nanoceria as antioxidant: Synthesis and biomedical applications," *Jom*, vol. 60, no. 3, pp. 33–37, 2008.
- [28] T. Sahu, S. Bisht, K. Das, and S. Kerkar, "Nanoceria: Synthesis and Biomedical Applications," *Curr. Nanosci.*, vol. 9, no. 5, pp. 588–593, 2013.
- [29] A. Karakoti et al, "Rareearthoxides as nanoadditives in 3-D nanocomposite scaffolds for bone regeneration," *J. Mater. Chem.*, 2010.
- [30] S. Das, J. M. Dowding, K. E. Klump, J. F. Mcginnis, W. Self, and S. Seal, "Cerium oxide nanoparticles: Applications and prospects in nanomedicine," *Nanomedicine*, vol. 8, no. 9, pp. 1483–1508, 2013.
- [31] C. Mandoli *et al.*, "Stem cell aligned growth induced by CeO2 nanoparticles in PLGA scaffolds with improved bioactivity for regenerative medicine," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 20, no. 10, pp. 1617–1624, 2010.
- [32] A. Marino *et al.*, "Gelatin/nanoceria nanocomposite fibers as antioxidant scaffolds for neuronal regeneration," *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, vol. 1861, no. 2, pp. 386–395, 2017.
- [33] A. R. Unnithan, A. Ramachandra Kurup Sasikala, Y. Sathishkumar, Y. S. Lee, C. H. Park, and C. S. Kim, "Nanoceria doped electrospun antibacterial composite mats for potential biomedical applications," *Ceram. Int.*, vol. 40, no. 8 PART A, pp. 12003–

12012, 2014.

- [34] A. Mansoor, "Permeability and blood compatibility properties of chitosan-poly(ethylene oxide) blend membranes for haemodialysis," *Biomaterials*, vol. 16, no. 8, pp. 593–599, 1995.
- [35] W. Hu et al, "Biocompatibility of braided poly(L-lactic acid) nanofiber wires applied as tissue sutures," *Polym. Int.*, 2010.
- [36] A. Grenha et al., "Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery," *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2005.
- [37] T. Dai et al., "Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects," 2014.
- [38] H. Liu et al., "A study on a chitosan-gelatin-hyaluronic acid scaffold as artificial skin in vitro and its tissue engineering applications."
- [39] M. Pakravan, M. C. Heuzey, and A. Ajji, "A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning," *Polymer (Guildf).*, vol. 52, no. 21, pp. 4813–4824, 2011.
- [40] N. Bhattarai et al., "Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility."
- [41] F. Fregnan *et al.*, "Chitosan crosslinked flat scaffolds for peripheral nerve regeneration," *Biomed. Mater.*, vol. 11, no. 4, 2016.
- [42] C. Tonda-Turo *et al.*, "Non-covalently crosslinked chitosan nanofibrous mats prepared by electrospinning as substrates for soft tissue regeneration," *Carbohydr. Polym.*, vol. 162, pp. 82–92, 2017.
- [43] Z. Yang, H. Peng, W. Wang, and T. Liu, "Crystallization behavior of poly(εcaprolactone)/layered double hydroxide nanocomposites," J. Appl. Polym. Sci., vol. 116, no. 5, pp. 2658–2667, 2010.
- [44] Y. M. Yang, W. Hu, X. D. Wang, and X. S. Gu, "The controlling biodegradation of chitosan fibers by N-acetylation in vitro and in vivo," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 18, no. 11, pp. 2117–2121, 2007.
- [45] S. Singh, T. Dosani, A. S. Karakoti, A. Kumar, S. Seal, and W. T. Self, "A phosphate-dependent shift in redox state of cerium oxide nanoparticles and its effects on catalytic properties," *Biomaterials*, vol. 32, no. 28, pp. 6745–6753, 2011.

- [46] E. Díaz, I. Puerto, and I. Sandonis, "The effects of bioactive nanoparticles on the degradation of DLGA," *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 64, no. 1, pp. 38–46, 2015.
- [47] M. Yen, J. Yang, and J. Mau, "Antioxidant properties of chitosan from crab shells," vol. 74, pp. 840–844, 2008.
- [48] L. G. Griffith and G. Naughton, "Tissue engineering Current challenges and expanding opportunities," *Science (80-.).*, vol. 295, no. 5557, 2002.
- [49] M. G. Persico, "Realizzazione di nanofibre a base di chitosano caricate con nanoparticelle di ossido di cerio e valutazione in vitro delle loro proprietà antiossidanti," 2018.