

POLITECNICO DI TORINO

Facoltà di Ingegneria

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale



REALIZZAZIONE DI NANOFIBRE A BASE DI CHITOSANO CARICATE CON NANOPARTICELLE DI OSSIDO DI CERIO E VALUTAZIONE IN VITRO DELLE LORO PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI

Relatore

Prof. Gianluca Ciardelli

Candidata

Maria Grazia Persico

Corelatore

Dott.ssa Chiara Tonda Turo

Anno accademico 2017/2018

Alla mia famiglia

Ai miei nonni

Sommario

| | |
|---|-----------|
| ABSTRACT..... | 1 |
| I. Introduzione..... | 2 |
| A. Il sistema nervoso..... | 2 |
| 1. <i>Le cellule</i> | 2 |
| 2. <i>I disturbi neurologici</i> | 5 |
| a) Ruolo di stress ossidativo e ROS..... | 6 |
| b) Malattie neurodegenerative | 8 |
| B. Ingegneria tissutale | 9 |
| 1. <i>Lo scaffold</i> | 12 |
| a) Funzioni dello scaffold | 12 |
| b) Proprietà dello scaffold..... | 13 |
| 2. <i>Materiali per scaffold</i> | 15 |
| a) Materiali polimerici | 15 |
| b) Polimeri biodegradabili/biorisorbibili | 17 |
| c) Cinetica di degradazione | 17 |
| d) Polimeri naturali | 21 |
| e) Polimeri sintetici..... | 22 |
| f) Nanoparticelle con proprietà antiossidanti | 24 |
| i. SINTESI..... | 25 |
| ii. STRUTTURA CHIMICA..... | 25 |
| iii. ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE | 27 |
| iv. APPLICAZIONI BIOMEDICALI..... | 30 |
| v. TOSSICITÀ | 33 |
| C. Scaffold per la rigenerazione del tessuto nervoso | 33 |
| 1. <i>Requisiti</i> | 34 |
| 2. <i>Materiali</i> | 37 |
| 3. <i>Design</i> | 38 |
| D. Realizzazione di scaffold nanofibrosi per l'ingegneria tissutale..... | 39 |
| 1. <i>Vantaggi della struttura nanofibrosa</i> | 39 |
| 2. <i>Electrospinning</i> | 40 |
| a) Principio di funzionamento | 41 |
| b) Difetti di elettrofilatura..... | 42 |

| | |
|---|----|
| c) Parametri che influenzano il processo | 43 |
| 3. <i>Electrospinning di biomateriali</i> | 46 |
| II. Materiali e metodi | 50 |
| A. Materiali | 50 |
| 1. <i>Chitosano</i> | 50 |
| a) Polietilenossido (PEO) | 53 |
| b) Fosfato di sodio dibasico | 54 |
| 2. <i>Nanoparticelle di ossido di cerio</i> | 56 |
| 3. <i>Cellule NIH/3T3</i> | 56 |
| 4. <i>Cellule SH-SY5Y</i> | 57 |
| B. Metodi | 58 |
| 1. <i>Preparazione delle soluzioni polimeriche</i> | 58 |
| a) Preparazione della soluzione di CS | 58 |
| b) Preparazione delle dispersioni di CS/NC | 59 |
| 2. <i>Fabbricazione delle membrane nanofibrose</i> | 61 |
| a) Processo di electrospinning | 61 |
| b) Parametri del processo..... | 62 |
| 3. <i>Caratterizzazione reologica delle soluzioni polimeriche</i> | 63 |
| 4. <i>Caratterizzazione delle membrane nanofibrose</i> | 64 |
| a) Caratterizzazioni morfologiche superficiali | 64 |
| Microscopia elettronica a scansione..... | 64 |
| Analisi delle immagini | 67 |
| Spettroscopia EDX..... | 68 |
| b) Caratterizzazione chimico/fisica..... | 69 |
| Spettroscopia Infrarossa FTIR-ATR | 69 |
| c) Caratterizzazione meccanica | 71 |
| d) Prove di degradazione | 72 |
| e) Prove antiossidanti..... | 74 |
| Microplate reader | 74 |
| f) Test di coltura cellulare | 76 |
| III. Risultati e discussione | 77 |
| A. Fabbricazione membrane elettrofilate | 77 |
| 1. <i>Nanofibre di controllo</i> | 77 |
| 2. <i>Ottimizzazione del protocollo per fibre composite</i> | 78 |
| B. Caratterizzazione reologica delle soluzioni | 81 |
| C. Caratterizzazione delle membrane | 85 |

| | |
|--|-----|
| 1. Membrane random CS/NC | 85 |
| a) Caratterizzazioni morfologiche superficiali | 85 |
| Microscopia SEM..... | 85 |
| Spettroscopia EDX..... | 87 |
| b) Caratterizzazione chimico/fisica..... | 88 |
| c) Caratterizzazione meccanica | 90 |
| d) Prove di degradazione | 91 |
| e) Prove antiossidanti..... | 96 |
| f) Test di coltura cellulare | 96 |
| 2. Membrane allineate CS/NC | 97 |
| a) Microscopia SEM | 97 |
| b) Spettroscopia EDX | 101 |
| c) Prove di degradazione | 103 |
| d) Test di coltura cellulare | 106 |
| IV. Conclusioni e sviluppi futuri | 108 |
| BIBLIOGRAFIA | 112 |

ABSTRACT

Tissue engineering aims to replace damaged biological tissues to restore or improve their functionalities using temporary structures, known as scaffolds. Their features ought to be optimized, to mimic the extra-cellular matrix providing cells adequate stimuli to promote tissues growth. In particular, electrospinning has proven to be an interesting technique to obtain polymeric nanofibers scaffolds doped with multifunctional nano-materials that stimulate the regeneration of tissue.

The aim of this work is to fabricate electrospun random and aligned membranes made of chitosan (CS), a natural derived polymer, loaded with antioxidant cerium oxide nanoparticles (NC). The NC loading method was optimized, in order to obtain homogeneous composite fibers with less defects and reduce the degree of NC agglomeration. To evaluate the dispersion of nanoparticles and viscosity of solutions, rheological tests were conducted. The nanofibrous composite membranes were obtained by electrospinning and their morphology was evaluated by electronic scanning microscopy (SEM). The result of morphological characterization shows that the fiber diameters were increased by loading large amount of nanoparticles. Energy Dispersive X-ray spectroscopy (EDX) confirmed the presence of antioxidant agents in electrospun fibers, while FTIR-ATR spectra did not shown any differences between control and composite fibers. Composite membranes with a higher content of nanoparticles provided an improvement in their own mechanical properties. CS fibers appeared to be more liable to degrade than doped membranes. Antioxidant colorimetric test shows that the increasing amount of NC loaded into the fibrous membranes leads to an increasement of composite membranes antioxidant capacity.

I. Introduzione

A. Il sistema nervoso

Il sistema nervoso è un apparato costituito da una fitta rete di cellule e fibre nervose responsabile dell'interazione dell'uomo con l'ambiente circostante. Alla macroscale, può essere suddiviso in due distretti anatomici: il sistema nervoso centrale (SNC) e sistema nervoso periferico (SNP). Il sistema nervoso centrale comprende encefalo e midollo spinale, situato all'interno del canale vertebrale. L'encefalo è separato dal resto dell'organismo dalla barriera emato-encefalica: è una barriera anatomico-funzionale perché, oltre alla complessità istologica, svolge un ruolo attivo (funzionale) proteggendo il sistema nervoso da eventuali elementi estranei. Il sistema nervoso periferico si dirama dal centrale e comprende tutti i tessuti neurali non appartenenti al SNC. Si occupa della comunicazione tra il SNC e gli organi: a seconda del tipo di informazione trasportata, si distinguono il SNP afferente e SNP efferente. Il primo permette la trasmissione delle informazioni somatiche e viscerali dagli organi al SNC: le informazioni somatiche riguardano il soma, ossia l'unità epitelio-muscolo-scheletrica; le informazioni viscerali sono relative agli organi interni [1].

1. Le cellule

A livello istologico è possibile individuare due principali categorie di cellule del tessuto neurale: neuroni e cellule gliali.

I neuroni sono definiti come cellule eccitabili, in grado di elaborare, trasferire e conservare informazioni. La trasmissione delle informazioni avviene generando un impulso elettrico, noto come potenziale d'azione, che si sviluppa nel corpo cellulare e si propaga attraverso l'assone [1].

In fig.1 viene riportata la tipica struttura di un neurone: è costituito da un corpo cellulare detto soma contenente il nucleo e un numero molto elevato di mitocondri. Dal soma si diramano due tipi di propaggini, chiamate neuriti: un gruppo costituisce i dendriti, delle estroflessioni del citoplasma che ricevono informazioni dalle cellule circostanti, e l'assone.

Attraverso le sinapsi, si depolarizza la membrana a livello dei dendriti e l'informazione si propaga fino al raggiungimento del soma. Nel soma avviene un'elaborazione spaziale e temporale degli impulsi, in modo che un nuovo potenziale d'azione possa generarsi e propagarsi unidirezionalmente lungo l'assone, fino a raggiungere le cellule circostanti.

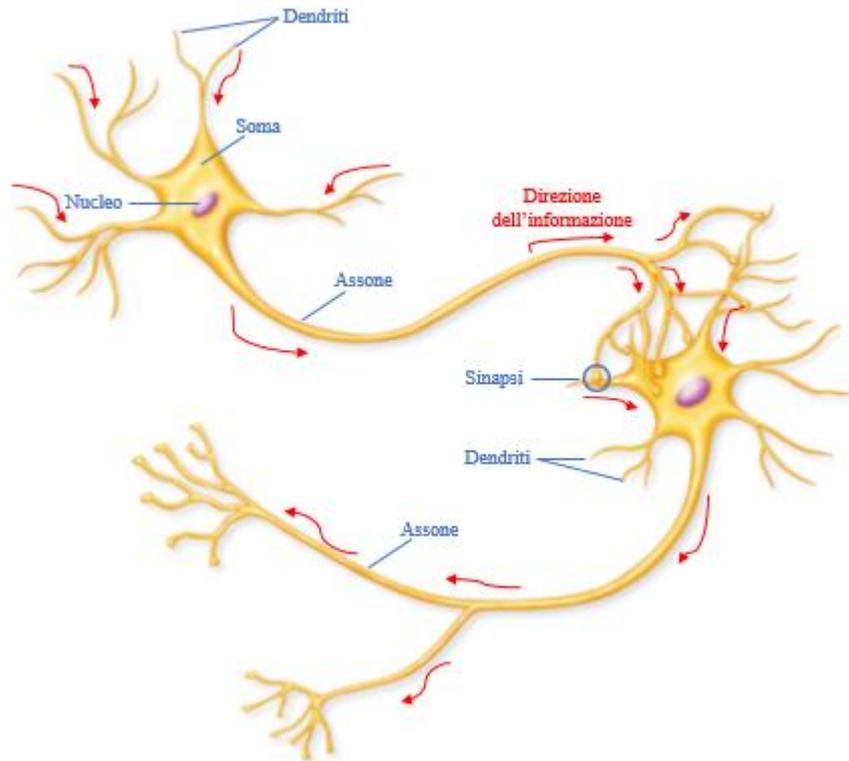


Figura 1. Due neuroni, con gli elementi che lo costituiscono. Il neurone superiore è quello presinaptico che comunica con il neurone in basso: l'informazione si propaga nella direzione osservabile in figura. Adattata da [1].

La neuroglia è una famiglia di cellule che formano una rete che avvolge le cellule nervose. Oltre a fungere da supporto meccanico per la crescita neuronale, proteggono e regolano l'attività dei neuroni stessi. Il loro ruolo però non è soltanto passivo. Diversamente infatti negli ultimi anni si è affermata sempre più la possibilità che essi svolgano un ruolo attivo nell'elaborazione dell'informazione neuronale a livello delle sinapsi, secondo il modello tripartito della sinapsi [2]. Le cellule neurogliali sono state classificate in: cellule di Schwann, cellule di telogia e cellule satelliti nel SNP e microglia, oligodendrociti, astrociti e cellule ependimali nel SNC.

- Le cellule di Schwann formano la guaina mielinica che riveste gli assoni del sistema nervoso periferico isolandoli dall'ambiente esterno. La guaina mielinica non è continua lungo l'assone ma è interrotta in alcuni punti, noti come nodi di Ranvier. In prossimità di questi ultimi si genera il potenziale d'azione che si propaga in maniera saltatoria, quindi più rapidamente. In caso di lesioni, le cellule di Schwann fungono inoltre da cellule guida, permettendo una corretta crescita degli assoni [1].
- Le cellule della telogia, o neuroglia terminale, sono cellule di Schwann che ricoprono però le terminazioni nervose; la loro forma varia a seconda della terminazione.
- Le cellule satelliti perineurali circondano i gangli: hanno forma cubica, cooperano per isolare il neurone da stimoli diversi da quelli prodotti a livello sinaptico.
- Le cellule microgliali sono le cellule gliali più piccole e presentano numerosi prolungamenti dendritici dotati di spine. Presentano pochi organuli nel citoplasma, eccetto numerosi ribosomi liberi ed un nucleo allungato. Nell'organismo sono presenti in stato quiescente o attivo: infatti, in condizioni normali sono poco numerose, ma in condizioni patologiche del tessuto nervoso aumentano notevolmente di numero. In forma ameboidi, si accumulano nelle zone di danno tessutale svolgendo attività fagocitaria: eliminano eventuali patogeni e rimuovono frammenti di neuroni in degenerazione [3]. In seguito all'attivazione ad opera di glutammato, citochine e altri fattori, le cellule si inspessiscono e producono elementi e molecole pro-infiammatorie che permettono un'azione neurotossica. A questa può aggiungersi anche l'attività fagocitaria. Dopo l'infiammazione, vengono secrete citochine anti-infiammatorie che richiamano neuroni e astrociti verso la zona lesa [4].
- Gli oligodendrociti sono cellule di piccole dimensioni, caratterizzati da scarsi processi citoplasmatici. La loro principale funzione consiste nella deposizione di mielina intorno agli assoni nel SNC: sono in grado di mielinizzare contemporaneamente più segmenti di uno o più assoni. Anche negli assoni del SNC la propagazione dell'impulso lungo l'assone è saltatoria per la presenza dei nodi di Ranvier.
- Gli astrociti sono le più numerose tra le cellule della neuroglia. Possiedono un piccolo corpo cellulare e molti prolungamenti citoplasmatici. Presentano forma

stellata, con processi cellulari ramificati con cui circondano neuroni e assoni. Possono entrare in stretto rapporto con i capillari sanguigni, formando la barriera ematoencefalica. In alcune regioni sono presenti astrociti staminali che, in caso di lesioni, proliferano dando origine a tessuto cicatriziale. Oltre a svolgere funzione di sostegno delle cellule nervose, ne controllano la comunicazione e intervengono nel loro metabolismo [3]. Gli astrociti sono i principali protagonisti della sinapsi tripartita, modulando i gradienti di ioni calcio [2].

- Le cellule endoteliali o endotelociti costituiscono l'epitelio che tappezza le cavità dell'encefalo e il canale centrale del midollo spinale. Presentano un citoplasma contenente numerosi organelli; sulla superficie presentano numerose ciglia. Anche queste cellule svolgono principalmente funzioni di supporto [3].

Alcune di queste cellule intervengono in caso di lesione di un neurone, ma la loro azione dipende dalla posizione della lesione stessa. Se il danno è sufficientemente lontano dal corpo cellulare, è possibile che la cellula mantenga una leggera capacità di rigenerazione delle proprie strutture. Infatti, a seguito di una lesione assonale, si interrompe la comunicazione sinaptica con la cellula successiva; qualche ora dopo, degenera il terminale sinaptico, nonché la porzione di assone a valle del danno. Soltanto dopo qualche settimana, ha inizio l'eventuale processo di rigenerazione: è necessario l'intervento delle cellule microgliali nel SNC, che eliminano i *debris* cellulari dovuti alle degenerazioni avvenute. Durante la fase di rigenerazione, l'assone sviluppa degli *sprout* disordinati a livello della lesione per colmare il *gap*. Nel SNP le cellule di Schwann si comportano da guida assonale, favorendo un'ordinata rigenerazione che permette di ripristinare correttamente la funzionalità cellulare. Nel SNC, invece, la rigenerazione viene inibita da alcune glicoproteine. La risposta immunitaria dovuta alle cellule della microglia è inoltre più lenta a causa della barriera emato-encefalica. Infine, gli oligodendrociti non fungono da guida nella crescita, per cui è quasi impossibile che si verifichi rigenerazione spontanea [5].

2. I disturbi neurologici

Dati recenti mostrano come i disturbi neurologici, tra cui il morbo di Alzheimer, la malattia di Parkinson, la sclerosi multipla, epilessia, cefalee, rappresentino il 3% del carico

totale di morbilità. Questo dato è destinato ad aumentare esponenzialmente nei paesi a basso e medio reddito nei prossimi dieci anni: nonostante ciò, la conoscenza della loro epidemiologia resta ancora limitata [6]. Tra le patologie sopra elencate, meritano particolare attenzione il morbo di Alzheimer, il Parkinson, ma soprattutto la sclerosi multipla, malattie neurodegenerative che comportano una progressiva perdita sensoriale (demenza) o di funzionalità (atassia) di cellule del cervello e del midollo spinale.

Per tutte queste malattie, non esiste un trattamento farmacologico verso la causa dei sintomi; gli unici trattamenti esistenti consentono di rallentare l'evoluzione della patologia e di ridurre gli effetti sulla qualità della vita del paziente.

Alla neurodegenerazione si associano anche dei disturbi nel metabolismo degli ioni metallici; in particolare, le concentrazioni di ioni zinco, rame e ferro aumentano notevolmente nel cervello dei pazienti più anziani.

Ad accumulare queste malattie però, vi è anche un aumento di stress ossidativo nei tessuti neurali: non è ancora del tutto chiaro se l'elevata quantità di specie reattive dell'ossigeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) sia un effetto o una causa della patologia stessa. Infatti, i ROS sono particolarmente attivi nei tessuti neuronali, dove attaccano le cellule gliali e i neuroni, estremamente sensibili ai radicali liberi perché consumano molto ossigeno per la produzione di ATP [7]. Gli effetti dei ROS verranno analizzati successivamente.

a) *Ruolo di stress ossidativo e ROS*

Lo stress ossidativo è definito come il risultato dell'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno, ad esempio anione superossido, perossido di idrogeno, radicale ossidrilico e ione ossidrilico. Da studi recenti è emerso come i ROS modulino l'attività cellulare, in particolare l'apoptosi, l'espressione genica e perfino l'attivazione a cascata di specifici pathway cellulari; inoltre, si comportano da messaggeri intra ed extra cellulari. È dunque necessario che vi sia equilibrio nei processi di produzione e smaltimento dei ROS [8].

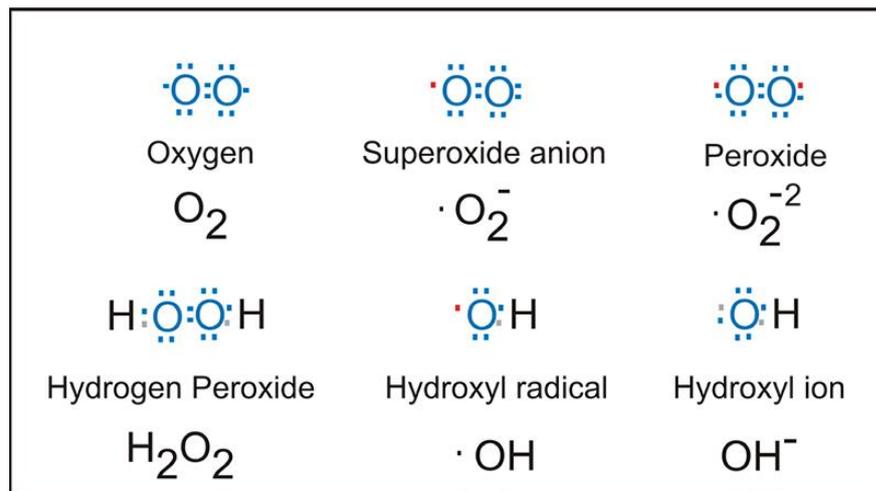


Figura 2. Strutture di Lewis dei più comuni ROS [9].

La maggior parte dei ROS deriva da processi di trasporto di elettroni e da reazioni di ossidazione. Infatti, l'ossigeno presenta due elettroni spaiati nel guscio elettronico più esterno e questo rende l'atomo notevolmente reattivo. Aggiungendo elettroni, l'ossigeno si riduce, formando i radicali rappresentati in fig.2. Lo stress ossidativo aumenta a causa di uno squilibrio tra l'attività pro-ossidante e anti-ossidante.

La generazione di ROS si sviluppa a partire dall'attivazione delle molecole di ossigeno e dalle successive reazioni con gli ioni metallici presenti nell'organismo.

Ai danni che lo stress ossidativo determina nei tessuti neurali, si associa anche il ruolo dei ROS nelle infezioni batteriche. Infatti, il meccanismo di eliminazione di agenti patogeni nell'organismo richiede la produzione di ROS da parte delle cellule del sistema immunitario, ma la loro sovrapproduzione potrebbe danneggiare le cellule stesse. Per esempio, il batterio *Pseudomonas aeruginosa* produce una tossina che induce danni cellulari e compromette l'azione del sistema immunitario per la produzione di ROS.

Gli antiossidanti ideali devono quindi possedere alcune caratteristiche. Non devono interferire con i ROS extracellulari prodotti per la naturale azione antimicrobica dell'organismo né proteggere gli agenti patogeni dell'infezione. Infine, dovrebbero agire soltanto quando lo stress ossidativo non può essere contrastato dagli agenti antiossidanti naturali presenti, senza interferire con la normale produzione di ROS [10].

È quindi importante scegliere con accuratezza la terapia antiossidante nel caso di infezioni e patologie.

b) Malattie neurodegenerative

Il morbo di Alzheimer si configura come la più diffusa malattia neurodegenerativa tra le persone anziane. Comporta una perdita progressiva e irreversibile dei neuroni, con relativa riduzione del volume e della consistenza dell'encefalo. Se la manifestazione tipica è la perdita della memoria, soprattutto recente, le manifestazioni istopatologiche, oltre alla progressiva atrofia dell'encefalo, sono relative alla formazione di placche intra ed extracellulari, dovute ad aggregazioni proteiche insolubili. Gli aggregati intracellulari sono causati dalla proteina Tau, di solito presente nel citoscheletro, che però si manifesta in forma iperfosforilata, formando delle strutture fibrillari dovute al mutamento conformazionale della proteina stessa. All'esterno sono invece presenti delle placche di amiloide, costituite da depositi di peptide β -amiloide. Queste strutture scatenano immediatamente la risposta immunitaria della microglia: col progredire della malattia, l'infiammazione iniziale diventa cronica e produce effetti tossici sull'organismo. Inoltre, l'elevata presenza di ioni metallici dovuti alle placche amiloidi produce delle reazioni chimiche che conducono alla generazione di H_2O_2 e infine di radicali ossidrilici tossici [7].

Il Parkinson (PD) è secondo per frequenza all'Alzheimer come malattia neurodegenerativa. Il primo sintomo patognomico è la bradicinesia nella fase precoce; quando non è ancora presente il tremore, il soggetto si muove e parla con difficoltà e ha un cattivo controllo della propria postura. Le lesioni riguardano soprattutto la perdita dei neuroni dopaminergici: si riduce la produzione del neurotrasmettitore noto come dopamina, con conseguente perdita di tutte le sinapsi coinvolte. In caso di pazienti malati di Parkinson, è necessario un notevole sforzo per compiere un movimento per la deficienza di dopamina. Quest'ultima, inoltre, interagisce con gli ioni rame e ferro riducendoli per dar luogo alla reazione di Fenton con conseguente produzione di H_2O_2 . Istopatologicamente, il morbo di Parkinson è caratterizzato dalla deposizione di corpi di Lewy, ossia proteine ubiquitarie nel citoplasma di alcuni neuroni e dalla presenza di strutture filamentose. Recenti studi hanno dimostrato che la presenza dei corpi di Lewy sia dovuta all'accumulo della proteina insolubile alfa-sinucleina [11]. Si è inoltre osservato che mutazioni dell'alfa-sinucleina possono modulare l'interazione della dopamina col ferro, causando

sovrapproduzione di ROS [7]. La perdita neuronale è accompagnata dalla morte di numerosi astrociti e dall'intervento di cellule della microglia.

La terapia maggiormente utilizzata su pazienti affetti da Parkinson prevede il trattamento con la levodopa, un farmaco contenente un principio attivo precursore della dopamina. La levodopa viene processata da alcuni enzimi del sistema nervoso centrale e trasformata in dopamina funzionale.

La Sclerosi Multipla, nota anche come sclerosi a placche, è una malattia autoimmune cronica demielinizzante. Il tratto caratteristico della malattia è rappresentato dalla formazione di placche sclerotiche, ossia delle lesioni della sostanza bianca. Si ritiene che la patogenesi sia relativa alla migrazione di numerosi linfociti autoreattivi attraverso la barriera emato-encefalica che causa l'infiammazione nei pressi dei neuroni colpiti. L'infiammazione può impedire la propagazione del potenziale d'azione assonale in modi diversi, tra cui demielinizzazione o recisione assonale. Intervengono dunque le cellule della microglia, rimuovendo i debris e promuovendo il processo di remielinizzazione. Se però la rigenerazione fallisce, il neurone è compromesso e si ridistribuiscono i canali ioni dipendenti utili per la generazione del potenziale d'azione: quest'ultimo si propaga molto lentamente nei pazienti malati, fino a 5 m/s, contro i 100 m/s tipici dei pazienti sani. Anche in assenza di infiammazione linfocitica, la microglia resta attivata cronicamente, tanto da condurre alla perdita dei neuroni. Non sono ben chiare le cause della malattia, né se l'infiammazione sia causa o effetto della neurodegenerazione [12]. Anche in tal caso, il metabolismo degli ioni ferro e la produzione di ROS contribuiscono notevolmente alla rapida degenerazione della malattia. Infatti si verifica un accumulo di ioni metallici che conduce alla formazione di placche che si depositano sulla guaina mielinica dei neuroni prima del processo di demielinizzazione [7].

B. Ingegneria tissutale

Il termine Ingegneria tissutale (*Tissue Engineering*) nasce intorno al 1980 per indicare la manipolazione chirurgica di tessuti e organi utilizzando protesi o biomateriali. Nella sua

accezione odierna, è stato definito nel 1987 come il settore interdisciplinare che riguarda “l’applicazione dei principi e dei metodi dell’ingegneria e delle scienze della vita per comprendere le relazioni tra la struttura e la funzione di tessuti sani e patologici dei mammiferi e per svilupparne dei sostituti biologici con l’obiettivo di ripristinarne, preservarne e migliorarne la funzione” [13].

Nasce con l’obiettivo di risolvere il problema della mancanza di organi e tessuti per eventuali trapianti: infatti, non solo la disponibilità dei donatori è notevolmente limitata, ma un trapianto potrebbe anche comportare numerosi problemi per il paziente. Infatti, nel caso di allotrapianto o trapianto di un intero organo è sempre necessaria una terapia immunosoppressiva per evitare eventuale rigetto dell’impianto: qualora il sistema immunitario lo riconosca come un corpo estraneo, si forma una capsula fibrotica intorno al tessuto, che nei casi più gravi conduce ad infiammazione cronica ed espulsione dell’impianto. Inoltre, l’impianto di tessuti appartenenti ad un donatore non elimina il rischio di contrarre malattie trasmissibili.

Oltre all’applicazione *in vivo* del *tissue engineering*, è anche possibile riferirsi anche ad applicazioni *in vitro* per studiare le cellule e la loro attività, oppure per testare gli eventuali effetti citotossici di un farmaco [14].

Tre sono gli elementi principali su cui si basano gli approcci di *tissue engineering*:

- le cellule che ricostruiscono il tessuto;
- lo *scaffold*, un substrato tridimensionale poroso e ingegnerizzato che guidi l’iniziale adesione delle cellule, la loro proliferazione e la formazione di nuovo tessuto;
- degli elementi regolatori, ossia segnali biologici, chimici e fisici che possano influenzare l’attività cellulare.

Come mostrato in fig. 3 è possibile variare alcune caratteristiche di ognuno di questi elementi per ottenere il tipo di rigenerazione richiesta. Tali elementi possono essere utilizzati secondo due tipi di approcci, uno che prevede la cellularizzazione *in vitro* e l’altro che prevede il *recruitment* cellulare *in vivo*. Nel primo caso, gli *scaffold* vengono seminati *in vitro* con le cellule e coltivati o in un mezzo di coltura in modo statico o dinamicamente in un bioreattore. Affinché le cellule aderiscano al substrato, è necessario che questo

possessa le caratteristiche gradite al tipo di cellula considerato, per cui il design dello *scaffold* deve essere progettato accuratamente. La presenza di fattori solubili è secondaria, visto che il processo avviene in modo estremamente controllato in vitro. In alternativa, lo *scaffold* non cellularizzato si colloca nel paziente: attraverso le biomolecole con cui è stato funzionalizzato (soprattutto fattori di crescita), è in grado di richiamare le cellule del paziente per essere colonizzato *in vivo*. In tal caso lo *scaffold* deve anche garantire l'adesione cellulare [15].

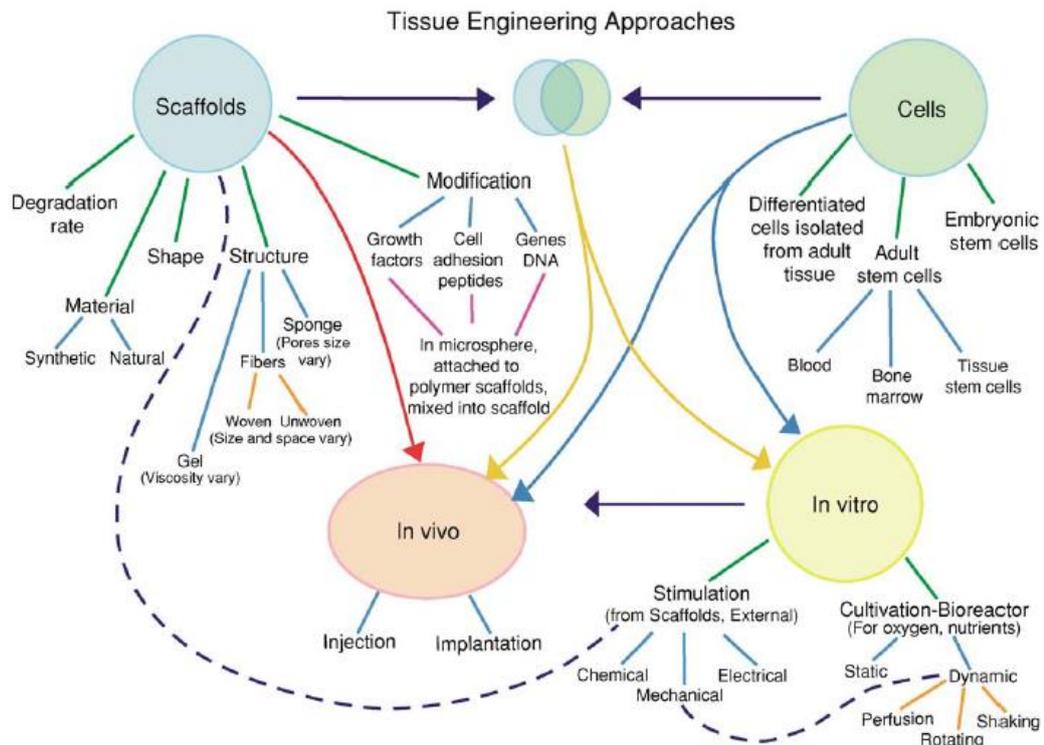


Figura 3. Componenti dell'ingegneria tissutale e loro interazione. Sono inoltre rappresentati i due possibili approcci (in vivo e in vitro) per la rigenerazione di un tessuto [15].

Uno dei maggiori problemi del *Tissue Engineering* è rappresentato dalla quantità limitata di cellule umane disponibili all'utilizzo. A seconda del tipo di tessuto da rigenerare, si possono utilizzare cellule di vario tipo, già differenziate o staminali; si preferisce di solito utilizzare cellule staminali per la possibilità di indurre il differenziamento nel fenotipo desiderato sfruttando opportuni stimoli (esterni o offerti dallo scaffold) e l'elevata capacità di *self-renewal* che posseggono tali cellule [16].

Alla questione cellulare si aggiunge il problema della vascolarizzazione. Se alcuni tessuti come pelle [17], cartilagine [18] e vescica [19] sono stati efficientemente ingegnerizzati perché dotati di spessori molto piccoli, tanto da potersi considerare bidimensionali, le soluzioni relative ad organi più complessi sono ancora in fase di ricerca. Infatti, gli *scaffold* permettono di ricreare tessuti tridimensionali *in vitro*, ma affinché le cellule ivi presenti restino vitali anche *in vivo*, è necessaria una rete di capillari e vasi sanguigni che fornisca ossigeno e nutrienti. Nel caso di impianto di tessuti ossei molto piccoli, si è osservato che i microvasi (presenti nell'impianto grazie all'utilizzo di cellule endoteliali in cocoltura) si collegano ai vasi sanguigni presenti nell'organismo [20]. In letteratura è presente più di un tipo di approccio per la vascolarizzazione di tessuti più spessi. È possibile inserire fattori di crescita nello scaffold che vengano rilasciati in maniera controllata *in vivo* [21], oppure far sì che le cellule presenti sullo *scaffold* secernano fattori angiogenici [22]. Ad esempio, è possibile incorporare fattori di crescita delle cellule endoteliali vascolari VEGF, proteine e peptidi della matrice extracellulare, anche organizzati in specifici pattern, per stimolare l'angiogenesi in una specifica direzione [23]. Un'altra opzione consiste nell'inserimento di cellule endoteliali o di cellule progenitriche endoteliali in cocolture, in modo che *in vitro* costituiscano dei capillari in grado di unirsi al sistema di vasi sanguigni presente *in vivo* [24]. Infine è possibile realizzare tessuti più spessi vascolarizzati *ex-vivo* attraverso lo sviluppo in bioreattori [25].

1. Lo scaffold

a) *Funzioni dello scaffold*

Nei biomateriali di terza generazione, le caratteristiche di assorbibilità e bioattività convergono, di modo che questi possano interagire in modo specifico con le integrine cellulari e indirizzarne l'attività. Infatti, gli *scaffold* devono fornire supporto alle cellule, favorirne l'adesione e agevolare la crescita tissutale.

È necessario quindi che siano **biomimetici**, in modo da riprodurre l'ambiente fisiologico nel modo più accurato possibile. In particolare, è opportuno che idealmente mimino l'ambiente della matrice extra-cellulare (ECM, *extra-cellular matrix*) in termini di

morfologia, composizione, proprietà superficiali, caratteristiche fisiche ed elettriche e stimoli biochimici offerti.

Tali supporti devono fornire rinforzo meccanico per il tessuto danneggiato, in modo da scongiurare il potenziale collasso.

Lo *scaffold* può essere inoltre funzionalizzato per veicolare le sostanze di cui necessita il processo di rigenerazione (cellule, fattori di crescita, geni).

Compito fondamentale di questi costrutti è il mantenimento della struttura tridimensionale e della morfologia dell'organo o del tessuto da rigenerare [26], [27]: per esempio, *scaffold* tubulari sono utilizzati per ingegnerizzare tessuti come arterie, trachea ed esofago [28]. Inoltre, deve garantire la stabilità della struttura rispetto agli stress meccanici che può fisiologicamente subire [29]. La struttura dipende fortemente dal metodo di fabbricazione usato e dal materiale. Alcuni scaffold sono realizzati come strutture spongiose tramite *solvent casting* [30], altri attraverso *electrospinning* per l'ottenimento di una matrice fibrosa.

b) Proprietà dello scaffold

Tutte le caratteristiche dello *scaffold*, dalla nano alla microscala, possono influenzare la risposta cellulare, in primo luogo fornendo stimoli topografici ma anche attraverso meccanismi di meccano-trasduzione che ne modifichino il citoscheletro [31]. Le proprietà principali che verranno analizzate sono rappresentate in fig.4.

Uno dei parametri principali da ottimizzare è la **composizione chimica**: per ispirarsi alla ECM nativa, lo scaffold deve essere bioattivo, favorendo le interazioni dirette con il tessuto biologico da sostituire. A partire dalla composizione chimica, è possibile modulare numerose caratteristiche dello scaffold, tra cui le modalità di degradazione e le proprietà meccaniche. Inoltre, la composizione influenza l'attività cellulare, a partire dall'adesione cellulare mediata dalle integrine.



Figura 4. Caratterizzazioni principali di uno scaffold per ingegneria tissutale.

Idealmente, lo *scaffold* dovrebbe essere completamente **biodegradabile** in ambiente fisiologico e i prodotti di degradazione devono essere non tossici, per evitare la risposta immunitaria. Infatti, l'interscambio cellula-ECM è mutuale, per cui i segnali provenienti dalla matrice extra-cellulare modificano l'attività cellulare e l'interazione della cellula con l'ambiente circostante promuove la secrezione di sostanze che degradano l'ECM stessa [32]. Il materiale deve degradare con una velocità appropriata a quella di rigenerazione del tessuto. Per esempio, nel caso di cellule con capacità proliferativa rapida, lo *scaffold* deve degradare con velocità elevate; qualora invece i tessuti richiedano stabilità nel tempo, la degradazione può avvenire in tempi più lunghi. La rapidità del processo di degradazione dello *scaffold* dipende dalle proprietà chimiche del biomateriale usato, dai parametri geometrici e morfologici dello *scaffold* e dal sito di impianto. La velocità di degradazione di un materiale può essere rettificata sfruttando opportune modifiche chimiche (relative alla reticolazione del materiale [15]), fisiche (realizzando dei blending polimerici) o variazioni dei processi di fabbricazione.

La **porosità** è un altro parametro strutturale da considerare: le dimensioni, la quantità, l'interconnessione e l'orientazione dei pori sono fattori fondamentali nel determinare la funzione dello *scaffold*. Infatti, le cellule tendono ad aderire nelle zone in cui i pori hanno dimensioni maggiori (fino ad un centinaio di micrometri), perché permettono una migliore

organizzazione spaziale del corpo cellulare; porosità inferiori (decine di micrometri) sono invece necessarie per assicurare un'adeguata vascolarizzazione. Inoltre, la porosità è selettiva perché impedisce a cellule indesiderate di colonizzare la struttura. L'orientazione dei pori può indirizzare la proliferazione cellulare. Inoltre, è opportuno bilanciare la porosità in modo da non intaccare le proprietà meccaniche del materiale [33].

Le **proprietà meccaniche** dello *scaffold* devono essere adatte al tipo di tessuto da rigenerare, in modo da mantenere la biomimesi. Prima che le cellule che occupano lo scaffold sintetizzino l'ECM, il materiale deve essere in grado di resistere all'eventuale frammentazione. Inoltre, lo *scaffold* deve fornire una rigidità tale da evitare il collasso delle porosità in caso di forze compressive. Numerosi studi di *mechanosensing* hanno dimostrato che le proprietà meccaniche modulano il comportamento cellulare, favorendo l'adesione e l'eventuale differenziamento cellulare nel fenotipo desiderato. Hu e altri [34] hanno osservato che *scaffold* dotati di modulo di Young elevato siano ideali per la rigenerazione del tessuto osseo; analogamente, *scaffold* realizzati con rigidità ridotta sono maggiormente utilizzati per la rigenerazione di tessuti *soft* [35].

2. **Materiali per *scaffold***

La scelta del biomateriale per la realizzazione dello *scaffold* è fondamentale per conferirgli le caratteristiche desiderate. In tal senso, i biomateriali più utilizzati sono generalmente materiali polimerici o ceramici. I ceramici sono più rigidi dei materiali polimerici e vengono impiegati soprattutto per la rigenerazione del tessuto osseo.

Attualmente, si preferisce realizzare *scaffold* a base di materiali compositi, ossia combinando dei biomateriali aventi proprietà diverse per sfruttare al meglio le specifiche di ognuno.

a) **Materiali polimerici**

I materiali polimerici sono largamente utilizzati nel *Tissue Engineering*. Infatti, possiedono caratteristiche fisico-chimiche molto varie: uno stesso tipo di polimero può

essere disponibile a diverso peso molecolare e in base a questo cambiano le proprietà del polimero. Le caratteristiche meccaniche del materiale dipendono anche dall'intensità delle forze intermolecolari, dalla flessibilità intrinseca delle molecole intorno ai legami e dalla struttura della catena polimerica. Tali materiali possono essere modificati nella composizione e nella reticolazione, funzionalizzati superficialmente e prevedono una grande varietà di lavorazioni possibili.

In base al comportamento rispetto alla degradazione, distinguiamo vari tipi di polimeri:

- Polimeri biostabili, che non subiscono sostanziali trasformazioni chimiche e/o fisiche nel tempo in ambiente biologico.
- Polimeri bioinerti, stabili dal punto di vista fisico/chimico, che interagiscono poco con i tessuti circostanti.
- Polimeri biodegradabili, che a contatto con i tessuti e i fluidi biologici subiscono dei fenomeni degradativi. I prodotti di degradazione sono frammenti a basso peso molecolare che potrebbero dar luogo a reazioni infiammatorie.
- Polimeri bioerodibili, in cui la biodegradazione enzimatica comincia dalla superficie del materiale.
- Polimeri biorisorbibili, che dopo l'impianto subiscono una degradazione, ma senza effetti tossici o rigetto poiché i prodotti di degradazione vengono rimossi da attività cellulari. I materiali biorisorbibili sono gradualmente rimpiazzati dal tessuto biologico.

I polimeri per il *Tissue Engineering* devono man mano degradare in ambiente biologico in un intervallo di tempo confrontabile con i processi di guarigione del tessuto: si scelgono quindi polimeri biodegradabili o biorisorbibili. Altri requisiti per i polimeri utilizzati risiedono nella processabilità del materiale, anche per le operazioni di sterilizzazione del dispositivo e nel mantenimento della stabilità meccanica del costruito anche durante la degradazione del materiale.

b) Polimeri biodegradabili/bioriassorbibili

Come già detto precedentemente, durante il processo di degradazione vengono prodotti dei frammenti a basso peso molecolare, che sono inglobati dalle cellule. Si manifesta dunque la necessità che i prodotti di degradazione dei polimeri non siano tossici. Inoltre, è innegabile che ad una maggior velocità di degradazione corrisponda il rilascio di una maggiore quantità di prodotti per unità di tempo: anche la velocità di degradazione può influenzare la risposta infiammatoria. Una particolare attenzione è quindi rivolta ai polimeri **bioriassorbibili**.

Tali polimeri offrono numerosi vantaggi rispetto agli altri per applicazioni biomedicali. Essi, infatti, degradandosi con cinetica controllata in ambiente biologico, offrono un supporto temporaneo per la rigenerazione dei tessuti, fornendo una guida fino alla guarigione. Inoltre, se funzionalizzati con biomolecole, fungono da carrier ideali per il loro rilascio controllato, con una cinetica che varia a seconda della velocità di degradazione. Un ulteriore vantaggio è rappresentato dal fatto che tali polimeri non necessitano di essere rimossi, perché vengono completamente degradati dall'organismo.

Nella scelta del polimero per *Tissue Engineering*, tenendo conto del processo di degradazione, si presta attenzione a due parametri. Il primo corrisponde alla durata temporale in cui il polimero mantiene le sue funzioni nelle condizioni di utilizzo post-impianto. Tale proprietà corrisponde al *functional time*. Nei dispositivi biodegradabili, in fase di degradazione il materiale perde massa. Durante questo processo rilascia dei prodotti di degradazione, fino a scomparire completamente in un intervallo di tempo noto come *disappearance time*. Nel tempo che intercorre tra il *functional time* e il *disappearance time*, il materiale perde funzionalità ma continua a rilasciare dei frammenti, che possono o meno causare problemi di biocompatibilità [36].

c) Cinetica di degradazione

Ci sono numerosi fattori che possono influenzare la velocità di degradazione di uno *scaffold* e la modalità di degradazione del *template*:

- Composizione chimica, i gruppi funzionali suscettibili a degradazione presenti in catena e come sono distribuite le unità ripetitive del polimero.
- Peso molecolare, perché più è alto (a parità di chimica), più sono lunghi i tempi di degradazione. Le catene più lunghe del polimero impiegheranno più tempo a dissolversi rispetto a quelle più brevi, per cui l'effetto del peso molecolare è visibile anche dalla polidispersità. Se un polimero è molto polidisperso, avrà differenti tempi di degradazione.
- Morfologia, che comprende il grado di cristallinità del materiale. Infatti, le regioni amorfe sono quelle in cui l'acqua penetra più velocemente favorendo l'idrolisi, invece nelle regioni cristalline del polimero, l'agente fa più fatica a giungere alle zone da degradare. Pertanto, la degradazione comincia sempre dalle zone amorfe poiché le regioni cristalline sono maggiormente resistenti.
- Sito di impianto, per la presenza di enzimi che influenzano la velocità di degradazione.
- Forma e dimensione, al crescere della dimensione aumenta il *disappearance time*. È necessario inoltre considerare il rapporto superficie/volume e il grado di porosità dello *scaffold*.
- Meccanismo di degradazione, se idrolitica o catalizzata da enzimi.

A seconda di questi parametri, varia la cinetica di degradazione. Si distinguono due modalità di degradazione (fig.5) che dipendono principalmente dalla chimica del materiale e dal meccanismo di degradazione.

Nella degradazione omogenea (degradazione della massa o in *bulk*), come visibile in fig.5(A), il materiale mantiene la sua forma originaria ma degrada all'interno diventando sempre più poroso, finché il peso molecolare del polimero non diventa abbastanza basso da determinare la dissoluzione del materiale. Infine, non reggendo più gli sforzi circostanti, la sua struttura collassa.

In fig.5(B) è rappresentata la modalità di degradazione eterogenea (degradazione superficiale): in tal caso il materiale viene degradato a partire dalla superficie. Il processo consiste quindi nella perdita graduale della forma e delle proprietà meccaniche.

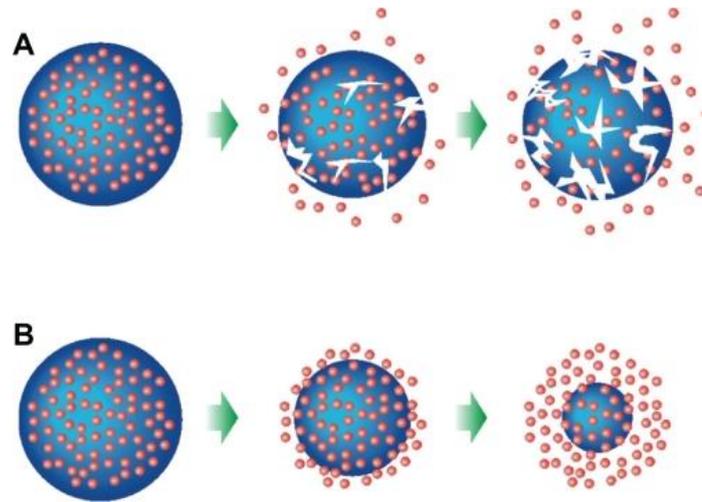


Figura 5. Modalità di degradazione da sistemi biodegradabili per rilascio di farmaci: (A) in massa, (B) in superficie.

La degradazione dei materiali polimerici in ambiente fisiologico avviene principalmente con meccanismo idrolitico in cui dei legami di una catena polimerica reagiscono con delle molecole d'acqua rompendosi e spezzando le catene originarie in segmenti più piccoli. I polimeri interessati da questo tipo di degradazione sono quelli preparati per policondensazione, tra cui quelli che presentano un gruppo carbonile legato ad un atomo di ossigeno, azoto o zolfo. In particolare, a seguito del meccanismo di idrolisi, l'acqua separa la catena a livello del punto in cui è avvenuta la condensazione durante la polimerizzazione. L'idrolisi può prevedere sia una modalità di degradazione in *bulk* che per erosione superficiale. Infatti, la degradazione della massa avviene quando l'acqua è in grado di diffondere nello scaffold e indurre la degradazione dall'interno. In alternativa, la degradazione superficiale interessa polimeri idrofobici per cui l'acqua inizia ad eroderli dall'esterno. Inoltre, il meccanismo idrolitico comporta un'acidificazione per pH causata dai prodotti di degradazione, che catalizza la reazione rendendola auto-accelerata [36] e ha effetti sull'infiammazione del tessuto. L'ambiente fisiologico è un mezzo di reazione estremamente controllato: è isoterma a 37°C, neutro con pH 7.4, asettico e foto-protetto. *In vivo*, complesse interazioni di componenti umorali e cellulari dei fluidi corporei producono risposte molto aggressive nei confronti dei corpi estranei e inducono velocemente il processo idrolitico. È possibile riprodurre *in vitro* il processo di degradazione mantenendo le condizioni sopra descritte e valutando nel tempo le variazioni di pH, peso e di peso molecolare (perché la produzione di frammenti modifica solo

quest'ultimo). Inoltre, in vivo sono presenti alcuni ioni che catalizzano la reazione di degradazione; in particolare, gli ioni PO_4^{3-} sono catalizzatori nelle reazioni di idrolisi, aumentando la velocità di degradazione di diversi ordini di grandezza. I polimeri che tipicamente degradano per idrolisi sono i policarbonati, poliuretani, poliammidi e polianidridi.

Un altro tipo di degradazione di polimeri prevede un meccanismo di ossidazione. Nell'ossidazione diretta, le reazioni infiammatorie attivate dalla presenza di corpo estraneo generano delle molecole reattive che effettuano processi ossidativi nel polimero. L'ossidazione può anche essere causata dalla presenza di ioni metallici derivanti dal processo di corrosione di metalli. Nel processo di degradazione si generano delle fessure con orientamento microscopico casuale indicative di frattura fragile e i prodotti di degradazione interessano anche il core del materiale. Infine, l'ossidazione è generata anche dall'ambiente esterno che trasmette, attraverso il corpo, radiazioni elettromagnetiche che degradano il materiale polimerico.

Tra le classi di enzimi presenti nell'organismo, alcune vengono coinvolte nei meccanismi di degradazione della ECM e sono in grado di facilitare la migrazione delle cellule e rimuovere gruppi funzionali delle molecole segnale. Gli enzimi principalmente coinvolti nella degradazione enzimatica dei polimeri sono le idrolasi, che fungono da catalizzatori nelle reazioni di idrolisi. Infatti, abbassando l'energia di attivazione, il meccanismo degradativo enzimatico è più veloce di quello idrolitico. Poiché gli enzimi non riescono a penetrare nel *core* del polimero degradabile, tale meccanismo prevede solo degradazione superficiale per erosione. Inoltre, è necessario osservare che la degradazione enzimatica è localizzata nel tessuto in cui gli enzimi sono presenti: pertanto, è indispensabile conoscere le caratteristiche del tessuto in cui impiantare lo scaffold e le componenti della ECM nativa. Il processo di degradazione avviene quando il sito attivo dell'enzima interagisce con determinate sequenze del polimero, scindendo la catena in due parti. Questo riconoscimento sito attivo - sequenza peptidica può essere riprodotto *in vitro*, modificando la catena polimerica e inserendovi delle sequenze degradabili da enzimi presenti in determinati tessuti. La degradazione enzimatica è anche visibile microscopicamente poiché è un meccanismo che comincia con l'erosione superficiale.

d) Polimeri naturali

I polimeri adoperati nel *Tissue Engineering* si classificano ulteriormente in polimeri naturali e polimeri sintetici a seconda della loro origine.

I polimeri naturali sono derivati o mimano la composizione della ECM nativa quindi possono essere utilizzati per rendere gli *scaffold* maggiormente biomimetici. I componenti della ECM, infatti, *in vivo* guidano il comportamento cellulare sia per via biochimica, sfruttando il legame che si instaura con le cellule, sia attraverso le loro caratteristiche meccaniche che sono specifiche per ogni tipo di tessuto. Inoltre, le proteine transmembranalie delle cellule aderiscono a specifiche sequenze peptidiche delle proteine di adesione dell'ECM. Progettando uno *scaffold* a base di polimeri naturali bioattivi che riproponga tali caratteristiche, è possibile guidare il comportamento cellulare, favorendone l'adesione, la proliferazione e la migrazione.

Tra i polimeri naturali si distinguono i polisaccaridi e le proteine.

I polisaccaridi sono idrofilici, assorbono molta acqua e mantengono quindi un ambiente idratato. Gli *scaffold* realizzati con questi polimeri sono altamente porosi, il che facilita la diffusione delle molecole al loro interno. Per la rigenerazione tissutale sono utilizzati sia polisaccaridi della matrice extra-cellulare, come condroitin solfato, acido ialuronico ed eparina, che polisaccaridi non appartenenti alla ECM come chitina e chitosano, amido e destrano. Si noti che i polisaccaridi che garantiscono l'adesione cellulare sono soltanto quelli appartenenti all'ECM.

Le proteine posseggono caratteristiche bioattive indipendentemente dalla loro presenza nella matrice extra-cellulare. Si distinguono in proteine dell'ECM, tra cui collagene, fibronectina, elastina, fibrina e proteine non appartenenti alla matrice extra-cellulare come cheratina e proteine della seta.

I polimeri naturali presentano però numerosi svantaggi, relativi soprattutto all'impossibilità di controllarne in modo specifico le proprietà. Infatti, a causa dell'idrofilicità e dell'elevata porosità presentano caratteristiche meccaniche deboli. Inoltre, sono degradabili per idrolisi ed enzimaticamente, ma la cinetica di degradazione non è facilmente controllabile o predicibile. Entrambi questi aspetti possono essere ovviati

introducendo una reticolazione, che permetterebbe di aumentare le proprietà meccaniche del materiale e i tempi di degradazione [28].

Un ulteriore svantaggio è rappresentato dalle modalità di estrazione di questi polimeri. Infatti, essendo prelevati da animali, sono disponibili in quantità limitata, sono scarsamente riproducibili e necessitano di processi di purificazione e sterilizzazione per eliminare eventuali agenti patogeni trasmissibili [33]. Ai problemi di immunogenicità si associano le difficoltà nella fabbricazione dovute alla loro ridotta processabilità in condizioni aggressive [37].

e) Polimeri sintetici

I polimeri sintetici sono estremamente utilizzati per la fabbricazione di *scaffold*, in virtù della loro flessibilità nella composizione e nei processi di sintesi per rispondere alle esigenze applicative. Infatti, gli *scaffold* ottenuti a partire da polimeri sintetici sono facilmente sintetizzabili su larga scala con metodi convenzionali perché, anche trattandoli in condizioni aggressive, i polimeri mantengono inalterate le loro proprietà. Gli *scaffold* realizzati presentano proprietà meccaniche e di degradazione molto variabili, a seconda del tipo di polimero utilizzato. Inoltre, controllando le proprietà del materiale in fase di sintesi, è possibile ottenere materiali più resistenti dal punto di vista della degradabilità, per cui viene garantita una maggiore stabilità nel tempo del costruito rispetto ai polimeri naturali.

I polimeri sintetici maggiormente adoperati nell'ingegneria dei tessuti sono poliesteri, poliuretani e polieteri.

In particolare, tra i poliesteri i più impiegati sono l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA) e il policaprolattone (PCL). Questi materiali sono suscettibili a degradazione idrolitica o enzimatica, la cui cinetica dipende dal grado di cristallinità e dall'idrofilicità del materiale. Inoltre, PLA e PGA generano prodotti di degradazione acidi, che potrebbero indurre una risposta infiammatoria. Altri poliesteri meno comuni nella realizzazione di *scaffold* (presentano elevati costi di produzione) sono i poliidrossialcanoati (PHA) che degradano per erosione superficiale.

I poliuretani possono mostrare proprietà molto diverse in funzione della loro struttura e degradano per idrolisi o per intervento di alcuni enzimi.

Infine, in ambito biomedicale sono spesso impiegati i polieteri, tra cui polietilenglicole (PEG) e polietilenossido (PEO). Per la loro elevata idrofilicità sono spesso utilizzati per realizzare idrogel a rilascio di farmaco [38]. Sono altamente idrofilici e solubili in acqua e degradano per ossidazione. Il PEG è largamente adoperato come polimero per rivestimenti *anti-fouling* e per trasportare farmaci e molecole bioattive. Infatti, il forte adsorbimento di acqua sul polimero limita l'adesione proteica e il riconoscimento da parte del sistema immunitario.

Lo svantaggio principale è rappresentato dal fatto che i polimeri sintetici abbiano una struttura diversa da quella dell'ECM, per cui non sono intrinsecamente bioattivi. Infatti, a causa della mancanza di gruppi funzionali che interagiscano con le cellule, supportano in modo limitato l'adesione cellulare e la proliferazione. In più, soltanto una minima parte dei polimeri sintetici è stata approvata dall'FDA per l'utilizzo in ambito biomedicale.

Per rendere tali polimeri bioattivi e per coniugare al meglio le proprietà dei materiali naturali e di sintesi è possibile ricorrere a due metodi per modificare il materiale.

Nella **funzionalizzazione in *bulk***, il materiale bioartificiale ottenuto è un materiale misto costituito da entrambe le componenti.

È possibile funzionalizzare il biomateriale secondo l'approccio chimico, che prevede l'introduzione di specifiche sequenze peptidiche nelle catene polimeriche che favoriscano l'adesione cellulare e la degradazione enzimatica del materiale. In alternativa, i due materiali vengono fisicamente miscelati allo stato liquido, tramite fusione oppure utilizzando un solvente comune. In entrambi i casi è necessario assicurarsi che il polimero naturale non subisca alterazioni e che mantenga la bioattività. Il terzo metodo di funzionalizzazione in *bulk* prevede la preparazione e la successiva sintesi di idrogel bioattivi contenenti proteine e peptidi di adesione.

La **funzionalizzazione superficiale** prevede la modifica superficiale del materiale sintetico che costituisce la struttura dello scaffold. Può essere ottenuta sfruttando diverse strategie, tra cui la formazione di *grafting* covalenti (per idrolisi, amminolisi, trattamento al plasma

o con DOPA) oppure non covalenti, sfruttando il legame streptavidina (avidina)-biotina, *coating* di eparina o tecniche *layer-by-layer*.

f) Nanoparticelle con proprietà antiossidanti

Negli ultimi anni, è stato sviluppato un interesse crescente nei confronti dei nanomateriali e del loro utilizzo in applicazioni biomedicali, tra cui sistemi a rilascio di farmaco, diagnostica, terapia e biosensori.

I nanomateriali possono essere utilizzati nell'ingegneria tissutale in due modi diversi.

Possono fungere da *carrier*, inglobando agenti bioattivi e modulando il loro rilascio, oppure agendo in maniera diretta con i tessuti sfruttando proprietà intrinseche come piezoelettricità, effetti antibatterici e antiossidanti. Il loro comportamento può essere controllato sfruttando stimoli interni o esterni, tra cui pH, temperatura, ultrasuoni, campi magnetici e luce [39]. Questi nanomateriali, noti come *smart materials*, permettono una azione più mirata verso i tessuti desiderati e in seguito allo stimolo effettuano una trasduzione di energia interagendo con le cellule.

Gli svantaggi principali legati al loro utilizzo sono relativi alle loro proprietà intrinseche: a causa dell'elevata area superficiale sono soggetti ad agglomerazione e sedimentazione. Inoltre, l'influenza delle loro caratteristiche sulla citotossicità è ancora oggetto di studio [40].

Recentemente, numerosi studi hanno testato diversi tipi di nanoparticelle con attività antiossidante intrinseca come neutralizzatori di radicali liberi e antiossidanti.

Tra queste, le nanoparticelle d'argento (AgNP) sono le più adoperate, per la loro significativa azione antibatterica e per la possibilità di sintesi su larga scala [41], [42], [43]. Altri nanomateriali adoperati sono l'ossido di zinco [44], oro [45] e il diossido di manganese [46].

In questo lavoro di tesi ci si soffermerà sull'utilizzo di nanoparticelle di ossido di cerio CeO₂, un nanomateriale biomimetico noto anche come nanoceria. È un materiale attivo che possiede proprietà *smart* e reagisce alle condizioni ambientali, in particolare a variazioni

di pH. Infatti, a pH acidi, tipici dei tessuti cancerosi, la nanoceria è citotossica, promuovendo la formazione di ROS. Per pH più elevati, le nanoparticelle invertono il loro comportamento, agendo da antiossidanti. Negli ultimi anni l'interesse della comunità scientifica nei confronti della nanoceria è enormemente cresciuto, soprattutto per le sue proprietà anti-infiammatorie e antiossidanti; le sue potenzialità e le modalità di utilizzo in ambito biomedicale sono ancora in fase di ricerca.

Il cerio è un metallo tradizionalmente considerato un elemento delle terre rare. Presenta l'orbitale 4f della configurazione elettronica molto vicino agli orbitali più esterni, per cui lo stato di ossidazione può facilmente cambiare, passando da $+3$ a $+4$. Nello stato di ossidazione $+3$, prende il nome di ceroso, nello stato $+4$ è denominato cerico.

i. SINTESI

In letteratura sono riportati numerosi metodi di sintesi della nanoceria. Le tecniche sviluppate comprendono la tecnica idrotermale/solvotermale, la precipitazione acquosa, le micelle invertite e la decomposizione termale. Per nanoparticelle da utilizzare in applicazioni biologiche si preferisce sfruttare la sintesi in fase acquosa, che permette la realizzazione di materiale biocompatibile avente dimensioni anche molto ridotte (3-5 nm). La scelta del metodo di sintesi è estremamente importante perché determina numerose proprietà fisico-chimiche della nanoceria, tra cui dimensioni, grado di agglomerazione nei liquidi, area superficiale, distribuzione di carica superficiale e stato di valenza [47]. Tali proprietà influenzano le interazioni delle nanoparticelle con l'interfaccia biologica. In varie applicazioni biologiche si è ritenuto opportuno rivestire la nanoceria con polimeri biocompatibili, come il PEG [48].

ii. STRUTTURA CHIMICA

La nanoceria è un materiale ceramico e alla nanoscala presenta dei difetti in superficie che le conferiscono proprietà catalitiche interessanti. Infatti, come è possibile osservare in fig.6, il cristallo di ossido di cerio possiede una struttura cristallina cubica tipo fluorite. Ogni catione Ce^{4+} è circondato da otto anioni O^{2-} e ogni atomo di ossigeno occupa una posizione tetraedrica (fig.6(a)). Nello stato di ossidazione $+3$, la nanoceria mantiene la sua struttura, compensando la carica assente attraverso la fuoriuscita di uno ione ossigeno dallo spazio tetraedrico e riducendo uno ione cerio in Ce^{3+} (fig.6(b)). La presenza di questa

lacuna funge da catalizzatore delle reazioni di ossidoriduzione [48]. Alla nanoscala, le proprietà catalitiche aumentano perché aumenta il rapporto superficie volume. Inoltre, la concentrazione di lacune aumenta al ridursi della dimensione delle nanoparticelle [49].

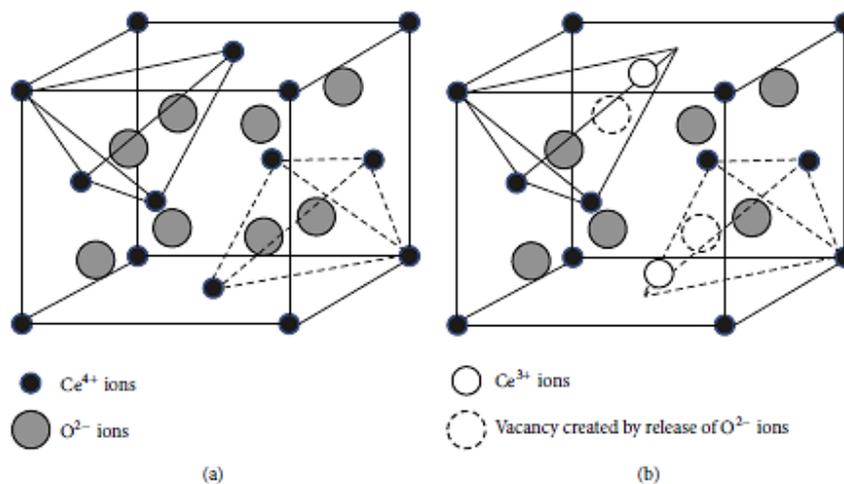


Figura 6. Struttura dei cristalli di ossido di cerio, (a) intatta, con stato di ossidazione +4, (b) distorta per le lacune degli atomi di ossigeno, con stato di ossidazione +3 [48].

Ulteriore caratteristica della nanoceria è la capacità autorigenerante: infatti, a causa del basso potenziale necessario alla riduzione, gli ioni cerio possono facilmente passare da uno stato di ossidazione all'altro, assorbendo e rilasciando ossigeno. In fig.7, si può osservare come contemporaneamente alla formazione delle lacune di ossigeno, lo ione Ce³⁺ si ossida e quello Ce⁴⁺ si riduca. Dunque, le nanoparticelle di ceria possono svolgere un doppio ruolo, come catalizzatori di reazioni di riduzione e di reazioni di ossidazione. Il processo avviene con un'efficienza elevatissima [47].

Dalla struttura chimica superficiale, in particolare dal rapporto Ce³⁺/Ce⁴⁺, dipendono anche le proprietà biocatalitiche e le interazioni con l'ambiente biologico. Inoltre, le nanoparticelle aventi dimensioni molto piccole (con diametro minore di 5 nm) riescono a stabilizzare una quantità maggiore di ioni Ce³⁺ sulla superficie. Pertanto, come già descritto precedentemente, il metodo di sintesi della nanoceria svolge un ruolo fondamentale nel determinarne le proprietà [50].

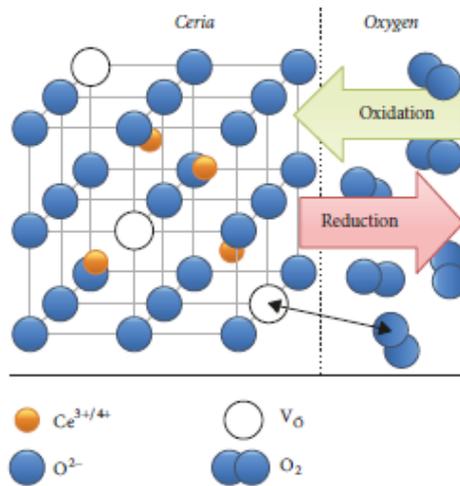


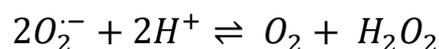
Figura 7. Formazione delle lacune di ossigeno e relative reazioni di ossido-riduzione dei cationi cerio [47].

iii. ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

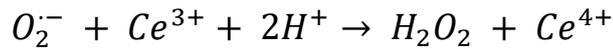
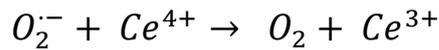
La quantità di ROS prodotta in ambiente fisiologico viene controllata naturalmente da numerosi agenti antiossidanti, sia di tipo enzimatico che di tipo non enzimatico, in grado di intervenire su una sola specie reattiva dell'ossigeno. La superossido dismutasi (SOD), la glutanione perossidasi (GSH-Px) e la catalasi (CAT) fungono da antiossidanti enzimatici; altri agenti come la vitamina E, la vitamina C e il β -carotene sono antiossidanti non enzimatici.

La nanoceria si comporta come un materiale biomimetico perché, in virtù delle sue proprietà catalitiche, riesce a svolgere le funzioni di due enzimi fondamentali: la catalasi e la superossido dismutasi, che sono alla base della regolazione dello stato redox intracellulare. Inoltre, l'azione catalitica degli enzimi avviene in maniera continua: allo stesso modo la NC presenta proprietà autorigeneranti.

La SOD appartiene alla classe degli enzimi ossidoreduttasi. Infatti, catalizza la reazione di dismutazione dello ione perossido in O_2 e H_2O_2 . La reazione, che avviene in due stadi, è semplificata in basso:

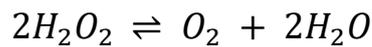


Korvisk et al. [51] hanno osservato l'azione biomimetica della nanoceria nei confronti della SOD.

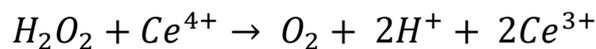


Dalle reazioni in alto è visibile il potere di *self-renewal* della nanoceria e come questa contribuisca a ridurre lo stress ossidativo, variando lo stato di valenza del cerio. Evidenze sperimentali hanno dimostrato chiaramente che nanoparticelle di ceria con rapporto Ce^{3+}/Ce^{4+} più elevato catalizzino maggiormente le attività SOD-mimetiche, anche se il meccanismo molecolare è perlopiù ancora sconosciuto [51].

La catalasi è un enzima protettivo coinvolto nella degradazione del perossido di idrogeno H_2O_2 , che danneggia i lipidi ed è prodotto dall'azione catalitica della SOD. Il completo meccanismo catalitico della CAT non è ancora del tutto noto, ma si ritiene che la reazione avvenga in due fasi; semplificandola, si può osservare la generazione di acqua e ossigeno da una specie reattiva dell'ossigeno:



Analizzando le interazioni NC – ioni fosfato, Singh et al. [52] hanno dimostrato l'attività CAT-mimetica della nanoceria:



Si è inoltre osservato che al ridursi del rapporto Ce^{3+}/Ce^{4+} , l'attività della nanoceria è maggiormente catalasi-mimetica.

Combinando le reazioni che coinvolgono il superossido e il perossido di idrogeno, è intuibile la funzione antiossidante della NC nei confronti dei ROS biologici e soprattutto la capacità di ripristino della sua attività al termine del ciclo di annichilimento delle specie reattive. Un meccanismo che unisca le attività SOD-mimetica e CAT-mimetica è stato proposto da Celardo et al. [53]. In particolare, in fig.8 è rappresentato il meccanismo di ossidazione del perossido di idrogeno e la conseguente riduzione del superossido per meccanismo rigenerativo. Analizzando le reazioni nello specifico, in (1) si nota come sia presente una lacuna superficiale dovuta all'ossigeno: ciò comporta la presenza di due ioni Ce^{4+} che si legano al perossido di idrogeno (2). Successivamente, vengono rilasciati due

protoni e i due elettroni rimasti sono trasferiti a due ioni cerio (3). Nello step (4), una molecola di ossigeno viene nuovamente liberata, lasciando una lacuna. Il perossido riesce a legarsi agli ioni Ce^{3+} adiacenti alla lacuna (5); successivamente, un elettrone viene trasferito ai Ce^{3+} presenti e sono prelevati due protoni dalla soluzione di immersione, fino a formare nuovamente H_2O_2 . Il perossido di idrogeno viene allontanato e l'operazione si ripete con un ROS differente (7). Infine, reagendo con un altro perossido di idrogeno, la superficie della nanoceria ritorna allo stato chimico iniziale con $2Ce^{4+}$ (1).

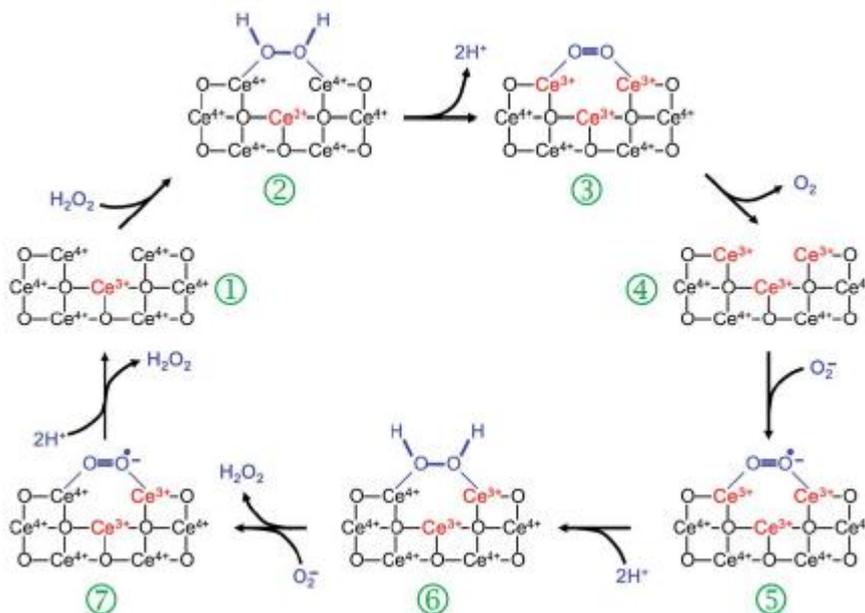
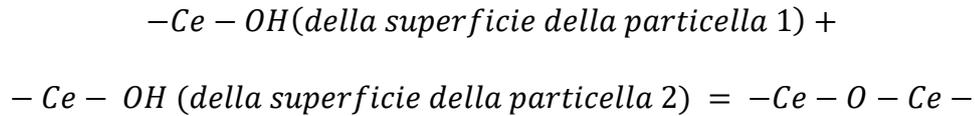


Figura 8. Meccanismo di azione della nanoceria per ossidazione del perossido di idrogeno e riduzione del superossido [53].

L'analisi dell'attività antiossidante della nanoceria in ambiente biologico è di difficile prevedibilità. Infatti, oltre alle differenze tra l'azione *in vitro* e *in vivo*, altri fattori possono influenzare la capacità catalitica delle nanoparticelle, tra cui la presenza di altri antiossidanti o di anioni, per esempio anioni fosfato [54]. Inoltre, numerosi studi hanno evidenziato una riduzione dell'azione della NC a causa dell'agglomerazione della formazione di aggregati di nanoparticelle in sospensione.

Nabavi et al. [55] hanno spiegato il meccanismo di aggregazione della nanoceria in soluzione per azione del pH. A bassi pH, la nanoceria tende a formare legami covalenti superficiali forti con i nitrati; per pH compresi tra 7 e 10, si formano flocculazioni di particelle, che si agglomerano per effetto del rilascio dei nitrati a pH 7. A ciò si aggiunge

il fatto che per pH maggiori del punto isoelettrico si abbia un ulteriore effetto flocculante. Il meccanismo proposto è il seguente:



Di conseguenza, il meccanismo catalitico delle nanoparticelle può subire delle variazioni, a causa dei ponti -Ce-O-Ce che si formano.

Ulteriori studi hanno provato l'interazione delle CeNP (nanoparticelle di ceria) con gli anioni fosfato. Singh et al. [52] hanno incubato delle particelle di ceria in soluzione salina. Analizzando tale dispersione nanoparticellare tramite spettroscopia UV- visibile, si nota come lo spettro presenti il picco di assorbimento a 275 nm, relativo al fosfato di cerio CeO₄P, a differenza dello spettro di assorbimento ottenuto a partire da una dispersione di CeNP in soluzione acquosa; quest'ultimo infatti presenta un picco di assorbimento a 250 nm, caratteristico della presenza di Ce³⁺ a 250 nm. È stato inoltre testato il potere antiossidante di questa soluzione misurando l'attività SOD-mimetica: si assiste alla completa perdita del potere SOD-mimetico della nanoceria. In particolare, per concentrazioni di anioni fosfato superiori a 100 μM, l'attività SOD-mimetica viene completamente inibita. D'altro canto, i test per valutare il potere CAT-mimetico hanno mostrato un aumento della degradazione di H₂O₂ al crescere della concentrazione di anioni fosfato. Ulteriori analisi in fotoluminescenza suggeriscono la predominanza di ioni Ce³⁺ e la presenza di fosfato di cerio: le interazioni superficiali sono responsabili dell'inibizione dell'attività SOD-mimetica e del contemporaneo incremento dell'azione CAT-mimetica.

iv. APPLICAZIONI BIOMEDICALI

Le nanoparticelle di ossido di cerio sono potentissimi antiossidanti, sono prodotte artificialmente e sono biomimetiche con efficienza altissima, per cui teoricamente basterebbe una sola somministrazione per eliminare i ROS in eccesso. Negli ultimi dieci anni sono state quindi proposte per tutte quelle patologie che hanno come concausa lo stress ossidativo. Sono state adoperate per terapie antitumorali, per contrastare l'avanzamento di

malattie neurodegenerative, ridurre l'effetto dell'invecchiamento su cellule neurali, modulare il differenziamento nel fenotipo adipocitico e per il trattamento dell'obesità [56].

Per quanto riguarda le applicazioni antitumorali, si è osservato che la nanoceria per pH maggiori di 7 sprigiona il suo potere antiossidante, ma per pH acidi inverte la sua azione e si comporta come pro-ossidante, producendo radicali liberi e diventando citotossica. Questa capacità può essere sfruttata nella promozione di una terapia antitumorale, perché a causa dell'elevata attività metabolica, l'ambiente tumorale è più acido rispetto ai tessuti circostanti [57]. Pesic et al. [58] hanno dimostrato che in alcune linee cellulari la nanoceria è in grado di modificare lo stato redox intracellulare. Infatti, analizzando l'azione di nanoparticelle di ceria (aventi diametro inferiore a 4 nm) su cellule del melanoma 518A2 e cellule dell'adenocarcinoma HT-29, le CeNP mostrano un'intensa attività pro-ossidante, promuovendo la produzione di anioni di perossido di idrogeno. Le cellule trattate mostrano variazioni nelle condizioni redox intracellulari, fino alla morte delle stesse a causa di uno stress ossidativo troppo elevato. In parallelo, lo stesso esperimento è stato condotto su altre linee cellulari tumorali e su cellule sane e ha mostrato un effetto antiossidante, positivo per le cellule. La proficua attività antitumorale della nanoceria è stata testata anche in altri studi, utilizzando cellule di adenocarcinoma dei polmoni [59], neuroblastoma [60] ed epatoma [61].

Inoltre, la nanoceria è stata utilizzata da Das e colleghi [62] come *carrier* di doxorubicina per aumentare l'efficacia delle terapie nel trattamento del cancro ovarico *in vitro*. Rispetto alla sola doxorubicina, le nanoparticelle caricate con il farmaco (CeO₂/DOX) sono più facilmente internalizzate dalle cellule e permettono un rilascio del farmaco più sostenuto nel tempo. Inoltre, la quantità di doxorubicina rilasciata è maggiore in ambiente acido (pH 5) rispetto a quella rilasciata in PBS a pH 7; con la NC si effettua quindi un *targeting* attivo verso i tessuti malati, limitando gli effetti citotossici.

Numerosi studi hanno mostrato l'effetto di un trattamento con nanoparticelle di ossido di cerio nei tessuti di ratti geneticamente modificati in cui è stato indotto il morbo di Parkinson.

Hegazy et al. [63] hanno condotto uno studio su una popolazione di 50 ratti, in cui su 40 di questi viene indotto il Parkinson attraverso la tossina 6-idrossidopamina, mentre i restanti 10 vengono trattati con una soluzione salina. Dopo tre settimane, si è testata la

disfunzionalità motoria dovuta ai trattamenti subiti ed è stata iniettata quotidianamente della NC nei topi malati per tre settimane. In seguito, si sono nuovamente testate le abilità motorie dei ratti e infine si sono sacrificati gli stessi per valutare i livelli di dopamina nello striato. Dai risultati, è emerso che un quantitativo elevato di NC può alleviare lo stress ossidativo, ridurre l'apoptosi dei neuroni dopaminergici con conseguente aumento dei livelli di dopamina nello striato e delle prestazioni neurocomportamentali.

Il ruolo anti-invecchiamento della NC in cellule simil-neuronali è stato analizzato da Ciofani e colleghi [64], [65], osservando gli effetti del trattamento antiossidante nelle cellule PC12. Le nanoparticelle usate presentano diametri intorno ai 10-20 nm, riescono ad essere internalizzate e influenzano le attività metaboliche della cellula. Per concentrazioni crescenti di NC somministrate, si ha un aumento del differenziamento neuronale, con incremento della lunghezza dei neuriti in coltura. Questo è ulteriormente dimostrato dalla sovraespressione di β -tubulina, indice del differenziamento nel fenotipo neuronale. Il risultato più eclatante riguarda però la completa alterazione di tutte le difese antiossidanti della cellula, in seguito all'introduzione di antiossidanti esterni. Successivamente si è misurata la quantità di dopamina secreta dalle colture neuronali in condizioni di controllo e in presenza di nanocereria. L'aumento della sua produzione è praticamente esponenziale ed è dovuto all'attivazione, da parte delle nanoparticelle, di geni regolatori del metabolismo della dopamina e di geni deputati alla codifica delle proteine trasportatrici di dopamina.

Le nanoparticelle di ossido di cerio sono state adoperate anche nel *Tissue Engineering*, realizzando dei substrati a base di acido poli-L-lattico (PLLA) funzionalizzati con *layer* di NC [66]. Cellule mesenchimali umane (MSC) e cellule simil-ossee sono state poste in coltura su tali scaffold ed in particolare in corrispondenza di regioni in cui la presenza di Ce^{4+} fosse predominante rispetto a quella di Ce^{3+} , con l'obiettivo di isolare il comportamento cellulare in relazione allo stato di valenza delle nanoparticelle. I risultati hanno provato un aumento della proliferazione delle MSC e un'inibizione dell'apoptosi; inoltre, è stato dimostrato che la NC permette l'attivazione dei canali Ca^{2+} delle cellule, promuovendo dei pathway che conducono all'espressione di VEGF, fattore di crescita angiogenico.

v. TOSSICITÀ

A causa del potenziale di cui dispongono, sono stati intensamente studiati gli effetti tossicologici delle nanoparticelle di ossido di cerio, ma la questione non è stata ancora del tutto chiarita.

In particolare, il gruppo di ricerca di Perez [67] ha effettuato degli studi sulla citotossicità della NC con *coating* polimerico e con differente carica superficiale, su cellule tumorali e sane. Si è osservato che la nanoceria viene internalizzata a livello subcellulare nel citoplasma e nei lisosomi a seconda della carica netta superficiale. Nel caso di localizzazione nel citoplasma, la tossicità è minima ma aumenta notevolmente se le nanoparticelle sono localizzate nei lisosomi delle cellule malate. Il potenziale terapeutico della nanoceria è stato valutato anche per il trattamento di traumi, perché penetra nel tessuto e riduce lo stress ossidativo, favorendo la rigenerazione della zona e coordinando la risposta cellulare di fibroblasti, cheratinociti e cellule vascolari endoteliali [68].

Ulteriori studi in vitro hanno però mostrato che l'esposizione a nanoceria può provocare modifiche trascrizionali alle cellule del tessuto polmonare. Inoltre, un'elevata dose di nanoparticelle può comportare danni al DNA ai leucociti del sangue e alle cellule epatiche. A ciò, si aggiunge la possibilità di neurotossicità, anche se gli effetti a lungo termine non sono ancora stati testati [56].

C. Scaffold per la rigenerazione del tessuto nervoso

La medicina rigenerativa si propone di promuovere la rigenerazione di tessuti: l'utilizzo di sole cellule staminali e fattori di crescita ha comportato risultati promettenti, ma in caso di danno esteso è necessario un supporto che influenzi l'attività cellulare promuovendo così la formazione di nuovo tessuto [5]. Come menzionato precedentemente, le caratteristiche dello *scaffold* influenzano le cellule che vi vengono coltivate secondo un processo di *give and take*. Le diverse tecniche di fabbricazione permettono di realizzare costrutti con proprietà molto diverse tra loro, che vengono usate in numerose applicazioni di medicina rigenerativa, combinandole o meno con cellule. Ad esempio, coltivando cellule

staminali a seconda degli stimoli offerti dallo *scaffold*, queste possono differenziare in fenotipi diversi. Membrane nanofibrose altamente porose a base di PLLA sono utilizzate per favorire il differenziamento di cellule staminali mesenchimali derivanti dal midollo osseo verso uno sviluppo osteogenico e condrogenico. In tal caso, ciò che permette il differenziamento nel fenotipo desiderato è l'interconnessione dei pori realizzata ad hoc [34].

Nel presente lavoro di tesi sono stati realizzati scaffold biomimetici in grado di favorire l'adesione e la proliferazione di cellule NIH/3T3 e SH-SY5Y, rispettivamente cellule della linea fibroblasti e della linea di neuroblastoma umano.

1. Requisiti

Conseguentemente all'impianto di uno *scaffold*, viene osservata un'elevata proliferazione di macrofagi. Questi presentano il cosiddetto spettro di polarizzazione, ossia variano la propria morfologia e la loro attività a seconda dello stadio del danno. Alla fase pro-infiammatoria, in cui i macrofagi posseggono forma tonda (stadio M1) segue la fase anti-infiammatoria, in cui i macrofagi M2 si presentano in forma più allungata. Nello stadio M1, i macrofagi producono ROS che aumentano l'infiammazione: qualora lo stadio M1 perduri a lungo, l'infiammazione diviene cronica. Negli stadi M2a e M2b si instaura la risposta anti-infiammatoria, producendo citochine. La fase finale, M2c, è la fase del *tissue remodeling*, in cui l'infiammazione viene soppressa, inibendo la formazione del tessuto fibroso attorno al biomateriale. È stato osservato che lo stadio di polarizzazione dei macrofagi dipende dal microambiente:

- stimoli fisici, come proprietà meccaniche dello scaffold, topografia alla micro e nano scala, porosità e geometria 3D;
- stimoli chimici, quali chimica superficiale e le variazioni di quest'ultima in seguito all'impianto, per esempio per adsorbimento di proteine;
- velocità di degradazione;
- segnali biochimici, come le citochine IL-4 e IL-10.

Dunque, si possono usare gli stimoli dello scaffold per indirizzare i macrofagi verso un differente stato di polarizzazione e di conseguenza indurre una specifica risposta, per esempio di tipo rigenerativo [69].

Malattie caratterizzate da attivazione cronica dei macrofagi, come l'arteriosclerosi e il cancro, sono associate ad alterazioni del microambiente, in particolare dell'ECM [70].

Soprattutto per il tessuto neurale, il loro ruolo è ancora più determinante, per il potere rigenerativo molto scarso del tessuto in esame. Nello specifico, è fondamentale che tali supporti riescano ad attivare la reazione delle cellule della microglia, che si occupano della difesa immunitaria attiva nel SNC. Queste cellule secernono citochine e altre molecole segnale per promuovere meccanismi pro-infiammatori e di mantenimento dell'omeostasi. Non posseggono recettori della citochina IFN- γ , che permette la polarizzazione dei macrofagi nello stadio M1: infatti, non posseggono lo spettro di polarizzazione classico dei macrofagi, con gli stadi M1 e M2 [71]. Il loro comportamento e i meccanismi con cui agiscono non sono stati ancora del tutto chiariti, per cui si ritiene di poter indurre anche nel tessuto neurale una lieve rigenerazione sfruttando le proprietà dello scaffold.

I primi requisiti di uno scaffold di questo tipo, descritti in fig.9, sono generici, relativi alle caratterizzazioni generali già descritte in precedenza.

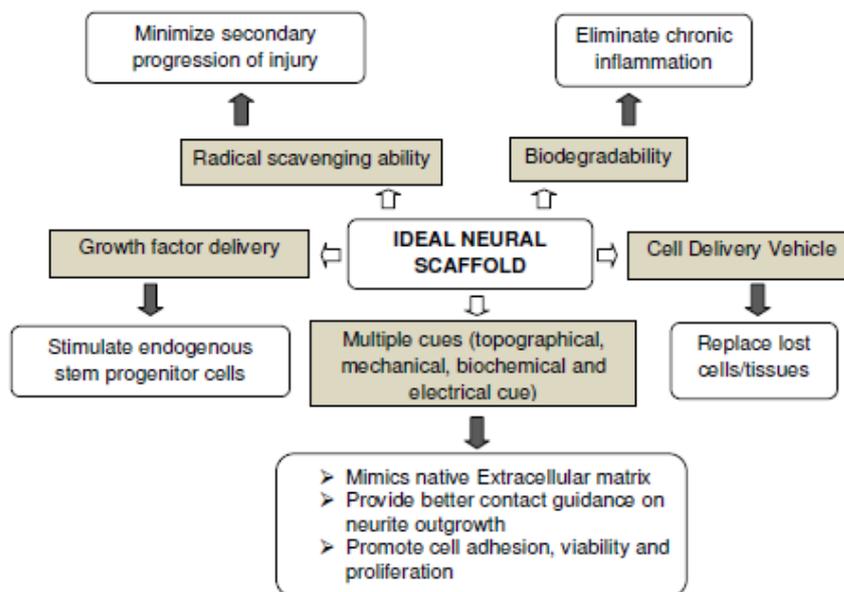


Figura 9. Caratterizzazioni dello scaffold ideale per la rigenerazione del tessuto nervoso [72].

Una prima caratteristica degli *scaffold* per cellule simil-neuronali è ovviamente la biocompatibilità. È necessario infatti, che lo scaffold si integri perfettamente nel tessuto danneggiato, inducendo una specifica risposta cellulare senza produrre effetti avversi.

Ulteriore proprietà è la biodegradabilità, perché il materiale deve degradare con una velocità controllata, che dipende dalla velocità di rigenerazione del tessuto in esame. I prodotti di degradazione devono essere non tossici in modo da limitare l'infiammazione, altrimenti lo stress ossidativo elevato potrebbe comportare danni cellulari. In particolare, è preferibile un meccanismo di erosione superficiale piuttosto che una degradazione in *bulk*, perché permette allo *scaffold* di mantenere una maggiore stabilità strutturale post-impianto. Inoltre, substrati con questo tipo di degradazione determinano un migliore contatto con le cellule fornendo una guida alla rigenerazione [73].

Il grado di porosità deve essere elevato, in modo da favorire la vascolarizzazione dello *scaffold* e l'apporto di sostanze nutritive alle cellule che lo colonizzano. Inoltre, la presenza di pori di dimensioni elevate, promuove la migrazione cellulare.

Una caratteristica di substrati specifici per il tessuto nervoso è relativa alle proprietà meccaniche. Infatti, è stato osservato che questo tipo di tessuto è *soft*, presentando bassa rigidità, intorno ai 500 Pa [74]. In caso di tessuto *soft*, le cellule generano adesioni focali meno clusterizzate e assumono morfologia tondeggianti. Nello specifico, cellule staminali in grado di differenziare nel fenotipo neurale, poste su substrati morbidi differenziano in cellule gliali; nel caso di substrato più rigido differenziano invece in cellule neuronali, con una *clusterizzazione* delle adesioni focali più pronunciata. In generale, i substrati utilizzati prevedono un modulo di Young tra 100 e 500 Pa [74]. Spesso si utilizzano idrogel proprio perché, essendo altamente idratati, posseggono una rigidità non troppo elevata.

Inoltre, lo *scaffold* ideale dovrebbe fornire stimoli topografici, biochimici ed elettrici. Infatti, deve essere biomimetico rispetto all'ECM del tessuto nativo; deve permettere la crescita dei neuriti, tramite un design apposito; deve promuovere adesione, vitalità e proliferazione cellulare. L'adesione cellulare dipende dalle caratteristiche superficiali del substrato, tra cui la bagnabilità. È possibile modificare la superficie utilizzando dei *coating* di proteine come laminina oppure incorporando nel costrutto delle specifiche sequenze peptidiche di adesione come IKVAV (Isoleucina – Lisina – Valina – Alanina - Valina).

2. Materiali

I materiali che vengono maggiormente adoperati, sia *in vivo* che *in vitro*, sono i polimeri, per la vasta scelta di proprietà di cui dispongono. Gli scaffold sono spesso realizzati con dei fattori di crescita incorporati, soprattutto NGF (Fattore di crescita nervoso) e BDNF (Fattore neurotrofico cerebrale) [75].

Dovendo realizzare scaffold dotati di modulo di Young basso, si preferisce sfruttare polimeri naturali, tra cui chitosano, chitina, collagene, gelatina e alginato, dotati intrinsecamente di bassa rigidità.

Gli idrogel sono spesso adoperati per fornire supporto meccanico alle cellule neurali, perché sono soffici, possono essere reticolati *in situ* incorporando biomolecole e generano un ambiente 3D, ideale per le cellule. Infatti, si è osservato che questi substrati promuovono il differenziamento nei tessuti neurali. Il meccanismo con cui ciò avviene non è ancora stato del tutto chiarito, ma probabilmente riguarda fenomeni di *mechanosensing* cellulari [76]. Zuidema e colleghi hanno mostrato che idrogel a base di destrano e chitosano, soft e dotati di carica positiva, favoriscono l'adesione cellulare [77]. Anche l'acido ialuronico offre supporto meccanico e promuove l'attività cellulare [78].

Sono stati condotti numerosi studi anche su polimeri sintetici biodegradabili impiegati per la rigenerazione del tessuto neurale, tra cui acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA), poli (ϵ -caprolattone) (PCL) e PLLA. Questi polimeri sono idrofobici, quindi vengono spesso funzionalizzati con sequenze peptidiche specifiche per favorire l'adesione cellulare. Alcuni di questi sono stati utilizzati anche per esperimenti *in vivo*: per esempio un idrogel a base di PHPMA è stato impiantato in ratti con lesioni al midollo spinale. Lo *scaffold* siffatto si integra correttamente nell'organismo, promuovendo l'adesione dei neuroni [79].

Per usufruire dell'elevata biocompatibilità e della modesta rigidità di cui godono i polimeri naturali, senza rinunciare alla flessibilità nel processo di fabbricazione tipico dei polimeri sintetici, si preferisce usare dei materiali compositi, ad esempio nanofibre a base di PLGA e gelatina per aumentare l'adesione e la proliferazione cellulare [80].

Inoltre, è significativo il fatto che la comunicazione tra i neuroni preveda la generazione di un potenziale elettrico. Ecco perché il substrato ideale dovrebbe possedere anche caratteristiche di conducibilità elettrica che promuova la crescita neuritica e la

rigenerazione neurale. Si impiegano quindi dei polimeri conduttivi, per stimolare elettricamente le cellule, quali il polipirrolo (PPy) o la polianilina [81], dotati anche di proprietà antiossidanti [82]. Le proprietà in *bulk* di questi polimeri, ossia volume, conducibilità e proprietà meccaniche e quelle superficiali, in particolare la carica, cambiano a seconda dello stato redox del polimero. Infatti, dopandoli con anioni aventi pesi molecolari diversi, cambiano le caratteristiche del polimero e come queste influenzino l'attività cellulare.

3. Design

Come già descritto precedentemente, le caratteristiche geometriche e la topografia superficiale dello *scaffold* influenzano l'interazione con le cellule. In particolare, si è osservato che per rendere la morfologia del substrato biomimetica rispetto all'ECM del tessuto nervoso, le tecniche che forniscono risultati migliori prevedono la realizzazione di idrogel e soprattutto di nanofibre.

A livello geometrico, gli idrogel forniscono un microambiente che a livello spaziale è simile alla ECM del tessuto nervoso e sono in grado di supportare e indirizzare la crescita dei neuriti.

Numerosi studi hanno dimostrato che il diametro [83] e l'orientamento delle fibre [84] e le dimensioni dello scaffold possano alterare la morfologia, la proliferazione e la migrazione cellulare. In particolare, l'allineamento delle fibre permette un migliore differenziamento delle cellule staminali in cellule neuronali. Yang e colleghi [85] hanno realizzato delle matrici nanofibrose a base di PLLA random e allineate aventi dimensioni micro e nanometriche. Su di esse sono state coltivate cellule staminali neurali ed è stato confrontato il loro comportamento in base al tipo di substrato. Si è osservato che la direzione delle estroflessioni e la crescita neuritica delle cellule è parallela alla direzione delle fibre per gli *scaffold* allineati. Inoltre, la velocità di differenziamento è maggiore per le cellule poste sulle nanofibre di PLLA rispetto a quella osservata per le microfibre. Simili risultati sono stati ottenuti anche per fibre in PCL realizzate dal gruppo di ricerca di Mahairaki utilizzando precursori di cellule neuronali. In generale, si suppone che

l'allineamento delle fibre influenzi l'arrangiamento del citoscheletro cellulare lungo la loro specifica direzione e di conseguenza l'eventuale differenziamento [84].

D. Realizzazione di scaffold nanofibrosi per l'ingegneria tissutale

1. Vantaggi della struttura nanofibrosa

Si è già osservato nei paragrafi precedenti come l'architettura dello *scaffold* possa influenzare la risposta cellulare.

Una struttura nanofibrosa è in grado di mimare l'ambiente biologico meglio di altre strutture perché le fibre (aventi dimensioni comprese tra 3 nm e 5 μm) hanno dimensioni confrontabili con le molecole biologiche e assumono una morfologia tridimensionale tipica della matrice extra-cellulare. Dalla fig.10 si può osservare come scaffold microporosi (A) e microfibrati (B) non permettano alla cellula di aderirvi correttamente: questa, infatti, aderisce all'interno delle porosità e ivi si appiattisce, mantenendo una struttura bidimensionale. Gli scaffold nanofibrati (C), invece, presentano elevata porosità interconnessa che favorisce l'adesione cellulare: all'interno dei pori, la cellula acquisisce una morfologia tridimensionale aderendo a più fibre.

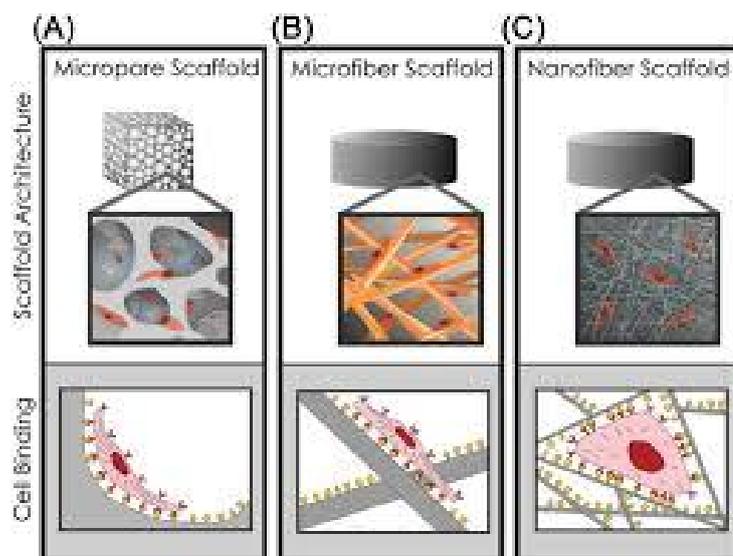


Figura 10. Architettura dello scaffold ed effetti sull'adesione cellulare.

Inoltre, gli scaffold nanofibrosi sono caratterizzati da un elevato rapporto superficie/volume per cui espongono numerosi siti di legame nanometrici per le cellule. Strutture di questo tipo possono essere realizzate per *self assembly*, tramite separazione di fase e soprattutto mediante l'elettrospinning che permette di controllare in modo molto accurato i parametri di processo [86].

2. Electrospinning

L'elettrospinning o elettrofilatura è un processo nato negli anni '30, ma utilizzato soltanto a partire dal 1994 per produrre nanofibre polimeriche per ingegneria tissutale [87]. Da allora, il numero di riviste e pubblicazioni riguardanti l'elettrospinning come tecnica per realizzare scaffold è cresciuto esponenzialmente [88]. Il processo sfrutta un sistema di guida elettrostatica che consente la deposizione delle fibre su un substrato. In particolare, viene applicata una forza motrice di natura elettrica molto elevata tra un ugello, dal quale fuoriesce la soluzione polimerica, e un collettore su cui si depositano le fibre.

È una tecnica estremamente vantaggiosa perché possiede elevata flessibilità e versatilità, permettendo il controllo della produzione di fibre processando numerosi polimeri sintetici e naturali [89]. Inoltre, l'apparato utilizzato è di semplice costruzione, economico e può essere facilmente modificato per realizzare scaffold più complessi [90]. Le nanofibre ottenute possono essere anche molto sottili (inferiori a 100 nm di diametro), ma convergono in una struttura continua e con porosità interconnessa che permette la diffusione di molecole [91]. Si noti che se la dimensione dei pori non è appropriata, le cellule non riescono a penetrare nella struttura [26]. Il rapporto superficie/volume è molto elevato e la struttura mantiene buone proprietà meccaniche per la presenza di pori aventi diametri micrometrici.

Le strutture nanofibrose così ottenute trovano vasto impiego in ambito biomedicale non soltanto come scaffold per ingegneria tissutale [92], ma anche come sistemi a rilascio controllato di farmaco [93], [94] e medicazioni per ferite [94].

Lo svantaggio principale nell'utilizzo dell'elettrospinning è legato alla bassa produttività del processo, che ne rende difficile la standardizzazione a livello industriale.

a) *Principio di funzionamento*

L'apparecchiatura per l'electrospinning (rappresentata in configurazione orizzontale in fig.11) è costituita da:

- una siringa, contenente la soluzione polimerica conduttiva;
- un collettore metallico, posto ad una specifica distanza dall'elettrodo positivo;
- un generatore di tensione, che genera una differenza di potenziale tra il capillare metallico della siringa e il collettore;
- una pompa che stabilisce la velocità con cui la soluzione polimerica viene elettrofilata.

La soluzione polimerica che si vuole elettrofilare viene inserita in una siringa e sospinta attraverso un ugello di dimensioni millimetriche da una pompa volumetrica. Tra l'ugello e il collettore viene applicata una differenza di potenziale molto elevata (5 - 40 kV) per mezzo di due elettrodi collegati ad un generatore di tensione continua. All'inizio la soluzione polimerica è trattenuta dalla sua tensione superficiale all'interno del capillare, per cui si genera una calotta emisferica in fuoriuscita dall'ugello per effetto della pompa. A causa della differenza di potenziale imposta, il capillare metallico si carica positivamente; il campo elettrico induce la formazione di cariche positive anche sulla superficie della soluzione in uscita. Si generano delle forze repulsive elettrostatiche che determinano una forza opposta alla tensione superficiale: per effetto delle forze che tendono a stirare la soluzione verso l'elettrodo opposto, essa inizia ad assumere una forma conica, nota come cono di Taylor [95]. Esiste un valore critico di intensità del campo elettrico per cui la forza elettrostatica diviene predominante rispetto alla tensione superficiale; raggiunto tale valore, un getto di fluido carico elettricamente fuoriesce dalla punta del cono di Taylor, diretto verso il collettore.

Quando il filamento si avvicina al collettore, il solvente evapora, in modo che la carica contenuta per unità di volume aumenti. Quando le forze agenti sulle cariche elettriche superficiali diventano più grandi delle forze coesive all'interno del getto, quest'ultimo si divide in più filamenti. Poco prima del collettore, per effetto del campo elettrico, il getto comincia a descrivere traiettorie circolari sempre più ampie, mentre i diametri diventano sempre più sottili.

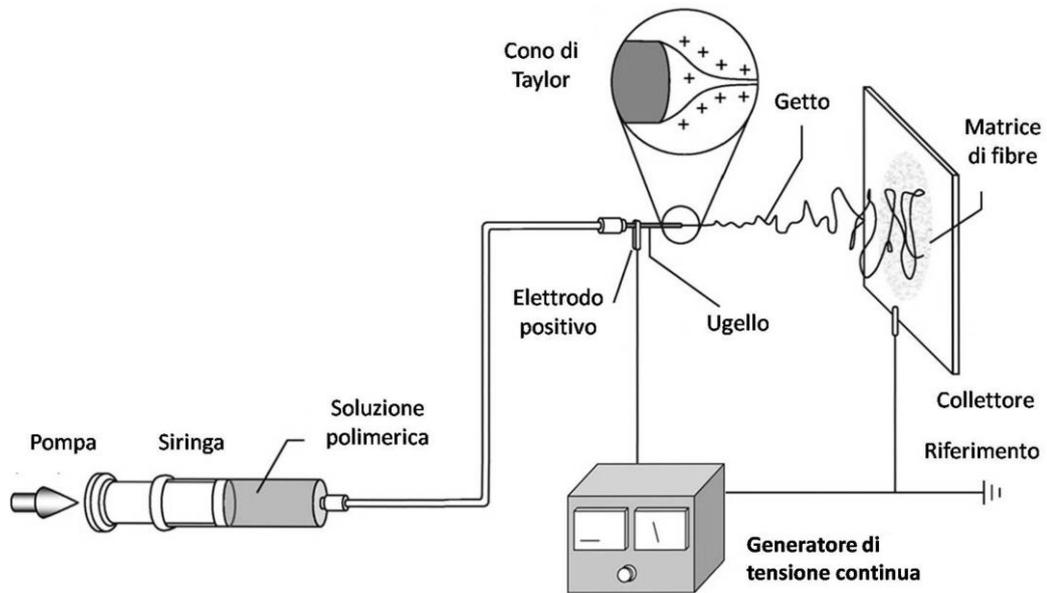


Figura 11. Sistema per electrospinning in configurazione orizzontale. Sono indicati tutti i componenti.

Per ottenere fibre disposte in maniera caotica, si utilizza un collettore piano metallico; qualora l'obiettivo fosse la realizzazione di fibre allineate, si adoperano collettori aventi particolari geometrie. In particolare, è possibile sfruttare collettori a cilindro rotante, aste metalliche parallele tra cui si posizionano le fibre allineate e due anelli equidistanti dall'ugello e paralleli tra loro.

b) Difetti di elettrofilatura

Alla fine del processo di electrospinning è possibile che le nanofibre ottenute presentino dei difetti.

- *Beads* (perline): sono rigonfiamenti delle fibre dovuti ad un'evaporazione non ottimale del solvente, che si verifica dopo la deposizione sul collettore (fig.12(a)).
- Nastri: sono strutture a sezione rettangolare che si formano perché le fibre depositate sono ancora intrise di solvente (fig.12(b)).

- Difetti superficiali: sono fibre ‘a ragnatela’, aventi diametro inferiore rispetto al diametro medio delle nanofibre presenti. La loro presenza dipende da parametri non ottimali del processo (fig.12(c)).

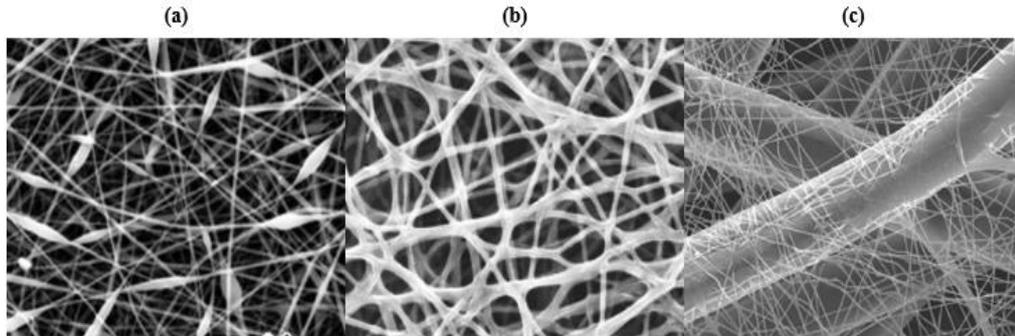


Figura 12. Immagini SEM di fibre con difetti: perline (a), nastri (b), difetti superficiali (c).

c) Parametri che influenzano il processo

Nonostante l’electrospinning sia un processo di semplice realizzazione, ci sono numerosi parametri che possono influenzare la morfologia, le dimensioni e la densità delle nanofibre. È quindi necessario uno scrupoloso controllo di questi per ottenere nanofibre prive di difetti. Si distinguono vari tipi di parametri.

I **parametri di sistema** sono relativi alle caratteristiche della soluzione e del polimero considerato.

La concentrazione è uno dei più importanti parametri di sistema. Infatti, al di sotto di un valore minimo, come visibile in fig.13(a), si verifica il processo di *electrospray*, per cui sul collettore si depositano micro e nanogoccioline polimeriche. L’*electrospray* dipende dalla bassa viscosità della soluzione e dall’elevata tensione superficiale [96]. Al crescere della concentrazione (fig.13(b)), si iniziano a formare nanofibre dotate però di numerosi difetti. A concentrazione troppo elevata (fig.13(d)), si ottengono fibre micrometriche con delle strutture ad elica a causa dell’elevata viscosità. È dunque necessario individuare il range di concentrazione ideale che permetta di ottenere fibre prive di difetti (fig.13(c)).

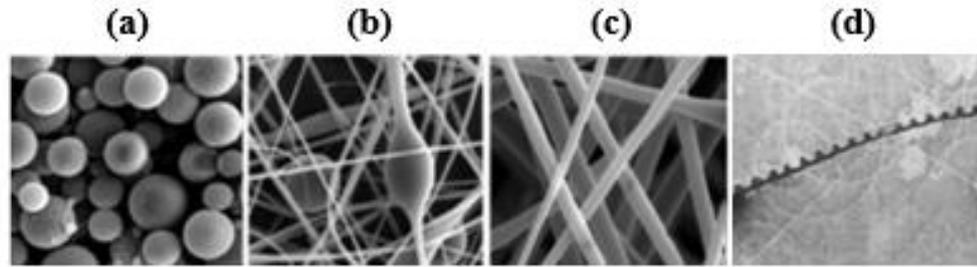


Figura 13. Immagini al SEM dei prodotti dell'electrospinning al crescere della concentrazione, (a) e (b) fibre a bassa concentrazione di polimero, (c) concentrazione ottimale [97], (d) concentrazione troppo elevata [98].

La viscosità della soluzione può essere modificata variando la concentrazione e il peso molecolare del polimero. A bassa viscosità, la tensione superficiale è predominante rispetto alle forze elettrostatiche: le fibre ottenute sono discontinue e con numerosi difetti. Viceversa, per soluzioni ad elevata viscosità, il getto polimerico ha difficoltà a formarsi [99].

La tensione superficiale dipende dalla viscosità della soluzione, ma soprattutto dal solvente. Uno studio del 2004 ha dimostrato la relazione sussistente tra la morfologia delle nanofibre elettrofilate e il solvente utilizzato nella soluzione [100]. Infatti, al variare del solvente e del rapporto di quest'ultimo con il polimero, si ottengono tensioni superficiali diverse. Ottimizzati tutti i parametri, la riduzione della tensione superficiale permette di ottenere fibre con *beads*. Ad elevata tensione superficiale, il getto risulta instabile.

La conduttività della soluzione dipende dal polimero, dal solvente e dall'eventuale presenza di sali ionici; spesso può essere incrementata attraverso l'utilizzo di solventi organici [101]. Aumentando la conduttività, il diametro delle nanofibre decresce ma valori troppo elevati rendono il getto molto instabile, determinando fibre a spessori disomogenei. Se la conduttività è estremamente bassa, si formano invece fibre con *beads*.

Tra i parametri di sistema rientrano anche alcune proprietà del polimero adoperato, come il peso molecolare e la struttura del polimero.

Il peso molecolare influenza la morfologia delle fibre, poiché condiziona la viscosità, la tensione superficiale e la conduttività. Polimeri dotati di basso peso molecolare tendono a formare *beads* se elettrofilati; adoperare polimeri ad elevatissimo peso molecolare permette di ottenere nanofibre prive di difetti anche a basse concentrazioni. Inoltre, un alto peso

molecolare contribuisce all'instaurarsi di interazioni intermolecolari (*entanglements*) che stabilizzano il getto polimerico. Analogamente, nei polimeri a struttura lineare ci sono più interazioni tra le catene, per cui sono facilmente filabili.

I **parametri di processo** corrispondono ai settaggi effettuati nell'apparecchiatura per *electrospinning*.

L'intensità del potenziale elettrico applicato è un parametro cruciale. Infatti, il getto diparte dal cono di Taylor soltanto se il voltaggio supera una soglia minima. Alcuni autori hanno osservato che un incremento del voltaggio comporta l'aumento delle forze repulsive presenti sulla superficie del getto, determinando la formazione di fibre più sottili [102]. Altri studi hanno però dimostrato che applicando voltaggi estremamente elevati, le nanofibre elettrofilate presentano diametri notevoli per la maggior quantità di getto eiettata [103]. La relazione esatta tra l'intensità del potenziale applicato e il diametro delle nanofibre è ancora oggetto di discussione.

La velocità del flusso imposta dalla pompa volumetrica influenza notevolmente la morfologia delle nanofibre. Infatti, per valori bassi di flusso, il solvente evapora prima che le fibre raggiungano il collettore. Se il flusso è eccessivamente rapido, si formano nanofibre con *beads* e nastri, poiché il solvente non ha tempo sufficiente per evaporare. In generale, al crescere della velocità del flusso, si ha una maggiore quantità di soluzione in uscita dall'ugello, il che comporta spessori e porosità più elevati.

Ulteriore parametro è la distanza tra ugello e collettore. Infatti, esiste una distanza minima al di sotto della quale le fibre non possono formarsi perché il solvente non evapora adeguatamente. È stato dimostrato che distanze più elevate favoriscano la formazione di nanofibre molto sottili [102].

I **parametri ambientali** che possono influenzare il diametro e la morfologia delle nanofibre sono soprattutto umidità e temperatura.

Alcuni autori hanno attestato che usufruire di temperature più elevate riduce lo spessore delle fibre elettrofilate, perché riduce la viscosità della soluzione [104].

Per quanto riguarda l'umidità, è necessario mantenerla in un intervallo specifico. Infatti, una bassa umidità potrebbe incrementare la velocità di evaporazione del solvente. D'altro canto, un'umidità elevata riduce le forze elettrostatiche perché neutralizza le cariche

superficiali presenti sul getto. Come risultato, le fibre ottenute posseggono diametri più ampi [105].

3. Electrospinning di biomateriali

Mediante l'*electrospinning* è possibile realizzare membrane nanofibrose a base di numerosi biopolimeri. Come accennato precedentemente, le membrane così ottenute risultano più biomimetiche e l'elevata porosità permette l'adesione cellulare e l'apporto di nutrienti. D'altro canto, i pori più piccoli limitano le possibilità di infezioni. Inoltre, il settaggio dei parametri di lavoro permette di realizzare membrane con le proprietà desiderate [106].

Per applicazioni biomedicali si preferisce adoperare biopolimeri biodegradabili, sia sintetici che naturali. Spesso per i polimeri naturali, si predilige l'*electrospinning* ad altre tecniche per la realizzazione di scaffold a causa delle condizioni di processo poco aggressive. Sono sottoposti ad *electrospinning* numerosi polisaccaridi, come cellulosa, chitosano, destrano e loro composti, ma anche proteine, come collagene, gelatina, proteine della seta. Tra i polimeri sintetici, vengono realizzate membrane elettrofilate a base di PLA, PGA, poliuretani e silicati, su cui è possibile la coltura di cellule staminali o già differenziate [107].

Alcuni biopolimeri non sono di semplice elettrofilatura, per cui necessitano di un materiale di supporto che ne migliori anche solubilità, biocompatibilità, biodegradabilità e proprietà meccaniche. Di solito si realizzano membrane bioartificiali, a base di un polimero naturale e di uno sintetico, in modo da combinare i vantaggi di entrambi. Per esempio, Kappan e colleghi [108] hanno dimostrato che fibre elettrofilate a base di PCL/gelatina favoriscano l'adesione e la proliferazione cellulare maggiormente rispetto alle fibre in solo PCL. Inoltre, l'allineamento delle fibre promuove la formazione di adesioni focali clusterizzate e l'orientamento di cellule muscolari lisce. È altresì opportuno utilizzare un agente reticolante per aumentare la stabilità delle nanofibre elettrofilate in ambiente acquoso [109].

Per conferire specifiche proprietà alle membrane nanofibrose, è possibile processare attraverso *electrospinning* materiali compositi; vengono ottenute in questo modo nanofibre

che incorporano nanomateriali. In particolare, viene sempre più investigata la realizzazione e di conseguenza l'utilizzo di nanofibre caricate con agenti aventi proprietà antibatteriche. In fig.14 sono riportate alcune delle modalità con cui l'agente attivo viene incorporato all'interno delle nanofibre ottenute mediante *electrospinning*.

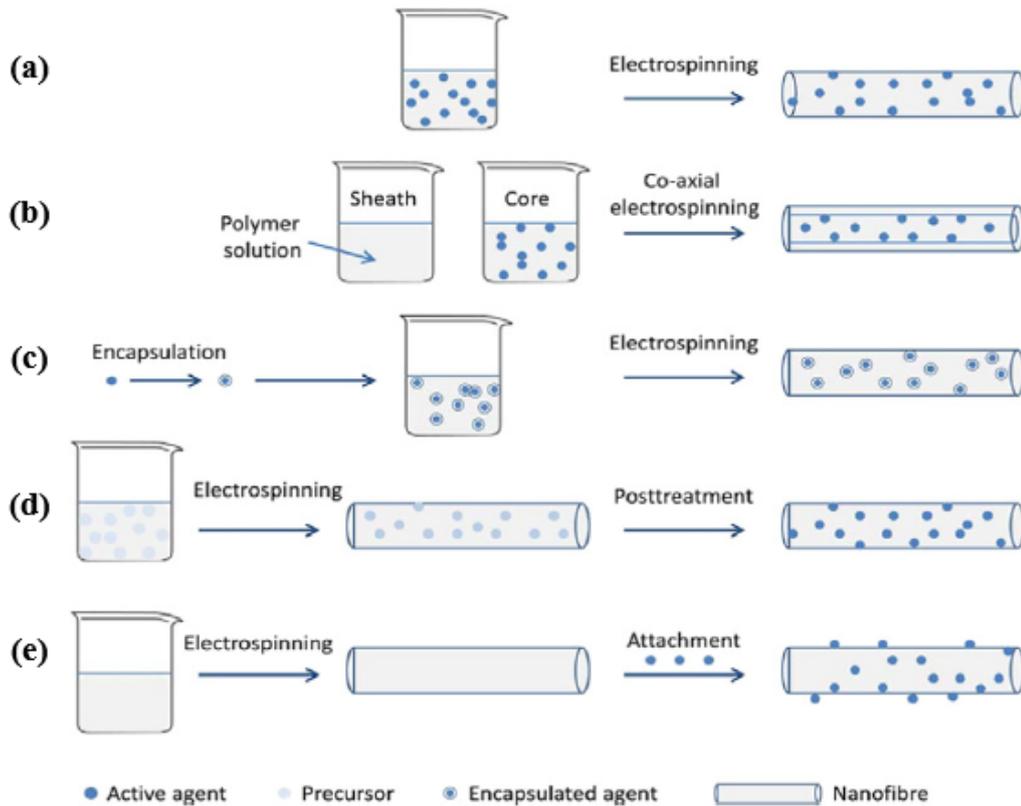


Figura 14. Modalità con cui si incorporano molecole attive nelle membrane elettrofilate: *blending* (a), *core/shell* (b), *incapsulamento* (c), *post-trattamento* (d), *attachment* (e) [110].

Il caso rappresentato in fig.14(a) identifica il *blend electrospinning*: l'agente attivo viene inserito nella soluzione polimerica da elettrofilare. Successivamente all'elettrofilatura della dispersione ottenuta (previa agitazione o sonicazione), gli agenti antibatterici sono distribuiti in modo casuale all'interno delle fibre, permettendo un rilascio prolungato nel tempo. Per la sua semplicità, questa tecnica è la più sfruttata per ottenere membrane composite. Xing e colleghi hanno testato l'attività antibatterica di fibre elettrofilate a partire da una dispersione di nanoparticelle di argento pre-sintetizzate e PLGA in HFIP. I risultati ottenuti hanno mostrato un'efficace azione contro i batteri *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*; le successive prove cellulari hanno fornito risultati promettenti

[111]. Risultati simili sono stati conseguiti anche per nanofibre funzionalizzate con AgNP in blending a base di PDVF [112], Nylon 6 [113] e altri polimeri [110]. È stata analizzata la bioattività di alcuni antibiotici come amoxicillina, metronidazolo e lidocaina incorporati in membrane di PLGA e collagene. Nelle fibre di collagene, il rilascio degli agenti attivi risulta efficiente nei confronti dei batteri *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* [114].

In fig.14(b) è raffigurato l'*electrospinning* coassiale. tale tecnica prevede l'utilizzo due soluzioni differenti e un apposito sistema di pompaggio: la dispersione contenente l'agente antibatterico costituirà la parte più interna della fibra (core), mentre la soluzione polimerica viene adoperata per realizzare lo *shell* esterno. In tal caso, il rilascio dipende dalla velocità con cui gli agenti antibatterici diffondono attraverso lo spessore dello *shell*. Il coaxial electrospinning si utilizza per incorporare antibiotici come la gentamicina in membrane elettrofilate. Nella procedura proposta da Torres-Giner e colleghi [115], sono state preparate due soluzioni, entrambe usando solventi a base di HFP. L'agente antibatterico viene disperso nella soluzione di collagene; nella soluzione per lo shell, il polimero usato è il PLA. Viene testata l'azione antibatterica delle fibre ottenute, confrontando i profili di rilascio del farmaco con quelli di fibre a base di PLA e di altre ottenute tramite blending PLA/collagene: nelle matrici realizzate mediante electrospinning coassiale, il profilo di rilascio dell'antibiotico nel tempo si dimostra privo di *burst release*.

Nell'incapsulamento (osservabile in fig.14(c)), gli agenti attivi vengono incapsulati all'interno di apposite strutture per mantenerne la stabilità e la funzionalità anche durante il processo di elettrofilatura. Le capsule ottenute sono poi miscelate nella soluzione polimerica e la dispersione viene sottoposta ad *electrospinning*. Numerosi autori hanno riportato esempi di matrici nanofibrose antibatteriche, ottenute incorporando l'amoxicillina in capsule da disperdere nella soluzione polimerica. Wang et al. [116] hanno adoperato dei dischi di argilla laponite caricati con l'antibiotico e miscelati in soluzione con PLGA per produrre membrane elettrofilate. Un ulteriore caso di nanofibre composite con agenti antibatterici incorporati è quello proposto da Zheng e colleghi [117]. Nel loro lavoro, le fibre vengono ottenute tramite electrospinning di una soluzione di PLGA in cui precedentemente sono state disperse nanoparticelle di idrossiapatite caricate superficialmente con amoxicillina. In entrambi i casi, si è osservato un ridotto burst release, buone caratteristiche di citocompatibilità e stabilità meccanica. Inoltre, l'effetto antibatterico è garantito dall'inalterata funzionalità dell'antibiotico.

L'immagine 14(d) è esplicativa di alcune modifiche al processo di elettrofilatura qualora gli agenti attivi siano suscettibili a denaturazione per le condizioni di processo. In tal caso, vengono inseriti nella soluzione polimerica dei precursori delle biomolecole antibatteriche che, in seguito all'*electrospinning*, subiscono un post-trattamento per convertirli nella forma attiva. Questa tecnica è utilizzata soprattutto per inserire nanomateriali di ossido di metallo. Per esempio, Yan e colleghi [118] hanno realizzato membrane di poliuretano caricate con nanoparticelle di TiO_2 sintetizzate *in situ*. Le particelle così ottenute sono distribuite nelle fibre elettrofilate in maniera omogenea. Dai successivi test *in vitro* si è evinto che tali membrane composite mostrano un'importante azione antibatterica nei confronti dei batteri *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* dovuta alla presenza dell'ossido di titanio.

L'ultima modalità (in fig.14(e)) prevede l'inserimento degli agenti antibatterici sulle nanofibre dopo l'*electrospinning*. Il fissaggio delle nanoparticelle in superficie può essere dovuto ad interazioni elettrostatiche (adsorbimento fisico) o a trattamenti chimici (*covalent immobilization*) [89]. Un lavoro condotto da Mei et al. [119], ha evidenziato la possibilità di produrre fibre elettrofilate di PAN (poliacrilonitrile) modificate superficialmente per esporre gruppi amminici utili per legarvi degli *spacer* idrofilici flessibili. A questi si legano molecole di PHMGH (cloridrato della poliesametilene-guanidina), un agente antibatterico non tossico. Dai risultati si è osservato l'efficace potere antibatterico delle fibre ottenute e la capacità di *self-cleaning* dovuta agli *spacer* idrofilici.

II. Materiali e metodi

In questo capitolo verranno descritti i materiali utilizzati per la produzione delle membrane elettrofilate e tutti i metodi adoperati per la loro caratterizzazione.

A. Materiali

1. Chitosano

In questo lavoro di tesi, è stato utilizzato chitosano 95/100 commercializzato dall'HMC⁺ (prodotto n.24704), avente le proprietà riportate in Tabella 1.

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

Tabella 1. Proprietà del chitosano di utilizzo.

Il chitosano (CS) è un polisaccaride naturale, ottenuto attraverso processi di deacetilazione alcalina della chitina. È non tossico, biocompatibile e biodegradabile; possiede proprietà antibatteriche e natura policationica che lo rendono adatto ad applicazioni biomedicali. Infatti, è possibile realizzare scaffold a base di chitosano in forma di gel [120], film [121] o fibre [122].

La chitina è un polisaccaride lineare molto abbondante in natura, ricavabile da numerosi insetti e crostacei. La sua struttura, in fig.15, è simile a quella della cellulosa, ma presenta un gruppo acetammide (-NHCOCH₃). A causa dell'elevata idrofobicità, è scarsamente

solubile in acqua e in numerosi solventi organici, per cui ha limitate applicazioni biomedicali [123].

Il chitosano è preparato per deacetilazione parziale della chitina allo stato solido in condizioni alcaline tramite idrossido di sodio o per depolimerizzazione della stessa tramite trattamento enzimatico con chitina deacetilasi [124]. Strutturalmente (come visibile in fig.15), si presenta come un copolimero a blocchi di D-glucosammina e N-acetil D-glucosammina. La catena principale è costituita da unità di D-glucosammina, tenute insieme da legami glicosidici $\beta(1,4)$: questa organizzazione fornisce una struttura semicristallina al materiale. In genere, sono presenti tre tipi di gruppi funzionali in catena, utili per apportare eventuali modifiche al polimero: un gruppo amminico in posizione C2 e due gruppi idrossilici, uno primario in posizione C3 e uno secondario in C6.

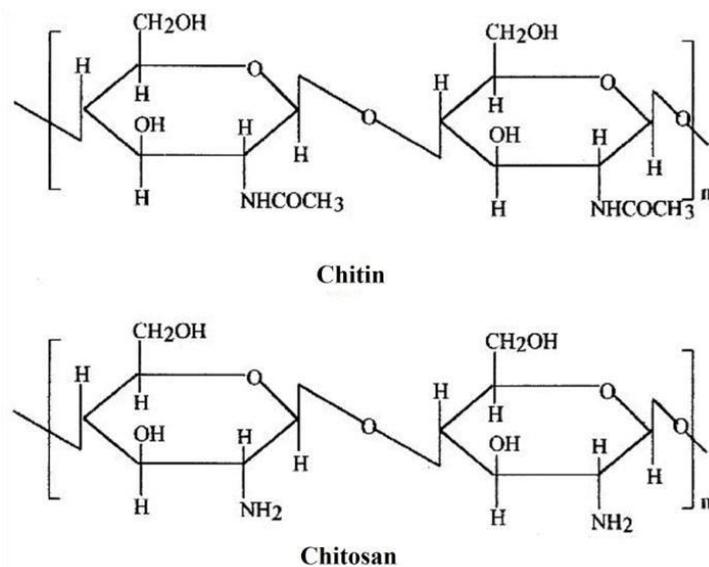


Figura 15. Struttura chimica di chitina e chitosano.

Dalla scelta del metodo di preparazione dipendono le caratteristiche del polimero, tra cui il grado di deacetilazione (DD, *Deacetylation Degree*) e il peso molecolare (da diecimila a un milione di Dalton). In particolare, il DD è calcolato come il rapporto tra la D-glucosammina e la somma di N-acetil D-glucosammina e D-glucosammina, per cui fornisce il numero di gruppi amminici in catena. Affinché possa essere considerata “chitosano”, la chitina deacetilata deve annoverare un DD maggiore del 60% [125].

In commercio sono disponibili CS con peso molecolare medio tra i 3.8 kDa e i 20 kDa e DD compreso tra il 66% e il 95%.

Tali parametri influenzano le caratteristiche fisico-chimiche del materiale, tra cui la solubilità.

Infatti, il CS presenta un comportamento pH-dipendente, utile nell'ingegneria tissutale perché consente la formazione di legami con altre biomolecole, come proteine [126] o DNA [127]. A pH minore di 6.5, il polimero solubilizza in soluzioni acide organiche (di solito acido acetico, acido formico e acido lattico) o inorganiche (come l'acido cloridrico) a causa della protonazione dei gruppi NH_2 in posizione C2 della D-glucosammina. Infatti, si instaurano delle forze repulsive intercatena tra i gruppi protonati che favoriscono lo swelling e la diffusione dell'acqua all'interno del materiale [128]. Viceversa, per pH maggiori o uguali a 6.5, i gruppi amminici tendono a deprotonarsi.

Anche la degradazione *in vivo* è controllata dal DD e dal peso molecolare: in particolare, all'aumentare del DD, la cinetica di degradazione rallenta; CS a bassi pesi molecolari degradano più velocemente di quelli a peso molecolare più elevato [129]. La degradazione può essere anche accelerata enzimaticamente ad opera di diverse proteasi, tra cui lisozima, pepsina e altri. In condizioni fisiologiche, il polimero degrada molto velocemente e possiede scarsa stabilità meccanica [130].

A causa della natura cationica in soluzione, della rigida struttura chimica e delle interazioni inter e intra molecolari, numerosi sono i problemi di processabilità del CS mediante *electrospinning*. Infatti, le soluzioni a base di chitosano si presentano estremamente viscosi a pH acido e temperatura ambiente, per cui si rende necessario realizzare dei *blend* con altri polimeri, per esempio con il PEO [131]. Inoltre, è opportuno utilizzare un agente reticolante, in modo da aumentare la stabilità delle fibre in ambiente acquoso e neutralizzare il loro pH acido [132].

a) Polietilenossido (PEO)

In questo lavoro di tesi, è stato utilizzato polietilenossido (la cui formula strutturale è riportata in fig.16) con peso molecolare medio di 900 kDa, fornito dalla Sigma-Aldrich (prodotto n.189456).

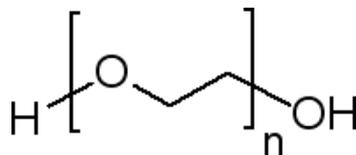


Figura 16. Struttura chimica del polietilenossido.

Si presenta come inodore e incolore, è solubile in acqua e stabile rispetto a variazioni di temperatura e all'azione di agenti chimici. Le proprietà del materiale utilizzato in questo lavoro di tesi sono riportate in Tabella 2.

| PEO - Sigma-Aldrich | |
|----------------------------|------------------|
| Forma | polvere |
| Peso molecolare medio | 900 kDa |
| Viscosità | 8800 - 17600 cps |

Tabella 2. Proprietà del PEO di utilizzo.

Come già menzionato precedentemente, il PEO è un polimero sintetico biocompatibile molto utilizzato nei *blend* con il chitosano. Spesso viene indicato come PEG a peso molecolare medio maggiore di 20 kDa; a livello industriale è prodotto aprendo l'anello dell'ossido di etilene (visibile in fig.17) che viene successivamente polimerizzato utilizzando un iniziatore, ad esempio glicole a basso peso molecolare o trioli di alcol [133].



Ethylene oxide

Figura 17. Anello di ossido di etilene.

Numerosi autori hanno realizzato membrane elettrofilate a base di *blend* di PEO e chitosano per aumentare la *spinnabilità* della soluzione di chitosano anche ad elevata concentrazione del polimero naturale.

Bhattarai e colleghi [134] hanno dimostrato che all'aumentare della quantità di PEO nel blend, la viscosità della soluzione si riduce, rendendola più processabile mediante electrospinning. In questo modo, il diametro delle fibre è maggiormente controllabile; l'aggiunta di PEO in soluzione permette la formazione di fibre aventi dimensioni più elevate. In lavori precedenti [135], sono stati indagati vari rapporti in volume di CS/PEO e dalla caratterizzazione tramite FTIR sono state proposte delle interazioni tra i due materiali tramite legami ad idrogeno, rappresentati in fig.18.

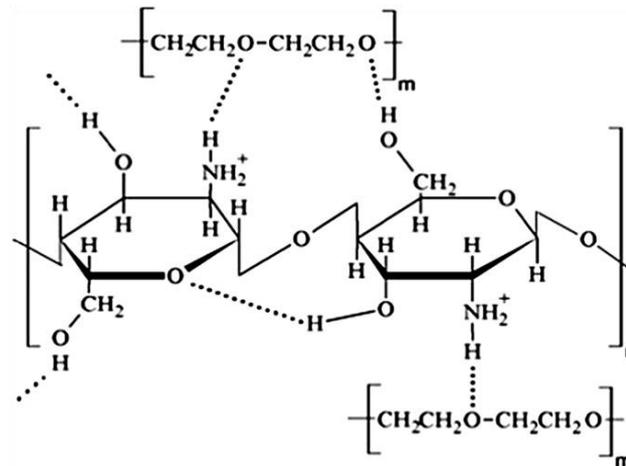


Figura 18. Interazioni tramite legami ad idrogeno tra le molecole di CS e PEO [136].

b) Fosfato di sodio dibasico

In questo lavoro di tesi, è stato utilizzato fosfato di sodio dibasico (ottenuto con grado di purezza maggiore del 99%) commercializzato dalla Sigma-Aldrich per reticolare il chitosano.

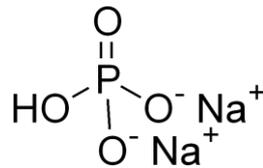


Figura 19. Fosfato di sodio dibasico.

Come già detto in precedenza, il CS possiede limitata stabilità fisica e meccanica in soluzione acquosa: si rende quindi necessario sfruttare agenti reticolanti. In particolare, per pH inferiori a 6.5, il chitosano manifesta una natura policationica. Il fosfato di sodio dibasico (DSP) è un sale non tossico che in soluzione acquosa si carica negativamente: può interagire pertanto elettrostaticamente con i gruppi protonati in soluzione (fig.20) [132]. Per le fibre ottenute tramite electrospinning, il reticolante viene inserito in soluzione prima del processo, in modo da evitare metodi di reticolazione in più step che possano alterare la morfologia delle nanofibre stesse.

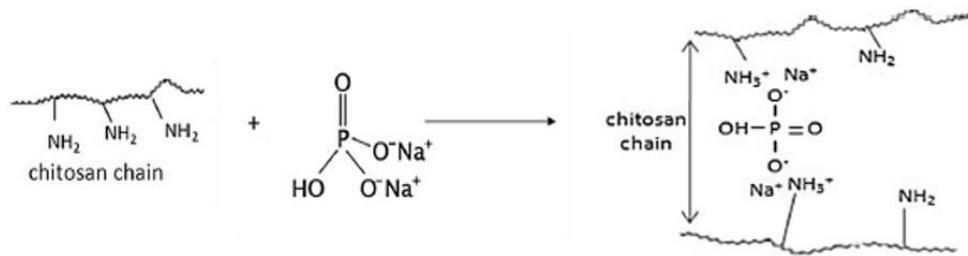


Figura 20. Fosfato di sodio dibasico.

Rispetto ai metodi di *crosslinking* covalente, la reticolazione ionica permette di incrementare il pH della soluzione di chitosano da 4 a 5.8-5.9 mantenendo costante la viscosità. Inoltre, il DSP aumenta la stabilità delle nanofibre in acqua fino a 7 giorni e neutralizza il pH acido delle membrane in presenza di fluidi biologici. I test meccanici hanno evidenziato la maggior rigidità delle fibre reticolate rispetto a quelle prive di crosslinking, che però risultano meno fragili [137].

2. Nanoparticelle di ossido di cerio

In questo lavoro di tesi, sono state utilizzate nanoparticelle di ossido di cerio fornite dalla Sigma-Aldrich (Tabella 3) miscelandole nella soluzione di CS/PEO da elettrofilare secondo le modalità che verranno descritte successivamente.

| NC - Sigma-Aldrich | |
|---------------------------|-----------------|
| Forma | Polveri |
| Colore | Bianco - Giallo |
| Dimensioni | ≤ 25.0 nm |

Tabella 3. Proprietà della NC di utilizzo.

3. Cellule NIH/3T3

Per i test cellulari *in vitro*, è stata utilizzata la linea cellulare NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™), derivata da fibroblasti embrionali NIH Swiss di *Mus musculus* immortalizzati seguendo il protocollo 3T3 (da cui prende il nome) e gentilmente fornita dalla Prof.ssa M.G. Spillantini (Università di Cambridge).

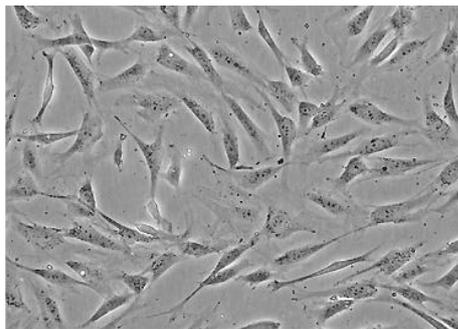


Figura 21. Morfologia di cellule NIH/3T3.

Le cellule NIH/3T3 costituiscono la linea cellulare di riferimento per studi su fibroblasti. Infatti, già dalle prime caratterizzazioni effettuate, si è osservata la conservazione della morfologia fibroblastica di partenza. Le condizioni di coltura permettono di limitare la

densità cellulare: è circa 1/5 di quella di altre linee cellulari. Inoltre, il tempo di proliferazione necessario a raddoppiare la popolazione cellulare è di circa 20-26 h [138].

4. Cellule SH-SY5Y

La linea cellulare SH-SY5Y (ATCC® CRL2266™), derivata da individuo femminile di 4 anni affetto da neuroblastoma, è adoperata per i test *in vitro* ed è stata gentilmente fornita dalla Prof.ssa M.G. Spillantini (Università di Cambridge). A partire dalla linea cellulare SK-N-SH ottenuta tramite biopsia del midollo osseo, sono infatti derivati modelli cellulari epiteliali e soprattutto simil-neurali, che sono quelli in esame.

Come osservato da Ross et al. [139], le SH-SY5Y presentano numerosi neuriti che si estendono dal soma cellulare e aderiscono ai substrati con elevata densità, disponendo di tempi di proliferazione molto rapidi (in condizioni opportune, la popolazione cellulare raddoppia in 48 ore).

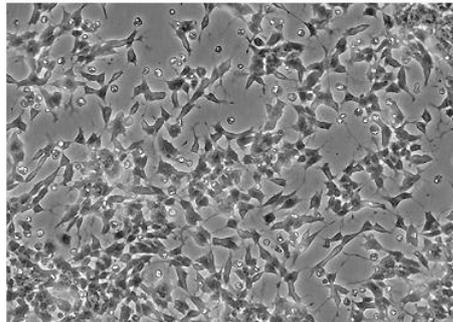


Figura 22. *Morfologia di cellule SH-SY5Y.*

Nonostante abbiano origini tumorali, sono impiegate come linea cellulare di riferimento per ricerche nel campo delle malattie neurodegenerative, in particolare del Morbo di Parkinson. Infatti, in seguito a differenziamento, presentano alcune proprietà tipiche dei neuroni dopaminergici tra cui la sensibilità agli aggregati di α -sinucleina, caratteristici della malattia [140].

B. Metodi

1. Preparazione delle soluzioni polimeriche

In questo paragrafo verranno descritte le procedure per la realizzazione delle soluzioni polimeriche da sottoporre ad elettrofilatura.

a) Preparazione della soluzione di CS

La soluzione polimerica a base di chitosano è stata preparata secondo il protocollo proposto da Tonda-Turo e colleghi [137] e rappresentato schematicamente in fig.23. Sono state preparate separatamente due soluzioni, una di CS 5% w/v e l'altra di PEO 3% w/v, entrambe in acido acetico 0.5M, poste in agitazione rispettivamente a 50 rpm e 1100 rpm per 24 h circa, a temperatura ambiente. In seguito alla completa dissoluzione dei due polimeri, è stata realizzata una miscela CS/PEO 50/50 v/v mantenendola in agitazione a 120 rpm per circa 2 h. Successivamente, è stato aggiunto alla miscela, il DSP 1M (una goccia al secondo) al 7.5% v/v rispetto al volume della soluzione di CS; dopo circa 1 h, è stato inserito un ulteriore co-solvente, il DMSO (dimetilsolfossido) al 5% v/v, al fine di aumentare la resa dell'elettrospinning riducendo l'*entanglement* delle catene polimeriche e migliorare la *spinnabilità* della soluzione. La soluzione così ottenuta è stata mantenuta nelle condizioni di agitazione e temperatura sopra descritte per circa 30 min.

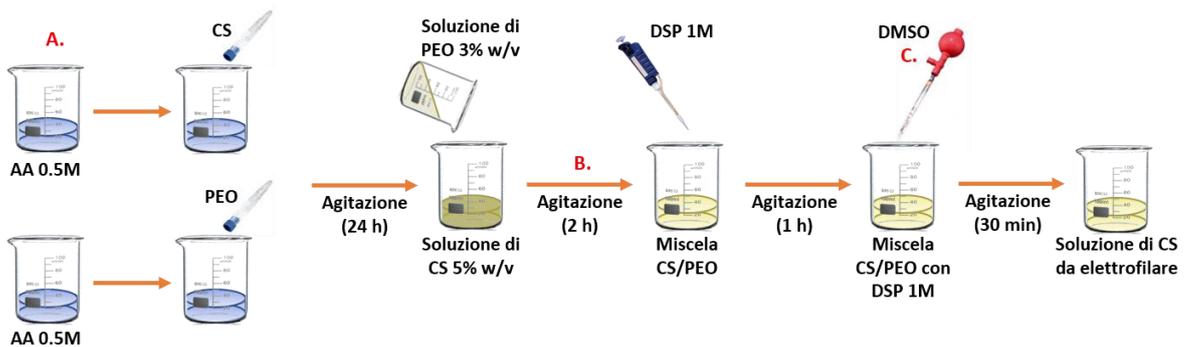


Figura 23. Schematizzazione delle procedure per l'ottenimento della soluzione di CS da elettrofilare. Le lettere in rosso sono indicative di modifiche al protocollo per realizzare fibre composite.

b) Preparazione delle dispersioni di CS/NC

In questo paragrafo sono descritte le procedure per la realizzazione di dispersioni di NC in soluzione per l'ottenimento di membrane composite. Per evitare la formazione di aggregati, sono state esaminate diverse modalità di inserimento del nanomateriale in soluzione apportando variazioni al protocollo di partenza. Nei tre casi riportati successivamente, il primo step della procedura richiede la completa solubilizzazione di CS al 5 % w/v e PEO al 3% w/v, come già descritto nel paragrafo precedente, ognuno in 4 ml di acido acetico 0.5M. Tali modifiche sono indicate in fig.23 con lettere rosse: il posizionamento della lettera è indicativo dello step del processo che viene variato.

- A. Come rappresentato in fig.23, il nanomateriale è stato disperso tramite sonicazione per 10 min in 4 ml di acido acetico 0.5M prima dell'aggiunta del CS alla concentrazione di 5% w/v. È stato poi seguito il protocollo descritto precedentemente, preparando in parallelo la soluzione di PEO. Le concentrazioni di NC testate sono (1, 3) mg/ml rispetto al volume della miscela.
- B. In tal caso, la NC è stata inserita dopo 2 h dalla realizzazione della miscela, lasciando la dispersione in agitazione per circa 25 min alle condizioni preimpostate. Dopo 5 min di sonicazione, si è poi proceduto aggiungendo il DSP secondo il modello in fig.23. Sono state provate concentrazioni di NC pari a (1, 3) mg/ml rispetto al volume della miscela.
- C. Dopo la realizzazione della miscela CS/PEO e della reticolazione ad opera del DSP, la NC è stata dispersa nel DMSO sonicando per 10 min; tale dispersione viene quindi aggiunta in soluzione (una goccia al secondo). Infine, la soluzione è stata mantenuta in agitazione per 30 min. Le concentrazioni di NC testate sono state (1, 3) mg/ml.

Nel secondo schema, proposto in fig.24, la modifica alla procedura è a monte: è stato ridotto il volume di acido acetico della soluzione di PEO da 4 ml a 3 ml; il polimero è stato quindi solubilizzato al 4% w/v. Parallelamente è stata preparata la soluzione di CS al 5% w/v in 4 ml di acido acetico 0.5M. Dopo 24 h in agitazione, è stata realizzata una miscela CCS/PEO avente volume di 7 ml che è stata lasciata in agitazione per 2 h. Il millilitro

residuo di solvente è stato utilizzato per disperdere la nanoceria tramite agitazione e sonicazione.

In fig.24 sono nuovamente posizionate delle lettere in rosso che indicano gli step in cui la dispersione di NC è stata inserita in soluzione a seconda della modifica considerata.

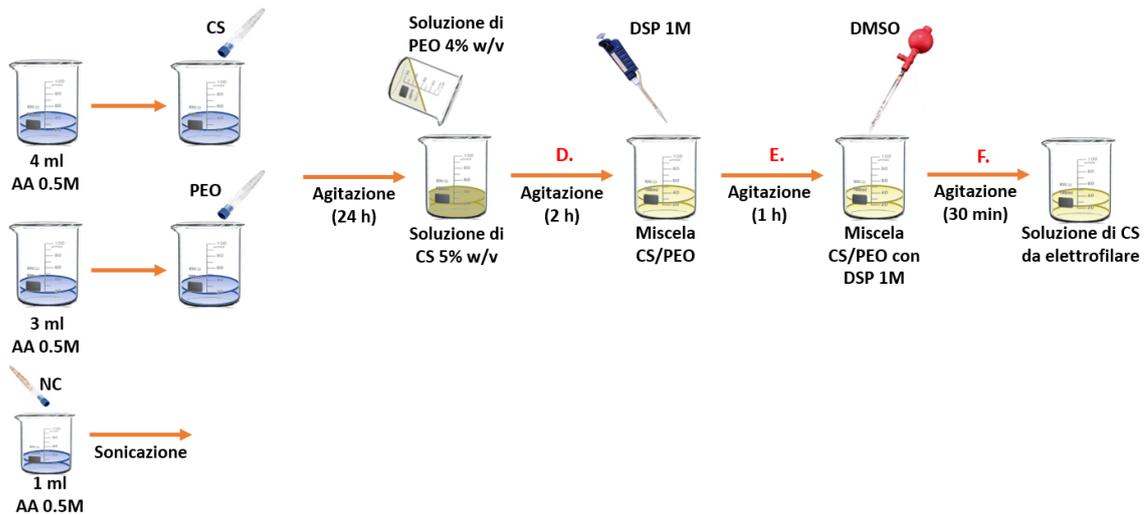


Figura 24. Ulteriore schema generale delle procedure testate per ottenere una dispersione di NC. Le lettere in rosso sono indicative di modifiche al protocollo per realizzare fibre composite.

- D.** Come osservabile in fig.24, prima dell'inserimento del DSP secondo il protocollo di partenza, è stata aggiunta in miscela (una goccia al secondo) la dispersione di NC già sottoposta a sonicazione per 10 min. In seguito, è stato introdotto il reticolante ed è stato seguito il protocollo valido per le fibre di chitosano scariche. Sono state testate concentrazioni del nanomateriale pari a (1, 3) mg/ml rispetto al volume finale di 8 ml.
- E.** In tal caso, la dispersione di NC è stata inserita in soluzione (una goccia al secondo) 1 h dopo l'aggiunta del DSP alla miscela, previa sonicazione (15 min). Infine, è stato introdotto il co-solvente seguendo le indicazioni previste da Tonda-Turo e colleghi [137] e rappresentate in fig.24. È stata provata una concentrazione di NC pari a 3 mg/ml rispetto al volume finale.
- F.** La dispersione di NC, già sonicata per 5 min, è stata introdotta in soluzione goccia a goccia dopo 15 min dall'aggiunta del DMSO. La soluzione polimerica

è stata completata mantenendola in agitazione per altri 15 min. In tal caso, l'unica concentrazione di NC esaminata è stata 3 mg/ml rispetto al volume finale.

2. Fabbricazione delle membrane nanofibrose

a) *Processo di electrospinning*

In questo lavoro di tesi sono state realizzate tramite electrospinning membrane di fibre random ed allineate, caricate con nanoceria. L'impianto di electrospinning adoperato in questo lavoro di tesi è stato messo a disposizione dai laboratori del DIMEAS (Dipartimento di Ingegneria Meccanica e Aerospaziale) del Politecnico di Torino.

L'apparecchiatura, raffigurata in fig.25, è costituita dai seguenti componenti:

- Un **generatore di tensione** (Linari Engineering s.r.l.) in grado di erogare una differenza di potenziale compresa tra 0 kV e 60 kV. Presenta tre morsetti, di cui uno collegato all'ago della siringa e due al collettore.
- Una **siringa** in plastica da 5 ml o in vetro da 10 ml, contenente la soluzione polimerica da elettrofilare e dotata di ago a punta piatta di diametro pari a 0.8 mm.
- Una **pompa volumetrica** (Linari Engineering s.r.l.) che mantiene costante il flusso della soluzione polimerica in uscita (in termini di ml/h) spingendo lo stantuffo della siringa tramite un pistone.
- Dei **collettori piani rettangolari su supporti in plastica**, le cui dimensioni variano a seconda del tipo di fibre da realizzare. In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati sia un unico collettore di dimensioni 200x300 mm², ricoperto da un foglio di alluminio per depositare le fibre in maniera random, che due collettori paralleli tra loro, ricoperti da fogli di alluminio, entrambi aventi dimensioni 38x230 mm². In quest'ultimo caso, le fibre si allineano nell'intercapedine tra i due collettori.

Tutti questi elementi, eccetto il generatore, sono posti all'interno di una cappa (120x60x60) cm³ dotata di un sistema di regolazione della temperatura interna e di ventilazione.



Figura 25. Componenti del sistema di electrospinning di Linari Engineering s.r.l.

b) Parametri del processo

I parametri di processo impostati vengono riportati in Tabella 4 e derivano dall'ottimizzazione effettuata da Tonda-Turo e colleghi [137] sulla soluzione realizzata tramite il protocollo descritto precedentemente per fibre a base di chitosano. Si noti che nell'electrospinning di nanofibre allineate è necessario valutare non soltanto la distanza tra l'ugello e i collettori, ma anche tra i collettori stessi.

| Parametri di processo | RANDOM | ALLINEATE |
|-------------------------------------|---------------|------------------|
| Tensione | 30 kV | 30 kV |
| Distanza ugello - collettore | 12 cm | 12 cm |
| Distanza tra i collettori | - | 2 cm |
| Flusso | 1.8 ml/h | 1.8 ml/h |
| Temperatura | 40 °C | 40 °C |
| Ventilazione | 10 | 10 |

Tabella 4. Parametri di processo per l'electrospinning delle soluzioni realizzate.

3. Caratterizzazione reologica delle soluzioni polimeriche

Le soluzioni polimeriche di controllo e quelle con le nanoparticelle realizzate secondo il protocollo ottimizzato sono state caratterizzate attraverso il reometro MCR302, Anton Paar, (in fig.26), disponibile nei laboratori del POLITO BIOMed Lab, sfruttando due piatti uguali, piani e paralleli, di diametro 50 mm.



Figura 26. Reometro MCR302, Anton Paar.

Il reometro rotazionale è dotato di un albero su cui un motore applica una coppia di forze: il piatto superiore, collegato all'albero, viene messo in rotazione o oscillazione, a seconda del tipo di prova da effettuare. Le analisi sono state tutte condotte in condizioni isoterme a 40°C, ossia la temperatura rilevata durante il processo di electrospinning, e mantenendo il gap tra i piatti a 0.8 mm. Tutti i parametri sono impostati tramite il software dedicato.

Sul piatto inferiore sono posti circa 2 ml della soluzione in esame. Dopo aver avviato la discesa del piatto superiore, il sistema permane in condizioni stabili per circa 10 min per permettere il raggiungimento della temperatura di prova e l'allineamento dei due piatti. L'analisi è stata svolta tramite tre test diversi, riassunti in Tabella 5:

- **Strain sweep test:** la prova è necessaria per individuare la regione viscoelastica di linearità, al di fuori della quale le proprietà meccaniche non sono indipendenti dalla deformazione applicata.
- **Frequency sweep test:** fissata una deformazione appartenente al range viscoelastico di linearità, si analizza la risposta in frequenza del sistema. Il test è

utile per identificare il punto di crossover in cui il campione presenta un comportamento prevalentemente elastico dovuto alla transizione sol-gel.

- **Viscosity rotational test:** impostando lo stress, il reometro misura lo *shear rate* corrispondente e il software fornisce l'andamento della viscosità della soluzione. Il test è indicato per valutare l'influenza delle nanoparticelle sulla viscosità della soluzione.

| | Strain test | Frequency test | Viscosity test |
|-------------------------------|-------------------------------------|--|--|
| Modalità di prova | Oscillatoria | Oscillatoria | Rotazionale |
| Parametri costanti | Frequenza di oscillazione 1 Hz | Deformazione 1% | Coppia di forze |
| Variabile indipendente | Deformazione (0.01-500%) | Frequenza di oscillazione (0.1-100 rad/s) | Shear rate (0.1-100 s ⁻¹) |
| Variabile dipendente | Modulo elastico e modulo viscoso | Modulo elastico e modulo viscoso | Viscosità |

Tabella 5. Prove reologiche effettuate e loro caratteristiche.

4. Caratterizzazione delle membrane nanofibrose

a) Caratterizzazioni morfologiche superficiali

Microscopia elettronica a scansione

Il microscopio a scansione elettronica (SEM) è un dispositivo che permette di esaminare morfologicamente i campioni in esame con un potere risolutivo di 5 nm.

L'apparecchiatura, rappresentata in fig.27, è costituita da:

- Un **sistema di generazione del fascio elettronico**, noto anche come **cannone elettronico**, che genera un fascio di elettroni primari.
- Un **sistema da vuoto**, necessario all'accelerazione degli elettroni.

- Un **sistema di manipolazione del fascio**, costituito da lenti elettromagnetiche, aperture e spirali per regolare la forma, il diametro e la focalizzazione del fascio elettronico sul campione.
- Una **camera portacampione** in cui riporre i supporti su cui sono alloggiati i campioni.
- Un **sistema di raccolta del segnale**, composto principalmente da un **rivelatore**.
- Un **sistema di elaborazione del segnale**, che converte i fotoni ricevuti dal rivelatore in impulsi elettrici.
- Un **sistema di visualizzazione dell'immagine**, il cui elemento fondamentale è un **tubo catodico**.

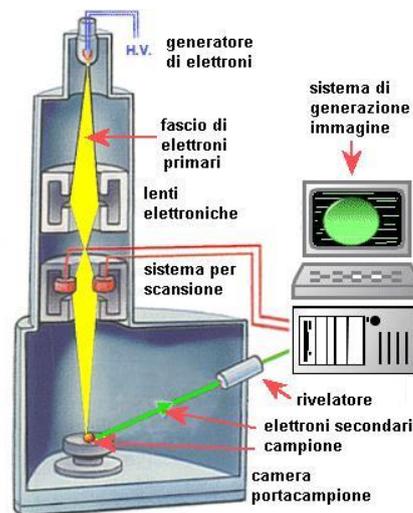


Figura 27. Schema generale del principio di funzionamento di un SEM.

Gli elettroni del fascio primario vengono generati per effetto termoionico da un filamento di tungsteno (catodo) a cui viene applicata una differenza di potenziale. Il fascio viene accelerato e fatto passare attraverso un anodo forato.

Le lenti elettromagnetiche generano un campo magnetico che deflette gli elettroni del fascio e tramite delle aperture, ne riducono il diametro. In questo modo lo spot del fascio decrementa da 10-100 μm a 1 nm – 1 μm sulla superficie del campione. Infine, sono presenti delle lenti collegate al sistema di scansione, che possono essere deflesse dall'operatore durante l'analisi: il fascio viene focalizzato, interagendo punto per punto, riga per riga, su una superficie rettangolare del campione facendone una scansione.

In seguito a questa interazione, vengono generati degli elettroni secondari (SE), in grado di fornire informazioni topografiche ad elevata risoluzione in funzione della loro densità. Lo spessore di penetrazione del fascio dipende dall'energia posseduta e dal numero atomico della specie in esame. Gli SE vengono attratti per interazione elettrostatica dal rivelatore e convertiti in fotoni; sono raccolti da un fotomoltiplicatore, convertiti in impulsi elettrici e amplificati. Il tubo catodico li elabora ricostruendo su un monitor l'immagine relativa alla superficie del campione scansionata.

È possibile inoltre variare i parametri che determinano la qualità dell'immagine, tra cui ingrandimento, risoluzione, luminosità e contrasto. Si noti che tutta l'analisi è condotta sotto vuoto spinto, per evitare collisioni tra gli elettroni e le molecole d'aria e l'ossidazione del filamento di tungsteno.

In questo lavoro di tesi, sono state analizzate le membrane elettrofilate realizzate, prelevandone campioni di area pari a 1 cm^2 e ponendoli tramite nastro biadesivo conduttivo su un portacampioni metallico per SEM. Per garantire la conducibilità dell'intera superficie dei campioni, questi sono stati sottoposti a metallizzazione tramite *sputtering* di ioni d'oro per 50 s, sfruttando lo strumento Agar Auto Sputter Coater (fig.28(a)) e impostando una corrente di 30 mA. Successivamente, i campioni sono stati analizzati tramite il microscopio elettronico a scansione LEO 435VP SEM (fig.28(b)). Entrambi gli apparecchi sono disponibili presso la sede di Alessandria del Politecnico di Torino.

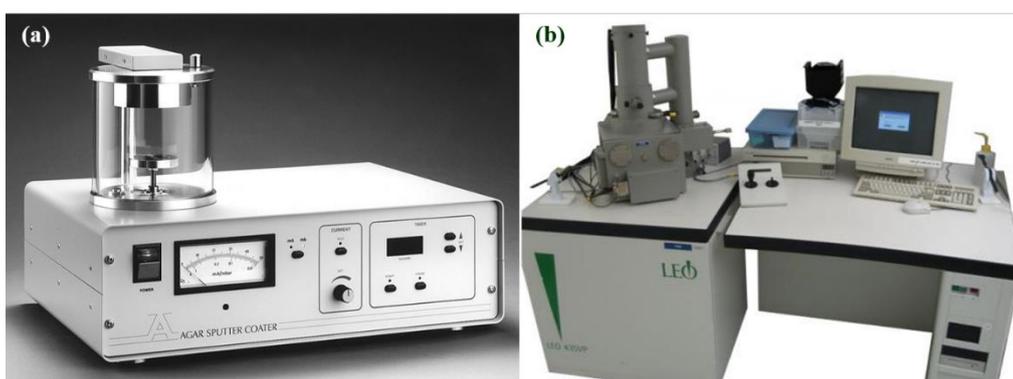


Figura 28. Agar Auto Sputter Coater (a) e LEO 435VP SEM (b).

Il SEM è stato regolato dall'operatore secondo i parametri descritti in Tabella 6.

| Parametri SEM | |
|---------------------------------------|---------------------|
| Tensione | 20 kV |
| Distanza ultima lente-campione | 15 mm |
| Ingrandimenti | 1000x, 2000x, 5000x |

Tabella 6. Parametri del SEM impostati dall'operatore.

Analisi delle immagini

Le immagini ottenute al SEM sono state analizzate tramite il software ImageJ (National Institutes of Health, USA) per esaminare, per ogni tipologia di campione, i diametri e l'eventuale allineamento delle fibre e la porosità delle membrane.

Per quanto riguarda la quantificazione delle dimensioni delle fibre, sono stati acquisiti 50 campioni dalle immagini al SEM relative all'ingrandimento maggiore (5000x) usando il comando *Measure* del software. I dati sono stati inseriti in un foglio di lavoro Excel per determinare il diametro medio delle fibre e la relativa deviazione standard.

La porosità delle membrane è stata valutata qualitativamente attraverso il comando *Analyze Particles* di ImageJ, che permette di trattare i pori come particelle circolari, valutandone l'area e calcolandone il diametro.

Infine, l'analisi dell'allineamento delle fibre è stata condotta calcolando la FFT (Fast Fourier Transformation) tramite l'apposito comando di ImageJ. L'immagine risultante in scala di grigi è indicativa della distribuzione spaziale delle fibre, ruotata di 90°: se i pixel bianchi sono disposti ellitticamente, allora c'è un certo grado di allineamento; in alternativa, per fibre random, questi si presentano secondo una disposizione circolare. A partire da una selezione circolare sull'immagine della FFT, è stato applicato un filtro (*Oval profile*) per calcolare la somma radiale delle intensità dei pixel posti all'interno della circonferenza tracciata. I valori ottenuti sono stati successivamente analizzati e normalizzati tramite il programma Excel.

Spettroscopia EDX

La spettroscopia EDX (*Energy Dispersive X-ray Analysis*) o spettroscopia EDS (*Energy Dispersive X-ray Spectrometry*) è una tecnica di microanalisi chimica che permette di ottenere informazioni composizionali e chimiche del campione in esame.

In particolare, viene osservata la distribuzione e l'intensità dei raggi X prodotti dall'interazione tra il fascio elettronico (generato da un'opportuna sorgente e accelerato) e il campione.

Infatti, quando il fascio colpisce la superficie del campione, gli atomi che lo compongono perdono gli elettroni appartenenti ai gusci elettronici più interni, dotati di un'energia caratteristica. In seguito alla collisione e alle lacune elettroniche generate, il sistema assume una configurazione ad alta energia, ma tende a tornare al livello energetico iniziale per rilassamento: gli elettroni dei gusci più esterni, a catena, effettuano un salto energetico, riempiendo in successione le lacune che si formano ed emettendo ogni volta la differenza energetica sotto forma di fotone X. Il numero di fotoni emessi e l'energia corrispondente sono caratteristici dell'elemento considerato. Questi vengono rilevati da un apposito dispositivo e per ciascun atomo, si individuano possibili transizioni elettroniche che vengono rappresentate sul cosiddetto spettro EDX tramite delle righe spettrali. È possibile dunque determinare la composizione e la concentrazione degli elementi che costituiscono il campione.

La strumentazione è la stessa del SEM, a cui vengono apportate alcune modifiche: si definisce infatti microscopio a scansione del tipo SEM-EDX. Anche in tal caso è necessario che l'analisi sia condotta sotto vuoto spinto, per evitare collisioni elettroni – molecole gassose, e che i campioni siano conduttivi. Per quanto riguarda il principio di funzionamento, è presente un emettitore (un filamento di tungsteno o di esaboruro di lantanio) che per effetto termoionico emette elettroni; questi, come per il SEM, sono accelerati applicando una differenza di potenziale, deflessi e focalizzati fino a collidere con il campione in esame. In seguito all'emissione di raggi X descritta precedentemente, la loro distribuzione energetica può essere misurata dal rivelatore (monocristallo di silicio drogato con litio) valutando l'energia (EDS, *Energy Dispersive Spectroscopy*) o la lunghezza

d'onda (WDS, *Wavelength Dispersive Spectroscopy*). Si utilizza inoltre l'azoto liquido per ridurre il rumore derivante dall'agitazione termica.

b) Caratterizzazione chimico/fisica

Spettroscopia Infrarossa FTIR-ATR

La spettroscopia FTIR in riflettanza totale attenuata (ATR) è una tecnica spettroscopica che permette di valutare la natura dei legami chimici presenti nel campione in analisi, sfruttando una radiazione infrarossa (IR) che lo colpisce.

Quando una molecola viene sottoposta a IR, passa dal suo stato vibrazionale fondamentale ad uno stato eccitato ad energia maggiore, causando la vibrazione dei legami chimici che la costituiscono: parte dell'energia dei raggi viene quindi assorbita, la restante parte viene trasmessa. Valutando la trasmittanza percentuale mediante il rapporto tra le intensità della radiazione trasmessa e della radiazione incidente, è possibile ottenere uno spettro, noto come spettro IR, in cui sono rappresentati i picchi di assorbimento dei raggi IR in funzione del numero d'onda in cm^{-1} (definito come il reciproco della lunghezza d'onda). Ad ogni numero d'onda corrispondono alcuni movimenti vibrazionali dei legami della molecola, distinti in due categorie:

- *Stretching* o stiramento (ν): variazione periodica della distanza tra gli atomi del legame. Può essere simmetrica (ν_s) o asimmetrica (ν_{as}) e richiede elevata energia.
- *Bending* o deformazione: deformazione dell'angolo di legame che può avvenire nel piano dell'angolo ed essere simmetrica (*scissoring*, δ) o asimmetrica (*rocking*, ρ). Il bending può essere anche esterno al piano, simmetrico (*wagging*, ω) o asimmetrico (*twisting*, τ).

In particolare, nella spettroscopia FTIR-ATR (Attenuated Total Reflectance), il campione viene posizionato su un cristallo ad elevato indice di rifrazione, detto **cristallo ATR** (di solito germanio, silicio o diamante), che viene colpito dal fascio IR secondo un angolo di incidenza critico che permette una riflessione totale dei raggi dal cristallo verso il campione. Il raggio IR riflesso subisce numerose riflessioni totali all'interno del cristallo, come osservabile in fig.29, ed ogni volta che penetra nel campione (per qualche frazione

di micron) viene attenuato. Infine, l'intensità del raggio IR in uscita dal campione viene misurata dall'**interferometro** che ne calcola la trasformata di Fourier. Questa costituisce lo spettro IR mediato sullo strato superficiale del campione secondo uno spessore di circa 5 μm .

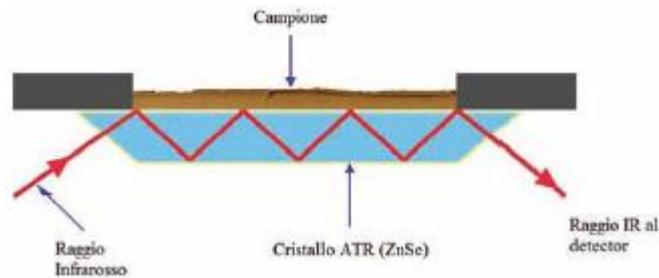


Figura 29. Principio di funzionamento della spettroscopia FTIR-ATR.

In questo lavoro di tesi, le membrane elettrofilate realizzate ottimizzando il protocollo e le nanoparticelle di ossido di cerio in polvere fornite dalla Sigma-Aldrich sono state analizzate tramite FTIR-ATR, sfruttando il dispositivo Frontier FT-IR Spectrometer, della Perkin Elmer disponibile presso la sede di Alessandria del Politecnico di Torino (in fig.30).



Figura 30. Dispositivo Frontier FT-IR Perkin Elmer.

Prima di ogni prova è stata effettuata una misurazione di background, in assenza del campione, per eliminare eventuale rumore dalle prove successive. Sono state utilizzate le apposite punte per condurre l'esperimento, piana per le membrane (preliminarmente staccate dal foglio di alluminio) e appuntita per le polveri, e lo strumento è stato regolato secondo i parametri in Tabella 7. I dati ottenuti tramite l'apposito software Spectrum sono

stati analizzati individuando il numero d'onda dei picchi presenti e il corrispondente legame messo in vibrazione.

| Parametri FTIR-ATR | |
|------------------------------------|-----------------------------|
| Cristallo | Diamante |
| Intervallo di numeri d'onda | 4000 - 600 cm^{-1} |
| Risoluzione | 4 cm^{-1} |
| Numero di scansioni | 32 |

Tabella 7. Parametri impostati utilizzando lo strumento per analisi FTIR-ATR.

c) Caratterizzazione meccanica

Le membrane elettrofilate realizzate sono state testate meccanicamente attraverso prove di trazione sfruttando il dispositivo MTS QTest/10, collocato presso i laboratori del DIMEAS del Politecnico di Torino e raffigurato in fig.31.



Figura 31. Apparecchiatura per prove meccaniche MTS QTest/10.

Il macchinario è costituito da due traverse: quella inferiore è fissa, quella superiore è mobile. Ad entrambe sono assicurati degli afferraggi tra i quali porre verticalmente il campione; l'afferraggio superiore è collegato alla traversa mobile attraverso una cella di carico. Avviata la prova, la traversa mobile si sposta verso l'alto, inducendo uno stato di deformazione nel provino e una forza di reazione esercitata del provino stesso, opposta al carico esercitato dalla traversa mobile. Questi sono misurati dalla cella di carico, che misura anche l'allungamento del campione attraverso un estensimetro posto sulla cella stessa. Il dispositivo è gestito tramite un software, TestWorks 4, che in tempo reale garantisce l'osservazione dell'andamento della prova. Quando il provino giunge a rottura, il test viene interrotto e il software restituisce i dati acquisiti.

I campioni da valutare sono stati staccati dal collettore e ritagliati, ottenendo rettangoli aventi spessori molto sottili. Per le membrane random sono stati analizzati 6 campioni per tipologia. Non è stato invece possibile prelevare dei campioni di fibre allineate in mancanza di sufficiente materiale. Prima di avviare la prova, sono stati misurati con un calibro digitale le dimensioni del provino, tra cui il tratto utile, che corrisponde alla distanza tra i due afferraggi, e il diametro del tratto utile. In questo lavoro di tesi, è stata utilizzata una cella di carico da 10 N e la velocità della traversa mobile è stata impostata tramite TestWorks 4 a 2 mm/min.

I dati acquisiti sono poi stati esportati in Excel e normalizzati rispetto al tratto utile e all'area della sezione trasversale, fino ad ottenere dei grafici sforzo-deformazione. Per ogni provino è stato calcolato il modulo di Young (E) rispetto al tratto lineare della curva, l'UTS (Ultimate Tensile Strength) e la deformazione percentuale a rottura. Tali parametri sono stati mediati sui campioni presenti per ogni tipologia di materiale, fino ad ottenerne il valor medio e la deviazione standard.

d) Prove di degradazione

Sono stati effettuati dei test di degradazione idrolitica ed enzimatica *in vitro* sulle membrane elettrofilate ottenute, sia random che allineate.

Le membrane sono state staccate dal collettore e sono stati ritagliati dei campioni di dimensioni 2x2 cm² per le fibre random e 1x1 cm² per quelle allineate. I campioni sono

stati immersi in 1 ml di PBS (tampone fosfato salino) per la degradazione idrolitica; per la degradazione enzimatica, si sono solubilizzati in PBS 10 mg/ml di lisozima (LZ from chicken egg white, $\geq 90\%$ proteins, activity $\geq 40\,000$ U/mg, Sigma-Aldrich, Canada), un enzima coinvolto nella degradazione dei legami glicosidici del chitosano. I campioni sono stati incubati a 37°C . Al termine del periodo di incubazione, secondo i tempi stabiliti, i campioni sono stati prelevati e, dopo aver rimosso la soluzione tampone, sono stati effettuati due risciacqui con abbondante acqua bidistillata. I campioni sono stati poi posti in congelatore, all'interno di dischi di Petri precedentemente rivestiti sul fondo di carta forno per facilitarne il distacco.

Successivamente sono stati introdotti nel liofilizzatore, presente nei laboratori del DIMEAS del Politecnico di Torino e visibile in fig.32(a). Il liofilizzatore impone una temperatura di -53°C e riduce la pressione fino a 0.01 mbar attraverso un sistema costituito da elettrovalvole e pompa da vuoto, consentendo la sublimazione del ghiaccio formatosi in vapore, secondo il diagramma pressione-temperatura in fig.32(b).

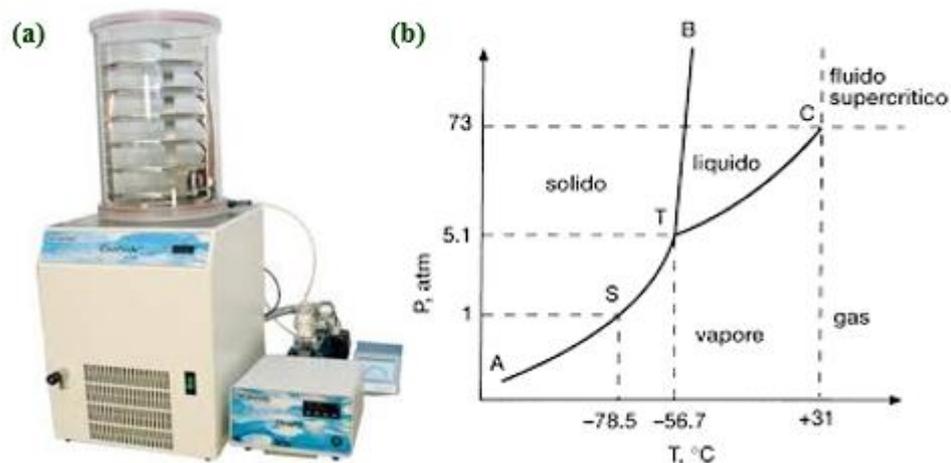


Figura 32. Liofilizzatore Scanvac Coolsafe 55-4 (a), diagramma pressione-temperatura dell'acqua (b).

L'analisi è stata condotta valutando peso e morfologia dei campioni, laddove possibile, prima e dopo 48 h, 96 h e 7 d di immersione. È stata calcolata la perdita di peso percentuale sfruttando la formula:

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

in cui W_0 è la massa iniziale del polimero, W_d è quella misurata dopo la degradazione. I valori sono stati elaborati per ogni tempo di immersione e per ogni campione, valutandone media e deviazione standard.

e) Prove antiossidanti

Per analizzare l'effetto antiossidante delle fibre elettrofilate caricate con nanoceria, è stato adoperato il kit colorimetrico Total Antioxidant Capacity Assay (MAK187) prodotto dalla Sigma-Aldrich. Attraverso queste prove è stata quindi valutata la capacità dei campioni di indurre la riduzione di ioni rame Cu^{2+} in ioni Cu^+ confrontandola con quella del Trolox, un analogo della vitamina E idrosolubile, usata come antiossidante standard. Gli ioni ridotti interagiscono con una *probe* colorimetrica, generando un ampio picco di assorbanza a 560 nm. L'assorbanza di ogni campione è stata valutata utilizzando il microplate reader Victor3 della Perkin Elmer, collocato nei laboratori della sede di Alessandria del Politecnico di Torino e raffigurato in fig.33(a).

Dopo aver centrifugato i reagenti, a 1000 rpm e 4°C per 5 min è stata preparata la Cu^{2+} Working solution, diluendo il Cu^{2+} Reagent con l'Assay Diluent forniti dal kit secondo il rapporto 1:49.

È stato poi seguito il protocollo stabilito dal fabbricante del kit per realizzare soluzioni di Trolox a concentrazioni note, utili per individuare la curva di calibrazione. Il test è stato condotto inserendo in una multiwell da 96 pozzetti, 100 μ l in duplicato delle soluzioni di Trolox e 10 mg delle fibre da testare in duplicato. È stato possibile effettuare il test soltanto per fibre random, a causa della scarsa quantità di materiale disponibile per le fibre allineate. Ai pozzetti contenenti le fibre sono stati aggiunti 100 μ l d'acqua. Seguendo il protocollo, è stata misurata l'assorbanza dopo aver lasciato agire la Cu^{2+} Working solution per 90 min, mantenendo la multiwell in shaking a temperatura ambiente e in assenza di luce.

Microplate reader

Il plate reader, o microplate reader è uno strumento che svolge analisi spettrofotometriche per individuare elementi biologici, chimici o fisici in campioni inseriti all'interno di piastre.

I componenti principali comprendono una **sorgente luminosa** che per misure di assorbanza prevede una lampada a xeno e dei **filtri** che consentono il passaggio di luce monocromatica attraverso una fenditura che rende i raggi paralleli. Avviata la prova, il fascio viene diretto verso i volumi di soluzione nei pozzetti della multiwell: per assorbimento, vengono eccitati gli elettroni degli orbitali più esterni delle molecole presenti in soluzione, per cui l'energia trasmessa è solo una frazione di quella incidente. Un **rivelatore** cattura il fascio trasmesso e tramite un **sistema di elaborazione**, viene fornita in uscita l'assorbanza per ogni pozzetto. Tutto il sistema è rappresentato schematicamente in fig.33(b).

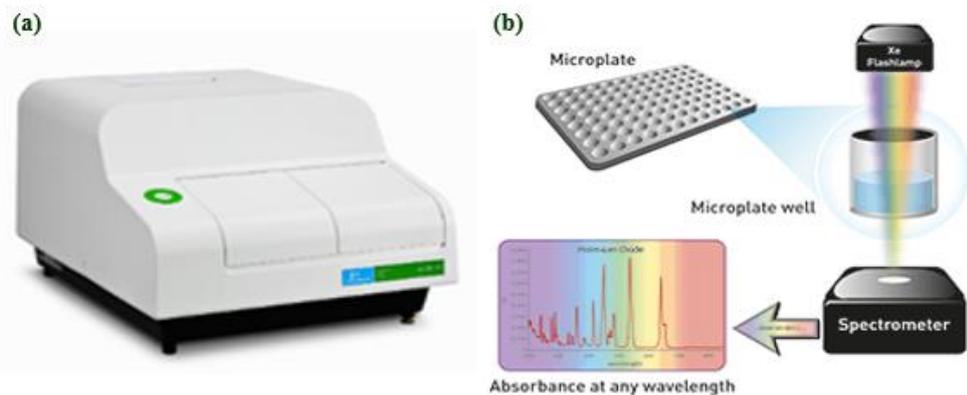


Figura 33. Microplate reader Victor3 della Perkin Elmer (a) e suo principio di funzionamento (b).

In particolare, per i campioni relativi alle fibre, è stato analizzato il sovranatante prelevato. Dopo aver posizionato la piastra da 96 pozzetti nello strumento, è stato impostato il tipo di prova da effettuare (Assorbanza a 560 nm) tramite il software dedicato; infine è stata avviata la prova.

I valori di assorbanza ottenuti sono stati elaborati tramite Excel: dopo aver calcolato media e deviazione standard per l'assorbanza di ogni tipologia di campione, è stata calcolata l'assorbanza netta per ognuno eliminando il bianco. Nel caso dei campioni relativi al sovrinatante, è stata effettuata una normalizzazione di tali valori in base al volume. È stata instaurata una corrispondenza tra i valori di assorbanza così ottenuti e le concentrazioni di antiossidante standard secondo la curva di calibrazione: l'attività antiossidante dei campioni è stata espressa in nM equivalenti di Trolox.

f) Test di coltura cellulare

Sono stati effettuati dei test cellulari valutando la morfologia e la vitalità delle cellule descritte in precedenza poste sulle membrane ottenute, sia random che allineate, ottimizzando il protocollo. In particolare, le prove sono state svolte in triplicato su nanofibre di chitosano di controllo e nanofibre caricate con 3 mg/ml di NC. Queste sono state disposte su vetrini aventi diametro 12 mm, nelle modalità seguenti:

- I vetrini sono stati fissati tramite scotch conduttivo sul collettore prima del processo di electrospinning, in modo che le fibre random vi si depositino. Successivamente, sono stati staccati ed inseriti in una multiwell da 24 pozzetti.
- Per favorire l'adesione delle fibre allineate, prelevate dal collettore alla fine del processo di electrospinning, i vetrini sono stati ricoperti di un sottile strato di PDMS M.G (Silicone Technology, NuSil™) e poi introdotti sul fondo di una multiwell da 24 pozzetti.

Le cellule sono state seminate sui vetrini all'interno delle multiwell (24 well) per 24 ore. Le analisi sono state successivamente condotte ai time point descritti esaminando la morfologia delle cellule cresciute sulle nanofibre di controllo e sulle membrane composite.

Il saggio di vitalità è stato effettuato tramite metodo fluorimetrico con resazurina (1 h di incubazione) dopo 24 ore dalla semina. Analogamente all'analisi precedente, la vitalità viene testata su cellule coltivate su entrambe le tipologie di substrati. Il kit colorimetrico permette di determinare la quantità di cellule vitali attraverso le reazioni di ossido-riduzione che si verificano nei mitocondri cellulari. Infatti, quando si riduce, la resazurina cambia colore, dal blu scuro al rosa fluorescente. Attraverso il plate reader collocato nei laboratori di Alessandria, è stata misurata l'emissione a 590 nm sotto eccitazione a 530-560 nm: l'intensità del segnale è proporzionale al numero di cellule vitali nel campione.

III. Risultati e discussione

Le membrane polimeriche elettrofilate sono state realizzate seguendo le modalità descritte precedentemente, sia per le fibre di controllo a base di chitosano che per quelle caricate con la nanoceria. Per individuare la procedura che consente di ottenere fibre omogenee e con la miglior distribuzione possibile di nanoparticelle, sono stati confrontati la morfologia e i diametri delle nanofibre random ottenute variando il protocollo secondo quanto esposto nel paragrafo I-B-1-b.

Dopo l'ottimizzazione del processo, le soluzioni ottenute sono state caratterizzate reologicamente per concentrazioni di nanoparticelle pari a (1, 3) mg/ml. Successivamente, sono state fabbricate membrane composite sia random che allineate e caratterizzate, in modo da identificare l'effetto della nanoceria sulle caratteristiche morfologiche, chimico-fisiche, meccaniche e di stabilità. È stato inoltre testato il potere antiossidante delle nanofibre realizzate confrontandolo con quello delle fibre di controllo. Infine, sono stati effettuati test cellulari in vitro sulle membrane realizzate sfruttando le linee cellulari NIH/3T3 e SH-SY5Y.

A. Fabbricazione membrane elettrofilate

1. Nanofibre di controllo

Le immagini in microscopia SEM relative alle membrane a base di chitosano (indicate con RND CS) sono riportate in fig.34 ad ingrandimenti 2000x e 5000x. Le fibre appaiono omogenee, continue e disposte in maniera casuale. Le immagini al SEM sono state elaborate tramite il software ImageJ, da cui è stato osservato un diametro medio pari a 120 ± 36 nm. La distribuzione dei diametri è stata successivamente confrontata con quelle delle fibre caricate, ottenute ottimizzando il protocollo.

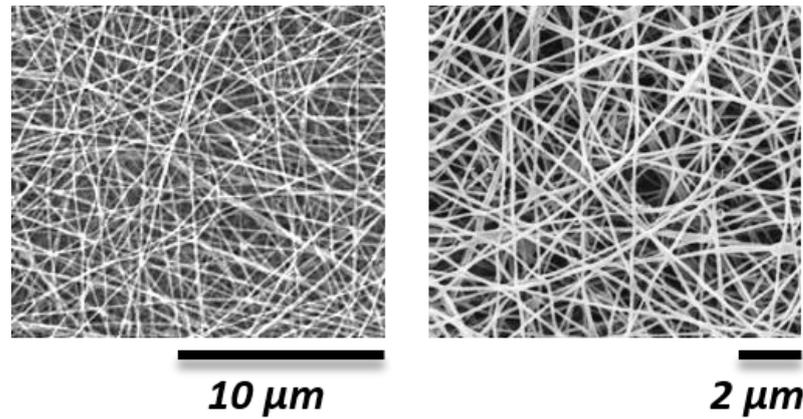


Figura 34. Immagine al SEM delle membrane elettrofilate random di controllo con ingrandimento 5000x.

2. Ottimizzazione del protocollo per fibre composite

Come già menzionato nel capitolo precedente, sono state testate varie modalità di dispersione delle nanoparticelle in soluzione, che vengono brevemente riportate:

- A.** NC sonicata in 4 ml di AA 0.5M in cui successivamente si solubilizza il CS;
- B.** NC in polvere inserita nella miscela CS/PEO e successivamente sonicata;
- C.** NC sonicata nel DMSO e aggiunta in soluzione
- D.** NC sonicata in 1 ml AA 0.5M e aggiunta in miscela
- E.** NC sonicata in 1 ml AA 0.5M e introdotta dopo il DSP
- F.** NC sonicata in 1 ml AA 0.5M e inserita dopo il DMSO

Le immagini al SEM (ingrandimento 2000x) delle nanofibre così ottenute sono confrontate in fig.35 per una concentrazione di NC in soluzione pari a 3 mg/ml. Tutte le membrane evidenziano una morfologia caratterizzata da fibre continue e disposte in maniera random, con difetti dovuti principalmente alla presenza di aggregati di nanoceria.

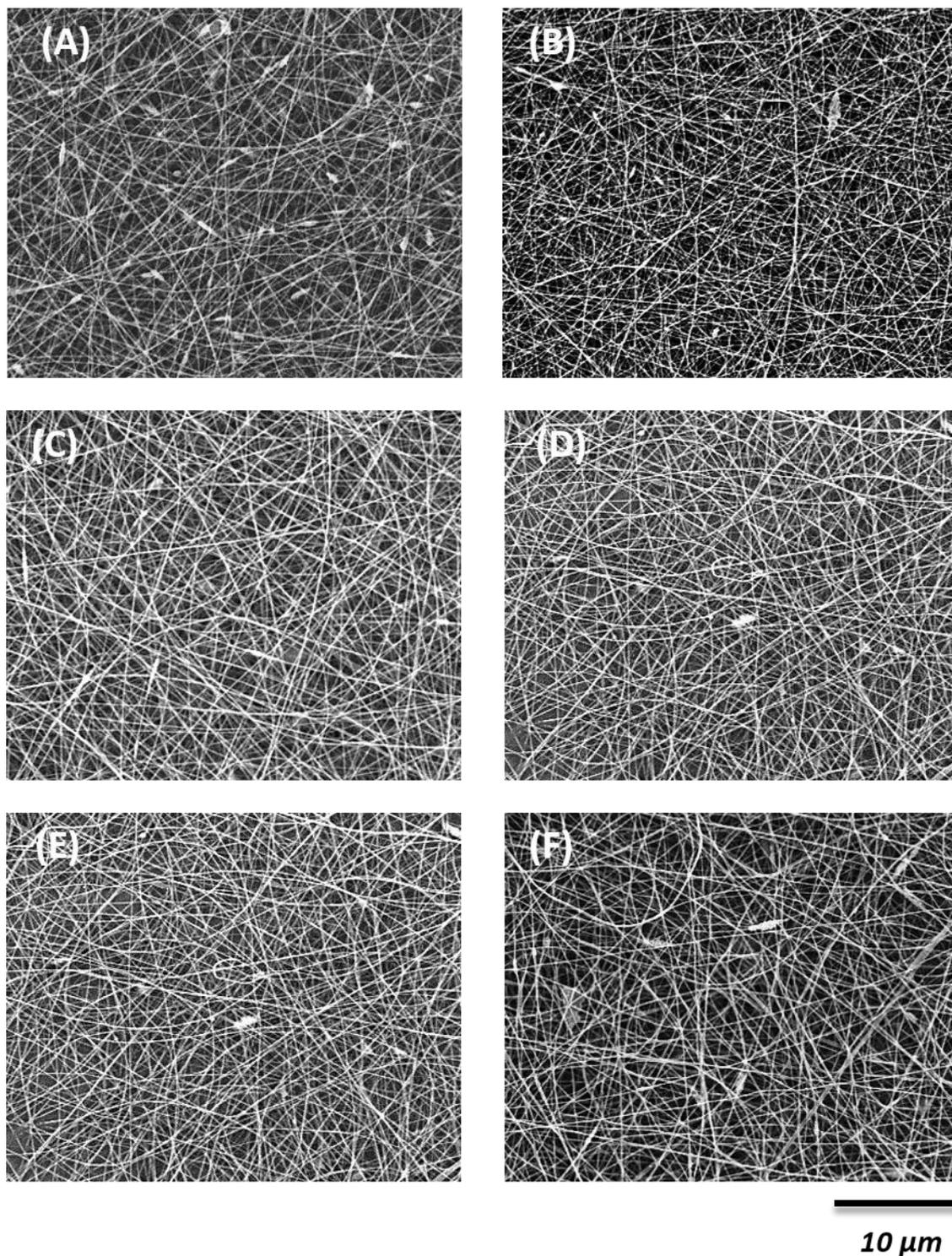


Figura 35. Immagini al SEM con ingrandimento 2000x delle membrane ottenute mediante i protocolli descritti sopra.

Tramite l'elaborazione delle immagini svolta con ImageJ ed Excel, si è calcolato per ogni modalità di dispersione il diametro medio delle nanofibre ottenute (riportati in Tabella 8).

| Diametro medio nanofibre (nm) | |
|--------------------------------------|----------|
| A | 122 ± 30 |
| B | 76 ± 22 |
| C | 132 ± 30 |
| D | 105 ± 30 |
| E | 127 ± 32 |
| F | 139 ± 32 |

Tabella 8. Diametri medi delle fibre ottenute tramite electrospinning per le varie procedure analizzate.

Dalle analisi morfologiche e dalle evidenze sperimentali, si evince la capacità di agglomerazione delle nanoparticelle in aggregati di dimensioni notevoli (spesso micrometriche) e la loro precipitazione se mantenute troppo tempo in agitazione.

Infatti, in fig.35(A), sono visibili numerosi aggregati aventi dimensioni elevate (24 h di agitazione della NC); il nanomateriale decanta anche seguendo la procedura B, per cui le membrane ottenute presentano fibre molto sottili (76 ± 22 nm) probabilmente dovute anche alla presenza di aggregati (fig.35(B)). Questi sono stati rilevati anche nell'immagine fig.35(D); inoltre, durante il processo di electrospinning, si è evidenziato come le nanoparticelle siano precipitate nella siringa. Tale separazione di fase è stata ritenuta responsabile della riduzione del diametro delle nanofibre rispetto a quello di controllo.

Dai risultati empirici, si è ritenuto opportuno limitare i tempi di agitazione della NC in soluzione, aggiungendola poco prima dell'elettrofilatura.

Nella procedura rappresentata in fig.35(E), gli aggregati di NC si dispongono lungo la stessa direzione delle fibre e sono meno numerosi. Nonostante ciò, sono stati riscontrati numerosi problemi durante il processo di elettrofilatura delle soluzioni realizzate secondo la modalità F, le cui membrane sono raffigurate in fig.35(F): la soluzione ottenuta era infatti poco viscosa, il processo è stato interrotto più volte a causa dei frequenti fenomeni di electrospray verificatisi.

Il processo C è stato quello che ha fornito risultati migliori: le membrane rappresentate in fig.35(C) appaiono infatti omogenee e continue; le fibre evidenziano una superficie leggermente rugosa, probabilmente dovuta alla presenza di NC. Infatti, i pochi agglomerati nanoparticellari riscontrati hanno dimensioni ridotte.

B. Caratterizzazione reologica delle soluzioni

Le soluzioni di controllo e quelle caricate con NC ad 1 mg/ml e 3 mg/ml sono state caratterizzate reologicamente.

- Dallo **strain sweep test**, rappresentato in fig.36, è possibile individuare la regione di viscoelasticità lineare, determinata dal plateau degli andamenti dei moduli.

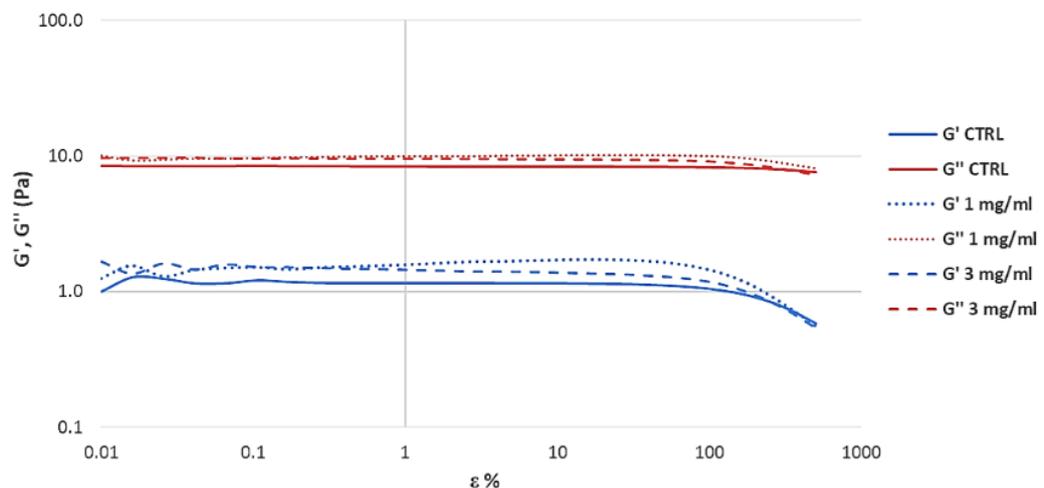


Figura 36. Grafico risultante dallo strain sweep test per tutte le soluzioni analizzate, a frequenza di oscillazione pari ad 1 Hz.

Per ogni soluzione, da 0.1% di deformazione fino al 100% circa, i due moduli risultano indipendenti dalla deformazione; superata una deformazione critica, il modulo elastico si riduce e le proprietà meccaniche della soluzione collassano del tutto. In tutti i casi analizzati, il modulo viscoso è maggiore di circa un ordine di grandezza rispetto al modulo elastico, per cui prevale il comportamento viscoso. Ciò è confermato dal fatto che la soluzione si mantenga liquida per tutta

la prova, per ogni deformazione imposta. In generale, non si riscontrano effetti reologici rilevanti della presenza di nanoparticelle sui moduli viscoelastici al variare dello strain applicato, se non un lieve aumento di entrambi i moduli.

Dal rapporto tra il modulo viscoso e il modulo elastico per ogni deformazione esaminata, è possibile ricavare indicazioni sulle forze della relativa soluzione colloidale. I valori ottenuti risultano sempre maggiori di 5, sintomo di una buona dispersione di nanoparticelle in soluzione. Inoltre, si noti che a basse deformazioni percentuali, il modulo elastico presenta delle oscillazioni e dei picchi, probabilmente dovuti al *disentanglement* incompleto delle catene polimeriche [141].

Da questo test, si ricava uno *strain* appartenente alla regione di viscoelasticità, che verrà utilizzato per effettuare le prove successive. In particolare, si sceglie una deformazione percentuale pari all'1%, in modo da condurre il frequency sweep test senza indurre il collasso delle proprietà meccaniche del campione.

- La **risposta in frequenza** dei moduli per tutte le soluzioni è rappresentata in fig.37. Per tutte le soluzioni testate, il comportamento viscoso è sempre prevalente rispetto a quello elastico: ciò indica l'assenza di transizione sol-gel alla temperatura di prova.

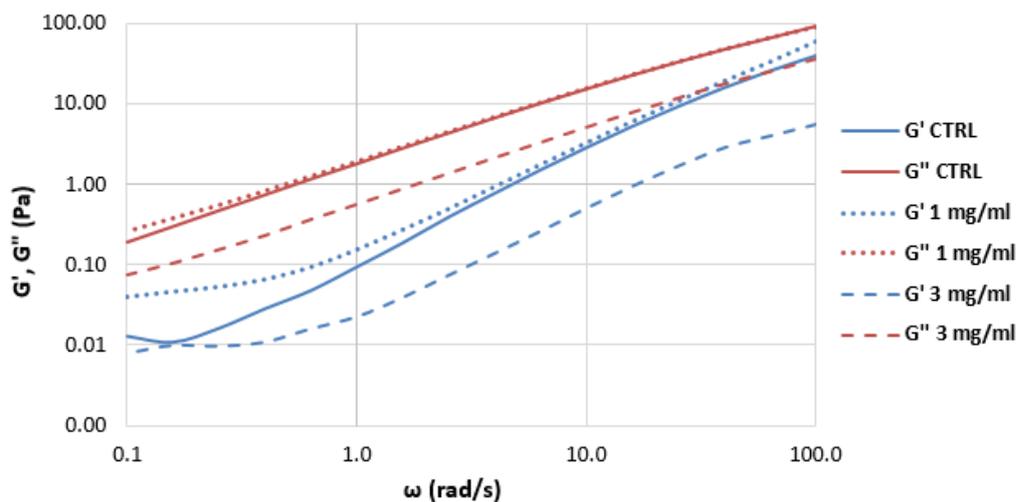


Figura 37. Risposta in frequenza ottenuta tramite il frequency sweep test per tutte le soluzioni analizzate.

Dalle evidenze sperimentali si evince che i moduli viscosi della soluzione di controllo e di quella caricata ad 1 mg/ml presentano andamenti simili; differenze maggiori si riscontrano nell'analisi dei moduli elastici. Infatti, alle basse frequenze, la soluzione composita ad 1 mg/ml risulta avere proprietà più elastiche rispetto al controllo, probabilmente a causa di aggregati nanoparticellari che si formano per le modalità della prova.

La soluzione contenente un quantitativo superiore di NC presenta moduli viscoelastici inferiori agli altri due. Questo risultato non è concorde con le evidenze riscontrate da numerosi autori, per cui all'aumentare della concentrazione di nanoparticelle in dispersione, si assiste all'incremento di entrambi i moduli [142].

- L'analisi reologica si è conclusa confrontando l'andamento della **viscosità** delle soluzioni testate in funzione della shear rate, ottenendo la *flow curve* in fig.38.

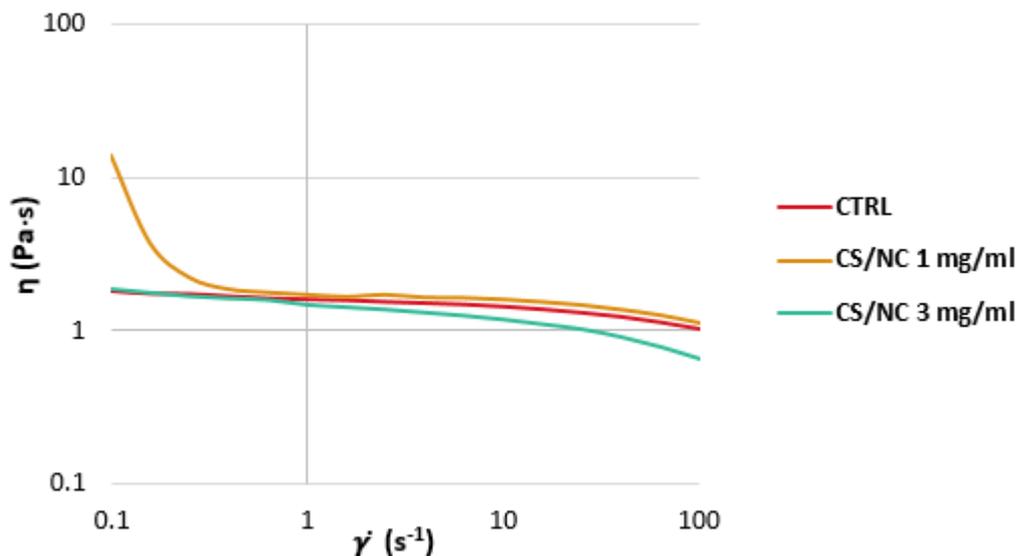


Figura 38. Flow curve per la soluzione di controllo e le dispersioni in chitosano di NC a 1mg/ml e 3 mg/ml.

I fluidi in esame presentano un comportamento non-newtoniano: la viscosità decresce all'aumentare della shear rate, secondo un andamento *shear thinning*, tipico dei fluidi viscoelastici. Alle basse velocità di deformazione, la soluzione di controllo e quella a 3 mg/ml mostrano il caratteristico plateau Newtoniano, assente nell'altra dispersione.

Numerosi autori hanno dimostrato che concentrazioni crescenti di nanomateriale in soluzione consentono di aumentare la viscosità a causa del moto del materiale e delle interazioni tra i materiali che favoriscono l'*entanglement* delle catene. Inoltre, la presenza di aggregati, plausibili nelle condizioni valutate, promuove l'incremento della viscosità stessa [143]. La soluzione a concentrazione 1 mg/ml conferma questi risultati, presentando viscosità superiore rispetto al controllo, soprattutto alle basse shear rate.

Altri autori hanno però osservato che qualora la dispersione analizzata presenti polimeri aventi catene lunghe o ingombranti per la reticolazione, la viscosità tende a diminuire per alcune concentrazioni di NP adoperate. Infatti, se le dimensioni delle macromolecole in soluzione sono confrontabili con quelle delle NP, allora per passare attraverso i gap che si formano tra queste ultime, le catene polimeriche riducono la propria estensione e subiscono *disentanglement* limitando la loro reticolazione [144]. La soluzione presenta quindi minore viscosità: è lecito supporre che ciò avvenga alla concentrazione di 3 mg/ml per l'elevata quantità di nanomateriale presente.

È stata approssimata la shear rate $\dot{\gamma}$ sulle pareti dell'ago in corrispondenza delle condizioni di flusso imposte nel processo di electrospinning:

$$\dot{\gamma} = \frac{4Q}{\pi r^3}$$

in cui Q è la portata volumetrica fissata a 1.8 ml/h, r è il raggio dell'ago utilizzato pari a 0.4 mm. Il valore ottenuto è circa pari a 9.95 s⁻¹: dal grafico la viscosità risulta pressappoco la stessa per le tre soluzioni analizzate.

C. Caratterizzazione delle membrane

1. Membrane random CS/NC

a) Caratterizzazioni morfologiche superficiali

Microscopia SEM

Nella figura sottostante sono riportate le immagini in microscopia SEM ottenute con la procedura ottimizzata a partire da soluzioni con concentrazione di NC pari a 1 mg/ml (indicate con il codice RND CS/NC 1) in fig.39(a), (b) e pari a 3 mg/ml (indicate con il codice RND CS/NC 3) in fig.39(c), (d) rispettivamente ad ingrandimenti 2000x e 5000x. Le immagini mostrano fibre continue e disposte in maniera casuale. Per concentrazioni superiori di nanomateriale, si evidenzia un numero maggiore di aggregati aventi dimensioni più elevate rispetto a quelli osservati nelle immagini delle fibre in RND CS/NC 1. Per queste ultime, la presenza di NC può essere riscontrata dalla presenza di rugosità superficiale delle fibre.

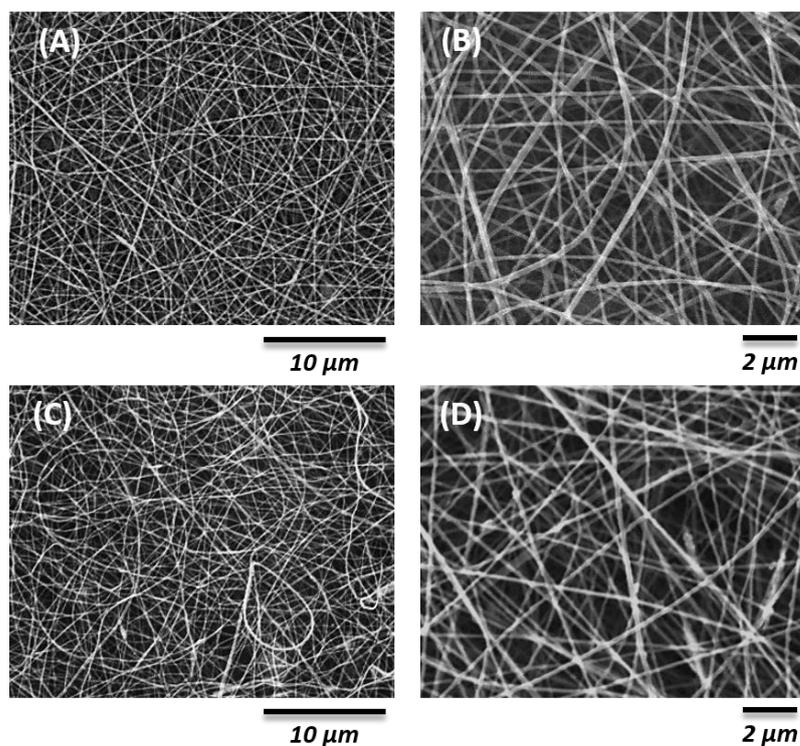


Figura 39. Immagini al SEM delle nanofibre composite RND CS/NC 1 a 2000x (a) e 5000x (b), e RND CS/NC 3 a 2000x (c) e 5000x (d).

Dall'elaborazione dei dati ottenuti tramite ImageJ, è stato possibile ricavare la distribuzione dei diametri per le fibre random di controllo e per quelle caricate con gli agenti antiossidanti alle due concentrazioni testate (fig.40).

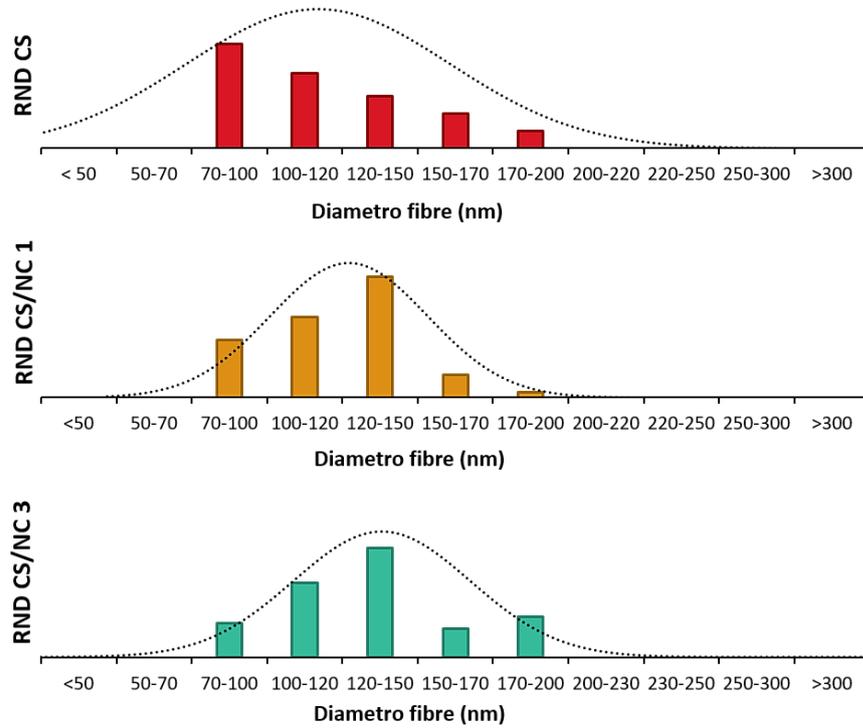


Figura 40. Distribuzione dei diametri delle fibre delle membrane random di controllo e composite.

Inoltre, si riportano in Tabella 9 i valori dei diametri medi delle fibre realizzate e delle porosità delle membrane elettrofilate.

| | Diametro fibre (nm) | Diametro pori (nm) |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| <i>RND CS</i> | 120 ± 37 | 553 ± 164 |
| <i>RND CS/NC 1</i> | 123 ± 24 | 561 ± 174 |
| <i>RND CS/NC 3</i> | 132 ± 30 | 567 ± 175 |

Tabella 9. Diametri medi delle fibre e dei pori relativi alle membrane random di controllo e composite.

Tutte le tipologie di fibre analizzate presentano diametri aventi dimensioni comprese tra 70 nm e 200 nm. Per quelle caricate con nanoparticelle, i diametri sono maggiormente concentrati nel range 120-150 nm; invece i diametri delle membrane di controllo si assestano su valori inferiori. Analogamente, confrontando i dati in Tabella 9, si osserva che

le nanofibre RND CS/NC 3 presentano diametri medi leggermente più elevati rispetto a quelle RND CS e alle RND CS/NC 1. Ciò può essere giustificato esaminando morfologicamente le membrane ottenute: la NC, spesso sotto forma di aggregati, viene internalizzata dalle fibre.

In tutte le immagini riportate, soprattutto quelle con ingrandimento 2000x, è possibile osservare una porosità interconnessa: l'arrangiamento delle fibre è molto fitto e i diametri medi dei pori aumentano leggermente incrementando la concentrazione del nanomateriale. Quindi, si attesta una maggiore porosità delle membrane caricate rispetto a quelle di controllo, seppur non particolarmente significativa.

Spettroscopia EDX

Le indagini in spettroscopia EDX hanno consentito di valutare la presenza dell'ossido di cerio nelle membrane realizzate. In fig.41 sono rappresentati gli spettri EDX relativi alle membrane RND CS, RND CS/NC 1 e RND CS/NC 3.

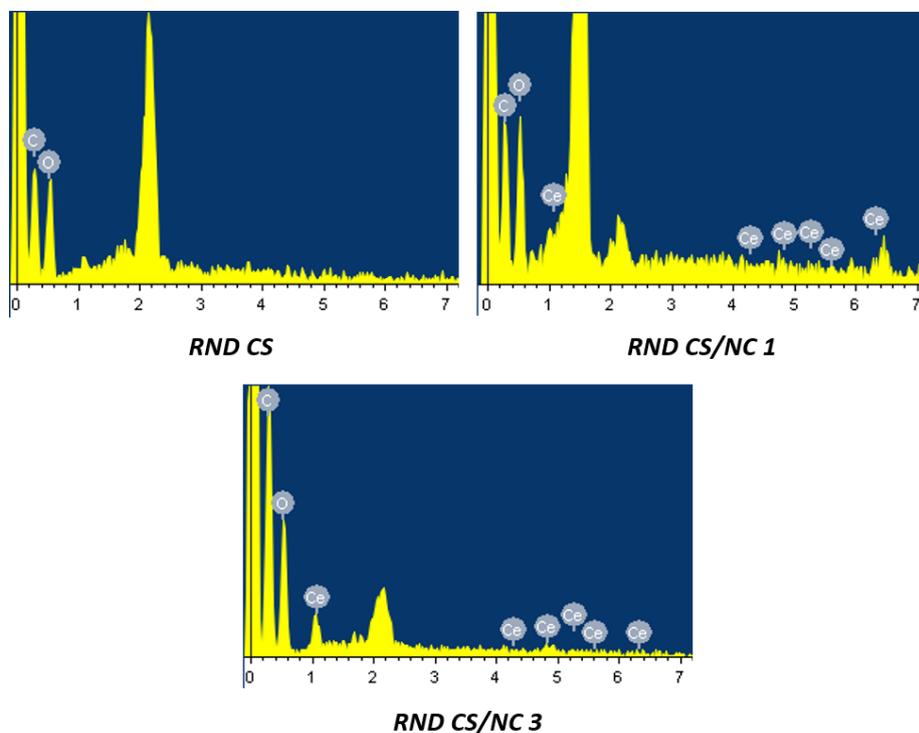


Figura 41. Spettri EDX delle membrane RND CS, RND CS/NC 1 e RND CS/NC 3.

Per ognuno di questi, si osserva la presenza dei picchi corrispondenti a carbonio (C) e ossigeno (O), dovuti principalmente al chitosano e al PEO. Per le fibre caricate, si evidenziano anche i picchi caratteristici del cerio (Ce), determinanti per accertare la presenza della nanoceria nelle fibre realizzate. In Tabella 10 sono riportati i contenuti percentuali degli elementi presenti nelle membrane polimeriche fabbricate. Si può osservare che i contenuti di cerio per le RND CS/NC 3 sono maggiori rispetto alle RND CS/NC 1, confermando la maggior quantità di NC nelle fibre.

| | %peso | | | % atomica | | |
|-----------|--------|-------------|-------------|-----------|-------------|-------------|
| | RND CS | RND CS/NC 1 | RND CS/NC 3 | RND CS | RND CS/NC 1 | RND CS/NC 3 |
| <i>C</i> | 51.57 | 43.76 | 41.15 | 58.65 | 51.61 | 49.4 |
| <i>O</i> | 48.43 | 54.45 | 55.77 | 41.35 | 48.21 | 50.28 |
| <i>Ce</i> | - | 1.79 | 3.08 | - | 0.18 | 0.32 |

Tabella 10. Percentuali in peso e atomiche rappresentative della quantità di carbonio, ossigeno e cerio registrate nelle membrane random elettrofilate.

b) Caratterizzazione chimico/fisica

Gli spettri FTIR-ATR della NC in polvere e delle membrane RND CS, RND CS/NC 1 e RND CS/NC 3, vengono riportati in fig.42. Le membrane allineate non sono state caratterizzate tramite FTIR-ATR perché non ci sono differenze a livello chimico tra le soluzioni utilizzate per le fibre random e allineate [137].

Nello spettro della NC è possibile identificare due picchi di assorbimento caratteristici della NC ovvero quelli a 3400 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} , relativi rispettivamente all'adsorbimento dell'acqua e allo stretching $\nu\text{O-H}$. La presenza di questi atomi potrebbe dipendere dalle modalità di sintesi delle nanoparticelle, così come i picchi di assorbimento a 1380 cm^{-1} associati allo stretching del legame N-O [145]. Analogamente i picchi di assorbimento a 1420 cm^{-1} e a 1330 cm^{-1} sono rappresentativi del bending dei legami O-H. Dai risultati presenti in letteratura, la nanoceria esibisce una banda di assorbanza a 550 cm^{-1} per lo stretching del legame Ce-O [145]. A causa del ristretto range di numeri d'onda che è stato

possibile impostare sullo strumento, questo picco non compare nello spettro riportato in fig.42.

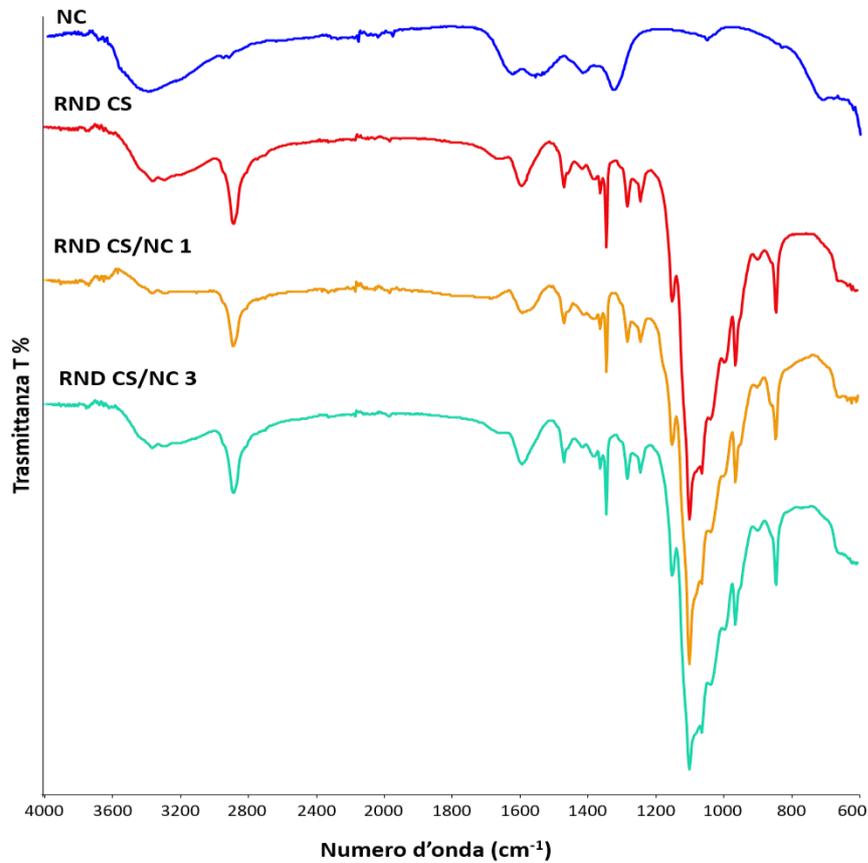


Figura 42. Spettri FTIR della NC in polvere e delle membrane realizzate.

Lo spettro delle membrane RND CS è stato analizzato e confrontato con altri presenti in letteratura. Non si riscontrano notevoli differenze tra quanto proposto da Tonda-Turo e colleghi [137] e gli spettri ottenuti. Infatti, si evidenzia la presenza dei picchi caratteristici del CS e del PEO, ma soprattutto di quelli relativi allo stretching del legame S=O a 1074 cm^{-1} per l'aggiunta del DMSO e del *crosslinking* effettuato a 1060 cm^{-1} (νPO_3), 995 cm^{-1} ($\delta\text{O-P-O}$) e 850 cm^{-1} ($\nu\text{P-OH}$).

Gli spettri dei campioni RND CS/NC 1 e RND CS/NC 3 risultano simili a quelli del campione RND CS. Attraverso questa tecnica non è possibile quindi identificare la presenza della NC all'interno dei campioni analizzati in quanto la NC stessa si presenta in forma cristallina [146].

c) Caratterizzazione meccanica

I dati ottenuti dalle prove di trazione per le membrane RND CS, RND CS/NC 1 e RND CS/NC 3 sono stati elaborati tramite Excel. Per individuare l'effetto della nanoceria sulle proprietà meccaniche delle fibre, sono stati confrontati i valori medi della rigidità E, della tensione ultima a trazione UTS e della deformazione percentuale a rottura $\epsilon\%$, riportati in Tabella 11.

| | <i>RND CS</i> | <i>RND CS/NC 1</i> | <i>RND CS/NC 3</i> |
|------------------|---------------|--------------------|--------------------|
| <i>E (MPa)</i> | 69 ± 11 | 71 ± 12 | 73 ± 17 |
| <i>UTS (MPa)</i> | 2 ± 1 | 2 ± 1 | 3 ± 1 |
| <i>ε (%)</i> | 4 ± 1 | 4 ± 1 | 7 ± 2 |

Tabella 11. Modulo elastico, UTS e deformazione percentuale di rottura mediati delle fibre RND CS, RND CS/NC 1 e RND CS/NC 3.

Dai risultati ottenuti è possibile osservare come i moduli di Young delle tre tipologie di campioni siano circa simili. Incrementi significativi sono rilevati per l'UTS e per la deformazione percentuale a rottura, più elevati nelle membrane RND CS/NC 3 rispetto alle altre due tipologie. Non si evidenziano significative variazioni nei valori medi dell'UTS e di $\epsilon\%$ per le membrane RND CS e RND CS/NC 1.

In fig.43 sono riportate delle curve sforzo-deformazione ottenute dalle prove effettuate, ma non completamente rappresentative dei valori medi di E, UTS e $\epsilon\%$ ricavati e descritti precedentemente.

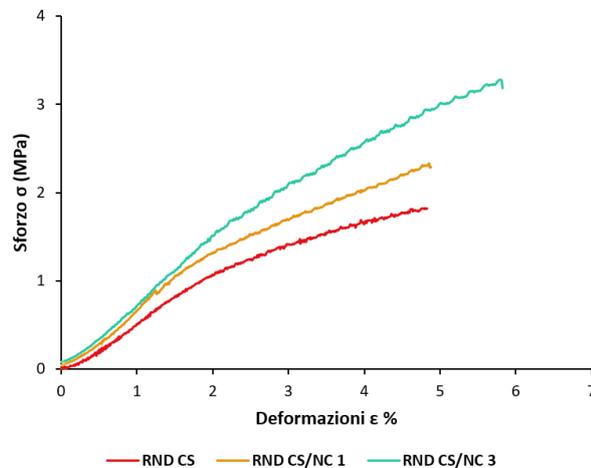


Figura 43. Curve sforzo-deformazione relative alle membrane random realizzate.

Dai risultati ottenuti si può dedurre che la presenza della NC migliora le proprietà meccaniche delle fibre, soprattutto per concentrazioni superiori di nanomateriale. Ciò è concorde con i dati presenti in letteratura, per cui incrementando la quantità di nanoparticelle presenti, le proprietà meccaniche delle membrane elettrofilate aumentano [147].

d) Prove di degradazione

Al fine di valutare la stabilità in ambiente fisiologico delle membrane random, sono state condotte a prove di degradazione, in PBS e in PBS e lisozima.

In fig.44 si riportano le immagini in microscopia SEM ad ingrandimento 5000x ottenute per i campioni incubati in PBS secondo i time step descritti precedentemente.

Dalle immagini ottenute è possibile osservare un lieve aumento della dimensione delle fibre a tempi di incubazione maggiori, attribuito ad uno *swelling* delle fibre che compongono le membrane; nelle immagini relative all'ultimo time step è evidente un accrescimento della percentuale di porosità delle membrane, tipico della degradazione in massa. Inoltre, si evince la presenza di difetti di dimensioni elevate nelle membrane di controllo, probabilmente di natura polimerica [148]. Nelle immagini relative alle membrane RND CS/NC 1 e RND CS/NC 3 si osservano degli aggregati di nanoparticelle: si suppone che questi dipendano dalle interazioni instaurate tra le nanoparticelle e gli ioni fosfato [54]. Confrontando le immagini relative al time step 7 d, le fibre non caricate mostrano una maggiore porosità rispetto alle altre, indice di una degradazione in massa più rapida.

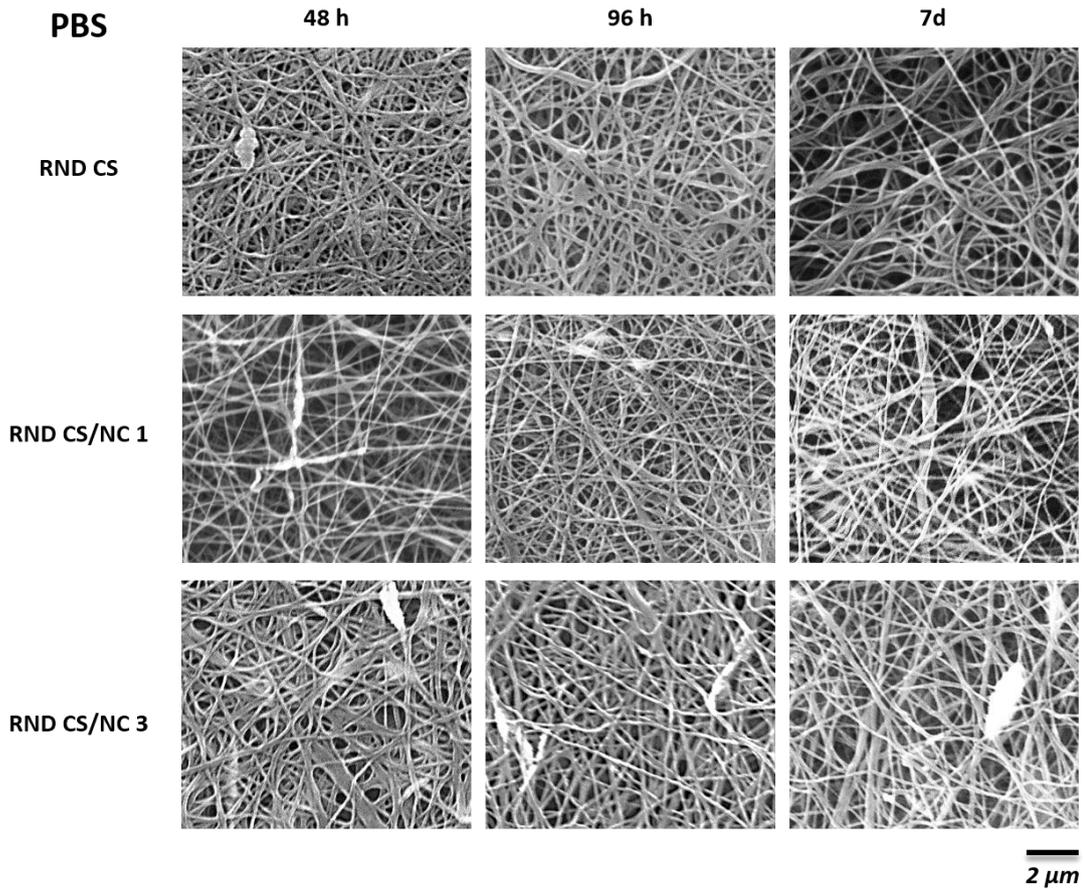


Figura 44. Immagini SEM ad ingrandimento 5000x delle membrane degradate secondo i time step stabiliti.

I diametri medi delle nanofibre RND CS, RND CS/NC 1 e RND CS/NC 3 a 7 giorni di incubazione hanno subito un incremento rispettivamente del 24%, 5% e 17% rispetto a quelli delle membrane nanofibrose non degradate. Dunque, è possibile dedurre che le fibre a base di solo chitosano risentano maggiormente degli effetti della degradazione in PBS rispetto alle fibre caricate.

I campioni incubati in PBS e lisozima e prelevati ai time step descritti sopra sono stati confrontati morfologicamente tra loro. Le relative immagini SEM ad ingrandimento 5000x sono riportate in fig.45.

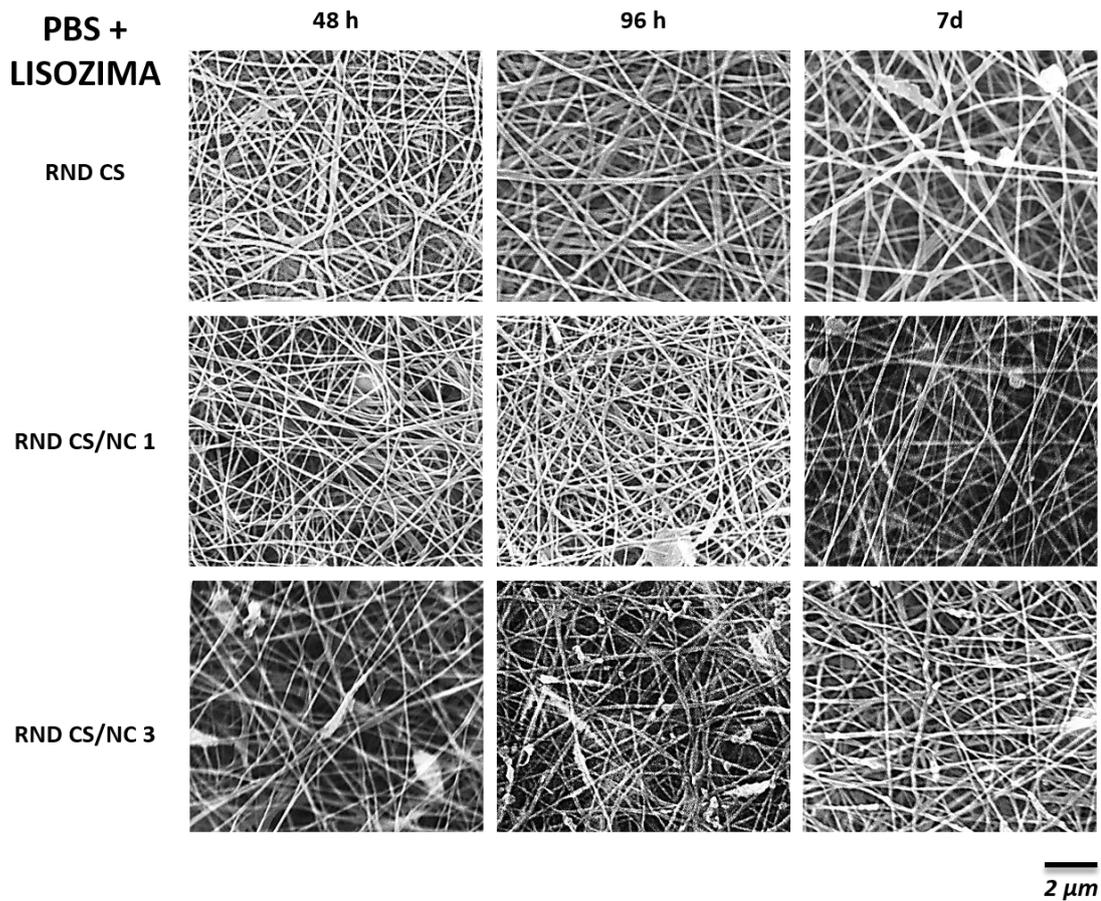


Figura 45. Immagini SEM con ingrandimento 5000x ai time step già descritti delle membrane RND CS, RND CS/NC e RND CS/NC 3 sottoposte a degradazione in PBS e lisozima.

In tal caso, la degradazione combina il meccanismo idrolitico con quello enzimatico.

Infatti, nelle RND CS, le fibre subiscono un incremento del diametro, da 131 ± 63 nm a 48 h a 173 ± 49 nm a 7 d. A questo si accompagna un aumento delle porosità, come ben visibile nell'immagine relativa a 7d; sono inoltre presenti aggregati polimerici dovuti alla degradazione.

Le nanofibre RND CS/NC 1 manifestano gli effetti del meccanismo degradativo soprattutto nelle immagini relative ai time step 96 h e 7d. A 96 h, si osserva come fibre di layer differenti siano fuse, ottenendo una matrice che presenta una porosità ridotta; a 7d sono visibili gli esiti della degradazione enzimatica superficiale: le nanofibre presentano un diametro ridotto, oltre ad essere poco continue e con difetti.

Le dimensioni delle fibre RND CS/NC 3 aumentano nel corso del processo: il diametro medio incrementa da 132 ± 30 nm a 180 ± 74 nm.

Infine, sono state confrontate le perdite percentuali in peso dei campioni in seguito al processo degradativo per individuare eventuali effetti della NC.

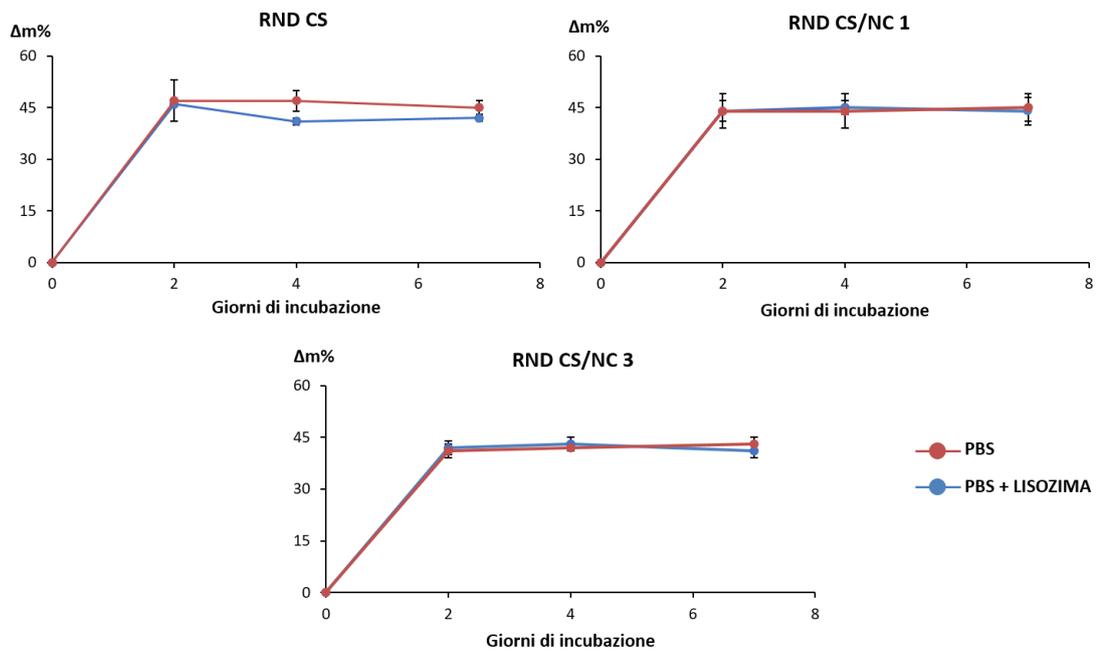


Figura 46. Variazione percentuale in peso dei campioni random immersi in PBS e in PBS e lisozima.

Dalla fig.46 è possibile osservare che le fibre RND CS in PBS perdono oltre il 40% della propria massa iniziale nelle prime 48 h, mantenendo poi peso suppergiù costante fino a 7 d.

Nel caso di incubazione in PBS e lisozima (PBS+LZ), invece, dopo un significativo decremento nelle prime 48 h, la perdita percentuale in peso si assesta su valori più bassi. L'elevata perdita di peso iniziale potrebbe dipendere dalla dissoluzione del PEO e dal rilascio di sali in PBS (che concorrono al peso totale dei campioni scarichi per il 45% e in misura minore al peso dei campioni di materiale composito): ciò è confermato da lavori precedenti, in cui una degradazione più efficace avviene sul lungo periodo [132]. Inoltre, poiché il LZ agisce sui legami glicosidici, si è osservato che la *weight loss* delle membrane

a base di chitosano in PBS + LZ è inferiore per CS aventi un grado di deacetilazione molto elevato, come quello utilizzato in questo lavoro di tesi ($\geq 92.6\%$) [149].

Nelle membrane RND CS/NC 1 e RND CS/NC 3 non si riscontrano significative differenze in termini di perdita di peso tra i campioni incubati in solo PBS e in PBS + LZ.

Confrontando gli andamenti relativi alle tre tipologie di membrane realizzate nel caso di incubazione in PBS, è possibile individuare una generale riduzione della *weight loss* all'aumentare della concentrazione di NC presente. Ciò è osservabile soprattutto raffrontando i dati delle fibre RND CS e RND CS/NC 3 riportati in Tabella 12. Tali risultati confermano quanto evidenziato dalla caratterizzazione morfologica descritta precedentemente: si può supporre che la presenza del nanomateriale induca una degradazione in massa più lenta rispetto alle membrane in solo CS.

Dai dati ricavati relativi all'incubazione in PBS + LZ, si può evincere una minor perdita di peso percentuale per le nanofibre RND CS/NC 3 rispetto alle altre tipologie nel breve periodo, a 48 h. Le membrane RND CS/NC 1 risentono degli effetti della degradazione più delle altre fibre a 96 h e 7 d, mostrando una maggiore *weight loss*.

| | $\Delta m\% \text{ PBS}$ | | | $\Delta m\% \text{ PBS} + \text{LZ}$ | | |
|-------------|--------------------------|-------------|-------------|--------------------------------------|-------------|-------------|
| | RND CS | RND CS/NC 1 | RND CS/NC 3 | RND CS | RND CS/NC 1 | RND CS/NC 3 |
| 48 h | 47 \pm 6 | 44 \pm 5 | 41 \pm 2 | 46 \pm 0 | 44 \pm 3 | 42 \pm 2 |
| 96 h | 47 \pm 3 | 44 \pm 5 | 42 \pm 1 | 41 \pm 1 | 45 \pm 2 | 43 \pm 2 |
| 7 d | 45 \pm 2 | 45 \pm 4 | 43 \pm 2 | 42 \pm 1 | 44 \pm 4 | 41 \pm 2 |

Tabella 12. Perdita di peso percentuale delle membrane incubate in PBS e PBS + LZ ai time point 48 h, 96 h e 7 d.

Come riportato da lavori presenti in letteratura, le nanoparticelle influiscono sulla degradazione in vitro del materiale polimerico a cui sono incorporate. Diaz et al. [150] hanno confrontato la degradazione subita da scaffold porosi a base di solo DGLA e di DLGA/nHA (nanoidrossiapatite). In tal caso, il nanomateriale riduce la *degradation rate* e la perdita di peso percentuale in PBS, poiché agisce da barriera, limitando la diffusione di acqua nel substrato.

e) Prove antiossidanti

Le membrane random realizzate sono state testate per valutarne il potere antiossidante sfruttando il kit descritto precedentemente. Una volta ottenuta la curva di calibrazione per il Trolox (in fig. 47(A)), l'assorbanza dei campioni è stata ottenuta in termini di nmol di Trolox equivalenti rispetto al volume considerato. I risultati ottenuti sono riassunti in fig.47(B).

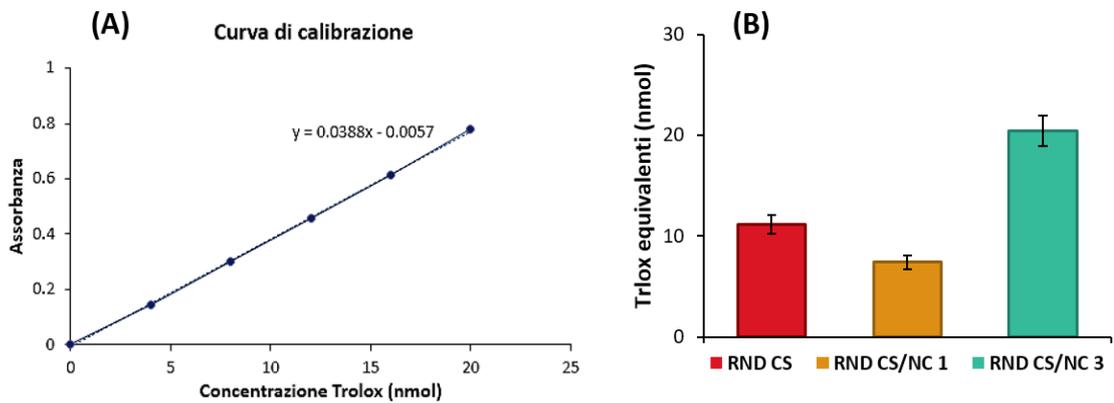


Figura 47. Curva di calibrazione ottenuta a partire dai campioni a diverse concentrazioni di Trolox (A) e potere antiossidante delle fibre realizzate in termini di Trolox equivalenti (B).

Dall'istogramma in fig.47(B), è possibile osservare il potere antiossidante delle fibre realizzate. Risulta evidente che le fibre RND CS/NC 3 posseggano una capacità antiossidante superiore dovuta al maggior quantitativo di nano-materiale caricato. Le membrane RND CS e RND CS/NC 1 presentano valori circa simili, per cui si può supporre che la quantità di NC immagazzinata non sia sufficiente ad indurre variazioni significative rispetto al campione scarico. Inoltre, è da considerare che il chitosano possiede un potere antiossidante intrinseco, come rilevato dalla prova.

f) Test di coltura cellulare

I risultati dei test di vitalità condotti su cellule coltivate sulle membrane RND CS e RND CS/NC 3 sono riportati in fig.48(A) per la linea cellulare 3T3 e in fig.48(B) per la linea

cellulare SHSY-5Y. I valori di assorbanza misurati dal plate reader sono stati normalizzati per quello di un substrato di controllo CTRL.

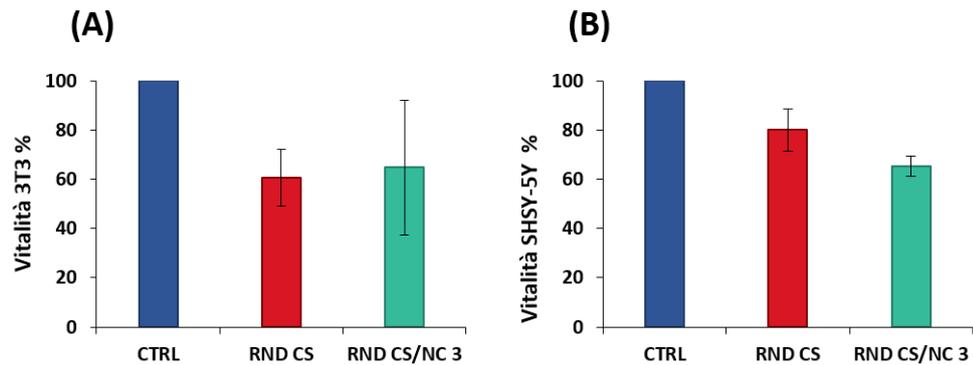


Figura 48. Percentuali di vitalità delle cellule delle linee 3T3 (A) e SHSY-5Y (B) coltivate sulle membrane RND CS e RND CS/NC 3 a 24 h.

Dalle immagini non è possibile riscontrare differenze significative nelle percentuali di vitalità delle cellule 3T3 calcolate tra le membrane RND CS e RND CS/NC 3. Per la linea cellulare derivata da neuroblastoma, si verifica un leggero decremento di vitalità tra le cellule coltivate sulle fibre RND CS/NC 3 e quelle seminate su solo chitosano. Inoltre, si attesta una maggiore vitalità percentuale delle cellule SHSY-5Y alle cellule 3T3. In entrambi i casi, si dimostra che le membrane realizzate non sono citotossiche per le linee cellulari analizzate.

2. Membrane allineate CS/NC

a) *Microscopia SEM*

In fig.49 sono riportate le immagini al SEM ad ingrandimenti 2000x e 5000x delle fibre allineate di controllo (indicate come ALL CS) e caricate con NC a 1 mg/ml e 3 mg/ml (indicate rispettivamente come ALL CS/NC 1 e ALL CS/NC 3) ottenute secondo il protocollo ottimizzato.

Le fibre appaiono poco omogenee, probabilmente a causa della tecnica utilizzata per la loro deposizione: all'inizio del processo si adagiano in maniera anisotropa, formando un

layer di fibre allineate tra i due collettori. In seguito, questo spessore di fibre cariche colma il gap tra i collettori, fornendo un supporto alla deposizione casuale delle fibre.

Morfologicamente, le fibre subiscono stretching, come visibile nelle immagini in basso. Questo dipende dalle elevate forze elettrostatiche generate agli estremi delle fibre che si allineano, nel caso di gap superiori ad 1 cm [151].

Sono ben visibili in fig.49(D) degli aggregati nanoparticellari di piccole dimensioni intorno alle fibre, relativi alle fibre ALL CS/NC 1: per concentrazioni superiori, risulta difficile distinguere particelle di nanomateriale tra le fibre ad ingrandimento 5000x per la presenza di numerosi difetti. È possibile osservare però, la presenza di aggregati di nanoceria nelle immagini ad ingrandimento inferiore.

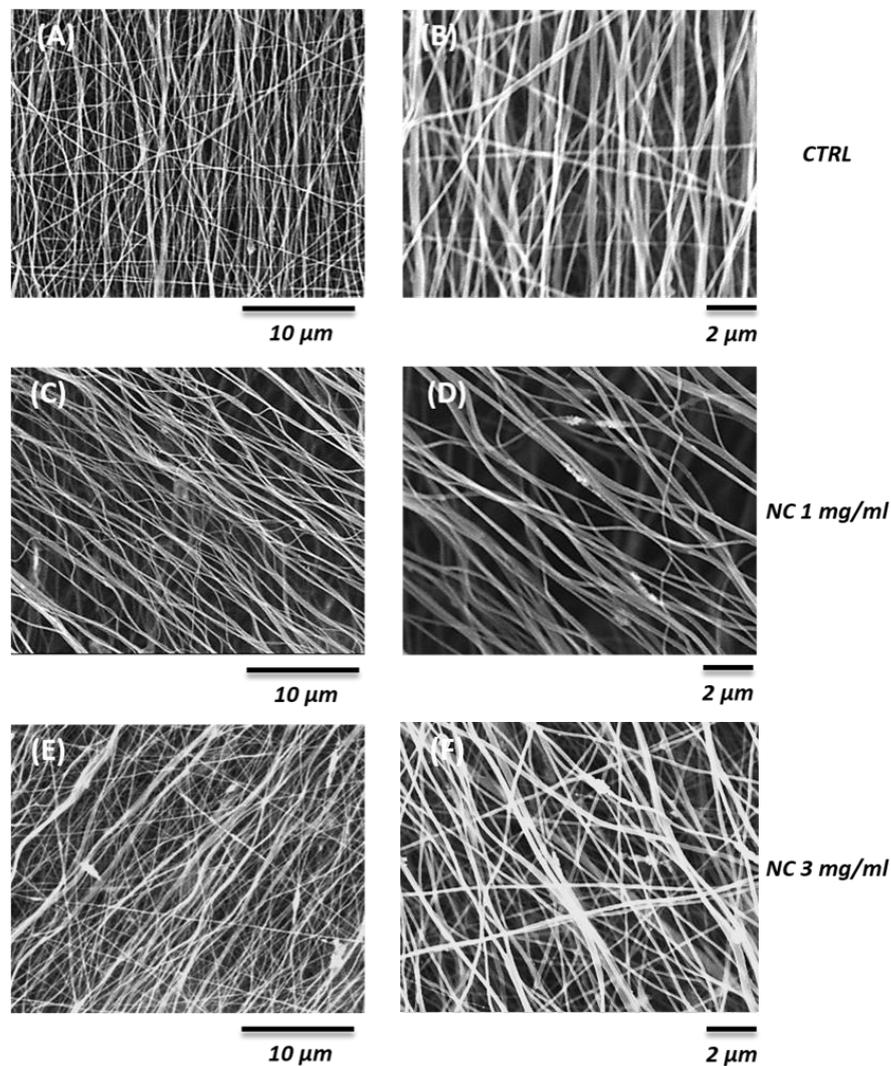


Figura 49. Immagini SEM delle membrane allineate di controllo 2000x (A) e 5000x (B), caricate con 1mg/ml di nanoceria a 2000x (C) e 5000x (D) e caricate con 3 mg/ml a 2000x (E) e 5000x (F).

I dati acquisiti dalle immagini tramite ImageJ sono stati elaborati tramite Excel, al fine di ottenere la distribuzione dei diametri delle fibre realizzate, in fig.50.

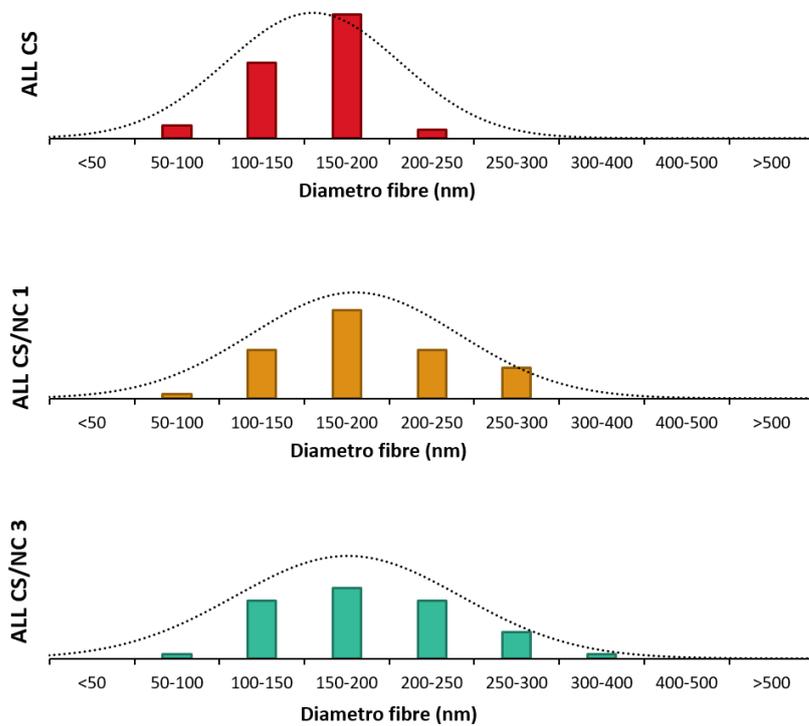


Figura 50. Distribuzione diametri delle fibre allineate di controllo e caricate con 1 mg/ml e 3 mg/ml di NC.

Mediante Excel sono stati calcolati i diametri medi delle fibre e le dimensioni medie dei pori dalle immagini in microscopia SEM. I valori sono riportati in Tabella 13.

| | Diametro fibre (nm) | Diametro pori (nm) |
|--------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| <i>ALL CS</i> | 157 ± 35 | 620 ± 195 |
| <i>ALL CS/NC 1</i> | 190 ± 47 | 622 ± 207 |
| <i>ALL CS/NC 3</i> | 187 ± 52 | 582 ± 183 |

Tabella 13. Diametri medi delle fibre e delle porosità relativi alle membrane allineate realizzate, sia di controllo che composite.

Dalle distribuzioni dei diametri, è possibile osservare che tutte le tipologie di fibre allineate analizzate presentano diametri compresi tra 70 nm e 200 nm, così come le fibre

random precedentemente esaminate. Le membrane di controllo mostrano diametri maggiormente concentrati nel range 70-120 nm; invece quelli relativi alle membrane composite sono distribuiti principalmente tra 100 nm e 150 nm. I dati riportati in Tabella 13 indicano un incremento del diametro medio delle fibre in relazione all'aggiunta di nanomateriale, ma non si riscontrano notevoli differenze al variare della concentrazione di NC. Le elevate variazioni delle dimensioni delle fibre dipendono probabilmente dallo stretching subito in fase di elettrofilatura, che è difficilmente controllabile.

Rispetto alle fibre random, si evidenziano dei diametri più elevati: ciò è concorde con altri risultati presenti in letteratura. Infatti, è stato dimostrato che non è possibile ottenere fibre allineate aventi diametri inferiori a 150 nm utilizzando questa tecnica: le fibre, per il peso eccessivo e le interazioni elettrostatiche che si sviluppano, tendono a rompersi o a depositarsi in maniera random [151].

Dai diametri dei pori non è possibile rilevare significative differenze tra fibre di controllo e quelle composite. In particolare, le fibre ALL CS/NC 3, la dimensione media dei pori è inferiore. Questo potrebbe essere però un effetto dei numerosi difetti riscontrati, tra cui la presenza di fibre non allineate depositate a causa dello spessore elevato del layer.

È stato valutato l'allineamento delle fibre sulle immagini riportate sopra, relative alle fibre allineate di controllo e a quelle ALL CS/NC 1 e ALL CS/NC 3. Dall'elaborazione effettuata con Excel, sono stati ottenuti i grafici rappresentati in fig.51.

Non si riscontrano variazioni significative nei tre casi, né per quanto riguarda la distanza tra i picchi, né relativamente all'intensità degli stessi. Si osserva però che i picchi sono maggiormente pronunciati nelle fibre di controllo e in quelle ALL CS/NC 1. Ciò potrebbe essere giustificato dai numerosi difetti riscontrati nelle membrane ALL CS/NC 3, tra cui la presenza di fibre non allineate probabilmente dovute allo spessore elevato del layer.

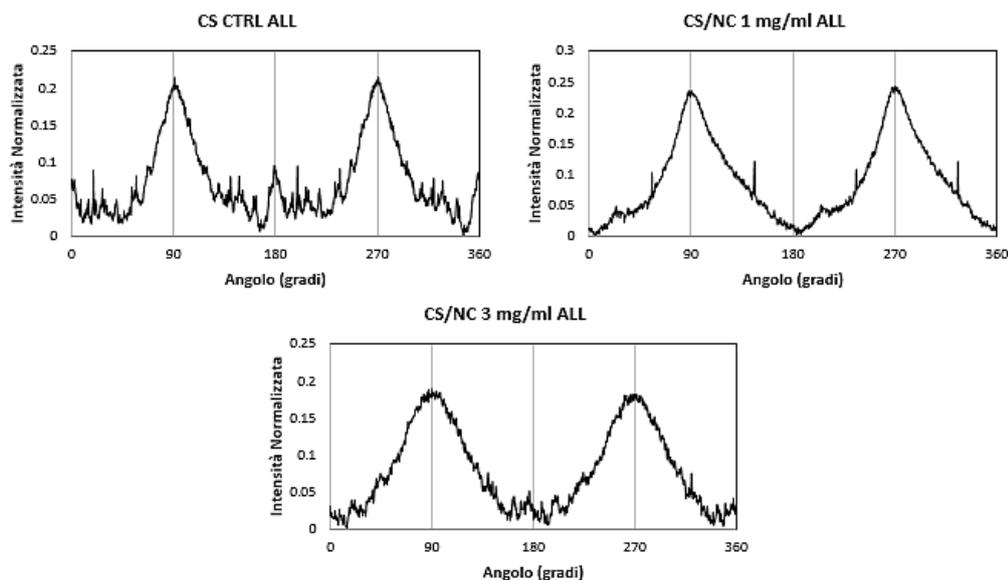


Figura 51. Spettri normalizzati della FFT sulle immagini SEM delle fibre allineate.

b) Spettroscopia EDX

Le membrane allineate sono state analizzate tramite spettroscopia EDX per individuarne la composizione chimica. Gli spettri EDX ottenuti sono riportati in fig.52.

Dall'immagine A si osserva la presenza dei picchi corrispondenti a carbonio (C) e ossigeno (O), utili per identificare la presenza del chitosano e del PEO. La presenza della NC è stata confermata dalla presenza del picco di assorbimento caratteristico del cerio (Ce), come visibile nelle immagini fig.52(B), (C) per le membrane ALL CS/NC 1 e ALL CS/NC 3.

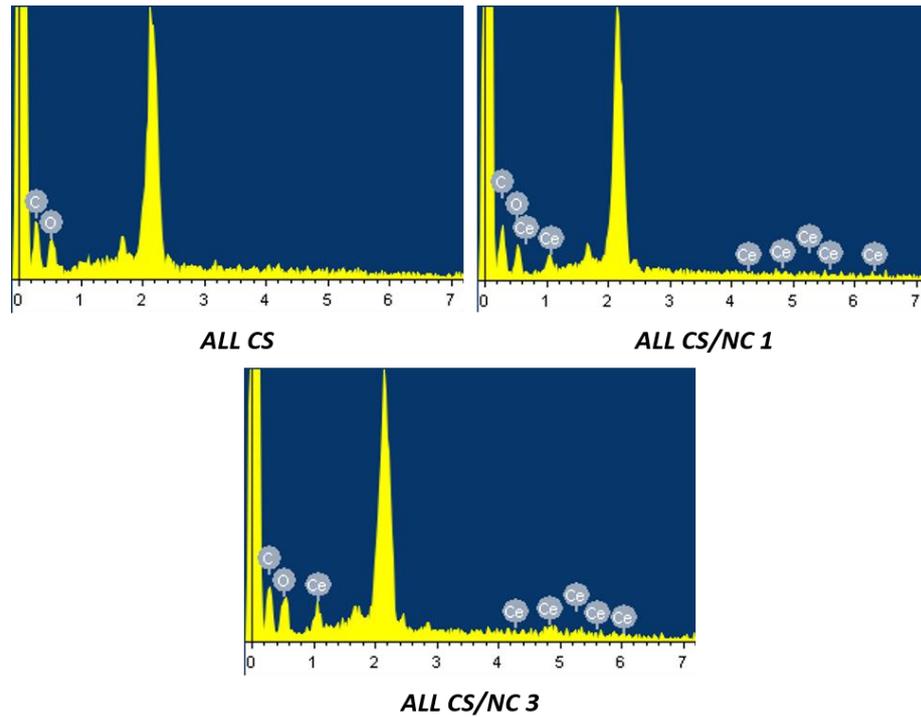


Figura 52. Spettri EDX che indicano le composizioni dei campioni ALL CS, ALL CS/NC 1 e ALL CS/NC 3.

Infine, in Tabella 14 sono riportate le percentuali composizionali delle membrane realizzate. Come ci si aspettava, il cerio è assente per le fibre di controllo, ma viene rilevato in quelle caricate. In particolare, è presente in percentuale maggiore nelle fibre ALL CS/NC 3 piuttosto che nelle ALL CS/NC 1, comprovando l'effettivo caricamento della NC nelle membrane, in quantità più elevata per concentrazioni maggiori.

| | %peso | | | % atomica | | |
|-----------|--------|-------------|-------------|-----------|-------------|-------------|
| | ALL CS | ALL CS/NC 1 | ALL CS/NC 3 | ALL CS | ALL CS/NC 1 | ALL CS/NC 3 |
| C | 51.57 | 48.58 | 45.37 | 58.65 | 57.09 | 55.45 |
| O | 48.43 | 48.28 | 47.77 | 41.35 | 42.59 | 43.83 |
| Ce | - | 3.13 | 6.87 | - | 0.32 | 0.72 |

Tabella 14. Componenti percentuali degli elementi delle membrane polimeriche elettrofilate.

c) Prove di degradazione

Le membrane ALL CS, ALL CS/NC 1 e ALL CS/NC 3, degradate sia in PBS che PBS e lisozima, sono state caratterizzate osservandone la morfologia a 48 h, 96 h e 7 d. Non è stato possibile prelevare membrane da pesare a causa dell'esiguità di materiale disponibile. Le immagini relative all'incubazione in PBS sono riportate in fig.53.

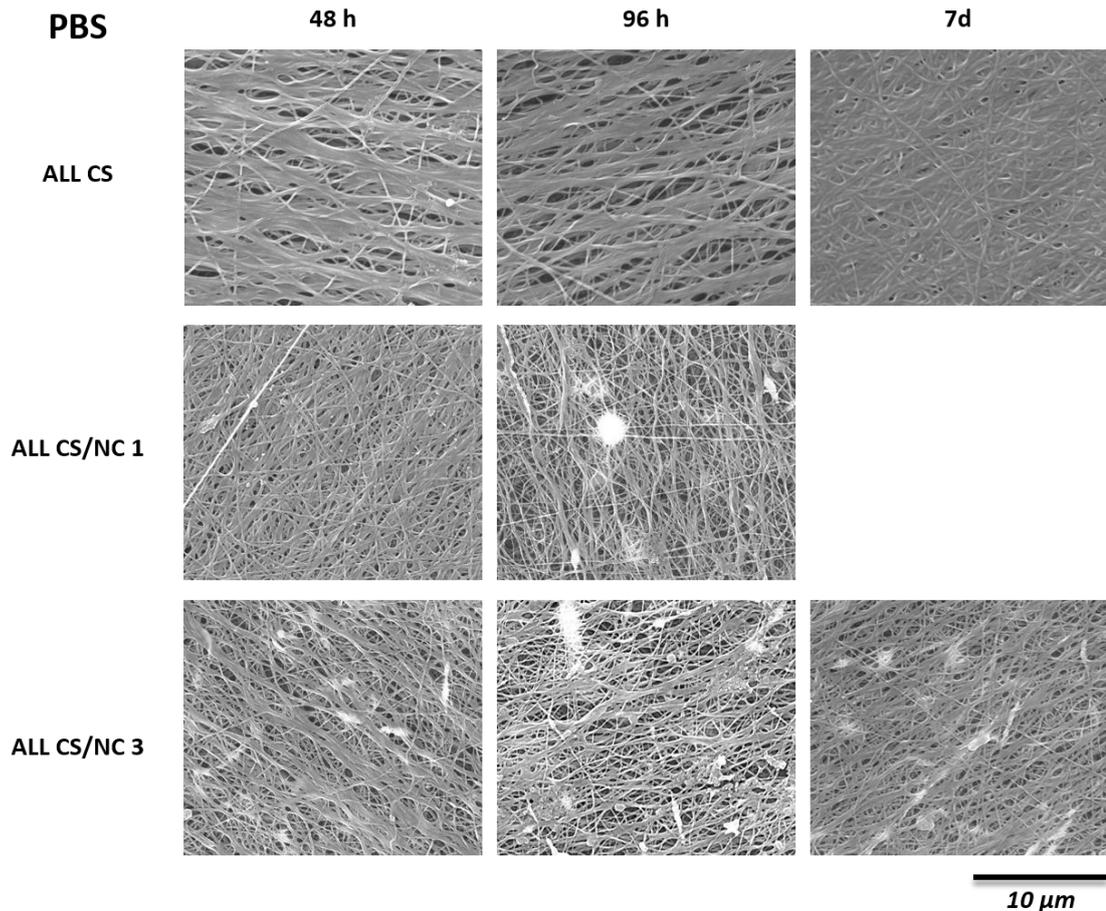


Figura 53. Immagini SEM con ingrandimento 5000x ai time point descritti sopra delle fibre ALL CS, ALL CS/NC 1 e ALL CS/NC 3 degradate in PBS.

Per tutte le membrane degradate, si osserva nelle immagini la formazione di aggregati di NC e polimerici, secondo quanto già descritto per fibre random.

Dalle immagini relative alle membrane ALL CS è evidente che in seguito alla degradazione, il materiale perda completamente la morfologia superficiale di partenza. Le fibre di layer differenti gradualmente collassano le une sulle altre, riducendo le porosità

presenti. Analizzando le immagini, è stata inoltre osservata una progressiva perdita dell'allineamento delle fibre, che si manifesta maggiormente a 7 d di incubazione.

Dall'analisi dimensionale dei diametri delle membrane ALL CS/NC 3 è possibile osservare un graduale incremento dei diametri delle fibre superficiali col procedere del tempo di incubazione attribuito probabilmente a *swelling*. Già dopo 96 h, si riscontra un aumento del 32% del diametro medio rispetto a quello calcolato in condizioni non degradate. In seguito, si assiste ad un aumento della porosità a causa della degradazione in massa e successivamente, ad un generale aumento del diametro delle fibre generato dal collasso della struttura su se stessa. Tramite analisi, si è evidenziato che già a 48 h le fibre mostrano un allineamento poco pronunciato, che nel corso della prova si riduce notevolmente.

Quindi, attraverso l'analisi morfologica delle membrane RND CS/NC 3 è possibile riscontrare come la presenza di NC riduca la velocità del processo di degradazione in PBS: le fibre scariche perdono quasi completamente la loro morfologia nei 7 d di incubazione.

Le immagini al SEM relative alle prove di degradazione condotte in PBS e lisozima (PBS+LZ) sono riportate in fig.54.

Per tutte le tipologie di membrane analizzate si osserva nelle immagini relative al primo time step uno *swelling* delle fibre: queste formano una struttura interconnessa, limitando le porosità.

Col progredire del processo, è possibile distinguere due trend diversi nelle fibre in esame. Nelle membrane ALL CS e ALL CS/NC 3 le porosità aumentano, per cui la soluzione salina riesce a penetrare nella struttura, degradandola internamente. Nelle immagini relative all'ultimo time step, è evidente l'effetto sinergico della degradazione enzimatica e idrolitica: le membrane subiscono erosione superficiale, le fibre risultano discontinue e dal diametro ridotto e la percentuale di porosità risulta aumentata rispetto ai time step precedenti.

In particolare, i diametri medi delle nanofibre ALL CS/NC 3 a 7 d sono leggermente inferiori rispetto a quelli delle fibre non degradate (rispettivamente 177 ± 60 nm e 187 ± 52 nm), il che è sintomo dell'effettiva degradazione superficiale. Inoltre, la struttura perde allineamento col progredire della prova, soprattutto tra 48 h e 7 d.

Non è stato possibile misurare i diametri delle fibre ALL CS a 48 h a causa del collasso delle fibre, ma osservando le immagini è evidente come vi sia una riduzione degli stessi. Tale fenomeno è stato invece accertato a 7 d di incubazione; in corrispondenza di tale time step si registra una riduzione del diametro da 261 ± 82 nm a 96 h, a 210 ± 56 nm a 7 d. Analizzando l'orientamento delle fibre, si è osservata una perdita dell'allineamento nel breve periodo, già a 48 h di incubazione.

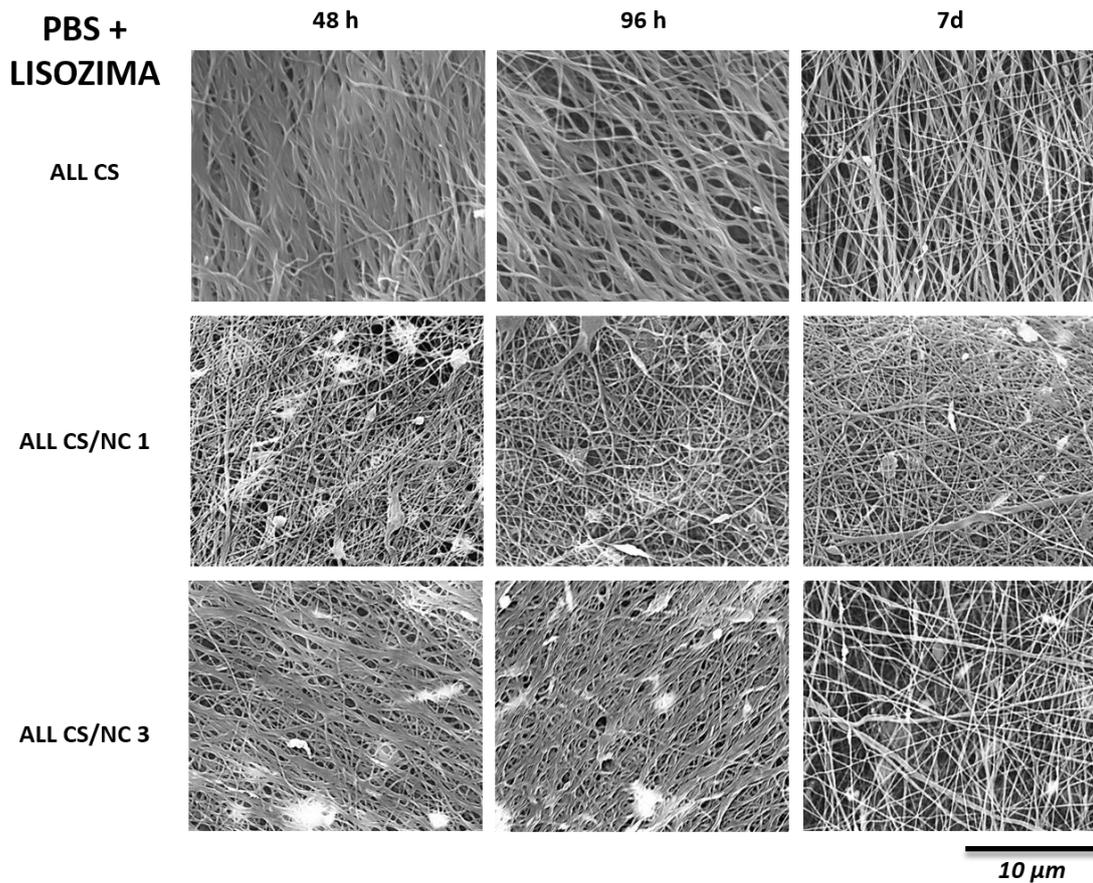


Figura 54. Immagini al SEM con ingrandimento 5000x delle membrane ALL CS, ALL CS/NC 1 e ALL CS/NC 3 degradate in PBS + LZ ai time step stabiliti.

L'altra tendenza è quella riscontrata nelle immagini relative alle membrane ALL CS/NC 1. Tali fibre appaiono più resistenti all'azione degradativa nel tempo, conservando maggiormente la morfologia superficiale. Infatti, non si osservano significative variazioni della porosità o dei diametri delle fibre: soltanto a 7 d, le fibre mostrano una dimensione

pari a 237 ± 103 nm, aumentando del 24% rispetto al diametro medio dei campioni non degradati. Dall'analisi dell'orientazione, si denota la mancanza di allineamento già a 48 h.

Dai risultati ottenuti si può dedurre quindi che la presenza della NC dispersa a concentrazione pari a 1 mg/ml rende il processo di degradazione più lento rispetto a quello che si verifica nelle membrane ALL CS e ALL CS/NC 3. Ciò potrebbe essere giustificato dal fatto che la presenza delle nanoparticelle limita l'ingresso di PBS nella membrana; nelle fibre RND CS/NC 3, la NC disposta in aggregati e meno internalizzata, viene rilasciata più velocemente, promuovendo il processo degradativo. Risultati simili sono stati ottenuti anche in altri lavori di letteratura per fibre a base di PLLA e nHA [152]. Inoltre, sembra che a concentrazioni più elevate, a 3 mg/ml, la degradazione influisca meno sull'orientazione delle fibre.

d) Test di coltura cellulare

I risultati delle prove cellulari effettuate per valutare la vitalità delle cellule seminate sulle membrane ALL CS e ALL CS/NC 3 sono riportati in fig. 55(A) per le cellule 3T3 e fig.55(B) per le cellule SHSY-5Y. I valori sono confrontati con quelli di un substrato di controllo CTRL, rispetto ai quali è stata effettuata una normalizzazione.

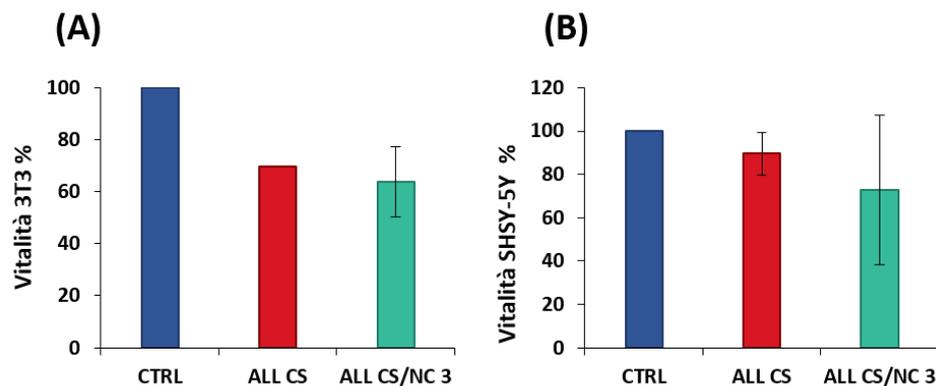


Figura 55. Vitalità percentuale delle cellule delle linee 3T3 (A) e SHSY-5Y (B) per le membrane ALL CS e ALL CS/NC 3 a 24 h.

Dall'analisi condotta, è stata ricavata la percentuale di cellule vitali sui campioni in esame. Si può osservare come per la linea cellulare 3T3, non vi siano differenze

significative in termini di vitalità percentuale tra le fibre di controllo e quelle caricate con NC. In entrambi i casi, i valori si assestano intorno al 60%. Al contrario, il modello cellulare SHSY-5Y mostra una maggiore propensione verso i substrati analizzati rispetto al modello dei fibroblasti, anche se la vitalità cellulare misurata per cellule coltivate su substrati carichi di nanoparticelle è leggermente inferiore rispetto a quella registrata per le membrane di controllo. In entrambi i casi, si dimostra che le membrane non sono citotossiche per le linee cellulari analizzate.

IV. Conclusioni e sviluppi futuri

L'ingegneria dei tessuti si propone di sostituire dei tessuti biologici danneggiati ripristinandone o migliorandone le funzionalità, attraverso l'impianto di una struttura temporanea. Si rende quindi necessario l'utilizzo di uno scaffold, ossia un supporto tridimensionale poroso che moduli l'attività delle cellule promuovendo la formazione di nuovo tessuto.

È fondamentale che questo possieda caratteristiche biomimetiche tali da riprodurre accuratamente la matrice extra-cellulare del tessuto nativo: deve essere progettato in modo che fornisca alle cellule gli opportuni stimoli topografici, morfologici, chimici e meccanici. Le proprietà principali da ottimizzare riguardano la composizione chimica, la biodegradabilità e la porosità che determinano il comportamento meccanico del materiale. I materiali più utilizzati per realizzare scaffold sono i polimeri per la loro versatilità, in quanto consentono di realizzare supporti dalle proprietà molto varie tramite una vasta gamma di processi. Le caratteristiche principali da ricercare nei polimeri risiedono nella biorisorbibilità e nel controllo della cinetica di degradazione: materiali dotati di tali qualità sono candidati ideali all'impianto perché non necessitano di rimozione e la *degradation rate* può essere modulata in base ai tempi di rigenerazione del tessuto biologico. Per ottenere uno scaffold che ottemperi a queste esigenze, negli ultimi anni si è sviluppato un crescente interesse nei materiali bioartificiali, costituiti da polimeri naturali e sintetici, in modo da coniugare la biomimesi dei primi con le proprietà meccaniche e la stabilità dei secondi. Ultimamente, numerosi studi scientifici si sono focalizzati sulla realizzazione di scaffold compositi, caricati con nanoparticelle inorganiche dotate di specifiche caratteristiche, tra cui proprietà antibatteriche e antiossidanti: in particolare, la nanoceria (NC) è estremamente nota per l'azione nei confronti dei ROS (*Reactive Oxygen Species*) che causano stress ossidativo elevato in concomitanza con infiammazione. Questo fenomeno è tipico di numerosi disturbi neurologici, per cui la NC è stata adoperata in molteplici studi per testarne gli effetti benefici sul tessuto nervoso.

In questo lavoro di tesi, sono state realizzate membrane in chitosano (CS), un polimero naturale, caricate con nanoparticelle di ossido di cerio: gli scaffold sono stati realizzati tramite *electrospinning*, sia con fibre disposte in maniera casuale che allineate secondo una specifica orientazione.

Le membrane a base di CS/NC sono state fabbricate a partire da una dispersione di NC nella soluzione di polimero naturale ed in seguito elettrofilate: la prima fase ha condotto all'ottimizzazione del protocollo di preparazione della soluzione a 3 mg/ml di NC, individuando la modalità più adeguata con cui disperdere il nanomateriale. L'analisi è stata effettuata confrontando morfologicamente le fibre random ottenute, ricercando quelle con il minor numero possibile di difetti superficiali e aggregati di NC: seguendo un protocollo per fibre a base di CS stabilito da Tonda-Turo e colleghi [137], si è scelto di procedere aggiungendo previa sonicazione una dispersione di NC nel cosolvente (DMSO) una goccia alla volta. Successivamente sono state testate concentrazioni di nanoparticelle in soluzione pari a 1 mg/ml e 3 mg/ml in quanto, da precedenti lavori, si è osservata un'azione antiossidante già a basse concentrazioni [153].

Dalla procedura ottimizzata, sono state testate reologicamente le corrispondenti soluzioni confrontandole con quelle di controllo: è stato valutato come le soluzioni contenenti 1 mg/ml di NC presentino un comportamento maggiormente viscoso rispetto al controllo, a causa della presenza delle nanoparticelle che ne incrementano le proprietà. La soluzione a 3 mg/ml ha mostrato un comportamento opposto, con riduzione della viscosità rispetto al controllo: in entrambi i casi, l'andamento delle prove può essere giustificato tramite letteratura, in quanto il comportamento reologico di un fluido polimerico contenente nanoparticelle risulta essere di difficile prevedibilità [143].

Successivamente è stata effettuata la caratterizzazione morfologica delle membrane composite. Dall'analisi delle immagini SEM, le fibre risultano continue e omogenee, nonostante per le allineate vi siano alcuni difetti dovuti alle modalità di fabbricazione tramite electrospinning. Nonostante ciò, si può riscontrare un lieve incremento del diametro delle fibre caricate rispetto ai controlli e la presenza di NC rilevabile nella rugosità superficiale delle fibre. La nanoceria non comporta effetti significativi sull'allineamento delle fibre ALL CS/NC 1 e ALL CS/NC 3 rispetto al controllo. L'analisi elementare eseguita sui campioni random ed allineati conferma la presenza di NC nelle membrane realizzate: in particolare, le percentuali indicative della quantità di nanoceria nelle fibre sono maggiori per le CS/NC 3 che per le CS/NC 1, attestando l'effettivo caricamento delle nanoparticelle nelle fibre.

La caratterizzazione tramite FTIR non ha permesso di rilevare la NC nelle membrane realizzate, a causa della natura cristallina della NC o del range di numeri d'onda settato sullo strumento non adeguato; dunque, gli spettri ottenuti per i campioni di controllo e per quelli relativi alle fibre composite non presentano significative differenze.

È stato possibile effettuare la caratterizzazione meccanica delle fibre soltanto per i campioni random, non disponendo di sufficiente materiale per le fibre allineate. Le proprietà meccaniche delle membrane composite hanno mostrato un aumento soprattutto in termini di UTS rispetto a RND CS e in maniera maggiormente evidente per concentrazioni maggiori di nanoparticelle, conformemente alla letteratura. I valori medi relativi a E, UTS e $\epsilon\%$ ottenuti per le membrane di controllo trovano conferma nel lavoro di tesi di Ruini [154].

I risultati delle prove di degradazione hanno evidenziato che le fibre RND CS sono più sensibili alla dissoluzione in PBS rispetto a quelle caricate, perché la variazione percentuale dei diametri medi è maggiore rispetto alle membrane composite; tale effetto è più evidente a livello morfologico nelle fibre allineate. In PBS e lisozima, sembra che concentrazioni più elevate del nanomateriale rallentino il processo degradativo nel breve periodo per le fibre random. Per le membrane allineate è visibile una maggiore conservazione della morfologia superficiale nelle fibre ALL CS/NC 1.

I risultati del test per valutare il potere antiossidante delle membrane hanno confermato un incremento dell'attività antiossidante nelle fibre RND CS/NC 3 rispetto al controllo in solo chitosano.

Dai risultati ottenuti dai test di coltura cellulare risulta evidente come nel futuro si potrebbero effettuare ulteriori test cellulari per verificare l'internalizzazione della NC presente sui substrati da parte delle cellule e per valutare l'effetto antiossidante sulle cellule sfruttando il kit già descritto precedentemente.

Per individuare più nettamente un trend nelle prove eseguite e il relativo effetto del nanomateriale, si potrebbe aumentare la concentrazione della NC in soluzione prima dell'electrospinning. Inoltre, si potrebbe ottimizzare il protocollo di preparazione delle soluzioni sostituendo il DSP con un altro reticolante, per limitare le interazioni della NC con gli anioni fosfato e promuovere il processo di degradazione favorendo il rilascio delle nanoparticelle.

Infine, sarebbe opportuno trovare un metodo alternativo per la realizzazione delle fibre allineate, tramite l'utilizzo di un collettore rotante, in modo da disporre di un'adeguata quantità di fibre per effettuare i test in maniera parallela sia sulle membrane random che su quelle allineate.

BIBLIOGRAFIA

- [1] C. L. Stanfield, *Principles of Human Physiology*, no. March. 2012.
- [2] G. Perea, M. Navarrete, and A. Araque, "Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information," *Trends Neurosci.*, vol. 32, no. 8, pp. 421–431, 2009.
- [3] V. Monesi, *Istologia*, V ed. 2002.
- [4] U. K. Hanisch, "Microglia as a source and target of cytokines," *Glia*, vol. 40, no. 2, pp. 140–155, Nov. 2002.
- [5] L. Binan, A. Ajji, G. De Crescenzo, and M. Jolicoeur, "Approaches for Neural Tissue Regeneration," *Stem Cell Rev. Reports*, vol. 10, no. 1, pp. 44–59, Feb. 2014.
- [6] C. J. L. Murray, "Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010," *Lancet*, vol. 380, no. 9859, pp. 2197–2223, Dec. 2012.
- [7] B. Uttara, A. Singh, P. Zamboni, and R. Mahajan, "Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options," *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 7, no. 1, pp. 65–74, 2009.
- [8] P. Held, "An Introduction to Reactive Oxygen Species Measurement of ROS in Cells," *BioTek Instruments*, pp. 1–14, 2012.
- [9] K. J. Barnham, C. L. Masters, and A. I. Bush, "Neurodegenerative diseases and oxidatives stress," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 3, no. 3, pp. 205–214, 2004.
- [10] 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, Aug. 2009.
- [11] W. J. Schulz-Schaeffer, "The synaptic pathology of α -synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia," *Acta Neuropathologica*, vol. 120, no. 2. pp. 131–143, 20-Aug-2010.
- [12] A. Compston and A. Coles, "Multiple sclerosis," *Lancet*, vol. 372, no. 9648, pp. 1502–1517, 2008.
- [13] B. R. Ringeisen, C. M. Othon, J. A. Barron, P. K. Wu, and B. J. Spargo, "The evolution of cell printing," in *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Springer, 2009, pp. 613–631.
- [14] R. Langer and J. P. Vacanti, "Tissue Engineering," *Science (80-.)*, vol. 260, no. May, pp. 920–926, 1993.
- [15] S. Levenberg and R. Langer, "Advances in Tissue Engineering," in *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 61, 2004, pp. 113–134.
- [16] R. Samsudin, "Stem cell and tissue engineering - The challenge of imitating nature," *Malaysian Journal of Medical Sciences*, vol. 10, no. 2, pp. 1–3, 2003.
- [17] K. Vig *et al.*, "Advances in skin regeneration using tissue engineering," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 4. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 07-Apr-2017.
- [18] G. Kalamegam, A. Memic, E. Budd, M. Abbas, and A. Mobasher, "A Comprehensive Review of Stem Cells for Cartilage Regeneration in Osteoarthritis," in *Advances in experimental medicine and biology*, 2018.

- [19] J. Adamowicz, M. Pokrywczyńska, S. V. Van Breda, T. Kloskowski, and T. Drewa, "Concise Review: Tissue Engineering of Urinary Bladder; We Still Have a Long Way to Go?," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 6, no. 11, pp. 2033–2043, Nov. 2017.
- [20] N. L'heureux, S. Pâquet, R. Labbé, L. Germain, and F. A. Auger, "A completely biological tissue-engineered human blood vessel," *FASEB J.*, vol. 12, no. 1, pp. 47–56, Jan. 1998.
- [21] Y. H. Shen, M. S. Shoichet, and M. Radisic, "Vascular endothelial growth factor immobilized in collagen scaffold promotes penetration and proliferation of endothelial cells," *Acta Biomater.*, vol. 4, no. 3, pp. 477–489, May 2008.
- [22] F. Yang *et al.*, "Genetic engineering of human stem cells for enhanced angiogenesis using biodegradable polymeric nanoparticles," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 8, pp. 3317–3322, Feb. 2010.
- [23] J. J. Moon, M. S. Hahn, I. Kim, B. A. Nsiah, and J. L. West, "Micropatterning of Poly(Ethylene Glycol) Diacrylate Hydrogels with Biomolecules to Regulate and Guide Endothelial Morphogenesis," *Tissue Eng. Part A*, vol. 15, no. 3, pp. 579–585, Mar. 2009.
- [24] S. S. Kulkarni, R. Orth, M. Ferrari, and N. I. Moldovan, "Micropatterning of endothelial cells by guided stimulation with angiogenic factors," in *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, vol. 19, no. 11, pp. 1401–1407.
- [25] S. Güven *et al.*, "Engineering of large osteogenic grafts with rapid engraftment capacity using mesenchymal and endothelial progenitors from human adipose tissue," *Biomaterials*, vol. 32, no. 25, pp. 5801–5809, Sep. 2011.
- [26] A. Khademhosseini, J. P. Vacanti, and R. Langer, "Progress in tissue engineering," *Sci. Am.*, vol. 300, no. 5, pp. 64–71, May 2009.
- [27] E. Cukierman, R. Pankov, D. R. Stevens, and K. M. Yamada, "Taking cell-matrix adhesions to the third dimension," *Science (80-.)*, vol. 294, no. 5547, pp. 1708–1712, Nov. 2001.
- [28] A. Atala, F. Kurtis Kasper, and A. G. Mikos, "Engineering complex tissues," *Sci. Transl. Med.*, vol. 4, no. 160, 2012.
- [29] Z. Peng, G. Haibing, and M. Haoyang, "Fabrication of scaffolds in tissue engineering : A review," vol. 13, no. 1, pp. 107–119, 2018.
- [30] A. G. Mikos, G. Sarakinos, S. M. Leite, J. P. Vacant, and R. Langer, "Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 14, no. 5, pp. 323–330, Apr. 1993.
- [31] D. O. Meredith, L. Eschbach, M. O. Riehle, A. S. G. G. Curtis, and R. G. Richards, "Microtopography of metal surfaces influence fibroblast growth by modifying cell shape, cytoskeleton, and adhesion," *J. Orthop. Res.*, vol. 25, no. 11, pp. 1523–1533, Nov. 2007.
- [32] D. J. Behonick and Z. Werb, "A bit of give and take: The relationship between the extracellular matrix and the developing chondrocyte," *Mechanisms of Development*, vol. 120, no. 11, pp. 1327–1336, Nov-2003.
- [33] H. Naderi, M. M. Matin, and A. R. Bahrami, "Review paper: Critical issues in tissue engineering: Biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems," *J. Biomater. Appl.*, vol. 26, no. 4, pp. 383–417, 2011.
- [34] J. Hu, K. Feng, X. Liu, and P. X. Ma, "Chondrogenic and osteogenic differentiations of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on a nanofibrous scaffold with designed pore network," *Biomaterials*, vol. 30, no. 28, pp. 5061–5067, Oct. 2009.

- [35] R. T. Tran, P. Thevenot, Y. Zhang, D. Gyawali, L. Tang, and J. Yang, "Scaffold sheet design strategy for soft tissue engineering," *Materials (Basel)*, vol. 3, no. 2, pp. 1375–1389, 2010.
- [36] S. Lyu and D. Untereker, "Degradability of polymers for implantable biomedical devices," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, no. 9, pp. 4033–4065, 2009.
- [37] N. Zhang and D. H. Kohn, "Using polymeric materials to control stem cell behavior for tissue regeneration," *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.*, vol. 96, no. 1, pp. 63–81, 2012.
- [38] Z. Zhang, M. J. Gupte, and P. X. Ma, "Biomaterials and Stem Cells for Tissue Engineering," *Expert Opin Biol Ther.*, vol. 13, no. 4, pp. 527–540, 2014.
- [39] N. Monteiro, A. Martins, R. L. Reis, and N. M. Neves, "Nanoparticle-based bioactive agent release systems for bone and cartilage tissue engineering," *Regen. Ther.*, vol. 1, pp. 109–118, Jun. 2015.
- [40] J. Zhang, L. Wu, H.-K. Chan, and W. Watanabe, "Formation, characterization, and fate of inhaled drug nanoparticles," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 6, pp. 441–455, May 2011.
- [41] A. Mohammed, A. Al-Qahtani, A. Al-Mutairi, B. Al-Shamri, and K. Aabed, "Antibacterial and Cytotoxic Potential of Biosynthesized Silver Nanoparticles by Some Plant Extracts," *Nanomaterials*, vol. 8, no. 6, p. 382, May 2018.
- [42] A. Issa, M. Al-Maadeed, A. Luyt, D. Ponnamma, and M. Hassan, "Physico-Mechanical, Dielectric, and Piezoelectric Properties of PVDF Electrospun Mats Containing Silver Nanoparticles," *C*, vol. 3, no. 4, p. 30, Oct. 2017.
- [43] C. You *et al.*, "Silver nanoparticle loaded collagen/chitosan scaffolds promote wound healing via regulating fibroblast migration and macrophage activation," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 10489, Dec. 2017.
- [44] T. Jamnongkan, R. Shirota, S. K. Sukumaran, M. Sugimoto, and K. Koyama, "Effect of ZnO nanoparticles on the electrospinning of poly(vinyl alcohol) from aqueous solution: Influence of particle size," *Polym. Eng. Sci.*, vol. 54, no. 9, pp. 1969–1975, Sep. 2014.
- [45] I. Edition, "Antioxidant properties of gold nanoparticles studied by ESR spectroscopy," vol. 57, no. 3, pp. 520–523, 2008.
- [46] J. Bizeau, C. Tapeinos, C. Marella, A. Larrañaga, and A. Pandit, "Synthesis and characterization of hyaluronic acid coated manganese dioxide microparticles that act as ROS scavengers," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 159, pp. 30–38, Nov. 2017.
- [47] 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, pp. 1–12, 2018.
- [48] P. Eriksson *et al.*, "Cerium oxide nanoparticles with antioxidant capabilities and gadolinium integration for MRI contrast enhancement," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 6999, Dec. 2018.
- [49] S. Deshpande, S. Patil, S. V. Kuchibhatla, and S. Seal, "Size dependency variation in lattice parameter and valency states in nanocrystalline cerium oxide," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 87, no. 13, p. 133113, Sep. 2005.
- [50] J. M. Dowding *et al.*, "Cellular Interaction and Toxicity Depend on Physicochemical Properties and Surface Modification of Redox-Active Nanomaterials," *ACS Nano*, vol. 7, no. 6, pp. 4855–4868, Jun. 2013.
- [51] C. Korsvik, S. Patil, S. Seal, and W. T. Self, "Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles," *Chem. Commun.*, no. 10, p. 1056, Mar. 2007.
- [52] 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, Oct. 2011.
- [53] I. Celardo, J. Z. Pedersen, E. Traversa, and L. Ghibelli, “Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles,” *Nanoscale*, vol. 3, no. 4, p. 1411, 2011.
- [54] Y. Xue, Q. Luan, D. Yang, X. Yao, and K. Zhou, “Direct Evidence for Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Cerium Oxide Nanoparticles,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 115, no. 11, pp. 4433–4438, Mar. 2011.
- [55] M. Nabavi, O. Spalla, and B. Cabane, “Surface Chemistry of Nanometric Ceria Particles in Aqueous Dispersions,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 160, no. 2, pp. 459–471, Oct. 1993.
- [56] Y. Li, P. Li, H. Yu, and Y. Bian, “Recent advances (2010–2015) in studies of cerium oxide nanoparticles’ health effects,” *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 44, pp. 25–29, Jun. 2016.
- [57] M. S. Wason *et al.*, “Sensitization of pancreatic cancer cells to radiation by cerium oxide nanoparticle-induced ROS production,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 9, no. 4, pp. 558–569, May 2013.
- [58] M. Pešić *et al.*, “Anti-cancer effects of cerium oxide nanoparticles and its intracellular redox activity,” *Chem. Biol. Interact.*, vol. 232, pp. 85–93, May 2015.
- [59] S. Mittal and A. K. Pandey, “Cerium Oxide Nanoparticles Induced Toxicity in Human Lung Cells: Role of ROS Mediated DNA Damage and Apoptosis,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, pp. 1–14, Jun. 2014.
- [60] M. Kumari, S. P. Singh, S. Chinde, M. F. Rahman, M. Mahboob, and P. Grover, “Toxicity Study of Cerium Oxide Nanoparticles in Human Neuroblastoma Cells,” *Int. J. Toxicol.*, vol. 33, no. 2, pp. 86–97, Mar. 2014.
- [61] G. Cheng *et al.*, “Cerium oxide nanoparticles induce cytotoxicity in human hepatoma SMMC-7721 cells via oxidative stress and the activation of MAPK signaling pathways,” *Toxicol. Vitr.*, vol. 27, no. 3, pp. 1082–1088, Apr. 2013.
- [62] J. Das, Y.-J. Choi, J. W. Han, A. M. M. T. Reza, and J.-H. Kim, “Nanoceria-mediated delivery of doxorubicin enhances the anti-tumour efficiency in ovarian cancer cells via apoptosis,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 9513, Dec. 2017.
- [63] M. A. Hegazy, H. M. Maklad, D. M. Samy, D. A. Abdelmonsif, B. M. El Sabaa, and F. Y. Elnozahy, “Cerium oxide nanoparticles could ameliorate behavioral and neurochemical impairments in 6-hydroxydopamine induced Parkinson’s disease in rats,” *Neurochem. Int.*, vol. 108, pp. 361–371, Sep. 2017.
- [64] G. Ciofani, G. G. Genchi, B. Mazzolai, and V. Mattoli, “Transcriptional profile of genes involved in oxidative stress and antioxidant defense in PC12 cells following treatment with cerium oxide nanoparticles,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1840, no. 1, pp. 495–506, Jan. 2014.
- [65] G. Ciofani *et al.*, “Effects of Cerium Oxide Nanoparticles on PC12 Neuronal-Like Cells: Proliferation, Differentiation, and Dopamine Secretion,” *Pharm. Res.*, vol. 30, no. 8, pp. 2133–2145, Aug. 2013.
- [66] T. Naganuma and E. Traversa, “The effect of cerium valence states at cerium oxide nanoparticle surfaces on cell proliferation,” *Biomaterials*, vol. 35, no. 15, pp. 4441–4453, May 2014.
- [67] J. M. Perez, A. Asati, S. Nath, and C. Kaittanis, “Synthesis of Biocompatible Dextran-Coated Nanoceria with pH-Dependent Antioxidant Properties,” *Small*, vol. 4, no. 5, pp. 552–556, May 2008.

- [68] S. Chigurupati *et al.*, “Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes, fibroblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 9, pp. 2194–2201, Mar. 2013.
- [69] R. Sridharan, A. R. Cameron, D. J. Kelly, C. J. Kearney, and F. J. O’Brien, “Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles,” *Mater. Today*, vol. 18, no. 6, pp. 313–325, Jul. 2015.
- [70] F. Y. McWhorter, T. Wang, P. Nguyen, T. Chung, and W. F. Liu, “Modulation of macrophage phenotype by cell shape,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 43, pp. 17253–17258, Oct. 2013.
- [71] C. D. Mills, “M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease.,” *Crit. Rev. Immunol.*, vol. 32, no. 6, pp. 463–88, 2012.
- [72] A. Subramanian, U. Krishnan, and S. Sethuraman, “Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration,” *J. Biomed. Sci.*, vol. 16, no. 1, p. 108, 2009.
- [73] C. Sundback *et al.*, “Biocompatibility analysis of poly(glycerol sebacate) as a nerve guide material,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 27, pp. 5454–5464, Sep. 2005.
- [74] K. Saha *et al.*, “Substrate Modulus Directs Neural Stem Cell Behavior,” *Biophys. J.*, vol. 95, no. 9, pp. 4426–4438, Nov. 2008.
- [75] A. Samadikuchaksaraei, “An overview of tissue engineering approaches for management of spinal cord injuries,” *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*, vol. 4, no. 1. BioMed Central, p. 15, 14-May-2007.
- [76] A. Banerjee *et al.*, “The influence of hydrogel modulus on the proliferation and differentiation of encapsulated neural stem cells,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 27, pp. 4695–4699, Sep. 2009.
- [77] J. M. Zuidema, M. M. Pap, D. B. Jaroch, F. A. Morrison, and R. J. Gilbert, “Fabrication and characterization of tunable polysaccharide hydrogel blends for neural repair,” *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 4, pp. 1634–1643, Apr. 2011.
- [78] Y. Wang *et al.*, “Combination of hyaluronic acid hydrogel scaffold and PLGA microspheres for supporting survival of neural stem cells,” *Pharm. Res.*, vol. 28, no. 6, pp. 1406–1414, Jun. 2011.
- [79] S. Woerly *et al.*, “Heterogeneous PHPMA hydrogels for tissue repair and axonal regeneration in the injured spinal cord,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 9, no. 7, pp. 681–711, 1998.
- [80] M. Mehra *et al.*, “Incorporation of mesoporous silica nanoparticles into random electrospun PLGA and PLGA/gelatin nanofibrous scaffolds enhances mechanical and cell proliferation properties,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 66, pp. 25–32, Sep. 2016.
- [81] J. Y. Lee, C. A. Bashur, A. S. Goldstein, and C. E. Schmidt, “Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 26, pp. 4325–4335, Sep. 2009.
- [82] M. Gizdavic-Nikolaidis, J. Travas-Sejdic, G. A. Bowmaker, R. P. Cooney, C. Thompson, and P. A. Kilmartin, “The antioxidant activity of conducting polymers in biomedical applications,” *Curr. Appl. Phys.*, vol. 4, no. 2–4, pp. 347–350, 2004.
- [83] G. T. Christopherson, H. Song, and H. Q. Mao, “The influence of fiber diameter of electrospun substrates on neural stem cell differentiation and proliferation,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 4, pp. 556–564, Feb. 2009.
- [84] V. Mahairaki *et al.*, “Nanofiber Matrices Promote the Neuronal Differentiation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Precursors In Vitro,” *Tissue Eng. Part A*, vol. 17, no. 5–

- 6, pp. 855–863, Mar. 2011.
- [85] F. Yang, R. Murugan, S. Wang, and S. Ramakrishna, “Electrospinning of nano/micro scale poly(l-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 15, pp. 2603–2610, May 2005.
- [86] M. Alessandri *et al.*, “Atmospheric plasma surface modification of electrospun poly(L-lactic acid): Effect on mat properties and cell culturing,” in *2013 Abstracts IEEE International Conference on Plasma Science (ICOPS)*, 2013, pp. 1–1.
- [87] P. K. Baumgarten, “Electrostatic spinning of acrylic microfibers,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 36, no. 1, pp. 71–79, May 1971.
- [88] J. Doshi and D. H. Reneker, “Electrospinning process and applications of electrospun fibers,” *J. Electrostat.*, vol. 35, no. 2–3, pp. 151–160, Aug. 1995.
- [89] M. Liu, X.-P. Duan, Y.-M. Li, D.-P. Yang, and Y.-Z. Long, “Electrospun nanofibers for wound healing,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 76, pp. 1413–1423, Jul. 2017.
- [90] D. I. Braghirolli, D. Steffens, and P. Pranke, “Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics,” *Drug Discov. Today*, vol. 19, no. 6, pp. 743–753, Jun. 2014.
- [91] T. Subbiah, G. S. Bhat, R. W. Tock, S. Parameswaran, and S. S. Ramkumar, “Electrospinning of nanofibers,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 96, no. 2, pp. 557–569, Apr. 2005.
- [92] J.-H. Guo *et al.*, “Potential Neurogenesis of Human Adipose-Derived Stem Cells on Electrospun Catalpol-Loaded Composite Nanofibrous Scaffolds,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 43, no. 10, pp. 2597–2608, Oct. 2015.
- [93] D. Brahatheeswaran *et al.*, “Hybrid fluorescent curcumin loaded zein electrospun nanofibrous scaffold for biomedical applications,” *Biomed. Mater.*, vol. 7, no. 4, p. 045001, Aug. 2012.
- [94] S.-J. Liu, Chen, Liao, and Chan, “Novel biodegradable sandwich-structured nanofibrous drug-eluting membranes for repair of infected wounds: an in vitro and in vivo study,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, p. 763, Feb. 2012.
- [95] G. Taylor, “Disintegration of Water Drops in an Electric Field,” *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 280, no. 1382, pp. 383–397, Jul. 1964.
- [96] J. . Deitzel, J. Kleinmeyer, D. Harris, and N. . Beck Tan, “The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 42, no. 1, pp. 261–272, Jan. 2001.
- [97] G. Eda and S. Shivkumar, “Bead-to-fiber transition in electrospun polystyrene,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 106, no. 1, pp. 475–487, Oct. 2007.
- [98] Z. Li and C. Wang, *One-Dimensional nanostructures*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [99] L. Larrondo and R. St. John Manley, “Electrostatic fiber spinning from polymer melts. I. Experimental observations on fiber formation and properties,” *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.*, vol. 19, no. 6, pp. 909–920, Jun. 1981.
- [100] Q. Yang *et al.*, “Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning,” *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 42, no. 20, pp. 3721–3726, Oct. 2004.
- [101] C. Huang *et al.*, “Electrospun polymer nanofibres with small diameters,” *Nanotechnology*, vol. 17, no. 6, pp. 1558–1563, Mar. 2006.

- [102] X. Yuan, Y. Zhang, C. Dong, and J. Sheng, "Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning," *Polym. Int.*, vol. 53, no. 11, pp. 1704–1710, Nov. 2004.
- [103] C. Zhang, X. Yuan, L. Wu, Y. Han, and J. Sheng, "Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats," *Eur. Polym. J.*, vol. 41, no. 3, pp. 423–432, Mar. 2005.
- [104] C. Mit-uppatham, M. Nithitanakul, and P. Supaphol, "Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers: Effect of Solution Conditions on Morphology and Average Fiber Diameter," *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 205, no. 17, pp. 2327–2338, Nov. 2004.
- [105] C. L. Casper, J. S. Stephens, N. G. Tassi, D. B. Chase, and J. F. Rabolt, "Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process," *Macromolecules*, vol. 37, no. 2, pp. 573–578, Jan. 2004.
- [106] D. Kai, S. S. Liow, and X. J. Loh, "Biodegradable polymers for electrospinning: Towards biomedical applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 45, pp. 659–670, Dec. 2014.
- [107] S. Agarwal, J. H. Wendorff, and A. Greiner, "Use of electrospinning technique for biomedical applications," *Polymer (Guildf.)*, vol. 49, no. 26, pp. 5603–5621, Dec. 2008.
- [108] P. Kuppan, S. Sethuraman, and U. M. Krishnan, "Interaction of human smooth muscle cells with nanofibrous scaffolds: Effect of fiber orientation on cell adhesion, proliferation, and functional gene expression," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 103, no. 7, pp. 2236–2250, Jul. 2015.
- [109] C. Tonda-Turo *et al.*, "Crosslinked gelatin nanofibres: Preparation, characterisation and in vitro studies using glial-like cells," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 5, pp. 2723–2735, Jul. 2013.
- [110] Y. Gao, Y. Bach Truong, Y. Zhu, and I. Louis Kyratzis, "Electrospun antibacterial nanofibers: Production, activity, and in vivo applications," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 131, no. 18, p. n/a-n/a, Sep. 2014.
- [111] Z.-C. Xing *et al.*, "In vitro anti-bacterial and cytotoxic properties of silver-containing poly(L-lactide-co-glycolide) nanofibrous scaffolds," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 11, no. 1, pp. 61–5, Jan. 2011.
- [112] J. Yuan, J. Geng, Z. Xing, J. Shen, I.-K. Kang, and H. Byun, "Electrospinning of antibacterial poly(vinylidene fluoride) nanofibers containing silver nanoparticles," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 116, no. 2, p. n/a-n/a, Apr. 2009.
- [113] S.-W. Park, H.-S. Bae, Z.-C. Xing, O. H. Kwon, M.-W. Huh, and I.-K. Kang, "Preparation and properties of silver-containing nylon 6 nanofibers formed by electrospinning," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 112, no. 4, pp. 2320–2326, May 2009.
- [114] D. W.-C. Chen, F.-Y. Lee, J.-Y. Liao, S.-J. Liu, C.-Y. Hsiao, and J.-K. Chen, "Preclinical Experiments on the Release Behavior of Biodegradable Nanofibrous Multipharmaceutical Membranes in a Model of Four-Wall Intrabony Defect," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, no. 1, pp. 9–14, Jan. 2013.
- [115] S. Torres-Giner, A. Martinez-Abad, J. V. Gimeno-Alcañiz, M. J. Ocio, and J. M. Lagaron, "Controlled Delivery of Gentamicin Antibiotic from Bioactive Electrospun Polylactide-Based Ultrathin Fibers," *Adv. Eng. Mater.*, vol. 14, no. 4, pp. B112–B122, Apr. 2012.
- [116] S. Wang *et al.*, "Encapsulation of Amoxicillin within Laponite-Doped Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanofibers: Preparation, Characterization, and Antibacterial Activity," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 4, no. 11, pp. 6393–6401, Nov. 2012.
- [117] F. Zheng, S. Wang, S. Wen, M. Shen, M. Zhu, and X. Shi, "Characterization and antibacterial activity of amoxicillin-loaded electrospun nano-hydroxyapatite/poly(lactic-co-glycolic acid) composite nanofibers," *Biomaterials*, vol. 34, no. 4, pp. 1402–1412, Jan. 2013.

- [118] L. Yan *et al.*, “Electrospun in-situ hybrid polyurethane/nano-TiO₂ as wound dressings,” *Fibers Polym.*, vol. 12, no. 2, pp. 207–213, Apr. 2011.
- [119] Y. Mei, C. Yao, K. Fan, and X. Li, “Surface modification of polyacrylonitrile nanofibrous membranes with superior antibacterial and easy-cleaning properties through hydrophilic flexible spacers,” *J. Memb. Sci.*, vol. 417–418, pp. 20–27, Nov. 2012.
- [120] C. M. Valmikinathan, V. J. Mukhatyar, and A. Jain, “Photocrosslinkable chitosan based hydrogels for neural tissue engineering,” *Soft Matter*, vol. 8, no. 6, pp. 1964–1976, Feb. 2012.
- [121] K. Hermans *et al.*, “Development and characterization of mucoadhesive chitosan films for ophthalmic delivery of cyclosporine A,” *Int. J. Pharm.*, vol. 472, no. 1–2, pp. 10–19, Sep. 2014.
- [122] T. T. T. Nguyen, O. H. Chung, and J. S. Park, “Coaxial electrospun poly(lactic acid)/chitosan (core/shell) composite nanofibers and their antibacterial activity,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 86, no. 4, pp. 1799–1806, Oct. 2011.
- [123] V. Zargar, M. Asghari, and A. Dashti, “A Review on Chitin and Chitosan Polymers : Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives and Applications,” no. 3, pp. 204–226, 2015.
- [124] S. M. Hudson and C. Smith, “Polysaccharides: Chitin and Chitosan: Chemistry and Technology of Their Use As Structural Materials,” in *Biopolymers from Renewable Resources*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998, pp. 96–118.
- [125] S. V. Madhally and H. W. Matthew, “Porous chitosan scaffolds for tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 20, no. 12, pp. 1133–42, Jun. 1999.
- [126] J. M. Campiña, H. K. S. Souza, J. Borges, A. Martins, M. P. Gonçalves, and F. Silva, “Studies on the interactions between bovine β -lactoglobulin and chitosan at the solid–liquid interface,” *Electrochim. Acta*, vol. 55, no. 28, pp. 8779–8790, Dec. 2010.
- [127] X. W. Li, D. K. L. Lee, A. S. C. Chan, and H. O. Alpar, “Sustained expression in mammalian cells with DNA complexed with chitosan nanoparticles,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1630, no. 1, pp. 7–18, Oct. 2003.
- [128] W. Wang *et al.*, “A new green technology for direct production of low molecular weight chitosan,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 74, no. 1, pp. 127–132, Oct. 2008.
- [129] H. Zhang and S. H. Neau, “In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation,” *Biomaterials*, vol. 22, no. 12, pp. 1653–8, Jun. 2001.
- [130] A. Wang *et al.*, “Physical properties and biocompatibility of a porous chitosan-based fiber-reinforced conduit for nerve regeneration,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 29, no. 11, pp. 1697–1702, Sep. 2007.
- [131] H. Homayoni, S. A. H. Ravandi, and M. Valizadeh, “Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 77, no. 3, pp. 656–661, Jul. 2009.
- [132] F. Ruini, C. Tonda-Turo, V. Chiono, and G. Ciardelli, “Chitosan membranes for tissue engineering: comparison of different crosslinkers,” *Biomed. Mater.*, vol. 10, no. 6, p. 065002, Nov. 2015.
- [133] J. K. Fink, “Poly(ethylene oxide),” in *Handbook of Engineering and Specialty Thermoplastics*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011, pp. 1–37.
- [134] N. Bhattarai, D. Edmondson, O. Veisoh, F. A. Matsen, and M. Zhang, “Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 31, pp. 6176–6184, Nov. 2005.

- [135] M. Pakravan, M. Heuzey, and A. Ajji, "A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning," *Polymer (Guildf)*, vol. 52, no. 21, pp. 4813–4824, Sep. 2011.
- [136] L. Martinová and D. Lubasová, "Electrospun Chitosan Based Nanofibers," *Res. J. Text. Appar.*, vol. 12, no. 2, pp. 72–79, May 2008.
- [137] 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, Apr. 2017.
- [138] G. J. Todaro, "Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines," *J. Cell Biol.*, vol. 17, no. 2, pp. 299–313, May 1963.
- [139] R. A. Ross, B. A. Spengler, and J. L. Biedler, "Coordinate Morphological and Biochemical Interconversion of Human Neuroblastoma Cells," *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 71, no. 4, pp. 741–747, Oct. 1983.
- [140] H. Xicoy, B. Wieringa, and G. J. M. Martens, "The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review," *Mol. Neurodegener.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–11, 2017.
- [141] R. B. Bird, R. C. Armstrong, and O. Hassager, *Dynamics of polymeric liquids*, Second Edi. John Wiley & Sons, Inc., 1987.
- [142] C. O. Metin, K. M. Rankin, and Q. P. Nguyen, "Phase behavior and rheological characterization of silica nanoparticle gel," *Appl. Nanosci.*, vol. 4, no. 1, pp. 93–101, Jan. 2014.
- [143] H. D. Koca, S. Doganay, A. Turgut, I. H. Tavman, R. Saidur, and I. M. Mahbubul, "Effect of particle size on the viscosity of nanofluids: A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 82, no. July 2017, pp. 1664–1674, Feb. 2018.
- [144] S. Jain, J. G. P. Goossens, G. W. M. Peters, M. van Duin, and P. J. Lemstra, "Strong decrease in viscosity of nanoparticle-filled polymer melts through selective adsorption," *Soft Matter*, vol. 4, no. 9, p. 1848, 2008.
- [145] M. Chelliah, J. B. B. Rayappan, and U. M. Krishnan, "Synthesis and Characterization of Cerium Oxide Nanoparticles by Hydroxide Mediated Approach," *J. Appl. Sci.*, vol. 12, no. 16, pp. 1734–1737, Dec. 2012.
- [146] 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, pp. 12003–12012, Sep. 2014.
- [147] H. Rodríguez-Tobías, G. Morales, and D. Grande, "Improvement of mechanical properties and antibacterial activity of electrospun poly(d, l -lactide)-based mats by incorporation of ZnO-graft -poly(d, l -lactide) nanoparticles," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 182, pp. 324–331, Oct. 2016.
- [148] H. A. Rather, R. Thakore, R. Singh, D. Jhala, S. Singh, and R. Vasita, "Antioxidative study of Cerium Oxide nanoparticle functionalised PCL-Gelatin electrospun fibers for wound healing application," *Bioact. Mater.*, vol. 3, no. 2, pp. 201–211, Jun. 2018.
- [149] A. Lončarević, M. Ivanković, and A. Rogina, "Lysozyme-Induced Degradation of Chitosan: The Characterisation of Degraded Chitosan Scaffolds," *J. TISSUE REPAIR Regen.*, vol. 1, no. 1, pp. 12–22, 2017.
- [150] 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, Jul. 2015.
- [151] D. Li, Y. Wang, and Y. Xia, "Electrospinning of Polymeric and Ceramic Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays," *Nano Lett.*, vol. 3, no. 8, pp. 1167–1171, Aug. 2003.

BIBLIOGRAFIA

- [152] X. Xu, X. Chen, A. Liu, Z. Hong, and X. Jing, "Electrospun poly(l-lactide)-grafted hydroxyapatite/poly(l-lactide) nanocomposite fibers," *Eur. Polym. J.*, vol. 43, no. 8, pp. 3187–3196, Aug. 2007.
- [153] 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, Feb. 2017.
- [154] F. Ruini, "Chitosan based biomaterials: soft tissue engineering applications," 2015.