

POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale

***MEMBRANE POLIMERICHE ELETTROFILATE CARICATE CON
NANOPARTICELLE PIEZOELETTRICHE DI TITANATO DI BARIO
PER LA RIGENERAZIONE DEL TESSUTO OSSEO***



Relatore:

Prof. Gianluca Ciardelli

Correlatori:

Dr.ssa Chiara Tonda-Turo

Dr.ssa Michela Licciardello

Candidata:

Giulia Rossanino

Anno accademico 2018/2019

*Ho cercato di non barcollare;
ho fatto passi falsi lungo il cammino.
Ma ho imparato che solo dopo aver scalato una grande collina,
uno scopre che ci sono molte altre colline da scalare.
Mi sono preso un momento per ammirare il panorama glorioso
che mi circondava, per dare un'occhiata da dove ero venuto.
Ma posso riposarmi solo un momento,
perché con la libertà arrivano le responsabilità
e non voglio indugiare,
il mio lungo cammino non è finito.*

Nelson Mandela

Indice

Abstract	1
Capitolo 1 - Introduzione	2
1.1 Ingegneria dei tessuti	2
1.1.1 <i>Scaffold per l'ingegneria dei tessuti</i>	5
1.1.1.1 Caratteristiche di uno <i>scaffold</i>	6
1.1.2 <i>Materiali utilizzati per la fabbricazione di scaffold</i>	8
1.1.2.1 Materiali polimerici.....	8
1.1.2.1.1 Processo di degradazione nei polimeri biodegradabili.....	10
1.1.2.1.2 Polimeri sintetici.....	13
1.1.2.1.3 Polimeri naturali	16
1.2 Materiali piezoelettrici	18
1.2.1 <i>Nanoparticelle di titanato di bario</i>	21
1.2.1.1 Applicazione delle nanoparticelle in ambito biomedicale	23
1.2.1.1.1 Applicazione delle BTNP nell'ingegneria dei tessuti	25
1.2.1.1.1.1 Cito compatibilità delle BTNP	28
1.3 Scaffold nanofibrosi	29
1.3.1 <i>Electrospinning o elettrofilatura</i>	30
1.3.1.1 Principio di funzionamento dell' <i>electrospinning</i>	32
1.3.1.2 Difetti di elettrofilatura	34
1.3.1.3 Parametri che influenzano l'elettrofilatura	34
1.3.1.4 <i>Electrospinning</i> di membrane composite	39

1.3.1.4.1 <i>Electrospinning</i> di membrane caricate con nanoparticelle di titanato di bario	40
1.4 Scopo del lavoro.....	41
<i>Capitolo 2 - Materiali e metodi.....</i>	43
2.1 Materiali.....	43
2.1.1 <i>Gelatina.....</i>	43
2.1.1.1 γ -glicidossipropiltrimetossisilano	46
2.1.1.2 Genipina.....	48
2.1.2 <i>Nanoparticelle di titanato di bario.....</i>	50
2.1.3 <i>Gomma Arabica.....</i>	50
2.1.4 <i>Cellule NIH/3T3.....</i>	53
2.1.5 <i>Cellule SaOS-2.....</i>	54
2.2 Metodi.....	55
2.2.1 <i>Preparazione delle soluzioni polimeriche.....</i>	56
2.2.1.1 Preparazione della soluzione di gelatina.....	56
2.2.1.2 Preparazione delle dispersioni di GL/BTNP	56
2.2.1.3 Preparazione della soluzione di GL/GA.....	57
2.2.1.4 Preparazione delle dispersioni di GL/BTNP/GA	58
2.2.2 <i>Fabbricazione delle membrane nanofibrose</i>	59
2.2.2.1 <i>Electrospinning</i>	59
2.2.2.1.1 Parametri di processo.....	60
2.2.3 <i>Caratterizzazione delle membrane nanofibrose.....</i>	61
2.2.3.1 Caratterizzazione morfologica.....	61

2.2.3.1.1	Microscopia a scansione elettronica (SEM)	61
2.2.3.1.1.1	Analisi delle immagini.....	64
2.2.3.2	Caratterizzazione chimico-fisica.....	65
2.2.3.2.1	Microanalisi EDX o EDS.....	65
2.2.3.2.2	Spettroscopia infrarossa con trasformata di Fourier (FTIR)	66
2.2.3.3	Analisi termogravimetrica (TGA).....	69
2.2.3.4	Caratterizzazione meccanica	71
2.2.3.5	Prove di degradazione	73
2.2.3.5.1	Reticolazione in genipina.....	75
2.2.3.6	Prove cellulari	76
Capitolo 3 - Risultati e commenti		80
3.1	Membrane composite elettrofilate.....	80
3.2	Ottimizzazione del protocollo di realizzazione delle nanofibre.....	81
3.2.1	<i>Ottimizzazione della quantità di gomma arabica</i>	<i>82</i>
3.3	Caratterizzazione morfologica delle membrane	86
3.3.1	<i>Microscopia SEM.....</i>	<i>86</i>
3.4	Caratterizzazione chimico-fisica.....	92
3.4.1	<i>Spettroscopia EDX.....</i>	<i>92</i>
3.4.2	<i>Spettroscopia FTIR-ATR</i>	<i>94</i>
3.5	Analisi termica: TGA.....	97
3.6	Caratterizzazione meccanica: prova a trazione	99
3.7	Prove di degradazione.....	101
3.7.1	<i>Prove di degradazione dopo la reticolazione in genipina</i>	<i>103</i>

3.8 Test cellulari	105
3.8.1 Cellule NIH/3T3.....	105
3.8.2 Cellule SaOS-2.....	106
Capitolo 4 - Conclusioni e sviluppi futuri	110
Bibliografia	114
Ringraziamenti.....	128

Abstract

Tissue engineering is the interdisciplinary field that aims to restore the function of damage tissue by the development of implantable biological substitutes, scaffolds. In the last years, the interest in *smart* materials, like piezoelectric ones, led to the creation of *active* scaffolds that stimulate tissue regeneration as well as mimic the native extracellular matrix.

The aim of this work is to produce electrospun membranes composed by gelatin (GL) loading piezoelectric barium titanate nanoparticles (BTNP) at high concentrations. To improve the distribution of BTNP in the membranes and to reduce the formation of the aggregates, the gum arabic (GA) was added to the aqueous solution of BTNP prior to blending with GL. The BTNP:GL ratio was set as 1:1 after an optimization phase. The maximum concentration of BTNP that allows obtaining homogeneous nanofibers without defects was 200 mg/ml. Composite membranes with 30, 100 and 200 mg/ml of BTNP produced by electrospinning were characterized.

The morphology of the membranes was evaluated by electronic scanning microscopy (SEM), and all of them showed a fibrous structure in a random configuration, where the fibre size were increased as a consequence the addition of BTNP. The presence of the piezoelectric agent was confirmed by EDX, but not by FTIR-ATR spectroscopy. The thermogravimetric analysis showed that there was a greater quantity of BTNP in the membranes loaded with 200 mg/ml compared to those with 100 mg/ml, but not twice as much. The presence of BTNP in the membranes led to an improvement in mechanical strength and a reduction in the deformation at break.

From a degradation point of view the cross-linking of GL with GPTMS did not guarantee stability of the developed membranes in an aqueous environment. For this reason the results obtained from cellular tests carried out on fibroblasts and SaOS-2 were not reliable. To overcome this problem a second cross-linking process was implemented using Genipin. The new membranes appeared stable up to two weeks of incubation.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Ingegneria dei tessuti

Il termine *Tissue Engineering* (TE) è stato coniato per la prima volta nel 1985 dal pioniere della bioingegneria Y. C. Fung presso un meeting sponsorizzato dalla National Science Foundation (NSF), in occasione della presentazione di un nuovo centro di ricerca [1].

L'ingegneria dei tessuti è una branca della medicina rigenerativa che identifica un campo di ricerca multidisciplinare in cui si applicano i principi e i metodi dell'ingegneria e della scienza della vita per comprendere la relazione che lega struttura e funzione dei tessuti, in condizioni normali e patologiche. Lo scopo è quello di sviluppare sostituti biologici che ripristinino, mantengano e/o migliorino le funzioni dei tessuti o di organi danneggiati, imitandone la struttura e l'evoluzione biologica [2][3].

Lo sviluppo della tecnologia e della conoscenza in diversi ambiti scientifici ha permesso di migliorare sempre di più approcci e metodologie anche nel settore medico-chirurgico, nel quale l'ingegneria dei tessuti risulta essere un'alternativa appropriata e promettente per il trattamento di lesioni e/o perdite di organi o tessuti [3]. Tale disciplina si propone di affrontare le problematiche connesse ad alcune procedure chirurgiche tradizionali (come il trapianto o l'impianto di protesi) quali ad esempio l'insufficienza di donatori compatibili e l'assunzione di farmaci immunosoppressori a vita. Oltre a rappresentare un valido strumento in campo chirurgico, la TE si dimostra anche un ottimo supporto alla ricerca, grazie alla possibilità di generare modelli di tessuti umani 3D *in vitro*, utili allo studio dei tessuti stessi e delle relative caratteristiche, o ad effettuare prove di screening farmacologico [4], diminuendo l'utilizzo di animali per i test clinici.

L'obiettivo principale dell'ingegneria dei tessuti è rigenerare i tessuti umani danneggiati introducendo nella zona di interesse "elementi viventi che siano in grado di integrarsi" con il tessuto biologico [5].

L'applicazione di tale disciplina implica l'utilizzo di tre elementi che costituiscono la cosiddetta triade del *tissue engineering*: cellule, *scaffold* e segnali regolatori (figura 1.1).

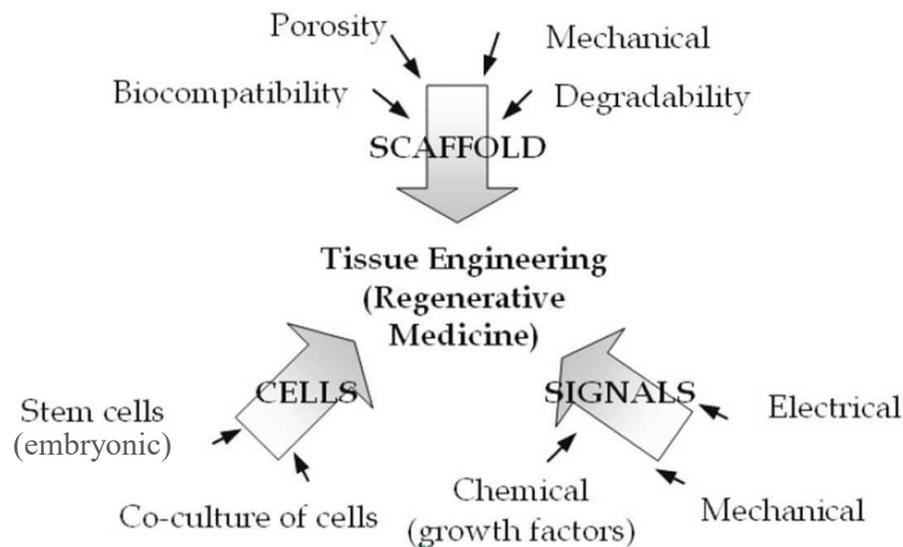


Figura 1.1 Schematizzazione degli elementi costitutivi dell'ingegneria dei tessuti e le relative caratteristiche [6].

Le cellule utilizzate per gli approcci di TE sono tipicamente cellule primarie e linee stabilizzate.

Le cellule primarie sono ottenute direttamente da un donatore e sono specifiche di un determinato tessuto. Esempi tipici sono i fibroblasti, gli osteoblasti e i cardiomiociti.

Le linee stabilizzate, ovvero linee cellulari immortalizzate, possono derivare sia da manipolazioni genetiche di colture primarie, sia da cellule primarie di tumori.

Le cellule possono essere autologhe o allogene [7].

Altra tipologia spesso utilizzata come fonte cellulare è quella delle cellule staminali, ovvero cellule non ancora differenziate che hanno la capacità di maturare in cellule adulte di diversi tessuti, sulla base degli stimoli cui vengono sottoposte. Possono essere cellule staminali embrionali oppure staminali adulte [8], e differiscono per sito di prelievo e potenzialità di differenziamento.

I supporti tridimensionali che sostengono le cellule durante la creazione della matrice extracellulare del neo tessuto si definiscono *scaffold*, strutture transitorie in grado di favorire la rigenerazione del tessuto danneggiato.

I segnali o gli elementi regolatori che influenzano uno *scaffold*, come molecole segnale o stimoli di diversa natura, possono essere applicati per favorire il differenziamento delle cellule verso una specifica tipologia cellulare, a seconda del tessuto di interesse. Esistono tre strategie principali di applicazione dell'ingegneria tissutale [3].

Una, definita ultimamente trapianto cellulare [9], consiste nell'utilizzo di sole cellule che vengono iniettate nel sito di interesse. Le cellule impiegate possono anche essere manipolate in base allo scopo. Questa procedura è utile per minimizzare le possibili complicanze chirurgiche, ma allo stesso tempo è limitata dalla possibile perdita di funzionalità cellulare a seguito della manipolazione, nonché dalla possibile reazione immunologica del paziente. È possibile, ad esempio, iniettare direttamente nel flusso sanguigno i leucociti per migliorare la salute di un soggetto affetto da leucopenia [2].

La seconda modalità prevede il coinvolgimento di sostanze che abbiano la capacità di promuovere la crescita del tessuto, come fattori di crescita o molecole segnale. La rigenerazione viene in questo caso stimolata dalla presenza di questi elementi, che sono specifici in funzione del tessuto che si vuole trattare [3][9].

L'ultimo approccio, solitamente il più impiegato [8][9], consiste nell'effettuare una coltura cellulare su uno *scaffold*, che può essere successivamente impiantato nella zona di interesse, rigenerando il tessuto *in vivo*; in alternativa, lo *scaffold* può essere utilizzato come matrice di coltura per lo sviluppo del neo tessuto *in vitro* (*off-the shelf tissue*) [3][7].

Un processo tipico dell'ingegneria dei tessuti è rappresentato schematicamente in figura 1.2, dove si evidenziano i diversi *step* necessari per raggiungere la rigenerazione del tessuto.

Risultano evidenti la potenzialità e l'utilità dell'ingegneria tissutale in quanto, sebbene alcuni tessuti umani abbiano un potere rigenerativo intrinseco, solo pochi riescono effettivamente a rinnovarsi. Infatti la maggior parte non è in grado di rigenerarsi, soprattutto in presenza di lesioni estese, o, qualora vi riesca, non in tempi ragionevoli.

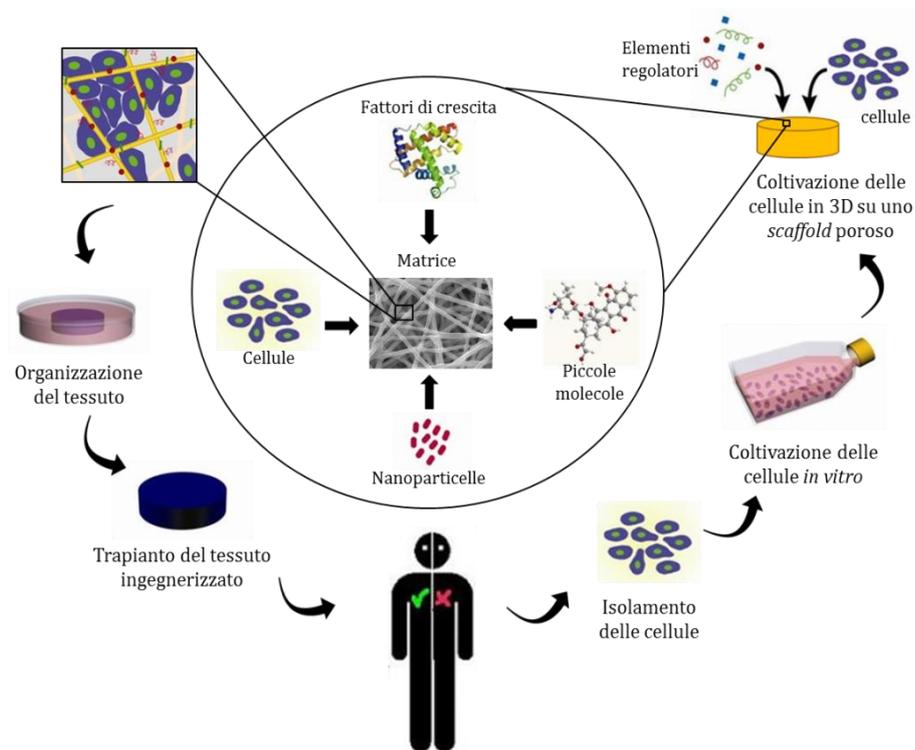


Figura 1.2 Schema di un possibile approccio di ingegneria tissutale.

1.1.1 Scaffold per l'ingegneria dei tessuti

Lo *scaffold* è un elemento chiave dell'ingegneria dei tessuti perché rappresenta la matrice tridimensionale capace di donare supporto alle cellule durante la formazione del nuovo tessuto, sia *in vitro* sia *in vivo*. Le fasi di adesione, proliferazione e, se necessario, successivo differenziamento cellulare che portano alla rigenerazione del tessuto risultano indubbiamente legate alle caratteristiche dello *scaffold* utilizzato, in quanto le cellule risentono degli stimoli provenienti dal substrato su cui aderiscono. L'influenza che lo *scaffold* ha sul comportamento cellulare rende il suo utilizzo e la sua progettazione fondamentali negli approcci di TE. Quello tipicamente più attuato consiste nell'impiantare lo *scaffold* seminato con le cellule nella zona lesionata e lasciare che il tessuto cresca *in vivo* [8]. Un metodo simile prevede l'impianto dello *scaffold* nel sito danneggiato, ma solo dopo un certo tempo di coltura cellulare effettuata *ex vivo*. Un'alternativa può essere quella di impiantare lo *scaffold* senza cellule, lasciando che siano quelle già presenti nel corpo umano a colonizzarlo direttamente *in situ*. Ed infine è possibile anche sviluppare l'organo o il tessuto *in vitro* ed impiantarli una volta maturi.

Lo *scaffold* ideale deve essere quindi una struttura temporanea che, mentre supporta le cellule nella rigenerazione del tessuto, si degrada nel tempo fino a quando la formazione della nuova matrice extracellulare è completa.

Appare evidente che, per ottenere un risultato ottimale, lo *scaffold* debba soddisfare determinati requisiti e svolgere alcune specifiche funzioni:

- ♦ **matrice tridimensionale** per garantire l'adesione cellulare e regolare processi cellulari utili alla formazione del tessuto;
- ♦ **supporto** fisico e **rinforzo** strutturale del difetto in cui esso è impiantato, così da mantenere la forma ed impedire il collasso e la deformazione del tessuto circostante;
- ♦ **barriera** per impedire che eventuali infiltrazioni possano compromettere il processo;
- ♦ **veicolare** e **rilasciare** cellule, molecole segnale, fattori di crescita e geni.

Lo *scaffold* è, quindi, una struttura complessa che deve eseguire parallelamente diverse attività. Tra queste si evidenzia come fondamentale la capacità di mimare la forma e le proprietà della matrice extracellulare natia.

Risulta quindi importante la scelta dei materiali utilizzati e del design scelto per la fabbricazione dello *scaffold*.

1.1.1.1 Caratteristiche di uno *scaffold*

Lo *scaffold* per rigenerare al meglio il tessuto deve rispondere a determinati requisiti, quali: composizione chimica adeguata, biocompatibilità e biodegradabilità con cinetica di degradazione appropriata, porosità interconnessa, proprietà meccaniche conformi al tessuto, buona processabilità e sterilizzabilità [10][11][12].

Lo *scaffold* deve riuscire a regolare il comportamento cellulare affinché si formi il tessuto. In tal senso risulta fondamentale la **composizione chimica**, che deve essere adeguata per garantire l'adesione, la migrazione e il differenziamento cellulare.

I meccanismi cellulari menzionati sono favoriti anche da una struttura e una dimensione dei pori appropriate. Lo *scaffold* ottimale deve essere **altamente poroso**, con porosità maggiore del 90% [10]. Infatti un'area superficiale molto ampia garantisce alle cellule il giusto spazio per aderire e crescere, con poche limitazioni

[10]. Inoltre, un elevato rapporto superficie/volume permette ad un numero maggiore di cellule di popolare il *template* [13]. Affinchè si riesca a formare il nuovo tessuto in modo efficace, la struttura dei pori deve garantire una distribuzione spaziale omogenea delle cellule all'interno dello *scaffold* [11]. Non è quindi sufficiente una porosità elevata, ma deve anche essere **interconnessa**. In questo modo, non solo viene consentita la totale colonizzazione dello *scaffold* da parte delle cellule, ma la presenza di pori più piccoli permette il passaggio dei nutrimenti utili alla vitalità cellulare e dei vasi sanguigni, fondamentali per la vascolarizzazione del tessuto [12].

La percentuale e la dimensione dei pori presenti nel costrutto non influenza solo la quantità di cellule che possono popolarlo, ma anche le sue **proprietà meccaniche**. Infatti si è notato come esse risultino più deboli in presenza di elevata porosità, con pori dell'ordine delle centinaia di micron [14].

È necessario che le proprietà meccaniche dello *scaffold* siano adeguate. Devono mantenere la struttura della forma desiderata e, allo stesso tempo, garantirne la funzione appena dopo l'impianto e durante il rimodellamento del tessuto.

Per fornire alle cellule i corretti segnali che consentano il differenziamento nel fenotipo desiderato, tali proprietà meccaniche devono essere simili a quelle del sito biologico di impianto. Come riportato in letteratura, infatti, vi è una forte connessione tra stress meccanici e comportamento cellulare: la matrice extracellulare è capace di riconoscere lo stimolo meccanico, oltre che morfologico, e risponde di conseguenza modificando la forma e l'orientamento della cellula [15].

Importante requisito è la **biocompatibilità**, proprietà che identifica quei materiali che riescono ad integrarsi con il sistema biologico senza innescare risposte infiammatorie o rilasciare sostanze tossiche nell'organismo. Più precisamente, lo *scaffold* deve essere **biodegradabile**. Idealmente esso dovrebbe essere completamente riassorbito una volta formato il tessuto. Quindi non solo deve essere biocompatibile ma anche i prodotti di degradazione non devono essere tossici e devono poter essere eliminati dai normali processi fisiologici, senza provocare reazioni sfavorevoli da parte del tessuto.

Le tempistiche della degradazione sono importanti al fine di ottenere un tessuto funzionante ed autosufficiente; la **cinetica di degradazione** dovrà essere paragonabile alla velocità con cui il tessuto viene rigenerato. Il tipo di tessuto da

rigenerare, il materiale utilizzato, il design e la struttura dello *scaffold* influenzano tale velocità [13].

Infine, lo *scaffold* deve essere **processabile** in tre dimensioni e **riproducibile** su larga scala, per poter avere applicazioni in clinica. Per garantire e mantenere l'atossicità e la biocompatibilità del costruito è importante anche che esso sia **sterilizzabile**, ma il processo non deve modificarne le caratteristiche.

1.1.2 Materiali utilizzati per la fabbricazione di *scaffold*

Gli *scaffold* utilizzati nell'ingegneria tissutale possono essere fabbricati impiegando biomateriali che sono classificati come semplici o compositi.

I materiali semplici possono essere metallici, ceramici o polimerici.

Quelli compositi risultano invece in una combinazione di due materiali semplici, in cui uno svolge la funzione di matrice.

Tendenzialmente i materiali più usati sono ceramici, polimerici e compositi.

La possibilità di combinare le migliori caratteristiche di polimeri naturali e sintetici o polimeri e ceramici rende i compositi un'ottima scelta in campo biomedicale.

1.1.2.1 Materiali polimerici

Il termine polimero deriva dal greco *polymerés* [7] e significa "che ha molte parti". Infatti i polimeri sono macromolecole ad elevato peso molecolare costituite da un gran numero di unità ripetitive identiche, chiamate monomeri, unite tra loro da legami chimici.

I materiali metallici e ceramici hanno raggiunto ottimi risultati in campo medico, ma sono poco usufruibili nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti, dove invece hanno assunto molta importanza i materiali polimerici, che presentano innumerevoli vantaggi [11].

I polimeri infatti presentano una buona processabilità che consente di fabbricare *scaffold* con composizioni e proprietà modulabili, design diversi e forme anche complesse, utilizzando tecniche di lavorazione differenti. È inoltre possibile

sottoporre questi costrutti a modifica superficiale e all'immobilizzazione di biomolecole e cellule, migliorando l'adesione cellulare e la bagnabilità [16].

È evidente come tali materiali possano essere in grado di garantire la realizzazione di *scaffold* di natura complessa e varia, capaci di mimare la matrice extracellulare nativa.

Una possibile classificazione dei polimeri viene effettuata sulla base del comportamento esibito in funzione della degradabilità:

- ♦ **Polimeri biostabili:** una volta impiantati non subiscono variazioni chimico-fisiche nel tempo;
- ♦ **Polimeri bioinerti:** materiali stabili le cui interazioni con i tessuti circostanti sono minime;
- ♦ **Polimeri biodegradabili:** subiscono modificazioni chimiche a contatto con l'ambiente biologico che comportano la loro dispersione molecolare, ma senza l'eliminazione dei prodotti di degradazione dall'organismo [14];
- ♦ **Polimeri biorisorbibili:** all'interno del corpo, a contatto coi fluidi biologici, subiscono una progressiva degradazione che produce *debris* non tossici, che vengono rimossi da attività cellulari.

Considerando le caratteristiche che uno *scaffold* ideale dovrebbe avere, i polimeri più adatti in campo biomedicale sembrano essere quelli biodegradabili e/o biorisorbibili. Infatti essi consentono di realizzare un supporto temporaneo che degrada nel tempo con una velocità specifica e adeguata, lasciando il posto al tessuto di nuova formazione. I prodotti di degradazione, però, non devono essere tossici e devono poter essere facilmente eliminati dall'organismo tramite i naturali processi metabolici. Un altro vantaggio è rappresentato dal fatto che una volta impiantato il costrutto *in situ*, non è necessario effettuare un secondo intervento invasivo per rimuoverlo.

Inoltre tali materiali consentono di realizzare strutture in grado di partecipare attivamente alla rigenerazione del tessuto mediando il rilascio controllato di farmaci, molecole e fattori di crescita. Questi *scaffold* sono diventati di grande interesse negli ultimi anni proprio perché la presenza di tali fattori contribuisce ad una più veloce ed efficace guarigione del danno tissutale.

1.1.2.1.1 Processo di degradazione nei polimeri biodegradabili

Come accennato nel paragrafo precedente i polimeri che vengono impiegati per la fabbricazione di *scaffold* in ambito biomedico sono biodegradabili e/o biorisorbibili. Infatti i *template* fabbricati servono da supporto temporaneo e devono poi essere completamente sostituiti dal tessuto rigenerato.

Per ottenere un risultato ottimale la velocità di degradazione del materiale deve essere adeguata a quella di rigenerazione del tessuto. È quindi necessario conoscere i meccanismi di degradazione del materiale polimerico per decidere quale possa essere utilizzato per la specifica applicazione.

In generale il processo di degradazione è influenzato da svariati fattori quali composizione chimica, peso molecolare, morfologia, presenza di eventuali difetti o porosità e sito di impianto.

Una prima distinzione può essere effettuata sulla base della modalità di degradazione: omogenea ed eterogenea (figura 1.3).

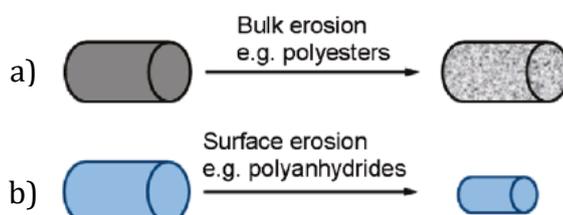


Figura 1.3 Modalità di degradazione dei polimeri: a) Degradazione omogenea, in massa (in bulk); b) Degradazione eterogenea o superficiale.

La **degradazione omogenea**, detta anche **in massa** o **in bulk**, prevede un progressivo deterioramento a partire dall'interno del materiale, che mantiene la propria forma fino a che il peso molecolare è talmente basso da far collassare la struttura, con perdita delle proprietà meccaniche.

La **degradazione eterogenea**, invece, è una degradazione **superficiale** che porta a graduale deterioramento della forma e delle proprietà meccaniche.

I materiali possono quindi degradare secondo queste due modalità, in base alle proprie caratteristiche. La capacità di assorbire molta acqua al proprio interno, per esempio, porta i polimeri idrofilici a degradare in massa; mentre i polimeri idrofobici,

che hanno struttura e caratteristiche diverse che non consentono l'assorbimento di acqua, tenderanno a degradare con meccanismo superficiale.

Le reazioni di degradazione che si verificano all'interno dell'ambiente biologico possono essere di tre tipi: idrolitica, ossidativa ed enzimatica.

La **degradazione idrolitica** avviene se nel materiale sono presenti legami che possono essere rotti per idrolisi, come reazione all'acqua (figura 1.4).

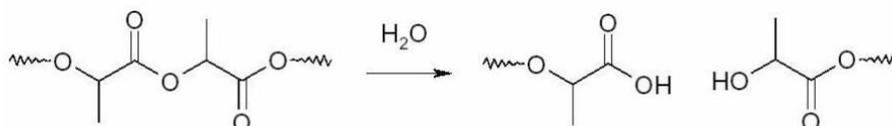


Figura 1.4 Esempio di polimero degradato idroliticamente. Poliestere idrolizzato.

Poliesteri, esteri, poliammidi e polianidridi, proteine, policarbonati e poliuretani, polimeri prevalentemente preparati per policondensazione, possono essere sottoposti ad idrolisi per la presenza dei gruppi carbonilici nella loro struttura.

È possibile testare questo tipo di degradazione *in vitro* e successivamente *in vivo*, andando a valutare il cambiamento delle caratteristiche del materiale (peso, peso molecolare e proprietà meccaniche) nel tempo.

Un film di materiale viene posto nelle condizioni fisiologiche di pH neutro (7.4) e temperatura di 37° in ambiente asettico. La valutazione della variazione di peso e di peso molecolare può fornire informazioni su modalità e velocità di degradazione.

Per esempio, una minima variazione nel peso accompagnata da una notevole differenza nel peso molecolare potrebbero identificare una degradazione in massa.

Inoltre, si è notato che la rottura dei legami per idrolisi porta al rilascio di prodotti che abbassano il pH, provocando un incremento di acidità, che sembra a sua volta provocare un aumento nella velocità di degradazione.

La cinetica di degradazione *in vitro* risulterà, in ogni caso, più lenta rispetto a quella *in vivo* perché la presenza di interazioni tra componenti umorali e cellulari dei fluidi corporei, in ambiente biologico, provocano risposte aggressive nei confronti del materiale impiantato. Infatti la presenza di determinati ioni contenuti nei fluidi extracellulari, come per esempio PO_4^{3-} , catalizza la reazione di idrolisi velocizzandone la degradazione.

La degradazione idrolitica può avvenire in *bulk* o superficialmente in base alle caratteristiche dei polimeri. Il policaprolattone (PCL), per esempio, degrada *in bulk* e la rottura dei legami genera prodotti alcolici che portano ad un accumulo di materiale acido al suo interno.

Gli *scaffold* polimerici possono anche essere sottoposti ad una **reazione degradativa** definita **ossidativa**, che può essere causata da diverse situazioni.

Si definisce ossidazione **diretta** quando questa è provocata direttamente dall'ospite, una volta impiantato il costrutto. Si verifica sempre perché il corpo sente la presenza di un elemento estraneo e di conseguenza vengono reclutati i macrofagi, che con la loro attività di risposta anti-infiammatoria producono sostanze ossidanti che concorrono alla degradazione del materiale polimerico.

L'ossidazione può essere indotta dalla presenza di **ioni metallici** prodotti dalla corrosione di parti metalliche eventualmente presenti nello *scaffold* o nelle vicinanze. Si manifesta sul materiale attraverso fessure lisce ad orientamento casuale sulla superficie, che identificano una maggiore fragilità, e prodotti di degradazione nel *core*. Per ovviare a questa condizione è possibile incorporare materiali antiossidanti oppure utilizzare direttamente polimeri antiossidanti.

Anche se limitata a casi particolari, può verificarsi ossidazione causata dall'**ambiente esterno**, in particolare dalla trasmissione di radiazioni elettromagnetiche. Infatti l'eccitazione degli elettroni può provocare degrado foto-ossidativo, con conseguente danneggiamento del materiale.

L'ultimo meccanismo di degradazione cui possono essere sottoposti i materiali polimerici è quello **enzimatico**, dovuto alla presenza di enzimi nell'ambiente biologico. Questa è una degradazione specifica perché gli enzimi impiegati degradano il materiale solo in corrispondenza di sequenze peptidiche precise.

La velocità della reazione di idrolisi è aumentata dalla presenza dell'enzima, che si comporta da catalizzatore. La degradazione è superficiale perché gli enzimi non riescono a penetrare il materiale e quindi iniziano a degradarlo dall'esterno.

Sono tre i possibili meccanismi con cui si verifica tale degradazione, e dipendono dal tipo di materiale che si va a deteriorare.

Il primo meccanismo è specifico per gli idrogeli e prevede lo sfaldamento dei legami ramificati delle catene polimeriche, trasformando il polimero da insolubile a solubile in acqua.

Il secondo meccanismo consiste nella polarizzazione dei gruppi laterali di catena, che rende la molecola idrofila e quindi degradabile.

L'ultimo meccanismo è principalmente impiegato su polimeri solidi e comporta la separazione dei monomeri che compongono la catena principale, permettendone l'eliminazione dall'organismo per vie metaboliche.

Gli enzimi principalmente coinvolti appartengono alla classe delle idrolasi, che sono specifici per la reazione di idrolisi. Alcuni esempi sono rappresentati dalla collagenasi, enzima presente nella matrice extracellulare adibito alla degradazione del collagene oppure dall'elastasi, che invece agisce sulle fibre elastiche della matrice.

Si evince quindi che se si vogliono fabbricare *scaffold* in grado di degradare enzimaticamente è necessario scegliere il giusto materiale e garantire in esso la presenza delle specifiche sequenze di riconoscimento per gli enzimi secreti dal tessuto in cui andrà impiantato.

I polimeri biodegradabili utilizzati in ambito biomedico si distinguono in due categorie: polimeri sintetici e polimeri naturali [17].

1.1.2.1.2 Polimeri sintetici

I polimeri sintetici sono materiali polimerici sintetizzati industrialmente che vengono spesso utilizzati nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti perché presentano diversi vantaggi. Infatti essi risultano facilmente sintetizzabili, con proprietà riproducibili e ripetibili ed è anche possibile sterilizzarli senza provocare variazioni nella loro composizione.

Il vantaggio di sintetizzare tali materiali è quello di poter ottenere strutture con caratteristiche chimiche, fisiche, morfologiche, meccaniche e degradative differenti, modulabili e conformi al tipo di applicazione biomedicale per cui sono impiegati o al tessuto che si desidera rigenerare [18].

Uno svantaggio nell'utilizzo di questi materiali è, invece, la diversità di struttura rispetto alla matrice extracellulare nativa. Ciò potrebbe comportare una mancanza di

gruppi funzionali che garantiscano l'adesione delle cellule, e di conseguenza una scarsa bioattività. Per ovviare a questo problema è possibile funzionalizzare i materiali con molecole quali peptidi, proteine o polisaccaridi. In questo modo i polimeri diventano bioattivi, sono in grado quindi di instaurare un legame con il tessuto biologico e di innescare reazioni cellulari che porteranno alla formazione di nuovo tessuto sano [19], senza la presenza di una capsula fibrotica.

La funzionalizzazione dei materiali ha come obiettivo quello di migliorare l'adesione e la proliferazione cellulare e può avvenire immobilizzando biomolecole all'interno della struttura (in massa o *in bulk*) oppure sulla superficie.

Per funzionalizzare i polimeri *in bulk* si possono utilizzare tre metodi differenti:

- ◆ Introdurre sequenze peptidiche durante il processo di sintesi. Ad esempio, nel caso dei poliuretani vengono inseriti estensori di catena capaci di legarsi alla catena polimerica ed aggiungere le sequenze peptidiche desiderate;
- ◆ Miscelare il polimero con il materiale che andrà a funzionalizzarlo (polimero naturale o proteina, ma non peptide);
- ◆ Sintesi di idrogeli bioattivi contenenti peptidi e proteine.

Anche la funzionalizzazione superficiale può avvenire tramite l'utilizzo di metodologie diverse:

- ◆ Esposizione di gruppi funzionali sulla superficie grazie ad un *grafting* covalente di proteine o peptidi formato mediante processi quali l'idrolisi, l'aminolisi, il trattamento al plasma, o l'utilizzo di proteine con capacità adesive come la polidopamina (DOPA);
- ◆ Rivestimenti non covalenti formati sfruttando il forte accoppiamento biotina-streptavidina oppure interazioni elettrostatiche (tecnica Layer-by-Layer).

I polimeri sintetici più utilizzati in ambito biomedicale appartengono alle famiglie dei poliesteri, dei poliuretani e dei polieteri.

I poliesteri sono polimeri di sintesi soggetti a degradazione idrolitica ed enzimatica, con cinetiche variabili in funzione di diversi fattori quali l'idrofilicità, la morfologia, la struttura, il grado di cristallinità e la porosità del materiale [18].

Fanno parte di questa famiglia di polimeri l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA) e i loro compositi (PLGA, PLLA, PDLA, PDLLA), che sono impiegati in

ambito biomedicale come fili da sutura per le operazioni chirurgiche e sono studiati per la rigenerazione di tessuti come cartilagine [10], osso e pelle [14] ed il rilascio di farmaci.

Anche il policaprolattone (PCL), poliestere alifatico, è spesso studiato per la realizzazione di *scaffold* nell'ingegneria dei tessuti per via delle sue buone proprietà meccaniche, l'elevata idrofobicità, la biocompatibilità e l'ampia versatilità. Rispetto al PLA ha una cinetica di degradazione più lenta che lo rende il materiale ideale per impianti a lungo termine o per il rilascio di farmaci [18].

Nei poliesteri rientrano anche i poliidrossialcanoati (PHA) di cui il più comune è il poli(3-idrossibutirrato) (PHB), semicristallino biocompatibile con elevata rigidità e fragilità. Subiscono degradazione superficiale e hanno alti costi di produzione.

I poliuretani contengono il gruppo uretanico nella loro struttura e, in genere, sono copolimeri a blocchi costituiti da due fasi: *soft* e *hard*. In funzione della struttura possono presentare proprietà molto diverse. Tendono a degradare lentamente per idrolisi, anche se è possibile catalizzare la reazione con un enzima.

Infine, nella famiglia dei polieteri si ritrovano altri due polimeri interessanti per applicazioni biomedicali: il polietilenglicole (PEG) e il polietilenossido (PEO).

Sono polimeri altamente idrofili e solubili in acqua e presentano degradazione di tipo ossidativo. Vengono per lo più utilizzati per il trasporto di farmaci e biomolecole o per fabbricare rivestimenti anti-fouling, per evitare l'adsorbimento delle proteine sulla superficie dello *scaffold*.

In tabella 1.1 sono riportati, in modo schematico, i polimeri sintetici principalmente utilizzati, sopra menzionati. Si riportano le seguenti informazioni: formula di struttura e famiglia di appartenenza, caratteristiche di degradazione [18] e possibili applicazioni.

POLIMERO	FORMULA	FAMIGLIA	TIPO DI DEGRADAZIONE	VELOCITÀ DI DEGRADAZIONE	TEMPO DI DEGRADAZIONE	APPLICAZIONI
ACIDO POLIGLICOLICO (PGA)		Poliesteri	Idrolitica, in <i>bulk</i> Enzimatica	Elevata	6-12 mesi	Fili da sutura bioriassorbibili [18] e <i>scaffold</i> per la rigenerazione di tessuti come la cartilagine [10]
ACIDO POLI(D)ILATTICO (PDLA) ACIDO POLI(L)LATTICO (PLLA)		Poliesteri	Idrolitica, in <i>bulk</i> Enzimatica	Lenta	PDLA: 12-16 mesi PLLA: >2anni	Sistemi per il rilascio di farmaci e <i>scaffold</i> per la rigenerazione dei tessuti [14][18]
POLICAPROLATTONE (PCL)		Poliesteri	Idrolitica, in <i>bulk</i> Enzimatica	Lenta	>2 anni	Sistemi per il rilascio di farmaci [47] [71] e fattori di crescita [56] e <i>scaffold</i> per la rigenerazione dei tessuti [47][80]
POLIIDROSSIBUTIRRATO (PHB)		Poliidrossialcanoati	Idrolitica, Superficiale	Lenta		Sistemi per il rilascio di farmaci, suture chirurgiche e <i>scaffold</i> per la rigenerazione dei tessuti [14]
POLIETILENGLICOLE (PEG) o POLIETILENOSSIDO (PEO)		Poliesteri	Ossidativa	Lenta		Materiali anti-fouling e anti-trombogenici, utili per rivestimenti di <i>scaffold</i> e stent [7]. PEO utilizzato insieme ad altri polimeri per realizzare fibre coassiali per il rilascio di farmaci [56]

Tabella 1.1 Polimeri sintetici bioriassorbibili maggiormente utilizzati in ambito biomedicale.

1.1.2.1.3 Polimeri naturali

I polimeri naturali generalmente sono derivati da componenti della matrice extracellulare, o comunque ne mimano la composizione. La sorgente di origine può essere animale o vegetale [20].

Essi presentano biocompatibilità e atossicità, infatti sono ben tollerati dal sistema biologico quando impiantati. A differenza dei polimeri sintetici, risultano già bioattivi e riescono ad integrarsi con il tessuto fornendo i corretti segnali necessari alle cellule per aderire, migrare e differenziare nel fenotipo desiderato. Sarebbe comunque possibile effettuare ulteriori modifiche superficiali, processo che risulterebbe più semplice rispetto a quello effettuato sui polimeri sintetici.

La biomimetività rende questi materiali adatti ad applicazioni biomedicali, soprattutto per la rigenerazione dei tessuti.

Nonostante ciò il processo di estrazione del materiale è più dispendioso rispetto a quello dei polimeri sintetici e risulta essere molto delicato, infatti il necessario utilizzo di condizioni aggressive potrebbe provocare danni o denaturare il materiale.

L'impiego dei polimeri naturali presenta anch'esso qualche svantaggio.

Infatti le proprietà di questi materiali sono poco controllabili, soprattutto la cinetica di degradazione [11], e non possono essere modulate in base alla necessità e al tipo di applicazione. Limitazioni importanti sono rappresentate dalle scarse proprietà meccaniche e da una velocità di degradazione elevata, che non rispecchiano i requisiti richiesti per la realizzazione di *scaffold* adeguati.

La produzione dei polimeri naturali non è riproducibile come quella dei sintetici perché dipende dalle condizioni ambientali in cui avviene [20]. Inoltre l'esposizione del materiale all'ambiente esterno, durante l'esportazione, potrebbe comportare una contaminazione microbica o da metalli pesanti [20]. Questo fattore associato all'origine animale di questi materiali provoca un'elevata immunogenicità, legata al rischio di trasmissione di malattie.

I polimeri naturali sono per la maggior parte idrofili, con elevata solubilità in acqua che conferisce loro una scarsa stabilità in ambiente acquoso. Per migliorarne la stabilità, quindi, è spesso necessario sottoporre tali materiali al processo di reticolazione (cross-linking) prima di impiantarli.

I polimeri naturali utilizzati in campo biomedicale si dividono in due categorie: polisaccaridi e proteine.

I polisaccaridi sono polimeri formati da monosaccaridi, uguali o diversi, uniti da legami o-glicosidici [21]. Intervengono nel meccanismo di adesione delle cellule al substrato oltre che nella comunicazione tra cellule. Possono svolgere ruolo di sostegno e di riserva energetica. La loro natura idrofilica garantisce la presenza di una matrice extracellulare idratata e porosa, utile al passaggio di nutrienti e scarti metabolici.

I polisaccaridi che si possono utilizzare per la realizzazione di *scaffold* sono [21][7]:

- ◆ Polisaccaridi di origine animale: acido ialuronico, glicosamminoglicani, condroitinsolfato, cheratansolfato, dermatansolfato ed eparina che appartengono alla matrice extracellulare; chitina/chitosano;
- ◆ Polisaccaridi di origine vegetale estratti dalle piante come cellulosa, amido e gomme; oppure estratti dalle alghe come alginato, agar e galattano;
- ◆ Polisaccaridi derivanti da microorganismi, che non fanno parte della matrice extracellulare, come gellano, dextranso, pullulano e cellulosa batterica.

Le proteine, o polipeptidi, sono polimeri basati sulla ripetizione di amminoacidi la cui sequenza ne identifica la struttura e l'attività. Svolgono funzioni diverse quali catalisi delle reazioni metaboliche, sintesi, segnalazione cellulare e funzione strutturale nella matrice extracellulare. Come i polisaccaridi anche le proteine intervengono nel processo di adesione cellulare, per cui presentano una certa bioattività e possono distinguersi in:

- ♦ Proteine contenute nella matrice extracellulare, che tendenzialmente assumono un ruolo strutturale, come fibrina, laminina, elastina, collagene e suoi derivati (gelatina);
- ♦ Proteine che non appartengono alla matrice extracellulare come cheratina, proteine adesive della cozza e della seta.

Polimeri naturali come chitosano, collagene e gelatina sono molto studiati per le loro possibili applicazioni in ambito biomedicale, soprattutto nel campo dell'ingegneria dei tessuti data la loro natura biomimetica e bioattiva.

Data la presenza di vantaggi e limitazioni in entrambe le tipologie di polimeri utilizzabili in ambito biomedicale, si studia spesso l'impiego di materiali formati dalla loro unione. In questo modo è possibile compensare le debolezze ed enfatizzare le qualità di entrambi.

Alternativa interessante è rappresentata dall'utilizzo di materiali compositi formati da una matrice polimerica in cui vi è disperso un materiale ceramico. Si denota generalmente un miglioramento nelle proprietà dello *scaffold*, che può anche assumere un comportamento "attivo" laddove vengono impiegati ceramici di natura particolare.

1.2 Materiali piezoelettrici

Nei paragrafi precedenti si è discussa l'importanza del materiale scelto per la progettazione e la realizzazione di uno *scaffold* per la rigenerazione di un tessuto danneggiato. Sono molteplici i materiali polimerici che sono stati studiati e valutati in questo settore, ma spesso sono stati fabbricati *scaffold* passivi in grado semplicemente di donare supporto alle cellule, senza veicolarne in alcun modo la

migrazione o la differenziazione [19]. Questa passività potrebbe diventare un problema soprattutto nel caso di tessuti molto complessi, in cui la crescita non controllata delle cellule potrebbe portare alla formazione di nuova matrice extracellulare indesiderata [19]. Per rimediare a queste limitazioni è possibile realizzare *scaffold* con comportamento “attivo” in grado di promuovere i corretti processi cellulari, utili alla formazione del tessuto desiderato [19].

È su questi *scaffold* bioattivi che ci si è maggiormente concentrati nell'ultimo decennio, andando anche a studiare materiali alternativi, definiti intelligenti (*smart materials*), capaci di rispondere a stimoli diversi di natura fisica (pressione, temperatura), chimica (pH, concentrazione) e meccanica (stress e deformazioni) [16]. Sono svariati i materiali *smart* impiegati per la realizzazione di *scaffold* bioattivi [16]; in questo lavoro di tesi sono state utilizzate nanoparticelle di materiale piezoelettrico.

La piezoelettricità è stata scoperta da Jacques e Pierre Curie nel 1880 ed è una caratteristica che i materiali possono esibire in base alla loro struttura cristallina, infatti si evidenzia solo quando la cella cristallina unitaria non presenta un centro di simmetria [22]. Recentemente i materiali che posseggono questa proprietà hanno assunto molta importanza per via delle loro caratteristiche, e risultano impiegabili in modo efficace anche in ambito biomedico. Infatti, la capacità di generare cariche elettriche quando sottoposti ad uno stress meccanico, e viceversa, li rende un'ottima scelta per applicazioni in cui è necessaria una trasduzione elettro-meccanica del segnale [16].

I materiali piezoelettrici possono essere classificati come segue [22] (schematicamente rappresentati in figura 1.5):

- ◆ Effetto **diretto** (o generatore): l'imposizione di uno stimolo meccanico comporta una polarizzazione asimmetrica di cariche con generazione elettrica;
- ◆ Effetto **indiretto** (o motore): l'applicazione di un campo elettrico produce una risposta meccanica nel materiale.

I materiali piezoelettrici possono essere naturali come per esempio il quarzo e la seta, oppure sintetizzati come polimeri, ceramici e compositi.

Sono 20 le classi di cristalli considerati piezoelettrici e si dividono in 7 gruppi, in funzione della loro struttura cristallina e della natura elastica del materiale (anisotropia, isotropia, ortotropia) [23].

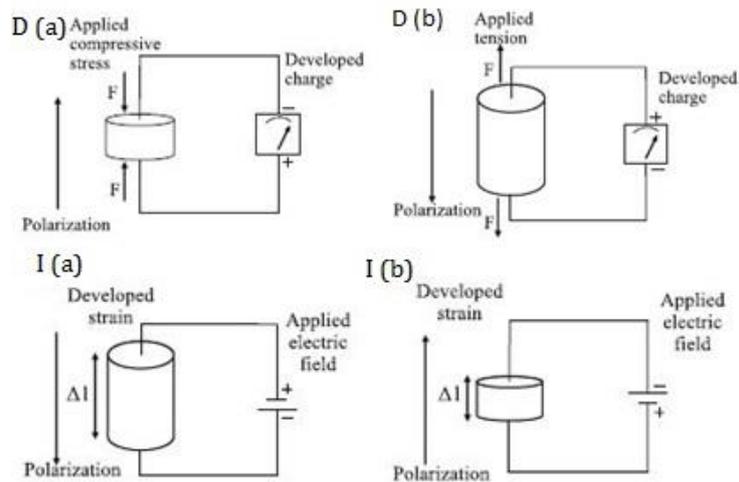


Figura 1.5 Rappresentazione schematica degli effetti piezoelettrici [23]: *D(a) Diretto, stimolo meccanico a compressione; D(b) Diretto con stimolo meccanico a trazione; I(a) e I(b) Indiretto con l'imposizione di un campo elettrico, in base al segno si ha una risposta meccanica corrispondente.*

Una delle classi più studiate di materiali piezoelettrici per le applicazioni biomedicali è quella dei ceramici con struttura cristallina perovskite.

In generale, un materiale appartenente a questa classe presenta una struttura cristallina della cella elementare del tipo ABO_3 , come mostrato nella figura 1.6.

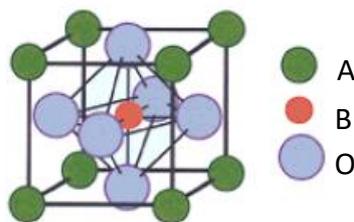


Figura 1.6 Struttura cristallina perovskite con cella unitaria del tipo ABO_3 [22].

Un piccolo catione B al centro del corpo viene attorniato da atomi di ossigeno, al centro delle facce, e da grandi cationi A, ai vertici della cella.

Rientrano in questa categoria ceramici quali il titanato di bario ($BaTiO_3$), il titanato di piombo ($PbTiO_3$), lo zirconato titanato di piombo (ZTP), e il piombo niobato di magnesio (PMN).

Anche altri materiali piezoelettrici sono stati oggetto di studio per applicazioni in ambito biomedico: l'ossido di zinco (ZnO), che presenta anche comportamento semiconduttivo e grande varietà di forma e il nitrato di boro sotto forma di nanotubi (BNNT) [16].

1.2.1 Nanoparticelle di titanato di bario

Il titanato di bario è un materiale ceramico di tipo perovskite con formula BaTiO_3 .

È un ceramico chimicamente e meccanicamente stabile facile da sintetizzare, tramite differenti metodi in base alle caratteristiche desiderate [24]. È modellabile in tante forme diverse ed è economico [23]. La sua composizione chimica e fisica gli conferisce, in determinate condizioni, proprietà piezoelettriche, ferroelettriche, catalitiche e in parte antiossidanti ed anti-infiammatorie, data la presenza di ioni titanio capaci di ridursi [25].

La scoperta dell'elevata costante dielettrica ($\epsilon > 1200 \text{ C/Nm}^2$) e successivamente delle proprietà ferroelettriche e piezoelettriche del titanato di bario, nei primi anni quaranta del Novecento, ha permesso di conoscere, studiare e utilizzare altri materiali ceramici con le stesse proprietà, dando così inizio alla storia della piezoelettricità [22][23].

Un sottogruppo dei materiali piezoelettrici è formato dai materiali ferroelettrici, che si contraddistinguono per la presenza di una polarizzazione spontanea nel loro stato indeformato e la possibilità di orientare i dipoli elettrici lungo la direzione di polarizzazione. È una proprietà che dipende molto dalla struttura atomica del materiale, per questo si manifesta solo in presenza di determinate strutture cristalline, tra le quali risulta interessante la configurazione perovskite [26].

La struttura cristallina del titanato di bario varia in base alla temperatura cui viene sottoposto. Si definisce una temperatura critica, detta di Curie (T_c), rispetto alla quale è possibile distinguere diverse configurazioni cristalline, di volta in volta assunte dal materiale. Per il titanato di bario la T_c è di $120 \text{ }^\circ\text{C}$ e le transizioni cristalline subite sono 5 [24]. Esse sono rappresentate schematicamente in figura 1.7, mentre la figura 1.8 mostra la struttura cristallina del BaTiO_3 relativa alle sue due configurazioni principali.

Se il ceramico si trova ad una temperatura più elevata della T_c la sua struttura cristallina risulta cubica e simmetrica, con al centro della cella un piccolo catione Ti^{4+} , ai vertici ioni Ba^{2+} , di dimensioni maggiore e al centro delle facce gli ioni ossigeno O^{2-} (figura 1.8 a). In questa condizione, definita paraelettrica [24], il materiale è inattivo e non esibisce alcun comportamento ferroelettrico o piezoelettrico. Questa

configurazione cubica è stabile fino a 1460 °C (figura 1.7 a), al di sopra dei quali risulta invece stabile una struttura esagonale [24].

A temperature inferiori ai 120 °C ogni cristallo subisce una transizione cristallografica passando da una struttura cubica simmetrica ad una asimmetrica tetragonale e successivamente romboedrica (quando $T=5$ °C), fase ferroelettrica [24] (figure 1.7 e 1.8 b, c). Questa trasformazione è associata allo spostamento relativo degli ioni, che provoca una polarizzazione spontanea lungo un'unica direzione cristallografica [26]. È in questa configurazione cristallina che il titanato di bario presenta le proprietà piezoelettriche che lo rendono un materiale tanto studiato. Quando le temperature sono molto basse (-90 °C) il ceramico subisce un ulteriore cambiamento nella propria struttura cristallina, che diventa trigonale [24] (mostrata in figura 1.7 d).

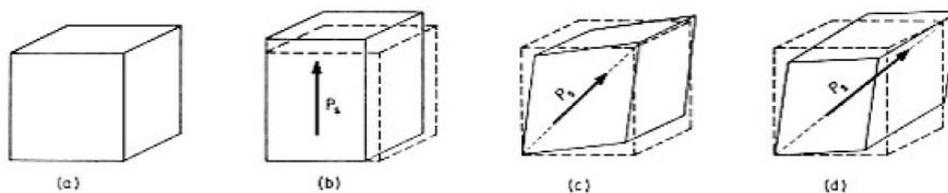


Figura 1.7 Cella unitaria del $BaTiO_3$ nelle quattro fasi di transizione: a) Cubica, stabile sopra i 120 °C; b) Tetragonale, stabile tra 120 °C e 5 °C; c) Ortrorombica, stabile tra 5 °C e -90 °C; d) Trigonale, stabile sotto i -90 °C [24].

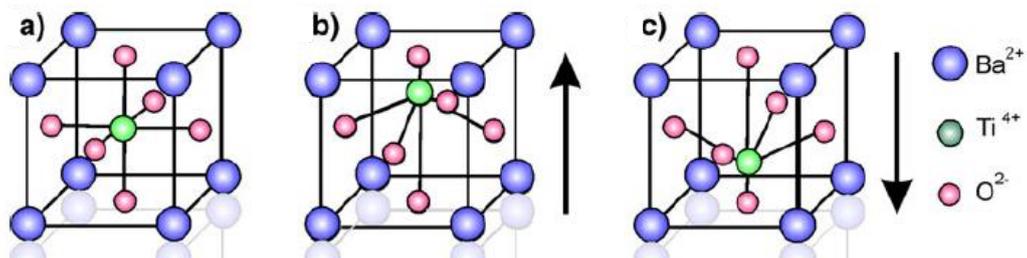


Figura 1.8 Struttura cristallina del $BaTiO_3$: a) $T > T_c$: fase para-elastica. Configurazione cubica simmetrica; b) e c) $T < T_c$: fase ferroelettrica. Configurazione asimmetrica tetragonale o romboedrica data dallo spostamento degli ioni Ti^{4+} rispettivamente verso l'alto (b) o verso il basso (c). [26].

Principalmente il titanato di bario è impiegato per applicazioni quali condensatori discreti e multistrato (MLCs) e semiconduttori, ma la sua biocompatibilità e le sue proprietà piezoelettriche lo rendono un materiale interessante anche per applicazioni in ambito biomedicale, soprattutto nell'ingegneria dei tessuti.

1.2.1.1 Applicazione delle nanoparticelle in ambito biomedicale

Si è evidenziato nei paragrafi precedenti come i materiali piezoelettrici possano essere impiegati anche in ambito biomedicale. Infatti, grazie alle loro caratteristiche, tali materiali possono avere svariate applicazioni come ad esempio la stimolazione elettrica di tessuti eccitabili come l'osso o i nervi, senza l'utilizzo di elettrodi [27][28], o come nanovettori per il rilascio mirato di farmaci [29].

In particolare, le nanoparticelle di titanato di bario (BTNP) sono state recentemente oggetto di studio per svariate applicazioni, come evidenziato dalla figura 1.9.

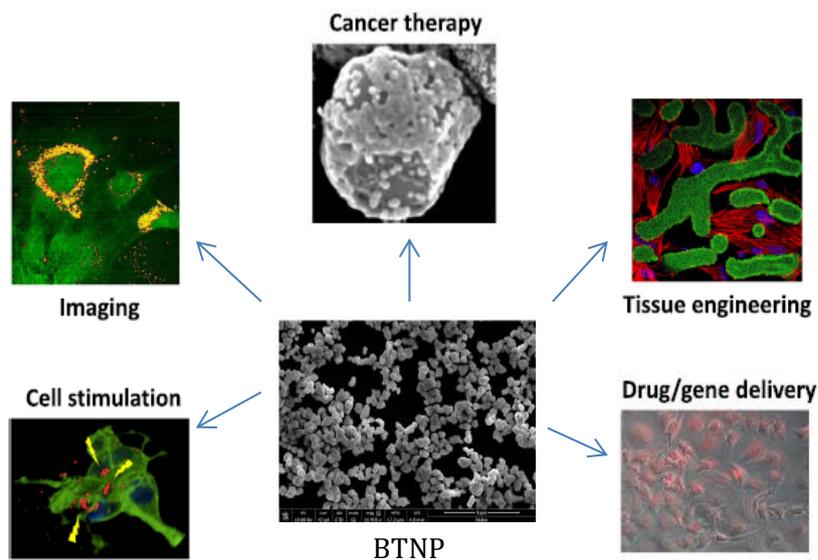


Figura 1.9 Possibili applicazioni in campo biomedicale delle nanoparticelle di titanato di bario (BTNP).

Le nanoparticelle di titanato di bario mostrano grandi potenzialità come particelle teranostiche e nanosonde ottiche, grazie alle loro proprietà ottiche non lineari [29][30] [31], per il trattamento terapeutico contro i tumori [29][30], come nanotrasduttori wireless di stimolazione biologica non invasiva [27] e per fabbricare *scaffold* compositi attivi per la rigenerazione dei tessuti [29].

Il titanato di bario risulta instabile termicamente e le nanoparticelle tendono a precipitare in soluzione acquosa [29]. Diverse sono state le soluzioni proposte per stabilizzare la dispersione delle BTNP, come l'utilizzo di poli-lisina (PLL) [32], acido glicol-chitosano (GC) [33], gomma arabica [34], alcol polivinilico ed etilcellulosa [35].

Il trattamento di neoplasie prevede solitamente l'impiego di farmaci chemioterapici, ma questi producono spesso effetti indesiderati, anche gravi. Per cercare di limitarli, circoscrivendo la citotossicità del medicinale alla sola zona cancerosa, sono stati sviluppati sistemi per il rilascio controllato di farmaci.

Ad esempio, Ciofani e colleghi hanno sperimentato l'applicazione delle BTNP come nanovettori di farmaci [33]. A tale scopo le nanoparticelle sono state disperse in una soluzione di PBS e glicol-chitosano, ed è stato valutato l'effetto tossico provocato su cellule di neuroblastoma umano, con risultati positivi di cito compatibilità [33]. Successivamente è stato somministrato alle stesse cellule tumorali il complesso, più instabile, dox-BTNP (BTNP rivestite con doxorubicina, uno dei principali antibiotici della famiglia delle antracicline, dotata di un ampio spettro antitumorale) [33].

La doxorubicina se prescritta in dosi elevate presenta cardio tossicità e una continua assunzione sembra provocare neuronopatie [36].

I risultati del lavoro di Ciofani e collaboratori mostrano come la presenza delle BTNP permetta una maggiore internalizzazione del farmaco da parte delle cellule, ma allo stesso tempo provochi una maggiore tossicità, pur limitando il quantitativo di principio attivo [33].

Un ulteriore approccio ultimamente utilizzato per il trattamento dei tumori è l'ipertermia, terapia termica che consiste nello scaldare il tessuto per pochi minuti a temperature di 42-47 °C, causando la morte delle cellule cancerogene.

In questo senso Ciofani e colleghi hanno realizzato delle nanoparticelle formate da un *core* di BTNP e un rivestimento d'oro applicabili per l'ipertermia [30]. La scelta dell'oro è legata al fatto che esso è in grado di assorbire le radiazioni nel vicino-infrarosso (NIR) e di produrre, quindi, calore [29]. Le *nanoshells* create sono state accumulate passivamente su cellule di neuroblastoma (SH-SY5Y), risultando biocompatibili, e successivamente sono state irradiate da un laser NIR provocando apoptosi cellulare localizzata [30].

Emerge da questo studio che le BTNP possano essere ottime candidate come nanosonde marcatrici [30] e la capacità di monitorare fenomeni biologici veloci le rende impiegabili simultaneamente per *imaging* e *targeting* cellulare [29].

A tale scopo sono stati sviluppati nanocristalli di titanato di bario da utilizzare come biomarcatori di *imaging* ottico, sfruttando il meccanismo di generazione della

seconda onda (SHG), che permette di ottenere segnali nitidi e duraturi con maggiore contrasto [37][38][39].

I nanocristalli di BTNP progettati da Hsieh e collaboratori, ad esempio, sono stati funzionalizzati con gruppi amminici così da legare covalentemente immunoglobuline G (IgG) sulla superficie. Gli anticorpi secondari così ottenuti vengono riconosciuti da specifici anticorpi primari in ambiente biologico, garantendo una rilevazione biomolecolare specifica. L'emissione di luce blu dei nanocristalli, quando sottoposti a stimolazione laser ad una lunghezza d'onda di 812 nm, permette di rilevare la presenza delle biomolecole [39].

In questo lavoro specifico è stato utilizzato come anticorpo secondario il Cy5, IgG anti-topo, ed è stato testato con quattro diversi anticorpi primari: anticorpo murino anti-uomo IgG CD144, anticorpi anti-uomo IgG di capra e coniglio e anticorpo monoclonale di topo, specifico per l'antigene umano HLA (human leukocyte antigen) di classe I. I risultati dimostrano un'elevata specificità di marcatura degli anticorpi secondari, rendendo i nanocristalli di titanato di bario interessanti biomarker per *imaging in vivo* [39].

Si evince come siano molteplici le aree in cui le nanoparticelle di titanato di bario possano essere applicate, ottenendo vantaggi e risultati promettenti.

1.2.1.1.1 Applicazione delle BTNP nell'ingegneria dei tessuti

Le nanoparticelle di titanato di bario (BTNP) risultano promettenti ed efficaci anche nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti.

Infatti come accennato nel paragrafo 1.2 le caratteristiche del titanato di bario, in quanto materiale piezoelettrico, lo rendono un ottimo candidato per applicazioni in cui sia necessaria la trasduzione elettromeccanica di un segnale. Questa caratteristica, unita alla buona cito compatibilità riscontrata in diversi studi [33] [40], rende le BTNP ceramiche adatte alla fabbricazione di *scaffold* compositi attivi per rigenerare tessuti eccitabili come osso, muscoli e nervi.

♦ **Rigenerazione del tessuto osseo**

Il titanato di bario, grazie alle sue proprietà piezoelettriche, è spesso studiato come materiale ceramico per la fabbricazione di *scaffold* bioattivi compositi per la rigenerazione dell'osso.

Infatti il tessuto osseo è un materiale composito naturale che possiede proprietà piezoelettriche interessanti, studiate a partire dagli anni '50 [26]. Un carico meccanico applicato produce potenziali elettrici, attribuiti alla natura piezoelettrica delle micelle cristalline del collagene e sembra manifestarsi solo quando il carico è applicato alle fibre allineate [41].

L'osso è uno dei pochi tessuti del corpo umano capace di rigenerarsi spontaneamente, ma questo rinnovamento risulta difficile in presenza di danni importanti.

Data la composizione e la natura piezoelettrica del tessuto, gli *scaffold* ultimamente utilizzati per fabbricare innesti ossei sono tendenzialmente compositi. Si uniscono la flessibilità e la riassorbibilità dei polimeri, spesso naturali, con l'osteconduttività e la rigidità dei ceramici [42]. È possibile scegliere come materiale ceramico uno che possieda caratteristiche piezoelettriche, così da stimolare adeguatamente il tessuto. È anche possibile incorporare all'interno degli *scaffold* fattori di crescita o cellule osteogeniche, aumentando ulteriormente la bioattività dell'innesto [42].

Ciofani e colleghi, ad esempio, hanno valutato il comportamento delle BTNP, rivestite con glicol-chitosano (GC), in presenza di cellule staminali mesenchimali (MSC) di topo [40]. I risultati mostrano una buona adesione cellulare. Nonostante le BTNP non influenzino la differenziazione cellulare delle MSCs in osteociti e adipociti, sembrano invece incrementare la formazione di idrossiapatite durante l'osteogenesi [40].

Uno studio *in vitro* volto a valutare l'effetto del composito formato da idrossiapatite e nanoparticelle di titanato di bario (HABT) su cellule simil-ossee (SaOS-2), è stato svolto da Baxter e collaboratori. Dai risultati ottenuti si evince come il composto possa essere considerato un buon substrato per l'adesione e la proliferazione cellulare, che risulta completa dopo circa 7 giorni [43].

Un'analisi effettuata da Ciofani e colleghi sullo *scaffold* 3D commerciale Osteo-Prints, ha dimostrato che la presenza delle BTNP, associata ad una stimolazione con ultrasuoni, sembra aumentare in modo significativo l'osteogenesi nelle cellule simil-ossee coltivate [28].

In un ulteriore lavoro che coinvolge le BTNP per la TE dell'osso, coordinato da Rocca, è stato dimostrato che le nanoparticelle in una condizione di ipergravità migliorano il differenziamento di cellule staminali mesenchimali in osteoblasti [34].

Le nanoparticelle di titanato di bario sono state incorporate in uno *scaffold* nanofibroso in acido poli-L-lattico (PLLA) da Yiping Li e collaboratori [44]. In questo lavoro sono stati fabbricati substrati nanofibrosi in conformazione allineata e *random* e, successivamente, è stato valutato il comportamento esibito da cellule staminali mesenchimali del midollo osseo. Entrambi aumentano la proliferazione cellulare rispetto allo *scaffold* non composito, ma esibiscono comportamenti diversi in funzione dell'allineamento delle fibre. Infatti le cellule coltivate sulle fibre allineate presentano un allungamento nella direzione preferenziale e non si nota un differenziamento cellulare [44]. Invece, le cellule a contatto con le fibre *random* mostrano una struttura filamentosa con un buono *spreading*, in grado di promuovere il differenziamento cellulare osteogenico [44].

♦ **Rigenerazione dei nervi**

La rigenerazione nervosa è un fenomeno complesso, perché non solo è complessa la rete neurale ma lo sono anche le possibili lesioni che possono verificarsi.

Gli stimoli elettrici giocano un ruolo importante nei processi cellulari neuronali [37]. In tal senso possono risultare efficienti materiali piezoelettrici, come le BTNP, nella realizzazione di *scaffold* che possano essere in grado di stimolare elettricamente i tessuti.

Ad esempio, Genchi e colleghi hanno progettato film costituiti dal copolimero piezoelettrico poli(vinilidene-trifluoroetilene) P(VDF-TrFE) caricato con nanoparticelle di titanato di bario, per aumentarne l'effetto piezoelettrico [45]. Successivamente è stato valutato il comportamento dei film durante la coltura con cellule di neuroblastoma umano (SH-SY5Y), utilizzate come modelli neuronali.

I risultati ottenuti mostrano che, rispetto al film di controllo, i neuriti aumentano significativamente sui film compositi, in presenza di stimolazione ultrasonica. La stessa considerazione si può effettuare per la morfologia allungata assunta dalle cellule neurali, che identifica una buona adesione delle cellule al substrato [45].

♦ **Rigenerazione del tessuto muscolare**

È noto come il tessuto muscolare (cardiaco e scheletrico) sia eccitabile ed influenzato durante il proprio sviluppo da svariati stimoli di tipo chimico e meccanico. Infatti corretti segnali meccanici e topografici influenzano lo sviluppo e la forma dei miotubi muscolari, ma anche la tecnica dell'elettrostimolazione risulta una terapia efficace per la stimolazione muscolare [37]. Date le proprietà di tale tessuto, le caratteristiche piezoelettriche del titanato di bario si prestano bene anche per la realizzazione di *scaffold* del tessuto muscolare.

Studi *in vitro* su cardiomiociti di topo (H9c2) sono stati svolti da Ciofani e colleghi utilizzando due diversi costrutti, contenenti le nanoparticelle di titanato di bario.

Il primo è rappresentato da una dispersione di BTNP in poli-lisina (PLL), che non sembra influenzare il differenziamento cellulare [32].

Il secondo costrutto analizzato è uno *scaffold* composito preparato con acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) caricato con BTNP. Questo risulta cito compatibile e la presenza delle nanoparticelle incrementa significativamente la proliferazione e la differenziazione in miotubi dei mioblasti testati [46].

1.2.1.1.1.1 Cito compatibilità delle BTNP

L'applicazione delle BTNP in ambito biomedicale, soprattutto nell'ingegneria tissutale, risulta ottimale se esse presentano biocompatibilità, senza esibire alcun effetto tossico sulle cellule.

Al fine di valutare la cito compatibilità del materiale, in diversi lavori presenti in letteratura sono stati eseguiti test di vitalità cellulare.

Come riportato da Ciofani e colleghi una dispersione di BTNP con la poli-L-lisina (PLL) è stata testata *in vitro*, a diverse concentrazioni, sulla linea cellulare H9c2 [32].

I risultati ottenuti mostrano una buona vitalità cellulare fino ad una concentrazione di nanoparticelle di 5 µg/ml. È stato verificato inoltre, che oltre tale concentrazione iniziano ad insorgere fenomeni apoptotici, che possono essere però attribuiti all'agente di rivestimento (PLL) [32].

Per cercare di rimediare all'effetto tossico provocato dalla PLL, Ciofani e il suo gruppo propone un rivestimento di glicol-chitosano (GC) per le BTNP [33][40]. Il complesso

BTNP-GC risulta cito compatibile nei confronti di cellule di neuroblastoma umano [33] e di cellule staminali mesenchimali di topo (fino a 100 µg/ml) [40].

Un altro studio viene effettuato da Staedler e collaboratori su una sospensione di nanoparticelle di titanato di bario in polietilenglicole (PEG) [38].

La vitalità cellulare è stata valutata per concentrazioni di BTNP di 10, 50 e 100 µg/ml. A tale scopo sono stati effettuati test di vitalità su tre diverse linee cellulari di cancro polmonare: adenocarcinoma umano (A549), carcinoma adenosquamoso (HTB-178) e cellule di carcinoma polmonare squamoso (HTB-182). Inoltre sono state testate cellule bronchiali adulte, manipolate in modo che queste esprimano caratteristiche fenotipiche di cellule epiteliali non ciliate muco-secerenti (BEAS-2B).

Dai test effettuati si è riscontrata nel BaTiO₃, a 50 µg/ml, una citotossicità accettabile e più bassa rispetto alle nanoparticelle parallelamente esaminate, anche per esposizione prolungata; inoltre essa risulta comparabile per tutte e quattro le linee cellulari [38].

1.3 Scaffold nanofibrosi

Come si evince dai paragrafi precedenti l'architettura dello *scaffold* è un paramentro importante capace di influenzare l'adesione e la proliferazione cellulare, e di conseguenza la rigenerazione del tessuto.

Uno *scaffold* può essere fabbricato con tre diverse architetture, correlate alla struttura dei pori: microporosa, microfibrata e nanofibrata.

In figura 1.10 sono rappresentate le tre tipologie in modo schematico per meglio comprendere il comportamento esibito dalle cellule in funzione della struttura.

Un'architettura nanofibrata è da preferire rispetto alle altre due, in quanto dimensioni e morfologia dei pori risultano molto simili a quelli esibiti dalla matrice extracellulare natia.

Come si nota dall'immagine a destra in figura 1.10 infatti, le cellule sono in grado di aderire perfettamente allo *scaffold* assumendo una forma tridimensionale. Questa contribuisce a promuovere processi come la migrazione e la proliferazione cellulare all'interno del costruito, garantiti anche da un elevato rapporto superficie/volume.

La nanotopografia, unita a segnali chimici, consente la differenziazione delle cellule nel fenotipo desiderato e permette loro di colonizzare in modo omogeneo lo *scaffold* [47].

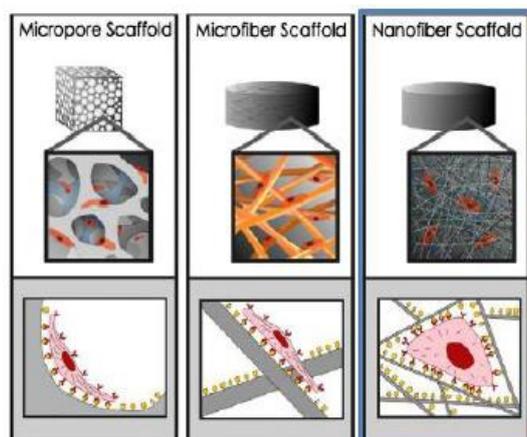


Figura 1.10 Comportamento cellulare influenzato dall'architettura dello scaffold. Da sinistra a destra si hanno architettura microporosa, microfibrata e nanofibrata.

Una delle principali sfide nel settore del *tissue engineering* è proprio lo sviluppo di costrutti capaci di imitare la natura nanofibrata della matrice extracellulare.

Sono diverse le tecniche utilizzate per la fabbricazione di costrutti tridimensionali porosi applicabili nell'ingegneria dei tessuti [11][12]. In particolare, per generare *scaffold* nanofibrati si utilizzano tre metodologie: separazione di fase, auto-assemblaggio ed *electrospinning* [11][12][47]. Tra queste l'*electrospinning* risulta essere quella attualmente più impiegata e studiata grazie ai suoi numerosi vantaggi, tra i quali la semplicità e la vasta gamma di materiali utilizzabili [12][47].

Questo lavoro di tesi prevede l'utilizzo di tale tecnica per la fabbricazione delle nanofibre e quindi sarà descritta in dettaglio nel prossimo paragrafo.

1.3.1 *Electrospinning* o elettrofilatura

La comparsa dell'*electrospinning* risale alla fine del 1800, mentre risulta brevettata ufficialmente da Formhals nel 1934 [48]. Il termine "*electrospinning*" per l'identificazione di questa tecnica nasce alla fine degli anni '90, seppure essa risulti utilizzata già da tanti anni [48].

L'*electrospinning* è una tecnica di tipo *top-down* che permette di fabbricare fibre polimeriche con diametri di dimensioni che vanno da 2 nm a qualche micrometro, con l'utilizzo di un potenziale elettrico [48][49].

Grazie alle caratteristiche di versatilità, semplicità ed economicità [50] tale tecnica è stata utilizzata, nel corso degli anni, in diversi settori per applicazioni quali indumenti protettivi, filtrazione, ottica, sensoristica e anche in campo biomedicale e farmaceutico [12][48][50][51]. In particolare, nell'ultimo decennio è stata incrementata la sua applicazione nell'ingegneria dei tessuti [48], dato che la natura nanometrica dei prodotti ottenuti si avvicina a quella della matrice extracellulare nativa [52].

Sono molti i materiali polimerici che possono essere processati attraverso la tecnica dell'*electrospinning* per produrre *scaffold* nanofibrosi altamente porosi, con porosità interconnessa [12][48][53]. L'architettura dei costrutti, che presenta un elevato rapporto superficie/volume, è favorevole all'adesione e alla proliferazione cellulare [12] e permette il passaggio di nutrienti utili alla vitalità del tessuto.

Variando i parametri di processo e scegliendo adeguatamente il materiale è possibile realizzare *scaffold* con proprietà modulabili e applicabili per la rigenerazione di specifici tessuti. La possibilità di funzionalizzare e modificare le fibre ottenute [49] [52][53], di incorporare direttamente nella soluzione polimerica biomolecole o nanomateriali "*smart*" [47] e di generare strutture gerarchiche [47] rende la tecnica dell'*electrospinning* molto versatile e altamente indicata per la TE, per il rilascio controllato di farmaci [49][54][55], fattori di crescita [56][57], proteine [58] ed enzimi [59].

Nell'ambito della TE sono stati studiati *scaffold* di natura diversa per rigenerare tessuti come l'osso [60], la cute [61], il muscolo scheletrico [62], la cartilagine [63], il tessuto vascolare [64][65], e quello neurale [66].

Sebbene siano molti i vantaggi apportati dall'impiego di questa tecnica, si presentano alcune limitazioni. Infatti il tasso di produzione è molto basso [48] e i materiali ottenuti possono presentare un ampio divario nella misura dei pori che potrebbe influenzare la migrazione cellulare [48].

1.3.1.1 Principio di funzionamento dell'*electrospinning*

L'elettrofilatura è una tecnica impiegata per la produzione di *scaffold* nanofibrosi.

Per ottenere fibre polimeriche la soluzione polimerica preparata viene caricata in una siringa e mantenuta stabile all'estremità dell'ago, grazie alla sua tensione superficiale. La siringa viene posta in un meccanismo di pompaggio ed un collettore, sul quale si andranno a depositare le fibre, viene posizionato ad una certa distanza dalla siringa. A questo punto si genera un'elevata differenza di potenziale tra l'ugello della siringa e il collettore, tramite un generatore ad alta tensione.

La soluzione polimerica, quindi, risulta sottoposta ad un campo elettrico che provoca la comparsa di cariche elettriche sulla sua superficie, con la creazione di una forza elettrica repulsiva, opposta alla tensione superficiale [67]. Fino a quando le due forze sono in equilibrio la superficie della soluzione polimerica presenta un menisco stabile di forma sferoidale. Mentre la pompa continua a muovere lo stantuffo della siringa a velocità costante, il voltaggio aumenta e la soluzione all'ugello inizia a diventare instabile. Quando si raggiunge un valore critico di tensione in cui la forza elettrica supera la forza della tensione superficiale [68], il menisco della soluzione polimerica assume una forma conica, nota come cono di Taylor [69]. A questo punto, sempre sotto l'effetto del campo elettrico, dall'estremità del cono di Taylor si genera un getto stabile e continuo di soluzione polimerica carica elettricamente, che si andrà a depositare sotto forma di fibre sul collettore [68]. Infatti, durante il tragitto percorso dal getto verso il collettore, avviene l'evaporazione del solvente utilizzato per preparare la soluzione, permettendo così la formazione delle fibre.

Un *set-up* per l'*electrospinning*, rappresentato in figura 1.11, è tendenzialmente costituito dalle seguenti componenti:

- ♦ **Alimentatore ad alta tensione** (10-30 kV) in corrente continua [50];
- ♦ **Siringa** in cui viene caricata la soluzione polimerica;
- ♦ **Pompa** per l'erogazione costante della soluzione polimerica alla velocità desiderata;
- ♦ **Collettore conduttore** tipicamente di alluminio, che rappresenta la superficie sulla quale si raccolgono le fibre polimeriche.

Esistono diverse tipologie possibili di collettore che producono membrane differenti, quali: piano, cilindrico rotante, a piani paralleli, a griglia e a disco

[50][70]. Il collettore piano, ad esempio, produce fibre orientate casualmente, come quello a griglia [70]. Mentre il collettore cilindrico rotante genera fibre orientate lungo una direzione preferenziale [50].

L'intero apparato può trovarsi in due conformazioni diverse: orizzontale o verticale [50].

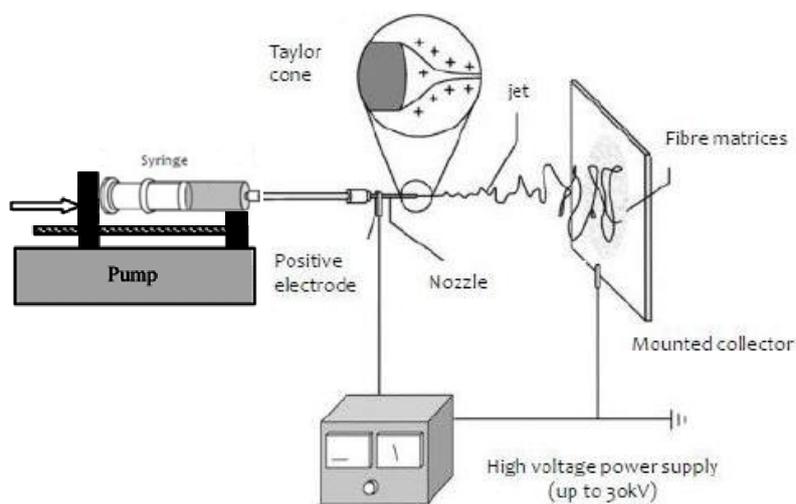


Figura 1.11 Schema di un tipico set-up per electrospinning, in conformazione orizzontale.

Modificando leggermente il *set-up*, cambiando il numero di ugelli e/o di siringhe [50], è possibile utilizzare l'*electrospinning* in modo alternativo, fabbricando nanofibre di natura diversa.

Ad esempio il *coaxial electrospinning* prevede l'utilizzo di due siringhe contenenti soluzioni polimeriche e un solo ago coassiale, e consente la fabbricazione di fibre *core-shell*, utili in campo biomedicale per il rilascio di farmaci [71][72] o biomolecole e fattori di crescita [56].

L'utilizzo di una tecnica multi-ugello, invece, permetterebbe di ovviare alla limitazione del basso tasso di produzione [50].

La tecnica *multi-channel co-electrospinning* si ottiene dall'unione delle due tecniche sopra citate, e permette di produrre una vasta tipologia di nanofibre con morfologie complesse [73].

1.3.1.2 Difetti di elettrofilatura

Se i parametri che influenzano l'elettrofilatura non sono ben controllati e non sono adeguati al tipo di membrana che si vuole realizzare, si possono riscontrare difetti nella morfologia delle fibre.

I principali difetti di elettrofilatura sono i seguenti:

- ♦ **Beads:** identificano rigonfiamenti tondeggianti o affusolati della fibra (figura 1.12 a), che dipendono da diversi fattori quali la tensione superficiale, la viscosità della soluzione e l'evaporazione lenta del solvente;
- ♦ **Nastri:** le fibre non mostrano una forma cilindrica, ma sembrano essere schiacciate. Infatti la mancata evaporazione del solvente le porta a collassare su loro stesse, come mostrato in figura 1.12 b;
- ♦ **Difetti superficiali:** sono più generici rispetto ai primi due, e possono verificarsi quando i parametri non sono adeguati ed ottimizzati (un esempio in figura 1.12 c).

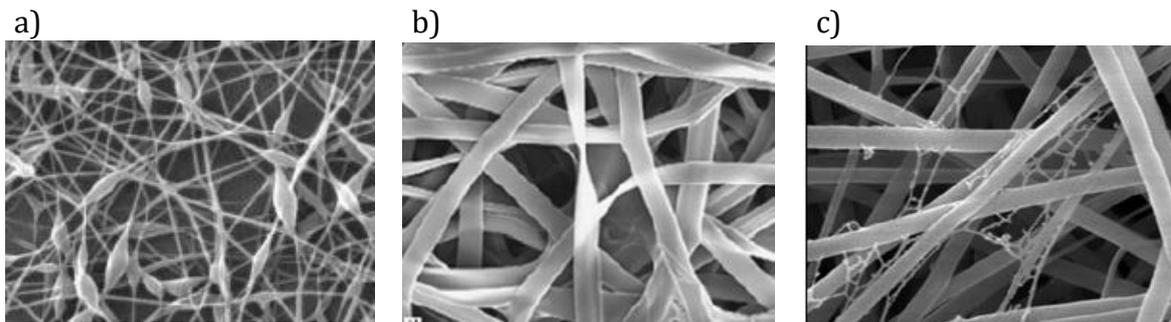


Figura 1.12 Immagini al SEM di nanofibre prodotte con electrospinning che presentano difetti: a) Nastri; b) Beads; c) Difetto superficiale.

1.3.1.3 Parametri che influenzano l'elettrofilatura

Il processo di *electrospinning* risulta semplice e affidabile per la fabbricazione di membrane nanofibrose. Nonostante ciò, entrano in gioco diversi fattori che possono influenzare in modo significativo il prodotto finale realizzato.

I parametri di funzionamento dell'elettrofilatura si suddividono, generalmente, in tre categorie: *parametri di soluzione*, *parametri di processo* e *parametri ambientali* [48][50].

Per ottenere fibre elettrofilate con la morfologia e il diametro desiderati, senza la presenza di difetti, è necessario controllare questi parametri e sceglierli adeguatamente.

♦ **Parametri della soluzione**

I parametri della soluzione influenzano la morfologia delle nanofibre ottenute.

La **concentrazione** della soluzione polimerica va calibrata in modo tale da produrre fibre senza difetti. Se la soluzione polimerica è a bassa concentrazione non si ottiene un getto continuo, ma si divide in tante gocce (*droplets*) che vanno a depositarsi sul collettore [53], ed in questo caso si parla di *electrospraying*. Quando la concentrazione aumenta leggermente, si vedrà la formazione di fibre e *beads* contemporaneamente [74] (figura 1.13 a, b). I difetti potranno essere rimossi andando ad aumentare ulteriormente la concentrazione, e di conseguenza la viscosità della soluzione polimerica. Infatti, come si nota in figura 1.13, all'incremento della concentrazione corrisponde un cambiamento di forma nei difetti, che diventano sempre più affusolati, fino a scomparire [48][74][75]. Il valore di concentrazione, però, non deve essere troppo elevato perché altrimenti il getto polimerico avrà difficoltà a formarsi, per via dell'incremento della viscosità [74].

Un parametro strettamente connesso alla concentrazione polimerica della soluzione è la **viscosità**. Infatti un incremento della concentrazione polimerica comporta un aumento della viscosità della soluzione. Una bassa viscosità non permette la produzione di fibre continue (figura 1.13 a), mentre una viscosità troppo alta rischia di far bloccare la soluzione nell'ugello della siringa [48]. In generale, al variare della viscosità si è riscontrato un effetto sul diametro delle fibre e sulla loro morfologia [50]. All'aumentare della viscosità aumenta il diametro delle fibre e i *beads*, già presenti a viscosità più basse, diventano più affusolati, più grandi e più distanziati tra loro (figura 1.13) [74][75].

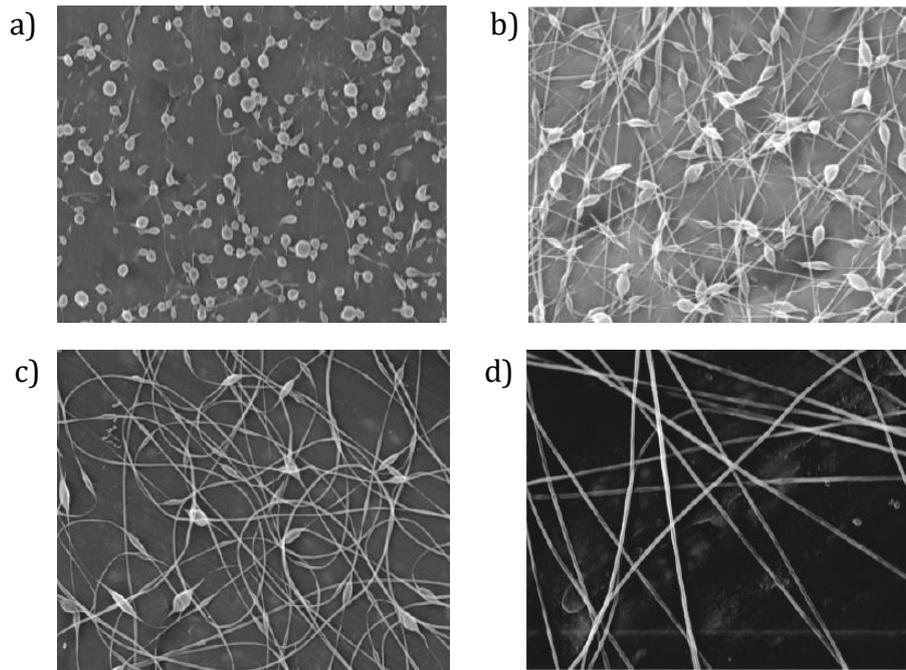


Figura 1.13 Immagini al SEM tratte da uno studio di Fung e colleghi [75] in cui si nota come vari la morfologia delle fibre all'aumentare della viscosità e della concentrazione della soluzione polimerica. a) Bassa concentrazione e formazione di goccioline; b) Formazione di fibre con elevata presenza di beads a concentrazione e viscosità basse; c) Un incremento nella concentrazione e nella viscosità della soluzione porta ad un miglioramento nella morfologia con minore densità di beads di forma affusolata e diametro delle fibre maggiore; d) Nanofibre lisce ed omogenee senza la presenza di difetti e con diametro maggiore, date dalla corretta concentrazione e conseguente viscosità polimerica.

Il **peso molecolare** del polimero influenza la viscosità, la tensione superficiale e la conduttività della soluzione polimerica [48]. Di conseguenza esso induce una modifica nelle caratteristiche del diametro delle nanofibre, che sarà differente a seconda del polimero impiegato [50]. Se il peso molecolare è basso si formano *beads* e non fibre, mentre a peso molecolare più elevato corrisponde un diametro medio delle fibre maggiore [48][76].

Anche il **solvente** utilizzato per preparare la soluzione polimerica risulta fondamentale per ottenere fibre lisce e prive di difetti, quali *beads* e nastri. Infatti l'evaporazione del solvente deve avvenire durante il percorso compiuto dal getto polimerico dall'ago al collettore [50]. L'impiego di solventi altamente volatili, con punto di ebollizione basso, è sconsigliato perché potrebbero evaporare troppo in fretta comportando un intasamento dell'ago della siringa da parte della soluzione [74]. Allo stesso tempo l'utilizzo di solventi con un punto di ebollizione alto risulta

sconveniente perché troppo poco volatili e di conseguenza non riusciranno ad evaporare con il giusto tempismo [74]. È più delicata l'ottimizzazione di tale parametro nel caso in cui sia richiesto l'impiego di più solventi per preparare la soluzione. Tendenzialmente uno dei due si comporta da non-solvente e la differenza di volatilità comporta una maggiore porosità nelle fibre ottenute [74].

Un parametro di soluzione che influenza la morfologia delle fibre, molto legato al tipo di solvente impiegato, è la **tensione superficiale**. Se è bassa le fibre si presentano prive di difetti [48][75], mentre una tensione superficiale elevata rende instabile il getto polimerico generando *beads* [48]. In funzione della tensione superficiale che presenta la soluzione varierà il potenziale applicato in modo da garantire la formazione del getto polimerico [50].

Il tipo di solvente e di polimero, insieme all'eventuale presenza di sali disciolti, influenzano la **conducibilità della soluzione** polimerica [48][74]. Una bassa conduttività genera solo *beads*, perché non si riesce a formare il cono di Taylor [74]. Essi diminuiscono di dimensione all'aumentare della conduttività della soluzione, che permette anche di generare fibre continue con diametro sempre minore [48] [75].

♦ **Parametri di processo**

Oltre alla scelta dei materiali da utilizzare per la preparazione della soluzione polimerica, risulta importante anche la selezione dei parametri di processo per ottenere fibre prive di difetti.

Uno dei fattori più importanti è l'**intensità del potenziale** applicato. Infatti deve essere adeguato per permettere la creazione del cono di Taylor all'ugello della siringa. Per tale motivo vi è una differenza di potenziale minima al di sotto della quale non vi è la formazione di fibre, ma questo valore critico varia in base al materiale polimerico [74]. Secondo alcuni studi ad un incremento del campo elettrico sembrerebbe essere associata una maggiore probabilità di formazione di *beads* [48], e una riduzione del diametro delle fibre, causato dall'aumento della forza elettrostatica repulsiva nella soluzione all'ugello [48] [74].

Il **flusso** della soluzione polimerica, regolato dalla pompa, influenza la velocità con cui il getto viene espulso dall'ugello e di conseguenza la velocità del tragitto percorso prima di depositarsi sotto forma di fibre sul collettore [48][77].

Un flusso più lento favorisce la polarizzazione della soluzione e permette al solvente di evaporare completamente [48][50]. Inoltre, si è osservato un incremento del diametro delle fibre e dei pori con l'aumento del *flow rate*, che potrebbe però portare alla formazione di *beads* [48][78].

Un altro parametro significativo è rappresentato dalla **distanza collettore-ugello**. Infatti deve essere accuratamente selezionata perché deve permettere la completa evaporazione del solvente e la formazione di fibre prive di difetti [48]. Come riportato in letteratura, il diametro delle fibre diminuisce all'aumentare della distanza, mentre se ago metallico e collettore sono posti molto vicini le fibre si presentano più grandi e con difetti [74].

♦ Parametri ambientali

Il processo di *electrospinning* risulta anche influenzato da parametri di natura ambientale come temperatura e umidità, presenti nella camera. Esiste una relazione tra questi due fattori: un aumento della temperatura porta ad una diminuzione dell'umidità e ad una più rapida evaporazione del solvente [50].

L'**umidità relativa (RH)** modifica la morfologia delle fibre perché può influenzare non solo le proprietà meccaniche che sono correlate alla rigidità, e quindi al diametro delle fibre [79], ma anche l'evaporazione del solvente e l'eventuale presenza di pori [53]. In generale, un incremento nella RH comporta la formazione di fibre spesse [50] porose superficialmente [48], che possono evolvere in fibre eterogenee affette da *beads*, se essa aumenta troppo [79]. D'altro canto, una bassa umidità velocizza l'evaporazione del solvente [48] e conferisce alle fibre una superficie liscia ed omogenea [53][79].

In ogni caso sembrano incidere in modo significativo le caratteristiche dei materiali polimerici impiegati [79].

Il parametro della **temperatura** può influenzare la velocità di evaporazione del solvente e la viscosità della soluzione, e di conseguenza il diametro delle fibre.

In base al polimero scelto, a volte è necessario impostare una determinata temperatura per poter mantenere la soluzione polimerica allo stato liquido durante l'intero processo.

Tendenzialmente, si è notato come un aumento della temperatura diminuisca la viscosità della soluzione e contemporaneamente aumenti la velocità di evaporazione del solvente, generando fibre con diametro medio minore [48][74].

Anche la temperatura del collettore, su cui si depositano le fibre, sembra influenzarne la morfologia. In particolare, ad un aumento di tale parametro corrisponde la comparsa di pori sulla superficie delle fibre, che aumentano in numero e dimensione [50].

1.3.1.4 *Electrospinning* di membrane composite

La versatilità dell'*electrospinning* permette di fabbricare *scaffold* nanofibrosi impiegando numerosi materiali diversi. Vista la necessità di creare costrutti complessi e sempre più funzionali, spesso questa tecnica è utilizzata per realizzare *scaffold* di natura composita. Infatti, si ritrovano in letteratura molti studi in cui vengono impiegati polimeri naturali e sintetici per generare strutture bioattive con buone proprietà meccaniche, oppure costrutti nanofibrosi che incorporano al loro interno nanoparticelle capaci di migliorarne le caratteristiche e/o la bioattività. Questi ultimi hanno mostrato un grande potenziale in svariate applicazioni [76].

Si è notato, infatti, che la bioattività e le proprietà delle nanoparticelle o biomolecole impiegate per drogare le membrane, rimangono invariate dopo il processo di elettrofilatura [47].

Sono diverse le metodologie impiegabili per incorporare nanoparticelle all'interno di fibre elettrofilate:

1. Dispersione delle nanoparticelle in soluzione.

È la procedura più semplice, e per questo è molto utilizzata; prevede l'aggiunta delle nanoparticelle alla soluzione polimerica e la loro successiva dispersione tramite agitazione e/o sonicazione [80].

2. Sintetizzazione delle nanoparticelle all'interno delle fibre elettrofilate.

Si generano fibre elettrofilate a partire da una soluzione polimerica contenente un precursore delle nanoparticelle. Successivamente le fibre vengono trattate adeguatamente per sintetizzare le nanoparticelle, che si troveranno all'interno delle fibre e non solo sulla loro superficie [76][31].

3. Funzionalizzazione superficiale delle fibre elettrofilate.

Le fibre sono realizzate con la tecnica dell'*electrospinning* e vengono successivamente trattate e immerse in una soluzione colloidale di nanoparticelle. Il trattamento superficiale consente l'adsorbimento delle nanoparticelle sulla superficie delle fibre [76].

4. L'*electrospinning* coassiale (*coaxial electrospinning*) [81]. Come accennato precedentemente, rappresenta un *electrospinning* modificato in cui due soluzioni distinte vengono elettrofilate contemporaneamente tramite l'uso di un ago coassiale, composto da due capillari concentrici. Si generano fibre del tipo *core-sheath* che possono essere cave, oppure piene, formate esternamente ed internamente da due materiali diversi [82][83]. Nel caso specifico dell'incapsulamento di nanoparticelle, esse tendenzialmente sono disperse nella soluzione che formerà la parte interna della fibra (*core*); mentre si impiega una soluzione polimerica come componente esterna delle fibre (*shell*) [56].

1.3.1.4.1 *Electrospinning* di membrane caricate con nanoparticelle di titanato di bario

Come esposto nel paragrafo 1.2, nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti risulta importante l'impiego di *scaffold* "attivi", che forniscono gli stimoli necessari alla corretta rigenerazione del tessuto [17]. In questo senso sono stati realizzati *scaffold* di natura composita che possono essere fabbricati a partire da miscele di polimeri sintetici e naturali, oppure da una matrice polimerica in cui vengono disperse biomolecole o nanoparticelle di varia natura.

Ultimamente sono stati realizzati *scaffold* compositi in cui nanoparticelle piezoelettriche sono state incorporate in una matrice polimerica [37]. In particolare, la biocompatibilità delle nanoparticelle piezoelettriche di titanato di bario (BTNP), ha permesso loro di essere oggetto di studio per *scaffold* nanofibrosi applicabili all'ingegneria dei tessuti.

Un lavoro svolto da Avila e colleghi, ad esempio, vuole valutare l'effetto che le BTNP producono in due *scaffold* con matrice polimerica diversa: alcol polivinilico (PVA) ed etilcellulosa (EC) [35]. Le due soluzioni contenenti polimero e nanoparticelle sono state sonicate per 30 minuti prima di essere sottoposte ad *electrospinning*. Nonostante il trattamento, in entrambe le membrane si nota una distribuzione non omogenea delle nanoparticelle, che si presentano sotto forma di aggregati [35].

Uno *scaffold* composito a base di policaprolattone (PCL) caricato con nanoparticelle di titanato di bario è stato studiato da Bagchi e il suo gruppo, con l'obiettivo di migliorare la rigenerazione del tessuto osseo [80].

Le nanoparticelle sono state aggiunte alla soluzione di PCL, che successivamente è stata posta in agitazione e sonicata. La soluzione ottenuta è stata sottoposta al processo di *electrospinning* generando nanofibre composite.

I risultati morfologici mostrano una diminuzione nel diametro delle fibre, rispetto allo *scaffold* in solo PCL, e la formazione di aggregati che indica una dispersione poco omogenea delle BTNP in soluzione, nonostante la sonicazione. Inoltre, la presenza delle nanoparticelle risulta influenzare anche le proprietà meccaniche delle fibre, incrementando significativamente il modulo elastico e la tensione di snervamento [80].

I test cellulari sono stati eseguiti su un modello di osteoblasti (MC3T3-E1) fino a 10 giorni di incubazione. I risultati ottenuti mostrano come l'adesione e la proliferazione cellulare su entrambi i substrati siano confrontabili. Mentre risulta, invece, un incremento del differenziamento cellulare nelle fibre composite rispetto alla membrana di controllo. In ogni caso le nanoparticelle risultano cito compatibili e sono le proprietà piezoelettriche a renderle indicate per la rigenerazione ossea [80].

1.4 Scopo del lavoro

Questo lavoro di tesi prevede la realizzazione di membrane composite elettrofilate in gelatina, caricate con nanoparticelle di titanato di bario.

Si vuole valutare come le nanoparticelle influiscano sulle proprietà dello *scaffold* e sul comportamento di cellule simil-ossee (SaOS-2).

L'obiettivo principale è quello di ottimizzare la dispersione delle BTNP in soluzione e quindi di fabbricare membrane nanofibrose con un'elevata concentrazione di tali particelle. Infatti, per garantire uno stimolo piezoelettrico più accentuato è auspicabile l'impiego di un'elevata concentrazione di nanoparticelle all'interno delle nanofibre.

Capitolo 2

Materiali e metodi

2.1 Materiali

Nel paragrafo seguente vengono presentati i materiali utilizzati per la fabbricazione delle membrane nanofibrose, oggetto di questo lavoro di tesi.

2.1.1 Gelatina

La gelatina commercializzata dalla *Sigma-Aldrich* (cod. 1002679884) utilizzata in questo lavoro di tesi deriva da pelle porcina e le sue proprietà sono riportate in tabella 2.1.

GL – Sigma-Aldrich	
<i>Tipo</i>	A
<i>Forma</i>	Polvere
<i>Solubilità</i>	50 mg/ml di H ₂ O

Tabella 2.1 *Proprietà della gelatina fornita dalla Sigma-Aldrich.*

La gelatina (GL) è un polimero naturale che deriva dalla parziale idrolisi del collagene, proteina fibrosa presente in grande quantità nei mammiferi, come costituente fondamentale del tessuto connettivo, della pelle e dell'osso [84].

La gelatina presenta una composizione simile a quella del collagene (figura 2.1), caratterizzata dalla ripetizione della sequenza amminoacidica Gly-X-Y, in cui generalmente X identifica la prolina e Y l'idrossiprolina [84][85].

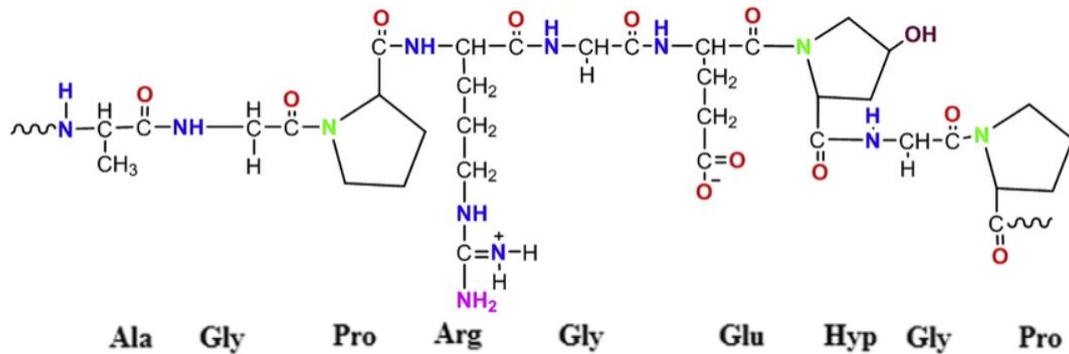


Figura 2.1 *Composizione amminoacidica della gelatina (GL).*

La struttura della gelatina è classificata su quattro livelli, come per ogni proteina [85]. La struttura primaria è rappresentata dalla catena polipeptidica, generata da una sequenza di amminoacidi, uniti tra loro da legami peptidici. L'interazione di tre catene polipeptidiche, tramite legami ad idrogeno, e la conseguente distorsione della forma in una spirale verso sinistra, definita α -elica, genera la struttura secondaria. Un ulteriore arrangiamento porta alla più stabile struttura terziaria, in cui l' α -elica si avvolge su se stessa e si ripiega verso destra in una spirale, producendo una tripla elica (meno ordinata di quella del collagene). Infine, la proteina è definita attraverso la struttura quaternaria, in cui più catene a tripla elica si uniscono tra loro grazie a legami elettrostatici [85]. La molecola ottenuta ha una forma a bastoncino ed è denominata protofibrilla [85].

L'estrazione della gelatina, a partire dal collagene, avviene attraverso un processo idrolitico accompagnato da un trattamento termico ($\sim 37 - 40 \text{ }^\circ\text{C}$ [86]) [87].

Il trattamento termico provoca la rottura dei legami ad idrogeno che stabilizzano la struttura a tripla elica del collagene. In questo modo si ottiene una disgregazione del materiale, che si organizza in semplici catene polipeptidiche con conformazione *random coil* [84][87]. La denaturazione definitiva del collagene, e la conseguente estrazione della gelatina, avviene attraverso il processo di idrolisi, che comporta la scissione dei legami covalenti presenti nelle catene polipeptidiche [87].

A seconda delle condizioni del trattamento, si possono ottenere due tipologie di gelatina differenti:

- ♦ La gelatina di tipo A, o gelatina basica, è ottenuta tramite un processo acido in cui il collagene suino viene immerso, per circa 24-48 ore, in una soluzione diluita di un acido forte (acido solforico o acido cloridrico). Essa presenta un

punto isoelettrico compreso tra pH 8 e pH 9 [84] ed esibisce, quindi, una carica positiva a pH fisiologico [85].

- ♦ La gelatina di tipo B si estrae, invece, dal collagene bovino tramite un processo alcalino di lunga durata. I gruppi ammidici dei residui glutamina ed asparagina vengono idrolizzati in gruppi carbossilici, rilasciando gli acidi glutammico ed aspartico nella molecola [88]. Per questo motivo la gelatina estratta presenta una quantità maggiore di gruppi carbossilici rispetto alla gelatina di tipo A [87], mentre possiede meno impurità [87] ed un punto isoelettrico minore, compreso tra pH 4 e pH 5 [84], presentando dunque una carica negativa a pH fisiologico [85].

Le proprietà della gelatina variano in funzione della sorgente animale da cui viene estratto il collagene e dal tipo di collagene prelevato [87], oltre che dalla tipologia di processo utilizzato [89].

Le principali sorgenti di collagene sono la pelle suina (46%) e bovina (29.4%) e le ossa di questi stessi animali (23.1%), anche se è in aumento la produzione di gelatina di pesce [84].

La gelatina è un materiale naturale che presenta numerosi vantaggi che hanno permesso di impiegarla in campo farmaceutico e biomedico. Essa infatti, pur presentando scarse proprietà meccaniche, risulta biocompatibile e non tossica, ha un potenziale più basso di generare risposte antigeniche rispetto al collagene [89] ed è abbastanza economica.

Inoltre, la GL è un materiale di tipo sol-gel che cambia il suo stato in funzione della temperatura. Essa si presenta allo stato sol a temperature di circa 30-40 °C in soluzione acquosa, mentre a temperature inferiori gelifica, subendo una transizione reversibile. Questo comportamento è causato da un cambiamento conformazionale delle catene da *random coil* (stato sol) a tripla elica (stato gel), durante il processo di gelificazione [85][90][91]. Quindi, la gelatina risulta solubile in soluzione acquosa solo ad elevate temperature (circa 40°C), mentre è insolubile a temperature inferiori in cui si evidenziano fenomeni di rigonfiamento e successiva gelificazione.

Per tale ragione, se si vuole utilizzare il materiale per applicazioni biomedicali *in vivo*, è necessario stabilizzarlo termicamente e meccanicamente tramite un processo

definito *cross-linking* o reticolazione, impiegando opportuni agenti reticolanti [87][89].

2.1.1.1 γ -glicidossipropiltrimetossisilano

In questa dissertazione la reticolazione della gelatina è stata effettuata utilizzando il γ -glicidossipropiltrimetossisilano (GPTMS) prodotto dalla *Sigma-Aldrich*, le cui proprietà sono evidenziate in tabella 2.2.

GPTMS – <i>Sigma-Aldrich</i>	
<i>Purezza</i>	98%
<i>Forma</i>	Liquido
<i>Densità</i>	1.07 g/ml a 25°C

Tabella 2.2 *Proprietà del GPTMS fornito dalla Sigma-Aldrich.*

Il γ -glicidossipropiltrimetossisilano è un agente reticolante di natura siliconica (formula riportata in figura 2.2), utilizzato per reticolare polimeri naturali come la gelatina, al fine di realizzare membrane biocompatibili stabili [92].

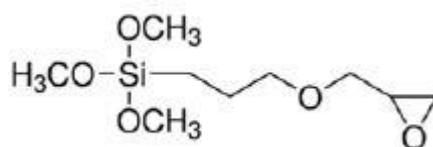


Figura 2.2 *Formula di struttura del γ -glicidossipropiltrimetossisilano (GPTMS).*

In generale il processo di reticolazione può essere fisico, enzimatico o chimico [87] attraverso l'utilizzo di agenti reticolanti quali, ad esempio, la gluceraldeide [93]. Spesso questo passaggio comporta un'alterazione nella morfologia delle fibre elettrofilate, che possono presentare un basso grado di stabilità e quindi dissolversi una volta impiantate [94].

Un metodo alternativo in grado di ovviare a questi svantaggi è stato proposto da Tonda-Turo e collaboratori [94]. Il GPTMS, utilizzato come agente reticolante per la gelatina, viene aggiunto direttamente alla soluzione polimerica prima di processare le fibre mediante *electrospinning* [94]. Rispetto ad altre sostanze reticolanti che possono

essere usate allo stesso modo in soluzione, come ad esempio la genipina [95], il GPTMS non comporta variazioni nella viscosità della soluzione di GL. Infatti, la reticolazione si conclude con l'evaporazione del solvente, poco prima che le fibre si depositino sul collettore [94].

Il meccanismo di reticolazione della gelatina ad opera del GPTMS è rappresentato in figura 2.3 e si attua attraverso due *step* consecutivi.

I gruppi amminici della GL reagiscono con gli anelli di ossido di etilene (ossirano) presenti nel GPTMS e una reazione di idrolisi, catalizzata da acidi, porta i gruppi trimetossi del reticolante a dare origine a gruppi silanolo (Si-OH) terminali [94] (figura 2.3 a).

Successivamente si formano i legami Si-O-Si attraverso la condensazione di due gruppi silanolo, che avviene principalmente durante l'evaporazione del solvente (figura 2.3 b). I legami Si-O-Si formati sono di tipo covalente inter-catena e generano una struttura reticolata e stabile [94].

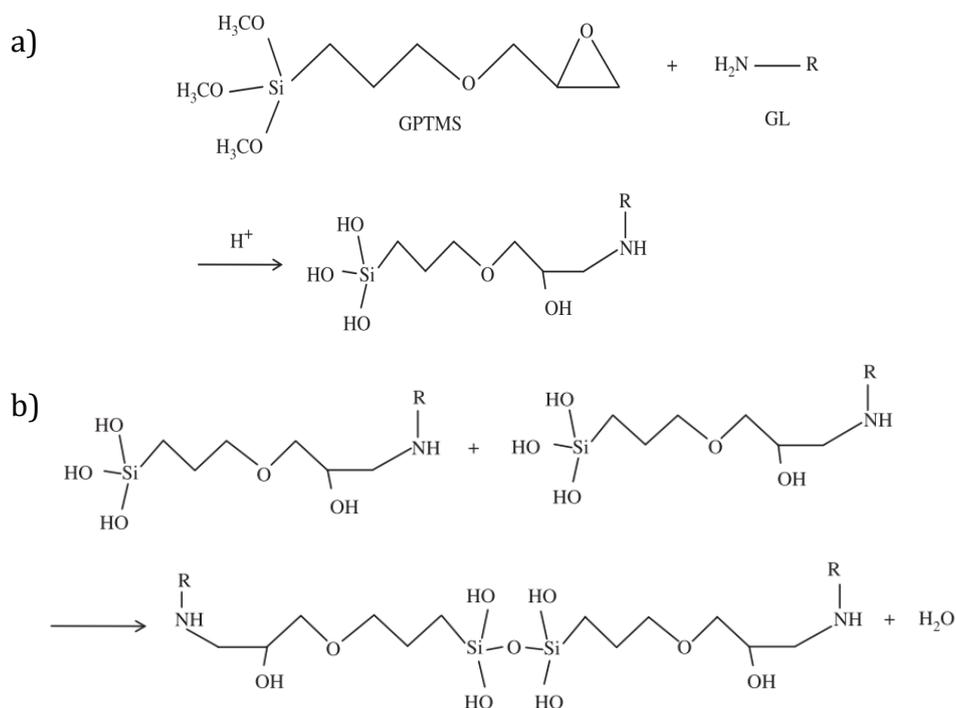


Figura 2.3 Meccanismo di reticolazione della gelatina (GL) attraverso l'agente reticolante γ -glicidossipropiltrimetossisilano (GPTMS) [94]. a) Reazione di idrolisi dei gruppi trimetossi del GPTMS in ambiente acido; b) Reazione di condensazione di due gruppi Si-OH con formazione di legami covalenti Si-O-Si, durante l'evaporazione del solvente.

Per assicurare un buon grado di reticolazione è necessario aggiungere alla soluzione acquosa di GL il corretto quantitativo di reticolante, valutato seguendo le indicazioni descritte nel lavoro di Liu e colleghi [96]. La quantità di GPTMS è stata calcolata rispetto alla concentrazione molare dei gruppi amminici presenti nei residui di lisina, idrossilisina ed arginina della GL, per ottenere un rapporto molare tra questi e le molecole di GPTMS pari a 2:1 [96]. Risulta, quindi, che per ogni grammo di GL sono necessari 92 µl di GPTMS.

2.1.1.2 Genipina

In questo lavoro, è stato introdotto un secondo processo di reticolazione usando la genipina commercializzata dalla *Challenge Bioproducts Co., Ltd. (CBC)* come agente reticolante. Le proprietà sono riportate in tabella 2.3.

Genipina – CBC	
<i>Formula molecolare</i>	C ₁₁ H ₁₄ O ₅
<i>Purezza</i>	98%
<i>Forma</i>	Polvere
<i>Colore</i>	Bianco
<i>Peso molecolare</i>	226.2 g/mol
<i>Solubilità</i>	In etanolo, metanolo, acetone

Tabella 2.3 *Proprietà della genipina fornita dalla Challenge Bioproducts Co., Ltd..*

La genipina, la cui formula di struttura è rappresentata in figura 2.4, è estratta da un glucoside iridoide, geniposide, presente nel frutto di *Gardenia jasminoides Ellis*. È spesso impiegata come colorante alimentare (pigmentazione blu) e nel campo della fitoterapia, mentre in ambito biomedico è utilizzata come *cross-linker* naturale per reticolare chimicamente materiali quali polimeri naturali e proteine [97]. I materiali cross-linkati con genipina presentano ottima stabilità termica e meccanica, paragonabili a quelle esibite dopo una reticolazione con altri reticolanti quali la glutaraldeide [97]. A parità di prestazioni, però, la genipina esibisce una migliore biocompatibilità e cito tossicità che la rendono una valida alternativa per reticolare

materiali quali la gelatina [97][98][99]. Tuttavia, il processo di reticolazione con genipina sembra alterare la morfologia delle fibre polimeriche [94][95] aumentandone il volume e provocando uno *swelling* della struttura in soluzione acquosa.

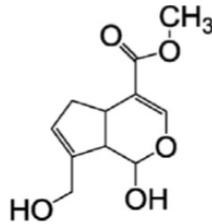


Figura 2.4 Formula di struttura della genipina.

La reticolazione chimica della gelatina ad opera della genipina si definisce “*non zero-length*” [89] perché avviene attraverso la creazione di legami covalenti con i soli gruppi amminici del polimero. Il processo non è ben caratterizzato ma sembra dividersi in due *step*, evidenziati schematicamente in figura 2.5.

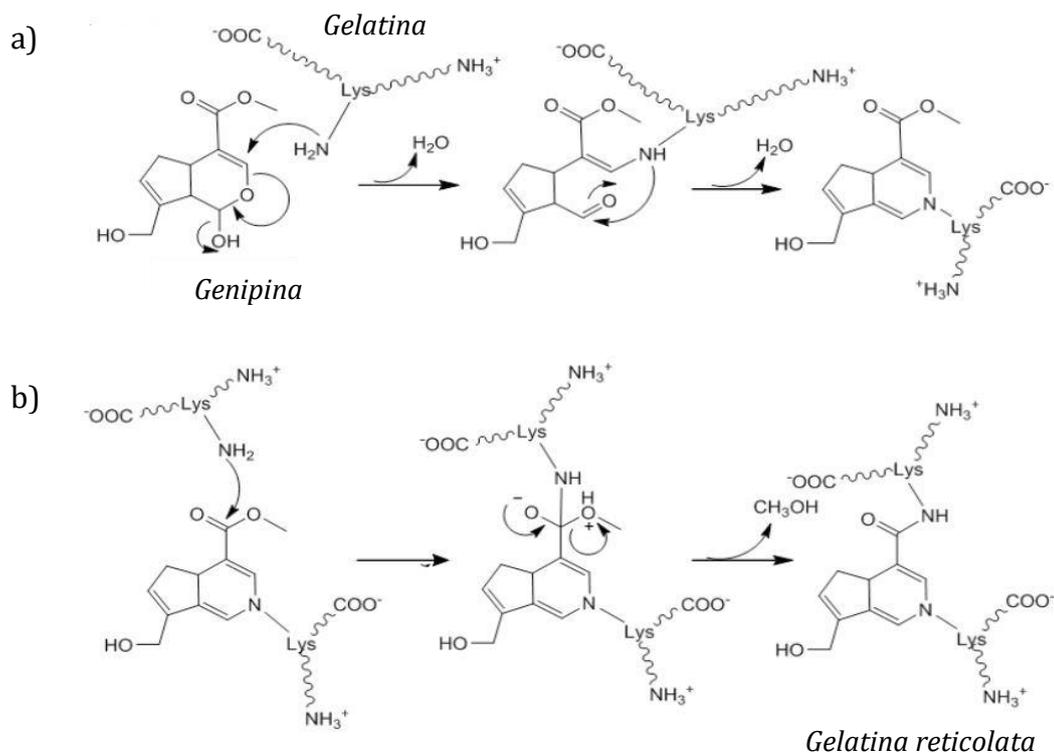


Figura 2.5 Meccanismo di reticolazione della gelatina (GL) attraverso l'agente reticolante genipina [89]. a) Apertura anello diidropirano della genipina ad opera del gruppo amminico della gelatina; b) Effettiva reticolazione con la sostituzione nucleofila di un ulteriore frammento di gelatina attraverso il gruppo amminico.

Inizialmente si verifica un attacco nucleofilo da parte di un gruppo amminico legato al residuo di lisina della gelatina sulla struttura ad anello della genipina, provocandone l'apertura e quindi la formazione di un'ammina terziaria (figura 2.5 a). Successivamente, si consolida il vero e proprio processo di reticolazione attraverso una più lenta sostituzione nucleofila da parte di un gruppo amminico della lisina di un secondo frammento di gelatina (figura 2.5 b).

2.1.2 Nanoparticelle di titanato di bario

Le nanoparticelle di titanato di bario (BTNP) utilizzate nel presente lavoro di tesi sono state fornite dalla *Nanostructured & Amorphous Materials, Inc.* e mostrano le caratteristiche elencate in tabella 2.4.

Tali nanoparticelle tetragonali, con proprietà piezoelettriche, sono state aggiunte alla soluzione polimerica di GL per ottenere, tramite il processo di *electrospinning*, membrane nanofibrose polimeriche caricate con le stesse BTNP.

BTNP – <i>Nanostructured & Amorphous Materials, Inc.</i>	
<i>Configurazione</i>	Tetragonale
<i>BaO/TiO₂</i>	0.999 – 1.001
<i>Purezza</i>	99.9 %
<i>Forma</i>	Polvere
<i>Dimensione</i>	300 nm
<i>Morfologia</i>	Sferica
<i>Colore</i>	Bianco

Tabella 2.4 *Proprietà delle BTNP fornite dalla Nanostructured & Amorphous Materials, Inc.*

2.1.3 Gomma Arabica

La gomma arabica (GA), detta anche gomma di acacia, è un biopolimero edibile ottenuto dall'essudato (figura 2.6 a) di due alberi: acacia senegal e acacia seyal, che crescono tipicamente in Sudan [100]. Quando la pianta viene ferita, per difendersi, secerne un liquido non viscoso, che una volta rappreso viene raccolto (figura 2.6 b) e

successivamente trattato per formare la gomma arabica in polvere, commercializzata (figura 2.6 c) [100][101].

Il metodo più semplice per ottenere la GA è l'essiccazione all'aria, che produce una gomma solubile in forma granulare, così come la fresatura meccanica [100]. Lavorazioni alternative sono l'essiccazione a spruzzo e l'asciugatura a rullo, che in condizioni controllate producono particelle dell'ordine di circa 100 μm prive di contaminazione microbica, in grado di dissolversi più rapidamente dell'essudato grezzo [100].

Il cambiamento morfologico subito dalla gomma arabica, durante la lavorazione, è schematizzato attraverso immagini rappresentative nella figura 2.6.

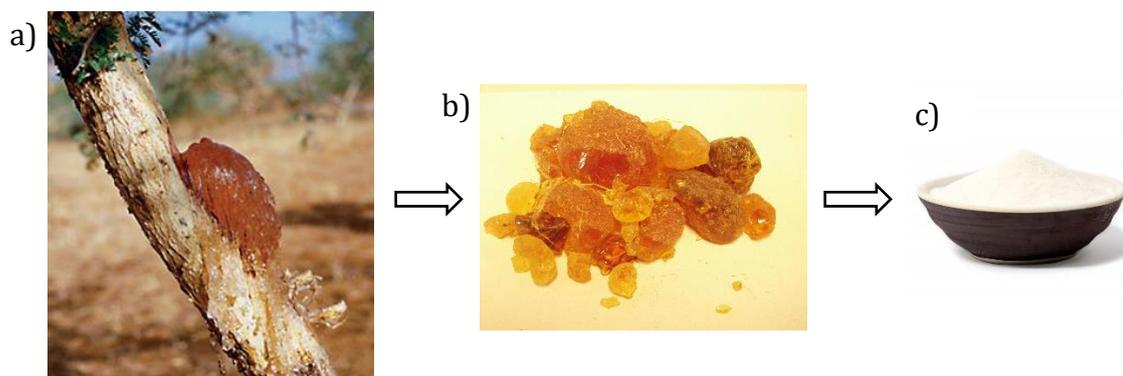


Figura 2.6 Immagini rappresentative della GA: a) Essudato secreto dalla pianta di acacia; b) Grumi vetrosi al momento della raccolta della gomma dal tronco; c) Polvere.

L'uso della gomma arabica come adesivo ed inchiostro risale ai tempi degli antichi Egizi [100]. Ancora oggi la GA è impiegata come adesivo nell'industria della carta, ma è spesso usata come addensante, stabilizzante ed emulsionante nell'industria alimentare. Nel corso degli anni anche settori quali il tessile, il farmaceutico e il biomedico hanno cominciato ad utilizzare la GA per alcune applicazioni [100].

La gomma arabica presenta elevata solubilità in acqua e bassa viscosità [100], ma a causa delle sue scarse proprietà meccaniche e della bassa stabilità termica, è ancora poco usata in campo biomedicale [102], anche se risulta valida come stabilizzante di nanoparticelle in soluzione [103][104][105], come sistema di *drug delivery* [102] o come reticolante di polimeri quali la GL, una volta modificata [106].

Chimicamente, la gomma arabica può essere considerata un eteropolisaccaride, neutro o leggermente acido, con una composizione ramificata (figura 2.7)

caratterizzata sostanzialmente da carboidrati (97%) e glicoproteine (< 3%) [100] [101].

Più precisamente, la gomma arabica ha una struttura eterogenea e complessa che consiste di tre componenti fondamentali [100]:

- ♦ Frazione principale (~90%) chiamata arabinogalattano (AG) costituita da un polisaccaride creato da unità β -(1 \rightarrow 3) D-galattosio e residui di ramnosio, arabinosio e acido glucuronico;
- ♦ Frazione secondaria costituita da proteine (~10%), definita arabinogalattano-proteina (AGP);
- ♦ Piccola e ultima frazione (~1%) composta da glicoproteine (GP), che detiene il più alto contenuto proteico dell'intera molecola.

La gomma di acacia senegal differisce dalla gomma estratta dall'acacia seyal per un maggiore contenuto di acido glucuronico e ramnosio ed un minor quantitativo di arabinosio [100].

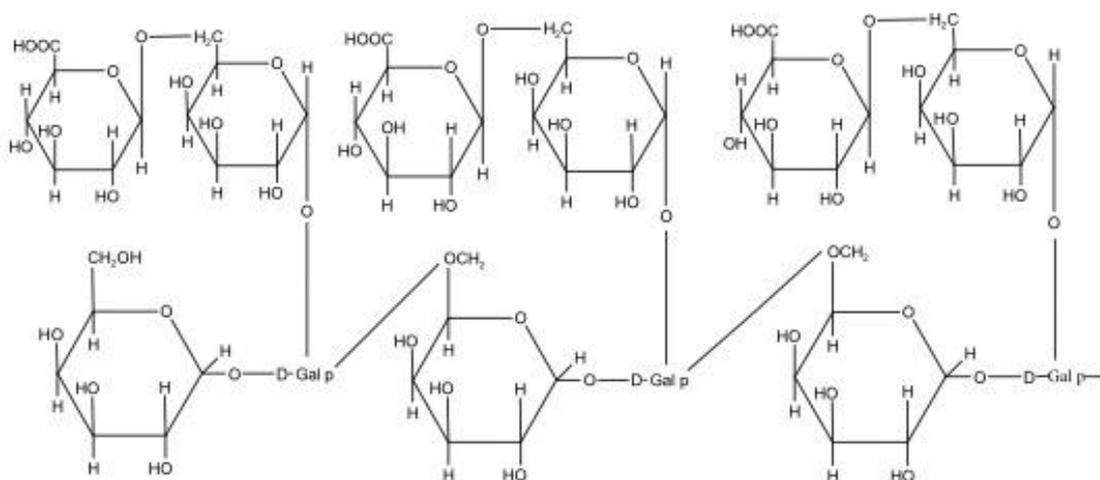


Figura 2.7 *Composizione della gomma arabica (GA).*

Questo lavoro di tesi ha l'obiettivo di realizzare membrane nanofibrose in gelatina caricate con nanoparticelle di titanato di bario in grandi quantità. Tali BTNP tendono a precipitare in soluzione e a creare aggregati all'interno delle fibre, impedendo una distribuzione omogenea delle stesse. Per ovviare a queste limitazioni, è stata utilizzata la gomma arabica come stabilizzante in soluzione, in modo da omogeneizzare la dispersione delle nanoparticelle, migliorandone la stabilità grazie alla formazione di un coating di GA attorno alle BTNP [103][104]. La quantità

ottimale di gomma è stata valutata rispetto alle BTNP testando rapporti BTNP/GA pari a 1:1 e 1:2. La differenza nella distribuzione delle nanoparticelle nei due casi è minima, quindi per garantire una buona spinnabilità della soluzione, evitando di aumentare troppo la viscosità della stessa, è stato scelto un rapporto BTNP/GA 1:1 (w/w), come riportato anche in letteratura [103].

La gomma arabica usata in questa attività di tesi è commercializzata dalla *Sigma-Aldrich* e in tabella 2.5 sono fornite le sue proprietà.

GA – Sigma-Aldrich	
<i>Forma</i>	Polvere
<i>Colore</i>	Bianco tendente al beige
<i>Peso molare</i>	250000 Da
<i>Solubilità</i>	In H ₂ O

Tabella 2.5 Proprietà della gomma arabica (GA) fornita dalla Sigma-Aldrich.

2.1.4 Cellule NIH/3T3

La linea cellulare NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™) è impiegata in questa attività di tesi per effettuare test cellulari di controllo sulle membrane realizzate.

Le NIH/3T3 sono fibroblasti stabilizzati a partire da cellule embrionali di topo albino svizzero (NIH), dopo circa 20-30 generazioni di crescita *in vitro* [107].

Il protocollo di stabilizzazione usato da Todaro e Green, nel 1963, è definito da un trasferimento in una nuova piastra ogni 3 giorni e un'inoculazione di 3×10^5 cellule, identificato dalla sigla 3T3 [107]. Rispetto alle altre linee cellulari studiate da Todaro e Green, le 3T3 risultano incapaci di proliferare dopo aver raggiunto una densità cellulare massima di circa 10^6 e si mostrano ancora sensibili all'inibizione di contatto cellula-cellula [107].

Queste linee cellulari NIH/3T3 sono divenute col tempo un modello standard di fibroblasti [108][109] e come tali presentano una morfologia caratterizzata da numerosi prolungamenti citoplasmatici (figura 2.8). Tuttavia, esse presentano una predisposizione alla formazione di focolai tumorali murini di sarcoma (MSV) e

leucemia (MuLV) [110]; caratteristiche cancerogene che risultano amplificate ed accelerate dalla trasfezione del gene attivo *c-Ha-ras-l* all'interno delle cellule [111]. Per diminuire la proliferazione di cellule tumorali si potrebbe inibire l'attività della proteina chinasi C (PKC), presente nelle cellule, usando la curcumina. Infatti, il lavoro svolto da Liu e colleghi relaziona l'inibizione della PKC ad una conseguente inibizione del TPA (12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato), promotore tumorale della pelle murina [112].

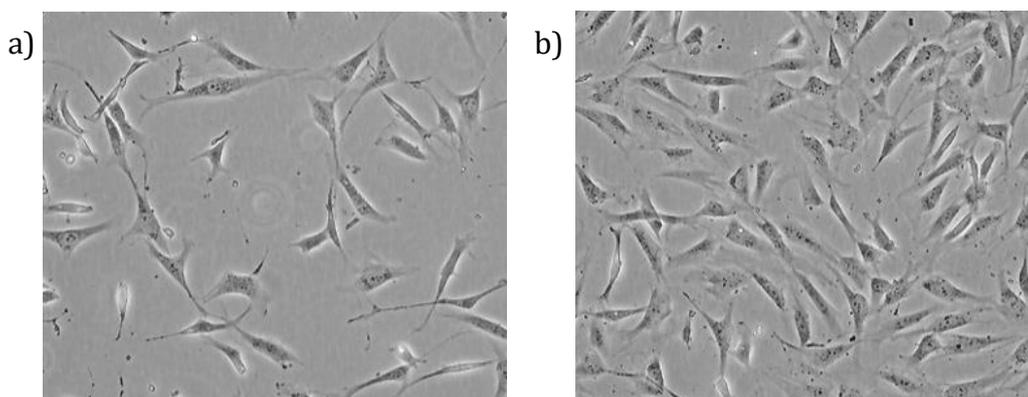


Figura 2.8 *Morfologia di cellule NIH/3T3 in coltura [113]: a) Bassa densità cellulare; b) Alta densità cellulare.*

2.1.5 Cellule SaOS-2

La linea cellulare SaOS-2 (cod. 89050205), deriva da cellule tumorali di osteosarcoma primario appartenenti ad una femmina di razza caucasica di 11 anni.

È stata acquistata dall'ECACC (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*) ed utilizzata, in questo lavoro, per effettuare test cellulari.

Le analisi effettuate da Rodan e collaboratori hanno permesso di scoprire le caratteristiche osteoblastiche delle SaOS-2 [114] che le rendono adatte ad essere impiegate come modelli di cellule ossee, pur essendo di natura tumorale [43].

Il fenotipo osteoblastico delle cellule SaOS-2 è dimostrato dai marcatori che emergono da analisi di tipo immunocitochimico: osteocalcina (OC), sialoproteina ossea (SBP), decorina e collagene I [115].

Tuttavia, le SaOS-2 presentano alcune differenze rispetto agli osteoblasti.

L'osteoprotegerina (OPG) e il collagene III presenti negli osteoblasti sani, vengono espressi solo da una bassa percentuale di cellule SaOS-2, mentre l'attività della fosfatasi alcalina (ALP) risulta maggiore per le cellule di linea [115].

A livello morfologico, gli osteoblasti mostrano forme variabili caratterizzate da numerosi processi cellulari allungati; al contrario, le cellule SaOS-2 si presentano poligonali e con poche protuberanze [115], come mostrato in figura 2.9 a. Inoltre, le SaOS-2 presentano una cinetica di proliferazione più elevata rispetto a quella esibita dagli osteoblasti e una densità cellulare di 15-20 volte superiore, pur mantenendo la stessa morfologia [115].

Come dimostrato da Prideaux e colleghi, oltre ad esibire un comportamento osteoblastico, le SaOS-2 sono capaci di mimare gli osteociti. Infatti, se coltivate per un lungo periodo, tali cellule sono in grado di differenziare in osteociti maturi, dotati di matrice extracellulare mineralizzata (figura 2.9 b) [116]. Per tale motivo, le cellule SaOS-2 possono essere impiegate anche come modello di osteociti umani [116].

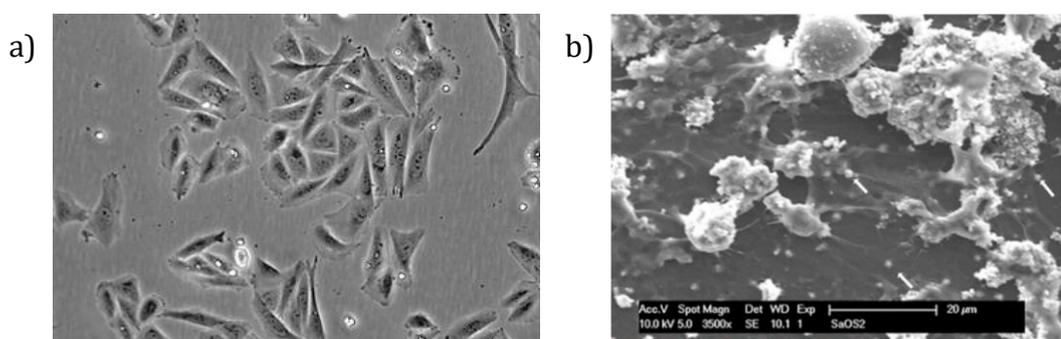


Figura 2.9 Immagini relative a cellule SaOS-2: a) Morfologia di cellule SaOS-2 in coltura [117]; b) Immagine al SEM di cellule SaOS-2 in cui si nota l'avvenuta mineralizzazione (giorno 21) [116].

2.2 Metodi

Il paragrafo presenta i protocolli applicati per la preparazione delle soluzioni polimeriche e la fabbricazione delle membrane composite elettrofilate a base di gelatina.

Inoltre, vengono descritte le strumentazioni utilizzate per caratterizzare le membrane ottenute e le procedure per effettuare i test cellulari su di esse.

2.2.1 Preparazione delle soluzioni polimeriche

2.2.1.1 Preparazione della soluzione di gelatina

Le membrane nanofibrose di controllo in gelatina (GL) sono state ottenute a partire da una soluzione polimerica preparata seguendo il protocollo riportato nel lavoro di Tonda-Turo e collaboratori [94].

La gelatina concentrata al 15% peso/volume (w/v) è stata dissolta in acqua bidistillata a 50 °C, sottoponendola ad un'agitazione di 350 rpm per circa 30-60 minuti. Una volta raggiunto il completo scioglimento della gelatina, è stato aggiunto il corretto quantitativo di GPTMS (92 µl per 1 g di GL) alla soluzione, che è stata posta nuovamente in agitazione a 50 °C per 20-30 minuti, al fine di evitare la gelificazione della stessa.

La figura 2.10 rappresenta schematicamente i passaggi effettuati per preparare la soluzione di gelatina.



Figura 2.10 Schematizzazione del protocollo di preparazione della soluzione di gelatina (GL).

2.2.1.2 Preparazione delle dispersioni di GL/BTNP

Le soluzioni acquose di gelatina contenenti le nanoparticelle piezoelettriche di titanato di bario (GL/BTNP), a diverse concentrazioni, sono state preparate seguendo gli *step* mostrati in figura 2.11 definiti in un precedente lavoro di tesi [118].

Concentrazioni di BTNP pari a 30, 100 e 120 mg/ml sono state aggiunte ad acqua bidistillata, e tramite l'uso di un sonicatore sono state disperse in soluzione.

In questo lavoro di tesi, è stato utilizzato il sonicatore ad ultrasuoni *Sonic VibraCell* della SAVATEC Strumenti Scientifici (modello CV00188), situato presso i laboratori

del DIMEAS del Politecnico di Torino. Lo strumento è stato impostato con una potenza di 130 W ed una frequenza di lavoro pari a 20 KHz.

Successivamente la gelatina, concentrata al 15% w/v, è stata aggiunta alla dispersione ed è stata mantenuta in agitazione (~350 rpm) alla temperatura di 50 °C, fino al completo scioglimento del polimero. Al fine di diminuire la formazione di aggregati e migliorare la distribuzione delle nanoparticelle, la dispersione è stata sonicata per circa un minuto prima di inserire il reticolante, alla concentrazione di 92 µl/g_{GL}. La soluzione omogenea di GL con BTNP disperse è ottenuta a seguito di un'ulteriore agitazione di circa 20 minuti alla temperatura di 50 °C.



Figura 2.11 Schematizzazione del protocollo di preparazione della dispersione delle nanoparticelle di titanato di bario (BTNP) in gelatina (GL).

2.2.1.3 Preparazione della soluzione di GL/GA

La gomma arabica (GA) è stata utilizzata come stabilizzante delle nanoparticelle, ed è quindi un materiale contenuto all'interno delle membrane polimeriche fabbricate. Per capire come essa possa influenzarne il comportamento, è stata inizialmente preparata una soluzione acquosa di gelatina e gomma arabica, secondo lo schema in figura 2.12, al fine di realizzare membrane di controllo in GL e GA.

Una concentrazione di 30 mg/ml di gomma arabica è stata dispersa in acqua bidistillata e sottoposta ad agitazione magnetica a circa 300 rpm. Poi, è stata addizionata la gelatina, concentrata al 15% w/v, ed è stata posta in agitazione a 350 rpm alla temperatura di 50 °C, fino a completo scioglimento. A questo punto, l'agente reticolante GPTMS è stato aggiunto in soluzione in quantità pari a 92 µl per ogni grammo di gelatina. Per far sciogliere ed agire il GPTMS, la soluzione è stata lasciata

sotto vigorosa agitazione a 50 °C per altri 20-30 minuti prima di procedere con l'elettrofilatura.



Figura 2.12 Schematizzazione del protocollo di preparazione della soluzione di gelatina (GL) e gomma arabica (GA).

2.2.1.4 Preparazione delle dispersioni di GL/BTNP/GA

Le soluzioni acquose di gelatina contenenti le nanoparticelle di titanato di bario (BTNP) stabilizzate dalla gomma arabica, definite come GL/BTNP/GA, sono state preparate seguendo i passaggi riportati in modo schematico in figura 2.13.

Le nanoparticelle sono state stabilizzate in soluzione con la gomma arabica (GA), in rapporto 1:1 (w/w) con le BTNP.

La GA è stata aggiunta ad acqua bidistillata e posta in agitazione fino a completo scioglimento. A questo punto sono state inserite le BTNP a concentrazioni crescenti pari a 30, 50, 70, 100 e 200 mg/ml, e sono state realizzate le dispersioni sonicando per 20 minuti. Successivamente, è stata aggiunta alla dispersione la gelatina al 15% w/v, ed è stata mantenuta in agitazione (~350 rpm) alla temperatura di 50 °C, fino a raggiungere una soluzione omogenea. Anche in questo caso, per diminuire la formazione di aggregati, evitare la precipitazione delle nanoparticelle e migliorarne la distribuzione, la dispersione è stata sonicata per 2-5 minuti (in base alla concentrazione di BTNP) prima di inserire il GPTMS, alla concentrazione riportata precedentemente. Una successiva agitazione di circa 20 minuti alla temperatura di 50 °C è necessaria al fine di ottenere una soluzione omogenea di GL con BTNP disperse e stabilizzate.

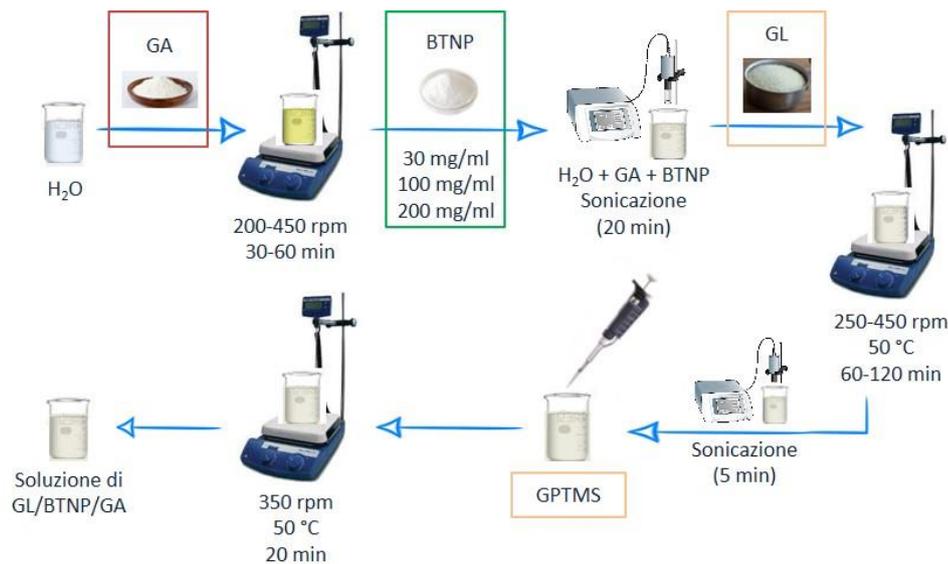


Figura 2.13 Schematizzazione del protocollo di preparazione della dispersione delle nanoparticelle di titanato di bario (BTNP), stabilizzate con la gomma arabica (GA), in gelatina (GL).

2.2.2 Fabbricazione delle membrane nanofibrose

2.2.2.1 *Electrospinning*

Le membrane nanofibrose sono state fabbricate attraverso la tecnica dell'*electrospinning* presso il laboratorio del Dipartimento di Ingegneria Meccanica e Aerospaziale (DIMEAS) del Politecnico di Torino.

Come descritto nel paragrafo 1.3, l'*electrospinning* è costituito da alcuni componenti principali che, nello specifico di questa attività di tesi, sono:

- ♦ **Alimentatore ad alta tensione** della Linari Engineering s.r.l. in grado di fornire una differenza di potenziale massima di 60 kV;
- ♦ **Siringa** in plastica da 5 ml dotata di un ago piatto di 21 G (0.8 mm), all'interno della quale sono state caricate le soluzioni polimeriche e le dispersioni di nanoparticelle a base di gelatina da processare;
- ♦ **Pompa volumetrica** (Linari Engineering s.r.l.) programmata in modo tale da spingere il pistone della siringa con velocità costante ed erogare un flusso continuo di soluzione polimerica durante l'intero processo;

- ♦ **Collettore piano**, sul quale vengono depositate le fibre elettrofilate, formato da una lastra rettangolare in plastica, ricoperta da un foglio di alluminio.

Gli elementi descritti compongono un apparato in conformazione orizzontale, mostrato in figura 2.14.



Figura 2.14 Sistema di electrospinning in conformazione orizzontale, utilizzato in questo lavoro di tesi.

Tutti i componenti, tranne il generatore di tensione, sono posti all'interno di una cappa chimica capace di regolare la ventilazione e la temperatura. In questo modo è possibile mantenere una temperatura costante ed aspirare i solventi che evaporano durante il processo.

Dopo aver collocato la siringa contenente la soluzione polimerica sulla pompa, uno dei morsetti dell'alimentatore è stato collegato all'ago, mentre gli altri due sono stati posizionati sul collettore. A questo punto sono stati impostati i parametri di processo desiderati e sono state realizzate le membrane nanofibrose.

2.2.2.1.1 Parametri di processo

I parametri di processo utilizzati per la produzione delle fibre elettrofilate sono riportati in tabella 2.6, e sono gli stessi sia per le fibre in sola GL, sia per quelle composite di GL e BTNP.

Il lavoro di Tonda-Turo e colleghi ha permesso di definire i parametri qui utilizzati [94], ad eccezione della velocità di flusso polimerico, ottimizzato in una precedente attività di tesi [118].

Parametri <i>Electrospinning</i>	
<i>Differenza di potenziale</i>	30 kV
<i>Flusso</i>	1.5 ml/h
<i>Distanza ugello-collettore</i>	12 cm
<i>Temperatura</i>	50 °C
<i>Ventilazione</i>	-

Tabella 2.6 *Parametri di processo impostati per l'electrospinning delle membrane nanofibrose in gelatina.*

2.2.3 Caratterizzazione delle membrane nanofibrose

2.2.3.1 Caratterizzazione morfologica

2.2.3.1.1 Microscopia a scansione elettronica (SEM)

Il microscopio a scansione elettronica è stato commercializzato per la prima volta nel 1952 [119], e oggi viene spesso utilizzato per visionare e caratterizzare campioni alla nanoscala. Infatti, lo strumento permette di unire un'ottima risoluzione (fino a 2 nm) ad un'elevata capacità di ingrandimento (massima 100000x) del campione preso in esame.

Il principio di funzionamento del SEM, rappresentato in figura 2.15 a, prevede l'emissione di un fascio di elettroni primari che, attraverso una colonna posta sotto vuoto, raggiungono il campione ed interagiscono con esso per generare l'immagine.

Un fascio di elettroni primari è emesso, al catodo, da un filamento di tungsteno (o di esaboruro di lantanio o di cerio) scaldato a circa 3000 K. La differenza di potenziale (1 keV - 50 keV) applicata tra anodo e catodo accelera gli elettroni, che vengono attratti dall'anodo polarizzato e quindi orientati verso il basso. Variando la tensione applicata è possibile regolare l'energia e la velocità del fascio emesso.

Lungo l'intera colonna è presente un sistema di lenti elettromagnetiche e diaframmi che riducono il diametro del fascio di elettroni e lo focalizzano sul campione (figura 2.15 b). Quando il campione viene colpito dal fascio reagisce emettendo diversi segnali, tra i quali elettroni secondari, utili ad analisi morfologiche, che vengono raccolti ed elaborati per mostrare all'interfaccia un'immagine in scala di grigio del campione. In particolare, la scansione del campione avviene attraverso la deflessione del fascio di elettroni, lungo gli assi x e y, ad opera di due coppie di bobine elettromagnetiche (figura 2.15 c), sincronizzate con il sistema di raccolta dati. L'operatore può determinare la velocità di scansione del campione.

Il funzionamento appena descritto può avvenire solo in condizione di vuoto ($p < 10^{-3}$ Pa), che garantisce la formazione e la propagazione del fascio elettronico senza perdite di energia.

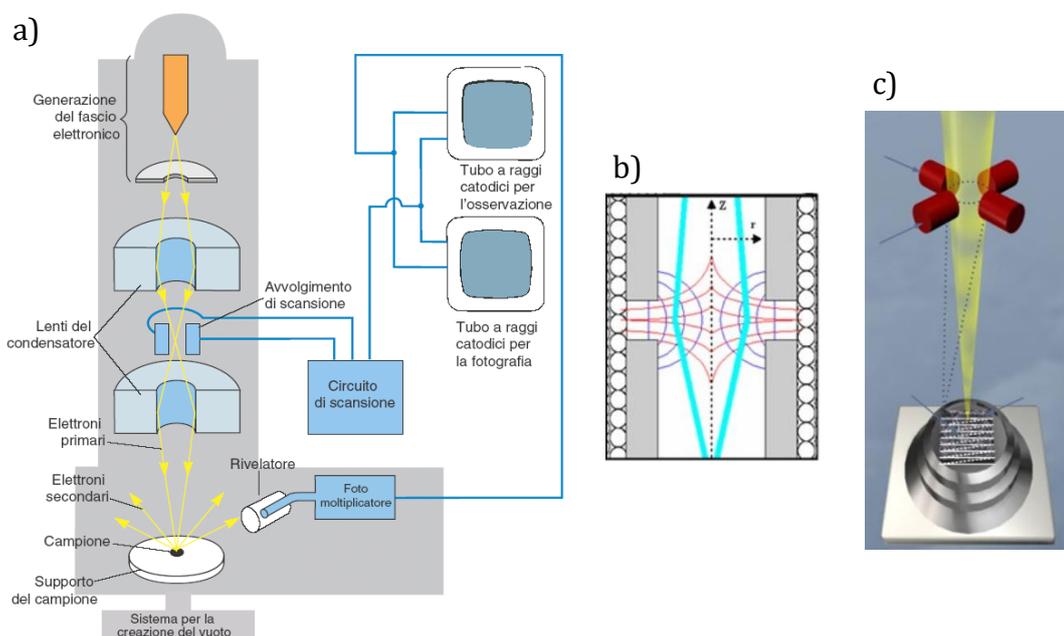


Figura 2.15 Principio di funzionamento di un microscopio a scansione elettronica (SEM): a) Struttura e composizione di un SEM [120]; b) Lente elettromagnetica con deviazione del fascio di elettroni (in azzurro) [121]; c) Deflessione del fascio ad opera delle bobine elettromagnetiche [121].

L'immagine ottenuta dai dati raccolti presenta un'ampia profondità di campo di fuoco ed un'elevata risoluzione, che migliora se si scansionano *spot* di piccole dimensioni alla volta. I toni di grigio che la compongono rispecchiano l'intensità di energia emessa dai relativi elettroni secondari. Infatti, le zone più chiare identificano quelle

aree del campione che hanno un numero atomico medio maggiore e, quindi, che sono in grado di emettere una quantità maggiore di elettroni secondari perché quelli primari sono penetrati poco in profondità; al contrario, le zone più scure rappresentano elementi del campione in cui gli elettroni primari sono penetrati di più e quindi è minore il numero di elettroni riemessi, così come il numero atomico (materiale più leggero).

Il SEM presenta, quindi, indubbi vantaggi quali l'elevata risoluzione e l'ampia profondità di campo, l'alta capacità di ingrandimento, la semplice e rapida preparazione dei campioni da analizzare e la possibilità di orientare il campione durante l'analisi.

In questa attività di tesi le membrane prodotte utilizzando i protocolli precedentemente descritti, sono state tagliate a formare quadrati di 1 cm^2 e quindi poste sulla superficie del porta-campione (*stub*), rivestita di biadesivo in carbonio. I campioni così ottenuti sono stati resi conduttivi da un rivestimento d'oro (*sputtering*), effettuato impostando un tempo di *sputtering* di 50 s e una corrente di 30 mA sullo strumento *Agar Auto Sputter Coater*, reso disponibile dai laboratori della sede di Alessandria del Politecnico di Torino (figura 2.16 a).

Successivamente, i campioni sono stati scansionati al SEM LEO 435VP, presente nei laboratori di Alessandria del Politecnico di Torino (figura 2.16 b).

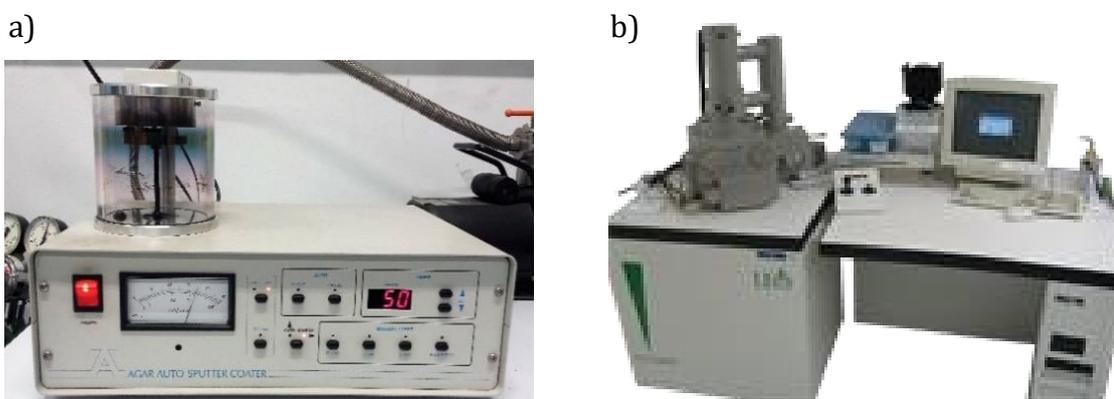


Figura 2.16 Strumentazione: a) Agar Auto Sputter Coater; b) SEM modello LEO 435VP.

I parametri impostati dall'operatore per scansionare i campioni sono riportati in tabella 2.7.

Parametri SEM	
<i>Tensione applicata</i>	20 kV
<i>Distanza lente-campione</i>	10 - 15 mm
<i>Ingrandimenti</i>	1000 x, 2000 x, 5000 x

Tabella 2.7 Parametri impostati per il SEM.

2.2.3.1.1.1 Analisi delle immagini

Le informazioni morfologiche sulle membrane nanofibrose sono state estrapolate dalle immagini ricavate dal SEM, utilizzando il programma *Image J*. È stato possibile valutare il diametro delle fibre, la grandezza dei pori e la dimensione degli aggregati di nanoparticelle.

L'immagine al SEM del campione preso in esame, è stata importata nel software *Image J* e, una volta impostata la scala di riferimento, è stato possibile analizzare i diametri di 50 fibre casuali grazie al comando '*Analyze - Misure*'. Successivamente, i dati sono stati riportati su Excel ed elaborati per ricavare il diametro medio delle fibre e mostrare graficamente la loro distribuzione.

Per valutare la dimensione degli aggregati di nanoparticelle è stata seguita la stessa procedura, analizzando per tre volte l'immagine SEM di ogni tipologia di membrana in cui, per ogni analisi, sono stati misurati casualmente 20 aggregati ognuna così da ottenere un valore medio. L'elaborazione successiva dei dati ha permesso di ricavare una dimensione media degli aggregati che è stata diagrammata per evidenziare la differenza significativa di comportamento (ANOVA test ad un fattore). Le fibre esaminate sono state: GL/BTNP senza GA con BTNP pari a 30 e 100 mg/ml; GL/BTNP/GA caricate con 30, 100, 200 mg/ml di BTNP.

Infine, per definire la dimensione dei pori è stata inizialmente regolata l'intensità del contrasto nelle immagini SEM, per evidenziare i contorni dei pori (*Adjust - Threshold*) e successivamente, con il comando '*Analyze - Particles*', sono state ricavate informazioni sulle aree desiderate. Tramite l'uso di Excel è stato possibile elaborare i dati raccolti per ottenere un valor medio di diametro dei pori, ipotizzati di forma circolare.

2.2.3.2 Caratterizzazione chimico-fisica

2.2.3.2.1 Microanalisi EDX o EDS

La spettroscopia EDX (*Energy Dispersive X-Ray Analysis*), anche definita come EDS (*Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*) è una microanalisi non distruttiva che permette di caratterizzare campioni a livello chimico e composizionale, sfruttando il rilascio di raggi x da parte del campione quando è sottoposto a microscopia a scansione elettronica.

Un fascio di elettroni interagisce con il campione, che in risposta emette diversi segnali, tra i quali i raggi x rilevati tramite l'EDX. Nel dettaglio, come mostra lo schema in figura 2.17, un elettrone primario del fascio incidente scalza un elettrone presente nell'orbitale più interno dell'atomo del campione, creando una lacuna caricata positivamente. Tale lacuna attrae gli elettroni presenti nei livelli energetici più alti e viene colmata da uno di essi. Questo salto energetico provoca il rilascio dei raggi x, che presentano un'energia pari alla differenza energetica tra i due livelli in cui è avvenuta la transizione elettronica e dipendente dal numero atomico dell'elemento. L'elettrone che compie il salto lascerà a sua volta una lacuna, che darà origine ad una nuova transizione elettronica e quindi al rilascio di raggi x con diversa energia, proporzionale al nuovo salto orbitale; e così via.

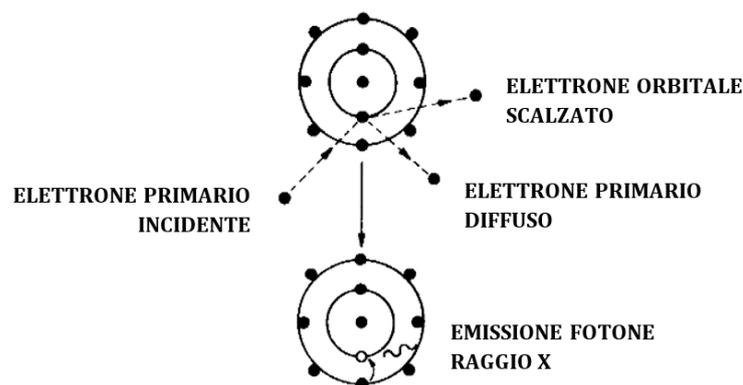


Figura 2.17 Schema identificativo del salto energetico compiuto dall'elettrone con emissione di fotone x.

L'analisi EDX può essere effettuata attraverso una spettroscopia a scansione elettronica (SEM), descritta al paragrafo 2.2.3.1.1, equipaggiata con un particolare *detector* sensibile alla lunghezza d'onda fotonica (WDS) o all'energia fotonica (EDS o EDX), posto in prossimità del campione. Tendenzialmente, il rilevatore è di tipo EDS e

consiste in un monocristallo in silicio drogato con il litio, mantenuto ad una temperatura di 77 K, al quale viene trasferita l'energia dei raggi x [122].

Un campione, per essere sottoposto ad analisi EDX, deve essere stabile a bassa pressione (non presentare fasi volatili, spesso eliminate tramite deidratazione) e conduttivo (*sputtering*).

Il risultato dell'analisi EDX è uno spettro costituito da svariati picchi corrispondenti ognuno ad una determinata energia, associata ad uno specifico elemento. L'area sottesa dai picchi è proporzionale al numero di atomi di quell'elemento riscontrati nel campione. Le informazioni ricavate da tale analisi sono sia semi-qualitative che semi-quantitative e permettono, quindi, di riconoscere e quantizzare gli elementi chimici che compongono il campione analizzato [122].

Le membrane polimeriche in gelatina e quelle composite caricate con 100 e 200 mg/ml di BTNP sono state analizzate tramite EDX preparando il campione come riportato nel paragrafo 2.2.3.1.1 ed esaminandolo attraverso il SEM.

2.2.3.2.2 Spettroscopia infrarossa con trasformata di Fourier (FTIR)

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR) è una tecnica analitica non distruttiva impiegata per ottenere una caratterizzazione fisico-chimica dei materiali attraverso l'uso di spettroscopia infrarossa.

La spettroscopia infrarossa (IR) vibrazionale sfrutta l'assorbimento di radiazione infrarossa ($0.76 < \lambda < 10^{-3} \mu\text{m}$) da parte del materiale, che provoca la vibrazione dei legami molecolari al suo interno. La lunghezza d'onda e l'intensità della radiazione infrarossa (IR) assorbita dal campione dipendono dalla forza del legame chimico e dagli atomi coinvolti. Infatti, i gruppi funzionali nelle molecole subiscono delle vibrazioni caratteristiche (*stretching* e *bending*) quando assorbono radiazione infrarossa, a lunghezze d'onda (λ) specifiche. In questo modo è possibile identificare gli elementi presenti all'interno del campione, oltre che misurarne la quantità attraverso l'intensità di assorbimento (assorbanza). Si deduce, quindi, come sia possibile ottenere informazioni quantitative (assorbanza) e qualitative (gruppi funzionali) sul campione preso in esame. Valutando la trasmittanza percentuale come

rapporto tra intensità del raggio trasmesso e intensità del raggio IR incidente, si ottiene come risultato uno spettro IR che mostra i picchi di assorbimento in funzione del numero d'onda (cm^{-1}), che identifica una specifica vibrazione di legame.

La spettroscopia IR con trasformata di Fourier (FT-IR) utilizza uno spettrofotometro in trasformata di Fourier per effettuare l'analisi, mostrato schematicamente in figura 2.18 a. Uno specchio semitrasparente (*beam-splitter*) suddivide il raggio sorgente IR in due raggi distinti, che successivamente si ricombinano esibendo fenomeni di interferenza, che danno origine all'interferogramma [123]. L'algoritmo utilizzato per generare lo spettro IR, a partire dall'interferogramma, è la trasformata di Fourier (FT).

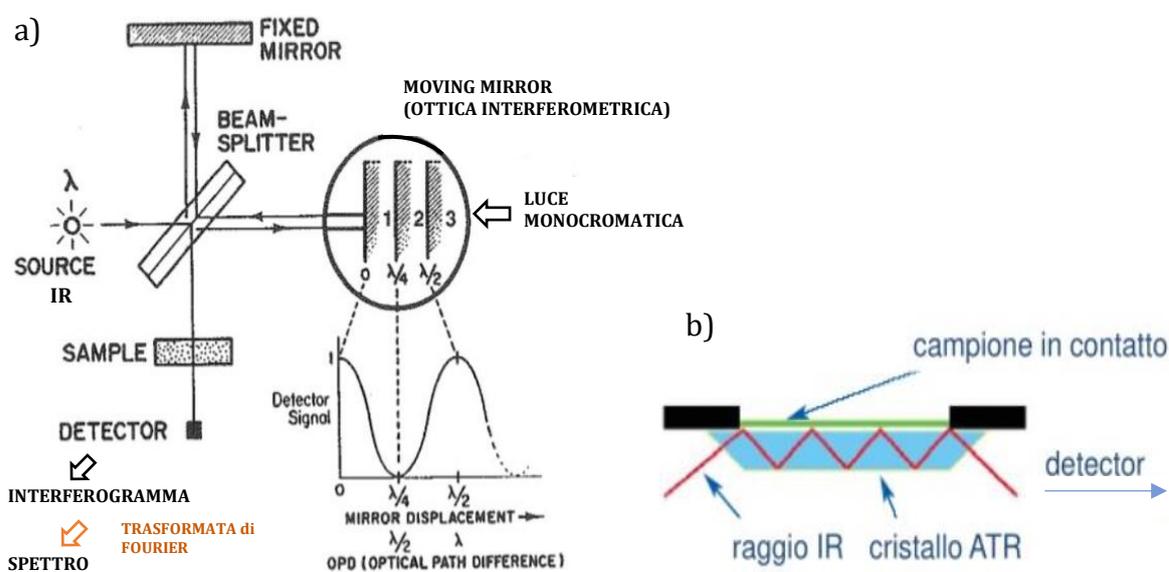


Figura 2.18 a) Rappresentazione schematica di uno spettrofotometro FTIR; b) Funzionamento della tecnica ATR, per la spettroscopia FTIR-ATR [123].

In particolare, per la seguente tesi è stata eseguita una FTIR di tipo ATR, cioè una spettrofotometria infrarossa con trasformata di Fourier in riflettanza totale attenuata (ATR). Come mostrato in figura 2.18 b, il campione viene posto a contatto di un cristallo ad elevato indice di rifrazione, che viene colpito da radiazione infrarossa con un angolo di incidenza tale da permettere la completa riflessione del raggio in direzione del campione. Il raggio IR viene riflesso più volte nel cristallo e subisce attenuazione quando penetra il campione. L'attenuazione identifica l'assorbimento della radiazione da parte del materiale ed è riportata in uscita in un interferogramma,

che viene elaborato tramite trasformata di Fourier per generare lo spettro IR relativo alla superficie del campione (profondità max 5 μm [123]).

Le membrane polimeriche fabbricate in gelatina (paragrafi 2.2.1.1 e 2.2.2.1), quelle composite GL/BTNP/GA realizzate con concentrazioni di nanoparticelle pari a 30, 100 e 200 mg/ml (paragrafi 2.2.1.4 e 2.2.2.1) e le polveri di GL e BTNP sono state analizzate tramite FTIR-ATR presso i laboratori di Alessandria del Politecnico di Torino, usando il dispositivo *Frontier FT-IR Spectrometer* della *Perkin Elmer* riportato in figura 2.19.



Figura 2.19 *Dispositivo Frontier FR-IR Spectrometer della Perkin Elemer.*

Dopo aver eseguito una prima analisi in background per tarare lo strumento ed eliminare il rumore per le prove successive, è stato effettuato il test sui campioni impostando i parametri in tabella 2.8, ottenendo uno spettro IR in tempi brevi. In base al campione esaminato sono state usate punte differenti: piatta per le membrane polimeriche, staccate dall'alluminio e tagliate di forma quadrata, e acuminata per le polveri, così da farle aderire bene al cristallo.

Gli spettri ottenuti sono stati analizzati attraverso l'apposito software *Spectrum*, evidenziando il numero d'onda dei picchi di assorbimento ed il corrispettivo legame sottoposto a vibrazione.

Parametri FTIR-ATR	
<i>Cristallo</i>	Diamante
<i>Risoluzione</i>	4 cm^{-1}
<i>Range numeri d'onda</i>	4000 – 600 cm^{-1}
<i>Numero di scansioni</i>	32

Tabella 2.8 *Parametri impostati per la FTIR-ATR.*

2.2.3.3 Analisi termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica (TGA) è un'analisi termica quantitativa che permette di misurare la variazione di massa subita (in funzione del tempo e/o della temperatura) da un materiale sottoposto a riscaldamento controllato crescente.

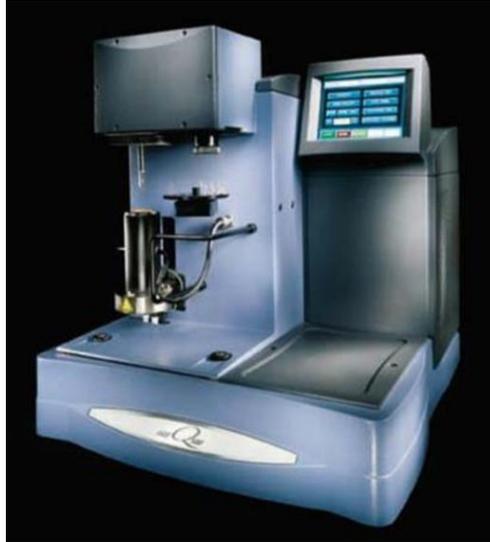


Figura 2.20 Termogravimetro per svolgere l'analisi TGA [124].

Un termogravimetro, mostrato in figura 2.20, è costituito dai componenti seguenti:

- ♦ **Bilancia** analitica **sensibile** (portata 5 – 20 mg);
- ♦ **Forno** o fornace con temperature che vanno da 25 °C a 1500 °C;
- ♦ Sistema di **gas di spurgo** che garantisce un'atmosfera inerte ed una diffusione omogenea del calore;
- ♦ Sistema di **elaborazione, acquisizione e visualizzazione** dei dati.

Il dispositivo è una sorta di bilancia di precisione in cui il campione viene scaldato progressivamente, a partire dalla temperatura ambiente fino ad arrivare a temperature di circa 1000 °C, attraverso rampe di salita programmabili con velocità di riscaldamento costante per ogni intervallo di temperatura. Le condizioni impostate durante l'esame dipendono dalle informazioni che si vogliono ricavare dal campione. Tendenzialmente, il primo esperimento svolto prevede un innalzamento della temperatura di 10 °C/minuto per scaldare il campione, che è mantenuto sotto costante corrente di gas inerte. Il risultato di tale prova è una curva di decomposizione termica, definita anche curva termogravimetrica o termogramma, che mostra la variazione di peso del campione (data dalla volatizzazione delle

sostanze volatili presenti nel materiale), assoluta o in percentuale, in funzione della temperatura. La curva ottenuta relativa alla perdita di peso può essere derivata per ottenere un andamento di velocità di perdita di peso, anche detto curva DTGA.

La TGA può essere effettuata per analizzare decomposizioni chimiche e corrosione di metalli o per determinare composti volatili e umidità di un certo materiale. Spesso è impiegata per lo studio della stabilità termica dei polimeri, cioè la massima temperatura alla quale è possibile sottoporre il materiale prima che si verifichino modifiche irreversibili, a livello chimico-fisico, che comporterebbero cambiamenti nelle sue proprietà. Un'informazione altrettanto utile ricavabile tramite la TGA, soprattutto nel caso di materiali compositi, è legata al riconoscimento quantitativo dei vari componenti con grado di volatilizzazione diversi, presenti nel campione. La TGA, infatti, è un'analisi quantitativa che non permette di discriminare quali materiali presenti all'interno del campione provochino le modificazioni che portano alla curva termogravimetrica. Per questo motivo, informazioni trasversali sul campione preso in esame sono spesso estrapolati dalla TGA abbinata ad altre analisi qualitative o termoanalitiche, come la FTIR e la calorimetria differenziale a scansione (DSC).

Nel caso delle membrane polimeriche prodotte per questa tesi, la TGA è stata gentilmente effettuata, in duplicato, presso l'Istituto Reale di Tecnologia KTH (*Kungliga Tekniska Högskolan*) di Stoccolma, Svezia.

Le fibre in sola gelatina e le membrane composite GL/BTNP/GA caricate con 100 e 200 mg/ml, preparate e realizzate secondo gli *step* descritti nei paragrafi 2.2.1.1, 2.2.1.4 e 2.2.2.1, sono state pesate per ottenere campioni rispettivamente di 5.4904 mg, 6.3403 mg e 6.2508 mg. Tali membrane sono state caratterizzate dal punto di vista della stabilità termica e della composizione percentuale sottoponendole a riscaldamento crescente (7 °C/min iniziali fino ad arrivare a circa 9 °C/min alla fine) a partire da circa 30 °C fino a raggiungere una temperatura finale di circa 794 °C.

Essendo noto il peso iniziale di ogni campione, è stato possibile ottenere il peso finale del campione togliendo la perdita percentuale di peso subita durante la prova. Poi è stato calcolato il residuo dato dalla presenza delle sole nanoparticelle facendo la differenza tra peso raggiunto dalla membrana composita e peso finale della membrana in gelatina; così per entrambe le membrane caricate. In questo modo è stato ottenuto un valore in mg relativo alle nanoparticelle presenti nelle due membrane composite esaminate.

Il confronto delle quantità ricavate dopo tale prova può fornire informazioni interessanti sulla precipitazione delle nanoparticelle in soluzione, che non vengono di conseguenza incorporate nelle membrane processate.

2.2.3.4 Caratterizzazione meccanica

Le membrane ottenute dal processo di *electrospinning* sono state caratterizzate meccanicamente attraverso prove di trazione, utilizzando il dispositivo *MTS QTest™/10* presente nei laboratori del DIMEAS del Politecnico di Torino (figura 2.21 a).

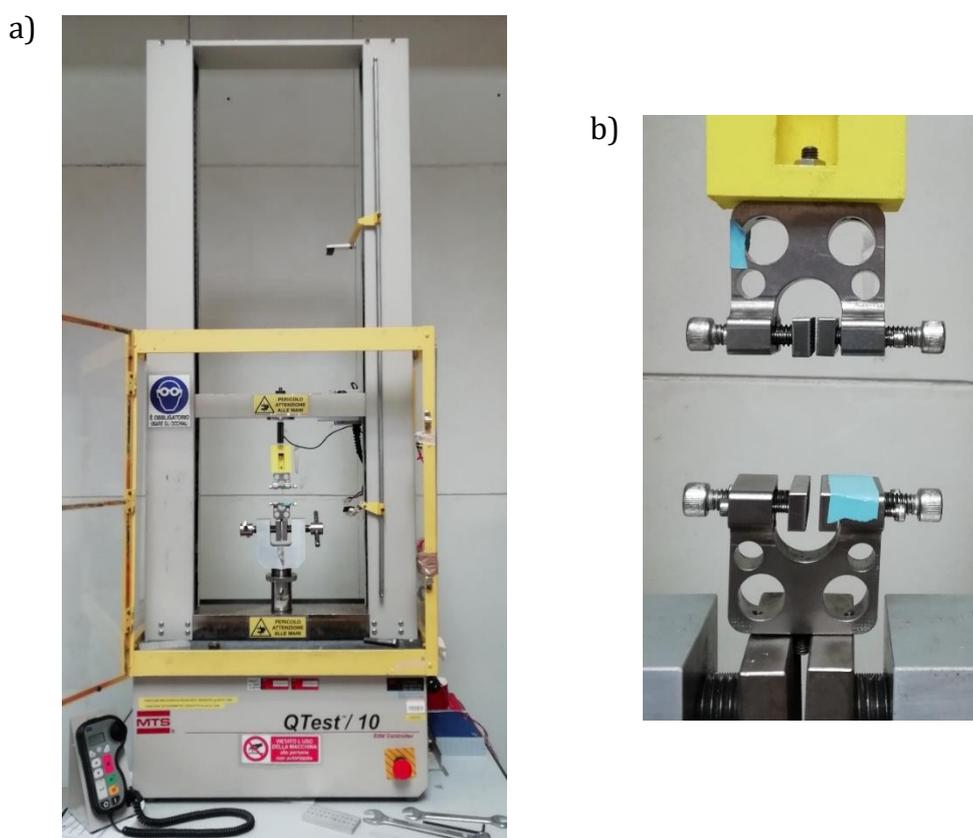


Figura 2.21 a) Dispositivo per prove meccaniche MTS QTest™ 10; b) Afferraggi.

Lo strumento è costituito da una traversa inferiore fissa e da una traversa superiore mobile, regolabile lungo l'asse y tramite un telecomando. Ad entrambe le traverse vengono fissati degli afferraggi, utili a tenere fisso il campione in posizione verticale per l'intera durata della prova. Nello specifico di questo lavoro, sono stati utilizzati gli afferraggi a chiusura regolabile mostrati in figura 2.21 b che, avendo una superficie

piatta e regolare, hanno consentito di effettuare la prova senza generare punti di intensificazione degli sforzi sulla membrana.

L'afferraggio superiore è collegato alla traversa tramite una cella di carico.

Quando viene avviato il test, la traversa mobile si muove verso l'alto ad una velocità impostata provocando una deformazione nel provino, che a sua volta reagisce esercitando una forza contraria al carico applicato dalla traversa. Tali deformazioni e le corrispettive forze di carico applicate, vengono rilevate dalla cella di carico grazie alla presenza di un estensimetro al suo interno. Il test termina quando il provino giunge a rottura. L'intero andamento della prova può essere monitorato in diretta dal software dedicato *TestWorks 4*, che permette di impostare i parametri del test e di esportare i dati acquisiti dalla cella di carico, una volta concluso.

Il *post-processing* dei dati permette di ottenere informazioni sulle proprietà meccaniche del materiale analizzato, come la resistenza, la resilienza e la deformazione.

In particolare, in questo lavoro sono state caratterizzate meccanicamente le fibre polimeriche GL, GL/GA e quelle composite GL/BTNP/GA contenenti concentrazioni pari a 30, 100 e 200 mg/ml di nanoparticelle, preparate e realizzate seguendo i protocolli presentati nei paragrafi 2.2.1.1, 2.2.1.3, 2.2.1.4 e 2.2.2.1.

Le membrane sono state staccate dal foglio di alluminio e ritagliate per formare provini rettangolari di circa 1.5 cm x 5 cm. Quattro campioni per ogni tipologia di membrana sono stati sottoposti a prove di trazione, così da ottenere dati significativi contraddistinti da valor medio e deviazione standard.

Prima di avviare il test ogni provino è stato misurato con un calibro digitale, per ottenere informazioni geometriche quali larghezza, spessore e distanza tra i due afferraggi, una volta alloggiato il campione, che identifica il tratto utile in cui il provino subisce le deformazioni che lo portano a rottura.

La caratterizzazione meccanica è stata effettuata utilizzando una cella di carico pari a 10 N ed impostando, tramite il software *TestWorks 4*, una velocità di 2 mm/min per la traversa mobile.

I dati acquisiti sono stati esportati su Excel e normalizzati in funzione della lunghezza utile e dell'area trasversale del provino, calcolata a partire dai dati geometrici.

A questo punto, è stato possibile ottenere dei grafici sforzo-deformazione (σ - ϵ), che mostrano lo sforzo applicato in funzione della deformazione percentuale del provino.

Per ogni campione, le proprietà meccaniche sono state valutate calcolando il modulo di Young o modulo elastico (E), in MPa, come coefficiente angolare del tratto lineare della curva σ - ε moltiplicato per 10^2 (attraverso la funzione di Excel 'Aggiungi linea di tendenza lineare', che permette di visionare l'equazione esplicita della retta) e la deformazione percentuale a rottura (ε %).

Per interpretare in modo più preciso i dati ricavati, sono state svolte delle analisi statistiche utilizzando l'*add-in* di Excel 'Analisi dati', selezionando il metodo ANOVA (*Analysis Of Variance*) ad un fattore ed impostando come limite di significatività 0.05.

2.2.3.5 Prove di degradazione

Le membrane nanofibrose fabbricate sono state sottoposte a prove di degradazione *in vitro*, al fine di valutarne la stabilità nel tempo in condizioni simil-fisiologiche. Tali condizioni sono state mimate dal PBS (*Phosphate-Buffered Saline*), soluzione salina acquosa contenente cloruro di sodio, fosfato di sodio e (a volte) cloruro di potassio, che presenta caratteristiche simili all'ambiente biologico dell'essere umano.

In particolare, le fibre in gelatina e le membrane composite GL/BTNP/GA con concentrazioni di nanoparticelle pari a 30, 100 e 200 mg/ml, realizzate secondo i protocolli descritti ai paragrafi 2.2.1.1, 2.2.1.4 e 2.2.2.1, sono state staccate dall'alluminio e tagliate a formare campioni rettangolari di circa 3 cm x 1 cm.

I campioni preparati sono stati immersi completamente in 3 ml di PBS ognuno, all'interno di *bijou* in plastica. A questo punto sono stati incubati a 37 °C e sono state poi valutate le caratteristiche di ogni campione al variare del periodo di incubazione. Le tempistiche inizialmente selezionate per l'incubazione dei campioni, definite *time-step*, sono state 30 minuti, 24 h, 72 h, 7 giorni e 14 giorni.

Dopo le prime prove, sono stati scartati i *time-step* di 7 e 14 giorni perché il materiale è stato completamente deteriorato, riducendo i *time-step* a 30 min, 24 h e 72 h.

Anche alcuni campioni dei *time-step* inferiori sono stati deteriorati molto e per tale motivo è stato cambiato il volume di PBS da utilizzare per il test, diminuendolo ad 1 ml. In questo modo è stato possibile valutare la degradazione di ogni campione, ad eccezione delle membrane composite con 200 mg/ml di BTNP dopo 72 h, che risultano disgregate in piccoli pezzi.

Un probabile *swelling* elevato delle membrane durante l'incubazione non ha consentito di ottenere informazioni morfologiche relative alla stabilità. Per ovviare al problema, quindi, le fibre sono state mantenute in posizione orizzontale lasciandole adese al foglio di alluminio e sono state ricoperte in superficie con una quantità sufficiente di PBS. Purtroppo, anche seguendo questo protocollo il materiale ha subito un'importante degradazione.

Dopo ogni *time-step* le membrane sono state sottoposte a due risciacqui con acqua bidistillata al fine di eliminare eventuali residui di sale. Inoltre, per poter effettuare l'analisi SEM che ha permesso di valutare morfologicamente la degradazione subita, le membrane così preparate sono state congelate e successivamente liofilizzate per eliminare tracce di fase liquida. Infatti, il liofilizzatore è un dispositivo che sfrutta la bassa temperatura e il vuoto per sublimare l'acqua congelata. Nello specifico, lo strumento utilizzato presso il laboratorio del DIMEAS del Politecnico di Torino è stato lo *Scanvac CoolSafe™ 55-4*, riportato in figura 2.22 a, utilizzando la pompa da vuoto in figura 2.22 b per abbassare la pressione e generare il vuoto nella cabina.

Una volta raggiunta la temperatura di $-53\text{ }^{\circ}\text{C}$ le fibre congelate sono state alloggiare nell'apposita cabina, successivamente posta sotto vuoto agendo sulla pompa, e quindi liofilizzate per circa 24h. Dopo aver eseguito il processo inverso per togliere il vuoto dalla cabina, sono stati estratti i campioni ormai completamente privi di acqua.

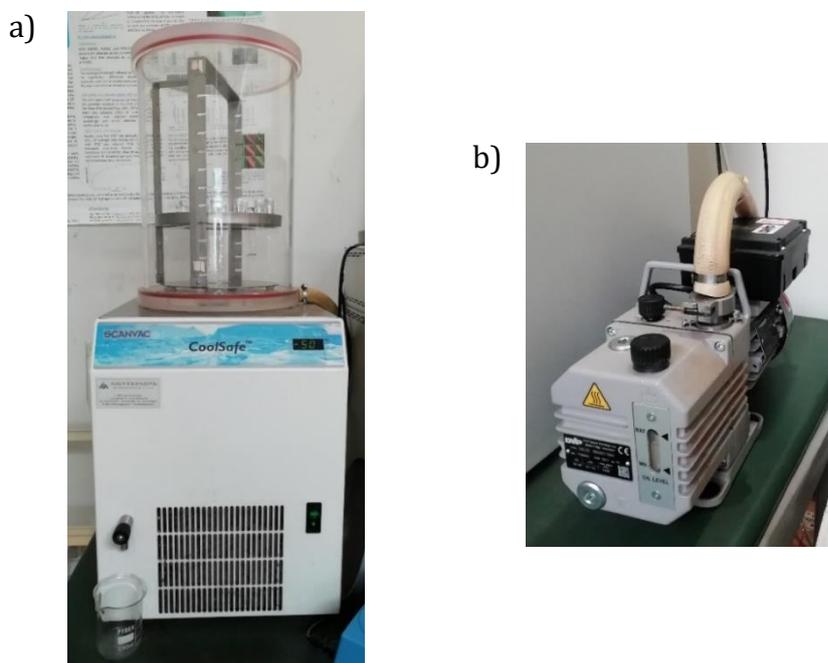


Figura 2.22 a) Dispositivo Scanvac CoolSafe 55-4; b) Pompa da vuoto.

2.2.3.5.1 Reticolazione in genipina

Data la finalità di tale lavoro, la stabilità del costruito è molto importante e quindi si è introdotto un ulteriore passaggio di reticolazione per meglio stabilizzare in ambiente acquoso le membrane composite realizzate.

L'agente reticolante genipina è stato sciolto in etanolo ad una concentrazione di 10% w/v. Le membrane elettrofilate staccate dall'alluminio sono state ritagliate a formare piccoli campioni che sono stati ricoperti con una quantità sufficiente di soluzione di genipina precedentemente preparata. Tali campioni sono stati lasciati ad incubare a temperatura ambiente per 72 h. Successivamente, è stata tolta la genipina ed i campioni sono stati risciacquati, congelati e liofilizzati. A questo punto è stato possibile caratterizzare le membrane dal punto di vista della degradazione e delle prove cellulari.

La procedura descritta è stata effettuata sulle membrane elettrofilate già reticolate con il GPTMS. Infatti, come riportato nel paragrafo 2.1.1.2, la genipina provoca sulle membrane in soluzione acquosa elevato *swelling* e di conseguenza un'alterazione morfologica. Per questo motivo mantenere il GPTMS in soluzione prima di eseguire l'*electrospinning* consente di ottenere membrane già reticolate e quindi più stabili e meno soggette a cambiamenti morfologici, una volta sottoposte al *cross-linking* con la genipina.

Grazie a questo nuovo protocollo è stato possibile esaminare le membrane nanofibrose composite GL/BTNP/GA caricate con 100 mg/ml e 200 mg/ml di BTNP fino a tre settimane di incubazione in PBS a 37 °C. I nuovi *time-step* identificati sono stati: 2 h, 24 h, 72 h, 7 giorni e 2 settimane.

Ad ogni *time-step* i campioni sono stati tolti dall'incubatore, sciacquati per due volte con acqua bidistillata (poi rimossa) per rimuovere i residui di sale ed infine congelati. Anche in questo caso per poter caratterizzare i campioni deteriorati essi sono stati liofilizzati. Quindi, la morfologia delle membrane è stata analizzata al SEM, formando piccoli campioni posti sul porta-campioni dello strumento.

2.2.3.6 Prove cellulari

Al fine di valutare la cito compatibilità del materiale e la morfologia assunta dalle cellule, cellule simil-ossee (SaOS-2) e fibroblasti (NIH/3T3), impiegati come controllo, sono state coltivate sulle membrane in gelatina (controllo) e su quelle composite GL/BTNP/GA con concentrazioni di BTNP di 100 e 200 mg/ml, fabbricate seguendo i protocolli presentati nei paragrafi 2.2.1.1, 2.2.1.4 e 2.2.2.1.1 ed ulteriormente stabilizzate dal processo di reticolazione con genipina precedentemente descritto nel paragrafo 2.2.3.5.1.

Le membrane sono state tagliate in piccoli campioni e fissate, ognuna, in un pozzetto di una piastra *multiwell* da 48 tramite l'utilizzo di *CellCrown™ 48*. Ogni tipologia di membrana è stata valutata in triplicato, così da avere un valore medio più attendibile di vitalità cellulare. La piastra *multiwell* con i campioni e le *cell crown* utilizzate sono mostrate in figura 2.23 a e b.

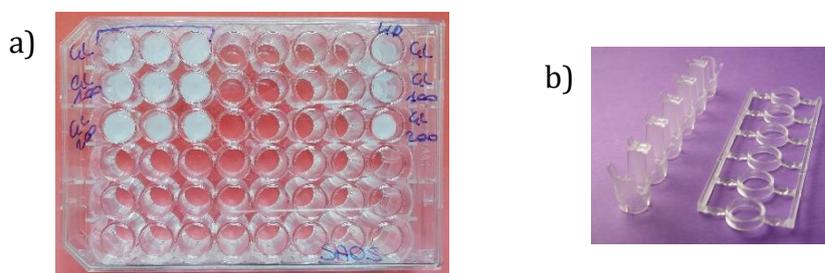


Figura 2.23 a) *Multiwell plate* da 48 pozzetti; b) *CellCrown™ 48*.

Le cellule sono state coltivate in una *flask* T25 (volume \sim 3.5 ml) all'interno di un incubatore che permette di mantenere un ambiente ad umidità controllata, con una temperatura di 37 °C e CO₂ concentrata al 5%. Tendenzialmente le cellule crescono velocemente, ad eccezione delle SaOS-2 che sono più lente, giungendo a confluenza (si compattano in tutto il volume a disposizione) in circa 48h.

A questo punto è necessario staccare le cellule per evitare apoptosi e garantire nuova proliferazione in medium fresco *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) con 10% di FBS (siero fetale bovino), senza antibiotico.

Per procedere con il test cellulare, prima di tutto le cellule sono state staccate dalla *flask* incubandole a 37 °C con una soluzione di tripsina/EDTA (\sim 0.7-0.8 ml), successivamente inattivata dall'aggiunta di medium fresco (\sim 1-2 ml). La sospensione cellulare è stata quindi prelevata, trasferita in una *falcon* da 15 ml e centrifugata per

circa 5 minuti a 1100 rpm per creare un pellet di cellule, separato dal medium. In questo modo è stato possibile aspirare ed eliminare il DMEM con tripsina/EDTA senza prelevare le cellule, che sono state risospese in medium fresco, ottenendo un volume di solito pari a quello iniziale ($\sim 3,5$ ml). Il passaggio successivo è stata la conta delle cellule, effettuata su una riduzione di 1:10 della sospensione madre attraverso la camera di conta di Neubauer (figura 2.24 a). Essa è formata da due camere (superiore ed inferiore) ognuna delle quali è a sua volta composta da quattro camerette. La sospensione ridotta è stata inserita nella camera di Neubauer, in corrispondenza di entrambi gli ambienti, superiore ed inferiore, ed è stata visionata al microscopio. Come evidenziato in figura 2.24 b sono state contate le cellule presenti in ognuna delle quattro cellette, per entrambe le camere. Quindi, è stato calcolato un valore medio per ogni camera (superiore ed inferiore) e poi la loro ulteriore media, per ottenere un unico risultato che è stato in seguito moltiplicato per 10^4 . Questo valore è riferito al numero di cellule presenti nella sospensione ridotta, pertanto, per avere una misura relativa all'intera sospensione madre, tale risultato è stato moltiplicato ancora per 10, ricavando un valore finale pari a $(n^\circ \text{ cellule contate}) \cdot 10^4 \cdot 10$ n°cell/ml di soluzione.

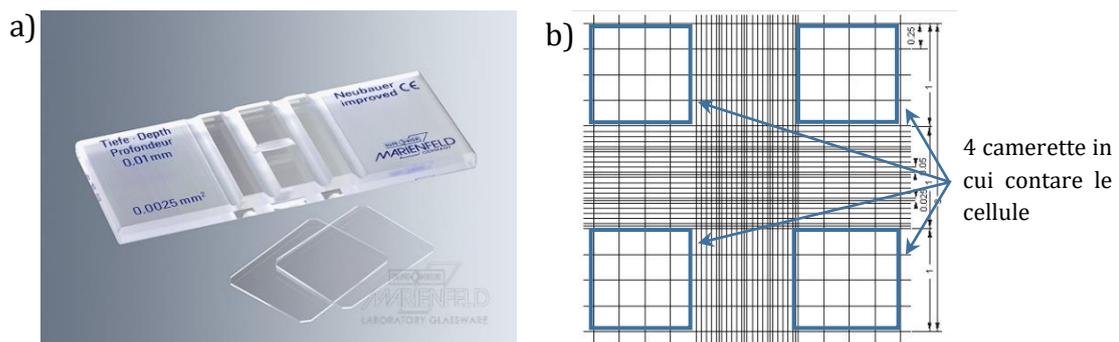


Figura 2.24 a) Camera di conta di Neubauer; b) Schematizzazione di una camera di conta al microscopio. Vengono contate solo le cellule presenti nelle quattro cellette evidenziate in blu.

Nel caso di una piastra con 48 pozzetti, in ogni pozzetto si coltivano 25000 cellule in circa 350 μ l di sospensione con DMEM. Infatti deve esserci abbastanza medium da permettere alle cellule di vivere e proliferare, ma non troppo da impedire lo scambio dei gas. Attraverso una proporzione è stata calcolata la quantità di soluzione madre da prelevare per avere in ogni pozzetto il numero di cellule desiderato.

La piastra *multiwell* è stata posta sotto cappa biologica e sterilizzata attraverso raggi ultravioletti per circa 30-60 minuti. Successivamente ogni pozzetto contenente il materiale da testare è stato riempito con la quantità precedentemente calcolata di sospensione cellulare. La sospensione è stata aggiunta anche in tre pozzetti vuoti per creare dei campioni di riferimento non trattati che identificano il 100% di vitalità cellulare. Nell'ultima colonna della piastra, come si nota in figura 2.23 a, si trova un ulteriore campione che è necessario per il *LIVE/DEAD* test, effettuato successivamente. Anche questo pozzetto è stato coltivato con le cellule e, anche in questo caso, è stato lasciato un campione non trattato inserendo la sospensione in un pozzetto direttamente a contatto con la plastica.

Il test di vitalità utilizzato in questo lavoro per effettuare le prove cellulari è definito saggio di vitalità con resazurina, che agisce da indicatore: se la cellula è viva la resazurina è capace di ridursi in soluzione trasformandosi in resorufina e cambiando colore da blu a rosa. L'analisi è stata eseguita seguendo lo stesso protocollo per entrambe le linee cellulari, dopo una coltura delle cellule sui substrati pari a 24 h, 48 h e 5 giorni. Passate le ore volute di incubazione delle cellule sulla piastra, il terreno di coltura è stato aspirato e sostituito con un medium contenente resazurina, che è anche stato aggiunto ad un pozzetto vuoto per generare un valore di riferimento. La piastra così preparata è stata incubata per 1h, in modo da far agire la resazurina ed effettuare l'esperimento in condizioni ottimali. Dopodiché la *multiwell* è stata posizionata nell'apposito vano del lettore di piastre *Multimode plate reader VICTOR X3* della *Perkin Elmer* (figura 2.25), utilizzato per svolgere l'analisi presso i laboratori di Alessandria del Politecnico di Torino. Tramite il software dedicato *Perkin Elmer 2030 Manager* sono stati evidenziati i pozzetti da esaminare ed è stato fatto partire l'esperimento. Esso prevede l'eccitazione a 530 nm della resazurina presente in coltura, con la misurazione dell'emissione a 590 nm. Il segnale corrisponde alla quantità di resazurina ridotta, che è proporzionale al numero di cellule ancora vitali. Una volta concluso il test, il software genera un file Excel esportabile, che è stato in seguito elaborato per estrapolare i dati di vitalità cellulare. Il valore corrispondente al pozzetto contenente la resazurina senza alcun campione rappresenta il cosiddetto bianco, cioè il rumore di fondo dato dalla sola soluzione di resazurina, che è stato sottratto a tutta la piastra in modo tale da avere solo i dati relativi alle cellule, caratterizzati da media e deviazione standard.



Figura 2.25 *Dispositivo Multimode plate reader VICTOR X3 della Perkin Elmer, con particolare della zona di posizionamento della piastra nell'ovale a destra.*

Un ulteriore esame di vitalità effettuato è il *LIVE/DEAD* test, che permette di discriminare visivamente le cellule vive e quelle morenti, o già morte, tramite immagini a fluorescenza del campione. Per evidenziare le cellule vive e morte (*Live/Dead*) sono stati utilizzati due diversi coloranti: calceina (L) ed etidio (D). La calceina si lega alle cellule vive e le colora di verde; mentre l'etidio interagisce con il DNA delle cellule che non presentano più integrità cellulare e ne colora di rosso il nucleo.

Capitolo 3

Risultati e commenti

3.1 Membrane composite elettrofilate

Le soluzioni polimeriche composite a base di gelatina contenenti diverse concentrazioni di nanoparticelle di titanato di bario (BTNP), stabilizzate e non stabilizzate dalla gomma arabica (GA), sono state preparate secondo i protocolli descritti nei paragrafi 2.2.1.3 e 2.2.1.4. Tali soluzioni sono state successivamente processate mediante *electrospinning* (paragrafo 2.2.2.1.1), ottenendo membrane composite nanofibrose.

Come già espresso nel paragrafo 2.1.3, all'interno delle membrane nanofibrose, le BTNP si presentano distribuite in modo disomogeneo, spesso raggruppate tra loro a formare agglomerati anche di grandi dimensioni. Per cercare di limitare questi inconvenienti, è stata usata la gomma arabica come stabilizzante delle nanoparticelle in soluzione, in quantità adeguata a garantire comunque la formazione di membrane morfologicamente uniformi e prive di difetti. È stata quindi necessaria una fase di ottimizzazione dei parametri; in particolare, nella prima fase è stato variato il rapporto tra BTNP e gomma arabica in soluzione (testando un rapporto 1:1 e 1:2). In entrambi i casi, sono state processate membrane con diverse concentrazioni di BTNP, pari a 30, 100, 150 e 200 mg/ml, con l'obiettivo di incorporare all'interno delle fibre la maggiore dose possibile di agente piezoelettrico.

Dopo aver selezionato il quantitativo di gomma arabica ottimale, le fibre composite elettrofilate sono state sottoposte a prove di degradazione e caratterizzate dal punto di vista morfologico, chimico-fisico, termico e meccanico per valutare come la presenza delle nanoparticelle ceramiche influenzi il materiale. Inoltre, per esaminare la cito tossicità delle fibre ed il comportamento cellulare, esse sono state impiegate come substrati per la coltura di fibroblasti e cellule SaOS-2.

3.2 Ottimizzazione del protocollo di realizzazione delle nanofibre

Le membrane composite GL/BTNP con concentrazioni pari a 30, 100 e 200 mg/ml di nanoparticelle (codificate come GL/BTNP 30, GL/BTNP 100 e GL/BTNP 200) sono state ottenute eseguendo i passaggi descritti nei paragrafi 2.2.1.2 e 2.2.2.1 e sono state successivamente caratterizzate morfologicamente attraverso il SEM, ottenendo le immagini riportate in figura 3.1.

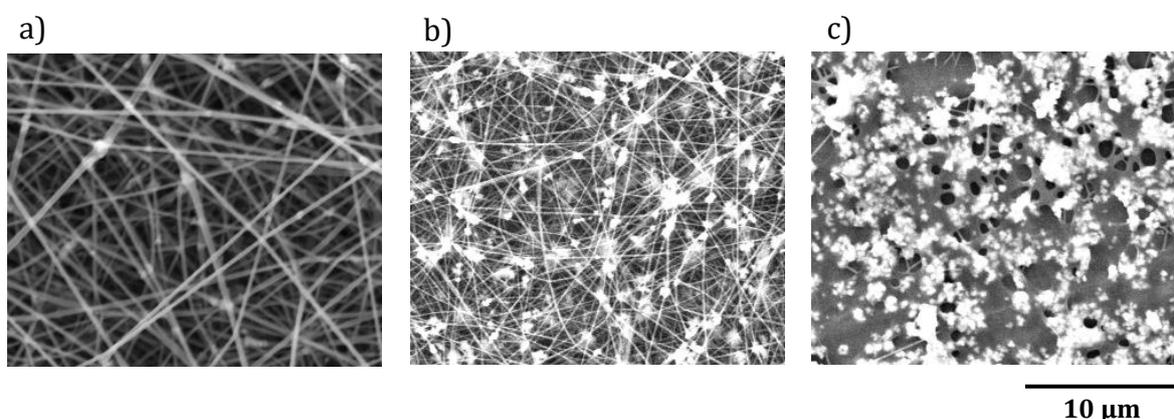


Figura 3.1 Immagini al SEM ad ingrandimento di 2000x delle membrane composite: a) GL/BTNP 30; b) GL/BTNP 100; c) GL/BTNP 200.

La soluzione polimerica ottenuta nel caso GL/BTNP 30 è stata elettrofilata senza difficoltà e ha permesso di fabbricare le membrane di figura 3.1. a. Le fibre disposte in conformazione *random* risultano omogenee, prive di difetti ed effettivamente caricate con le nanoparticelle, che si ritrovano sparse nell'intera struttura sotto forma di aggregati. Durante la fabbricazione delle membrane caricate con 100 mg/ml di BTNP, invece, è stata riscontrata maggiore difficoltà nello spinnare la soluzione polimerica. Nonostante ciò, è stato possibile ottenere una membrana nanofibrosa con fibre omogenee disposte casualmente e contenenti le nanoparticelle piezoelettriche sotto forma di aggregati, come si può notare in figura 3.1 b.

Visivamente, dal confronto delle immagini 3.1 a e 3.1 b, è possibile riscontrare la presenza di BTNP in entrambe le membrane, seppure risulti evidente una quantità nettamente maggiore di nanoparticelle nel caso GL/BTNP 100 rispetto alla GL/BTNP 30.

La soluzione polimerica contenente 200 mg/ml di BTNP, invece, si è dimostrata altamente viscosa e, per tale motivo, è stato complicato il processamento delle fibre. A

dimostrazione di ciò, la figura 3.1 c mostra una struttura fibrosa sottostante coperta, quasi del tutto, da un compatto strato superficiale formato da polimero ed agglomerati di nanoparticelle. Risulta, quindi, evidente che non è stato possibile ottenere la membrana composita desiderata.

Per raggiungere l'obiettivo prefissato e quindi fabbricare delle membrane polimeriche nanofibrose anche per elevate concentrazioni di BTNP, è stata introdotta la gomma arabica come stabilizzante delle nanoparticelle.

3.2.1 Ottimizzazione della quantità di gomma arabica

Il quantitativo ottimale di gomma arabica da aggiungere in soluzione è stato valutato attraverso l'analisi delle immagini SEM delle membrane processate a partire dalle dispersioni delle nanoparticelle descritte nel paragrafo 2.2.1.4, in cui la GA è stata dispersa in rapporto 1:1 e 2:1 rispetto alle BTNP. Sono state preparate soluzioni polimeriche con concentrazioni di BTNP crescenti, al fine di valutare non solo l'andamento della distribuzione delle nanoparticelle e della dimensione degli eventuali agglomerati all'interno delle fibre, ma anche la massima concentrazione di agente piezoelettrico che è possibile disperdere, continuando ad ottenere una soluzione processabile attraverso *electrospinning*. La scelta, quindi, è stata effettuata tenendo conto della processabilità della soluzione, della morfologia finale delle fibre ottenute, che devono essere uniformi e prive di difetti, e della distribuzione delle nanoparticelle piezoelettriche all'interno della membrana.

In figura 3.2 sono mostrate le immagini al SEM delle membrane composite realizzate con gomma arabica in rapporto 1:1 e 2:1 (codici identificativi delle membrane rispettivamente BTNP:GA 1:1 e BTNP:GA 1:2) contenenti 30, 100 e 150 mg/ml di BTNP, esaminate per effettuare la scelta del parametro.

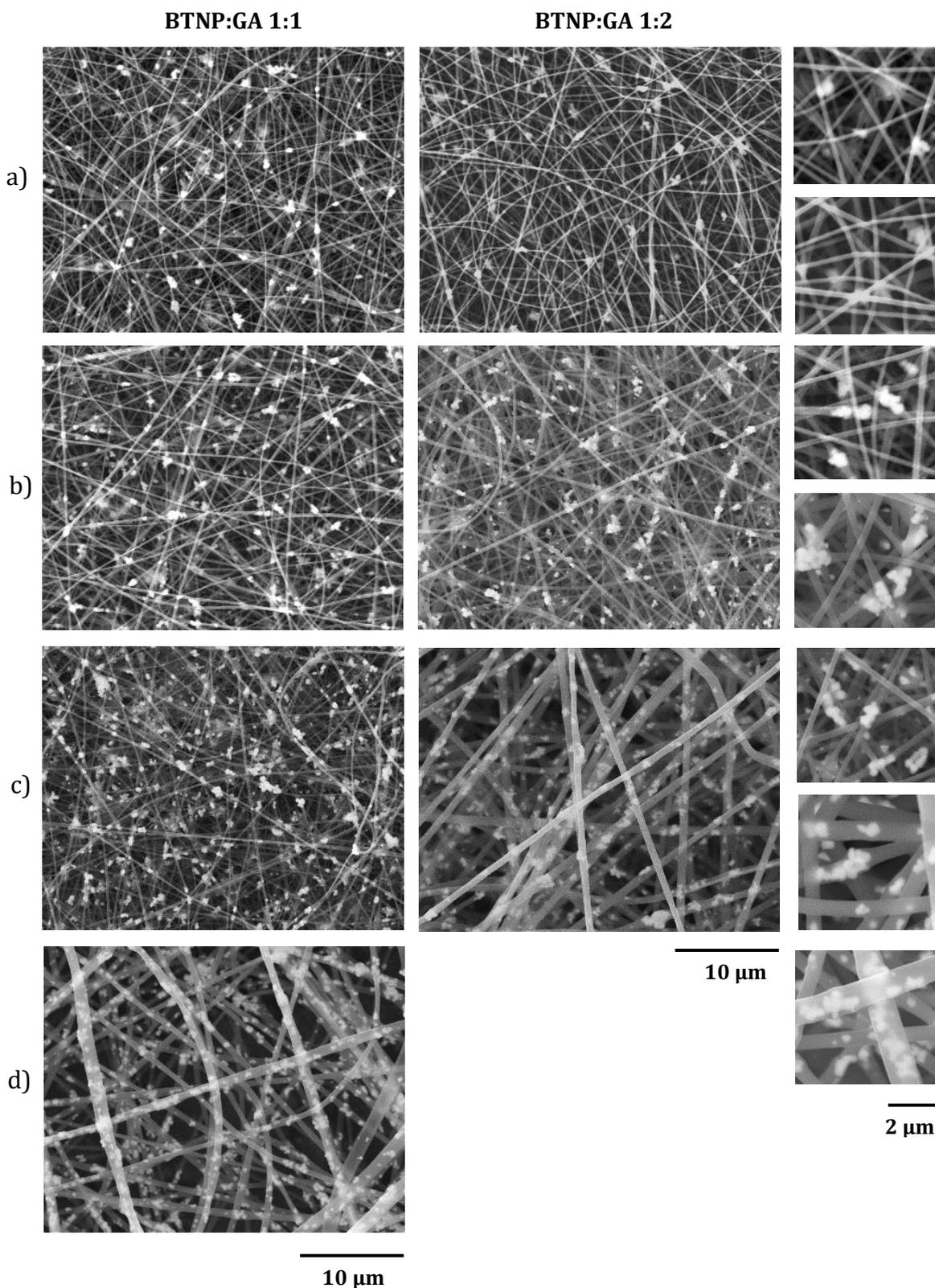


Figura 3.2 Immagini al SEM delle membrane polimeriche composite caricate con concentrazioni di BTNP di a) 30 mg/ml; b) 100 mg/ml; c) 150 mg/ml; d) 200 mg/ml. Le immagini a sinistra e in centro sono ad ingrandimenti di 2000x e rappresentano rispettivamente membrane con BTNP:GA 1:1 e BTNP:GA 1:2. A destra, in alto e in basso, sono riportati più in piccolo i particolari (5000x) degli aggregati delle nanoparticelle relativi ai rapporti 1:1 e 1:2.

Si nota come la presenza della gomma arabica non influenzi la morfologia delle membrane polimeriche, che si presentano, in entrambi i casi, con fibre omogenee e prive di difetti orientate casualmente. Dall'analisi delle immagini (figura 3.3) è possibile notare come le fibre polimeriche caricate con una maggior quantità di BTNP presentino un diametro medio maggiore.

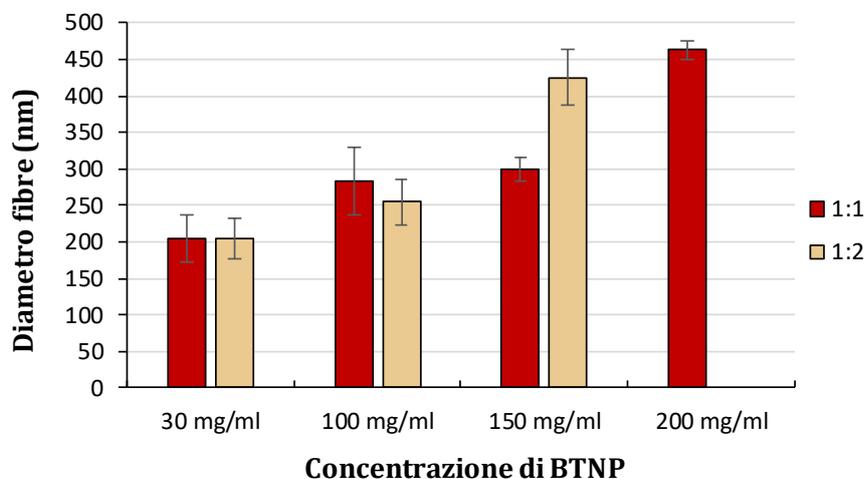


Figura 3.3 *Diametro medio delle fibre polimeriche al variare della concentrazione di nanoparticelle di titanato di bario, per i due protocolli seguiti per ottimizzare la quantità di gomma arabica.*

Nel caso delle fibre BTNP:GA 1:2 con concentrazione iniziale in soluzione di BTNP elevata (≥ 150 mg/ml), è stata riscontrata una particolare difficoltà nel processare le fibre; questa potrebbe essere attribuita all'elevata viscosità della soluzione e per tale ragione non è stato possibile effettuare immagini al SEM per 200 mg/ml di BTNP. Una concentrazione di gomma arabica pari a quella delle nanoparticelle (BTNP:GA 1:1), invece, ha permesso di processare soluzioni polimeriche con concentrazione molto elevata di BTNP, fino a 200 mg/ml, ottenendo membrane con struttura nanofibrosa. Tale concentrazione risulta essere la massima quantità di BTNP che è possibile disperdere in soluzione.

I risultati hanno quindi portato a scegliere il rapporto BTNP:GA pari a 1:1, per la migliore processabilità della soluzione polimerica.

Sebbene siano state valutate svariate concentrazioni di nanoparticelle di titanato di bario per ottimizzare il parametro relativo alla quantità di gomma arabica, le successive caratterizzazioni delle membrane composite sono state eseguite solo per concentrazioni pari a 30, 100 e 200 mg/ml.

L'effettiva diminuzione nella dimensione degli aggregati di nanoparticelle a seguito dell'aggiunta della gomma arabica, è stata valutata confrontando le misure medie degli aggregati (calcolate come descritto al paragrafo 2.2.3.1.1.1) per le membrane elettrofilate senza e con la GA. Dato che la membrana GL/BTNP 200 non mostra una struttura nanofibrosa (figura 3.1 c), il confronto è stato effettuato tra nanofibre con 30 e 100 mg/ml di BTNP.

I valori medi degli aggregati sono riportati in tabella 3.1 e in figura 3.4.

<i>Dimensione aggregati (nm)</i>	30 mg/ml	100 mg/ml
Senza GA	620±52	1141±50
Con GA	537±17	473±45

Tabella 3.1 Dimensione degli aggregati presenti nelle membrane polimeriche composite senza e con gomma arabica per concentrazioni di BTNP pari a 30 e 100 mg/ml.

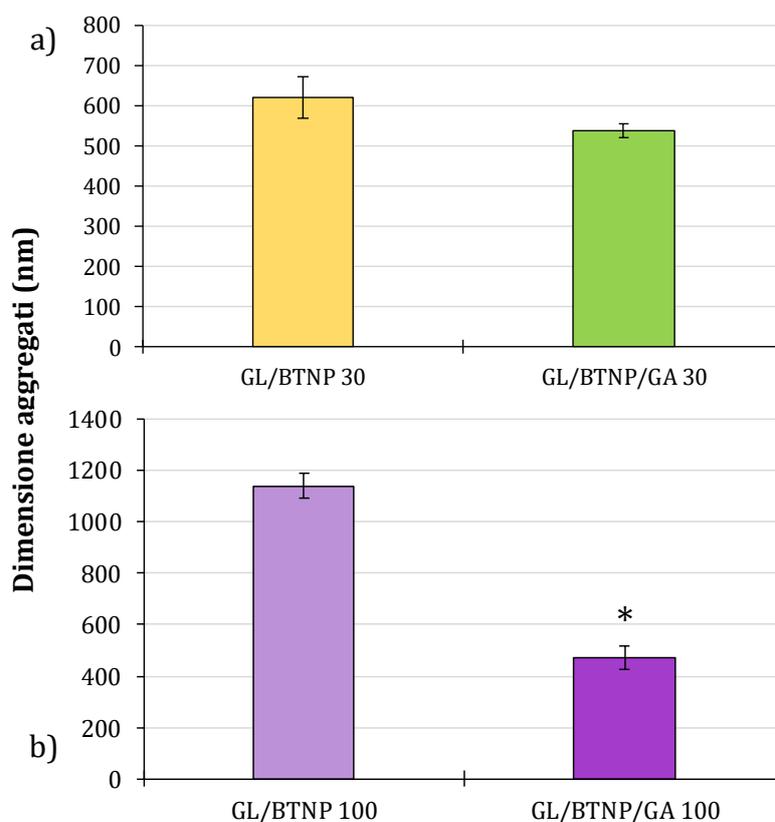


Figura 3.4 Confronto della dimensione media degli aggregati per le membrane composite esaminate senza e con la gomma arabica: a) 30 mg/ml di BTNP; b) 100 mg/ml di BTNP. * $p < 0.05$ statisticamente significativo.

I risultati ottenuti dimostrano che effettivamente l'aggiunta della gomma arabica contribuisce a diminuire la dimensione degli aggregati di nanoparticelle che si formano all'interno delle membrane polimeriche. In particolare, per basse concentrazioni di BTNP si riscontra una diminuzione da 620 a 473 nm, mentre nel caso di concentrazione elevata (100 mg/ml) si verifica un decremento più spiccato e statisticamente significativo da 1141 a 473 nm.

L'impiego della gomma arabica, quindi, ha permesso di realizzare membrane nanofibrose composite altamente caricate con nanoparticelle di titanato di bario, diminuendone anche la dimensione degli aggregati.

3.3 Caratterizzazione morfologica delle membrane

3.3.1 Microscopia SEM

La morfologia delle membrane polimeriche ottenute è stata valutata attraverso le immagini SEM. Le membrane in sola gelatina sono state esaminate ed utilizzate come controllo, in modo da comprendere l'effetto che la gomma arabica e le nanoparticelle di titanato di bario producono sulle membrane composite.

In figura 3.5 sono riportate le immagini SEM delle fibre in gelatina (GL), che si presentano uniformi, senza alcun difetto superficiale ed orientate casualmente a formare una matrice tridimensionale nanofibrosa omogenea.

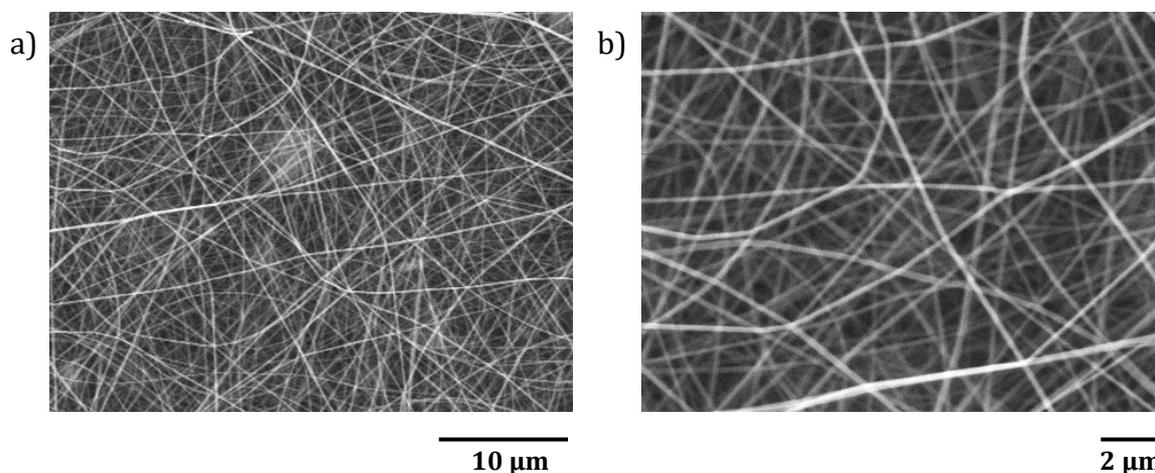


Figura 3.5 Immagini al SEM delle membrane in GL: a) Ingrandimento 2000x; b) Ingrandimento 5000x.

Le immagini SEM delle membrane polimeriche in gelatina e gomma arabica (GL/GA), in figura 3.6, mostrano fibre omogenee e senza difetti, come nel caso della sola gelatina, con un diametro apparentemente paragonabile. La gomma arabica, dunque, non sembra influenzare la morfologia delle fibre polimeriche e la loro processabilità.

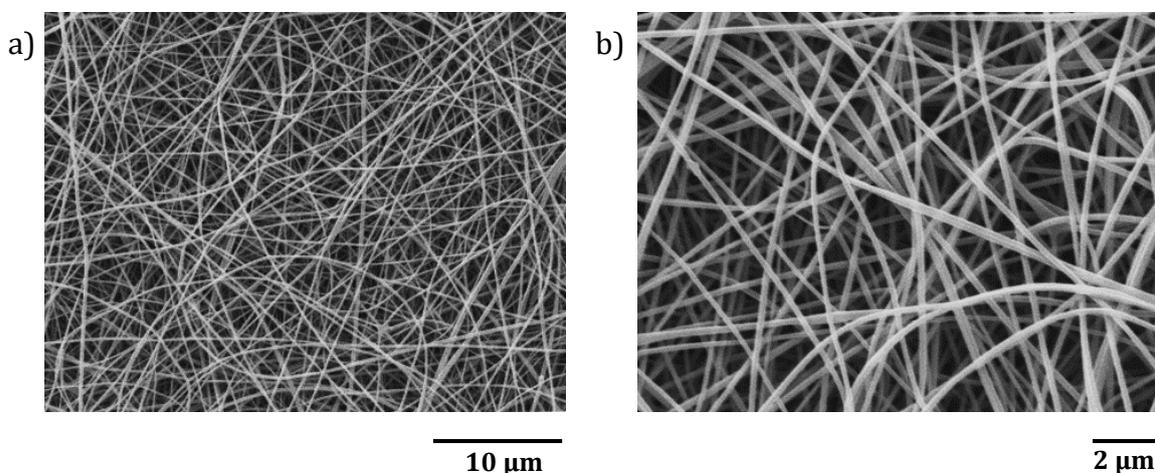


Figura 3.6 Immagini al SEM delle membrane in GL/GA: a) Ingrandimento 2000x; b) Ingrandimento 5000x.

Le membrane polimeriche composite caricate con 30, 100 e 200 mg/ml di nanoparticelle di titanato di bario stabilizzate da altrettanta concentrazione di gomma arabica, come da ottimizzazione, sono rappresentate nella figura 3.7.

Le membrane composite saranno denominate con i codici GL/BTNP/GA 30, GL/BTNP/GA 100 e GL/BTNP/GA 200.

Le immagini mostrano in tutti e tre i casi delle matrici polimeriche in conformazione *random*, caratterizzate da porosità interconnessa di dimensione variabile e fibre omogenee senza difetti di superficie. La presenza delle nanoparticelle, quindi, permette di ottenere membrane nanofibrose con una buona morfologia fino ad una concentrazione di 200 mg/ml.

Come già espresso precedentemente, le nanoparticelle si presentano all'interno della membrana in forma di aggregati, ma nonostante questo si nota come esse si distribuiscano in modo abbastanza omogeneo su tutta la superficie. Infatti, è possibile notare visivamente la presenza di un maggior numero di nanoparticelle all'interno della membrana, all'aumentare della loro concentrazione. In alcuni casi, come ad esempio nelle immagini 3.7 b e 3.7 f, sembra che le nanoparticelle vengano inglobate all'interno delle fibre.

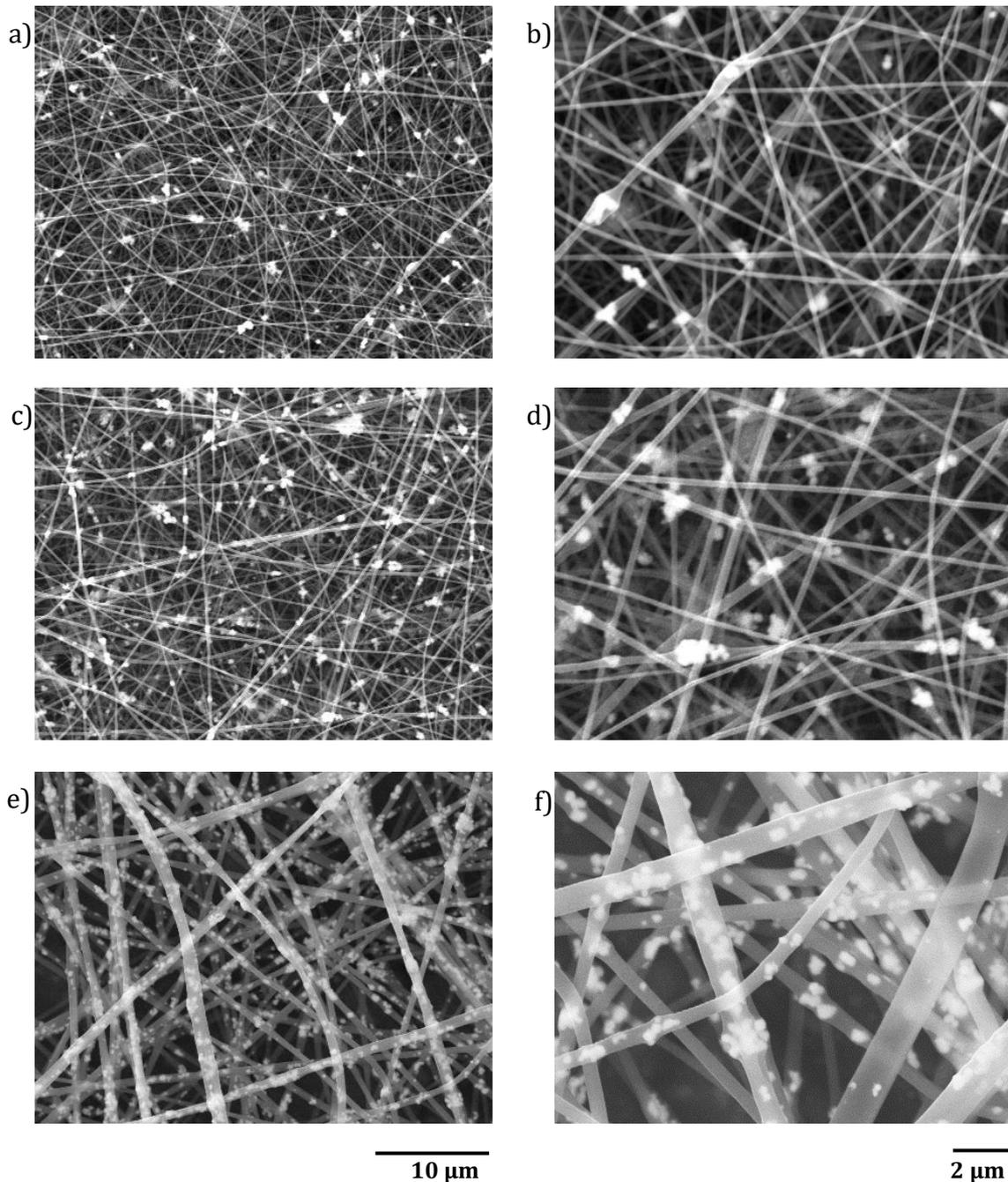


Figura 3.7 Immagini al SEM delle membrane composite GL/BTNP/GA 30: a) 2000x, b) 5000x; GL/BTNP/GA 100: c) 2000x, d) 5000x; GL/BTNP/GA 200: e) 2000x, f) 5000x.

Dal confronto delle immagini SEM emerge anche che all'incremento della concentrazione di nanoparticelle di titanato di bario corrisponde una migliore distribuzione delle stesse all'interno della membrana. Nella matrice GL/BTNP/GA 200, infatti, le nanoparticelle non solo sono sparse omogeneamente in tutta la struttura, ma tendono anche a distribuirsi lungo la direzione delle fibre polimeriche (figure 3.7 e, 3.7 f).

L'analisi delle immagini mediante il software *Image J* ha permesso di ottenere informazioni quantitative sulle membrane quali la distribuzione dei diametri, il valore di diametro medio e la dimensione media dei pori e degli aggregati di nanoparticelle. In tabella 3.2 sono riportati i valori medi dei diametri e dei pori per le diverse membrane esaminate.

	GL	GL/GA	GL/BTNP/GA 30 mg/ml	GL/BTNP/GA 100 mg/ml	GL/BTNP/GA 200 mg/ml
<i>Diametro fibre (nm)</i>	179±19	194±20	205±32	284±46	463±13
<i>Diametro pori (nm)</i>	585±348	473±247	984±281	1108±312	1139±343

Tabella 3.2 Dimensione delle fibre e dei pori delle membrane polimeriche in GL, GL/GA e composite GL/BTNP/GA.

La distribuzione dei diametri, invece, è riportata tramite istogrammi nella figura 3.8. È possibile evidenziare una distribuzione abbastanza omogenea delle fibre, per tutte le membrane, che si avvicina all'andamento gaussiano ideale che contraddistingue una distribuzione omogenea.

Le dimensioni delle fibre nelle membrane polimeriche variano tra 84 e 763 nm. In particolare, le membrane di controllo in GL e GL/GA hanno lo stesso *range* di dimensione dei diametri e per entrambe la maggior parte delle fibre si trova tra 150 e 200 nm. Quindi, per quanto vi sia un aumento nel valor medio dei diametri per la membrana GL/GA rispetto alla sola gelatina, emerge dalle distribuzioni che la presenza della gomma arabica altera di poco la morfologia. Anche nel caso della membrana composita caricata con 30 mg/ml di BTNP la maggior parte delle fibre ha una dimensione di 150-200 nm, seppure il *range* sia più ampio. Si nota, infatti, come il *range* di dimensione delle fibre polimeriche si estenda all'aumentare della concentrazione di nanoparticelle, passando da 100-300 nm nel caso di 30 mg/ml a 100-400 nm per la membrana GL/BTNP/GA 100, fino ad arrivare ad una dimensione compresa tra 250 e 800 nm nel caso maggiormente caricato. Un *range* di diametri maggiore potrebbe far pensare ad una maggiore eterogeneità nella dimensione dei diametri delle fibre, che tuttavia presentano nel complesso una distribuzione abbastanza omogenea.

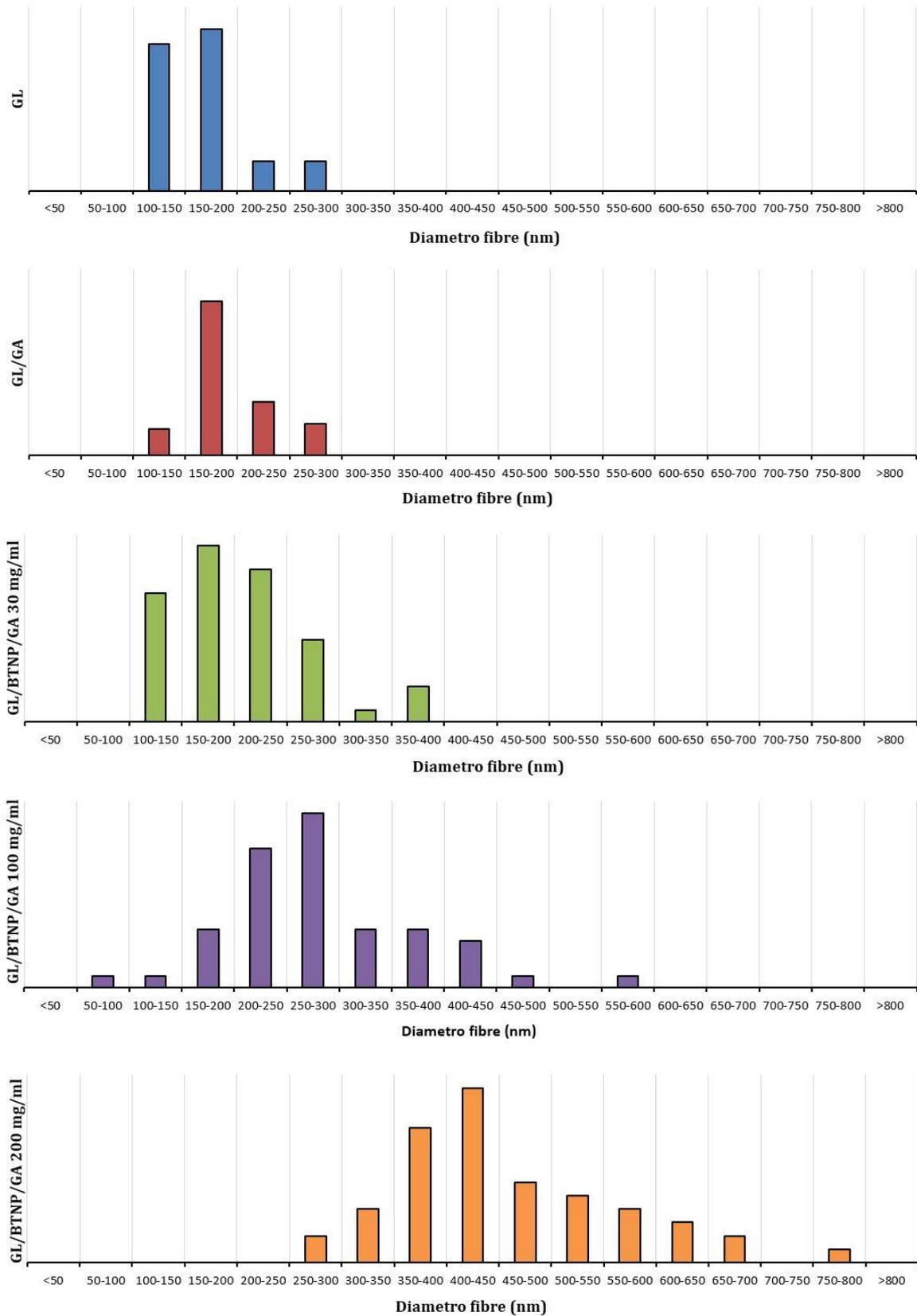


Figura 3.8 *Distribuzione dei diametri delle fibre per le diverse tipologie di membrane.*

I dati presenti in tabella 3.2 mostrano come la dimensione delle fibre polimeriche sia influenzata dalla presenza delle nanoparticelle. Infatti, rispetto al controllo, l'aggiunta delle BTNP comporta un aumento nel diametro medio delle fibre, che incrementa ulteriormente all'aumentare della concentrazione dell'agente piezoelettrico. Tale andamento può trovare una giustificazione nel fatto che un incremento nella quantità di nanoparticelle disperse in soluzione determina una maggiore viscosità della soluzione polimerica, che porta a sua volta ad aumentare la dimensione delle fibre all'interno della membrana [75]. Eppure, alcuni lavori presenti in letteratura mostrano come la dispersione delle BTNP in una matrice polimerica comporti una diminuzione della dimensione delle fibre polimeriche [44][80]. L'utilizzo di polveri di BTNP con diametro minore (~ 100 nm) rispetto a quelle usate in questa attività, e di polimeri sintetici, che morfologicamente presentano fibre più grandi rispetto alla gelatina, potrebbero giustificare il diverso risultato ottenuto.

I valori dei diametri medi indicano che l'aumento della dimensione delle fibre non è molto pronunciato, se non nel caso della membrana caricata con 200 mg/ml di nanoparticelle, che vede un incremento di quasi 200 nm rispetto alla struttura con 100 mg/ml. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che morfologicamente la membrana maggiormente caricata presenta le nanoparticelle distribuite uniformemente sull'intera lunghezza delle fibre e non localizzate in piccole regioni sotto forma di aggregati di grandi dimensioni. L'aumento del diametro, quindi, non sarebbe legato alla sola regione occupata dall'aggregato, ma dipenderebbe dall'intera fibra che risulta di dimensioni maggiori per la presenza delle nanoparticelle.

In tabella 3.2 sono anche evidenziate le dimensioni medie dei pori delle membrane, che hanno un andamento simile a quello dei diametri delle fibre. Infatti, anche in questo caso le membrane composite presentano pori di dimensioni maggiori rispetto alla matrice in sola gelatina, che aumentano proporzionalmente con l'incremento delle BTNP. Si deduce, quindi, come le membrane composite presentino una porosità interconnessa maggiore rispetto alla membrana di controllo.

Infine, in tabella 3.3 e in figura 3.9 sono riportate le dimensioni medie degli aggregati di nanoparticelle calcolati tramite il software *Image J* per le membrane composite caricate con 30, 100 e 200 mg/ml di BTNP. I valori ottenuti dimostrano come l'incremento delle nanoparticelle all'interno della membrana comporti una

diminuzione nella dimensione degli aggregati, che risulta statisticamente significativa nel caso della membrana maggiormente caricata rispetto a GL/BTNP/GA 30.

	GL/BTNP/GA 30 mg/ml	GL/BTNP/GA 100 mg/ml	GL/BTNP/GA 200 mg/ml
Dimensione aggregati (nm)	537±17	473±45	444±8

Tabella 3.3 Dimensione degli aggregati di BTNP presenti nelle membrane polimeriche composite caricate con 30, 100 e 200 mg/ml di nanoparticelle.

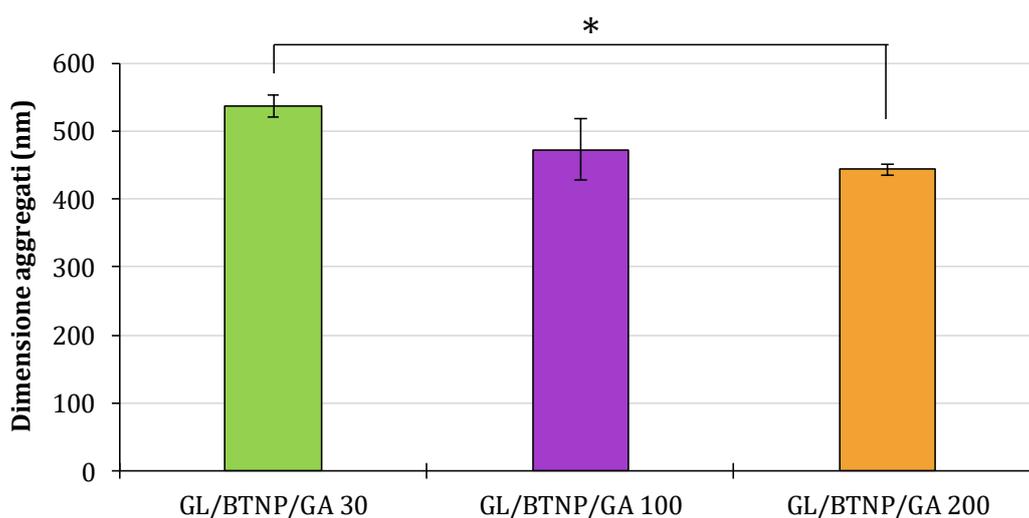


Figura 3.9 Confronto tra gli aggregati di nanoparticelle calcolati per le tre membrane composite GL/BTNP/GA esaminate. * $p < 0.05$ statisticamente significativo.

3.4 Caratterizzazione chimico-fisica

3.4.1 Spettroscopia EDX

La presenza delle nanoparticelle piezoelettriche di titanato di bario all'interno delle membrane composite è stata confermata attraverso la spettroscopia EDX. Essa, infatti, ha permesso di valutare gli elementi chimici presenti nel materiale.

Lo spettro EDX relativo alla membrana di controllo e a quelle caricate con 100 e 200 mg/ml di nanoparticelle di titanato di bario è riportato in figura 3.10, mentre nelle tabelle 3.4 e 3.5 sono esposti i valori percentuali degli elementi che compongono il campione.

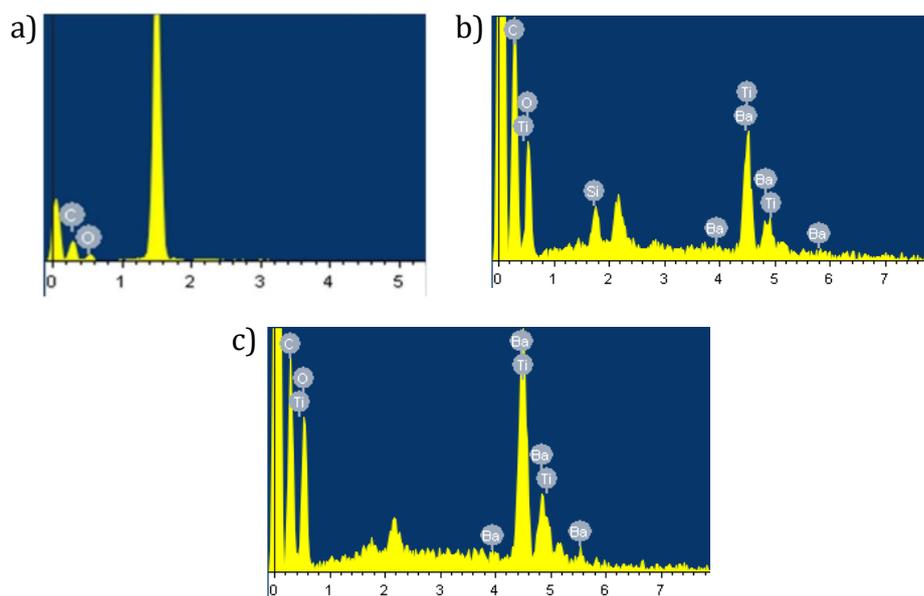


Figura 3.10 a) Spettro EDX della membrana in GL; b) Spettro EDX della membrana composita GL/BTNP/GA 100; c) Spettro EDX della membrana composita GL/BTNP/GA 200.

Elementi	% peso		
	GL	GL/BTNP/GA 100	GL/BTNP/GA 200
<i>C</i>	57.94	45.00	31.84
<i>O</i>	42.06	32.46	31.32
<i>Ti</i>		6.83	9.80
<i>Ba</i>		13.87	24.04

Tabella 3.4 Percentuale in peso degli elementi presenti nelle membrane esaminate.

Elementi	% atomica		
	GL	GL/BTNP/GA 100	GL/BTNP/GA 200
<i>C</i>	64.73	61.57	52.91
<i>O</i>	35.27	33.35	39.07
<i>Ti</i>		2.34	4.08
<i>Ba</i>		1.66	3.93

Tabella 3.5 Elementi presenti nelle membrane esaminate in percentuale atomica.

Dalla figura 3.10 si nota come i picchi relativi al carbonio (C) e all'ossigeno (O), identificativi della gelatina, siano presenti sia nello spettro della membrana in GL (3.10 a) che in quello delle membrane composite (3.10 b, 3.10 c).

La presenza delle nanoparticelle di titanato di bario, invece, è rilevata dai picchi del bario (Ba) e del titanio (Ti), presenti esclusivamente negli spettri di figura 3.10 b e 3.10 c relativi alle membrane caricate. I valori in tabella 3.4 e 3.5 confermano un maggior contenuto di nanoparticelle nel campione GL/BTNP/GA 200 rispetto al composito GL/BTNP/GA 100.

3.4.2 Spettroscopia FTIR-ATR

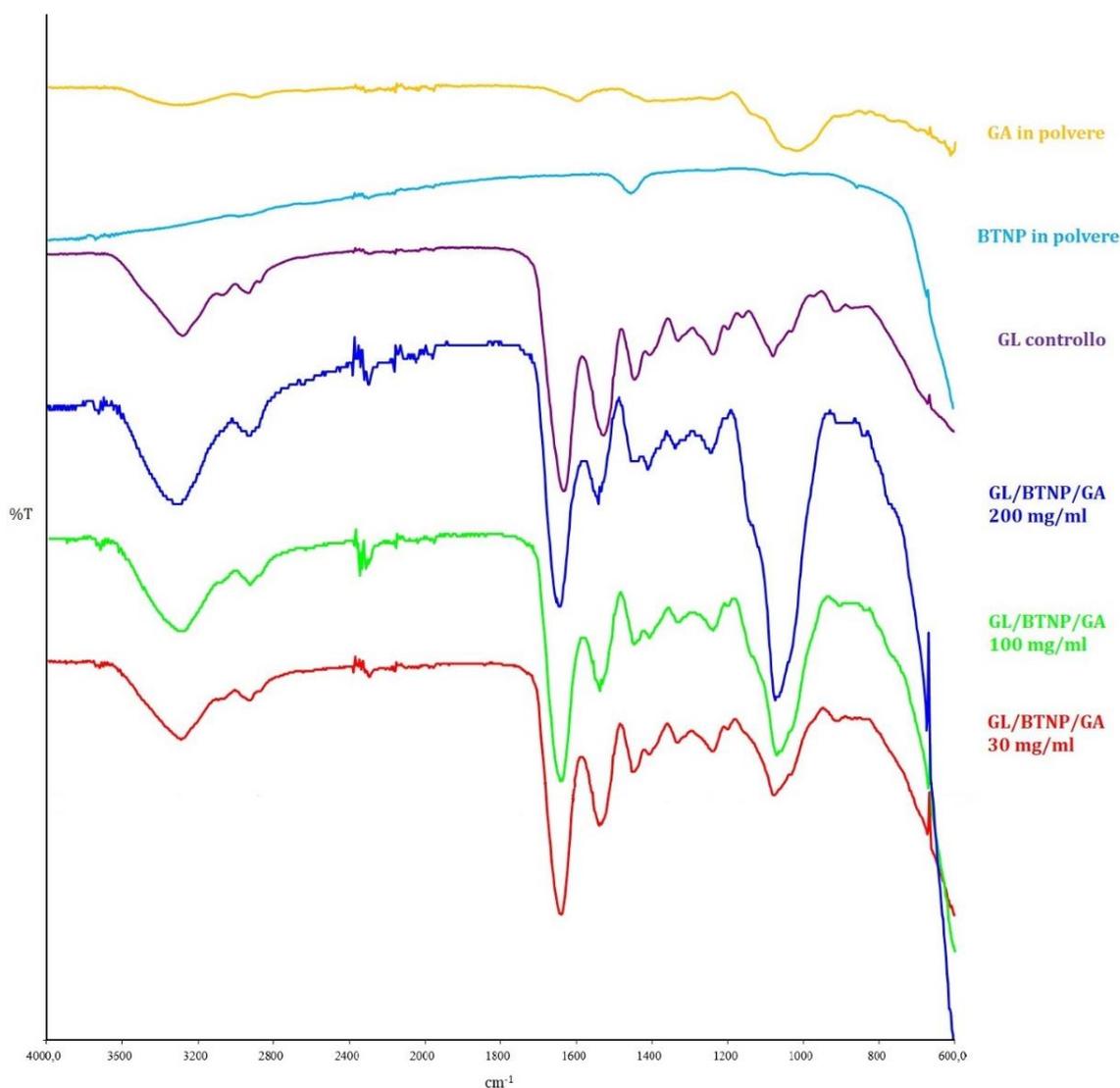


Figura 3.11 Spettro FTIR-ATR delle membrane e delle polveri, rappresentato in trasmittanza.

Un'ulteriore tecnica di analisi eseguita sulle membrane per valutare la presenza delle nanoparticelle di titanato di bario è la spettroscopia FTIR-ATR.

Ogni tipologia di membrana: GL, GL/GA e GL/BTNP/GA alle diverse concentrazioni e le polveri di gomma arabica e titanato di bario sono state sottoposte a tale esame.

In figura 3.11 sono riportati gli spettri di assorbimento dei campioni.

Nello spettro della gelatina di controllo (viola) sono presenti i picchi caratteristici che identificano la vibrazione dei legami delle ammidi I, II e III. In particolare, lo *stretching* del legame carbonile (C=O) per l'ammide I (1645 cm^{-1}), il *bending* del legame N-H nell'ammide II (1530.01 cm^{-1}) e lo *stretching* del legame C-N, accompagnato da un cambiamento planare dell'angolo di legame N-H, per la ammido III (1241.16 cm^{-1}) [94]. Inoltre, si rilevano picchi di assorbimento che confermano l'avvenuta reticolazione della gelatina ad opera del GPTMS: presenza dei legami covalenti Si-O-Si (picco 1082.19 cm^{-1} e successivo) e *stretching* del gruppo silanolo ($\sim 917\text{ cm}^{-1}$) [94].

L'analisi FTIR delle polveri ha portato ad avere spettri di assorbimento diversi rispetto a quelli riscontrati in letteratura, anche se è comunque possibile rilevare alcuni picchi caratteristici.

Lo spettro della gomma arabica (giallo) presenta bande di assorbimento più accentuate in corrispondenza di 1019.31 , 1599 e 3293 cm^{-1} , che rivelano rispettivamente lo *stretching* del legame C-OH [125][126], lo stiramento del legame C=O nell'ammide I [105] e contemporaneamente il *bending* del legame N-H [105][126] ed infine (sebbene si trovi a frequenze minori) lo stiramento del legame N-H [105][127] delle glicoproteine che, però, può essere coperto dal più ampio picco di assorbimento dato dallo *stretching* del legame OH presente nei polisaccaridi della gomma [105][125]. Nel *range* $2923\text{-}2942\text{ cm}^{-1}$ si dovrebbe ritrovare un picco di assorbimento relativo alla vibrazione del legame C-H del gruppo metilene ($-\text{CH}_2$), che nello spettro in figura 3.11 risulta poco evidente a 2924 cm^{-1} [105][125]. Anche il picco caratteristico legato allo *scissoring* del legame C-H [126] è poco rimarcato in corrispondenza di 1415 cm^{-1} .

Per quanto riguarda lo spettro FTIR della polvere di titanato di bario, riportato anch'esso in figura 3.11 in azzurro, si notano poche bande di assorbimento. Il picco principale che si riscontra a 1456 cm^{-1} potrebbe corrispondere alla vibrazione del gruppo CO_3 del carbonato di bario [128]. Invece, il piccolo picco visualizzato a circa

3700 cm^{-1} sembrerebbe essere legato ad una deformazione del gruppo ossidrilico nel legame Ba-OH, data dall'assorbimento del gruppo OH da parte del campione a causa di umidità [128][129][130]. La vibrazione di tale gruppo, laddove non si trattasse di rumore, potrebbe anche essere identificata dalla zona compresa tra circa 2000 e 2700 cm^{-1} [131]. La leggera banda visualizzabile a circa 1000 cm^{-1} potrebbe, invece, corrispondere ad uno *stretching* del legame Ti-O [132][131].

Il BaTiO₃ presenta due picchi di assorbimento nell'area relativa all'impronta digitale, compresi tra 430 e 563 cm^{-1} , che corrispondono rispettivamente al *bending* e allo stiramento del legame Ti-O [129][130] e che identificano la conformazione tetragonale del materiale ceramico [130]. Tuttavia, non è stato possibile rilevare tali bande in quanto lo strumento utilizzato permette di visualizzare uno spettro in un *range* di 4000 - 600 cm^{-1} .

Le membrane composite (blu, verde, rosso) dato che sono a base di gelatina presentano gli stessi picchi principali del polimero, anche se alcuni di essi appaiono leggermente *shiftati* in funzione della concentrazione di nanoparticelle. La forza del legame potrebbe essere ridotta a causa dell'ossigeno in Ba⁺⁺ e del legame ammidico presente nel titanato di bario (BaTiO₃).

Tuttavia, esse non sembrano presentare alcun picco significativo che identifichi la presenza delle nanoparticelle di titanato di bario, probabilmente anche perché la stessa polvere presenta poche bande di assorbimento.

In tabella 3.6 sono riportati i valori dei picchi di assorbimento caratteristici per la membrana di controllo in gelatina (GL) e per le polveri di gomma arabica (GA) e titanato di bario (BaTiO₃).

Campione		Valore picco (cm ⁻¹)	Vibrazione legame
GL	<i>Ammide I</i>	1645	<i>Stretching C=O</i>
	<i>Ammide II</i>	1530	<i>Bending C-H</i>
	<i>Ammide III</i>	1241	<i>Stretching C-N</i>
	<i>Reticolazione con GPTMS</i>	1082	Legami Si-O-Si
917		<i>Stretching Si-OH</i>	
GA		1019	<i>Stretching C-OH</i>
		1599	<i>Stretching C=O</i>
			<i>Bending N-H</i>
		3293	<i>Stretching N-H</i>
			<i>Stretching O-H</i>
		2924	<i>Stretching C-H (CH₂)</i>
1415	<i>Scissoring C-H</i>		
BaTiO₃	<i>Presenti</i>	1456	CO ₃
		3700	Ba-O-H (umidità)
		2000-2700	O-H
		1000	<i>Stretching Ti-O</i>
	<i>Non presenti. Conformazione tetragonale</i>	430	<i>Bending Ti-O</i>
		563	<i>Stretching Ti-O</i>

Tabella 3.6 Picchi caratteristici dello spettro di assorbimento della membrana in GL.

3.5 Analisi termica: TGA

L'analisi termogravimetrica è stata eseguita sulle membrane di GL e GL/BTNP/GA 100 e GL/BTNP/GA 200 per valutare l'efficienza di caricamento delle BTNP all'interno delle membrane.

La curva termogravimetrica dei campioni è mostrata in figura 3.12.

Emerge dal grafico in figura 3.12 come il processo degradativo delle membrane composite sembri *shiftato* verso temperature di poco superiori a quella relativa alla membrana in sola gelatina. Infatti, nel momento in cui si trovano ad avere un peso pari all'86 % di quello iniziale, le membrane GL/BTNP/GA 100 e 200 presentano una temperatura di circa 303 °C e 305 °C rispettivamente, mentre il controllo in GL mostra una temperatura di circa 290 °C. Per quanto sia poca la differenza di

temperatura (13-15 °C), questo fatto potrebbe dimostrare una maggiore stabilità delle catene polimeriche contro il degrado termico, nel caso composito, proprio per via dell'interazione con il ceramico [133].

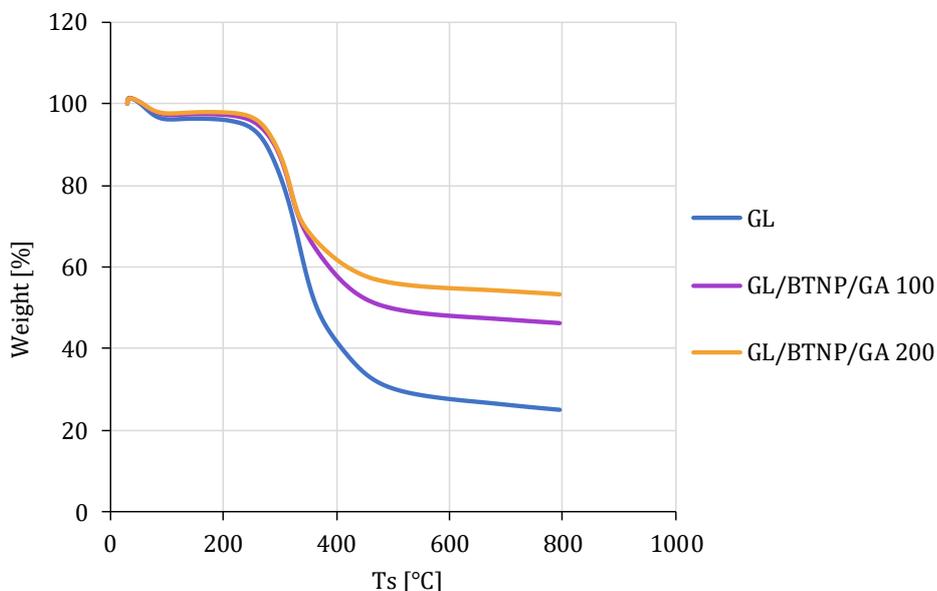


Figura 3.12 Curva termogravimetrica per le membrane nanofibrose in GL, GL/BTNP/GA 100 e GL/BTNP/GA 200.

Il peso percentuale finale raggiunto dopo la degradazione termica è 25.02 per la membrana in GL, 46.24 per GL/BTNP/GA 100 e 53.29 per la membrana composita GL/BTNP/GA 200. Come descritto nel paragrafo 2.2.3.3 è stato possibile ricavare i pesi assoluti finali delle tre membrane che risultano rispettivamente: 1.3736 mg, 2.9317 mg e 3.3310 mg.

A questo punto, attraverso il calcolo del residuo sono stati ricavati i dati relativi alle nanoparticelle per le due membrane composite che risultano pari a 1.55806 mg per GL/BTNP/GA 100 e a 1.95735 mg per la membrana caricata con 200 mg/ml di BTNP. Dai valori ottenuti emerge come effettivamente il contenuto di BTNP presente nella membrana GL/BTNP/GA 200 sia più elevato rispetto a quello in GL/BTNP/GA 100, come ci si aspettava, ma non del doppio come dovrebbe essere sulla base delle concentrazioni scelte. Tale risultato non sorprende eccessivamente essendo nota la tendenza delle nanoparticelle a precipitare in soluzione. Infatti, è possibile che parte delle BTNP disperse in soluzione siano precipitate durante la preparazione delle soluzioni stesse oppure nella siringa durante il processamento delle fibre, andando quindi a diminuirne il contenuto nella membrana elettrofilata ed esaminata.

3.6 Caratterizzazione meccanica: prova a trazione

Al fine di valutare come la presenza della gomma arabica e delle nanoparticelle ceramiche influenzi le proprietà meccaniche delle membrane polimeriche, sono state eseguite le prove di trazione su ogni tipologia di nanofibre, ottenendo informazioni sul modulo elastico (E) e ricavando le curve sforzo-deformazione (σ - ϵ).

I valori di modulo elastico ricavati sono riportati in figura 3.13.

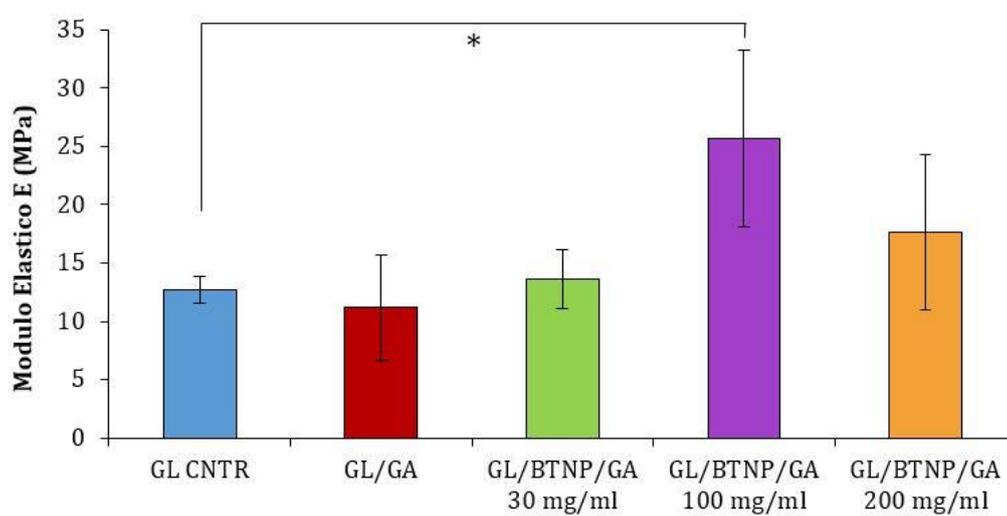


Figura 3.13 Modulo elastico medio per ogni tipologia di membrana nanofibrosa analizzata: GL, GL/GA, GL/BTNP/GA con 30, 100 e 200 mg/ml di nanoparticelle.

* $p < 0.05$ statisticamente significativo

La membrana caricata con 100 mg/ml di nanoparticelle presenta un modulo elastico statisticamente più elevato rispetto alla membrana di controllo in sola gelatina (* $p < 0.05$). Dato che le restanti variazioni di E non risultano statisticamente significative, è possibile affermare che il miglioramento della resistenza meccanica riscontrato nella membrana composita sia effettivamente causato dalla presenza delle nanoparticelle.

Un aumento nel modulo elastico in seguito all'incremento delle nanoparticelle piezoelettriche è stato riscontrato anche da Bagchi e colleghi, che hanno analizzato l'influenza delle BTNP sul comportamento di membrane in PCL [80]. Sono stati indagati anche film caricati con nanoparticelle di titanato di bario. In particolare, Genchi e collaboratori hanno caratterizzato film in P(VDFE-TrFE) riscontrando, anche in questo caso, un aumento del modulo elastico del materiale all'aumentare della quantità di nanoparticelle [45]. Al contrario, Mendes e colleghi hanno valutato una

diminuzione del modulo di Young nei film esaminati in PVDF, caricati con nanoparticelle di BaTiO₃ di dimensioni di circa 500 nm [133].

Per quanto non vi sia una differenza significativa nella diminuzione del modulo elastico della membrana composita maggiormente caricata rispetto a quella con 100 mg/ml di BTNP, il fenomeno potrebbe essere dovuto ad un infragilimento della struttura interna della membrana polimerica causato da un quantitativo troppo elevato di nanoparticelle di titanato di bario.

L'abbondanza di nanomateriale ceramico, inoltre, porta le membrane polimeriche composite a deformarsi di meno rispetto al controllo in sola gelatina, come è dimostrato dalle curve σ - ε di figura 3.14 e dall'andamento statisticamente significativo (* $p < 0.05$) delle deformazioni percentuali a rottura riportate in figura 3.15.

L'aggiunta delle BTNP alla membrana polimerica in gelatina comporta una maggiore fragilità del materiale, che vede statisticamente ridotta la propria deformazione a rottura, proporzionalmente all'incremento delle nanoparticelle (figura 3.15). Infatti, all'aumentare delle BTNP vi è una diminuzione statisticamente significativa della deformazione a rottura delle membrane composite. L'unico caso in cui si riscontra un comportamento paragonabile è quello tra le due membrane composite caricate con 100 e 200 mg/ml di nanoparticelle, in quanto la lieve differenza nella deformazione a rottura non risulta essere statisticamente significativa (** $p > 0.05$).

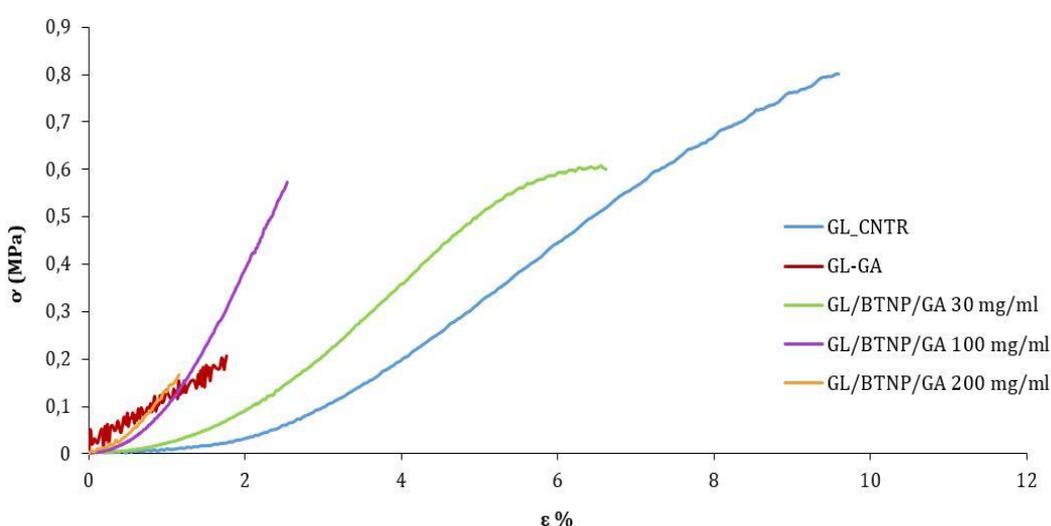


Figura 3.14 Curva sforzo-deformazione per ogni tipologia di membrana nanofibrosa analizzata: GL, GL/GA, GL/BTNP/GA con 30, 100 e 200 mg/ml di nanoparticelle.

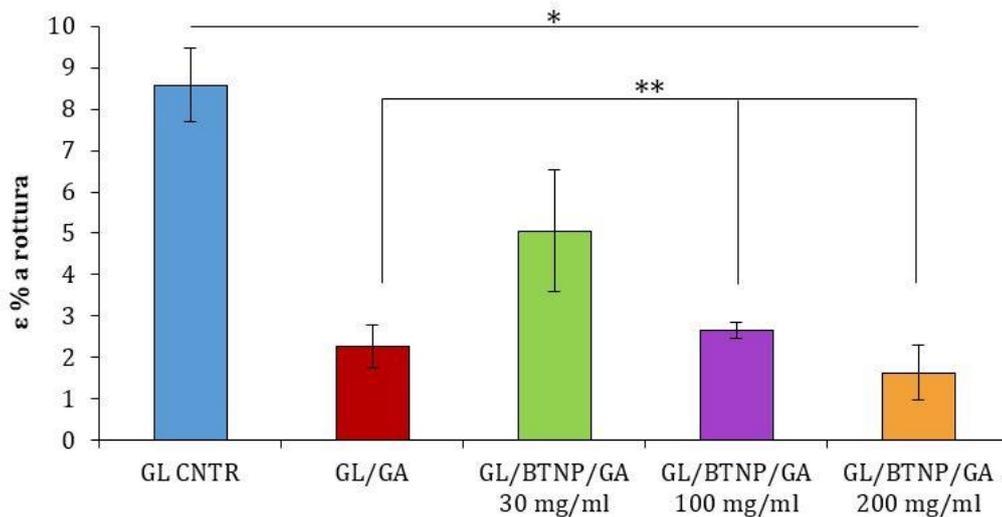


Figura 3.15 Deformazione percentuale media a rottura per ogni tipologia di membrana nanofibrosa analizzata: GL, GL/GA, GL/BTNP/GA con 30, 100 e 200 mg/ml di nanoparticelle. $p < 0.05$: * statisticamente significativo; $p > 0.05$: ** statisticamente non significativo.

3.7 Prove di degradazione

La stabilità delle membrane nanofibrose è stata esplorata tramite prove di degradazione in PBS a 37 °C a diversi *time-step* di incubazione. Dopo la liofilizzazione dei campioni è stato possibile eseguire su di essi la microscopia SEM, ottenendo le immagini riportate in figura 3.16.

Si nota immediatamente che non è presente l'immagine SEM della membrana GL/BTNP/GA 200. Infatti, come accennato nel paragrafo 2.2.3.5 il campione è stato completamente degradato e non è stato quindi possibile caratterizzarlo.

Dalle immagini di figura 3.16 emerge come le membrane inizino a degradare precocemente, mostrando un deterioramento consistente e veloce. In generale, si può dedurre come tale meccanismo sia costituito da un iniziale deterioramento a livello superficiale, seguito da una degradazione in *bulk*. All'inizio, infatti, pare avvenire una coalescenza delle fibre polimeriche, che tendono ad unirsi tra loro e ad appiattirsi. Successivamente, invece, si riscontra un deterioramento del materiale non più solo localizzato sulla superficie, che comporta una vera e propria perdita della morfologia. Questo processo non sembra coinvolgere la membrana composita GL/BTNP/GA 100, che perde la propria morfologia fibrosa già a partire dal primo *time-step* con la formazione di uno strato compatto di nanoparticelle sulla superficie (figura 3.16 c).

Tale comportamento potrebbe essere causato proprio dalla presenza di un'elevata quantità di BTNP, se non fosse per il miglioramento mostrato invece dalla membrana maggiormente caricata (figura 3.16 d) nei due *time-step* esaminati. Il problema, quindi, è probabilmente legato alla stabilità in ambiente acquoso del materiale, magari poco reticolato, piuttosto che alla presenza del ceramico.

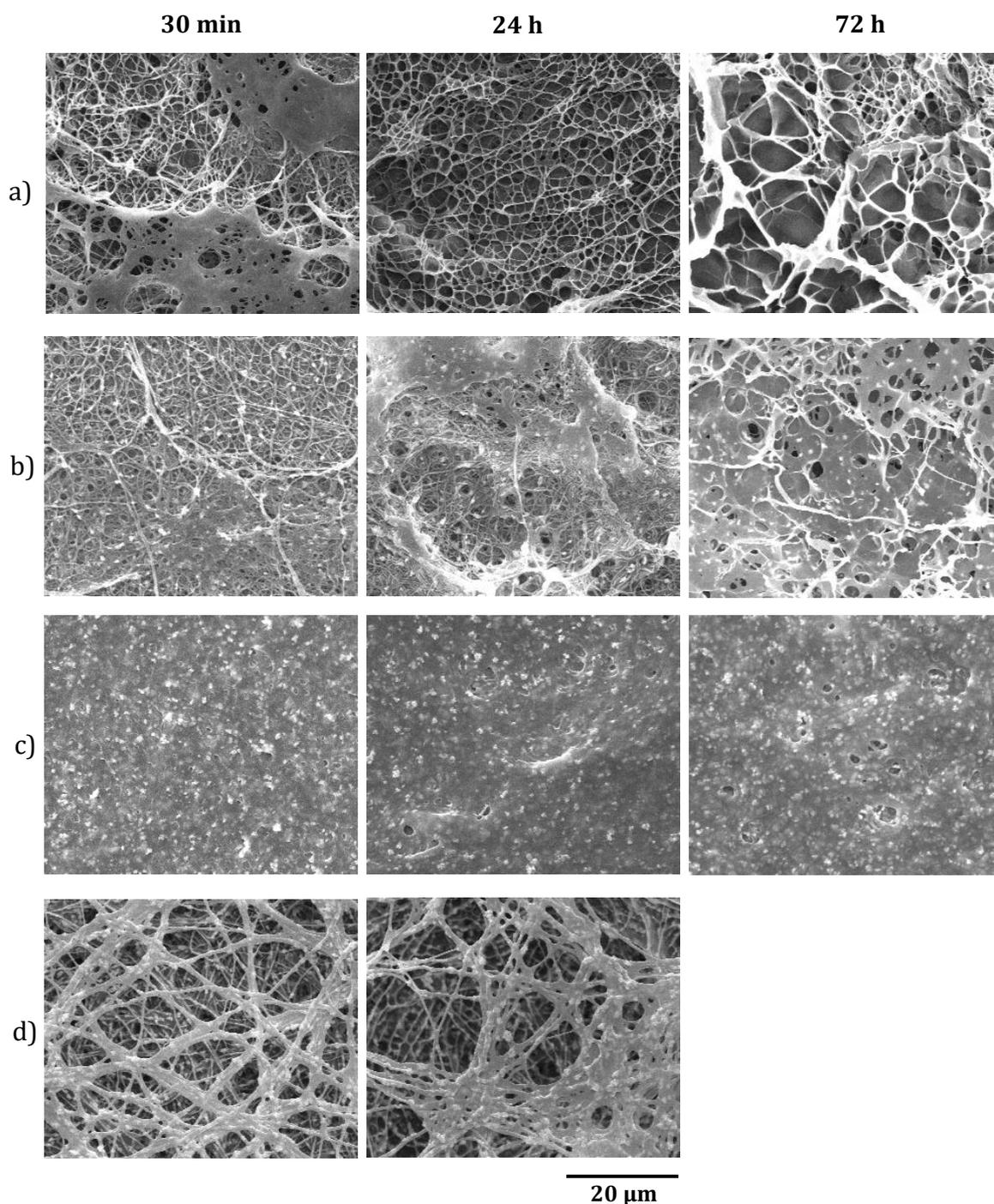


Figura 3.16 Immagini SEM delle membrane dopo 30 min, 24 h e 72 h di incubazione in PBS: a) GL; b) GL/BTNP/GA 30; c) GL/BTNP/GA 100; GL/BTNP/GA 200. Ingrandimento 1000x.

Un materiale composito che mostra queste caratteristiche di instabilità non risulta sicuramente ottimale per un impiego come *scaffold* in vivo.

Per ovviare a questo problema e migliorare la stabilità in ambiente acquoso, le membrane composite sono state sottoposte ad un'ulteriore reticolazione utilizzando come reticolante la genipina (vedi paragrafo 2.2.3.5.1).

3.7.1 Prove di degradazione dopo la reticolazione in genipina

Le nanofibre GL/BTNP/GA 100 e GL/BTNP/GA 200 reticolate con la genipina sono state sottoposte a nuovi test di stabilità. In figura 3.17 sono riportate le immagini al SEM delle membrane dopo l'incubazione a 37 °C in PBS per i cinque *time-step* esaminati.

Le membrane in sola gelatina, che qui non sono presentate, hanno mostrato una colorazione blu a seguito del processo di reticolazione in genipina, condizione ritrovata in letteratura [98]. Le membrane composite, invece, non hanno subito alcuna alterazione.

Il comportamento esibito dalle due tipologie di membrana esaminate (figura 3.17) sembra differire leggermente.

La membrana GL/BTNP/GA 100 mostra fin dall'inizio una forte tendenza delle fibre ad unirsi tra loro a livello superficiale, che la porta ad ottenere una struttura porosa, quasi spugnosa, dopo 72 h di incubazione. Nei giorni successivi sembra riacquisire una morfologia nanofibrosa, che tende nuovamente a coalescere al 14° giorno. Durante l'intero processo di degradazione le nanoparticelle rimangono sempre distribuite sull'intera struttura e all'interno delle fibre.

La GL/BTNP/GA 200, invece, dopo 2 h di incubazione sembra già aver perso la sua natura fibrosa, data la presenza di uno strato superficiale di polimero in cui sono dispersi gli aggregati di nanoparticelle. Dai *time-step* successivi, invece, si nota come essa riemerge e venga poi mantenuta fino a 14 giorni di incubazione, in cui inizia a verificarsi la coalescenza delle fibre polimeriche.

Nel complesso le membrane composite di figura 3.16 si presentano morfologicamente fibrose fino a due settimane di incubazione, *time-step* in cui è stato ancora possibile analizzare entrambe le tipologie (a differenza delle prove precedenti).

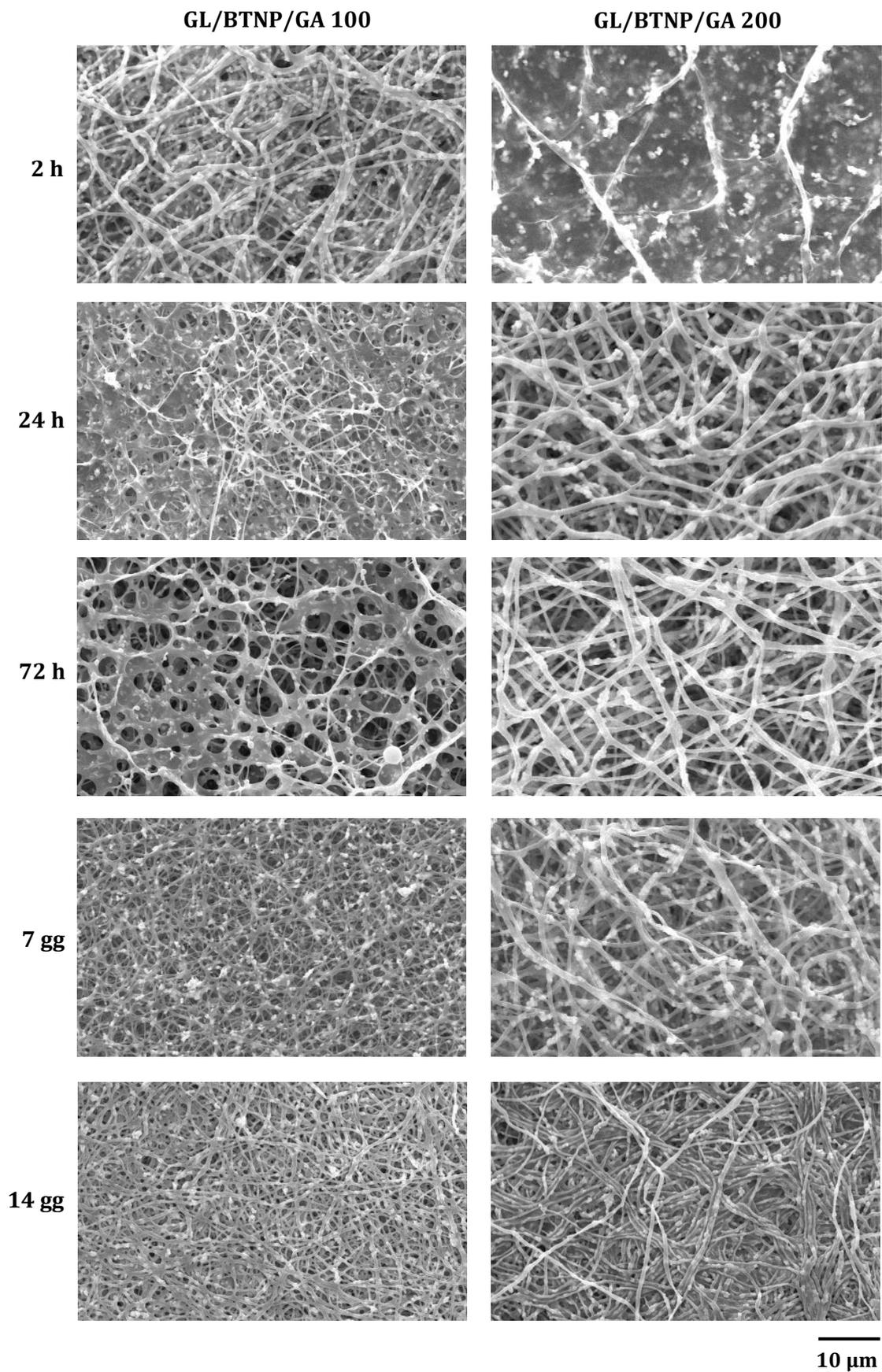


Figura 3.17 Immagini SEM delle membrane composite stabilizzate GL/BTNP/GA 100 e GL/BTNP/GA 200 dopo 2 h, 24 h, 72 h, 7 e 14 giorni di incubazione in PBS. Ingrandimento 2000x.

L'instabilità delle membrane valutata al paragrafo 3.7, quindi, sembra davvero essere il risultato di una scarsa reticolazione. L'aggiunta di un'ulteriore reticolazione della gelatina ad opera della genipina sembra effettivamente migliorarne il comportamento, rendendo il materiale stabile in ambiente acquoso.

In ogni caso, a seguito dell'immersione in PBS, le nanofibre presentano un leggero *swelling* (rigonfiamento) iniziale che pare diminuire con l'aumentare del periodo di incubazione. Tale fenomeno è spesso legato alla reticolazione con la genipina [94][95], ma potrebbe essere ridotto incrementando il tempo di reticolazione, rispetto alle 72 h qui effettuate [134].

3.8 Test cellulari

Le membrane nanofibrose elettrofilate sono state impiegate come substrati per la coltura cellulare, al fine di valutare l'influenza che le nanoparticelle di titanato di bario e la loro concentrazione provocano sulle cellule.

3.8.1 Cellule NIH/3T3

Modelli cellulari di fibroblasti (NIH/3T3) sono stati coltivati per 24 h sulle membrane in GL e sulle matrici composite caricate con 200 mg/ml di BTNP, per avere un controllo cui far riferimento.

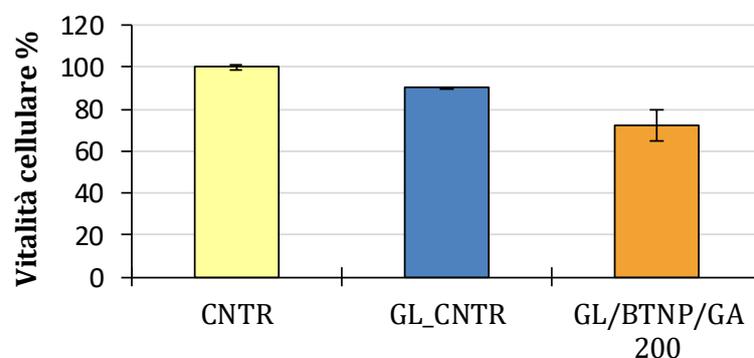


Figura 3.18 Vitalità di cellule NIH/3T3 sulla plastica della multiwell (CNTR), sulla membrana polimerica in sola GL (GL_CNTR) e sulla membrana composita maggiormente caricata (GL/BTNP/GA 200).

La figura 3.18 mostra il livello di vitalità cellulare ottenuto tramite il saggio con la resazurina. Il valore che corrisponde al 100% di vitalità è stato ricavato coltivando le cellule direttamente sulla piastra (CNTR) ed è stato usato come controllo positivo per esaminare i risultati ottenuti per la membrana in gelatina (GL_CNTR) e per quella composita (GL/BTNP/GA 200).

I valori ottenuti indicano che, rispetto al controllo, le membrane in gelatina riducono al 90% la vitalità dei fibroblasti, che risulta quindi molto elevata. Come ci si aspettava da un polimero naturale come la gelatina, essa si dimostra biocompatibile e non citotossica per le cellule. Nel caso della membrana composita, invece, la vitalità cellulare risulta ridotta di circa il 30%. Quindi, nonostante le nanoparticelle di titanato di bario siano considerate biocompatibili, la loro presenza nelle membrane in gelatina aumenta la tossicità del materiale rendendolo un substrato non ottimale per le cellule. Tuttavia, la struttura può essere comunque considerata cito compatibile in quanto risultano ancora il 72.25 % di fibroblasti metabolicamente attivi.

3.8.2 Cellule SaOS-2

Le membrane in GL e quelle composite GL/BTNP/GA 100 e GL/BTNP/GA 200 sono state esaminate come substrati per la coltura di cellule simil-ossee (SaOS-2) tramite il saggio di vitalità con resazurina ed il *LIVE/DEAD* test.

Come nel caso dei fibroblasti, i risultati di vitalità delle membrane ottenuti dal test con resazurina sono stati valutati confrontandoli con il 100% di vitalità cellulare data dalla coltura delle cellule sulla plastica (CNTR).

In figura 3.19 sono riportati i valori relativi all'attività metabolica percentuale delle SaOS-2 valutata dopo 24 h, 48 h e 5 giorni di coltura sui tre substrati.

In generale, dal grafico si nota come all'aumentare del periodo di coltura diminuisca la vitalità cellulare per entrambe le membrane esaminate, e come essa sia sempre inferiore per le nanofibre caricate con il titanato di bario rispetto alla sola gelatina, dovuto molto probabilmente alla presenza del ceramico.

Dopo una coltura di 24 h si riscontra una maggiore vitalità cellulare rispetto al controllo sia nel caso di membrana in GL (134%), sia nel caso di materiale composito (122%). Questa condizione per la gelatina non è inusuale, infatti le sue proprietà di

bioattività e biocompatibilità la rendono un ottimo substrato per la crescita cellulare. Risulta, invece, particolare per le membrane composite che contengono un materiale inorganico, per quanto si sappia essere biocompatibile. Dopo due giorni di coltura entrambi i costrutti possono essere considerati una superficie ottimale per le cellule, per quanto si evidenzi una leggera perdita metabolica nel caso composito, che porta la percentuale di vitalità cellulare al 96%. La gelatina si dimostra altamente non citotossica mantenendo attive ancora dopo cinque giorni l'81% delle cellule coltivate. Le nanofibre GL/BTNP/GA 100, invece, presentano maggiore citotossicità in quanto mantengono vitali solo il 58% delle cellule. Tale comportamento potrebbe essere causato dalle nanoparticelle piezoelettriche caricate nella matrice di gelatina.

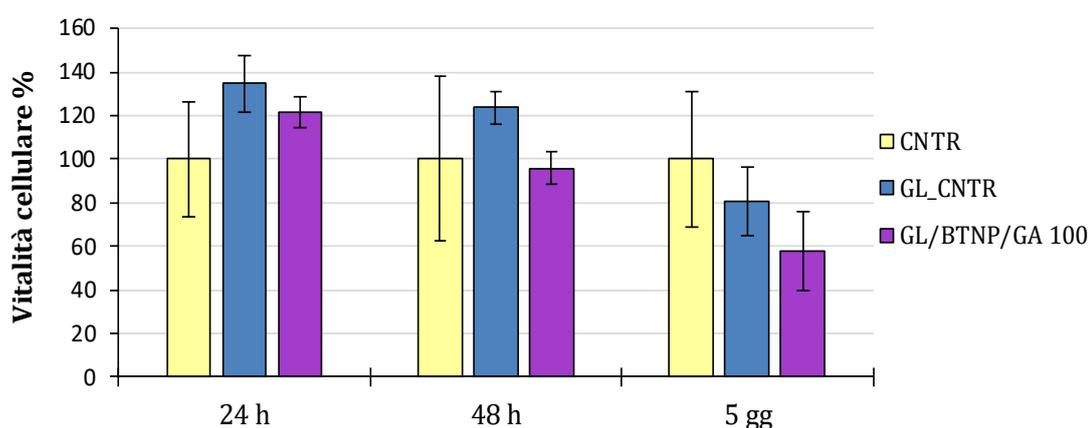


Figura 3.19 Vitalità di cellule SaOS-2 sulla plastica della multiwell (CNTR), sulla membrana polimerica in sola GL (GL_CNTR) e sulla membrana composita GL/BTNP/GA 100.

La vitalità delle cellule coltivate per 48 h e 5 giorni è stata esaminata anche attraverso il *LIVE/DEAD* test che ha permesso di ottenere le immagini a fluorescenza delle cellule, mostrate in figura 3.20. Compaiono in verde le cellule vive e in rosso quelle in apoptosi.

Nell'immagine relativa alla membrana GL/BTNP/GA 100 dopo una coltura di 48 h è possibile notare la presenza di "buchi" neri attorno ai quali sono distribuite le cellule. Questi fori potrebbero corrispondere ad un iniziale processo di degradazione del materiale, già riscontrato durante i test di stabilità (paragrafo 3.7), che sembra scomparire del tutto dopo 5 giorni di coltura, lasciando le cellule a diretto contatto con la plastica. Infatti, in questo caso non sono più visibili i fori ma sembra esserci un

quantitativo di cellule maggiore, indice di una proliferazione cellulare garantita da un ottimo substrato quale la petri.

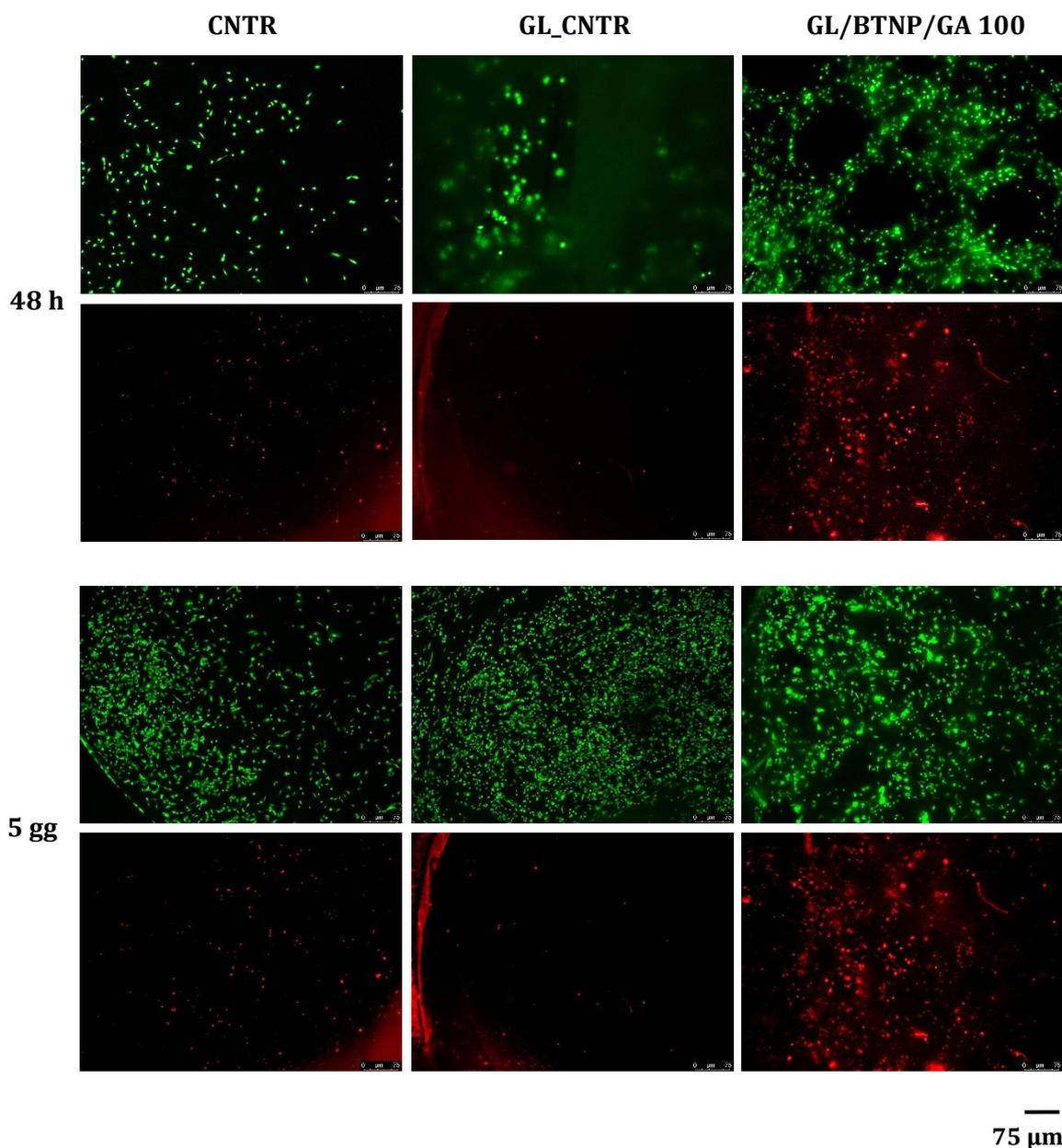


Figura 3.20 Immagini a fluorescenza delle cellule SaOS-2 relative al LIVE/DEAD test effettuato sulla plastica della multiwell (CNTR), sulla membrana polimerica in sola GL (GL_CNTR) e sulla membrana composita caricata con 100 mg/ml di BTNP (GL/BTNP/GA 100) dopo 48 h e 5 giorni di coltura. Gli ingrandimenti sono 4x per le immagini LIVE e 10x per le immagini DEAD.

Data la possibilità che il materiale da testare si sia degradato, è evidente che i risultati qui riportati relativi ai test cellulari effettuati (su entrambe le linee cellulari) non possano essere considerati attendibili e correttamente interpretabili. Infatti, non

essendo sicuri sull'integrità del composito non è possibile analizzare con certezza come l'aggiunta del titanato di bario influenzi la membrana polimerica in gelatina.

Capitolo 4

Conclusioni e sviluppi futuri

L'ingegneria dei tessuti si propone di fabbricare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere e migliorare la funzionalità di organi o tessuti che risultano danneggiati o lesionati. Sono tre i principali protagonisti di questa disciplina: le cellule, lo *scaffold* e gli elementi regolatori, quali stimoli e biomolecole.

Lo *scaffold*, struttura tridimensionale temporanea, svolge un ruolo fondamentale perché non solo deve garantire un supporto meccanico al tessuto di nuova formazione, ma deve anche possedere le corrette proprietà che inducano l'adesione e la proliferazione cellulare. Risulta quindi essenziale la sua progettazione in termini di *design* e biomateriali, in modo tale da mimare la struttura e la funzionalità della matrice extracellulare nativa, fornendo i corretti stimoli meccanici e biologici alle cellule prima di degradare completamente. In tal senso, un'architettura nanofibrosa è da preferire in quanto consente alle cellule di aderire e proliferare all'interno della struttura. I biomateriali maggiormente impiegati per la fabbricazione di *scaffold* sono i polimeri biodegradabili e/o biorisorbibili, perché presentano meccanismi di degradazione che li rendono idonei a rappresentare una matrice temporanea e perché permettono di scegliere tra una moltitudine di composizioni e proprietà diverse quella che meglio si adatta alla specifica applicazione. La scelta può ricadere sui polimeri di origine naturale o sintetica. Se i polimeri naturali, che derivano da componenti della matrice extracellulare, esibiscono scarse proprietà meccaniche e degradative ma sono caratterizzati da un'ottima biocompatibilità, bioattività e biomimetici; i polimeri sintetici, al contrario, non risultano per niente bioattivi ma presentano migliori proprietà meccaniche modulabili che li rendono versatili e processabili tramite diverse tecniche. Per quanto un processo di funzionalizzazione possa incrementare la biomimetici del materiale, spesso gli *scaffold* fabbricati per applicazioni biomediche non sono in grado di generare gli stimoli adeguati ad una corretta e completa crescita del tessuto danneggiato. Per cercare di rimediare,

recentemente sono stati esaminati materiali definiti *smart* capaci di stimolare attivamente le cellule. In particolare, nanomateriali di natura piezoelettrica risultano interessanti per applicazioni biomediche, soprattutto nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti eccitabili come l'osso, in quanto caratterizzati dalla capacità di rispondere ad uno stimolo meccanico producendo un potenziale elettrico e viceversa.

All'interno di questo complesso quadro analizzato si inserisce il lavoro di tesi qui presentato, in cui sono state realizzate membrane nanofibrose a base di gelatina (GL), polimero naturale derivato dal collagene, all'interno delle quali sono stati incorporati agenti piezoelettrici ceramici ultimamente oggetto di svariati studi: nanoparticelle di titanato di bario (BTNP). La tecnica utilizzata per fabbricare le membrane con architettura nanofibrosa è l'*electrospinning*.

L'obiettivo principale è quello di incorporare il maggior quantitativo possibile di agente piezoelettrico all'interno delle membrane, garantendo una distribuzione omogenea dello stesso. Le nanoparticelle di titanato di bario tendono a precipitare in soluzione acquosa e si presentano all'interno delle membrane sotto forma di aggregati. Per migliorare la loro distribuzione all'interno della struttura e diminuire la formazione e la dimensione degli aggregati si è deciso di provare ad utilizzare uno stabilizzante di nanoparticelle che crea un *coating* attorno al nanomateriale rendendolo maggiormente idrofilico e migliorandone, quindi, la dispersione in soluzione e, di conseguenza, all'interno della membrana polimerica. In questa attività si è scelto come stabilizzante per le nanoparticelle la gomma arabica (GA), un biopolimero edibile, e quindi biocompatibile, recentemente studiato per questo impiego in ambito biomedicale.

Le nanoparticelle di titanato di bario sono state disperse, tramite sonicazione, in una soluzione acquosa di GA prima di aggiungere la GL. Dopo aver completamente solubilizzato il polimero, la soluzione è stata ulteriormente sonicata prima di inserire l'agente reticolante GPTMS. La soluzione così ottenuta è stata poi processata mediante *electrospinning* impostando i parametri ottimizzati nel lavoro di Tondaturo e colleghi e in una precedente tesi, e sono state così fabbricate le membrane composite in GL/BTNP/GA. La GA è stata aggiunta alla soluzione in quantità pari alle nanoparticelle, a seguito di una fase di ottimizzazione. In questo modo, infatti, è stato raggiunto il giusto compromesso tra distribuzione delle stesse all'interno della membrana e processabilità della soluzione, che presenta ancora una viscosità

adeguata. Il massimo quantitativo di agente piezoelettrico che è stato possibile incorporare all'interno della membrana polimerica è di 200 mg/ml.

Le membrane composite sono state fabbricate disperdendo in soluzione concentrazioni crescenti pari a 30, 100 e 200 mg/ml di nanoparticelle di titanato di bario e successivamente sono state sottoposte a diverse caratterizzazioni al fine di valutare come la presenza delle BTNP influenzi il comportamento del materiale.

La spettroscopia a scansione elettronica (SEM) ha permesso di esaminare le membrane ottenute dal punto di vista morfologico. Esse presentano fibre omogenee prive di difetti orientate in modo causale che, a differenza del controllo in sola GL, mostrano la presenza di nanoparticelle. L'analisi morfologica ha rivelato come all'aumentare della concentrazione di nanoparticelle aumenti la dimensione delle fibre e dei pori, probabilmente a seguito di un aumento nella viscosità della soluzione polimerica, e contemporaneamente migliori la loro distribuzione all'interno della struttura. Inoltre, è stato possibile misurare gli aggregati riscontrando una diminuzione statisticamente significativa nella loro dimensione per le membrane caricate con 100 mg/ml di BTNP rispetto alla membrana composita fabbricata senza l'impiego della gomma arabica.

L'effettiva presenza del titanato di bario nelle membrane composite è stata esaminata attraverso caratterizzazioni chimico-fisiche. Essa è confermata dalla comparsa dei picchi del titanio e del bario nello spettro EDX delle nanofibre composite. Lo spettro di assorbimento compreso tra 4000 e 600 cm^{-1} ottenuto tramite la spettroscopia FTIR-ATR delle membrane e delle polveri di GA e BTNP, invece, non mostra i picchi caratteristici delle vibrazioni del legame Ti-O e identificativi della conformazione tetragonale del materiale ceramico, perché essi si trovano in un *range* di 430-563 cm^{-1} . D'altro canto, nelle membrane composite si notano le bande di assorbimento tipiche della gelatina, che sembrano coprire leggermente i picchi legati alla gomma arabica che non risultano, quindi, del tutto riscontrabili nello spettro delle membrane composite.

L'analisi termogravimetrica eseguita sulle membrane maggiormente caricate ha confermato una maggiore quantità di BTNP nella membrana GL/BTNP/GA 200 rispetto a quella contenente 100 mg/ml di nanoparticelle, seppure non risulti il doppio come dovrebbe essere. Tale risultato potrebbe essere imputabile alla forte tendenza del nanomateriale ceramico a precipitare in soluzione.

Il comportamento meccanico del materiale è stato indagato attraverso prove di trazione, che hanno consentito di ottenere curve sforzo-deformazione e di ricavare valori medi di modulo elastico e deformazione percentuale a rottura. L'elaborazione dei dati rivela un miglioramento nella resistenza meccanica del materiale dato l'aumento statistico del modulo di Young nel caso della membrana caricata con 100 mg/ml di BNTP rispetto alla membrana di controllo in gelatina. L'incremento del materiale ceramico (BaTiO₃) comporta, invece, una diminuzione statistica della deformazione a rottura della membrana, che mostra un comportamento fragile.

I risultati ottenuti dalle prove di degradazione in PBS delle membrane hanno mostrato un intenso e repentino deterioramento del materiale, che non risulta quindi stabile in ambiente acquoso. Pertanto, risultano poco attendibili i risultati ottenuti dalla coltura di cellule NIH/3T3 (fibroblasti) e SaOS-2 sulle membrane composite.

Il problema è stato successivamente risolto introducendo un ulteriore processo di reticolazione in genipina (10% w/v in etanolo) alle membrane processate tramite *electrospinning* (già reticolate con GPTMS), incrementandone la stabilità. Le nanofibre così prodotte, infatti, risultano morfologicamente stabili fino a due settimane di incubazione a 37 °C in PBS, anche se presentano un lieve *swelling* delle fibre.

Dato che la stabilità delle membrane è stata raggiunta, sarebbe auspicabile eseguire nuovamente i test cellulari con le cellule simil-ossee SaOS-2 sulle membrane stabilizzate, per valutarne la cito tossicità. Così come sarebbe interessante analizzare l'effetto della membrana composita sulla proliferazione, sul differenziamento cellulare e sull'espressione genica. Per ottenere migliori risultati in termini di comportamento cellulare si potrebbe anche introdurre una stimolazione ad ultrasuoni, come emerso in letteratura [45][135].

Inoltre, per valutare se le BTNP vengano effettivamente inglobate dalle fibre polimeriche, si potrebbero analizzare le membrane composite GL/BTNP/GA attraverso la tecnologia STEM (microscopia a scansione e trasmissione elettronica).

Bibliografia

- [1] J. Viola, B. Lal, and O. Grad, "3.0 Emergence and Evolution of a Shared Concept," pp. 18–24, 2003.
- [2] Skalak R. and Fox C.F. (eds.), "Tissue engineering," *New York Alan R. Liss*, 1988.
- [3] R. Langer and J. P. Vacanti, "Tissue engineering," *Science (80-.)*, vol. 260, no. 5110, pp. 920–926, 1993.
- [4] L. G. Griffith and M. A. Swartz, "Capturing complex 3D tissue physiology in vitro," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 3, pp. 211–224, Mar. 2006.
- [5] J. P. Vacanti and R. Langer, "Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation," *Lancet*, vol. 354, no. Luglio, pp. 32–34, 1999.
- [6] F. Lyons, S. Partap, and F. J. O'Brien, "Part 1: scaffolds and surfaces.," *Technol. Health Care*, vol. 16, no. 4, pp. 305–17, 2008.
- [7] V. Chiono, "Lezioni di ingegneria per la medicina rigenerativa." 2017.
- [8] R. S. Katari, A. Peloso, and G. Orlando, "Tissue Engineering," *Adv. Surg.*, vol. 48, no. 1, pp. 137–154, 2014.
- [9] J. T. Hutmacher, Dietmar Werner Schantz, C. Xu Fu Lam, K. Cheng Tan, and T. Chyne Lim, "State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 1, pp. 245–260, 2007.
- [10] L. E. Freed *et al.*, "Biodegradable polymer scaffold for tissue engineering," *Nat. Biotechnol.*, vol. 12, pp. 1119–1124, 1994.
- [11] T. Chen, G., Ushida, T., & Tateishi, "Scaffold design for tissue engineering," *Macromol. Biosci.*, vol. 2, no. 2, pp. 67–77, 2002.
- [12] B. Subia, J. Kundu, and S. C., "Biomaterial Scaffold Fabrication Techniques for

- Potential Tissue Engineering Applications,” *Tissue Eng.*, no. 3, pp. 141–159, 2010.
- [13] A. G. Mikos, G. Sarakinos, M. D. Lyman, D. E. Ingber, J. P. Vacanti, and R. Langer, “Prevascularization of porous biodegradable polymers,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 42, no. 6, pp. 716–723, 1993.
- [14] A. Rodrigues Santos Jr., “Bioresorbable polymers for tissue engineering,” *Tissue Eng.*, vol. 18, no. 18, pp. 225–246, 2011.
- [15] D. E. Ingber *et al.*, “Cellular Tensegrity: Exploring How Mechanical Changes in the Cytoskeleton Regulate Cell Growth, Migration, and Tissue Pattern during Morphogenesis,” *Int. Rev. Cytol.*, vol. 150, pp. 173–224, Jan. 1994.
- [16] F. Greco and V. Mattoli, “Introduction to Active Smart Materials for Biomedical Applications,” in *Piezoelectric nanomaterials for biomedical applications*, G. Ciofani and A. Menciassi, Eds. 2012, pp. 1–27.
- [17] S. Stratton, N. B. Shelke, K. Hoshino, S. Rudraiah, and S. G. Kumbar, “Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering,” *Bioact. Mater.*, vol. 1, no. 2, pp. 93–108, 2016.
- [18] A. G. Pathiraja, A. Raju, and N. Gadegaard, “Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering,” *Eur. Cells Mater.*, vol. 5, no. June 2014, pp. 1–16, 2003.
- [19] S. Hofmann and M. Garcia-Fuentes, “Bioactive Scaffolds for the Controlled Formation of Complex Skeletal Tissues,” in *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*, D. Eberli, Ed. 2011, pp. 393–432.
- [20] K. Kaushik, R. B. Sharma, and S. Agarwal, “Natural polymers and their applications,” *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, vol. 37, no. 2, pp. 30–36, 2016.
- [21] A. Aravamudhan, D. M. Ramos, A. A. Nada, and S. G. Kumbar, *Natural Polymers : Polysaccharides and Their Derivatives for Biomedical Applications*. Elsevier Inc., 2014.
- [22] G. H. Haertling, “Ferroelectric ceramics: History and Technology,” *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 82, no. 4, pp. 797–818, 1999.

- [23] P. Dineva, D. Gross, R. Müller, and T. Rangelov, "Piezoelectric Materials," in *Dynamic Fracture of Piezoelectric Materials*, vol. 212, P. Dineva, D. Gross, R. Müller, and T. Rangelov, Eds. 2014, pp. 7–32.
- [24] M. M. Vijatović, J. D. Bobić, and B. D. Stojanović, "History and challenges of barium titanate: Part I," *Sci. Sinter.*, vol. 40, no. 2, pp. 155–165, 2008.
- [25] R. Contreras, H. Sahlin, and J. A. Frangos, "Titanate biomaterials with enhanced antiinflammatory properties," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, pp. 480–485, 2006.
- [26] F. R. Baxter, C. R. Bowen, I. G. Turner, and A. C. E. Dent, "Electrically active bioceramics: A review of interfacial responses," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 38, no. 6, pp. 2079–2092, 2010.
- [27] A. Marino, G. G. Genchi, E. Sinibaldi, and G. Ciofani, "Piezoelectric Effects of Materials on Bio-Interfaces," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 21, pp. 17663–17680, 2017.
- [28] A. Marino *et al.*, "Two-Photon Lithography of 3D Nanocomposite Piezoelectric Scaffolds for Cell Stimulation," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 46, pp. 25574–25579, 2015.
- [29] G. G. Genchi, A. Marino, A. Rocca, V. Mattoli, and G. Ciofani, "Barium titanate nanoparticles: promising multitasking vectors in nanomedicine," *Nanotechnology*, vol. 27, 2016.
- [30] E. FarrokhTakin *et al.*, "Barium titanate core--gold shell nanoparticles for hyperthermia treatments," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 8, pp. 2319–31, 2013.
- [31] P. Sá *et al.*, "Ferroelectric characterization of aligned barium titanate nanofibres," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 46, no. 10, 2013.
- [32] G. Ciofani *et al.*, "Preparation of stable dispersion of barium titanate nanoparticles: Potential applications in biomedicine," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 76, no. 2, pp. 535–543, 2010.
- [33] G. Ciofani, S. Danti, D. D'Alessandro, S. Moscato, M. Petrini, and A. Mencassi, "Barium titanate nanoparticles: Highly cytocompatible dispersions in glycol-

- chitosan and doxorubicin complexes for cancer therapy," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 5, no. 7, pp. 1093–1101, 2010.
- [34] A. Rocca *et al.*, "Barium titanate nanoparticles and hypergravity stimulation improve differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 433–445, 2015.
- [35] H. A. Ávila, M. M. Reboledo, M. Castro, and R. Parra, "Nanofibers obtained by electrospinning of BaTiO₃ particles dispersed in polyvinyl alcohol and ethylcellulose," *Mater. Res.*, vol. 16, no. 4, pp. 839–843, 2013.
- [36] G. Cavaletti, "Toxic and Drug-Induced Neuropathies," in *Neurobiology of Disease*, S. Gilman, Ed. Elsevier Inc., 2007, pp. 871–883.
- [37] G. Ciofani, S. Danti, L. Ricotti, D. D. Alessandro, S. Moscato, and V. Mattoli, "Applications of Piezoelectricity in Nanomedicine," in *Piezoelectric nanomaterials for biomedical applications*, G. Ciofani and A. Menciassi, Eds. 2012, pp. 213–238.
- [38] D. Staedler *et al.*, "Harmonic nanocrystals for biolabeling: A survey of optical properties and biocompatibility," *ACS Nano*, vol. 6, no. 3, pp. 2542–2549, 2012.
- [39] C. L. Hsieh, R. Grange, Y. Pu, and D. Psaltis, "Bioconjugation of barium titanate nanocrystals with immunoglobulin G antibody for second harmonic radiation imaging probes," *Biomaterials*, vol. 31, no. 8, pp. 2272–2277, 2010.
- [40] G. Ciofani *et al.*, "Effects of barium titanate nanoparticles on proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 102, pp. 312–320, 2013.
- [41] E. Fukada and I. Yasuda, "On the Piezoelectric Effect of Bone," *J. Phys. Soc. Japan*, vol. 12, no. 10, pp. 1158–1162, 1957.
- [42] R. Yunus, S. K. T. S, and M. Doble, "Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 57, pp. 452–463, 2015.
- [43] F. R. Baxter, I. G. Turner, C. R. Bowen, J. P. Gittings, and J. B. Chaudhuri, "An in vitro study of electrically active hydroxyapatite-barium titanate ceramics using

- Saos-2 cells," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 20, no. 8, pp. 1697–1708, 2009.
- [44] Y. Li *et al.*, "Electroactive BaTiO₃nanoparticle-functionalized fibrous scaffolds enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 4007–4018, 2017.
- [45] G. G. Genchi *et al.*, "P(VDF-TrFE)/BaTiO₃ Nanoparticle Composite Films Mediate Piezoelectric Stimulation and Promote Differentiation of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 5, pp. 1808–1820, 2016.
- [46] G. Ciofani, L. Ricotti, A. Menciassi, and V. Mattoli, "Preparation, characterization and in vitro testing of poly (lactic-co-glycolic) acid/barium titanate nanoparticle composites for enhanced cellular proliferation," *Biomed. Microdevices*, vol. 13, no. 2, pp. 255–266, 2011.
- [47] X. Yang and H. Wang, "Electrospun Functional Nanoibrous Scaffolds for Tissue Engineering," *Tissue Eng.*, pp. 159–178, 2010.
- [48] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique," *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 325–347, 2010.
- [49] G. R. Williams, N. P. Chatterton, T. Nazir, and L. Zhu, "Electrospun nanofibers in drug delivery: recent developments and perspectives," vol. 3, pp. 515–533, 2012.
- [50] S. Thenmozhi, N. Dharmaraj, K. Kadirvelu, and H. Y. Kim, "Electrospun nanofibers: New generation materials for advanced applications," *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.*, vol. 217, pp. 36–48, 2017.
- [51] S. Agarwal, A. Greiner, and J. H. Wendorff, "Functional materials by electrospinning of polymers," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 38, no. 6, pp. 963–991, 2013.
- [52] S. Agarwal, J. H. Wendorff, and A. Greiner, "Use of electrospinning technique for biomedical applications," *Polymer (Guildf.)*, vol. 49, no. 26, pp. 5603–5621, 2008.
- [53] F. E. Ahmed, B. S. Lalia, and R. Hashaikeh, "A review on electrospinning for

- membrane fabrication: Challenges and applications," *Desalination*, vol. 356, pp. 15–30, 2015.
- [54] L. E. Aguilar *et al.*, "Electrospun polyurethane/Eudragit® L100-55 composite mats for the pH dependent release of paclitaxel on duodenal stent cover application," *Int. J. Pharm.*, vol. 478, no. 1, pp. 1–8, 2015.
- [55] K. Kalwar, X. Zhang, M. A. Bhutto, L. Dali, and D. Shan, "Incorporation of ciprofloxacin/laponite in polycaprolactone electrospun nanofibers: Drug release and antibacterial studies," *Mater. Res. Express*, vol. 4, no. 12, pp. 0–15, 2017.
- [56] M. Rubert *et al.*, "Electrospun PCL/PEO coaxial fibers for basic fibroblast growth factor delivery," *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 48, pp. 8538–8546, 2014.
- [57] S. Sahoo, L. T. Ang, J. C. H. Goh, and S. L. Toh, "Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 93, no. 4, pp. 1539–1550, 2010.
- [58] J. Zeng, A. Aigner, F. Czubyko, T. Kissel, J. H. Wendorff, and A. Greiner, "Poly(vinyl alcohol) nanofibers by electrospinning as a protein delivery system and the retardation of enzyme release by additional polymer coatings," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 3, pp. 1484–1488, 2005.
- [59] D. E. Wong, M. Dai, J. N. Talbert, S. R. Nugen, and J. M. Goddard, "Biocatalytic polymer nanofibers for stabilization and delivery of enzymes," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 110, pp. 16–22, 2014.
- [60] H. Yoshimoto, Y. M. Shin, H. Terai, and J. P. Vacanti, "A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 24, no. 12, pp. 2077–2082, 2003.
- [61] S. G. Kumbar, S. P. Nukavarapu, R. James, L. S. Nair, and C. T. Laurencin, "Electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 29, no. 30, pp. 4100–4107, 2008.
- [62] J. S. Choi, S. J. Lee, G. J. Christ, A. Atala, and J. J. Yoo, "The influence of electrospun aligned poly(ϵ -caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of

- self-aligned skeletal muscle myotubes," *Biomaterials*, vol. 29, no. 19, pp. 2899–2906, 2008.
- [63] W.-J. Li *et al.*, "A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells," *Biomaterials*, vol. 26, no. 6, pp. 599–609, 2005.
- [64] U. Bertram *et al.*, "Vascular Tissue Engineering: Effects of Integrating Collagen into a PCL Based Nanofiber Material," *Biomed Res. Int.*, vol. 2017, 2017.
- [65] D. Gugutkov, J. Gustavsson, M. Cantini, M. Salmeron-Sánchez, and G. Altankov, "Electrospun fibrinogen-PLA nanofibres for vascular tissue engineering," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2016.
- [66] 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, 2005.
- [67] J. Doshi and D. H. Reneker, "Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers," vol. 35, pp. 151–160, 1995.
- [68] 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, pp. 909–920, 1981.
- [69] G. Taylor, "Electrically driven jets," *Proc. R. Soc. London, Ser. A, Math. Phys. Sciences.*, vol. 313, pp. 453–475, 1969.
- [70] P. Kumar, "Effect of Collector on Electrospinning To Fabricate Aligned Nanofiber Effect of Collector on Electrospinning To Fabricate Aligned Nanofiber," National Institute of Technology Rourkela, 2012.
- [71] M. Rubert, Y. F. Li, J. Dehli, M. B. Taskin, F. Besenbacher, and M. Chen, "Dexamethasone encapsulated coaxial electrospun PCL/PEO hollow microfibers for inflammation regulation," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 93, pp. 51537–51543, 2014.

- [72] C. Wang, K. W. Yan, Y. D. Lin, and P. C. H. Hsieh, "Biodegradable core/shell fibers by coaxial electrospinning: Processing, fiber characterization, and its application in sustained drug release," *Macromolecules*, vol. 43, no. 15, pp. 6389–6397, 2010.
- [73] F. Li, Y. Zhao, and Y. Song, "Core-Shell Nanofibers: Nano Channel and Capsule by Coaxial Electrospinning," in *Nanofibers*, A. Kumar, Ed. InTech, 2010, pp. 419–438.
- [74] A. Haider, S. Haider, and I. K. Kang, "A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology," *Arab. J. Chem.*, 2015.
- [75] H. Fong, I. Chun, and D. H. Reneker, "Beaded nanofibers formed during electrospinning," *Polymer (Guildf.)*, vol. 40, no. 16, pp. 4585–4592, 1999.
- [76] C.-L. Zhang and S.-H. Yu, "Nanoparticles meet electrospinning: Recent advances and future prospects," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, no. 13, pp. 4423–4448, 2014.
- [77] N. Okutan, P. Terzi, and F. Altay, "Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers," *Food Hydrocoll.*, vol. 39, pp. 19–26, 2014.
- [78] W. Zuo, M. Zhu, W. Yang, H. Yu, Y. Chen, and Y. Zhang, "Experimental study on relationship between jet instability and formation of beaded fibers during electrospinning," *Polym. Eng. Sci.*, vol. 45, no. 5, pp. 704–709, 2005.
- [79] J. Pelipenko, J. Kristl, B. Janković, S. Baumgartner, and P. Kocbek, "The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers," *Int. J. Pharm.*, vol. 456, no. 1, pp. 125–134, 2013.
- [80] A. Bagchi, S. R. K. Meka, B. N. Rao, and K. Chatterjee, "Perovskite ceramic nanoparticles in polymer composites for augmenting bone tissue regeneration," *Nanotechnology*, vol. 25, no. 48, 2014.
- [81] Y. Lu *et al.*, "Coaxial electrospun fibers: applications in drug delivery and tissue engineering," *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, vol. 8, no. 5, pp. 654–677, 2016.

- [82] Y. Dror *et al.*, "One-step production of polymeric microtubes by co-electrospinning," *Small*, vol. 3, no. 6, pp. 1064–1073, 2007.
- [83] M. Pakravan, M. C. Heuzey, and A. Ajji, "Core-shell structured PEO-chitosan nanofibers by coaxial electrospinning," *Biomacromolecules*, vol. 13, no. 2, pp. 412–421, 2012.
- [84] M. C. Gómez-Guillén, B. Giménez, M. E. López-Caballero, and M. P. Montero, "Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources : A review," *Food Hydrocoll.*, vol. 25, no. 8, pp. 1813–1827, 2011.
- [85] M. Tamburin, "Le gelatine animali: tecnologia di produzione e caratteristiche igienico-sanitarie," Università degli studi di Padova.
- [86] A. Marina, P. Gentile, V. Chiono, and G. Ciardelli, "Collagen for bone tissue regeneration," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 9, pp. 3191–3200, 2012.
- [87] M. Nikkhah, M. Akbari, A. Memic, A. Dolatshahi-pirouz, and A. Khademhosseini, "Gelatin-based Biomaterials for Tissue Engineering and Stem Cell Bioengineering," in *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies*, 2016, pp. 37–62.
- [88] X. Wang *et al.*, "Gelatin-Based Hydrogels for Organ 3D Bioprinting," *Polymers (Basel)*, vol. 9, no. 9, 2017.
- [89] J. B. Rose *et al.*, "Gelatin-Based Materials in Ocular Tissue Engineering," *Materials (Basel)*, vol. 7, pp. 3106–3135, 2014.
- [90] A. Hayashi and S.-C. Oh, "Gelation of Gelatin Solution," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 47, no. 8, pp. 1711–1716, 1983.
- [91] C. Joly-Duhamel, D. Hellio, and M. Djabourov, "All Gelatin Networks : 1. Biodiversity and Physical Chemistry," *Langmuir*, vol. 18, no. 19, pp. 7208–7217, 2002.
- [92] B. O. Mahony *et al.*, "Silica-Gelatin Hybrids with Tailorable Degradation and Mechanical Properties for Tissue Regeneration," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 20, pp. 3835–3845, 2010.

- [93] S. Aliakbarshirazi and A. Talebian, "Electrospun gelatin nanofibrous scaffolds for cartilage tissue engineering," *Mater. Today Proc.*, vol. 4, no. 7, pp. 7059–7064, 2017.
- [94] 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, 2013.
- [95] S. Panzavolta, M. Gioffrè, M. Letizia, C. Gualandi, L. Foroni, and A. Bigi, "Electrospun gelatin nanofibers: Optimization of genipin cross-linking to preserve fiber morphology after exposure to water," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 4, pp. 1702–1709, 2011.
- [96] Y.-L. Liu, Y.-H. Su, and J.-Y. Lai, "In situ crosslinking of chitosan and formation of chitosan–silica hybrid membranes with using γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane as a crosslinking agent," *Polymer (Guildf.)*, vol. 45, pp. 6831–6837, 2004.
- [97] A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, N. Roveri, and K. Rubini, "Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin," *Biomaterials*, vol. 23, pp. 4827–4832, 2002.
- [98] A. Oryan, A. Kamali, A. Moshiri, H. Baharvand, and H. Daemi, "Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 107, pp. 678–688, 2018.
- [99] C.-H. Yao, B.-S. Liu, S.-H. Hsu, and Y.-S. Chen, "Calvarial bone response to a tricalcium phosphate-genipin crosslinked gelatin composite," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 3065–3074, 2005.
- [100] M. A. Montenegro, M. L. Boiero, L. Valle, and C. D. Borsarelli, "Gum Arabic: More Than an Edible Emulsifier," in *Products and Applications of Biopolymers*, J. Verbeek, Ed. InTech, 2012.
- [101] D. Renard, L. Lavenant-Gourgeon, M. C. Ralet, and C. Sanchez, "Acacia senegal gum: Continuum of molecular species differing by their protein to sugar ratio,

- molecular weight, and charges," *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 9, pp. 2637–2649, 2006.
- [102] S. I. Ahmad, N. Hasan, C. K. V. Z. Abid, and N. Mazumdar, "Preparation and characterization of films based on crosslinked blends of gum acacia, polyvinylalcohol, and polyvinylpyrrolidone-iodine complex," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 109, no. 2, pp. 775–781, 2008.
- [103] G. Ciofani *et al.*, "Cytocompatibility evaluation of gum Arabic-coated ultra-pure boron nitride nanotubes on human cells," *Nanomedicine*, vol. 9, no. 6, pp. 773–788, 2014.
- [104] L. Zhang *et al.*, "Gum Arabic-Coated Magnetic Nanoparticles for Potential Application in Simultaneous Magnetic Targeting and Tumor Imaging," *AAPS J.*, vol. 11, no. 4, pp. 693–699, 2009.
- [105] O. Ana and C. Afonso, "In vitro studies of Gum Arabic-coated Magnetic Nanoparticles with Mammalian Cell Cultures Por Ana Sofia Cardoso Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para Ana Isabel Dias Bicho dos Santos," p. 77, 2008.
- [106] P. R. Sarika, K. Cinthya, A. Jayakrishnan, P. R. Anilkumar, and N. R. James, "Modified gum arabic cross-linked gelatin scaffold for biomedical applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 43, pp. 272–279, 2014.
- [107] G. J. Todaro and H. Green, "Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells inn culture and their development into established lines," *J. Cell Biol.*, vol. 17, no. 6, pp. 299–313, 1963.
- [108] M. Chen, P. K. Patra, S. B. Warner, and S. Bhowmick, "Role of Fiber Diameter in Adhesion and Proliferaion of NIH 3T3 Fibroblast on Electrospun Polycaprolactone Scaffolds," *Tissue Eng.*, vol. 13, no. 3, pp. 579–587, 2007.
- [109] P. Rejmontová, Z. Capáková, N. Mikušová, and N. Maráková, "Adhesion, Proliferation and Migration of NIH/3T3 Cells on Modified Polyaniline Surfaces," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 9, pp. 1439–1446, 2016.
- [110] J. L. Jainchill, S. A. Aaronson, and G. J. Todaro, "Murine Sarcoma and Leukemia

- Viruses: Assay Using Clonal Lines of Contact-Inhibited Mouse Cells," *J. Virol.*, vol. 4, no. 5, pp. 549–553, 1969.
- [111] R. G. Greig *et al.*, "Tumorigenic and metastatic properties of 'normal' and ras-transfected NIH/3T3 cells," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 82, no. June, pp. 3698–3701, 1985.
- [112] J.-Y. Liu, S.-J. Lin, and J.-K. Lin, "Inhibitory effects of curcumin on protein kinase C activity induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in NIH 3T3 cells," *Carcinogenesis*, vol. 14, no. 5, pp. 857–861, 1993.
- [113] ATTC e LGC Standards, "http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/crl-1658.aspx?geo_country=it."
- [114] S. B. Rodan *et al.*, "Characterization of a Human Osteosarcoma Cell Line (Saos-2) with Osteoblastic Properties Characterization of a Human Osteosarcoma Cell Line (Saos-2) with Osteoblastic Properties," *Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 47, pp. 4961–4966, 1987.
- [115] C. Pautke *et al.*, "Characterization of Osteosarcoma Cell Lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in Comparison to Human Osteoblasts," *Anticancer Res.*, vol. 24, pp. 3743–3748, 2004.
- [116] M. Prideaux *et al.*, "SaOS2 Osteosarcoma Cells as an In Vitro Model for Studying the Transition of Human Osteoblasts to Osteocytes," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 95, no. 2, pp. 183–193, 2014.
- [117] ATTC e LGC Standards, "http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-85.aspx?geo_country=it."
- [118] M. Licciardello, "Membrane polimeriche elettrofilate con componenti piezoelettriche: caratterizzazione e valutazione degli effetti su cellule simil-ossee," Politecnico di Torino, 2017.
- [119] B. M. Collett, "Scanning Electron Microscopy: a Review and Report of Research in Wood Science," *Wood Fiber Sci.*, vol. 2, pp. 113–133, 1970.
- [120] "<https://docplayer.it/10014739-Microscopio-ottico-in-campo-chiaro.html>."

- [121] P. L. Fabbri and M. Tonelli, "Corso di Microscopia Elettronica a Scansione." .
- [122] M. Scimeca, S. Bischetti, H. K. Lamsira, R. Bonfiglio, and E. Bonanno, "Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis," *Eur. J. Histochem.*, vol. 62, no. 2841, pp. 89–98, 2018.
- [123] S. Fiorilli, "Spettroscopia infrarossa: principi e applicazioni. Lezione del Corso Materiali e Superfici Ingegnerizzate per Applicazioni in Medicina." 2017.
- [124] "<https://biomateriali.files.wordpress.com/2012/12/tga.pdf>." .
- [125] A. I. El-Batal, F. A. E.-L. Gharib, S. M. Ghazi, A. Z. Hegazi, and A. G. M. A. El Hafz, "Physiological Responses of Two Varieties of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to Foliar Application of Silver Nanoparticles," *Nanomater. Nanotechnol.*, vol. 6, no. 13, 2016.
- [126] Z. Gao, C. Zhi, Y. Bando, D. Golberg, M. Komiyama, and T. Serizawa, "Efficient disentanglement of boron nitride nanotubes using water-soluble polysaccharides for protein immobilization," *RSC Adv.*, vol. 2, no. 15, pp. 6200–6208, 2012.
- [127] Y. Huang *et al.*, "Nanospherical arabinogalactan proteins are a key component of the high-strength adhesive secreted by English ivy - Supporting Information," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, pp. 1–11, 2016.
- [128] D. Hennings and S. Schreinemacher, "Characterization of Hydrothermal Barium Titanate," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 9, pp. 41–46, 1992.
- [129] M. Singh, B. C. Yadav, A. Ranjan, M. Kaur, and S. k. Gupta, "Synthesis and characterization of perovskite barium titanate thin film and its application as LPG sensor," *Sensors Actuators B. Chem.*, vol. 241, pp. 1170–1178, 2017.
- [130] M. K. Trivedi *et al.*, "Impact of Biofield Treatment on Atomic and Structural Characteristics of Barium Titanate Powder," *Ind. Eng. Manag.*, vol. 4, no. 3, p. 1000166, 2016.
- [131] M. R. a Bhuiyan, M. M. Alam, M. a Momin, M. J. Uddin, and M. Islam, "Synthesis and Characterization of Barium Titanate (BaTiO₃) Nanoparticle," *Int. J. Mater.*

Mech. Eng., vol. 1, no. April, pp. 21–24, 2012.

- [132] O. Harizanov, A. Harizanova, and T. Ivanova, “Formation and characterization of sol–gel barium titanate,” *Mater. Sci. Eng. B*, vol. 106, pp. 191–195, 2004.
- [133] S. F. Mendes, C. M. Costa, C. Caparros, V. Sencadas, and S. Lanceros-Méndez, “Effect of filler size and concentration on the structure and properties of poly(vinylidene fluoride)/BaTiO₃nanocomposites,” *J. Mater. Sci.*, vol. 47, no. 3, pp. 1378–1388, 2012.
- [134] L. Bi *et al.*, “Effects of different cross-linking conditions on the properties of genipin-cross-linked chitosan/collagen scaffolds for cartilage tissue engineering,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 22, no. 1, pp. 51–62, 2011.
- [135] G. G. Genchi *et al.*, “Ultrasound-activated piezoelectric P(VDF-TrFE)/boron nitride nanotube composite films promote differentiation of human SaOS-2 osteoblast-like cells,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 14, no. 7, pp. 2421–2432, 2018.

Ringraziamenti

Dopo tanti mesi di lavoro trovo sia giusto ringraziare le persone che mi hanno aiutata e sostenuta in questo percorso, ognuna a modo suo.

Innanzitutto ci tengo a ringraziare i miei relatori, il prof. Gianluca Ciardelli e la prof.ssa Tonda-Turo, per avermi permesso di svolgere questo progetto di tesi e per avermi seguita con professionalità e disponibilità durante l'intero periodo.

Ringrazio anche il gruppo di ricerca di bioingegneria industriale del Politecnico di Torino e della sede di Alessandria.

Un prezioso ringraziamento lo rivolgo a Michela, la dottoranda che chiunque vorrebbe avere come *supervisor* per la tesi. Non potevo sperare in una persona migliore. Disponibilità, professionalità, precisione, pazienza, simpatia, gentilezza e dolcezza sono solo alcune delle sue qualità, sicuramente quelle che mi hanno permesso di intraprendere il lavoro in laboratorio nel migliore dei modi. Pur essendo sempre molto impegnata, non ha mai smesso di essere presente nel momento del bisogno. È stata un punto di riferimento imprescindibile in questi mesi di lavoro e non posso che ringraziarla immensamente per il tempo che mi ha dedicato.

Ringrazio anche Giulia e Viola per aver rallegrato le intere giornate in cui ho usato l'*electrospinning* e per avermi dato consigli utili al lavoro.

Un ringraziamento speciale va rivolto alla mia famiglia, che sicuramente merita molto più di quello che riuscirò ad esprimere in queste righe.

Grazie mamma e papà per i sacrifici e le difficoltà che avete dovuto affrontare e superare per permettermi di studiare e di raggiungere questo traguardo importante. So che sono stati anni faticosi anche per voi, e purtroppo sono stati di più rispetto a quello che vi aspettavate e per questo mi dispiace, ma come si dice?! Meglio tardi che mai! Sono stati anni colmi di alti e bassi che, però, hanno contribuito a rafforzarci come persone e come famiglia. Voglio ringraziarvi per non avermi mai fatto mancare nulla e per avermi sempre sostenuta ed incoraggiata a seguire il mio cuore e la mia strada.

Marco, fratellone mio, non importa se non viviamo più sotto lo stesso tetto o se ci sentiamo poco perché so che se ho qualche problema o se ho bisogno di un consiglio

tu ci sei. E così è stato durante questo periodo universitario. Infatti sei stato l'unico della famiglia a capire veramente il mio stato d'animo e sei sempre stato disponibile ad ascoltarmi e a sostenermi. Le tue risposte alle mie domande, a volte, hanno risuonato come l'eco del mio animo, come se io le conoscessi già ma fossi tu a darmene la consapevolezza. Quindi grazie per avermi aperto la mente in diverse occasioni e grazie per essere quell'occhio critico esterno che però si preoccupa ed è sincero, ne ho avuto bisogno e credo che ne avrò bisogno per sempre.

Non posso non ringraziare anche Pako, il cane più bello, dolce e furbo del mondo che ha la capacità di farti apprezzare e amare la vita ogni giorno.

Un ringraziamento di cuore va a Simo, che anche durante questi mesi di lavoro è stato un punto di riferimento importante per me. Ogni momento, triste o felice, l'ho condiviso con te. Ti ringrazio perché la passione e lo stacanovismo che metti nel tuo lavoro mi hanno spesso spronata a fare tutto il possibile e a non darmi mai per vinta ed il tuo amore mi ha confortata e rafforzata nei momenti più duri.

Infinitamente grazie a Cri, la sorella che non ho mai avuto ma che ho trovato e scelto. Non ci sono parole esaustive per esprimere quanto la tua amicizia sia stata fondamentale in questi anni. Qualsiasi fosse il mio problema sapevo che potevo contare su di te. Mi hai sempre accompagnata e sostenuta durante tutto il percorso, facendomi rialzare quando sono caduta e spingendomi quando mi ero bloccata. Come te, ci sono altri amici preziosi che ci tengo a ringraziare in questo momento. Fra, Giulia, Fede e Remo siete stati importanti perché non penso possa esistere la vita senza rapporti che ti permettono di vedere il mondo attraverso altri occhi. Ho sempre sentito il vostro appoggio e i momenti di felicità, allegria, pazzia e spensieratezza che abbiamo passato insieme hanno contribuito a rendere speciali questi anni universitari, come quelli liceali.

Un grazie particolare va alla mia meravigliosa madrina Rosanna e a Gianni, che con immensa tristezza non potrà partecipare a questa gioia, anche se lo custodisco nel mio cuore. Avete sempre creduto in me e mi avete dato il coraggio e la forza per affrontare qualsiasi ostacolo.

Grazie a Lalluch, Max, Andrea e Clara che mi sono sempre rimasti a fianco, anche se ognuno ha già preso la propria strada. Ho sempre sentito il vostro incoraggiamento e la vostra forza.

Un sincero ringraziamento va a tutti i colleghi universitari che ho conosciuto durante questi anni e che hanno condiviso con me paure, difficoltà, fatiche e successi. Ringrazio Alice, Martina e Valentina per aver costituito il miglior gruppo di lavoro possibile e per essere delle persone vere e di cuore. Grazie a Sara e Maria Stefania per la simpatia e la gentilezza che hanno sempre dimostrato di avere. Ringrazio Chiara, sicula dall'animo sensibile, per lo studio insieme e per il continuo supporto reciproco. Grazie ai ragazzi della sala tesisti che si sono susseguiti nei mesi, che hanno condiviso le mie stesse esperienze e che hanno rallegrato i giorni passati a scrivere la tesi: Gabriele, Valentina, Giovanna, Giovanna, Marika, Dario, Laura, Irene, Mattia, Gerardina, Gabriele, Irene, Antonia. In particolare voglio ringraziare Maria Grazia, Federica e Laura S., persone meravigliose che mi sono state sinceramente vicine.

Vorrei ringraziare i miei parenti, che si sono sempre preoccupati per me: zia Franca, Elisa, Simone e Tiziana, zia Maria e zio Nino, zia Rosetta, zio Nello e Marianne, zio Gino e Maria Grazia.

Grazie anche agli amici di famiglia più cari, che mi hanno sostenuta anche se non eravamo sempre in contatto: Michela e Paki, Milena, Federica e Francesca e la loro nonna Maria.

Grazie, avete contribuito a farmi diventare la persona che sono.