

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria dei Materiali

Tesi di Laurea Magistrale

Idrogel fotoreticolabili a base cellulosa e amido



Relatore

Prof. Marco Sangermano

Candidato

Lorenzo Gatti

Marzo 2021

Sommario

1. Introduzione	4
1.1 Gli idrogel	5
1.2 Tipologie di idrogel.....	6
1.3 Caratterizzazione degli idrogel	8
1.3.1 Misure di rigonfiamento.....	8
1.3.2 Grado di reticolazione	8
1.3.3 Analisi reologiche	10
1.3.4 Biocompatibilità	11
1.3.5 Analisi NMR.....	12
1.4 Bibliografia e sitografia.....	14
1.5 Indice figure.....	15
2. La cellulosa	16
2.1 Struttura della cellulosa.....	16
2.1.1 Livello molecolare	16
2.1.2 Livello supramolecolare	17
2.1.3 Struttura morfologica	17
2.2 La cellulosa cristallina.....	19
2.3 Eterificazione della cellulosa.....	20
2.4 Esterificazione della cellulosa	21
2.5 Idrogel a base metilcellulosa	22
2.6 Idrogel a base di carbossimetilcellulosa sodica	26
2.7 Idrogel a base idrossipropilcellulosa	30
2.8 Bibliografia e sitografia.....	32
2.9 Indice figure	34
2.10 Indice tabelle	36
3. Amido	36
3.1 Struttura dell'amido	37
3.2 Gelificazione e retrodegradazione dell'amido.....	38
3.3 Idrogel fotoreticolabili a base amido	39
3.4 Bibliografia e sitografia.....	42
3.5 Indice figure	42
3.6 Indice tabelle	42

1. Introduzione

Il seguente lavoro di ricerca ha ad oggetto gli idrogel che, come noto, sono dei colloidali formati da catene polimeriche di molecole disperse in acqua, il cui contenuto del mezzo acquoso può superare il 99%. Le catene polimeriche formano tra di loro un network tridimensionale in grado di intrappolare l'acqua circostante e di mantenerla al loro interno per una determinata quantità di tempo, a seconda del tipo di preparazione che si è utilizzata per sintetizzare l'idrogel.

Gli idrogel esistono da più di mezzo secolo e da quando sono stati sintetizzati la prima volta nel 1960 hanno trovato, grazie ad una costante ed esponenziale crescita, sempre più impieghi sia in ambito biomedico, per la sostituzione di tessuti umani, che quale ambiente favorevole per la coltura cellulare.

L'obiettivo della seguente ricerca bibliografica è volto a fornire una presentazione degli sviluppi scientifici raggiunti negli ultimi anni in ordine all'utilizzo di materiali derivanti dal mondo vegetale al fine di utilizzare gli stessi come base per la creazione di idrogel fotoreticolabili.

Il lavoro è diviso in tre capitoli, suddivisi come di seguito; nel primo capitolo verranno fornite delle classificazioni utili a suddividere le varie tipologie di idrogel e i principali metodi di caratterizzazione che vengono comunemente utilizzati per lo studio di questi materiali. Nel secondo capitolo verrà trattata la cellulosa, andandone a descrivere la struttura e le principali caratteristiche per poi andare ad analizzare, caso per caso, le funzionalizzazioni che vengono effettuate su questo polimero per produrre gli idrogel fotoreticolabili e i loro principali utilizzi.

Infine, nel terzo e ultimo capitolo verrà trattato l'amido e gli idrogel fotoreticolati a base di questo polimero che, rispetto alla cellulosa, non si è ancora affermato come materiale per l'ingegneria tissutale, nonostante nel 2020 sia stato effettuato un lavoro pionieristico che ha dato dei risultati promettenti per futuri studi e impieghi di questo polimero in ambito biomedico.

1.1 Gli idrogel

Gli idrogel sono dei materiali polimerici reticolati in un network 3D in grado di assorbire, rigonfiandosi, elevate quantità di solvente con il quale formano un composto insolubile a breve o lungo termine (1).

Il primo idrogel che è stato sintetizzato e descritto risale al 1960, Wichterle e Lim crearono un network di poliidrossietilmetacrilato (pHEMA) per sviluppare le prime lenti a contatto (2).

Con il passare degli anni, soprattutto dagli anni 70 in poi, la ricerca si è concentrata sempre di più sullo sviluppo di idrogel grazie a nuovi materiali e alle nuove sfide che i ricercatori si sono posti. In figura 1 è possibile osservare come il numero di pubblicazioni sulla rivista scientifica "PubMed" con la parola chiave "Hydrogels" è aumentata esponenzialmente dagli anni 70 al 2015, e come continua inesorabilmente tutt'ora a crescere.

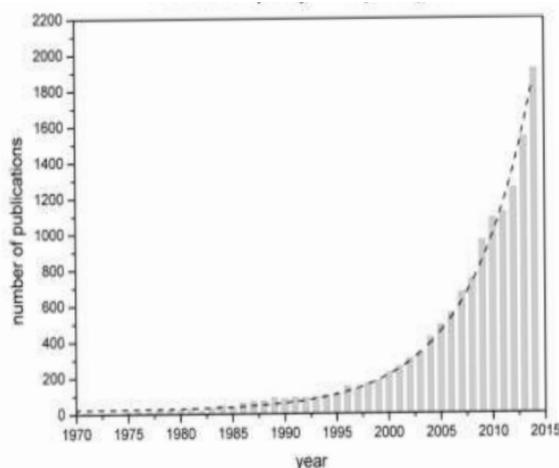


Figura 1: numero di pubblicazioni effettuate dal 1970 al 2015 con la parola "hydrogel" sulla rivista "PubMed".[1]

Secondo una revisione effettuata nel 2014 dal titolo "Hydrogels in a historical perspective: From simple network to smart materials" (3) la ricerca nello sviluppo degli idrogel si può dividere in 3 sezioni:

- i. la prima generazione di idrogel, partendo dagli studi di Wichterle e Lim sugli idrogel a base pHEMA (2) e successivamente sul PVA (4) e il PEG (5), aveva come obiettivo la creazione di idrogel con buone proprietà rigonfianti e meccaniche che permettessero non solo il mantenimento della forma, ma garantissero lo scambio di ossigeno tra l'occhio e l'esterno;
- ii. negli anni 70 si cominciarono ad effettuare ricerche per sviluppare degli idrogel in grado di rispondere a stimoli esterni e che possedessero la transizione da *liquid like* a *solid like* in funzione dell'ambiente in cui si trovano, come ad esempio variando la temperatura, il pH o la concentrazione di specifiche molecole (6). Questo passaggio rivoluzionò i campi di applicazione degli idrogel, acquisirono infatti molto interesse nell'ambito biomedicale per applicazioni *in situ* di chirurgia non invasiva e per il trasporto e rilascio di farmaci nei pazienti (7-8);
- iii. la terza generazione di idrogel si è sviluppata a partire dagli anni 90 e si è orientata verso la produzione di idrogel stereo complessi (PEG-PLA) (9) per creare idrogel autoassemblanti con

interazioni fisiche e senza l'uso di crosslinker chimici che potessero essere iniettabili in situ nei pazienti.

Infine lo sviluppo degli idrogel si sta spostando verso la creazione dei cosiddetti "smart materials", ossia matrici polimeriche con un ampio spettro di proprietà modificabili e capaci di reagire a diversi stimoli, l'applicazione principale per cui si sviluppano questi idrogel è la riparazione tissutale(10).

1.2 Tipologie di idrogel

Esistono diversi modi per classificare le varie tipologie di idrogel, di seguito vengono descritte le tre principali:

- i) il primo è in base ai legami che si formano tra le varie catene polimeriche, che possono essere fisici o chimici. Nel primo caso i legami sono più deboli rispetto ai secondi perché ci sono soltanto forze elettrostatiche, legami idrogeno, interazioni idrofobiche o entanglements che tengono unite le macromolecole, questo fa sì che la reticolazione sia reversibile, infatti in alcuni casi basta una variazione di temperatura o di pH per osservare la rottura del reticolo. Quando invece ci si trova di fronte ad idrogel che possiedono legami chimici intermolecolari si osservano legami covalenti tra le varie catene che formano il reticolo, questo fa sì che gli idrogel chimici possiedano maggiore stabilità e forza meccanica e che quindi mantengano le loro proprietà per maggior tempo;
- ii) un altro modo di caratterizzare gli idrogel è in base al precursore che viene utilizzato durante la sua produzione, infatti si possono trovare monomeri, oligomeri o polimeri. Nel primo caso si possono citare il PEG e il PPO (polifenilenoossido) che sono dei buoni carriers per il trasporto di farmaci, nel secondo si usano polimeri a basso peso molecolare che sono in grado di polimerizzare formando il network. Un esempio è il poliuretano, questo viene utilizzato come trappola per agenti inquinanti nel trattamento delle acque. Infine, partendo da polimeri che vengono opportunamente trattati per essere resi idrofilici e solubili in acqua per poi essere reticolati, in questa categoria si possono inserire, ad esempio, catene polisaccaridiche come la cellulosa, che viene prima resa solubile formando ad esempio la carbossimetilcellulosa CMC e poi reticolata grazie al diamminopropano o l'anidride metacrilica.(16-17);
- iii) Ancora un'ulteriore classificazione può essere fatta in base alla natura del polimero che viene utilizzato; esistono infatti polimeri naturali e sintetici. I principali polimeri naturali sono le proteine, come ad esempio il collagene e i polisaccaridi, come la cellulosa, l'alginato e l'amido. I vantaggi principali di questa categoria sono che gli idrogel basati su fonti naturali sono biodegradabili e alcuni biocompatibili, di contro però hanno la possibilità di contenere agenti patogeni che vanno eliminati o comunque tenuti sotto controllo e rispetto a quelli sintetici hanno caratteristiche meccaniche più scarse. I polimeri sintetici sono costituiti da monomeri che non per forza provengono dal petrolio, possono derivare infatti anche da fonti naturali come l'acido lattico che deriva da piante come il mais e la canna da zucchero; tuttavia, la maggior parte di essi deriva da risorse fossili come l'acetato di vinile o il glicole etilenico. Questa tipologia di polimeri è particolarmente interessante in quanto possono essere sintetizzati in modo molto accurato facendo sì che posseggano precise proprietà e funzioni, cosa che con i polimeri naturali risulta più difficile in quanto non si riesce ancora ad avere una ripetibilità precisa dei diversi lotti. Lo svantaggio principale di questa categoria di polimeri è che non sono biodegradabili e non hanno proprietà bioattive, restano comunque molto utilizzati in quanto sono biocompatibili (16).

1.3 Caratterizzazione degli idrogel

Per poter caratterizzare gli idrogel fotoreticolabili a base di cellulosa e amido, che verranno trattati nei capitoli 2 e 3, occorre effettuare una serie di analisi, di seguito descritte, che permettono ai ricercatori di ottenere importanti informazioni riguardo i processi chimici e fisici che si verificano durante la preparazione degli idrogel.

1.3.1 Misure di rigonfiamento

Le prove di swelling o rigonfiamento sono molto importanti in quando analizzando la percentuale d'acqua che viene assorbita dall'idrogel durante il rigonfiamento da un feedback sul rilascio di farmaci (1). Quando un idrogel comincia ad assorbire acqua questa interagisce con i gruppi polari delle catene polimeriche e viene denominata "*primary bound water*". Man mano che questi gruppi vengono idratati l'idrogel comincia a rigonfiarsi, esponendo anche i gruppi idrofobi che anch'essi interagiscono con l'acqua e portano alla cosiddetta "*secondary bound water*". L'acqua legata in modo primario e secondario viene comunemente definita come l'acqua "totalmente legata" e differisce dall'acqua che viene semplicemente intrappolata nel *network* polimerico per effetto osmotico ("*free water*"). Il processo di rigonfiamento viene bilanciato dai legami del *network* polimerico che si comportano come una molla facendo sì che ad un certo punto venga raggiunto l'equilibrio(1).

La prova che viene svolta usualmente per valutare la percentuale di solvente intrappolato nel reticolo è quella gravimetrica; l'idrogel viene pesato all'equilibrio con il solvente, ovvero quando non si osservano più variazioni di volume, successivamente viene liofilizzato per far sublimare tutta l'acqua adsorbita e il grado di rigonfiamento viene calcolato tramite la seguente equazione:

$$S_w\% = \frac{W_{eq} - W_d}{W_{eq}} * 100$$

Dove W_{eq} è il peso dell'idrogel in equilibrio con il solvente, W_d è il peso del campione liofilizzato.

1.3.2 Grado di reticolazione

Il grado di reticolazione può essere valutato grazie alla spettroscopia a-trasformata di Fourier infrarossa (FTIR) la quale fornisce importanti informazioni sui legami chimici che compongono una molecola, sia qualitativi che quantitativi.

Il principio di funzionamento è basato sul fatto che, irradiando una molecola con uno spettro di radiazione infrarossa che va da 4000 a 500 cm^{-1} quando è presente un legame chimico in grado di assorbire quella determinata energia associata all'energia del legame chimico, esso va in risonanza con la radiazione e ne assorbe una parte, passando dal suo stato vibrazionale fondamentale ad uno eccitato. È importante ricordare che la condizione necessaria affinché si possa verificare una transizione vibrazionale da parte di una radiazione infrarossa, è che si verifichi un cambiamento del dipolo elettrico; quindi molecole omoatomiche come N_2 e O_2 non sono rilevabili con questa analisi, mentre molecole apolari come ad esempio la CO_2 possono entrare in risonanza con la radiazione IR solo grazie alle vibrazioni asimmetriche in modo che creino dei dipoli istantanei.

In un tipico spettro FTIR in ordinata troviamo la trasmittanza mentre in ascissa la frequenza espressa in numero d'onda del fascio incidente che colpisce il campione come riportato in figura 2. Se il materiale analizzato è completamente trasparente alla radiazione si rileverà una linea parallela all'asse delle ascisse, mentre se non è trasparente si troveranno dei picchi di ampiezza ed altezza variabile in base ai legami chimici che hanno assorbito la radiazione IR. (12-13)

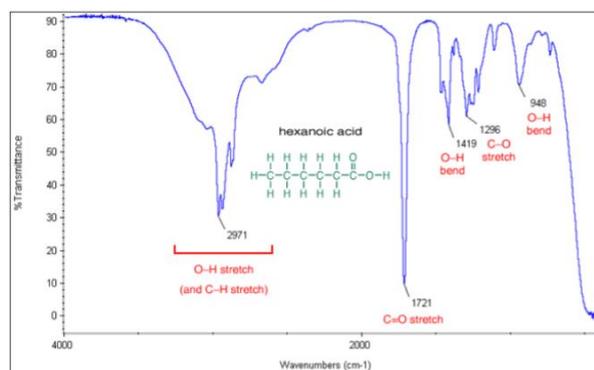


Figura 2: esempio di diagramma FTIR. [2]

I moti vibrazionali dei legami molecolari sono di due tipi: di stretching e di bending; il primo è uno stiramento del legame che si allunga e si accorcia come una molla e può essere simmetrico o asimmetrico in base al movimento degli atomi durante la vibrazione, mentre il secondo è una variazione dell'angolo di legame che può essere simmetrica nel piano (scissoring), asimmetrica nel piano (rocking) oppure quella fuori dal piano che può essere simmetrica (wagging) o asimmetrica (twisting).

Lo spettro infrarosso lo si può dividere in tre zone: la prima è quella dei gruppi funzionali, che è confinata tra 3800 e 1300 cm⁻¹ e comprende le bande dovute agli stretching e i bending dei gruppi funzionali come ad esempio O-H, N-H, C=C, N=O, C=O, ecc..

Nella seconda zona, che si estende da 1300 a 650 cm⁻¹ si trova la zona delle "impronte digitali" che deve il suo nome al fatto che in questo intervallo di frequenze si trovano le bande caratteristiche di ogni molecola, perché sono originate da vibrazioni dell'intero scheletro molecolare.

Nella terza zona (650 -200 cm⁻¹) le bande che si trovano sono dovute allo stiramenti di atomi pesanti, deformazioni di gruppi privi di idrogeno e vibrazioni di scheletro.

Tutti i picchi che si trovano nello spettro possono essere acuti o ampi; i primi sono caratterizzati da una lunghezza d'onda caratteristica di assorbimento che porta in risonanza quel legame, mentre quelli ampi indicano che quel legame ha un range di lunghezze d'onda con cui può vibrare. In particolare si può far riferimento allo stretching del gruppo O-H che produce un ampio picco tra 3500 e 3000 cm⁻¹ che è influenzato dall'intorno chimico nel quale è immerso il campione; in questo caso, parlando di idrogel, sarà l'acqua con i suoi legami chimici ad influenzare la misurazione. (12-13)

Grazie a questa tecnica si riesce ad analizzare quanti gruppi funzionalizzati hanno reagito durante la reticolazione andando a vedere la diminuzione dei picchi caratteristici, ad esempio, dei doppi legami che si sono rotti per creare la reticolazione e conferisce quindi conferme ai ricercatori se le reazioni che si vogliono ottenere siano effettivamente avvenute.

1.3.3 Analisi reologiche

Le proprietà meccaniche degli idrogel vengono valutate attraverso analisi reologiche. Per far ciò si usa il reometro, il quale ha diverse configurazioni geometriche, quella più versatile ed utilizzata è quella a piatti piani paralleli.(14)

Per descrivere il comportamento reologico si possono utilizzare 2 diversi metodi di analisi, il metodo statico e il metodo dinamico. Con il metodo statico si impostano degli stress di taglio e si aspetta la risposta nel tempo del campione quindi si valutano le proprietà di scorrimento, mentre con il metodo dinamico si applicano degli sforzi che variano seguendo delle armoniche e servono per valutare le proprietà di deformabilità della struttura del campione senza però arrivare allo scorrimento.

La scala del tempo in reologia si ottiene con il numero di Deborah, che è adimensionale ed è definito come:

$$De = \tau / T$$

Dove T è il tempo di osservazione del fenomeno, mentre τ è il tempo di rilassamento caratteristico del campione per rispondere alla deformazione.

Il tempo τ è infinito per i solidi elastici e zero per i liquidi newtoniani. Alti numeri di Deborah indicano un comportamento elastico del materiale, mentre bassi numeri un comportamento viscoso.

Nell'analisi degli idrogel il numero di Deborah corrisponde alla differenza tra il tempo caratteristico di rilassamento del composto polimero-solvente e il tempo caratteristico di diffusione del solvente all'interno del polimero. In questo caso quando De è molto maggiore di 1 non abbiamo sostanzialmente variazioni nella struttura del polimero durante la fase di idratazione, mentre quando De è molto minore di 1 la struttura del polimero cambia rapidamente man mano che il solvente fluisce al suo interno.

In entrambe le situazioni, $De \gg 1$ e $De \ll 1$, la diffusione di Fick è il meccanismo predominante; mentre quando il numero di Deborah tende a 1 il processo di rigonfiamento non risponde più alla legge di Fick in quanto il processo di rilassamento influenza il processo diffusivo.

Proprietà come rigidità, viscosità, modulo dissipativo (*loss modulus*) indicato come G'' e modulo di conservativo (*storage modulus*) indicato come G' , possono cambiare applicando stress di varia intensità, questo cambiamento può essere istantaneo o può cambiare con il passare del tempo. La maggior parte degli idrogel mostrano un comportamento di shear thinning dato dal fatto che la viscosità diminuisce aumentando lo sforzo di taglio a flusso costante. Quindi essi sono classificati come materiali tissotropici, ovvero materiali che subiscono uno shear thinning dipendente dal tempo, seguito da uno stato di recupero.

Quando vengono effettuate delle prove dinamiche sui campioni si impongono delle sollecitazioni (stress o deformazioni) la cui intensità varia in modo sinusoidale nel tempo. Il campione viene monitorato misurando l'intensità della risposta e lo sfasamento rispetto allo stimolo applicato. In questo modo si riescono a ricavare i parametri di G' G'' (14-15).

Un'altra configurazione che viene spesso adottata per lo studio degli idrogel fotoreticolabili è quella dell'analisi fotoreologica. In questo tipo di analisi il piatto inferiore, il quale è solitamente in metallo, viene sostituito con un disco di quarzo trasparente agli UV. Con una fibra ottica passante per il supporto del disco

in quarzo si illumina il campione per far avvenire la reticolazione e si studia il suo comportamento durante la reticolazione. È così possibile avere informazioni sulla velocità di reticolazione.

1.3.4 Biocompatibilità

Nel campo biomedico e farmaceutico per poter utilizzare gli idrogel è di fondamentale importanza che essi siano biocompatibili e non tossici.

La biocompatibilità è la capacità di un materiale di esplicare la propria funzione con un appropriata risposta da parte del sistema vivente che lo ospita; intendendo risposta appropriata come la specifica risposta del biomateriale in base alla particolare zona dell'organismo nel quale sia stato introdotto.

La valutazione della biocompatibilità viene effettuata in vivo e in vitro per comprendere la sicurezza e l'efficacia del materiale all'interno dell'ospite. Questi test vengono prima effettuati su animali e se non emergono problematiche si passa alla sperimentazione sull'uomo.

Prima di effettuare prove in vivo bisogna dimostrare non citotossicità dell'idrogel attraverso prove in vitro. Esistono 2 tipi di prove, nella prima il campione viene messo a contatto con soluzioni fisiologiche isolate dal soggetto o simulate e si osserva in seguito ad un determinato periodo di incubazione a 37°C e si osservano i cambiamenti che possono avvenire sia nella soluzione che nel campione. L'altra tipologia di prove consiste nel valutare la capacità delle cellule specifiche, con le quali il campione andrà a contatto in vivo, di moltiplicarsi sul materiale.

Uno dei problemi fondamentali per gli idrogel utilizzati in campo biomedico è la presenza di elementi tossici al loro interno. Questi elementi possono essere iniziatori, solventi, stabilizzatori, monomeri e crosslinkers non reagiti. Per rendere gli idrogel compatibili normalmente vengono effettuati dei processi di purificazione come ad esempio dei lavaggi con acqua calda.

Quando invece si utilizza la tecnica della gelificazione in situ, normalmente la soluzione composta dai monomeri o gli oligomeri insieme al solvente, gli iniziatori e i crosslinkers vengono posizionati direttamente in vivo e successivamente fatti reagire. Questa tecnica è la meno invasiva, tuttavia bisogna porre particolare attenzione al fatto che tutti i materiali non siano tossici e che reagiscano completamente.(15)

1.3.5 Analisi NMR

L'analisi NMR (Risonanza Magnetica Nucleare) è di grande importanza nello studio e nella preparazione degli idrogel, essa infatti è una tecnica molto sensibile che fornisce informazioni qualitative e quantitative sulla struttura delle molecole che si stanno utilizzando. Nei seguenti capitoli l'analisi NMR è stata utilizzata sia per verificare che determinate reazioni fossero avvenute con successo, ma anche per avere informazioni sul grado di sostituzione dei gruppi -OH da parte di molecole utilizzate successivamente per ottenere la fotoreticolazione.

L'NMR è una tecnica non distruttiva che basa il suo funzionamento sull'orientazione e lo scostamento del momento magnetico μ dei nuclei che posseggono un numero di massa o una carica dispari e quindi uno spin nucleare I diverso da zero, posti all'interno di un campo magnetico B_0 . I nuclei che vengono utilizzati nell'ambito di questi studi sono il ^1H e il ^{13}C che posseggono uno spin $I=1/2$.

I nuclei di questi atomi posseggono un vettore momento magnetico μ che è orientato casualmente nello spazio se non vi sono campi magnetici che lo perturbano o se comunque sono trascurabili come quello terrestre (30–70 μT). Quando viene applicato un campo magnetico di maggiore intensità il vettore μ tende ad allinearsi parallelamente al campo ed esistono due configurazioni che il vettore μ può assumere; nella prima il vettore μ si orienta nello stesso verso del campo magnetico (stato α), mentre nella seconda nel verso opposto (stato β). Queste due orientazioni hanno energie differenti e la differenza tra i due livelli di energia è direttamente proporzionale all'intensità del campo magnetico applicato secondo la relazione:

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0$$

Dove E è l'energia, γ è una costante di proporzionalità chiamata rapporto giromagnetico che lega il momento magnetico al momento angolare di spin I secondo la relazione $\mu = \gamma I$ e B_0 è il campo magnetico applicato. In figura 3 è possibile osservare lo scostamento dei livelli energetici all'aumentare del campo magnetico applicato.

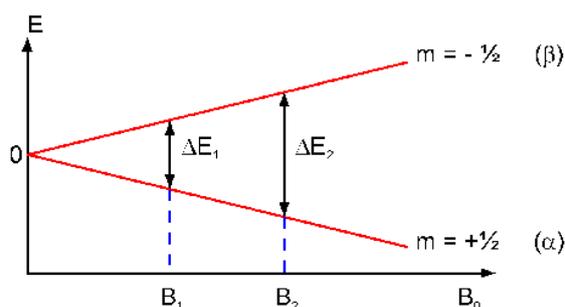


Figura 3: scostamento dei livelli energetici dei momenti magnetici con l'incremento del campo magnetico [3]

Quando viene mandata sul campione una radiazione in radiofrequenza ad impulsi con energia $E = h\nu$ che corrisponde esattamente al salto energetico tra lo stato α a più bassa energia e lo stato β a più alta energia il nucleo nello stato α si ecciterà assorbendo la radiazione e passando allo stato a maggior energia ed invertendo il proprio spin. Il segnale che viene rilevato dallo spettrometro è quello rilasciato dai nuclei eccitati durante il loro rilassamento. Questi segnali corrispondono a dei picchi sul diagramma

assorbanza/frequenza. In base all'intorno chimico dell'atomo considerato il segnale subisce degli scostamenti ed è grazie a questi scostamenti che è possibile ricostruire completamente la struttura della molecola. (18-19)

1.4 Bibliografia e sitografia

- (1) History and application of Hydrogels. Naziha Chirani, L'Hocine Yahia, Lukas Gritsch, Federico Leonardo Motta, Soumia Chirani, Silvia Faré. *iMedPub Journals*. (2015)
- (2) Hydrophilic Gels for Biological Use. O. Wichterle & D. Lim. *Nature* 185, p. 117-118. (1960)
- (3) Hydrogels in a historical perspective: From simple network to smart materials. Sytze J. Buwalda, Kristel W.M. Boere, Pieter J. Dijkstra, Jan Feijen, Tina Vermonden, Wim E. Hennink. *Journal of Controlled Release*. Volume 190, p. 254-273 (2014).
- (4) Gel formation of aqueous solution of polyvinyl alcohol irradiated by gamma rays from cobalt-60. A. Danno. *Phys. Soc. Jpn.* p. 722-727 (1958).
- (5) Radiation chemistry of aqueous poly(ethylene oxide) solutions. P.A. King, J.A. Ward. *Polym. Sci. A Polym. Chem.* 8 p.253-262 (1970)
- (6) Hydrogels: from soft contact lenses and implants to self-assembled nanomaterials. J. Kopeček, J. Polym. Sci. A Polym. Chem. 47 5929-5946 (2009)
- (7) In situ-forming hydrogels—review of temperaturesensitive systems, E. Ruel-Gariépy, J.-C. Leroux, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 409-426 (2004)
- (8) Thermoresponsive polymers for biomedical applications. M.A. Ward, T.K. Georgiou, *Polymers* 3 1215-1242. (2011)
- (9) Controlled Thermoresponsive Hydrogels by Stereocomplexed PLAPEG-PLA Prepared via Hybrid Micelles of Pre-Mixed Copolymers with Different PEG Lengths. Daniel G. Abebe and Tomoko Fujiwara. *Biomacromolecules* 13, 6, 1828-1836 (2012)
- (10) Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Somasundar Mantha, Sangeeth Pillai, Parisa Khayambashi, Akshaya Upadhyay, Yuli Zhang, Owen Tao, Hieu M. Pham and Simon D. Tran. *MDPI* (2019).
- (11) DLP 3D Printing Meets Lignocellulosic Biopolymers: Carboxymethyl Cellulose Inks for 3D Biocompatible Hydrogels. Giuseppe Melilli, Irene Carmagnola, Chiara Tonda-Turo, Fabrizio Pirri, Gianluca Ciardelli, Marco Sangermano, Minna Hakkarainen and Annalisa Chiappone. *MDPI* (2020).
- (12) <http://webusers.fis.uniroma3.it/iucci/gio/FTIR.pdf> ultima visualizzazione 1/1/2021.
- (13) Wikipedia : spettroscopia infrarossa ultima visualizzazione 1/1/2021.
- (14) Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications, Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications. Syed K. H. Gulrez, Saphwan Al-Assaf and Glyn O Phillips (2011). Available from: <http://www.intechopen.com/books/progress-in-molecular-and-environmental-bioengineering-from-analysis-and-modeling-to-technology-applications/hydrogels-methods-of-preparation-characterisation-and-applications>.
- (15) Novel polymer based hydrogels for biomedical applications. Synthesis, classification and rheological investigation of the hydrogels thixotropic behaviour. Samson Olufemi Abiodun Junior Akanbi. (2015).
- (16) What are Hydrogels? George A. Paleos, Pittsburgh Plastics Manufacturing, Butler, PA (2012)
- (17) Polysaccharide-Based Hydrogels: The Key Role of Water in Affecting Mechanical Properties (2012)
- (18) Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare in biomedicina. <https://www.osti.gov/etdweb/servlets/purl/632764>.
- (19) Spettroscopia NMR: <https://people.unica.it/flaminiacesaremarincola/files/2011/12/Lez10-12-ChimFisBiol-NMR.pdf>.

1.5 Indice figure

[1] figura 1: History and application of Hydrogels. Naziha Chirani, L'Hocine Yahia, Lukas Gritsch, Federico Leonardo Motta, Soumia Chirani, Silvia Faré. iMedPub Journals. (2015)

[2] figura 2: <http://webusers.fis.uniroma3.it/iucci/gio/FTIR.pdf> ultima visualizzazione 1/1/2021.

[3]figura 3: Theory of NMR Spettroscopy:
<http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/projects/schirra/html/theory.htm>

2. La cellulosa

La cellulosa è sintetizzata da una vasta gamma di organismi viventi (1). Solitamente si associa la riserva di cellulosa come prodotto di piante quale il cotone o altri vegetali ciò perché rappresentano la fonte maggiore utilizzata industrialmente per l'estrazione di questo polimero, tuttavia esistono altre fonti di cellulosa che spesso non vengono considerate. Infatti la cellulosa è prodotta anche da batteri e procarioti come ad esempio i cianobatteri (2). La cellulosa, insieme ad altri polisaccaridi come l'amido, è la più grande riserva di energia solare che è presente sul nostro pianeta in quanto è un sottoprodotto che viene creato dagli organismi viventi in seguito alla fotosintesi clorofilliana ovvero dal prodotto di reazione che è il glucosio.

2.1 Struttura

Al fine di descriverne dettagliatamente la struttura della cellulosa occorre definirne i tre livelli strutturali principali :

- 1) Il livello molecolare della singola catena polimerica
- 2) Il livello supramolecolare, ovvero di impacchettamento delle molecole
- 3) Il livello riguardante l'organizzazione delle unità complesse anche detto struttura morfologica

2.1.1 Livello molecolare

La cellulosa è un omopolimero lineare composto da unità fondamentali di glucosio che sono legati tra loro da legami 1,4- β -glucosidici in modo da formare disaccaridi chiamati cellobiosio ($C_6H_{10}O_5$)₂O che, ripetendosi, formano il polimero di cellulosa vero e proprio(1) come si può osservare in figura 1.

I gruppi OH in posizione 2 3 e 6 sono in grado di effettuare le reazioni tipiche degli alcoli mentre all'estremità in posizione 1 l'aldosio possiede proprietà riducenti in quanto, partecipando ad una reazione redox, può ridurre, ossidandosi, l'altro reagente; tuttavia essendo le catene polimeriche molto lunghe, addirittura fino a 15000 unità glucosidiche (1), questo ha un effetto marginale, l'altra estremità, non avendo un aldeide disponibile, non possiede proprietà riducenti.

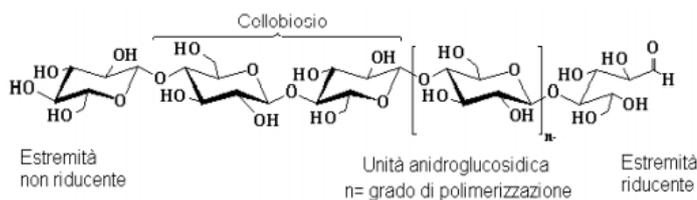


Figura 1: molecola di cellulosa[1]

Gli atomi di ossigeno che fanno da ponte per la chiusura della molecola di glucosio e quelli che fanno da ponte tra le varie molecole di glucosio, insieme ai gruppi -OH, sono responsabili delle interazioni intra e inter molecolari, soprattutto legami idrogeno. Questi ultimi stabilizzano i legami glucosidici e rendono la macromolecola lineare. Ciò si può osservare nella figura 2.

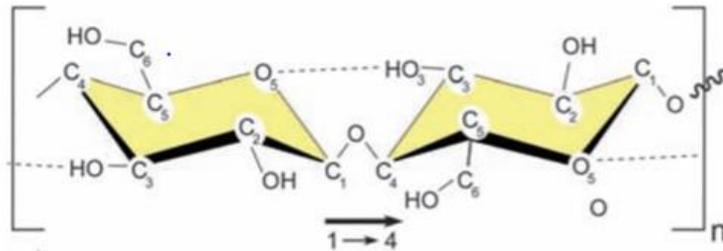


Figura 2: i legami idrogeno che si creano nella macromolecola di cellulosa[2]

Il glucosio è solubile in acqua, tuttavia man mano che cresce il peso molecolare del polimero la solubilità diminuisce. Il numero di unità fondamentali per avere un prodotto insolubile in acqua è di almeno 8; sopra tale limite le varie catene polimeriche hanno una buona affinità e si organizzano tra loro. Nella cellulosa il numero di monomeri che si legano tra loro dipende dalla fonte, come ad esempio nella parete primaria e secondaria delle cellule vegetali, la primaria ha un grado di polimerizzazione tipico di 8000 unità, mentre la secondaria ha un numero più elevato che può arrivare fino a 15000. (1)

2.1.2 Livello supramolecolare

Durante la biosintesi si vengono a formare interazioni intramolecolari di tipo van der Waals e idrogeno tra le varie catene polimeriche permettendo un impaccamento parallelo delle varie catene che prendono il nome di microfibrille, queste possiedono un diametro che può variare da 5 a 50 nm e una lunghezza che può essere di diversi micrometri a seconda della biofonte. Questi legami inter e intramolecolari fanno sì che le microfibrille posseggano una buona rigidità assiale.

Le fibrille sono la fase rinforzante di piante, alberi, alcune creature marine come i tunicati, alghe e batteri

All'interno delle microfibrille si possono osservare delle zone cristalline e delle zone amorfe, le zone cristalline sono di particolare interesse perché sono quelle che vengono estratte ottenendo vari sottoprodotti come ad esempio i nanocristalli di cellulosa (CNC) o modificati per essere funzionalizzati a seconda del prodotto finale che si vuole ottenere.(4)

2.1.3 Struttura morfologica

A livello morfologico la cellulosa si può descrivere come un insieme di polimeri ben organizzati in micro fibrille che a loro volta si organizzano in fibrille che vanno poi a formare la parete cellulare dei vegetali come riportato nella figura sottostante(4).

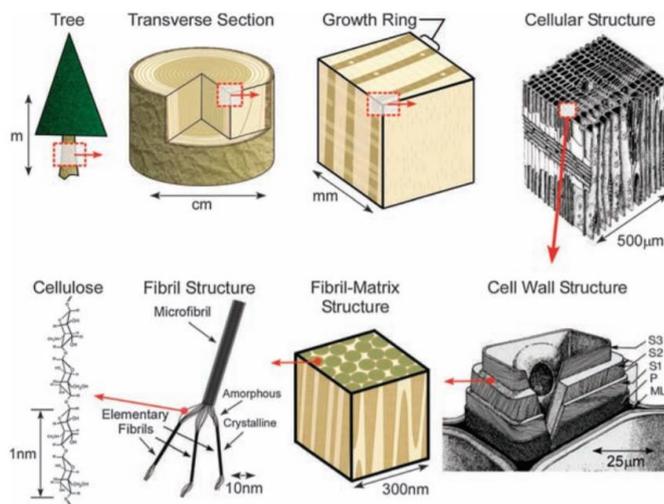


Figura 4: schema che riproduce i vari livelli strutturali della cellulosa[3]

2.2 La cellulosa cristallina

Esistono 6 diversi polimorfismi della cellulosa cristallina (CC) indicati come I, II, III_I, III_{II}, IV_I e IV_{II} figura 4. I primi due sono i più importanti in quanto sono presenti in natura. La CC I è quella maggiormente presente in natura ed è metastabile, mentre la CC II è la forma stabile perché presenta un legame idrogeno in più in quanto le catene si organizzano in modo anti parallelo. È possibile convertire la cellulosa di tipo I in quella di tipo II tramite un processo irreversibile di mercerizzazione (trattandola con idrossido di sodio in soluzione acquosa) oppure tramite un processo sempre irreversibile di rigenerazione (solubilizzazione e ricristallizzazione) (5).

La cellulosa III con struttura esagonale viene ottenuta dalla cellulosa di tipo I o II tramite un processo reversibile trattandola con ammoniaca (6) e dalla cellulosa di tipo IV viene ottenuta partendo dalla cellulosa di tipo III tramite trattamenti termici.

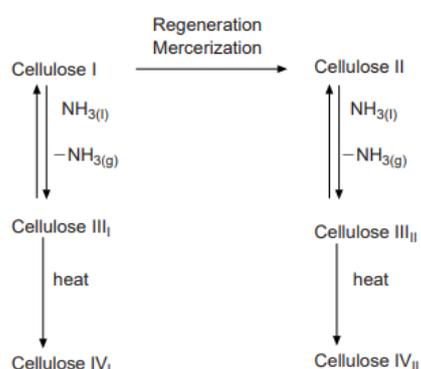


Figura 4: polimorfismi della cellulosa cristallina [4]

A causa della cristallinità della cellulosa, essa è insolubile nella maggior parte dei solventi organici, il che rende difficile l'utilizzo di questo polimero nella sua forma originaria se non per limitate applicazioni, come ad esempio rinforzi di nano cristalli o fibrille di cellulosa in matrici polimeriche (7).

Per superare questa problematica e rendere la cellulosa di maggior interesse tecnologico, essa viene trattata chimicamente andando a sostituire i gruppi ossidrilici presenti sugli anelli glucosidici responsabili della sua elevata cristallinità e quindi insolubilità. (4)

Le reazioni che vengono effettuate maggiormente per raggiungere un buon grado di sostituzione e ottenere prodotti solubili sono l'eterificazione e l'esterificazione (8), partendo dai prodotti di queste reazioni è poi possibile funzionalizzarli per creare gli idrogel fotoreticolabili.

2.3 Eterificazione della cellulosa

Come descritto nel paragrafo precedente occorre sostituire i gruppi idrossilici della cellulosa per ottenere dei prodotti solubili, una delle reazioni che vengono ampiamente utilizzate è quella di eterificazione che permette di sostituire i gruppi –OH con radicali organici come gruppi metili, etili e altri più complessi.

La reazione di eterificazione è la seguente :



(alcool) (alchilcloruro) (etere) (acido cloridrico)

Dove R' corrisponde al gruppo che si vuole sostituire all'idrogeno del gruppo idrossilico, mentre l'alcool è uno dei 3 gruppi idrossilici che si trovano nella molecola di glucosio. In base al gruppo che si andrà a funzionalizzare e al grado di sostituzione si otterranno prodotti differenti con diversi gradi di solubilità come si può osservare in tabella 1 e 2(8).

La maggior parte delle reazioni di eterificazione portano alla formazione di prodotti che non sono biocompatibili e per poter utilizzare la cellulosa funzionalizzata vanno eliminati effettuando dei lavaggi con acqua calda (8).

Cellulose ether	Etherifying agent	Co-product	By-product	
			Name	Formula
Methyl (MC)	methyl chloride	NaCl	methanol dimethyl ether	CH ₃ OH CH ₃ OCH ₃
Ethyl (EC)	ethyl chloride	NaCl	ethanol diethyl ether	C ₂ H ₅ OH C ₂ H ₅ OC ₂ H ₅
Hydroxyethyl (HEC)	ethylene oxide	none	ethylene glycol and polymers thereof	CH ₂ OHCH ₂ OH
Hydroxypropyl (HPC)	propylene oxide	none	propylene glycol and polymers thereof	CH ₃ CH ₂ OHCH ₂ OH
Carboxymethyl (CMC)	chloroacetic acid	NaCl	glycolic acid	HO-CH ₂ -COOH

Tabella 1: principali prodotti che si ottengono dopo un processo di eterificazione della cellulosa{1} .

Cellulose ether	DS	Solubility
MC	0.1–1.1	soluble in 6–8% NaOH
	1.4–2.0	soluble in H ₂ O
	2.4–2.8	soluble in organic solvents
EC	0.8–1.7	soluble in H ₂ O
	2.4–2.8	soluble in organic solvents
NaCMC	0.1–3.0	soluble in H ₂ O
CMC	0.05–0.25	soluble in 6–8% NaOH
HEC	0.11–0.31	soluble in 6–8% NaOH
	0.66–1.66	soluble in H ₂ O
HPC	0.15–0.35	soluble in 6–8% NaOH
	3.5–4.5	soluble in H ₂ O
EHEC [70]	0.68 (ethyl) and 0.87 (hydroxyethyl)	soluble in H ₂ O
	1.9–2.2 (ethyl) and 0.35–0.65 (hydroxyethyl)	soluble in organic solvents
	1.33 (ethyl) and 0.51 (hydroxyethyl)	soluble in both H ₂ O and organic solvents

Tabella 2: grado di sostituzione e solubilità dei principali prodotti di eterificazione che si ottengono trattando la cellulosa. {2}

2.4 Esterificazione della cellulosa

La seconda reazione che viene fatta abitualmente sulla cellulosa è l'esterificazione dei gruppi idrossilici per mezzo di acidi come l'acido acetico e l'acido nitrico (8), la prima esterificazione della cellulosa fu fatta nel 1846 da Schönbein che utilizzò una miscela di acido solforico e acido nitrico sul cotone per produrre la nitrocellulosa; un composto altamente esplosivo e infiammabile dove tutti i gruppi OH sono sostituiti da gruppi esteri nitrati. In quegli anni si cercò di sostituire la polvere da sparo con il fulmicotone, ma la pericolosità nel maneggiare il composto e i costi di produzione in larga scala non permisero un suo utilizzo in campo bellico.(9)

Nel corso degli anni si è riusciti ad ottenere nitrati di cellulosa con un grado di sostituzione minore, rendendo così il composto più stabile e utilizzabile per altri scopi.

La reazione di esterificazione della cellulosa maggiormente utilizzata in campo biomedico e farmaceutico è quella di acetalizzazione della cellulosa, facendola reagire con acido acetico in presenza di acido solforico e ottenendo così l'acetato di cellulosa (AC). Anche qui una volta ottenuto l'AC si fa un lavaggio per eliminare i sottoprodotti di reazione e gli acidi che non hanno reagito(8).

2.5 Idrogel a base metilcellulosa

La metilcellulosa è l'etere più semplice che si può ottenere dalla cellulosa ed è ottenuta facendo reagire la cellulosa con clorometano in soluzione acquosa di idrossido di sodio, come mostrato in figura 5.

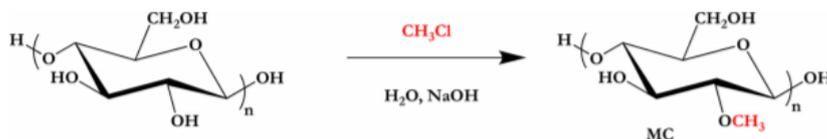


Figura 5: reazione di metilazione della cellulosa [5]

La solubilità della MC, come già visto in tabella 2, è molto influenzata dal grado di sostituzione dei gruppi -OH, infatti finché non si raggiunge un grado di sostituzione compreso tra 1.4 e 2 essa risulta insolubile in acqua fredda. Le soluzioni acquose di MC sono stabili in un range di pH che varia tra 2-12 senza variazioni sostanziali nella viscosità (10).

Una delle caratteristiche più interessanti di questo polimero in soluzione acquosa è la formazione di gel termosensibili reversibili; infatti, scaldando la soluzione sopra i 55°C si ha la transizione da *liquid like* a *solid like* e raffreddando si ha la transizione inversa. La causa di questo comportamento è data dalle interazioni idrofobiche dei gruppi metilici. A temperature inferiori dei 55°C le molecole d'acqua si organizzano in modo da circondare i gruppi metilici rendendo la MC solubile (11).

Come la cellulosa, la MC è classificata come biocompatibile e biodegradabile dalla Food and Drugs Administration (FDA) (12) e il suo utilizzo per la produzione di idrogel termosensibili è stato ampiamente studiato (13-14). Il problema che è stato riscontrato in queste ricerche è che gli idrogel termosensibili a base di questo polimero possiedono limitate proprietà meccaniche in quanto sono molto sensibili alla variazione di temperatura. Questo ne limita i campi di applicazione e infatti essi vengono utilizzati solo come rivestimenti di capsule o compresse per il trasporto di farmaci (15). Per applicazioni dove viene richiesta una maggior stabilità dell'idrogel e maggiori proprietà meccaniche si è passati allo studio di idrogel reticolati da legami chimici e per evitare di utilizzare elementi non biocompatibili la fotopolimerizzazione è la miglior opzione per raggiungere questi obiettivi.

Per poter utilizzare la fotopolimerizzazione radicalica e creare un idrogel di metilcellulosa reticolato chimicamente, e quindi più stabile rispetto all'idrogel termosensibile composto da sola metilcellulosa, nello studio effettuato da Simone S. Stalling et al. (15), la metilcellulosa è stata sottoposta ad una reazione di metacrilazione con anidride metacrilica, come si può osservare in figura 6, andando ad esterificare i gruppi -OH non sostituiti della catena polimerica ottenendo così dei gruppi insaturi che in presenza di un fotoiniziatore e di luce UV potessero reticolare creando un network tridimensionale.

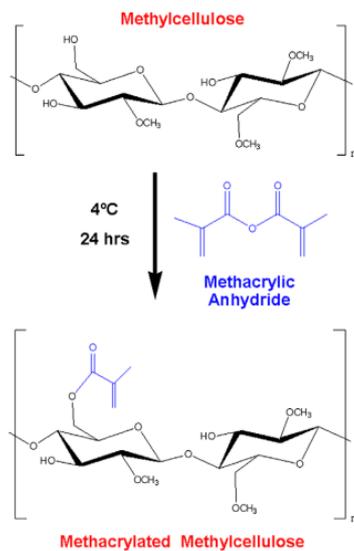


Figura 6: schema della reazione di metacrilazione della MC [6]

In particolare lo scopo di questa ricerca era quello di valutare se l'aumento in peso percentuale di MC all'interno dell'idrogel portasse a minori valori di rigonfiamento e a moduli di compressione maggiori, inoltre se questi idrogel avessero bassa citotossicità e una bassa risposta infiammatoria in vivo(15).

La reazione di metacrilazione è stata confermata tramite l'analisi ¹HNMR osservando i picchi dei protoni metacrilati, gli idrogel sono stati creati in forma cilindrica con uno spessore di 2 mm e un diametro di 8 mm formati sono risultati stabili e le prove di swelling hanno confermato le ipotesi iniziali, infatti quelli con una percentuale più bassa di MC-MA si sono rilevati più prestanti come dimostra la figura 7.

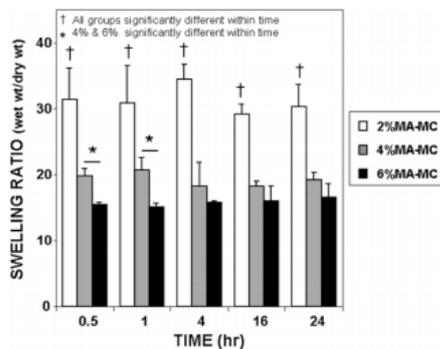


Figura 7: risultati della prova di rigonfiamento effettuata sugli idrogel di MC-MA[7].

I test di compressione hanno anche loro confermato le ipotesi iniziali tanto che gli idrogel con il 2% in peso di MC sono risultati troppo deboli per essere testati meccanicamente, mentre quelli con più alta percentuale in peso (6wt%) avevano un modulo elastico a compressione di circa 15 kPa più alto rispetto a quelli con percentuale in peso di 4wt% (24kPa e 9kPa rispettivamente).

Le analisi in vivo effettuate su delle cavie hanno dimostrato che inserendo gli idrogel sottopelle per 80 giorni la risposta infiammatoria era minima anche se quello con la più bassa percentuale in peso si era

degradato (2wt%) questo ha sorpreso i ricercatori in quanto nei topi non esiste l'enzima Cellulasi, essi hanno quindi ipotizzato che le proprietà meccaniche dell'idrogel fossero talmente scarse da non supportare l'attività motoria della cavia. Gli altri idrogel, quelli con più alte percentuali in peso e soprattutto quelli con il 6wt% erano rimasti intatti e non avevano subito deformazioni visibili.

In conclusione, le ipotesi effettuate per questa ricerca si sono state confermate; esse dimostrano che gli idrogel fotoreticolati a base MC-MA sono biocompatibili e possono essere utilizzati come filler per la chirurgia ricostruttiva, come carriers per il trasporto di farmaci e per l'incapsulazione cellulare (15).

Per quanto riguarda lo studio degli idrogel a base di metilcellulosa per il rilascio farmaci ci si può riferire alla tesi sperimentale di Dhritman Das pubblicata nel 2013 dal titolo: "Photocrosslinked Methylcellulose Hydrogels for Controlled Protein Release" (16) in questo studio durante la fotoreticolazione dell'idrogel, eseguita come nella ricerca di Simone S. Stalling et al. (15), nella soluzione acquosa è stata aggiunta anche della BSA (albumina di siero bovino), una proteina animale ampiamente utilizzata nella ricerca grazie alla sua facile reperibilità, per studiarne l'assorbimento e il rilascio in vitro da parte dell'idrogel. Sono stati effettuati anche qui campioni con diverse percentuali in peso di MC-MA ed il rilascio della proteina è stato studiato con il metodo BCA, ovvero un metodo colorimetrico che sfrutta la riduzione degli ioni rameici a rameosi da parte delle proteine in ambiente basico e il loro successivo intrappolamento da parte di due molecole di acido Bicinconinico che porta alla formazione di un complesso viola-porpora e il colore viene misurato ad una lunghezza d'onda di 562 nm con uno spettrofotometro per determinare l'intensità del colore e correlarlo alla concentrazione delle proteine in soluzione (17). I risultati ottenuti sono rappresentati nelle figure 8 e 9.

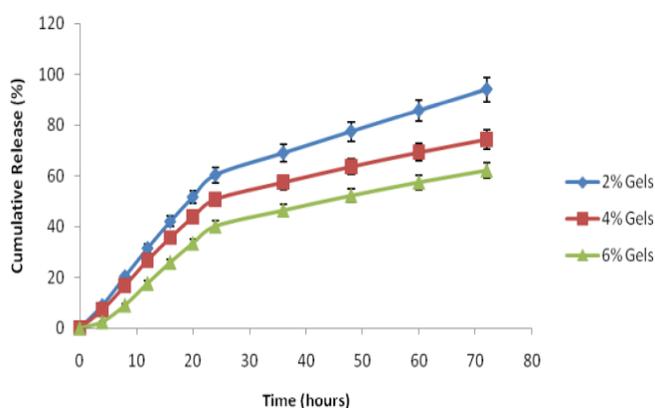


Figura 8: rilascio cumulativo della BSA nel tempo da parte degli idrogel [8].

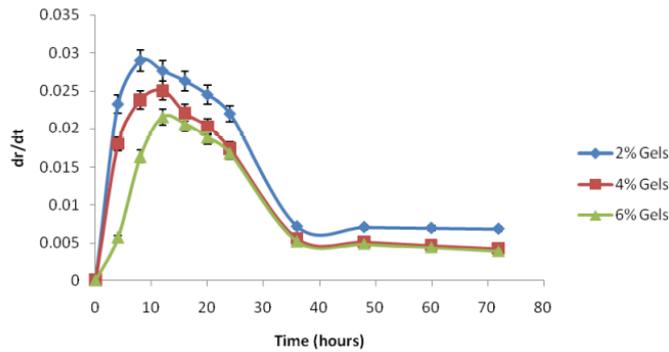


Figura 9: velocità di rilascio nel tempo della BSA da parte degli idrogel [9].

Come è possibile osservare in figura 7 l'idrogel con il 2% in peso di MC-MA ha un rilascio di circa il 94% nelle 72 ore in cui è stato effettuato l'esperimento rispetto agli altri 2 (4% e 6%) che hanno un rilascio del 74% e 62% rispettivamente. Questo è dovuto al fatto che il trasporto delle proteine e la loro velocità di rilascio (figura 9) sono correlate alla struttura dell'idrogel in cui sono disperse, ovvero sono dipendenti dalla larghezza delle maglie che si sono create reticolando l'idrogel e diffondo attraverso la soluzione che è stata adsorbita dall'idrogel.

Per far fronte alla domanda sempre crescente di inchiostri biocompatibili che possano essere utilizzati con la stampa 3D per l'ingegneria tissutale, lo studio effettuato da Ji Youn Shin et al. Nel 2020 dal titolo: "Dual-crosslinked methylcellulose hydrogels for 3D bioprinting applications" (18) ha proposto un nuova tipologia di idrogel a base di metilcellulosa funzionalizzandola con Tiramina ottenendo buone proprietà meccaniche e di stampa, senza perdere citocompatibilità. L'ottenimento dell'idrogel è stato possibile attraverso una reazione a due stadi come riportato in figura 10.

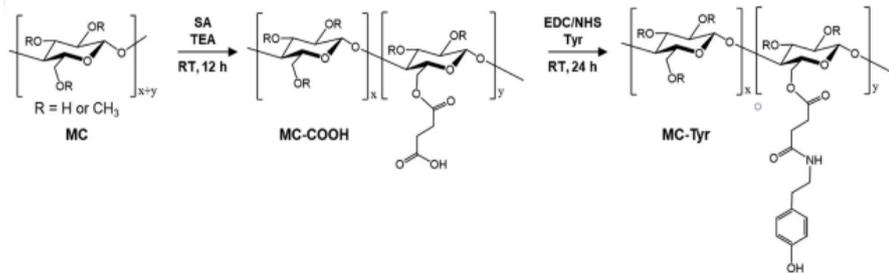


Figura 10: schema reazione a due step per ottenere la MC-Tyr [10]

Durante il primo step della reazione la MC reagisce con anidride succinica (SA) e trietilammina (TEA) ottenendo così la MC-COOH, dopodiché seguendo il processo EDC/NHS (12) alla MC-COOH viene graffata la Tiramina, che sarà poi la responsabile dei legami covalenti tra le catene durante la fotopolimerizzazione

2.6 Idrogel a base di carbossimetilcellulosa sodica

La carbossimetilcellulosa sodica è l'etere più utilizzato della cellulosa ed è ottenuto industrialmente facendo reagire la cellulosa prima con idrossido di sodio ottenendo la sostituzione dell'idrogeno del gruppo idrossilico con il sodio e successivamente viene aggiunto l'acido cloroacetico ottenendo così il gruppo carbossimetilico sodico, come mostrato in figura 11 (8).



Figura 11: schema reazione per l'ottenimento di NaCMC.[11]

Questo polimero è fisiologicamente inerte, biocompatibile e biodegradabile come la cellulosa ed è solubile in acqua anche con un grado di sostituzione di un ordine di grandezza inferiore rispetto alla MC, gli utilizzi di questo polimero sono i più vari, dall'industria farmaceutica a quella alimentare (10-19).

Per quanto riguarda la produzione di idrogel fotoreticolabili a base di questo polimero in tutti gli studi effettuati la CMC è stata funzionalizzata con anidride metacrilica (20-21-22), per far sì che in presenza di un fotoiniziatore potesse reticolare, seguendo lo schema di reazione mostrato in figura 12.

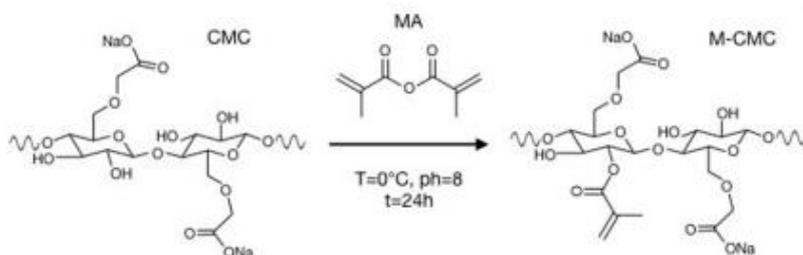


Figura 12: schema reazione di metacrilazione della CMC[12].

Una volta avvenuta la reazione si è avuto modo di verificare che effettivamente l'anidride metacrilica avesse reagito con la CMC, effettuando analisi ^1HMR e FTIR, e confrontandole con le stesse analisi effettuate prima della reazione. Come mostrato in figura 13

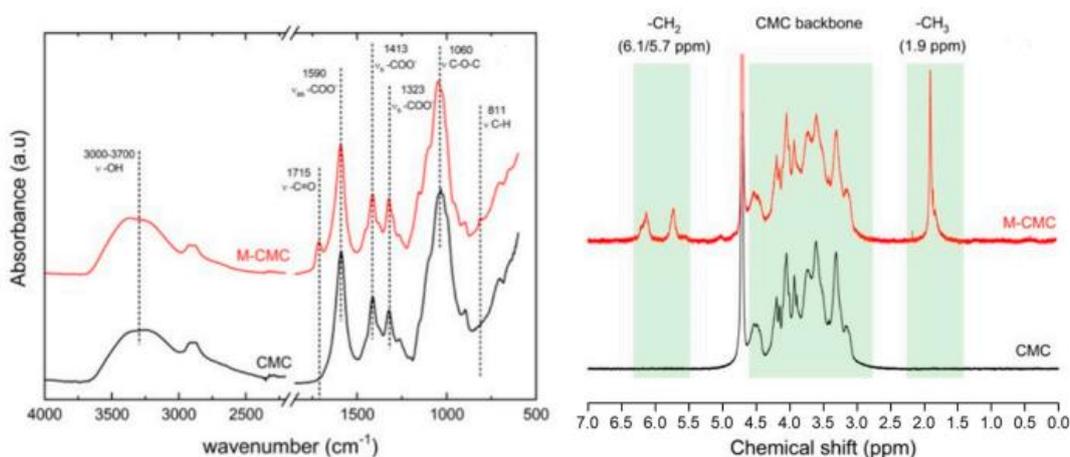


Figura 13: analisi FTIR (a sinistra) e analisi ^1H NMR (a destra) effettuate prima e dopo la reazione di metacrilazione sulla CMC[13].

Come si può osservare in figura 13, per quanto riguarda l'analisi FTIR l'avvenuta reazione è confermata dalla presenza delle vibrazioni di stretching del gruppo estere $-(\text{C}=\text{O})\text{O}$ a 1715 cm^{-1} e del $-\text{C}-\text{H}$ a 811 cm^{-1} che non erano presenti nell'analisi effettuata sulla CMC. Analizzando invece l'analisi ^1H NMR si può osservare come la struttura della CMC sia collocata tra 2.7 e 5 ppm e che nell'analisi effettuata dopo la reazione spuntino altri 3 picchi, due vicini corrispondenti ai gruppi $-\text{CH}_2$ rispettivamente a 6.1 e 5.7 ppm e il terzo, corrispondente al gruppo $-\text{CH}_3$ a 1.9 ppm. Entrambe queste analisi hanno confermato dunque l'avvenuta reazione di metacrilazione.

Una volta ottenuta la MA-CMC a seconda dello studio effettuato la fotopolimerizzazione è avvenuta con tecniche differenti.

Nello studio effettuato da Anna T. Reza et al. del 2010 dal titolo "*Characterization of novel photocrosslinked carboxymethylcellulose hydrogels for encapsulation of nucleus pulposus cells*" (21) si è utilizzata una reticolazione UV in degli stampi in vetro per creare degli idrogel a base MA-CMC con diversi pesi molecolari (90 kDa e 250kDa) con uno spessore di 2mm e un diametro di 8 mm, che potessero sostituire il cuscino fibrocartilagineo che si trova tra le vertebre, che nel tempo può degenerare e portare a lombalgia (23). In altri studi, al posto della CMC si sono utilizzati idrogel fotoreticolati a base di acido ialuronico solo che nonostante i buoni risultati ottenuti, essendo l'acido ialuronico ricavato da fonti animali per non avere una risposta immunitaria da parte del paziente deve essere sottoposto a vari step di purificazione, facendo aumentare i costi ed inoltre non si riesce ancora a garantire una ripetibilità precisa dei lotti (24-25). I test di vitalità delle cellule dal nucleo polposo intrappolate nell'idrogel hanno dato buoni risultati, infatti la vitalità è stata confermata dopo 15 giorni di test in vitro. I problemi che si sono riscontrati invece sono legati ai valori del modulo di Young in compressione, questi sono diminuiti nei giorni seguenti alla fotoreticolazione. Questa diminuzione delle proprietà meccaniche è legata alla degradazione idrolitica a cui vanno incontro i gruppi carbonili delle reticolazioni tra le macromolecole sia in vitro che soprattutto in vivo. La maggior perdita dei valori di modulo di Young si è riscontrata negli idrogel contenenti minori percentuali in peso di MA-CMC, questi idrogel infatti hanno meno reticolazioni e quindi questo effetto è aumentato (22). Per quest'applicazione occorre quindi lavorare ancora per riuscire ad ottenere idrogel più stabili

meccanicamente e chimicamente e che possano quindi supportare la colonna vertebrale dei pazienti con patologie degenerative dei cuscinetti fibrocartilaginei della colonna vertebrale.

Un'altra applicazione che si sta studiando per gli idrogel a base di MA-CMC è quella di creare degli inchiostri fotoreticolabili biocompatibili che possano essere utilizzati per applicazioni biomediche (20). Nello studio pubblicato nel 2020 dal titolo: "DLP 3D Printing Meets Lignocellulosic Biopolymers: Carboxymethyl Cellulose Inks for 3D Biocompatible Hydrogels" si sono creati due inchiostri che potessero essere reticolati utilizzando una stampa DLP (direct light processing), la quale è osservabile nella figura 14, mentre nella 15 viene riportato lo schema di funzionamento.



Figura 14: stampante DLP [14]



Figura 15: schema di funzionamento della stampante DLP[15]

Questa tecnica di additive manufacturing, insieme ad altre tecniche di AM come la stereolitografia(26), consente di stampare strato su strato idrogel con geometrie particolari che possono essere modulate a seconda dell'utilizzo a cui andranno incontro. Per creare queste geometrie si utilizzano software CAD che vengono poi convertiti in file .stl per essere processate dalle macchine. La macchina utilizzata per questo studio è la stampante Asiga UV-MAX DLP che possiede una risoluzione di 62 μm ed utilizza un proiettore LED con una lunghezza d'onda di 385 nm. Gli idrogel ottenuti sono stati poi sottoposti ad un processo di post-curing con una lampada UV a mercurio per consolidare ulteriormente le reticolazioni(20).

Prevedendo un utilizzo biomedico degli idrogel, una volta fotoreticolati, sono stati sottoposti a test meccanici, prove di swelling e prove di citotossicità in vitro.

In questo studio sono state preparate due formulazioni a base di MA-CMC che potessero essere fotoreticolate: la prima conteneva del DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ovvero un terreno di cultura utilizzato per le cellule aderenti ricco di glucosio (fino a 4500g/L) e di vitamine (27), l'altra invece conteneva solo acqua. Per poter reticolare sotto radiazione UV ad entrambe le soluzioni è stato aggiunto del LAP (Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate) come fotoiniziatore. La reticolazione è dimostrata dall'analisi FTIR che evidenzia la scomparsa del picco relativo al -C-H a 811 cm^{-1} e gli idrogel ottenuti sono mostrati nella figura 16

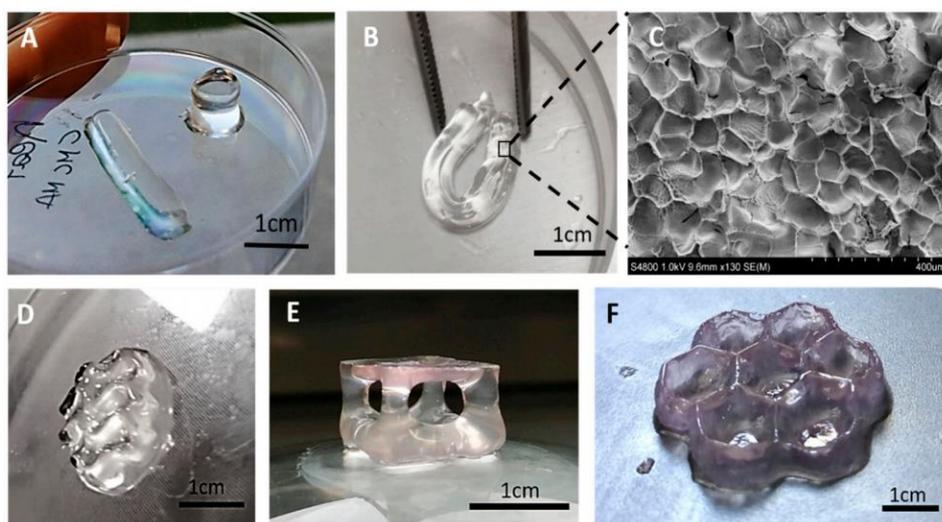


Figura 16: (A) cilindro e parallelepipedo ottenuti dalla formulazione MA-CMC/acqua/LAP, (B) buona flessibilità mostrata dall'idrogel, (C) foto scattata con SEM dopo aver liofilizzato l'idrogel che mostra la sua microporosità caratteristica, (D) forma particolare ottenuta dalla formulazione MA-CMC/acqua/LAP, (E-F) forme particolari ottenute dalla formulazione MA-CMC/DMEM/LAP. [16]

Per quanto riguarda i test di rigonfiamento e meccanici si sono creati degli idrogel a forma cilindrica. Le prove di rigonfiamento in acqua hanno dimostrato un aumento percentuale in peso del 650% in 24 ore anche se nelle prime 5 è avvenuto la gran parte del rigonfiamento come mostrato in figura 17

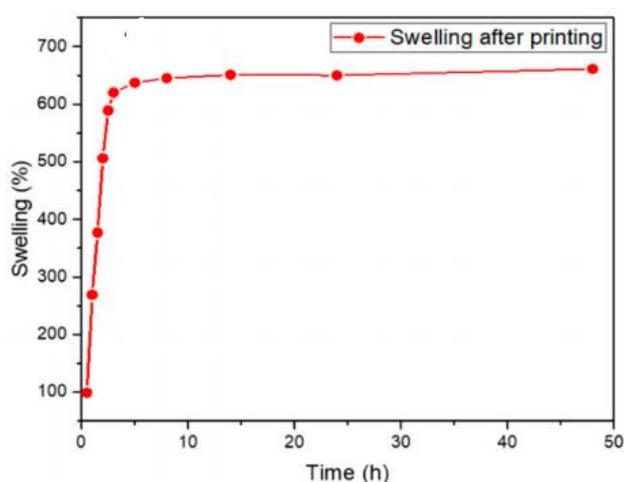


Figura 17: prova di rigonfiamento effettuata sull'idrogel [17]

Questo elevato rigonfiamento è correlato a due cause, la prima è la struttura dell'idrogel che è mostrata in figura 16.C e che quindi permette al solvente di infiltrarsi nella struttura, mentre la seconda è la grande repulsività elettrostatica dei gruppi anionici ($-COO^-$) presenti sulla catena polimerica della MA-CMC.

Il modulo di Young a compressione è stato calcolato in due range di deformazione, nella prima regione lineare si è ottenuto un modulo di 32kPa, mentre incrementando la deformazione si è ottenuto un modulo di 84kPa.

Per quanto riguarda le prove preliminari effettuate in vitro la vitalità delle cellule utilizzate nel test è stata confermata la 96 % nelle prime 24 ore (20).

2.7 Idrogel a base idrossipropilcellulosa

L'idrossipropilcellulosa (HPC) viene ottenuta facendo reagire ad alte temperature e pressioni la cellulosa alchilica in presenza di ossido di propilene secondo lo schema di reazione mostrato in figura 18 (10).

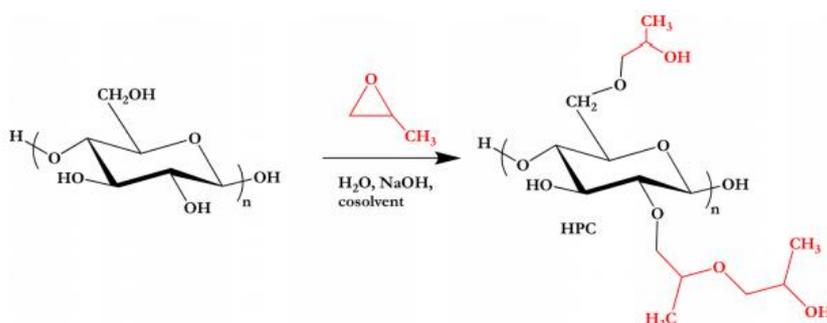


Figura 18: schema di reazione per l'ottenimento dell'idrossipropilcellulosa [18]

La HPC è facilmente ottenibile e con un basso costo di produzione. Un grado di sostituzione tra 3.5 e 4.5 la rende solubile in acqua e mostra una transizione Sol-Gel alla LCST di 40°C (31) circa subendo una transizione da soluzione isotropa a colloidale come la metilcellulosa. Come gli altri derivati della cellulosa essa è biocompatibile e biodegradabile idroliticamente, per questo motivo è stata oggetto di studio per la preparazione di idrogel fotoreticolabili.

In uno studio pubblicato nel 2013 dal titolo: "Preparation of a soft and interconnected macroporous hydroxypropyl cellulose methacrylate scaffold for adipose tissue engineering" Siew Pei Hoo e i suoi collaboratori hanno preparato e caratterizzato un idrogel fotoreticolato che potesse essere utilizzato come alternativa al trapianto autogenico di tessuti adiposi dei pazienti che avessero subito delle perdite o danneggiamenti al tessuto adiposo (32). Per far ciò la HPC è stata metacrilata facendola reagire come nelle ricerche precedenti con anidride metacrilica per renderla fotoreticolabile, ottenendo così la HPC-MA; la conferma anche qui è stata data dall'analisi 1H NMR. L'idrogel è stato ottenuto facendo prima precipitare la HPC in soluzione sfruttando la transizione di fase alla LCST e successivamente aggiungendo il fotoiniziatore Irgacure 2959 (2-hydroxy-1-[4-(2-hydroxyethoxy)-phenyl]-2-methyl-1-propanone) che si è dimostrato non tossico per la maggior parte delle cellule dei mammiferi (33) ed esponendo la soluzione all'irraggiamento

UV si sono ottenuti gli idrogel che sono stati poi liofilizzati per poterne studiare la porosità. I diversi passaggi sono osservabili in figura 19.

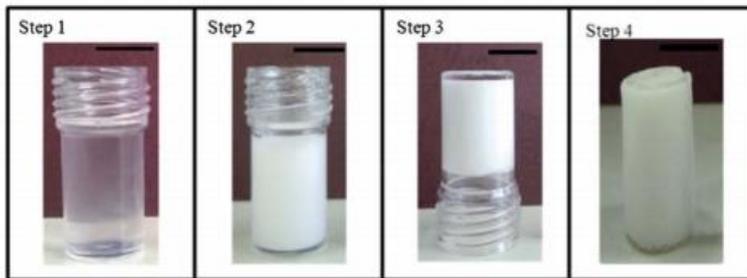


Figura 19:passaggi per ottenere l'idrogel utilizzato come scaffold per la riparazione tissutale, nell'ordine: step 1:soluzione acquosa con 10%wt di HPC, step 2:soluzione dopo aver scaldato la soluzione a 40°C e aver aggiunto l'iniziatore, step 3: idrogel dopo la fotoreticolazione, step 4: idrogel dopo la liofilizzazione [19]

Generalmente, un'impalcatura utilizzabile per questo scopo deve soddisfare alcuni prerequisiti, in primis il materiale deve essere biocompatibile, citocompatibile e biodegradabile in modo da lasciare spazio nuovo nel tessuto del paziente, inoltre deve essere sufficientemente poroso per poter permettere lo scambio di nutrienti e di scarti alle cellule che aderiscono ad esso, deve poter essere fabbricato facilmente in diverse forme e dimensioni in modo da avere un'ottima adattabilità in base alla zona in cui verrà applicato ed infine deve possedere proprietà meccaniche simili a quelle del tessuto che sta sostituendo.

Per quanto riguarda la biocompatibilità, e la citocompatibilità i test effettuati dai ricercatori hanno riportato che dopo 7 giorni l'impiantazione, le cellule del tessuto adiposo hanno cominciato a proliferare, confermando che l'idrogel supporta la crescita cellulare. La biodegradabilità è fondamentale per far sì che il tessuto del paziente prenda il posto della protesi, la cellulosa e i suoi derivati non degradano facilmente in vivo, mentre l'anidride metacrilica, utilizzata per creare i crosslinking, va incontro a degradazione idrolitica in presenza di PBS, una soluzione salina contenente fosfato di sodio e talvolta cloruro di potassio utilizzato in ambito medicale come medium per la coltura cellulare. Per valutare se gli idrogel preparati con diverse percentuali in peso di HPC-MA (10%-15%-20%wt) possedessero questo comportamento sono stati lasciati per 40 giorni in soluzione con PBS e si è valutata la perdita di peso come mostrato in figura 20.

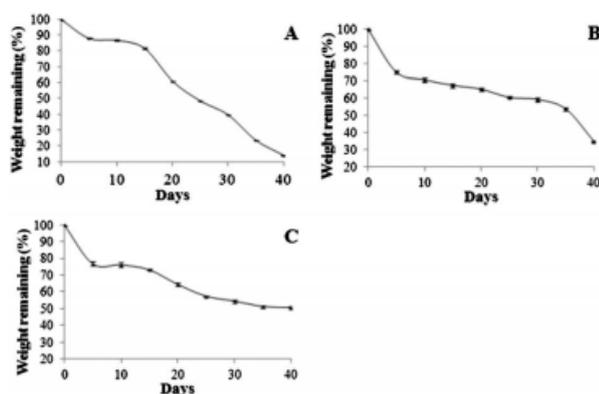


Figura 20: perdita percentuale in peso dei 3 idrogel testati: A (10%wt HPC-MA), B (15%wt HPC-MA), C(20%wt HPC-MA). [20]

Come si può osservare in figura 20, gli idrogel con minor percentuale in peso di HPC-MA, avendo meno crosslink, sono andati incontro a degradazione idrolitica più velocemente rispetto a quelli con percentuali maggiori.

Per quanto riguarda la porosità gli idrogel liofilizzati sono stati accuratamente rotti e ricoperti d'oro e palladio per poterne analizzare la microstruttura utilizzando il SEM con alti e bassi ingrandimenti la microstruttura. Tutti gli idrogel preparati hanno mostrato un'ottima porosità aperta, come mostrato in figura 21

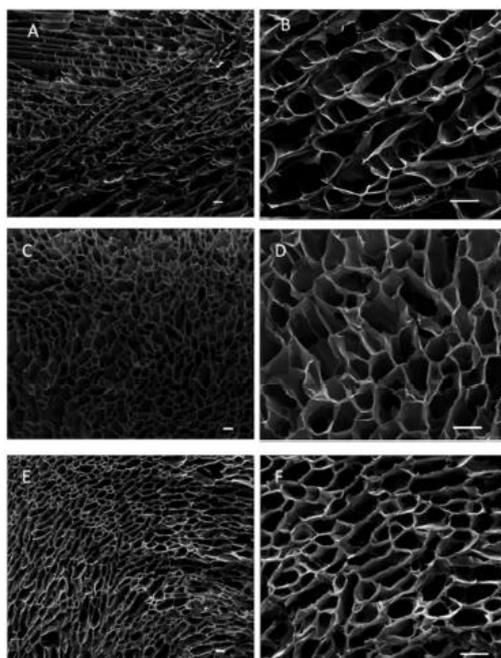


Figura 21: ingrandimenti effettuati con microscopio elettronico a scansione sugli idrogel fotoreticolati, nell'ordine: A-B 10%wt HPC-MA, C-D 15%wt HPC-MA, E-F 20%wt HPC-MA. Scala: 100 μ m. [21]

Le successive analisi porosimetriche al mercurio hanno confermato la presenza di porosità aperte e diametro medio dei pori è stato rispettivamente per i tre campioni (10% 15% 20%) di 69, 45 e 42 μ m.

Le prove meccaniche hanno evidenziato dei valori del modulo elastico di 0.75, 1.87 e 4,8 kPa ; valori questi paragonabili a quelli del tessuto adiposo che varia tra 3-4 kPa. Le prove di swelling hanno dimostrato che gli idrogel con più alte percentuali in peso di HPC-MA assorbono meno acqua e con velocità più basse confermando che una maggiore reticolazione porta a maggior difficoltà per il solvente a penetrare nella struttura. In conclusione i ricercatori hanno confermato che questi idrogel potranno essere utilizzati in futuro per applicazioni nell'ingegneria tissutale(32).

2.8 Bibliografia e sitografia

- (1) Cellulose Structure and Biosynthesis: What is in Store for the 21st Century? R. MALCOLM BROWN, JR. Molecular Genetics and Microbiology, University of Texas at Austin, Austin, Texas 78712 (2013).
- (2) Cellulose in Cyanobacteria. Origin of Vascular Plant Cellulose Synthase? David R. Nobles, Dwight K. Romanovicz, and R. Malcolm Brown, Jr. Plant Physiology , 127 (2) 529-542. Section of Molecular Genetics and Microbiology, The University of Texas, Austin, Texas 78712. (2001).
- (3) sintesi di biomateriali a base cellulosa derivatizzata. Ermelinda Blosie, Bartolo Gabriele, Rita Muzzalupo. Dipartimento di Scienze Farmaceutiche (2008).
- (4) Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. Robert J. Moon, Ashlie Martini, John Nairn, John Simonsen and Jeff Youngblood. Chem. Soc. Rev., 2011, 40, 3941–3994 (2010).
- (5) Cellulose: the structure slowly unravels. ANTOINETTE C. O'SULLIVAN. CELLULOSE 4, 173-207 (1997)
- (6)) X-ray studies of reactions of cellulose in non-aqueous systems. II. Interaction of cellulose and primary amines. Davis, W. E., Barry, A. J., Peterson, F. C. and King, A. J. Interaction of cellulose and primary amines. J. Am. Chem. Soc. 65, 1294-1300.(1943).
- (7) Cellulose Nanocrystals vs. Cellulose Nanofibrils: A Comparative Study on Their Microstructures and Effects as Polymer Reinforcing Agents. Xuezu Xu, Fei Liu, Long Jiang, J. Y. Zhu, Darrin Haagenon, and Dennis P. Wiesenborn. ACS Appl. Mater. Interfaces , 5, 8, 2999–3009.(2013).
- (8) Pharmaceutical significance of cellulose. S. Kamel,N. Ali, K. Jahangir, S. M. Shah, A. A. El-Gendy. EXPRESS Polymer Letters Vol.2, No.11 758–778. (2008).
- (9) Wikipedia: Nitrocellulosa. Ultima visualizzazione 04/01/21.
- (10) Pharmaceutical Applications of Cellulose Ethers and Cellulose Ether Esters. Hale Cigdem Arca, Laura Mosquera-Giraldo, Vivian Bi, Daiqiang Xu, Lynne S. Taylor, and Kevin J. Edgar. Biomacromolecules, 19, 2351–2376. (2018)
- (11)Physical Properties of Diblock Methylcellulose Derivatives with Regioselective Functionalization Patterns: First Direct Evidence That a Sequence of 2,3,6-Tri-O-Methyl-Glucopyranosyl Units Causes Thermoreversible Gelation of Methylcellulose. Nakagawa, A.; Fenn, D.; Koschella, A.; Heinze, T.; Kamitakahara. J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys. 49 (21), 1539–1546.(2011).
- (12)Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. Miyamoto T, Takahashi S, Ito H, Inagaki H, Noishiki Y. J Biomed Mater Res;23:125–33.(1989)
- (13)Gel network structure of methylcellulose in water. Li L, Thangamathesvaran PM, Yue CY, Tam KC, Hu X, Lam YC. Langmuir; 17:8062–8 (2001).
- (14)Thermal gelation properties of methyl and hydroxypropyl methylcellulose. Sarkar N. . J Appl Polym Sci;24:1073–87 (1979).
- (15)Development of photocrosslinked methylcellulose hydrogels for soft tissue reconstruction. Simone S. Stalling, Sunday O. Akintoye, Steven B. Nicoll. Acta Biomaterialia 5 1911–1918. (2009).
- (16)Photocrosslinked Methylcellulose Hydrogels for Controlled Protein Release. Das Dritiman. City University of New York (CUNY). (2013).
- (17)The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. Walker J.M. (2009).
- (18)Dual-crosslinked methylcellulose hydrogels for 3D bioprinting applications. Ji Youn Shina , Yong Ho Yeoa , Jae Eun Jeongb , Su A. Parkb, Won Ho Parka. Carbohydrate Polimers 238 116192 (2020).
- (19) Impiego della carbossimetilcellulosa e uso di altri additivi nella stabilizzazione tartarica dei vini rossi. Motta S., Bollito A., Guaita, M., Petrozziello M., Panero L., Bosso A. Bulletin de l'OIV Vol.82 No.941/942/943 pp.367-377 ref.12. (2009).
- (20)DLP 3D Printing Meets Lignocellulosic Biopolymers: Carboxymethyl Cellulose Inks for 3D Biocompatible Hydrogels. Giuseppe Melilli, Irene Carmagnola, Chiara Tonda-Turo, Fabrizio Pirri,

- Gianluca Ciardelli, Marco Sangermano, Minna Hakkarainen and Annalisa Chiappone. *Polymers*, 12, 1655. (2020).
- (21) Characterization of novel photocrosslinked carboxymethylcellulose hydrogels for encapsulation of nucleus pulposus cells. Anna T. Reza, Steven B. Nicoll. *Acta Biomaterialia* 6 179–186. (2010)
- (22) Functional nucleus pulposus-like matrix assembly by human mesenchymal stromal cells is directed by macromer concentration in photocrosslinked carboxymethylcellulose hydrogels. Michelle S. Gupta & Steven B. Nicoll. *Cell Tissue Res* 358:527–539. (2014)
- (23) An overview of the incidences and costs of low back pain. Frymoyer JW, Cats-Baril WL. *n. Orthop Clinics N Am*;22:263–71 (1991)
- (24) Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks. Burdick JA, Chung C, Jia X, Randolph MA, Langer R. *Biomacromolecules*;6:386–91.(2005)
- (25) Photocrosslinkable hyaluronan as a scaffold for articular cartilage repair. Nettles DL, Vail TP, Morgan MT, Grinstaff MW, Setton LA. *Ann Biomed Eng*;32:391–7.(2004).
- (26). A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. Melchels, F.P.W.; Feijen, J.; Grijpma, D.W. *Biomaterials*, 31, 6121–6130 (2010).
- (27) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME) Formulation | Sigma-Aldrich.
- (28) High-strength cellulose–polyacrylamide hydrogels: Mechanical behavior and structure depending on the type of cellulose. A.L. Buyanovl.V. GofmanN.N. Saprykina. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2019, 100, 103385.
- (29) Temperature dependence of the disintegration times of compressed tablets containing hydroxypropyl-cellulose as binder. J. W. STAFFORD J. F. PICKARD R. ZINK. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* Volume 30, Issue 1. (1978).
- (30) Safety of low-substituted hydroxypropyl cellulose (L-HPC) to be used as a food additive in food supplements in tablet form. Maged Younes et al. *EFSA Journal* Volume 16, Issue 1.(2018)
- (31) Phase Diagram of Aqueous Solutions of (Hydroxypropyl)cellulose. Suzie Fortin and Gérard Charlet. *Macromolecules*, 22, 2286-2292. (1989)
- (32) Preparation of a soft and interconnected macroporous hydroxypropyl cellulose methacrylate scaffold for adipose tissue engineering. Siew Pei Hoo, Qiu Li Loh, Zhilian Yue, Jing Fu, Timothy T. Y. Tan, Cleo Choong and Peggy P. Y. Chan. *J. Mater. Chem. B*, 1, 3107. (2013)
- (33) Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation. Christopher G Williams, Athar N Malik, Tae Kyun Kim, Paul N Manson, Jennifer H Elisseff. *Biomaterials* 26(11):1211-8. (2005).

2.9 Indice figure

[1] Figura 1 : sintesi di biomateriali a base cellulosa derivatizzata. Ermelinda Blois, Bartolo Gabriele, Rita Muzzalupo. Dipartimento di Scienze Farmaceutiche (2008).

- [2] Figura 2: Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. Robert J. Moon, Ashlie Martini, John Nairn, John Simonsenf and Jeff Youngblood. : Chem. Soc. Rev., 2011, 40, 3941–3994 (2010).
- [3] Figura 3: Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. Robert J. Moon, Ashlie Martini, John Nairn, John Simonsenf and Jeff Youngblood. : Chem. Soc. Rev., 2011, 40, 3941–3994 (2010).
- [4] Figura 4: Cellulose: the structure slowly unravels. ANTOINETTE C. O'SULLIVAN. CELLULOSE 4, 173-207 (1997).
- [5] Figura 5 : Pharmaceutical Applications of Cellulose Ethers and Cellulose Ether Esters. Hale Cigdem Arca, Laura. Mosquera-Giraldo, Vivian Bi, Daiqiang Xu, Lynne S. Taylor, and Kevin J. Edgar. Biomacromolecules, 19, 2351–2376. (2018).
- [6] Figura 6: Development of photocrosslinked methylcellulose hydrogels for soft tissue reconstruction. Simone S. Stalling, Sunday O. Akintoye, Steven B. Nicoll. Acta Biomaterialia 5 1911–1918. (2009).
- [7] Figura 7: Development of photocrosslinked methylcellulose hydrogels for soft tissue reconstruction. Simone S. Stalling, Sunday O. Akintoye, Steven B. Nicoll. Acta Biomaterialia 5 1911–1918. (2009).
- [8] Figura 8: Photocrosslinked Methylcellulose Hydrogels for Controlled Protein Release. Das Dritiman. City University of New York (CUNY). (2013).
- [9] Figura 9: Photocrosslinked Methylcellulose Hydrogels for Controlled Protein Release. Das Dritiman. City University of New York (CUNY). (2013).
- [10] Figura 10: Dual-crosslinked methylcellulose hydrogels for 3D bioprinting applications. Ji Youn Shina , Yong Ho Yeoa , Jae Eun Jeongb , Su A. Parkb, Won Ho Parka. Carbohydrate Polimers 238 116192 (2020).
- [11] Figura 11 : Pharmaceutical significance of cellulose. S. Kamel,N. Ali, K. Jahangir, S. M. Shah, A. A. El-Gendy. eXPRESS Polymer Letters Vol.2, No.11 758–778. (2008).
- [12] Figura 12: DLP 3D Printing Meets Lignocellulosic Biopolymers: Carboxymethyl Cellulose Inks for 3D Biocompatible Hydrogels. Giuseppe Melilli, Irene Carmagnola, Chiara Tonda-Turo, Fabrizio Pirri, Gianluca Ciardelli, Marco Sangermano, Minna Hakkarainen and Annalisa Chiappone. Polymers, 12, 1655. (2020).
- [13] Figura 13: DLP 3D Printing Meets Lignocellulosic Biopolymers: Carboxymethyl Cellulose Inks for 3D Biocompatible Hydrogels. Giuseppe Melilli, Irene Carmagnola, Chiara Tonda-Turo, Fabrizio Pirri, Gianluca Ciardelli, Marco Sangermano, Minna Hakkarainen and Annalisa Chiappone. Polymers, 12, 1655. (2020).
- [14] Figura 14: https://www.asiga.com/products/printers/max_series/max/
- [15] Figura 15: https://www.asiga.com/products/printers/max_series/max/
- [16] Figura 16: DLP 3D Printing Meets Lignocellulosic Biopolymers: Carboxymethyl Cellulose Inks for 3D Biocompatible Hydrogels. Giuseppe Melilli, Irene Carmagnola, Chiara Tonda-Turo, Fabrizio Pirri, Gianluca Ciardelli, Marco Sangermano, Minna Hakkarainen and Annalisa Chiappone. Polymers, 12, 1655. (2020).

[17] Figura 17: DLP 3D Printing Meets Lignocellulosic Biopolymers: Carboxymethyl Cellulose Inks for 3D Biocompatible Hydrogels. Giuseppe Melilli, Irene Carmagnola, Chiara Tonda-Turo, Fabrizio Pirri, Gianluca Ciardelli, Marco Sangermano, Minna Hakkarainen and Annalisa Chiappone. *Polymers*, 12, 1655. (2020).

[18] Figura 18: Pharmaceutical Applications of Cellulose Ethers and Cellulose Ether Esters. Hale Cigdem Arca, Laura Mosquera-Giraldo, Vivian Bi, Daiqiang Xu, Lynne S. Taylor, and Kevin J. Edgar. *Biomacromolecules*, 19, 2351–2376. (2018).

[19] Figura 19: Preparation of a soft and interconnected macroporous hydroxypropyl cellulose methacrylate scaffold for adipose tissue engineering. Siew Pei Hoo, Qiu Li Loh, Zhilian Yue, Jing Fu, Timothy T. Y. Tan, Cleo Choong and Peggy P. Y. Chan. : *J. Mater. Chem. B*, 1, 3107. (2013).

[20] Figura 20: Preparation of a soft and interconnected macroporous hydroxypropyl cellulose methacrylate scaffold for adipose tissue engineering. Siew Pei Hoo, Qiu Li Loh, Zhilian Yue, Jing Fu, Timothy T. Y. Tan, Cleo Choong and Peggy P. Y. Chan. : *J. Mater. Chem. B*, 1, 3107. (2013).

[21] Figura 21: Preparation of a soft and interconnected macroporous hydroxypropyl cellulose methacrylate scaffold for adipose tissue engineering. Siew Pei Hoo, Qiu Li Loh, Zhilian Yue, Jing Fu, Timothy T. Y. Tan, Cleo Choong and Peggy P. Y. Chan. : *J. Mater. Chem. B*, 1, 3107. (2013).

2.10 Indice tabelle

{1} Tabella 1: Pharmaceutical significance of cellulose. S. Kamel, N. Ali, K. Jahangir, S. M. Shah, A. A. El-Gendy. *eXPRESS Polymer Letters* Vol.2, No.11 758–778. (2008).

{2} Tabella 2: Pharmaceutical significance of cellulose. S. Kamel, N. Ali, K. Jahangir, S. M. Shah, A. A. El-Gendy. *eXPRESS Polymer Letters* Vol.2, No.11 758–778. (2008).

3. Amido

L'amido è il polisaccaride di riserva maggiormente presente nelle piante. Esso è biodegradabile, viene prodotto in abbondanza a basso costo e presenta inoltre un comportamento termoplastico. L'amido viene

sintetizzato nelle foglie delle piante durante la fotosintesi clorofilliana da parte di enzimi che ne regolano l'accrescimento e successivamente mobilitato verso i principali siti di accumulo come semi, radici, tuberi e frutti da cui poi viene estratto. Le fonti principali da cui si estrae questo polimero sono il mais, il grano e le patate(1).

3.1 Struttura dell'amido

L'amido si trova sotto forma di granuli che sono composti da 2 diversi polimeri, l'amilosio e l'amilopectina.

L'amilosio è una macromolecola lineare le cui unità fondamentali sono anelli glucosidici legati tra loro da legami 1,4 α glucosidici, mentre l'amilopectina è una macromolecola altamente ramificata che possiede catene lineari legate da legami 1,4 α glucosidici che si collegano tra di loro tramite legami 1,6 α glucosidici .

I granuli di amido sono organizzati con un'alternanza di zone cristalline e zone amorfe, nella parte cristallina è maggiormente presente amilopectina che permette di ottenere la cristallinità grazie ai legami di idrogeno che si formano tra le ramificazioni facendo sì che le ramificazioni si organizzino in cluster che sono insolubili in acqua; l'amilosio invece è maggiormente presente nella zona amorfa e si organizza in strutture a doppia elica con un'altra molecola di amilosio ed è la parte solubile in acqua calda. In tabella 1 è possibile osservare la quantità di amilosio e amilopectina che generalmente si può trovare all'interno delle diverse fonti di amido, la dimensione dei granuli e la percentuale di cristallinità degli stessi. Questi valori possono variare a seconda della zona della pianta che si va ad analizzare e dalle diverse specie della stessa famiglia di piante, quella che viene riportata è dunque una media. In figura 1 è invece possibile osservare a partire dal granulo arrivando alle catene glucosidiche, la struttura dell'amido.

Starch	Amylose content (%)	Amylopectin content (%)	Granule size (μm)	Crystallinity (%)
Wheat	26–27	72–73	25	36
Maize	26–28	71–73	15	39
Waxy starch	<1	99	15	39
Amylomaize	50–80	20–50	10	19
Potato	20–25	70–74	40–100	25

Tabella 1: fonti principali di amido e principali caratteristiche{1}

Formattato: Titolo 2, Allineato a sinistra

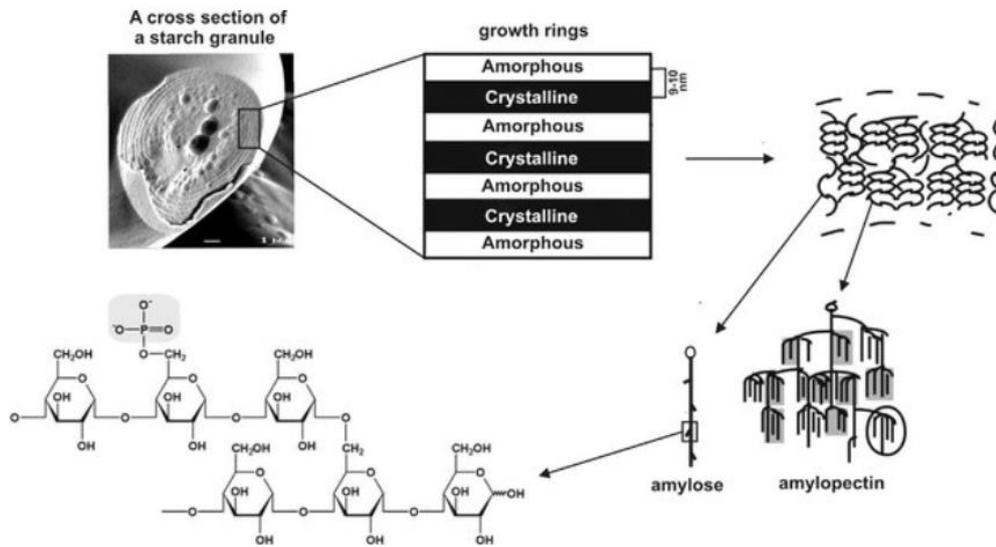


Figura 1: struttura dell'amido [1]

3.2 Gelificazione e retrodegradazione dell'amido

Quando i granuli di amido vengono messi in sospensione in acqua a temperatura ambiente, una piccola parte di essa viene reversibilmente assorbita (2). Quando invece la temperatura viene alzata tra i 50 e i 70°C i granuli di amido assorbono una grande quantità di solvente a partire dalle zone amorphe e si ha la perdita dell'ordine cristallino. Questo processo porta alla separazione dell'amilosio dall'amilopectina, infatti la parte amorfa del granulo è quella che è composta maggiormente da amilosio ed è quella che reagisce. L'amilosio interagendo con l'acqua rompe i legami idrogeno della doppia elica ed entra in soluzione, portando alla disintegrazione del granulo; L'amilopectina invece, non essendo solubile interagisce solo superficialmente con l'H₂O. Le molecole d'acqua che si legano alle catene polimeriche portano ad una diminuzione dell'acqua libera in soluzione e questo fa sì che ci sia un incremento della viscosità. Questo processo è chiamato gelificazione. Quando la soluzione viene raffreddata le macromolecole si riorganizzano tentando di recuperare la forma iniziale, essendo però un processo irreversibile la gelificazione, questo non accade. Nel processo di retrodegradazione o ricristallizzazione quello che succede è un'espulsione di una certa percentuale d'acqua adsorbita dalle macromolecole ed un riarrangiamento delle catene. Questo processo è reversibile perché scaldando nuovamente la soluzione ritorna alla situazione di gel(2).

3.3 Idrogel fotoreticolabili a base amido

Per la preparazione di idrogel fotoreticolabili a base di amido, nello studio effettuato nel 2020 dal titolo : "Light Processable Starch Hydrogels"(3), dell'amido ad alto contenuto di amilosio (70%) proveniente dal mais è stato messo in soluzione con dimetilsolfossido (DMSO) utilizzato come solvente, scaldando la soluzione a 70 gradi è stata ottenuta la solubilizzazione dell'amilosio; una volta raffreddata la soluzione, l'amilosio gelatinizza e a quel punto viene aggiunta anidride metacrilica per ottenere la funzionalizzazione e rendere l'amido fotoreticolabile. Aggiungendo poi LAP come fotoiniziatore ed esponendo la soluzione a raggi UV viene ottenuto l'idrogel. In figura 2 è possibile osservare lo schema del processo adottato per ottenere l'idrogel.

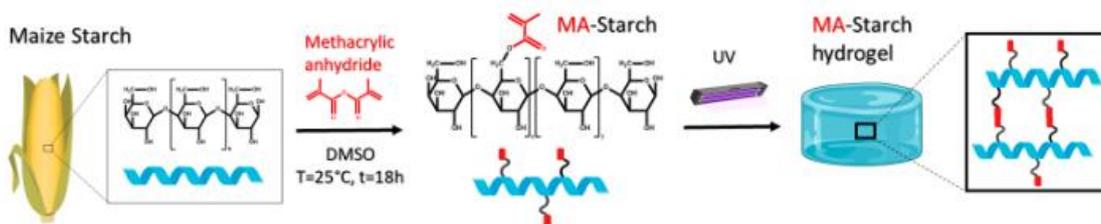


Figura 2: schema delle reazioni effettuate per ottenere gli idrogel fotoreticolati a base amido[2]

Lo scopo di questo studio era quello di valutare la biocompatibilità e le proprietà meccaniche di diversi idrogel con percentuali in peso differenti di amido metacrilato (5, 10 e 15%wt). E di confermarne la stampabilità attraverso la DLP.

L'avvenuta reazione di metacrilazione è stata confermata tramite analisi ^1H NMR e ^{13}C NMR prima e dopo il processo di metacrilazione. I risultati ottenuti sono visibili in figura 3.

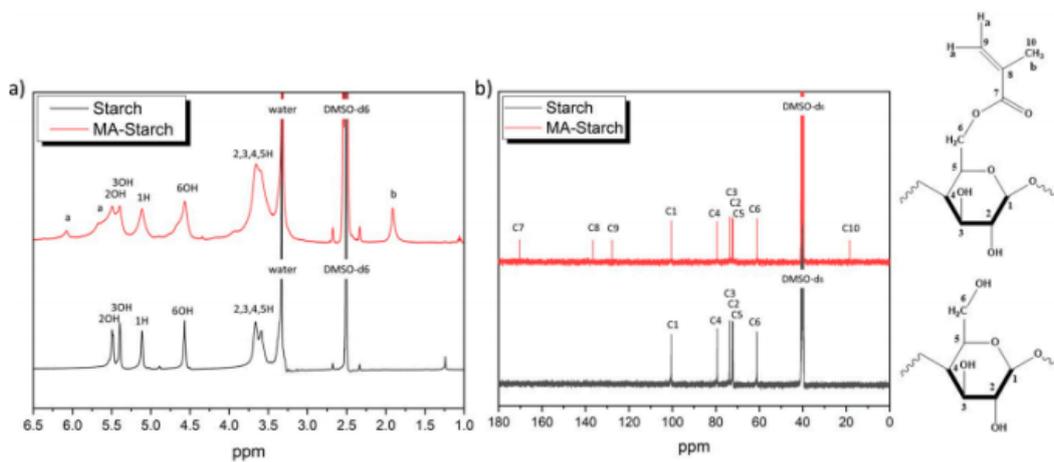


Figura 3: risultati dell'analisi ^1H NMR (a) e ^{13}C NMR (b) prima e dopo la reazione di metacrilazione [3]

Come è possibile osservare in figura 3, l'amido ha mostrato i picchi caratteristici a $\delta = 3.59$ e $\delta = 3.66$ ppm che rappresentano i protoni del CH in posizione 2, 3, 4, e 5; mentre il picco del C1 è visibile a $\delta=5.11$ ppm. I picchi dei protoni dei gruppi OH in posizione 2, 3 e 6 sono osservabili a $\delta=4.57$ $\delta=5.40$ e $\delta=5.49$ ppm rispettivamente mentre l'elevato picco a $\delta=3.35$ rappresenta i protoni dell'acqua che sono stati adsorbiti dall'amido. Una volta metacrilato sono emersi altri picchi a $\delta=5.66$ e $\delta=6.07$ ppm indicati con (a) nella figura e sono i picchi dei doppi legami $=CH_2$ mentre i gruppi metilici dell'anidride sono emersi a $\delta=1.9$ ppm indicati con (b). Grazie all'analisi HNMR è stato anche possibile valutare il grado di sostituzione che è di 0.08. L'analisi CNMR ha dato i risultati che ci si aspettava infatti sono comparsi i picchi a $\delta=18.45$ ppm (picco del carbonio del gruppo metile), $\delta=136.61$ e $\delta=127.75$ ppm (atomi di carbonio occupati nel doppio legame) e il picco a $\delta=170.38$ ppm che rappresenta il carbonio del gruppo C=O.

Per valutare in tempo reale la cinetica della fotoreticolazione è stata utilizzata un'analisi fotoreologica che ha dato i risultati mostrati in figura 4.

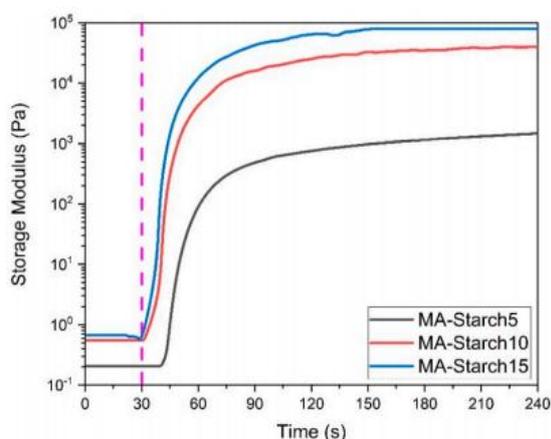


Figura 4: risultati della prova fotoreologica per gli idrogel con diverse %in peso di MA-Starch [4]

Si può osservare come gli idrogel con percentuali di 10 e 15 %Wt siano reticolati dopo soli 30 secondi dall'inizio della prova e il plateau di G' , e quindi la fine della reticolazione, è stato raggiunto dopo circa 90 secondi. L'idrogel con un contenuto più basso di MA-Starch ha iniziato la reticolazione con un ritardo di circa 10 secondi e ha raggiunto il plateau dopo 120 secondi. I ricercatori hanno ipotizzato che questo ritardo fosse dovuto al fatto che l'amido fosse in bassa concentrazione nel solvente e che, combinato al basso grado di sostituzione, la velocità di reazione sia stata ritardata dalla combinazione di questi due fattori.

Le prove meccaniche effettuate sui diversi idrogel hanno evidenziato che aumentando da 5 a 10 la percentuale in peso di Ma-Starch all'interno dell'idrogel si ottiene un incremento da 13 a 20 kPa. Le prove di swelling riportate in figura 5 mostrano una maggior velocità di adsorbimento e percentuali di acqua adsorbita da parte degli idrogel con minori percentuali in peso di MA-Starch confermando che, una quantità maggiore di crosslinks, porta ad avere una maggior resistenza meccanica e una minore quantità e velocità di acqua adsorbita.

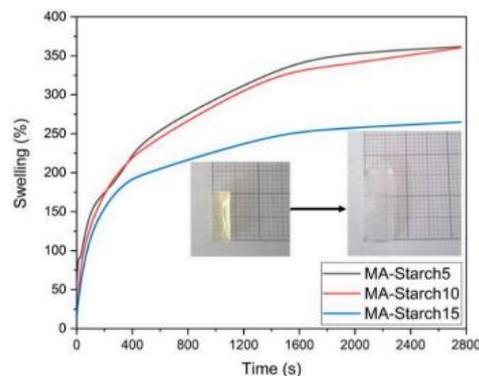


Figura 5: misure di swelling effettuate sui diversi idrogel[5]

Le prove di citotossicità hanno confermato una buona vitalità cellulare su tutti i campioni realizzati confermando così la possibilità di utilizzare questa tipologia di idrogel fotoreticolati nell'ingegneria tissutale.

Infine, con la formulazione contenente il 10% in peso di MA-Starch che aveva mostrato un modulo elastico di 13 kPa, ossia molto simile a quello dei tessuti muscolari (12kPa) (4), sono stati realizzati tramite stampa DLP idrogel con diverse forme e dimensioni che sono stati poi sottoposti ad un processo di curing per consolidarne la forma. Ciò ha dimostrato quindi la possibilità di utilizzare questa formulazione come un possibile inchiostro per l'ingegneria tissutale e per impalcatura per la coltura cellulare.

3.4 Bibliografia e sitografia

- (1) Production, Chemistry and Degradation of Starch-Based Polymers. Analia Vázquez, Maria Laura Foresti and Viviana Cyras. *Biopolymers : New Materials for Sustainable Films and Coatings*, edited by David Plackett, John Wiley & Sons. (2011)
- (2) Gelation and retrogradation of concentrated starch systems: 1. Gelation. C.J.A.M. Keetels, T. van Vliet and P. Walstr. *Food Hydrocolloids*. Vol. 10 no. 3 pp.343-353. (1996).
- (3) Light Processable Starch Hydrogels. Camilla Noè, Chiara Tonda-Turo, Annalisa Chiappone, Marco Sangermano and Minna Hakkarainen. *Polymers*, 12, 1359. (2020)
- (4) Cellular modulation by the elasticity of biomaterials. Han, F.; Zhu, C.; Guo, Q.; Yang, H.; Li, B Han, F.; Zhu, C.; Guo, Q.; Yang, H.; Li, B. *J. Mater. Chem. B* 4, 9–26. (2016)

3.5 Indice figure

[1] Figura 1: Potato starch synthases: Functions and Relationships. Farhad Nazarian-Firouzabadi, Richard G.F. Visser. *Biochemistry and Biophysics Reports* 10 (2017).

[2] Figura 2: Light Processable Starch Hydrogels. Camilla Noè, Chiara Tonda-Turo, Annalisa Chiappone, Marco Sangermano and Minna Hakkarainen. *Polymers*, 12, 1359. (2020)

[3] Figura 3: Light Processable Starch Hydrogels. Camilla Noè, Chiara Tonda-Turo, Annalisa Chiappone, Marco Sangermano and Minna Hakkarainen. *Polymers*, 12, 1359. (2020)

[4] Figura 4: Light Processable Starch Hydrogels. Camilla Noè, Chiara Tonda-Turo, Annalisa Chiappone, Marco Sangermano and Minna Hakkarainen. *Polymers*, 12, 1359. (2020)

[5] Figura 5: Light Processable Starch Hydrogels. Camilla Noè, Chiara Tonda-Turo, Annalisa Chiappone, Marco Sangermano and Minna Hakkarainen. *Polymers*, 12, 1359. (2020)

3.6 Indice tabelle

{1} tabella 1: Production, Chemistry and Degradation of Starch-Based Polymers. Analia Vázquez, Maria Laura Foresti and Viviana Cyras. *Biopolymers : New Materials for Sustainable Films and Coatings*, edited by David Plackett, John Wiley & Sons. (2011)

Conclusioni

Grazie alla ricerca condotta per la realizzazione del presente testo ho avuto modo di confrontarmi e meglio comprendere l'ampia e complessa branca scientifica dedicata ai polimeri. A seguito della mia analisi, sono giunto a ritenere che seguendo il trend della figura del capitolo 1.1 sulle pubblicazioni riguardanti gli idrogel è auspicabile che nei prossimi anni questi materiali potranno realmente rivoluzionare completamente il campo biomedico grazie alle eccellenti proprietà che posseggono come l'ottima biocompatibilità, la loro origine naturale, e quindi la loro facile reperibilità e biodegradabilità, e infine grazie alla facilità con cui essi possono essere modificati per fare in modo che vadano a mimare i tessuti che sostituiscono.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il professore Marco Sangermano che ha contribuito alla stesura di questa tesi, per la sua disponibilità continua nel fornirmi spiegazioni ed utili consigli, ma soprattutto per avermi trasmesso, durante le sue lezioni una profonda passione per questa materia.

Grazie ai miei compagni di corso Andrea, Luca, Federico, Giulia ed Eugenia con cui in questi anni ho condiviso gioie e dolori.

Ed infine un grande grazie ai miei genitori che mi hanno sostenuto economicamente durante il percorso di studi.