POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale

Intrappolamento di microrganismi in idrogeli fotoreticolati



Relatori

Prof.ssa Francesca Bosco Prof. Marco Sangermano

Candidato

Elga Maria Asaro

Luglio 2019

Indice

1. Introduzione e scopo del lavoro		
2. Fotopolimerizzazione	3	
2.1. Fotopolimerizzazione radicalica	5	
2.2. Fotoiniziatori	7	
2.2.1. Applicazioni di fotoiniziatori nel visibile	8	
2.3. Vantaggi e limiti della fotopolimerizzazione	10	
3. Tecniche di immobilizzazione cellulare	11	
3.1. Vantaggi e limiti dell'immobilizzazione dei microrganismi	11	
3.2. Metodi di immobilizzazione		
3.2.1. Adesione o adsorbimento superficiale	12	
3.2.1.1. Adsorbimento físico	12	
3.2.1.2. Adsorbimento chimico	13	
3.2.2. Intrappolamento in matrici porose	14	
3.2.3. Contenimento tramite membrana	15	
3.2.4. Aggregazione	16	
3.2.4.1. Auto-aggregazione naturale	16	
3.2.4.2. Cross-linking	17	
4. Idrogeli polimerici: tipologie ed applicazioni	19	
4.1. Classificazione degli idrogeli		
4.1.1. Classificazione degli idrogeli in base al tipo di legame	20	
4.1.1.1. Reticolazione chimica	21	
4.1.1.2. Reticolazione fisica	23	
4.1.2. Classificazione degli idrogeli per la natura dei costituenti		
4.1.2.1. Idrogeli naturali	24	
4.1.2.2. Idrogeli sintetici	26	
4.2. Applicazioni degli idrogeli polimerici	28	
5. Introduzione dei microrganismi utilizzati nel lavoro di tesi	31	
5.1. Impiego di Pseudomonas fluorescens	31	
5.2. Impiego di Rhodotorula mucilaginosa	33	
6. Materiali e metodi	35	
6.1. Materiali utilizzati per la sintesi degli idrogeli polimerici		
6.2. Caratterizzazione chimico-fisica degli idrogeli polimerici	37	
6.2.1. Fotoreologia	37	

6.2.2.	Osservazione degli idrogeli mediante microscopia ottica	38
6.2.3.	. DMTA: analisi termica dinamo-meccanica	
	6.2.3.1. Misura della densità di reticolazione	39
6.2.4.	Prove di swelling	39
6.2.5.	Ottimizzazione dei lavaggi degli idrogeli	39
6.3. Intrappola	amento dei microrganismi negli idrogeli polimerici	40
6.3.1.	Microrganismi impiegati, terreni di coltura e condizioni di crescita	40
6.3.2.	Preparazione dell'inoculo e valutazione della crescita dei microrganisti	mi 41
6.3.3.	Inibizione della crescita dei microrganismi da parte dei monomeri deg idrogeli e dell'irraggiamento	gli 41
6.3.4.	Prove di diffusione per la valutazione del trattenimento dei microrganismi da parte dei film polimerici	42
6.3.5.	Intrappolamento dei microrganismi negli idrogeli	43
7. Risultati e discus	sione	45
7.1. Caratteriz	zzazione degli idrogeli	45
7.1.1.	Fotoreologia degli idrogeli polimerici	45
7.1.2.	Immagini al microscopio ottico degli idrogeli polimerici	50
7.1.3.	DMTA: analisi termica dinamo-meccanica	51
	7.1.3.1. Risultati relativi alla densità di reticolazione	56
7.1.4.	Prove di swelling	57
7.1.5.	Ottimizzazione dei lavaggi degli idrogeli	59
7.2. Intrappola	amento dei microrganismi negli idrogeli polimerici	61
7.2.1.	Valutazione dell'inibizione della crescita dei microrganismi da parte o monomeri P550 e P250	lei 61
7.2.2.	Valutazione del cut-off del reticolo polimerico per il trattenimento dei microrganismi	64
7.2.3.	Caratterizzazione degli idrogeli contenenti i microrganismi	68
	7.2.3.1. Fotoreologia degli idrogeli contenenti <i>P. fluorescens</i> e <i>R. mucilaginosa</i>	69
	7.2.3.2. Analisi DMTA dei campioni contenenti <i>P. fluorescens</i> e <i>R. mucilaginosa</i>	71
8. Conclusioni e pro	ospettive future	75

1. Introduzione

L'impiego biotecnologico dei microrganismi presenta molti campi applicativi, quali i processi fermentativi per beni alimentari [1], per il trattamento di acque reflue [2] e per la produzione di farmaci [3], oltre che, come elementi di rilevamento biologico per la produzione di biosensori [4].

L'utilizzo dei microrganismi è particolarmente diffuso grazie alle loro capacità di resistere ad ampi intervalli di pH e temperatura e di individuare un'ampia gamma di sostanze chimiche [4].

Negli ultimi anni la tecnica dell'immobilizzazione cellulare è ritenuta sempre più interessante e impiegabile per differenti applicazioni, in campo industriale [5], biomedico e sensoristico [6]. Infatti, rispetto ad altre tecnologie, l'immobilizzazione cellulare mostra molti vantaggi, come la prolungata attività metabolica, la stabilità delle cellule, i bassi costi, la capacità di individuare le sostanze chimiche tossiche più velocemente e la maggiore resistenza a queste; inoltre, viene migliorata l'efficienza del processo biotecnologico in termini di produttività. Una delle tecniche di immobilizzazione è l'intrappolamento, mediante il quale le cellule vengono racchiuse in una matrice polimerica sufficientemente porosa per consentire la diffusione dei nutrienti alle cellule [7]. In particolare, l'intrappolamento di cellule microbiche può avvenire sia in maniera passiva, usando la naturale tendenza dei microrganismi di attaccarsi alle superfici naturali o sintetiche e crescere su di esse, che in maniera attiva mediante agenti flocculanti o chimici [8].

Possono essere utilizzate come matrice di intrappolamento dei microrganismi gli idrogeli polimerici.

Gli idrogeli possono essere definiti come una catena polimerica reticolata in grado di trattenere acqua all'interno della loro struttura porosa, grazie alla presenza di gruppi idrofilici e densità di reticolazione [9]. Gli idrogeli possono essere utilizzati come biosensori, sistemi di somministrazione di farmaci, attuatori in processi medici e in processi di bioseparazione [10]. Gli idrogeli, possono essere classificati in base al tipo di legame con cui vengono formati, sono definiti fisici quando il loro reticolo viene tenuto insieme da forze secondarie che includono forze ioniche e i legame ad idrogeno, sono invece chiamati chimici quando vengono reticolati mediante legami covalenti [11].

L'obiettivo del presente lavoro è l'intrappolamento di microrganismi all'interno di idrogeli, ottenuti mediante fotoreticolazione. In particolare come microrganismi sono stati testati un batterio (*P. fluorescens*) e un lievito (*R. mucilaginosa*).

Durante una fase preliminare, sono state valutate diverse miscele di monomeri acrilati e metacrilati, in particolare polietilenglicole diacrilato (PEGDA) e dimetacrilato (PEGDMA) a diverso peso molecolare, combinati per ottenere diverse tipologie di copolimeri; è stata inoltre testata la presenza o meno di un tampone salino acquoso (phosfate-buffered saline, PBS), fondamentale per il successivo intrappolamento dei microrganismi. Tuttavia, in alcune delle miscele è stata osservata una separazione di fase che complica la successiva polimerizzazione. Per tale motivo, sono state selezionate solo alcune delle miscele preparate. Le miscele selezionate sono state quindi fotopolimerizzate mediante irraggiamento con luce visibile in un fotoreometro che, in tempo reale, permette di valutare la variazione del modulo elastico durante la polimerizzazione. Gli idrogeli così ottenuti sono stati essiccati in vuoto e sono stati caratterizzati mediante analisi termiche dinamo-meccaniche (DMTA) e prove di swelling (rigonfiamento). Una volta caratterizzati i diversi idrogeli, sono state condotte delle prove

preliminari all'intrappolamento dei microrganismi. In particolare, è stata valutata la possibile tossicità nei confronti dei microrganismi scelti, testando i monomeri irraggiati o meno con luce visibile su terreno agarizzato. In seguito, è stato sviluppato un test in camera di diffusione per valutare la capacità di trattenimento dei microrganismi da parte dei film. Infine, sono stati preparati dei film con i microrganismi intrappolati, che sono stati opportunamente caratterizzati dal punto di vista della cinetica di reticolazione, tramite fotoreologia in tempo reale, nonché dal punto di vista delle proprietà termiche e meccaniche, tramite analisi DMTA.

In questo elaborato, inizialmente, si tratterà la fotopolimerizzazione, essendo proprio questa la tecnica usata per polimerizzare le miscele di prepolimeri, in seguito si tratteranno le diverse metodologie di immobilizzazione di microrganismi, con particolare riferimento all'intrappolamento e alle sue applicazioni. Successivamente si descriveranno le diverse tipologie di idrogeli e le varie applicazioni in cui vengono impiegati. Saranno, quindi, introdotti i microrganismi che verranno impiegati nella parte sperimentale di questo lavoro di tesi e i loro principali utilizzi. Infine, saranno esaminati i metodi e i materiali impiegati per condurre le prove sperimentali, quindi discussi i risultati ottenuti.

2. Fotopolimerizzazione

Nell'ultimo secolo, la fotopolimerizzazione ha suscitato grande interesse sia per motivi ecologici che economici. Da più di trenta anni è alla base di numerose applicazioni convenzionali ed è utilizzata per molti scopi, quali, ad esempio, la realizzazione di rivestimenti [12], di guide ottiche [13] e di otturazioni dentali [14], così come nell'ambito microelettronica [15], dell'ingegneria ossea [16] della e tissutale [17]. La fotopolimerizzazione può essere eseguita a temperatura ambiente o a temperature inferiori: ciò la pone in contrasto con le polimerizzazioni termiche, le quali richiedono temperature elevate [18][19]; questo rappresenta sicuramente un notevole vantaggio per la fotopolimerizzazione e rende possibile il suo impiego anche nei casi in cui l'alta temperatura costituisce un limite [19]. Infatti, la fotopolimerizzazione, poiché richiede basse temperature, può essere adoperata per applicazioni biomedicali, come l'immobilizzazione di cellule [20]. La polimerizzazione fotoiniziata è un processo che si serve della luce come fonte di energia per indurre la conversione di piccole molecole insature allo stato liquido in macromolecole solide a seguito di reazioni di polimerizzazione. I componenti di base del liquido di partenza sono monomeri o prepolimeri che con l'eccitazione possono solidificare in due modi: polimerizzazione e reticolazione (o cross-linking) [21]. Le reazioni di polimerizzazione possono essere indotte da tanti tipi di radiazioni, tra cui raggi X, raggi γ, raggi IR, raggi UV, microonde, fasci di elettroni e ioni; di solito però la fotopolimerizzazione viene attivata dalla luce UV e dalla regione di luce visibile [21]. La reazione può essere avviata da un fotoiniziatore che si decompone e genera radicali in risposta alla luce UV o visibile. La fotopolimerizzazione può formare diverse tipologie di polimeri, tra cui i termoplastici e i termoindurenti, i primi si ottengono da monomeri monofunzionali e sono costituiti da catene lineari e poco ramificate, non reticolate (ovvero non legate le une con le altre); i termoindurenti, invece, si ottengono da monomeri di partenza bi o polifunzionali che, reagendo, vanno a formare un vero e proprio reticolo connesso da legami chimici (Figura 2.1) [22].



Figura 2.1 Un polimero lineare a sinistra e uno reticolato a destra (i cerchi neri indicano i punti di reticolazione).

Nel 1929 il chimico Carothers propose la divisione dei polimeri in due categorie in base al loro meccanismo di formazione: condensazione e addizione [23].

La reazione di polimerizzazione per condensazione avviene attraverso l'unione di due molecole e l'eliminazione di una molecola di piccole dimensioni. I monomeri di partenza

devono possedere determinati requisiti affinché possa avvenire la polimerizzazione per condensazione, in particolare devono presentare almeno due siti reattivi cioè due gruppi funzionali, quali per esempio il gruppo alcolico, il gruppo amminico o il gruppo carbossilico [24].

Un esempio di polimerizzazione per condensazione è la reazione di formazione del poliestere che vede l'eliminazione di acqua (formula di reazione indicata con Eq. (1)) [25]:

$$nHO-R-OH + nHOCO-R'-COOH \rightarrow OH[-R-OCO-R'-COO-]_nH + (2n-1)H_2O$$
(1)

Nella polimerizzazione per addizione, i monomeri reagiscono per formare la catena polimerica senza perdita di atomi, questo è un aspetto tipico delle molecole che contengono i doppi legami C=C (alcheni) [26]. In questo caso l'elemento base della catena, il monomero, reagisce con altri monomeri uguali che troviamo ripetuti all'interno della lunga catena idrocarburica. Tali reazioni di polimerizzazione possono realizzarsi con un meccanismo anionico, cationico o radicalico e avvengono grazie ad un catalizzatore che rompe il doppio legame e rende disponibile gli atomi di carbonio per formare nuovi legami con conseguente accrescimento del polimero [26].

Un esempio di polimerizzazione per addizione dovuto ad un monomero vinilico insaturo è il seguente (formula di reazione indicata con Eq. (2)) [25]:

$$CH_2=CH \rightarrow -CH_2-CH-CH_2-CH$$
(2)
$$| \qquad | \qquad | \qquad | \qquad X \qquad X$$

Nella Tabella 2.1 vengono evidenziate alcune differenze sostanziali tra i due tipi di polimerizzazione:

Polimerizzazione per condensazione	Polimerizzazione per addizione
Il peso molecolare non è un multiplo	Il peso molecolare è un numero intero
intero delle unità monomeriche di partenza	multiplo del monomero di partenza
Generalmente richiede più di un'unità	Generalmente richiede una sola unità
monomerica	monomerica
Le unità monomeriche devono avere	Le unità monomeriche presentano uno o più
almeno due gruppi funzionali	siti di insaturazione

 Tabella 2.1. Differenze tra polimerizzazione per condensazione e per addizione.

La radiazione visibile può dare inizio alla fotopolimerizzazione grazie ad un fotoiniziatore che interagisce con essa, assorbendola. In questo modo, il fotoiniziatore si decompone in radicali liberi che fungono da starter per la reazione di polimerizzazione per addizione radicalica [25].

Nel prosieguo del lavoro, verrà approfondita la trattazione della la fotopolimerizzazione per addizione radicalica, tecnica utilizzata nelle fasi successive del lavoro di tesi.

2.1 Fotopolimerizzazione per addizione radicalica

Come precedentemente riportato, la fotopolimerizzazione per addizione può essere ionica o radicalica [27]. La fotopolimerizzazione ionica, può essere, a sua volta, cationica o anionica a seconda della natura della specie reattiva generata; nel caso della fotopolimerizzazione radicalica, invece, la specie reattiva è un radicale libero che induce una propagazione della reazione [27][28].

Nella fotopolimerizzazione radicalica si possono distinguere tre meccanismi chiave della reazione: iniziazione, propagazione e terminazione [29].

Nella fase di inizio, la luce, ricopre un ruolo fondamentale, in quanto attiva il fotoiniziatore (PI), promuovendo un elettrone ad un orbitale con un'energia maggiore, indicato in Eq. (3):

$$PI + luce \rightarrow PI^*$$
 (3)

La vita del radicale attivato PI* è estremamente breve, generalmente meno di 10^{-6} secondi. In questo tempo, PI* può subire due processi: uno di disattivazione nel quale tramite emissione di calore o luce ritorna ad essere PI e un altro, invece, mediante il quale si ottiene la formazione di un intermedio reattivo R•, indicato in Eq. (4) [29]:

$$PI^* \rightarrow R^{\bullet}$$
 (4)

La specie reattiva \mathbb{R}^{\bullet} , fortemente instabile, reagisce con il monomero M per formare una catena polimerica (\mathbb{P}_1^{\bullet}) in crescita, Eq. (5), caratterizzata dalla costante cinetica di iniziazione, k_i :

$$\mathbf{R} \bullet + \mathbf{M} \to \mathbf{P}_1 \bullet \tag{5}$$

Nella propagazione, Eq. (6), viene aggiunta una uguale unità monomerica alla catena in crescita, con costante cinetica, k_p :

$$P_n \bullet + M \to P_{n+1} \bullet \tag{6}$$

Per la terminazione esistono due processi, la cui competitività varia in base alla circostanza in cui si verificano [30]. Per esempio in un mezzo viscoso, il tipo di terminazione che predomina dipende dalla percentuale di monomeri convertiti in polimero, infatti, all'inizio della reazione, quando la conversione è relativamente piccola, predomina quella bimolecolare; al crescere della percentuale di monomeri convertiti predomina quella monomolecolare. La prima terminazione indicata in Eq. (7.a) è caratterizzata con la costante cinetica k_t , invece, la seconda terminazione, indicata in Eq. (7.b), è descritta con la costante cinetica k_{tp} :

$$P_{n} \bullet + P_{m} \bullet \rightarrow P_{n+m} \left(P_{n} + P_{m} \right) \tag{7.a}$$

$$P_{n}\bullet + R\bullet \rightarrow P_{n}R \tag{7.b}$$

La prima è una normale terminazione bimolecolare, chiamata combinazione, in cui due macroradicali crescono insieme e terminano; la seconda è una terminazione monomolecolare, chiamata disproporzionamento, in cui un macroradicale in crescita reagisce con un radicale primario e si ha formazione di un polimero inattivo [30].

La fotopolimerizzazione radicalica è molto popolare grazie alla vasta disponibilità di monomeri che possono essere utilizzati. Tuttavia, nel caso della fotopolimerizzazione degli acrilati, durante la fase di inizio, si hanno dei problemi di inibizione da parte dell'ossigeno molecolare [31]. Questo rappresenta un problema molto importante poiché quasi tutte le reazioni di fotopolimerizzazione avvengono in presenza di aria. La reazione tra radicali iniziatori e ossigeno, caratterizzata dalla costante di equilibrio k_0 , forma dei radicali perossilici (Figura 2.2) che possono evolversi in idroperossidi e disattivare i radicali iniziatori. L'ossigeno, provoca degli effetti dannosi, infatti, porta ad un lungo periodo di induzione della reazione e quindi ad una diminuzione della velocità di polimerizzazione, della conversione finale e della lunghezza della catena polimerica; inoltre, contribuisce alla formazione sulla superficie del polimero di uno strato appiccicoso [31].



Figura 2.2: Reazione di formazione dei radicali perossilici. [31]

In un ambiente ben aerato, dove la concentrazione dell'ossigeno è dell'ordine di 10⁻³ mol/L, la fotopolimerizzazione non può svilupparsi perché ko>> kp così che tutti i radicali formati reagiscono con l'ossigeno disciolto nel monomero (reazione di scavening) [32]. Le conseguenze di questa reazione sono il progressivo consumo di ossigeno e durante il periodo di inibizione la diminuzione costante della sua concentrazione nel monomero irradiato. Il processo di polimerizzazione inizierà solo quando i monomeri saranno in grado di competere con l'ossigeno, per la reazione di scavening dei radicali iniziatori, cioè quando $k_0 \approx k_p$. Nei sistemi aperti viene raggiunta una concentrazione stazionaria di ossigeno disciolto, nel momento in cui l'ossigeno consumato viene subito compensato da quello atmosferico attraverso la superficie del film di polimerizzazione. La concentrazione di ossigeno che allo stato stazionario consente la polimerizzazione è di circa 4,2·10⁻⁶ mol/L [32]. Considerando che per gli acrilati, la concentrazione di ossigeno è approssimativamente 10⁻³ mol/L, la concentrazione iniziale di ossigeno deve essere ridotta di oltre cento volte prima che si verifichi la polimerizzazione. Pertanto, l'entità dell'inibizione dell'ossigeno dipende fortemente dalla velocità con cui viene consumato l'ossigeno. Questo limite, può essere superato utilizzando grandi quantità di fotoiniziatori oppure impiegando intensità luminose molto alte che generano elevate concentrazioni di radicali iniziatori e consumano l'ossigeno disciolto nei mezzi di polimerizzazione [33]. In alternativa, l'inibizione dell'ossigeno è arginabile, attraverso il rivestimento con film di azoto o polietilene, anche se è un metodo fisico molto costoso [33]. Un aspetto interessante per limitare l'inibizione da ossigeno è l'effetto che ha la struttura del monomero, infatti, monomeri contenenti più gruppi eteri sono più viscosi e meno sensibili all'ossigeno [33]. Altri modi prevedono l'aggiunta al sistema di alcune specie chimiche come le N-vinilammidi o di alcuni additivi come le ammine [34] o tioli [35].

2.2 Fotoiniziatori

La fotopolimerizzazione può essere ottenuta con l'assorbimento di un fotone per ogni fase di propagazione (la cosiddetta "fotopolimerizzazione diretta"), oppure, con l'assorbimento di un solo fotone per la fase di attivazione ("polimerizzazione fotoiniziata") [36].

Quindi, un fotoiniziatore è una molecola, usata da sola o in combinazione con altre, in grado di formare specie reattive radicali, cationi radicalici e protoni che possono iniziare reazioni a catena, a seguito dell'assorbimento di luce ultravioletta o visibile di opportuna intensità [37]. Di seguito alcune proprietà di base dei fotoiniziatori, necessarie per lo svolgimento della fotopolimerizzazione [38]:

- 1. Stabilità termica;
- 2. Elevata capacità di assorbimento nella regione UV-visibile dello spettro;
- 3. Produzione di un anione, un radicale o catione, a seguito dell'irradiazione, in grado di avviare la polimerizzazione;
- 4. Assenza di tossicità e odori;
- 5. Eccellente conservabilità e stabilità una volta disciolto nella miscela reattiva;
- 6. Facilità di sintesi e costo contenuto.

È possibile dividere i fotoiniziatori in due classi in base al tipo di reazione che sviluppa le specie radicali:

• Fotoiniziatori di tipo 1: generano due radicali primari mediante la fotolisi dei legami carbonio-carbonio in posizione alfa ad un gruppo carbonilico (reazioni di Norrish I) (Fig. 2.3) [39]. Si tratta di una scissione omolitica intermolecolare sul carbonio α definita α -cleavage. Questi radicali sono in grado di iniziare una reazione di polimerizzazione a catena. Rientrano in questa tipologia di fotoiniziatori, i composti carbonilici aromatici che hanno dei sostituenti adatti all'assorbimento della luce come i benzil-chetali, gli α -amminochetoni e gli ossidi di acilfosfina [40].

I radicali, ottenuti a seguito della scissione del legame chetonico, reagiscono tra di loro eliminando un C=O e producono un alcano.



Figura 2.3: Esempio di reazione di Norrish di tipo I. [41]

• Fotoiniziatori di tipo 2: la cui operatività avviene mediante l'estrazione di un atomo di idrogeno e il suo trasferimento sull'ossigeno carbonilico, in questo modo si genera un diradicale reattivo mediante processi bimolecolari (reazione di Norrish II), costituiti da un iniziatore e da un coiniziatore [42]. Gli iniziatori assorbono la luce, che passa ad uno stato terziario eccitato e possiede l'energia necessaria all'estrazione dell'idrogeno; tra gli iniziatori si distinguono i camforchinoni e gli tioxantoni. Tra i coiniziatori che partecipano alla reazione vi possono essere, i tioli e gli alcoli, che donano atomi di idrogeno, o le ammine, che donano elettroni [40].

La reazione di Norrish del secondo tipo (Fig 2.4) implica il trasferimento dell'idrogeno γ all'ossigeno carbonilico per formare un 1,4-idrossi biradicale [41].



Figura 2.4: Esempio di reazione di Norrish di tipo II. [41]

2.2.1. Applicazioni di fotoiniziatori nel visibile

Alla fine degli anni novanta sono stati sviluppati i fotoiniziatori che operano nella regione del visibile dello spettro elettromagnetico, in termini lunghezze d'onda comprese tra i 390 nm e i 700 nm. Questi iniziatori assorbono la luce di vari colori, tra cui blu, verde e rossa, con una velocità simile a quella fotografica che provoca la conversione di un monomero acrilico liquido altamente funzionalizzato in un poliacrilato solido [43]. Paragonando i fotoiniziatori appena descritti con quelli che assorbono luce ultravioletta, i primi presentano notevoli vantaggi rispetto ai secondi in termini di sicurezza di irradiazione, profondità di indurimento e costo dell'apparecchiatura utilizzata [44]. Inoltre, i fotoiniziatori ultravioletti provocano una forte tossicità per le cellule tale da provocarne la morte [45].

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato come fotoiniziatore che assorbe nel campo del visibile: l'acido bismetoilfosfinico o BAPO-OH, (MesCO)₂P(O)OH (Figura 2.5) [46]. Il BAPO-OH è un BAPO (fotoiniziatore commerciale) funzionalizzato con un gruppo OH, sintetizzato nei laboratori di Zurigo al fine di ottenere un iniziatore attivo nel visibile e idrosolubile [47]. Infatti, la maggior parte dei fotoiniziatori non sono solubili in acqua [48]. Il BAPO-OH si può ottenere da fosforo rosso e da sodio metallico, utilizzando come solvente in cui far avvenire la reazione il dimetossietano, e come promotore redox il naftalene ($C_{10}H_8$). In questo modo, il sodio e il fosforo vengono convertiti in sodio fosfuro. A seguito della protonazione, di una reazione con mesitoilcloruro (MesCOCI) e di un trattamento con acido acetico (HOAc), si ottiene il fosfagenolo (indicato con il numero 1 nella Figura 2.5). Infine, per ottenere il BAPO-OH con un rendimento pari all'87% (riferito a P) viene aggiunto il perossido di idrogeno (H₂O₂) [46].

In Figura 2.5 viene riportata la sintesi del BAPO-OH, in modo schematico:



Figura 2.5: Schema riassuntivo della sintesi del BAPO-OH da fosforo rosso e sodio metallico. [46]

I cristalli di BAPO-OH fondono a T=134,7 °C e sono termicamente stabili fino a 250 °C. La pK_a è pari a 2,48 ed è stato ottenuto mediante titolazione con NaOH 0,1 M in acqua [46].

I fotoiniziatori idrosolubili, come il BAPO-OH, vengono richiesti ampiamente per varie applicazioni. Per esempio, nel 2013, è stata dimostrata, mediante la presenza del BAPO-OH nella reazione di riduzione fotochimica, l'azione riducente di Cu (II). Il processo viene effettuato in acqua a temperatura ambiente e a seguito dell'irradiazione si ottiene il rame cristallino [49]. Grazie alle loro proprietà fisiche e chimiche, le nanoparticelle di rame vengono utilizzate in molteplici applicazioni come catalizzatori, dispositivi ottici, elettronici e come sensori biologici e chimici [50]. Per la preparazione delle nanoparticelle di rame, nella letteratura scientifica, si trovano numerosi metodi, tra cui la fotoriduzione del Cu (II) a Cu (I). Questo processo di produzione di nanomateriali di rame in sistemi acquosi, in cui il BAPO-OH funge da ligando e da agente di riduzione di 4 elettroni, possiede una resa molto alta. L'aggiunta di agenti come il PVP (polivinilpirrolidone) aiuta a stabilizzare le particelle di rame e ne influenza la dimensione e la morfologia [51]. Infatti, aumentando la concentrazione del PVP si formano particelle di rame di dimensioni più piccole, dapprima bastoncellari e, continuando ad aumentare il PVP, si ottengono nanoparticelle sferiche. Infine, con un'elevata concentrazione di PVP si possono ottenere i nanofili di rame, aventi diametro pari a 30 nm e lunghezze fino a diversi micrometri [49].

Il BAPO-OH è un blocco fondamentale e versatile per la sintesi dei BAPO etero-sostituiti [49]. Infatti, viene facilmente raggiunto dal cloruro dell'acido fosfinico trasformandosi in BAPO-Cl, questo reagendo con ammine, alcoli e tioli produce i corrispondenti BAPO etero-sostituiti con una buona resa. Quindi, è possibile adattare il BAPO (ossido di bis(acil)fosfano) alla composizione del sistema richiesto per un'applicazione specifica selezionando un sostituente appropriato sul fosforo. Inoltre, la natura acida del BAPO-OH consente di produrre una vasta quantità di sali come il Na(BAPO-O) che è molto solubile in acqua [49][52][53]; entrambi i fotoiniziatori vengono impiegati nella polimerizzazione di emulsioni prive di tensioattivi (SFEP), ciò è interessante per ottenere, mediante metodi sostenibili, dispersioni di particelle polimeriche stabili in acqua [46].

Esistono tanti altri fotoiniziatori attivati dalla luce visibile. tra questi i benzoyltrimethylgermane (BTMGe) e i dibenzoyldiethylgermane (DBDEGe) che sono dei derivati del benzoil germanio che hanno belle buone proprietà meccaniche come la resistenza alla flessione, stabilità in conservazione e alla luce UV, molto utilizzati nei compositi dentali a base di resina. Questi due possono sostituire il camforchinone (CQ) e l'etilene 4-(N,Ndimetilammino) benzoato (EMBO) perché sono più stabili alla luce UV e in deposito [54]. Un altro fotoiniziatore sintetizzato e studiato è il sale di ferrocenio Fc-NBP che se esposto alla luce visibile avvia sia la polimerizzazione cationica che quella radicalica di acrilati ed epossidi [55]. La velocità di fotopolimerizzazione degli acrilati quando si utilizza Fc-NBP come fotoiniziatore risulta essere più veloce di quando si fotopolimerizza l'oligomero DGEBA (bisfenolo-A-epossido), tuttavia la velocità riferita a quest'ultima reazione può essere accelerata usando il fotosensibilizzante BPO (perossido di benzoile) [55]. Gli epossidi possono essere polimerizzati in caso di esposizione alla luce visibile anche con dei sistemi fotoiniziati a base di colorante boro-dipirrometene (bodypy), di sale di iodonio e di tris(trimetilsilil)silano [56]. La presenza di silano aumenta la percentuale di epossido che viene polimerizzato e convertito. Viene anche utilizzato per la sintesi di reticoli polimerici di miscele costituite da acrilati e vinil eteri [56]. Nel 2009 ha destato curiosità il fotoiniziatore formato dal complesso metallico $Ru(bpy)_3^{2+}$ utilizzato per la polimerizzaizone del vinile e come sonda molecolare per rilevare NIPAM (N,N-dimetilanilina) e AMPS (2-acrilammido-2metilpropansolfonico acido) negli idrogeli. Il grado di polimerizzazione e di conversione sono influenzati dalla struttura del monomero; in particolare, aumentando la concentrazione di NIPAM rispetto a quella di AMPS, diminuiscono [57].

2.3 Vantaggi e limiti della fotopolimerizzazione

I diversi vantaggi dell'impiego delle radiazioni luminose o ad alta energia per iniziare la reazione di fotopolimerizzazione hanno riscosso notevole interesse. Le radiazioni luminose vengono emesse da una sorgente grazie alla quale è possibile confinare le zone che devono subire la reticolazione e monitorare il procedere della reazione di polimerizzazione. Infatti, semplicemente accendendo o spegnendo la fonte luminosa si riesce a controllare la reticolazione dei monomeri [58]. Il risparmio energetico è significativo rispetto ai processi tradizionali, poiché è limitato all'inizio della reazione ed è localizzato su determinate zone, limitando al massimo le eventuali dispersioni. Una importante peculiarità è la rapida reazione di polimerizzazione che porta ad elevate produttività ed efficienze a costi limitati [59][60]. Un altro grande vantaggio deriva dalla possibilità di eseguire una rapida reticolazione a temperatura ambiente o inferiore che permette di utilizzare questa tecnica della fotopolimerizzazione in applicazioni biochimiche, come l'immobilizzazione di enzimi e di microrganismi [20]. Inoltre, evitando di raggiungere temperature elevate, si estende il numero di monomeri che possono essere utilizzati, garantendo la versatilità del processo [61].

I sistemi fotopolimerizzabili ed in particolare i sistemi radicalici di cui ci occupiamo in questa tesi, oltre a presentare evidenti vantaggi rispetto a processi tradizionali, mostrano limiti e criticità non trascurabili. Si tratta di limiti e non di svantaggi poiché molti di essi risultano risolvibili. Come già spiegato prima, una importante criticità nella fotopolimerizzazione radicalica è data dall'inibizione da parte dell'ossigeno presente nell'ambiente, perché disattiva i radicali formati dall'iniziatore, ostacolando e in certi casi impedendo l'iniziazione della reazione. Quanto descritto rappresenta una criticità della fotopolimerizzazione radicalica, tuttavia, sono state sviluppate alcune strategie per mitigare questo problema, come l'allontanamento dell'ossigeno dalla superficie irradiata mediante un flusso di gas inerte, l'inserimento nel sistema di molecole più affini all'ossigeno che reagiscono con esso prima che inibisca i radicali del fotoiniziatore oppure un aumento della quantità del fotoiniziatore [62]. Un altro aspetto critico nella fotopolimerizzazione radicalica è il ritiro volumetrico, che implica un notevole limite in determinate applicazioni, infatti, a causa di esso si verifica un accumulo di forti tensioni che può rivelarsi molto dannoso [63]. Spesso si hanno problemi ambientali poiché i polimeri sono prodotti da monomeri e i fotoiniziatori, che spesso sono tossici, hanno forti odori e alta volatilità [20]. Infine, esiste una forte relazione tra radiazione e spessore dei film polimerici ottenibili. Infatti, una volta che la radiazione ad alta intensità inizia a reticolare, fa più fatica a raggiungere gli strati più interni del manufatto polimerico, quindi ad una certa profondità la radiazione non riesce a penetrare facilmente e non è garantita la completa omogeneità della reticolazione [64]. Quindi, i gradienti di velocità e di intensità della luce influiscono sulla omogeneità del film, infatti, la superficie del campione più vicina alla fonte luminosa avrà una velocità di polimerizzazione maggiore rispetto alla porzione del campione più lontano da essa [58]. Un rimedio a questa criticità è la stampa 3D che grazie all'irraggiamento limitato ai singoli strati sottili, garantisce un'efficiente uniformità della polimerizzazione [65].

3. Tecniche di immobilizzazione cellulare

I primi tentativi di immobilizzazione furono sperimentati intorno al 1950 da Grubhofer e Schleith, i quali riuscirono a intrappolare alcuni enzimi come carbossipeptidasi, diastasi, pepsina e ribonucleasi in una resina poliacrilstirenica diazotata [66]. Con il termine "enzimi immobilizzati" si intende "enzimi fisicamente confinati o localizzati in una determinata regione dello spazio con conservazione delle loro attività catalitiche e che possono essere usati ripetutamente e continuamente" [67]. Nel 1967, Chibata e alcuni suoi collaboratori, svilupparono l'immobilizzazione di un'aminoacilasi prodotta da Aspergillus orvzae per la risoluzione di amminoacidi D-L racemici sintetici [68]. Questo è stato il primo uso industriale al mondo di enzimi immobilizzati. Gli enzimi vengono estratti da tutti gli organismi: animali, piante e microrganismi. Quelli ottenuti da microrganismi sono i più adatti a scopi industriali per vari motivi, tra i quali il basso costo di produzione, le non limitate condizioni di produzione e il breve tempo di produzione [69]. Tuttavia, questi enzimi estratti sono spesso instabili (caratteristica della loro struttura complessa) e non impiegabili per l'uso pratico dell'immobilizzazione a causa dei loro difficoltosi processi di produzione, lavorazione e stoccaggio che gravano economicamente sull'intero processo industruale [70]. Negli anni settanta, con lo scopo di eliminare la necessità di estrarre l'enzima dai microrganismi e di utilizzare sistemi multienzimatici, si è tentato di immobilizzare in modo diretto intere cellule di microrganismi. In particolare, nel 1973, si è riuscito a produrre l'acido L-aspartico, utilizzando delle cellule di Escherichia coli immobilizzate [71]. Questa è considerata la prima applicazione industriale di cellule microbiche immobilizzate. Da un confronto tra l'immobilizzazione enzimatica e quella cellulare, quest'ultima è considerata molto più vantaggiosa per fattori economici, avendo un costo più basso, per la migliore stabilità e per il tempo richiesto per l'esecuzione [70]. Infatti, i costi per l'isolamento dell'enzima dalla cellula di appartenenza e per la sua purificazione sono molto alti.

Di seguito verranno illustrati i diversi vantaggi e svantaggi dell'immobilizzazione dei microrganismi e le varie tecniche di immobilizzazione cellulare.

3.1 Vantaggi e limiti dell'immobilizzazione dei microrganismi

Tra i principali vantaggi per cui viene impiegata l'immobilizzazione di microrganismi vi sono i costi contenuti, l'attività prolungata e la stabilità delle cellule (infatti, la matrice di immobilizzazione può agire come mezzo di protezione da tensioni meccaniche, da variazioni di pH e temperatura, e da sostanze tossiche) [72]. La densità di cellule è più elevata rispetto ai sistemi non immobilizzati (sospesi) e ciò comporta alte rese di produzione [73]. Altri grandi vantaggi per le applicazioni industriali possono essere il riutilizzo dei sistemi immobilizzati, il facile recupero dei prodotti ottenuti e la continuità dei processi [73]. Tuttavia, esistono delle modo significativo limitazioni che possono influenzare in l'applicazione dell'immobilizzazione a livello industriale. Infatti, una non controllata crescita dei microrganismi può portare allo sfaldamento della matrice di intrappolamento e alla contaminazione dei prodotti o alla perdita della biomassa [74]. Inoltre, la matrice di immobilizzazione può limitare la diffusione dei nutrienti e dei prodotti e andare incontro ad abrasione nel tempo [75]. Ciò avviene, in alcuni casi, a causa della crescita cellulare e, in altri, a causa di stress meccanici dovuti a mass transfer all'interno dei bioreattori [75]. Infine, alcune sostanze chimiche utilizzate durante i processi di immobilizzazione possono essere tossiche per le cellule e provocarne la morte [74].

3.2 Metodi di immobilizzazione

L'immobilizzazione, in biotecnologia, è definita come "la tecnica utilizzata per la fissazione fisica o chimica di cellule, organelli, enzimi o altre proteine, su un supporto solido o in una matrice solida, al fine di aumentare la loro stabilità e rendere possibile il loro uso ripetuto o continuo" [76]. Esistono numerose tecniche per ottenere l'immobilizzazione di microrganismi. Queste possono essere classificate in base al processo fisico coinvolto, cioè adesione o adsorbimento, intrappolamento, contenimento e aggregazione, o in base al processo chimico, cioè la formazione di un legame covalente o ionico, entrambi generalizzati con il nome cross-linking [77]. La classificazione dei sistemi immobilizzati secondo il processo fisico-chimico e la natura del microambiente sono mostrati in Figura 3.1. Il metodo più affidabile e conveniente è l'immobilizzazione cellulare per intrappolamento, perché è semplice e le condizioni in cui avviene risultano essere meno aggressive per le cellule [78] (in seguito saranno trattati in modo più approfondito questi aspetti). Nella valutazione di un metodo di immobilizzazione devono essere presi in considerazione alcuni fattori relativi alla matrice di immobilizzazione, come il suo grado di porosità, il volume dei suoi pori, l'idrofilicità, la presenza di gruppi funzionali, il suo riutilizzo, la stabilità meccanica, la tossicità dei reagenti utilizzati, la disponibilità, il costo dei reagenti e delle attrezzature per la sua realizzazione [79].



Figura 3.1: Classificazione dei metodi di intrappolamento cellulare. (Figura parzialmente modificata da [80])

3.2.1 Adesione o adsorbimento superficiale

L'immobilizzazione dei microrganismi mediante adsorbimento su un supporto può essere ottenuta naturalmente o indotta artificialmente usando degli agenti detti di cross-linking, come ossidi metallici o agenti leganti covalenti come glutaraldeide o gli organosilani [76].

3.2.1.1 Adsorbimento físico

I microrganismi riescono a legarsi al supporto organico o inorganico mediante interazioni ioniche, di Van der Waals e legami ad idrogeno. Queste interazioni governano l'adesione che è lo step chiave nel controllo dell'immobilizzazione cellulare sul supporto. In Figura 3.2 viene mostrato come appaiono legati il supporto e i microrganismi [81]. Tra i supporti preferiti per questo tipo di immobilizzazione ci sono materiali come vetro [82] o pietra pomice [83], le cui capacità di adsorbimento possono essere migliorate se trattati con policationi o chitosano [76]. Le proprietà meccaniche fondamentali dei supporti affinché possano essere impiegati sono l'alta resistenza, la bassa biodegradabilità, il basso costo, la grande elasticità, l'alta disponibilità e l'elevata porosità che porta ad una importante superficie di adsorbimento [76]. Inoltre, il supporto deve avere un'alta affinità verso i microrganismi poiché sarà proprio l'adsorbente opportunamente scelto che agevola il metabolismo microbico (le cellule adsorbite sono a contatto diretto con i nutrienti), deve proteggere le cellule dagli agenti tossici e deve preservare la loro attività fisiologica [84].

L'adsorbimento fisico comporta il trasporto delle cellule sulla superficie del supporto, seguita dall'adesione, dalla successiva colonizzazione della superficie di supporto ed eventualmente la formazione di un biofilm [85]. In generale, le cellule possono essere immobilizzate irreversibilmente o reversibilmente. L'adsorbimento fisico rientra nelle tecniche di immobilizzazione reversibili, e ne rappresenta il metodo più semplice e vantaggioso da un punto di vista economico. Tuttavia, presenta alcuni svantaggi dovuti essenzialmente ai legami deboli tra il supporto e le cellule, per tale motivo, viene utilizzato per tempi brevi in quanto vi è un alto tasso di perdita di biomassa e, a causa del legame instabile e dell'impossibilità di controllare la crescita della biomassa, anche la riproducibilità è bassa [86]. Nella maggior parte dei casi la produttività delle cellule è molto sensibile ai cambiamenti delle condizioni ambientali come pH, temperatura e forza ionica tanto da produrre il loro desorbimento [87]. Tra i materiali più comuni che è possibile utilizzare come supporti si distinguono l'amido, il collagene, alcune resine a scambio ionico, il carbone attivo, il gel di silice, l'argilla, l'ossido di alluminio, il titanio e la ceramica [88]. Alcune applicazioni di microrganismi immobilizzati mediante adesione superficiale riguardano la produzione di amilasi mediante Bacillus stearothermophilus [89], la produzione di etanolo con Zymomonas mobilis [90] e la produzione di penicillina attraverso Penicillium chrysogenum [91].



Figura 3.2: Cellule immobilizzate su un supporto mediante adsorbimento. (Figura parzialmente modificata da [92])

3.2.1.2 Adsorbimento chimico

L'adsorbimento chimico consiste nella formazione di un legame chimico tra il microrganismo e il materiale di supporto (mostrato in Figura 3.3). Il legame chimico che si forma è di tipo covalente. Quest'ultimo, essendo una forte interazione, impedisce la separazione delle cellule dai relativi supporti e rende il sistema meccanicamente stabile; tuttavia, le cellule hanno poca libertà di movimento e ciò causa una diminuzione della loro attività [93]. Solitamente il supporto viene modificato e reso attivo per permettere la creazione di gruppi elettrofili su di

esso in grado di reagire con i gruppi nucleofili presenti nella parete cellulare dei microrganismi [94]. L'intrappolamento mediante formazione di legame covalente presenta degli svantaggi, uno dei quali è proprio legato all'impiego di un supporto attivato e non rinnovabile. Inoltre, poiché viene direttamente coinvolta la parete cellulare nella formazione del legame si ha un grande rischio di danneggiare le cellule [94]. Un altro limite di questa tecnica riguarda gli agenti utilizzati per la formazione dei legami covalenti che sono di solito citotossici. Dunque, è molto difficile trovare delle condizioni ottimali di intrappolamento senza danneggiare le cellule. L'adsorbimento chimico viene, quindi, impiegato solamente quando la prestazione e la stabilità del sistema immobilizzato sono maggiori rispetto alla perdita irreversibile dell'attività cellulare [95]. Esistono diversi casi in cui questa tecnica è stata applicata con successo. Uno di questi riguarda i lieviti e viene descritto da Navarro e Durand che, in un articolo del 1977, definiscono un metodo per immobilizzare tramite legame covalente il lievito *Saccharomyces carlsbergensis* su sfere di silice porosa [96]. Nel 1979, fu pubblicato un altro studio riguardate l'immobilizzazione del lievito *Saccharmyces cerevisiae* su vetro borosilicato e zirconia [97].



Figura 3.3: Cellule immobilizzate su un supporto mediante legame covalente. (Figura parzialmente modificata da [92])

3.2.2 Intrappolamento in matrici porose

L'intrappolamento è un metodo irreversibile, in cui le cellule sono immobilizzate in una matrice o all'interno di fibre (visibile in Figura 3.4). L'intrappolamento è il metodo più studiato nell'immobilizzazione cellulare [85]. L'efficacia dell'immobilizzazione varia a seconda del tipo di cellula e del tipo di materiale di supporto impiegati. Le matrici maggiormente coinvolte in questo tipo di immobilizzazione possono essere degli idrogeli costituiti da polimeri naturali, quali, collagene, gelatina, cellulosa, alginato e carragenina, oppure da polimeri sintetici, come, poliuretano, poliacrilammide, metacrilati, resine fotoreticolate e polivinil alcol (PVA) [79]. Entrambe le tipologie formano una maglia tridimensionale e una rete porosa essenziali per trattenere in modo fisico le cellule al loro interno e, allo stesso tempo, consentono il trasporto di nutrienti, metaboliti e altre molecole fondamentali. Le cellule intrappolate possono raggiungere alte densità nella matrice e, rispetto a quelle immobilizzate mediante adesione superficiale, sono ben protette dai flussi convettivi nei bioreattori. Interessante è la capacità di alcuni polimeri porosi, come nel caso degli idrogeli, di possedere un'elevata resistenza meccanica. Tuttavia, questa tecnica contiene alcune criticità. Infatti, la rete polimerica porosa permette, oltre al diffondersi dei nutrienti e dei prodotti metabolici, anche l'ingresso all'interno delle sue maglie di sostanze tossiche che possono provocare la morte dei microrganismi in esse contenuti. Tra le principali criticità di questa tecnica di immobilizzazione vi sono i limiti di trasporto di massa con conseguente perdita cellulare, la disattivazione durante l'intrappolamento e l'abrasione della matrice dopo l'applicazione [88].



Figura 3.4: Cellule immobilizzate in un supporto mediante intrappolamento. (Figura parzialmente modificata da [92])

Gli idrogeli sono ideali per l'intrappolamento perché solitamente mostrano un'alta biocompatibilità con le cellule ospiti contenendole fisicamente in modo eccellente all'interno dei reticoli e possiedono buone proprietà di diffusione e trasporto [98]. Ulteriori vantaggi sono rappresentati dal fatto che mediante gli idrogeli si ha una distribuzione uniforme delle cellule e possono essere formati mediante tecniche di polimerizzazione in condizioni blande [99]. Infatti, quando le cellule sono presenti durante la polimerizzazione in situ, l'uso di solventi aggressivi, monomeri tossici, radiazioni UV e alte temperature deve essere evitato per assicurare un'adeguata sopravvivenza cellulare [99]. Sebbene i polimeri naturali vengano maggiormente impiegati nella tecnica di intrappolamento, recentemente hanno ricevuto grande interesse anche i polimeri sintetici [100]. Infatti, questi ultimi possono essere facilmente e artificialmente progettati per rendere alcune loro proprietà adeguate all'applicazione prevista, agendo, per esempio, sulla porosità del gel e sulle sue proprietà ioniche. Inoltre, rispetto ai polimeri naturali, la longevità e la resistenza meccanica dei polimeri sintetici risultano essere generalmente superiori. Tuttavia, entrambe le tipologie di gel presentano una limitata stabilità meccanica, infatti, la loro struttura viene facilmente distrutta dalla crescita delle cellule all'interno dei reticoli polimerici e dalla produzione di anidride carbonica. Anche l'ossigeno all'interno della matrice può rappresentare una limitazione per questa tecnica. Per cercare di sopperire a queste criticità, la struttura del gel può essere rinforzata facendo reagire i costituenti principali dell'idrogelo con alcune specifiche molecole oppure mediante essiccazione parziale del gel [80].

3.2.3 Contenimento tramite membrana

La tecnica di immobilizzazione mediante contenimento tramite membrana viene impiegata quando è richiesta la separazione delle cellule dai prodotti. Le barriere possono essere preformate (reattori a membrane piatte o a fibre cave) o formate attorno alle cellule da immobilizzare (microcapsule e intrappolamento bifasico) [101]. Le membrane sintetiche sono solitamente membrane polimeriche per microfiltrazione o ultrafiltrazione, ma ne possono essere usate anche di altri tipi come la gomma siliconica, la ceramica o le membrane a scambio ionico [76]. Il trasferimento di massa attraverso la membrana dipende da dimensione e struttura dei pori, dall'idrofilia e dalla carica della stessa [76]. L'intrappolamento in membrane preformate (Figura 3.5) è un metodo che non richiede l'utilizzo di agenti chimici e di condizioni estreme. La sospensione cellulare subisce un processo di filtrazione al termine del quale le cellule sono libere di crescere all'interno di un reattore. Le membrane possono fungere da supporto per lo sviluppo di biofilm con trasferimento diretto di ossigeno e diffusione dei nutrienti attraverso le loro pareti [102]. I principali svantaggi dell'immobilizzazione cellulare tra membrane microporose sono i limiti di trasferimento di massa e i possibili biofouling della membrana causati dalla crescita cellulare [103][104]. La microincapsulazione (Figura 3.6), invece, ha trovato applicazioni in molti campi tra cui quello farmaceutico, agricolo, terapeutico e nutrizionale [105]. L'immobilizzazione dei microrganismi mediante microincapsulazione viene impiegata per superare alcuni inconvenienti, come la perdita cellulare, la bassa stabilità meccanica, la contaminazione e i limiti di trasferimento di massa, reperibili tra le criticità di altre tecniche di immobilizzazione [106]. Il confinamento delle cellule nelle microsfere offre diversi vantaggi come la protezione contro stress meccanici e ambientali, il rilascio controllato di sostanze, mantenendo alcune attività di crescita e metaboliche per periodi di tempo prolungati. Inoltre, è possibile riutilizzare le cellule microbiche incapsulate a causa della costante rigenerazione cellulare all'interno delle microsfere [106]. Le microsfere hanno generalmente dimensioni inferiori a 1.000 µm e permettono la diffusione dei metaboliti al di fuori da esse e la diffusione di nutrienti all'interno di esse. Ciò è reso possibile grazie al loro alto grado di permeabilità, dovuto al fatto che vengono impiegati polimeri idrosolubili per costruire le microsfere [107]. Inoltre, i polimeri impiegati per la microincapsulazione di cellule microbiche possono essere sia sintetici che naturali, nonostante i primi offrano una maggiore resistenza meccanica e una migliore stabilità chimica, sono preferiti i secondi perché meno dannosi per l'integrità e vitalità delle cellule [108][94]. La microincapsulazione viene impiegata, per esempio, per immobilizzare i batteri Lactococcus lactis subsp. cremoris all'interno di membrane di alginato/poli-L-lisina, nylon o PEI (polietileneimmina) per la produzione di acido lattico [109].



Figura 3.5: Cellule immobilizzate tramite contenimento in membrane microporose preformate. (Figura parzialmente modificata da [102])



Figura 3.6: Cellule immobilizzate tramite contenimento in microcapsule. (Figura parzialmente modificata da [102])

3.2.4 Aggregazione

3.2.4.1 Auto-aggregazione naturale

L'immobilizzazione per auto-aggregazione viene definita "*flocculazione*", infatti, le cellule aggregandosi naturalmente formano dei granuli o dei flocculati (Figura 3.7) [110]. Questo è il metodo di immobilizzazione più semplice e meno costoso, ma allo stesso tempo, anche il meno prevedibile. Gli aggregati di microrganismi sono coinvolti in molti processi industriali, per esempio, nella produzione della birra, dove le cellule di lievito vengono sottoposte a flocculazione alla fine della fermentazione primaria in modo tale da riuscire a separarle dalla birra stessa [111].

La flocculazione è influenzata da numerosi parametri, tra cui le condizioni nutritive, l'agitazione, il pH, la temperatura di fermentazione e le condizioni di conservazione [112]. Inoltre, il mezzo di fermentazione stesso, il contenuto di glucosio e di composti azotati, può influenzare il successo della stessa immobilizzazione [113]. Questa tecnica di immobilizzazione viene anche chiamata "attacco cellula-cellula" e le cellule flocculate in grandi aggregati possono essere considerate effettivamente immobilizzate se gli stessi aggregati possono essere separati dal liquido per scrematura o rapida sedimentazione [76]. Tuttavia, non tutte le cellule hanno la capacità di flocculare e per formare gli aggregati in modo naturale, essendo questi molto sensibili agli stress, impiegano molto tempo. Per agevolare l'attaccamento delle cellule possono essere introdotti degli agenti reticolanti come l'agarosio e la cellulosa [114]. In quest'ultimo caso non si parla più però di aggregazione naturale ma di cross-linking.



Figura 3.7: Cellule immobilizzate mediante aggregazione naturale. (Figura parzialmente modificata da [102])

3.2.4.2 Cross-linking

La tecnica di immobilizzazione mediante cross-linking combina l'intrappolamento con il metodo che si avvale del legame covalente [115]. Il cross-linking (Figura 3.8) è un metodo di immobilizzazione irreversibile che non richiede un supporto. Esso solitamente viene applicato agli enzimi e, in rari casi, alle cellule microbiche in quanto, essendo coinvolte direttamente le cellule nella formazione dei legami, queste possono danneggiarsi [85]. Inoltre, la tossicità delle sostanze chimiche utilizzate come agenti reticolanti impongono una limitazione all'applicabilità generale di queste procedure, che risultano essere citotossiche [116]. Tuttavia, le cellule microbiche possono essere immobilizzate mediante reticolazione reciproca con reagenti multifunzionali come glutaraldeide e toluendiisocianato [117].



Figura 3.8: Cellule immobilizzate mediante cross-linking. (Figura parzialmente modificata da [102])

4. Idrogeli polimerici: tipologie e applicazioni

Il termine "hydrogel" è apparso per la prima volta nella letteratura scientifica intorno al 1900 per descrivere un gel colloidale di sali inorganici, ma solo nel 1960 gli si riferì l'accezione con cui ancora oggi lo si descrive [118]. Ad oggi, infatti, con il termine "hydrogel" o "idrogelo" si intendono i reticoli polimerici tridimensionali idrofili in grado di assorbire e trattenere l'acqua al loro interno rigonfiandosi [118]. Essi sono in grado di ospitare al loro interno una grande quantità di acqua (in alcuni casi fino al 99%), e proprio questa caratteristica li rende spesso biocompatibili, così che ad oggi sono ritenuti una delle classi più promettenti di biomateriali [119].

Negli ultimi decenni sono stati fatti significativi progressi nel campo degli idrogeli come biomateriali. Le conoscenze emergenti nella chimica dei polimeri e una maggiore comprensione dei processi biologici hanno portato all'impiego degli idrogeli in diverse applicazioni tecnologiche in campo biomedico [120], farmaceutico [121], biosensoristico [122], alimentare [123] e nell'ingegneria tissutale [124]. Infatti, l'acqua negli idrogeli controlla la permeazione dei nutrienti nelle cellule e dei prodotti cellulari. Nonostante l'alto contenuto d'acqua, gli idrogeli mantengono le proprietà dei solidi. L'acqua può essere strettamente legata alla rete polimerica o libera di muoversi all'interno del reticolo [125]. Infatti, non appena ha inizio l'assorbimento, le prime molecole d'acqua che entrano nella matrice polimerica idratano i gruppi polari più idrofili (primary attached water). In seguito, anche i gruppi idrofobi interagiscono con le molecole d'acqua (secondarv attached water). Il processo si completa con l'assorbimento di acqua (free water) che riempie gli spazi tra le reti e i pori più grandi fino ad arrivare al valore di equilibrio dello swelling [125]. Le interazioni responsabili dell'assorbimento di acqua, forze capillari e osmotiche, vengono controbilanciate da forze resistenti esercitate dalle catene polimeriche. Pertanto, il grado di rigonfiamento e le proprietà degli idrogeli dipendono dalle grandezze di queste due forze con effetti opposti [118].

Le caratteristiche principali che definiscono un idrogelo ideale sono: un'elevata capacità di assorbimento in una soluzione salina, un basso contenuto di monomero residuo, un'elevata durabilità e stabilità nell'ambiente di rigonfiamento e durante lo stoccaggio, così come la biodegradabilità senza la formazione di specie tossiche, e neutralità del pH dopo il rigonfiamento in acqua, l'assenza di colore e odore, e infine la capacità di essere ribagnato, qualora fosse necessario [126]. Ovviamente, è impossibile che un singolo idrogelo soddisfi tutti i requisiti appena elencati, pertanto, bisogna che alcune delle suddette proprietà vengano ottimizzate rispetto ad altre in base all'applicazione in cui lo si vuole utilizzare [126].

Per l'individuazione della dimensione teorica della maglia del reticolo polimerico ξ (mostrato in Figura 4.1 e rappresentato dall' Equazione 4.3), caratterizzante ogni singolo idrogelo, bisogna definire alcuni parametri chiave, tra cui il coefficiente di swelling/rigonfiamento del volume Q, definito dall'Equazione 4.1, e il peso molecolare medio tra due punti di reticolazione adiacenti, espresso da una funzione più complessa che per valori di Q maggiori può essere semplificata come riportato nell'Equazione 4.2 [119].

$$Q = \frac{v_s}{v_d} \tag{4.1}$$

$$Q = \beta \overline{M}_c^{3/5} \tag{4.2}$$

$$\xi = Q^{1/3} (\bar{r}_0^2)^{1/2} \tag{4.3}$$

Dove β è una costante relativa al volume specifico del polimero e \bar{r}_0 è radice quadrata della distanza media tra punti di legami adiacenti (dipendente dalla lunghezza e dal numero dei legami).



Figura 4.1: Maglia teorica dell'idrogelo di dimensione ξ (distanza tra due punti di cross-linking). [119]

4.1 Classificazione degli idrogeli

La classificazione degli idrogeli dipende dal metodo di preparazione (omopolimeri e copolimeri), dalla loro distribuzione di carica (cationici, anionici e non ionici), dall'essere soggetti alla degradazione (biodegradabili e non biodegradabili), dal tipo di legame con cui sono formati (reticolazione chimica e reticolazione fisica), dalla natura dei costituenti di base (naturali e sintetici) e dal tipo di risposta agli stimoli chimici/biochimici/fisici a cui sono sottoposti [127]. In questo lavoro si è scelto di trattare la classificazione degli idrogeli in base alla natura del materiale di base. Nella parte sperimentale, infatti, sono stati utilizzati degli idrogeli sintetici all'interno dei quali sono stati intrappolati sia batteri che lieviti. Vengono quindi riportate proprietà, caratteristiche, vantaggi, limitazioni e alcune applicazioni sia degli idrogeli naturali che sintetici per l'immobilizzazione di microrganismi.

4.1.1 Classificazione degli idrogeli in base al tipo di legame

Gli idrogeli polimerici possono essere distinti in base al tipo di reticolazione che può essere chimica o fisica [128]. In relazione al metodo di preparazione degli idrogeli variano le proprietà e le possibili applicazioni in cui possono essere utilizzati. Nel caso di reticolazione chimica (Figura 4.2 a) vengono coinvolti dei legami primari (come i legami covalenti) tra le catene polimeriche, mentre nel caso di reticolazione fisica (Figura 4.2 b) sono coinvolti dei legami secondari e delle interazioni deboli (per esempio legami ad idrogeno e interazioni Coulombiane) [129]. A causa dei diversi tipi di legame instauratisi nei reticoli polimerici, le due tipologie di idrogeli hanno proprietà diverse che saranno esaminate nei prossimi paragrafi. Sia la reticolazione chimica che quella fisica trasformano una soluzione di polimeri liquida in un solido o in un gel limitandone le capacità di movimento delle singole catene polimeriche [130]. Quindi, la reticolazione, collegando le singole catene di polimeri, fa aumentare la massa molecolare degli idrogeli e li rende più resistenti sia agli stress meccanici che termici [130].



Figura 4.2: Idrogeli prodotti per reticolazione: (a) chimica e (b) fisica. (Figura parzialmente modificata da [119])

4.1.1.1 Reticolazione chimica

Gli idrogeli chimicamente reticolati rappresentano una classe di polimeri, che passando dallo stato liquido allo stato solido, formano nuovi legami covalenti attraverso delle reazioni chimiche. I nuovi legami covalenti costruiscono una struttura reticolare tridimensionale polimerica in cui l'acqua può essere intrappolata e, agenti terapeutici o cellule viventi possono essere incapsulati al suo interno. Esistono diverse reazioni chimiche attraverso le quali si formano gli idrogeli [131]. Inoltre, mediante la reticolazione chimica, si ottengono degli idrogeli permanenti e irreversibili [132]. Le principali reazioni chimiche coinvolte sono di seguito riportate e discusse.

- Fotoreticolazione: è una tecnica di reticolazione che presenta molti vantaggi, tra cui la grande velocità di reazione, le condizioni miti di reticolazione e il controllo spaziale della reticolazione. I sistemi fotoreticolati possono essere formulati da soluzioni acquose di polimeri contenenti insaturazioni e molecole fotosensibili (fotoiniziatori). Nel campo degli idrogeli si sfruttano solitamente reazioni radicaliche. In seguito all'esposizione ad una fonte luminosa UV o visibile, infatti, il fotoiniziatore si decompone formando dei radicali liberi e catalizzando la polimerizzazione. I polimeri utilizzati per le reazioni di reticolazione presentano solitamente dei gruppi metacrilato o acrilato che subiscono una rapida polimerizzazione in presenza della radiazione luminosa [131]. Questo meccanismo di reticolazione presenta, tuttavia, anche dei limiti, tra i quali la possibile tossicità e non biocompatibilità di alcuni fotoiniziatori, la formazione di radicali durante la reazione e la prolungata esposizione alla fonte luminosa (nel caso di UV è meglio non utilizzarla se durante la polimerizzazione si è in presenza di cellule viventi poiché è troppo aggressiva e potrebbe provocare la morte cellulare) [133].
- Reazione click: è una reazione che, sulla base di quanto riportato da Sharpless e colleghi [134], presenta specifiche caratteristiche come l'alta efficienza, l'eccellente specificità, la generazione di sottoprodotti inoffensivi facilmente rimuovibili (con metodi non cromatografici, come la cristallizzazione o la distillazione), il mancato utilizzo di solvente (in alcuni casi è sufficiente utilizzare la sola acqua) e la generazione di un prodotto stabile in condizioni fisiologiche. L'esempio più rappresentativo (visibile in Figura 4.3) è la reazione tra gruppi terminali acetileni e azoturi catalizzata da Cu (I) e applicata nella progettazione di idrogeli per applicazioni terapeutiche [135].



Figura 4.3: Meccanismo di reazione click tra gruppi acetileni e azoturi catalizzata da Cu (I). (Figura parzialmente modificata da [131])

• Addizione di Michael: è una reazione di addizione nucleofila di un composto carbonile α, β -insaturo e di un nucleofilo [136]. Tra i componenti nucleofili maggiormente impiegati vi sono i tioli e le ammine, mentre tra quelli carbossilici insaturi vi sono gli acrilati, i metacrilati e i gruppi solfoni vinilici [136]. La reazione di Michael maggiormente studiata è quella tra i gruppi tiolo e vinile (visibile in Figura 4.4) grazie alle condizioni di reazione miti, alla velocità di reazione controllabile e all'elevata resa chimica [137].



Figura 4.4: Meccanismo di reazione di addizione di Michael tra gruppi tiolo e vinile. (Figura parzialmente modificata da [131])

- Reazione di condensazione: i poliesteri e le poliammidi possono essere sintetizzati mediante le reazione di condensazione tra, rispettivamente, i gruppi ossidrili e amminici, con acidi carbossilici o suoi derivati [130]. Per avere un miglior controllo della densità di reticolazione degli idrogeli e sopprimere le reazioni secondarie si aggiunge il reagente N-idrossisuccinimmide durante la reazione [130].
- Reazione enzimatica: si verifica in presenza di un enzima che richiede condizioni di reazioni miti, come pH né troppo acidi né troppo basici e temperatura ambiente, e necessita di un ambiente acquoso. La reazione enzimatica, inoltre, ha un'altra caratteristica importante, ovvero, la specificità del substrato con l'enzima impiegato e ciò può prevenire la tossicità causata da reazioni collaterali. Tra gli enzimi maggiormente usati vi sono: perossidasi, transglutaminasi, tirosinasi, transferasi e lisil-ossidasi [138]. In particolare, gli

enzimi consentono la formazione di legami covalenti tra i reticoli polimerici. La perossidasi, per esempio, catalizza l'accoppiamento ossidativo dei componenti del fenolo in presenza di un ossidante come il perossido di idrogeno (reazione visibile in Figura 4.5) [138].



Figura 4.5: Meccanismo di reazione enzimatica con perossidasi e perossido di idrogeno. (Figura parzialmente modificata da [131])

4.1.1.2 Reticolazione fisica

Mediante la reticolazione fisica si ottengono degli idrogeli reversibili e modificabili dopo la polimerizzazione. Talvolta, questi idrogeli si disintegrano e si dissolvono in acqua a causa della natura debole della forza di legame tra i suoi reticoli [132]. Negli ultimi anni hanno destato molto interesse gli idrogeli realizzati mediante legami fisici senza l'utilizzo di agenti di reticolazione. Infatti, questi agenti possono influire non solo sull'integrità delle sostanze (ad esempio cellule, proteine, enzimi, microrganismi) da intrappolare all'interno degli idrogeli, ma spesso devono essere rimossi, perché tossici, prima che gli idrogeli possano essere applicati [139]. I principali meccanismi di interazione vengono di seguito esposti.

- Interazioni ioniche: gli idrogeli possono essere reticolati mediante interazioni ioniche a
 temperatura ambiente e a pH fisiologici, quindi, in condizioni miti. Questo meccanismo di
 reticolazione non richiede la presenza di gruppi ionici nel polimero, infatti, gli ioni
 possono essere aggiunti durante la formazione degli idrogeli [139]. Un noto esempio di
 polimero reticolato con interazioni ioniche è l'alginato. L'alginato è un polisaccaride
 anionico che viene reticolato aggiungendo nella sua miscela cationi come lo ione calcio
 [140].
- Cristallizzazione: comporta processi di congelamento-scongelamento e crea un gel forte e altamente elastico. Nel caso del polivinilalcol (PVA) il reticolo viene formato a seguito di un processo di congelameto-scongelamento della soluzione acquosa del polimero stesso. Le proprietà del gel dipendono soprattutto dal peso molecolare del PVA, dalla concentrazione di PVA nella soluzione acquosa, dal tempo di congelamento e dal numero di iterazione del processo di congelamento [141].
- Legami ad idrogeno: si formano quando vengono protonati dei gruppi di acidi carbossilici. Lo swelling degli idrogeli reticolati mediante legami ad idrogeno dipendono fortemente dal

pH della soluzione acquosa da cui vengono prodotti. Il legame ad idrogeno si verifica per esempio tra il gruppo carbossilico del poli(acido metacrilico) e l'ossigeno del poli(etilenglicole). Una volta formato il legame ad idrogeno nella soluzione contenente il poli(acido metacrilico) e il poli(etilenglicole), viene iniettato dell'etanolo e, a seguito della sua diffusione, si ha la formazione del gel. Tuttavia, questa tipologia di idrogeli si dissolve gradualmente nel tempo a causa della dissociazione dei legami deboli [142].

4.1.2 Classificazione degli idrogeli per la natura dei costituenti

4.1.2.1 Idrogeli naturali

La maggior parte degli idrogeli naturali appartengono alla famiglia dei polisaccaridi [127]. Tra questi vi sono: alginati, carragenine, agar e agarosio, chitina e chitosano, pectine, gomme di gellano, acido ialuronico, collagene e gelatina. I più importanti tra questi vengono di seguito trattati più dettagliatamente.

- Gli alginati, costituiscono una famiglia di copolimeri non ramificati con blocchi omopolimerici di acido β-D-mannuronico (M) legati con legami covalenti 1,4 con acido α-L-guluronico (G). I monomeri possono presentarsi in blocchi consecutivi (solo G o M) oppure in modo alternato, formando i blocchi MG [143]. Gli alginati sono polisaccaridi isolati da alghe brune, come la Laminaria hyperborea, presenti in tutto il mondo [144]. Una delle principali proprietà dell'alginato è la capacità di formare gel in presenza di alcuni cationi divalenti, in particolare, Ca²⁺. Le proprietà fisiche del gel dipenderanno dal rapporto degli acidi uronici (G e M), in particolare, i gel con una maggiore quantità di G sono più duri ma fragili, mentre quelli con una quantità maggiore di M sono più morbidi e più flessibili [145]. Il successo dell'intrappolamento di microrganismi in alginati è dovuto al fatto che è semplice, economico, non denaturante, con basse perdite cellulari e i nutrienti riescono facilmente ad attraversare i reticoli polimerici e giungere ai microrganismi. Inoltre, l'idrogelo che si viene a formare è biochimicamente inerte e le cellule vengono intrappolate negli spazi interstiziali del reticolo polimerico. In base al tipo di ione metallico utilizzato per formare il gel, i pori presenti possono variare in quantità e dimensione, pertanto devono essere effettuati prima del loro utilizzo degli esami per valutarne le proprietà fisico-chimiche [146]. L'alginato, nonostante la sua idoneità come materiale per la matrice di intrappolamento, presenta una limitazione riguardante l'uso di alginato di Ca²⁺ come matrice di immobilizzazione, dovuta alla sua sensibilità ai composti chelanti come il fosfato, il citrato e il lattato, oppure ai cationi antigelificazione come Na^+ o Mg^{2+} . Per superare questa criticità si possono tenere le sfere di gel in un terreno contenente alcuni ioni calcio liberi in modo tale da tenere basso il rapporto Na⁺/ Ca⁺ [147]. Tra le applicazioni di questa tecnica vi sono: l'intrappolamento di Lactoccoccus lactis in sfere di alginato di calcio per produrre una crema fermentata [148], l'intrappolamento di Bifidobacterium longum, anch'essi in sfere di alginato di calcio, per testare il loro tasso di mortalità quando vengono posti a contatto con succhi gastrici e sali biliari[149] e l'immobilizzazione di Saccharomyces cerevisiae in alginati con diversi metalli sostituiti per valutare quale tra i diversi metalli testati sono i migliori agenti di intrappolamento [150].
- Le carragenine, in particolare la κ-carragenina, vengono spesso utilizzate nei processi di intrappolamento di microrganismi. Sono formate da unità alternate di 1,3 β-D-galattosio e 1,4 α-D-galattosio e vengono ottenute da alghe rosse [151]. Si distinguono diversi tipo di carragenina (λ, κ, ι) in base alla loro solubilità in cloruro di potassio, ma la κ-carragenina è più adatta all'intrappolamento di microrganismi e, in forma di gel, può essere facilmente prodotta in diverse forme in base all'applicazione [152]. Grazie alla loro biocompatibilità e

alle eccezionali proprietà fisico-chimiche, i gel di carragenina hanno trovato svariate applicazioni industriali, in particolare, nei settori alimentare, farmaceutico e cosmetico [153]. Alcune tra le principali applicazioni si basano sull'utilizzo di cellule di *Acetobacter aceti* intrappolate in sfere di κ -carragenina per la produzione di acido acetico mediante fermentazione [154], di *Lactococcus lactis* e di *Leuconostoc mesenteroides*, immobilizzati separatamente, per la produzione di prodotti lattiero-caseari fermentati [153] e di *Zymomonas mobilis* per la produzione di etanolo [155].

- L'agar e l'agarosio sono polisaccaridi lineari isolati dalle alghe rosse marine (*Gelidium* sp.) [156]. L'agarosio rappresenta il componente gelatinoso di base dell'agar la cui unità fondamentale è l'agarbiosio (un disaccaride composto da (1,3)- β -D-galattopiranosio e (1,4)-3,6-anidro- α -L-galattopiranosio collegati mediante un legame glicosidico) [157]. La caratteristica essenziale dei supporti di agarosio è rappresentata dai pori pentagonali, la cui stabilità dipende dalla formazione del legame idrogeno tra le sue catene. Il gel di agarosio non ha una struttura meccanica forte e ciò ne limita l'uso nell'immobilizzazione. Tuttavia, a bassa temperatura, sia l'agar che l'agarosio, tendono ad avere un forma solida [93]. La preparazione delle sfere viene effettuata facendo gocciolare l'agar caldo oppure mediante una sospensione di agarosio in un freddo tampone in cui avviene una solidificazione improvvisa [158]. L'immobilizzazione mediante agar e agarosio è applicabile alle sole cellule che sono in grado di tollerare le alte temperature a cui sono sottoposte nel processo di gelificazione [94]. L'agar è utilizzato, per esempio, nell'immobilizzazione di *Actinobacillus succinogenes* per la produzione di acido succinico [159] e di *Rhodobacter sphaeroides* per la produzione di idrogeno [160].
- Le gomme di gellano sono dei polisaccaridi extracellulari secreti dal batterio Pseudomonas elodea e sono prodotte attraverso fermentazione aerobica [161]. Le gomme di gellano sono dei polisaccaridi anionici lineari composti da unità ripetute di 1,3- β -D-glucosio, 1,4- β -Dacido glucuronico, 1,4- β -D-glucosio e 1,4- α -L-ramnosio [162]. Inoltre, il gel di gellano, nella forma nativa, contiene due sostituenti acilici per ogni unità ripetitiva di tetrasaccaride che vengono persi durante l'estrazione commerciale in concomitanza con un aumento del grado di cristallinità della sua polvere [163]. Infatti, la forma sostituita produce gel morbidi ed elastici, mentre dalla forma non sostituita si ottengono gel duri e fragili con proprietà migliori rispetto ad altri polisaccaridi comuni, in concentrazioni equimolari, come l'agar, la k-carragenina e l'alginato [164]. Quando la concentrazione di polisaccaridi è sufficiente, la gomma di gellano produce un gel le cui proprietà reologiche dipendono dalla forza ionica, dal tipo di ione stabilizzante e dall'acilazione [163]. La temperatura di gelificazione, per esempio, aumenta da 35 °C a 55 °C con la concentrazione di cationi [163]. La gomma di gellano è adatta all'immobilizzazione di batteri termofili a causa della sua alta temperatura di formazione che, tuttavia, può essere diminuita aumentando la concentrazione di alcune molecole come citrato, metafosfato ed EDTA, rendendola quindi più idonea all'immobilizzazione di batteri mesofili [165], come nel caso del Lactobacillus casei, per la produzione continua di probiotici [166]. Un altro esempio di impiego di batteri, viene riportato da uno studio condotto in Canada riguardante la biodegradazione di benzina da un sistema acquoso attraverso un consorzio di batteri immobilizzati in microsfere di gomma di gellano [167].
- Il collagene appartiene ad una famiglia di proteine fibrose presenti in tutti gli animali multicellulari. La principale caratteristica di tutte le molecole di collagene è la loro rigida struttura elicoidale a triplo filamento. Le catene di collagene sono estremamente ricche di glicina e prolina, entrambe importanti nella formazione stabile della tripla elica [168]. Il collagene è idrofilo, si gonfia in presenza di acqua ed è solubile solo a bassi valori di pH [169]. Il meccanismo di immobilizzazione cellulare nel collagene comporta la formazione

di molteplici interazioni ioniche, legami ad idrogeno e forze di Van der Waals tra le cellule e il collagene [80]. La preparazione della soluzione di collagene e la miscelazione con le cellule devono essere eseguite a basse temperature (4°C). La gelificazione viene poi ottenuta aumentando il pH, la temperatura (fino a 37 °C) e la forza ionica della soluzione di collagene [170]. Il collagene è utilizzato, per esempio, nell'immobilizzazione di *Escherichia coli* per la fabbricazione di un chip microbico utile nella diagnosi medica [171] e di batteri metanogeni per la produzione di metano [172].

4.1.2.2 Idrogeli sintetici

Gli idrogeli prodotti da polimeri sintetici hanno caratteristiche migliori rispetto a quelli naturali, tra le quali la minore sensibilità all'abrasione, la migliore resistenza meccanica e, quindi, la maggiore longevità. Inoltre, alcune loro proprietà come la porosità del gel e la permeabilità possono essere facilmente ingegnerizzate. I principali gruppi di polimeri impiegati sono: gli acrilati, i vinilici, gli ammidici, i poliuretani e i polietilenglicoli [173].

- I gel di poliacrilammide sono caratterizzati da lunghe catene e da una grande capacità di preservare la loro forma e resistenza meccanica anche mentre assorbono acqua e ioni. La reazione di formazione del gel di poliacrilammide avviene mediante copolimerizzazione di acrilammide e dell'agente reticolante N,N-metilene-bis(acrilammide) [174]. L'acrilammide è un monomero vinilico, altamente solubile in acqua, formato dall'idratazione dell'acrilonitrile ed è una potente neurotossina. Una volta avvenuta la gelificazione perde la sua pericolosità in quanto non è più assorbibile attraverso la pelle [174]. Il processo di copolimerizzazione per reazione di addizione di radicali liberi crea un legame covalente tra un atomo di carbonio nella molecola N,N-metilene-bis(acrilammide) e un atomo di carbonio nella catena di poliacrilammide, rendendo il processo non reversibile a causa dell'alta energia di dissociazione del legame primario carbonio-carbonio [175]. La formazione dei radicali liberi avviene grazie al TEMED che catalizza la decomposizione dello ione persolfato producendo proprio una molecola con un elettrone spaiato (radicale libero) [80]. Numerosi altri agenti di reticolazione sono stati usati per alterare le proprietà degli idrogeli di poliacrilammide, tra cui vi è l'N,N-diidrossietilen-bisacrilammide o DHEBA, i cui legami formati sono resi reversibili attraverso l'utilizzo di acido periodico. La dimensione media dei pori del gel di poliacrilammide è facilmente controllabile alterando le concentrazioni di monomero e del reticolante [175]. Viene utilizzato il gel di poliacrilammide per immobilizzare cellule di Pseudomonas C12B per la degradazione di tensioattivi alchil solfati [176], Brevibacterium per rimuovere ioni bivalenti da soluzioni acquose [177], Alcaligenes eutrophus per la denitrificazione dalle acque reflue [178] e Desulfovibrio desulfuricans per rimuovere metalli, come Cr, Mo, Se e U, mediante reazioni di riduzione [179].
- I polietilenglicoli (o polietilen ossidi) sono dei polimeri che possiedono unità ripetitiva CH₂CH₂-O. I PEG con pesi molecolari inferiori a 1.000 tendono ad essere viscosi e incolore, mentre, quelli con un peso molecolare maggiore sono bianchi e cerosi. Tutti i PEG o PEO possono essere acrilati al fine di poterli reticolare chimicamente. Infatti, possono essere reticolati attraverso un processo di fotopolimerizzazione con fonte luminosa UV-visibile. Sono anfifilici e sono solubili sia in ambienti acquosi che in solventi organici quali: coluro di metilene, etanolo, toluene, acetone e cloroformio [180]. Tuttavia, quando sono acrilati la loro idrofilicità può essere modificata. Il polimero PEG, se funzionalizzato, è in grado di formare autonomamente un reticolo insolubile. Inoltre, è

possibile aggiungere dei gruppi come acrilato, tiolo, ammina e carbossile, per conferire al biomateriale una buona resistenza meccanica. Gli idrogeli a base di PEG come il polietilenglicole metacrilato (PEGMA), dimetacrilato (PEGDMA) e diacrilato (PEGDA) sono ampliamente applicati nel rilascio di farmaci grazie alla loro proprietà chimiche come biocompatibilità, non tossicità e solubilità [125]. Queste proprietà chimiche contraddistinguono molti dei polimeri a base di PEG, rendendoli quelli maggiormente impiegati per la sintesi di idrogeli in campo farmaceutico e biomedico [125]. All'interno di questi idrogeli possono essere intrappolate delle cellule durante il processo di fotopolimerizzazione della miscela di e fotoiniziatore [181]. Tra le maggiori applicazioni in cui gli idrogeli a base di PEG vengono utilizzati come matrici in cui immobilizzare microrganismi vi sono quelle che impiegano i batteri ammonio ossidanti per il trattamento di acque reflue [181,182].

- Il polivinilalcol è un polimero idrofilo, biodegradabile e biocompatibile. Questo polimero si è dimostrato una scelta eccellente per le applicazioni di ingegneria tissutale e gli idrogeli costituiti con questo polimero sono considerati ottimi biomateriali per immobilizzare microrganismi [183]. Oltre ai vantaggi tipici degli idrogeli (capacità di assorbire acqua, permeabilità ai gas, flessibilità e biocompatibilità), quelli di PVA si distinguono per le buone proprietà meccaniche e la capacità di trattenere l'acqua all'interno della loro struttura [183]. Una soluzione di PVA diventa gelatinosa per congelamento e il suo grado di gel dipende dal numero di iterazione del processo congelamento-scongelamento. Utilizzando questo metodo è possibile ottenere un idrogelo elastico che può avere una bassa attività se il numero di iterazione del processo congelamento-scongelamento è alto. Per ovviare a problema della perdita di attività è necessario introdurre nella soluzione di PVA dei crioprotettori come il glicerolo [125]. Per immobilizzare i microrganismi all'interno del gel di PVA sono stati utilizzati altri due metodi, oltre al "congelamento-scongelamento" appena descritto, uno consiste nell'utilizzo di una irradiazione UV, mentre l'altro impiega una soluzione acida (contenente per esempio acido borico) nel processo di gelificazione [173]. Quest'ultimo è un metodo economico e semplice, però gli acidi utilizzati possono essere tossici per le cellule e il gel di PVA che si forma, essendo altamente appiccicoso, tende ad agglomerarsi [173]. L'agglomerazione del gel di PVA può essere evitata aggiungendo una piccola quantità di calcio alginato, mentre la citotossicità dell'acido può essere limitata riducendo il tempo di immersione delle perle di PVA da 24 ore a 2 ore e applicando una soluzione di leganti [173]. Gli idrogeli in PVA sono utilizzati per immobilizzare, per esempio, i batteri Pseudomonas putida per la biodegradazione dei fenoli [184] e Microbacterium liquefaciens per la riduzione del cromo [185] e i lieviti Saccharomyces cerevisiae per la fermentazione della birra [186].
- Il poliuretano (PU) è ottenuto per reazione tra un di-isocianato e un poliolo (PEG e polipropolenglicole o PEG solamente) in presenza di catalizzatori, necessari per aumentare la velocità di reticolazione, e di additivi (tensioattivi o ritardanti di fiamma), necessari per conferire determinate caratteristiche al materiale da formare [187]. Il poliuretano può essere prodotto sotto forma di schiuma o nella struttura di gel a seconda del tipo e della concentrazione del policianato impiegato [187]. La specificità degli idrogeli PU si basa sull'ampia varietà delle loro proprietà insite nella struttura chimica. Infatti, è importante scegliere gli oligodioli adatti perché determineranno il rapporto molare dei gruppi NCO/OH e, di conseguenza, le proprietà degli idrogeli [125]. All'interno dei reticoli polimerici degli idrogeli PU possono essere intrappolate le cellule di microrganismi. I prepolimeri, essendo idrofili, possono essere miscelati con una

sospensione di cellule in soluzione acquosa, generando la reazione dei terminali dei gruppi funzionali di isocianato con l'acqua. Da questa reazione le cellule, dunque, risultano essere intrappolate mediante la formazione di legami ureici e la liberazione di anidride carbonica [80]. Tra i microrganismi immobilizzati in PU troviamo i funghi *Aspergillus niger* per la produzione di acido citrico [188] e i batteri *Rhizopus oryzae* per la produzione di acido lattico [189].

4.2 Applicazioni degli idrogeli polimerici

In questo paragrafo sono state illustrate, le proprietà e le caratteristiche degli idrogeli grazie alle quali essi possono avere svariate applicazioni. In questo paragrafo si approfondiscono gli scopi per i quali sono utilizzati, rivolgendo particolare attenzione agli idrogeli fotoreticolati a base di PEG essendo proprio questi i materiali utilizzati in questo lavoro di tesi.

Gli idrogeli possono essere impiegati nel rilascio controllato di farmaci, in particolare, possono essere sensibili a variazioni di pH [190], temperatura [191], concentrazione di glucosio [192], luce [193] e variazioni di pressione [194]. Un'applicazione di rilascio controllato di farmaci vede come protagonisti gli idrogeli a base di PEG. In particolare, idrogeli ottenuti mediante radiazioni gamma, grazie alla loro struttura tridimensionale, sono impiegati nella somministrazione intravascolare e diffusione controllata di proteine [195]. Uno studio condotto nel 1994 [196] ha permesso di valutare la velocità di rilascio, da parte di idrogeli a base di PEG formati mediante radiazioni ultraviolette, di lisozima, insulina, albumina di siero bovino, immunoglobulina e lattato deidrogenasi. Il rilascio è regolato dalla degradazione del polimero, infatti, quando i legami del reticolo vengono idrolizzati, le dimensioni dei pori all'interno della matrice di idrocarburi aumentano e, di conseguenza, le molecole di farmaco sono in grado di lasciare il gel. Gli idrogeli possono essere anche progettati per avere caratteristiche fisiche simili a quelle dei tessuti molli e, quindi, impiegati nel campo dell'ingegneria tissutale [197]. Infatti, possono essere degli ottimi mezzi di rigenerazione e sostituzione della cartilagine. Per esempio possono essere formati in "scaffolds" a base di PEG modificati e resi degradabili con peptidi bioattivi al cui interno far crescere cellule muscolari lisce aortiche per la produzione di proteine della matrice extracellulare [198]. Gli idrogeli a base di pectina sono molto utilizzati nell'industria alimentare e cosmetica perché grazie ad essi si riesce a modificare il rilascio di sostanze profumate e a migliorare la percezione dei sapori [199]. Altre volte gli idrogeli di pectina e gelatina vengono adoperati durante i processi di confezionamento e imballaggio degli alimenti. Infatti, grazie all'impiego di idrogeli di pectina, al cui interno vengono intrappolati alcuni principi attivi antibatterici, aumenta la durata di conservazione e viene protetta la qualità complessiva del cibo [200]. Gli idrogeli polimerici vengono ampliamente adoperati anche per la produzione di biosensori. Nel 2010 è stato messo a punto un biosensore a base di PEG fotopolimerizzando una soluzione contenente PEGDA, HOMPP (2-idrossi-2metilpropiofenone) come iniziatore, tirosinasi e quantum dots (QDs) di CdSe/ZnS [201]. Durante la fotopolimerizzazione, la tirosinasi e i QDs sono stati intrappolati all'interno del reticolo del gel rendendolo fluorescente e sensibile al fenolo. Infatti, l'ossidazione del fenolo è catalizzata dalla tirosinasi da cui vengono prodotti dei chinoni che spengono la fluorescenza dei QDs. Quindi, l'intensità della fluorescenza degli idrogeli appena descritti diminuisce linearmente in base alla concentrazione di fenolo presente nel sistema e che deve essere ossidata. In un altro studio condotto nel 2013 [202], è stato prodotto un biosensore a base di cellulosa al cui interno sono stati immobilizzate, per filtrazione, delle cellule di Anabaena torulosa atte al rilevamento di metalli pesanti come Cu, Pb e Cd. La membrana, a seguito di un processo di essiccazione, è stata fissata in un pozzetto cilindrico progettato per essere collegato ad una sonda ottica, connessa a sua volta ad un fluorimetro. L'attività fotosintetica dei cianobatteri contenuti nel biosensore è cambiata in concomitanza con l'inserimento dei componenti tossici nella soluzione acquosa e, di conseguenza, si è assistito anche ad una variazione dell'emissione di fluorescenza rilevata col fluorimetro.

5. Introduzione dei microrganismi utilizzati nel lavoro di tesi

Nella sezione sperimentale del presente elaborato sono stati utilizzati due tipologie differenti di microrganismi, il ceppo batterico *Pseudomonas fluorescens* e quello di lievito *Rhodotorula mucilaginosa*. Di seguito vengono descritte alcune applicazioni nelle quali vengono impiegati questi due differenti tipi di microrganismi.

5.1 Impiego di Pseudomonas fluorescens

Pseudomonas fluorescens è un bacillo (Figura 5.1) e appartiene ad un gruppo di saprofiti comuni non patogeni che colonizzano il suolo, l'acqua e gli ambienti di superficie delle piante [203]. Le sue caratteristiche fisiologiche e genetiche lo rendono utilizzabile non solo in campo biotecnologico ma anche in agricoltura [204], in sistemi di trattamento di acque reflue [205] e in ambito biosensoristico [206]. Una caratteristica distintiva è la sua capacità di biodegradare rifiuti chimici pericolosi come inquinanti xenobiotici, metalli pesanti, pesticidi e fenoli [207]. I batteri del ceppo Pseudomonas fluorescens sono gram negativi, aerobi, incapaci di fermentare il glucosio, crescono ad un pH compreso tra 4 e 8 ed in un intervallo di temperatura compreso tra 4 e 32 °C [208]. La loro crescita viene favorita dalla presenza di un terreno ricco di peptidi con una fonte di energia che varia da 0,1% a 1% (peso/volume) e carente di ferro in modo tale da rilevare meglio la fluorescenza naturale prodotta da questi batteri [208]. Infatti, *Pseudomonas fluorescens* produce una serie di pigmenti tra i quali uno chiamato pioverdina di colore giallo-verde, fluorescente e solubile in acqua, la cui sintesi dipende da diversi fattori ambientali, in particolare dalla natura chimica del carbonio organico, dal grado di aereazione del terreno di coltura, dal pH, dalla presenza di luce, ma soprattutto dalla presenza dei cationi Mg^{2+} , Zn^{2+} e Fe³⁺ [209]. La pioverdina è il principale pigmento prodotto da Pseudomonas fluorescens ed è un sideroforo, quindi è in grado di legare il catione Fe^{3+} , ed è utilizzato dal microrganismo come un carrier cellulare di ferro [210]. Quando P. fluorescens cresce in condizioni di carenza di ferro, produce una grande quantità di pioverdine. Quest'ultime possiedono lo stesso tipo di cromoforo fluorescente che deriva dalla 2,3-diammino-6,7-diidrossichinolina, insieme alla deferriferribactina [211]. Quest'ultima quando chela il ferro (III) diventa di colore rosso-arancio, invece, è incolore sotto forma di legante libero. Esistono circa 15 tipi di pioverdine prodotte da P. fluorescens, tuttavia, è possibile definire la struttura soltanto di alcune tra di esse (un esempio di struttura è riportata in Figura 5.2, nella quale è possibile rilevare la presenza di amminoacidi) [211]. La pioverdina può essere impiegata come mezzo di bioriconoscimento per la rilevazione di metalli come Fe^{3+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} che in concentrazioni elevate possono diventare un grave problema per la contaminazione dell'ambiente acquatico [212]. Si è inoltre visto che al di sopra di una certa concentrazione di Fe^{3+} e Cu^{2+} (rispettivamente 3.6 μM e 25.0 μM) la produzione di pioverdina viene inibita [212]. A fronte di questi risultati, si potrebbero realizzare dei biosensori economici per valutare la presenza di metalli pesanti negli ambienti acquatici [212].


Figura 5.1: Morfologia (A) e micrografia a scansione elettronica (B) di *Pseudomonas fluorescens*. [208]



Figura 5.2: Struttura chimica della pioverdina. [211]

Tante sono le applicazioni di P. fluorescens immobilizzato, una tra le quali impiega il ceppo modificato geneticamente HK44, immobilizzato su pellicole di silice spesse 1 mm preparate dalla pre-polimerizzazione di una soluzione di tetrametossisilano, acqua e HCl (rispettivamente nei seguenti rapporti 1:5:0.01) [213]. Questo sistema, dopo 50 minuti di esposizione al naftalene e al salicilato, risponde con un'emissione di luce visibile. In particolare, la concentrazione minima che produce la bioluminescenza è di 1.2 mg/L per il naftalene mentre è di 0.5 mg/L per il salicilato. I risultati di questo studio indicano che l'immobilizzazione dei batteri nelle pellicole sol-gel di silice è un metodo conveniente per la preparazione di biosensori che possono essere usati, più volte, per circa 8 mesi [213]. Un'altra applicazione interessante è la depurazione dai corpi idrici di pesticidi clorurati quali 2,4-acido diclorofenossiacetico (2,4-D) e il bis(4-clorofenil)-2,2,2-tricloroetano (DDT). Ciò è possibile grazie all'immobilizzazione delle cellule di Pseudomonas fluorescens (coltivate in YPG per 24 ore a 32 °C) in un biofiltro di tezontle [214]. La necessità di eliminare/ridurre la quantità di questi pesticidi nasce a causa delle loro proprietà chimiche molto dannose e alla loro tossicità. Nelle prime 5 ore di funzionamento del biofiltro si assiste ad un importante calo della concentrazione di pesticidi, a seguito delle quali si è osservato un andamento asintotico. Inoltre, durante le prime 3.5 ore è stata raggiunta una degradazione pari al 99% per concentrazioni di 2,4-D di 500 mg/L e dal 55% al 99% per concentrazioni di DDT di 150 mg/L [214]. Risulta significativa anche l'applicazione di *Pseudomonas fluorescens* DSMZ 1895 intrappolato in sfere di alginato (2 mm di diametro) per la produzione di biotensioattivi [215]. La sintesi del biotensioattivo è stata studiata utilizzando l'olio di oliva come unica fonte di carbonio e di energia, misurando la tensione superficiale e l'indice emulsionante E24 per 5 giorni a temperatura ambiente e a pH neutro. L'intrappolamento in alginato di calcio insolubile viene dunque riconosciuto come metodo rapido, non tossico, economico e versatile per la produzione di biotensioattivi [215].

5.2 Impiego di Rhodotorula mucilaginosa

Rhodotorula mucilaginosa è un lievito saprofita ubiquitario che può essere isolato da diverse fonti ambientali, tra cui gli animali e una grande varietà di cibi e bevande. Questo microrganismo ha la capacità di sopravvivere e di crescere in ambienti estremi e possiede eccellenti caratteristiche biotecnologiche, grazie alle quali viene impiegato nella biotrasformazione del rame, nella produzione di biotensioattivi e di carotenoidi [216]. La presenza di *Rhodotorula mucilaginosa* è stata riscontrata anche in campioni umani, dove, in pazienti con sistema immunitario compromesso, può essere causa di infezioni. La forma delle cellule varia da sferica a ellissoidale (vedi Figura 5.3) e il colore delle loro colonie varia dal rosa all'arancione [217]. I lieviti producono dei pigmenti noti come carotenoidi molto usati come coloranti alimentari naturali, precursori della vitamina A, additivi ai cosmetici e antiossidanti. La produzione di carotenoidi può essere resa ottimale utilizzando un terreno di coltura appropriato costituito principalmente da estratto di malto, peptone e glucosio [218]. Da alcuni studi si è evinto che il pH e la temperatura ottimali per la sintesi dei carotenoidi sono rispettivamente 5 e 25 °C [219].

L'impiego di R. mucilaginosa immobilizzato ha ricevuto un notevole interesse in vari campi, per esempio, grazie alla sua capacità di degradare le sostanze chimiche tossiche in modo efficiente, viene impiegato nel trattamento di acque reflue industriali. In particolare, il ceppo Z1 di Rhodotorula mucilaginosa immobilizzato in una schiuma poliuretanica è stato utilizzato per degradare il nitrobenzene [220]. Inoltre, le cellule di R. mucilaginosa Z1 immobilizzate nella schiuma di poliuretano riescono a tollerare e degradare più rapidamente il nitrobenzene rispetto alle cellule libere [220]. Altre applicazioni che impiegano Rhodotorula mucilaginosa per degradare chetoni riguardano la riduzione di mentone, R-metil-α-camfolenone, carvone ed eucarvone [221]. In particolare, immobilizzando cellule di Rhodotorula mucilaginosa, il cui ceppo proviene dalla collezione del Prof. A. Nespiak (accademia medica di Wrocalw), in un gel di poliacrilammide è possibile ridurre stereospecificatamente il gruppo carbonico dei chetoni ciclici precedentemente citati in un gruppo ossidrilico (-OH), trasformando così i suddetti chetoni in alcoli. Inoltre, si è evinto che durante la reazione di trasformazione, è avvenuta per prima la riduzione dei legami del gruppo carbonilico e che le cellule di R. mucilaginosa immobilizzate non hanno perso la capacità di trasformare i chetoni anche se applicate ripetutamente [221]. L'impiego di Rhodotorula mucilaginosa per l'eliminazione di etilcarbammato (EC), noto come uretano, è un'altra importante applicazione di questo microrganismo [222]. L'uretano è potenzialmente cancerogeno per l'uomo, pertanto, essendo stato ritrovato in molti tipi di bevande alcoliche, è di notevole importanza la riduzione della sua formazione durante il processo di fermentazione, distillazione e conservazione a lungo termine [223]. Uno studio condotto nel 2013 alla Jiangnan Univerity in Cina ha mostrato come cellule di R. mucilaginosa CGMCC 5081 immobilizzate in alginato di calcio/chitosano siano riuscite mediante la produzione di uretanasi a rimuovere l'80% di etilcarbammato dal vino di riso prodotto in quelle zone [222].



Figura 5.3: Morfologia (A) e micrografia a scansione elettronica (B) di *Rhodotorula mucilaginosa*. [224]

6. MATERIALI E METODI

Nel presente capitolo verranno trattati i materiali e gli strumenti utilizzati per ottenere i risultati che verranno successivamente analizzati nel Capitolo 7. Le prove sperimentali e le osservazioni sono state condotte all'interno del laboratorio biotecnologico del Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia (DISAT) e del laboratorio interdipartimentale grafene/nanobio del Politecnico di Torino.

6.1 Materiali utilizzati per la sintesi degli idrogeli

I materiali utilizzati nelle diverse prove sperimentali sono idrogeli polimerici, a base di polietilenglicole (PEG) (met)acrilati fotoreticolati, . Come precursori polimerici sono stati selezionati un polietilenglicole bifunzionale con gruppi metacrilati, il polietilenglicole diacrilato (PEGDMA) con peso molecolare Mw 550 e un polietilenglicole diacrilato (PEGDA) Mw 250, forniti da Sigma-Aldrich.. La scelta di utilizzare questi due tipi di monomeri nasce per esigenze legate alla dimensione delle maglie del polimero, che, variando le quantità di PEGDA Mw 250 (P250) e PEGDMA Mw 550 (P550) all'interno della miscela di prepolimeri, può essere modificata per permettere l'intrappolamento dei microrganismi. In Figura 6.1 e 6.2 sono riportate le formule chimiche dei due monomeri citati

precedentemente, in ordine rispettivamente polietilenglicole diacrilato (PEGDA) e polietilenglicole dimetacrilato (PEGDMA).



Figura 6.1: Polietilenglicole diacrilato (PEGDA).



Figura 6.2: Polietilenglicole dimetacrilato (PEGDMA).

In una fase preliminare, i due monomeri sono stati miscelati secondo diversi rapporti percentuali in peso e con diverse quantità di PBS (tampone fosfato salino), fornito anch'esso da Sigma-Aldrich. Si è utilizzato come mezzo acquoso proprio il PBS per le sue proprietà di isotonicità e non tossicità per le cellule. I diversi campioni di prepolimeri, mediante fotoreticolazione, vengono poi trasformati in idrogeli.

Sono state preparate diverse formulazioni, sia variando i rapporti percentuali tra i due monomeri, sia variando la quantità di acqua presente. Nelle tabelle sotto mostrate sono riassunte le varie condizioni testate: in Tabella 6.1 si descrivono i diversi rapporti percentuali tra PEGDMA e PEGDA utilizzati e in Tabella 6.2 i diversi volumi di PBS aggiunti al sistema PEGDMA/PEGDA, espresse in phr (parts per hundred resin) rispetto al totale della miscela di prepolimeri.

Formulazioni	
100%wt P550	
80%wt P550 + 20%wt P250	
67%wt P550 + 33%wt P250	
60%wt P550 + 40%wt P250	
40%wt P550 + 60%wt P250	
33%wt P550 + 67%wt P250	
20%wt P550 + 80%wt P250	

Tabella 6.1. Differenti formulazioni al variare del rapporto percentuale di P550 e P250

Tabella 6.2. Differenti volumi di PBS nella miscela di prepolimeri

Quantità di tampone fosfato salino (PBS)	
P550 senza PBS	
P550 + 25 phr di PBS	
P550 + 50 phr di PBS	
P550 + 70 phr di PBS	
P550 + 100 phr di PBS	
P550 + 150 phr di PBS	
P250 senza PBS	
P550 + P250 + 25 phr di PBS	
P550 + P250 + 50 phr di PBS	

Le formulazioni precedentemente descritte fotopolimerizzano solo in presenza di un fotoiniziatore. Il fotoiniziatore utilizzato in questo lavoro di tesi è l'acido bismetoilfosfinico, BAPO-OH, ovvero un BAPO (Figura 6.3) funzionalizzato con un gruppo OH per renderlo idrosolubile, mostrato in Figura 6.4 [46]. Il BAPO-OH impiegato in questo lavoro di tesi è stato sintetizzato nei laboratori dell'ETH di Zurigo e la quantità introdotta per ciascun idrogeli è pari a 0.2% w/w.



Figura 6.3: Formula chimica della molecola BAPO.



Figura 6.4: Formula chimica della molecola BAPO-OH [51].

6.2 Caratterizzazione chimico-fisica degli idrogeli

I materiali impiegati in questo lavoro di tesi sono stati caratterizzati mediante prove di fotoreologia, analisi termiche dinamo-meccaniche DMTA, test di swelling e valutazione della densità di reticolazione, con lo scopo di mettere a punto le formulazioni corrette che permettono di avere i reticoli polimerici degli idrogeli delle dimensioni e delle caratteristiche ottimali per l'intrappolamento dei microrganismi testati.

6.2.1 Fotoreologia

Per la valutazione della fotoreticolazione delle diverse formulazioni è stato utilizzato un reometro "Anton Paar MCR 302", in modalità piatto-piatto (Figura 6.5) accoppiandolo ad una fibra ottica. Il piatto inferiore è di vetro e attraverso di esso la lampada a fibra ottica (con un filtro di cut-off a 400 nm) "Hamamatsu LC8" (15 mW/cm²) irraggia le formulazioni preparate precedentemente (presentate nelle tabelle 4.1 e 4.2) che vengono contenute dal secondo piatto dal diametro di 25.0 mm, il quale gli applica lo sforzo di taglio. Come valori di set-up vengono definiti il gap tra i due piatti di 1.0 mm, la temperatura di 25 °C, la frequenza dello sforzo applicato di 60 rad/s e l'ampiezza dello sforzo di 0,1%. La fibra ottica, una volta stabilizzata (circa 10 min) viene accesa dopo 1 minuto dall'inizio della prova, per far sì che il sistema possa stabilizzarsi, dopodiché viene registrato un valore di G' al secondo.

La prova di fotoreologia, nelle stesse condizioni sperimentali, è stata condotta per valutare la formazione del reticolo e la cinetica di polimerizzazione degli idrogeli contenenti i microrganismi (25 phr), *P. fluorescens* e *R. mucilaginosa* risospesi in PBS ad una concentrazione pari a OD 40 a 620 nm.



Figura 6.5: Reometro "Anton Paar MCR 302" e uno zoom che mostra la modalità piatto-piatto e la sorgente luminosa.

6.2.2 Osservazione degli idrogeli mediante microscopia ottica

Gli idrogeli reticolati vengono osservati al microscopio ottico "Leica DMLM" con un obiettivo 5x per valutare la loro omogeneità e la presenza di eventuali imperfezioni del film che potrebbero causare un attraversamento facilitato dei microrganismi. Gli idrogeli sono stati analizzati sia a secco che dopo le prove di swelling.

6.2.3 Analisi termica dinamo-meccanica (DMTA)

L'analisi dei campioni di idrogeli di spessore pari a 0.8 - 0.9 mm (polimerizzati con uno spessore di 1 mm che si riduce poiché sono stati seccati in stufa prima di procedere con l'analisi DMTA), larghezza tra 3.0 e 5.0 mm, è stata effettuata mediante "TTDMA Triton Technology-Mettler Toledo", in presenza di azoto (strumento visibile in Figura 6.6). Il range di temperatura con cui sono state eseguite le prove varia a seconda della tipologia di campione esaminato. Infatti, per i campioni in cui la percentuale in peso del monomero PEGDMA Mw 550 è maggiore le prove vengono condotte in un intervallo che ha come estremi -60 °C e 80 °C, mentre per i campioni con maggiore quantità di PEGDA Mw 250 l'analisi inizia a -40°C e termina per valori pari a circa 120 °C. Come valori di set-up viene anche definita la rampa di temperatura di 3 °C/min, la frequenza pari a 1 Hz, l'ampiezza della tensione di 0,02 mm e un rapporto tra forza statica e forza dinamica pari a 1.

Sono stati testati tutti i campioni degli idrogeli costituiti da differenti percentuali in peso di PEGDMA/PEGDA reticolati in assenza e presenza di PBS (da 25 phr a 150 phr) e in seguito tutti i campioni in cui è stato possibile intrappolare i microrganismi (*P.fluorescens* e *R.mucilaginosa*) in soluzione con 25 phr di PBS ad una concentrazione pari a OD 40 a 620 nm. Tutti i campioni sono stati seccati in stufa a vuoto ad una temperatura pari a 60 °C prima dell'analisi per eliminare la soluzione acquosa dal reticolo affinché questa non influenzasse le misure nel rage di temperatura scelto.



Figura 6.6: "TTDMA Triton Technology-Mettler Toledo"

6.2.3.1 Misura della densità di reticolazione

La densità di reticolazione dei campioni relativi alle diverse formulazioni è stata ottenuta tenendo conto del modulo elastico G' una volta raggiunto il plateau gommoso. La densità di reticolazione, solitamente espressa con il simbolo v, è stata calcolata mediante l'equazione 6.1 sotto riportata,

$$G' = vRT \tag{6.1}$$

dove la costante dei gas perfetti R è uguale a 8.314 J/molK, mentre T è la temperatura in gradi Kelvin.

6.2.4 Prove di swelling

Il campione fotoreticolato viene pesato, immerso in acqua e viene valutata la variazione del peso nel tempo o la percentuale di swelling, mediante l'equazione 6.2 sotto riportata. Per condurre la misura, il campione viene prelevato dalla soluzione acquosa, asciugato tamponando con della carta e pesato. Il peso dei campioni viene monitorato da 0 min fino a 540 min (A seguito del valore di % di swelling calcolato a 540 min, viene valutato quello dopo 12 ore e 48 ore).

$$\% swelling = \frac{w_s - w_d}{w_s} \times 100 \tag{6.2}$$

6.2.5 Ottimizzazione dei lavaggi degli idrogeli

In questa prova vengono condotte delle misure di assorbanza allo spettrofotometro UV-Visibile "Varian Cary5000". I campioni esaminati sono le soluzioni di PBS in cui avvengono gli swelling dei film utilizzati poi in camera di diffusione. L'analisi è condotta tra 200 e 400 nm e i dati ottenuti sono stati rielaborati mediante il software Origin. Le prove condotte si possono dividere in due classi: i campioni (A e B) delle soluzioni di swelling del film, prelevate dopo 15, 30, 60 e 120 min, fanno parte della prima classe; mentre, i campioni (C e D) delle soluzioni di swelling del medesimo film in cui però ad ogni step temporale (15, 30, 60 e 120 min), a seguito del prelievo, si è deciso di sostituirne la soluzione di lavaggio con del nuovo PBS, fanno parte della seconda classe.

6.3 Intrappolamento dei microrganismi negli idrogeli polimerici

6.3.1 Microrganismi impiegati, terreni di coltura e condizioni di crescita

Gli esperimenti sono stati condotti con i microrganismi *Pseudomonas fluorescens* DSMZ 50090 (ATCC 13525) e *Rhodotorula mucilaginosa* isolato nel laboratorio biotecnologico del DISAT. Per le prove con *Pseudomonas fluorescens* sono stati impiegati il terreno complesso DSM1 e il terreno minimo Meyer 1978 (M78) [212], le cui composizioni sono riportate nelle Tabelle 6.3 e 6.4. Invece, per le prove con *Rhodotorula mucilaginosa* è stato utilizzato è il terreno complesso ME, la cui composizione è riportata nella Tabella 6.6. *Pseudomonas fluorescens* per crescere necessita di una temperatura pari a 20 °C, mentre, *Rhodotorula mucilaginosa* cresce a temperature leggermente più alte, pari a 30 °C.

Per lavorare in completa sterilità si è sempre lavorato sotto una cappa biologica e tutto il materiale utilizzato è stato preventivamente sterilizzato in autoclave (120 °C, 1 atm, 20 min).

Componente	Concentrazione [g/L]
K ₂ HPO ₄	6.0
KH ₂ PO ₄	3.0
(NH4)2SO4	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
Acido succinico	4.0
Agar (se terreno solido)	15.0

Tabella 6.3. Componenti del terreno M78 (forniti da Sigma-Aldrich)

Tabella 6.4. Componenti del terreno DSM1 (forniti da Sigma-Aldrich)

Componente	Concentrazione
	[g/L]
Estratto di malto	20
Peptone	2
D-glucosio	20
Agar (se terreno solido)	20

Componente	Concentrazione [g/L]
Peptone	5.0
Estratto di carne	3.0
Agar (se terreno solido)	15.0

Tabella 6.5. Componenti del terreno ME (forniti da Sigma-Aldrich)

6.3.2 Preparazione dell'inoculo e valutazione della crescita dei microrganismi mediante spettroscopia UV-visibile

I microrganismi sono stati inoculati in una piastra Petri contenente il terreno agarizzato (DSM1 o ME), e sono stati fatti crescere alla temperatura ottimale per 24 ore, a seguito delle quali sono stati risospesi con 5 mL di acqua e opportunamente diluiti affinché il valore di densità ottica a 620 nm (OD₆₂₀) fosse quello ottimale a seconda della prova in cui sono stati utilizzati. In particolare, la biomassa è stata standardizzata ad una concentrazione compresa tra OD₆₂₀ 0.8 e 1 per le prove di inibizione e per effettuare la crescita in beuta e a OD₆₂₀ 10 per le prove in camera di diffusione. Il valore di densità ottica, definita come l'assorbanza normalizzata in base alla lunghezza d'onda, è ricavato mediante lo spettrofotometro UV-visibile "hp HEWLETT PACKARD 8452A".

6.3.3 Inibizione della crescita dei microrganismi da parte dei monomeri costituenti gli idrogeli

La prova è stata eseguita per valutare l'inibizione della crescita di *P. fluorescens* da parte dei monomeri P550 e P250 in soluzione al 50% con il PBS. Sono stati utilizzati entrambi i terreni DSM1 e M78 agarizzati (allo stato solido), colati all'interno di piastre Petri sterili (20 mL per ogni piastra). In ciascuna piastra sono stati seminati 50 μ L di soluzione prelevata dall'inoculo standardizzato ad OD₆₂₀ pari a 1 e nel centro posato un disco di carta da filtro con un diametro pari a 25.0 mm, sul quale viene posto il monomero da testare al 50% in PBS. Le prove sono state condotte per ciascun monomero, P250 e P550, sia irraggiato per 10 min con la stessa sorgente luminosa usata per polimerizzare gli idrogeli che non irraggiato. Ciascuna condizione sperimentale, sotto riportate in modo sintetico, è stata svolta in triplicato e per ciascun terreno solido (DSM1 e M78).

- 1) P. fluorescens non irraggiato con luce visibile (controllo positivo);
- 2) *P. fluorescens* + P550 (50%wt) in PBS <u>non irraggiato</u> con luce visibile (3x);
- 3) *P. fluorescens* + P550 (50%wt) in PBS <u>irraggiato</u> con luce visibile (3x);
- 4) *P. fluorescens* + P250 (50%wt) in PBS <u>non irraggiato</u> con luce visibile(3x);
- 5) *P. fluorescens* + P250 (50%wt) in PBS <u>irraggiato</u> con luce visibile(3x);

Al termine delle 24 ore, in cui le piastre sono state riposte all'interno di un incubatore a 20 °C, è stata verificata l'eventuale presenza di alone di inibizione della crescita di *P. fluorescens* attorno ai dischi di carta.

6.3.4 Prove di diffusione per la valutazione del trattenimento dei microrganismi da parte dei film polimerici

L'obiettivo della prova è quello di determinare il valore di cut-off del reticolo polimerico tale da trattenere i microrganismi all'interno di esso. Per la prova è stata utilizzata la camera di diffusione "PermeGear", visibile in Figura 6.7, con un diametro pari a 15 mm all'interno della quale è possibile inserire un volume pari a 5 mL per lato e dotata di ancorette magnetiche che permettono di mettere in agitazione il suo contenuto. Quindi, viene introdotto un volume pari a 5 mL di biomassa standardizzata a OD_{620} 10 all'interno della cella sinistra (rispetto alla scritta) della camera di diffusione, precedentemente sterilizzata. Ciascun idrogelo testato viene fatto swellare in 3 mL di PBS per circa 24 ore e viene posto tra le due celle in vetro della camera di diffusione. Nella cella destra (rispetto alla scritta) vengono inseriti 5 mL di solo terreno M78 o ME. La camera di diffusione, ben chiusa, viene posta su un agitatore magnetico speciale, che permette di agitare le soluzioni all'interno delle due celle con una velocità pari a 400 rpm. Dopo 8, 24 e 48 ore vengono prelevati dalla cella sinistra 50 µL di terreno M78 o ME e condotte delle diluizioni seriali in acqua. Dalle eppendorf in cui sono state preparale le diluizioni vengono prelevati 100 µL e seminati sui terreni solidi DSM1 o MEA (in duplicato). Le piastre vengono lasciate in incubazione a 20 °C per 24-48 ore, al termine delle quali vengono contate le CFU di P. fluorescens o di R. mucilaginosa cresciute e valutati i rapporti CFU/mL.



Figura 6.7: Camera di diffusione "PermeGear".

Gli idrogeli testati in queste prove, sia per *P. fluorescens* che per *R. mucilaginosa*, sono riportati nella Tabella 6.6, di seguito riportata.

Tabella 6.6. Formulazioni degli idrogeli testati nella camera di diffusione.

Formulazioni	
100%wt P550 + 25 phr PBS	
67%wt P550 + 33%wt P250 + 25phr PBS	
60%wt P250 + 40%wt P550	

6.3.5 Intrappolamento dei microrganismi negli idrogeli

Per le prove di intrappolamento dei microrganismi nell'idrogelo polimerico, la biomassa cresciuta e standardizzata ad una concentrazione compresa tra OD_{620} 0.8 e 1 come descritto nel paragrafo 6.3.2, è stata utilizzata come inoculo (10% v/v) di una coltura (200 mL in beuta Erlenmeyer da 500 mL) in terreno liquido M78 o ME (a seconda a quale microrganismo ci riferiamo). La beuta è stata posta in incubatore a 20 °C in agitazione a 120 rpm per 24 ore . Successivamente, il contenuto della beuta è stato centrifugato per 5 min a 4000 rpm, così da separare la biomassa dal surnatante, quest'ultimo in seguito rimosso. La biomassa è stata quindi risospesa e lavata con circa 50 mL di PBS, per poi essere nuovamente recuperata tramite centrifugazione. In seguito, la biomassa è stata risospesa in PBS affinché la sua concentrazione sia pari a OD_{620} 40, miscelata insieme alle diverse soluzioni di pre-polimeri, riportate in Tabella 6.7, e fotopolimerizzate come descritto precedentemente (paragrafo 6.2.1).

Tabella 6.7. Formulazioni degli idrogeli fotopolimerizzati con i microrganismi.

Formulazioni	
100%wt P550 + 25 phr <i>P. fluorescens/R. mucilaginosa</i> in PBS	
80%wt P550 + 20%wt P250 + 25 phr <i>P. fluorescens/R. mucilaginosa</i> in PBS	
67%wt P550 + 33%wt P250 + 25 phr <i>P. fluorescens/R. mucilaginosa</i> in PBS	
60%wt P550 + 40%wt P250 + 25 phr P. fluorescens/R. mucilaginosa in PBS	

7. RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel presente capitolo della tesi vengono riportati i risultati delle prove sperimentati effettuate sui diversi idrogeli e con i diversi microrganismi. L'obiettivo del presente lavoro è l'intrappolamento microrganismi all'interno di di idrogeli, ottenuti mediante fotoreticolazione. In particolare come microrganismi sono stati testati un batterio (P. fluorescens) e un lievito (R. mucilaginosa). I dati illustrati sono divisi in tre paragrafi principali, nel primo vengono caratterizzati tutti gli idrogeli costituiti da diverse percentuali in peso di PEGDMA/PEGDA e PBS (o H₂O). Dalla loro caratterizzazione è stato possibile selezionare quelli da testare per l'intrappolamento dei microrganismi al loro interno. Nel secondo paragrafo vengono esaminate le possibili inibizioni della crescita dei microrganismi dovute alla presenza dei monomeri costituenti gli idrogeli, nonché la capacità degli idrogeli selezionati di trattenere i microrganismi. Quest'ultima prova è stata resa possibile dall'uso di una camera di diffusione. Nell'ultimo paragrafo, infine, vengono riportati i dati relativi alla caratterizzazione chimico-fisica degli idrogeli contenenti i microrganismi, confrontandoli con i dati discussi precedentemente.

7.1 Caratterizzazione degli idrogeli

La caratterizzazione chimico-fisica è il risultato dell'elaborazione e dell'armonizzazione delle informazioni raccolte attraverso prove fotoreologiche, analisi DMTA e swelling. Caratterizzare gli idrogeli ottenuti mediante fotopolimerizzazione è utile per poter apprezzare il rapporto tra struttura dei monomeri di partenza e proprietà dei materiali finali, e per valutare le loro caratteristiche al fine di selezionare quelli più adatti all'intrappolamento dei microrganismi.

7.1.1 Fotoreologia degli idrogeli polimerici

La fotoreologia è una tecnica utile per monitorare la formazione del reticolo degli idrogeli e la loro cinetica di polimerizzazione in tempo reale [225]. In particolare, essa permette di valutare le proprietà viscoelastiche dei campioni, seguendo gli andamenti nel tempo del modulo elastico G' e del modulo viscoso G''. Il modulo G' rappresenta il modulo conservativo e cresce in concomitanza con la formazione del reticolo polimerico, raggiungendo un valore costante quando termina la fase di propagazione del processo di polimerizzazione. In particolare, in queste prove, per ciascun sistema PEGDMA/PEGDA è stato tenuto in considerazione solo il modulo elastico G' e la sua variazione a fronte di uno sforzo in frequenza. Le prove preliminari di seguito riportate sono state condotte al fine di capire la quantità massima di acqua che si riesce ad introdurre nel sistema polimerico. Infatti, i due monomeri utilizzati hanno proprietà fisiche differenti, in particolare, il PEGDMA Mw 550 (P550) è idrofilo mentre il PEGDA Mw 250 (P250) è idrofobo. Quindi, è necessario trovare la corretta quantità di soluzione acquosa che non produca una emulsione a seguito della miscelazione con la formulazione polimerica. Nota questa quantità, al posto dell'acqua viene utilizzato il PBS, perché sarà proprio in questo tampone che saranno risospesi i batteri. Infatti,

il PBS è isotonico, non tossico per le cellule ed avendo un pH neutro mantiene costante il pH delle cellule [226].

In Figura 7.1 vengono riportate le diverse curve relative ai moduli elastici G' degli idrogeli formati dal 100% di P550, 0.2% di BAPO-OH e diverse quantità di acqua, ottenute durante la prova. Tutte le curve mostrano lo stesso andamento: un primo tratto costante, non significativo perché i valori sono registrati prima dell'accensione della lampada e quindi non utili per capire la cinetica di reticolazione; passati 60 secondi, viene accesa la sorgente luminosa, inizia la polimerizzazione dei campioni posizionati sulla lente di vetro e in concomitanza si assiste alla crescita lineare della curva fino a stabilizzarsi ad un valore costante nell'ultimo tratto. La pendenza del secondo tratto della curva è significativa per capire la velocità della polimerizzazione dei campioni: con il procedere della reazione, la stessa rallenta fino al conseguimento di una condizione stazionaria, in cui il modulo elastico raggiunge un plateau. Il rallentamento della cinetica di reticolazione e il raggiungimento del plateau avvengono quando la polimerizzazione volge al termine. La curva blu è prodotta dalla polimerizzazione dell'idrogelo contenente solo il monomero, quindi senza alcuna introduzione nella formulazione di acqua, e mostra la cinetica più veloce rispetto alle altre, raggiungendo il plateau dopo circa 1 min dall'accensione della sorgente luminosa, con un valore di G' costante pari a $1.10 \cdot 10^7$ Pa. Aumentando la guantità di acqua nella formulazione. si osserva una diminuzione della cinetica di polimerizzazione, con il raggiungimento del plateau dopo più di 2 min dall'inizio di reticolazione e con valori di G' via via minori. Infatti, il sistema con maggiore percentuale, in volume, di acqua ha una minore percentuale di prepolimero, per cui il suo reticolo risulta essere più lasco e quindi con minori proprietà meccaniche. Come visibile in Figura 5.1, l'idrogelo costituito dal 100% di P550 e 150 phr di acqua è quello che ha il reticolo con modulo elastico minore, mentre quello costruito senza acqua forma un reticolo più forte.



Figura 7.1: Curve di G' in fotoreologia degli idrogeli formati da P550 e diverse percentuali di acqua.

Gli stessi andamenti vengono mostrati nella Figure 7.2 che rappresenta le curve G' degli idrogeli formati da diverse percentuali di P550 e P250. Tuttavia, all'aumentare della quantità

di P250, e di conseguenza al diminuire di quella del P550, la quantità d'acqua utilizzata nelle formulazioni diminuisce a causa dell'idrofobicità del P250. Infatti, nell'idrogelo costituito dal 60% di P550 e dal 40% di P250 non si riescono ad inglobare all'interno della formulazione più di 25 phr di acqua, superati i quali si assiste alla formazione di un'emulsione e ad una separazione di fase durante la fotopolimerizzazione.







Figura 7.2: (A, B, C) Curve G' in fotoreologia degli idrogeli formati da diverse percentuali di P550/P250 e phr di acqua.

In Figura 7.3 vengono mostrate le curve relative al modulo elastico G' dei sistemi reticolati costituiti da diverse percentuali di P550/P250 e 0.2%wt di BAPO-OH. In questo caso si osserva che, aumentando la quantità di monomero P250 e, conseguentemente, diminuendo quella del P550, la cinetica di polimerizzazione aumenta in modo graduale. In particolare, la curva relativa al film formato con solo P250 arriva ad un valore costante di G' pari a $7 \cdot 10^6$ Pa in 31 secondi; invece, quella relativa all'idrogelo formato con solo P550, arriva ad un valore costante di G' pari a $1.10 \cdot 10^7$ Pa in un minuto. Quindi, la curva rosa relativa alla formulazione costituita da solo P250 è quella con la cinetica di polimerizzazione più rapida in assoluto tra i campioni esaminati, mentre la curva blu, relativa alla formulazione costituita solo da P550, è quella con cinetica più lenta, come atteso. Questo è probabilmente da attribuire ad una maggiore reattività del gruppo acrilico rispetto al gruppo metacrilico nei confronti della poliaddizione radicalica UV-indotta.

Inoltre è possible aspettarsi che il peso molecolare dei monomeri possa influenzare in qualche modo la cinetica di polimerizzazione ma anche la dimensione delle maglie del reticolo. Infatti, aumentando la quantità di monomero P250 rispetto al P550, le maglie del reticolo risultano essere sempre più strette e i co-polimeri formati sono sempre più densamente reticolati e più rigidi.



Figura 7.3: Curve G' in fotoreologia degli idrogeli formati da diverse percentuali di P550/P250.

Per le prove successive di intrappolamento dei microrganismi all'interno degli idrogeli polimerici, si è deciso di utilizzare le formulazioni contenenti differenti quantità di P550/P250 e 25 phr di PBS (gli andamenti relativi ai valori di G' sono riportati nella Figura 7.4). Si è scelta come quantità di PBS 25 phr perché è la sola che si riesce a utilizzare per ottenere gli idrogeli con una percentuale maggiore di P250. Infatti, i film con percentuali di P250 maggiori del 40% non possono contenere PBS perché risulterebbero non omogenei e non utilizzabili per le prove di intrappolamento.

Nella Tabella 7.1 vengono riportati i valori di G' degli idrogeli appena presi in considerazione:

Formulazione film	G' [Pa]
100% P550 + 25 phr PBS	$6.54 \cdot 10^5$
80% P550 + 20% P250 + 25 phr PBS	$1.33 \cdot 10^{6}$
67% P550 + 33% P250 + 25 phr PBS	$2.01 \cdot 10^{6}$
60% P550 + 40% P250 + 25 phr PBS	$3.20 \cdot 10^{6}$

Tabella 7.1. Valori di G' al plateau delle curve in fotoreologia al variare delle percentuali di
P550/P250.



Figura 7.4: Curve G' in fotoreologia degli idrogeli formati da diverse percentuali di P550/P250 e 25 phr di PBS.

7.1.2 Immagini al microscopio ottico degli idrogeli polimerici

Gli idrogeli prodotti mediante fotoreticolazione vengono osservati al microscopio ottico per valutare la loro omogeneità superficiale non percepibile ad occhio nudo. Gli idrogeli costituiti dal 100% di P550 o P250 mostrano una struttura omogenea e trasparente. Tuttavia, gli idrogeli, aumentando la quantità di P250 nella miscela di pre-polimeri, diventano sempre più opachi e si assiste alla formazione di piccoli crateri superficiali. Ciò è dovuto ad una non

perfetta miscibilità dei due monomeri che rende le superfici esaminate sempre meno uniformi. Aumentando la quantità di acqua/PBS si formano dei crateri superficiali di dimensioni maggiori apparentemente non passanti, ma che sicuramente rendono gli idrogeli sempre più disomogenei. In Figura 7.5 viene riportata un'immagine al microscopio ottico del film costituito da 100% P550 con il 25 phr di PBS per mostrare la sua omogeneità rispetto agli idrogeli costituiti dal 60% P550 e dal 40% P250, 67% P550 e dal 33% P250, entrambi con 25 phr di PBS, visibili in Figura 7.6 (a e b). Le immagini dell'idrogelo costituito dall'80% P550 e dal 20% P250 non vengono riportate perché mostrano la stessa morfologia superficiale del film mostrato in Figura 7.5.



Figura 7.5: Immagine al microscopio ottico (ingrandimento 50 volte) del film costituito da 100% P550 e 25 phr di PBS dopo swelling.



Figura 7.6: Immagini al microscopio ottico (ingrandimento 50 volte) dei film costituiti da (a) 60% P550 40% P250 e 25 phr di PBS dopo swelling, (b) 67% P550 33% P250 e 25 phr di PBS dopo swelling.

7.1.3 DMTA: analisi termica dinamo-meccanica

L'analisi termica dinamo-meccanica comporta l'applicazione di un piccolo sforzo in frequenza su un campione e la misurazione della risposta allo stesso (in termini di deformazione) [227]. La tensione in input è controllata mediante l'impostazione dei valori di

set-up dello strumento e in base al tipo di idrogelo testato verranno determinate le sue proprietà viscoelastiche intrinseche in funzione della temperatura. Tra le proprietà termomeccaniche intrinseche, è di nostro interesse l'individuazione della temperatura di transizione vetrosa dei diversi campioni di idrogeli esaminati. La temperatura di transizione vetrosa, solitamente indicata con il simbolo T_g, rappresenta il valore di temperatura al di sotto della quale un materiale amorfo si comporta da solido vetroso; infatti, i movimenti di contorsione e rotazione delle molecole sono congelati, mentre, al di sopra di tale valore lo stesso materiale amorfo si comporta da solido gommoso. La transizione vetrosa è una transizione di fase del II ordine, in cui si osservano delle discontinuità nella derivata prima delle variabili di stato di Gibbs [228]. Nell'analisi DMTA il valore della temperatura alla quale il fattore di smorzamento *Tan* δ raggiunge il valore massimo. Il modulo complesso è caratteristico dei materiali viscoelastici e può essere considerato come la somma di un valore reale e di un valore immaginario, espresso dall'equazione 7.1,

$$E^* = E' + i E''$$
 (7.1)

dove E' rappresenta il modulo elastico espresso mediante l'equazione 7.2, mentre, E'' è il modulo viscoso ed è espresso attraverso l'equazione 7.3, in cui compaiono lo sforzo (σ_0) e la deformazione applicata ε_0 . Il rapporto dei due moduli è pari al fattore di smorzamento $Tan \delta$, espresso dall'equazione 7.4, il cui valore varia da zero (per i solidi elastici) a infinito (per i liquidi viscosi) [229].

$$E' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cos(\delta) \tag{7.2}$$

$$E'' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \sin(\delta) \tag{7.3}$$

$$Tan \,\delta = \frac{E''}{E'} = \frac{\sin(\delta)}{\cos(\delta)} \tag{7.4}$$

In Figura 7.7 sono riportate le curve di *Tan* δ riferite ai campioni precedentemente essiccati caratterizzati da diverse composizioni di P550/P250. In particolare, si nota che all'aumentare della quantità di P550 a discapito di quella del P250, le curve si spostano verso sinistra, e di conseguenza anche il valore della temperatura vetrosa diminuisce. In Tabella 7.2 vengono mostrati i dati relativi alla temperatura vetrosa per gli otto campioni di idrogeli esaminati, i valori spaziano da 5.2 °C a 71.4 °C, corrispondenti rispettivamente ai film costituiti dal 100% di monomero P550 e dal 100% di monomero P250. Tutti gli altri campioni hanno valori di temperatura vetrosa intermedi. Più la temperatura a cui si arriva alla transizione diminuisce e più i film hanno comportamento gommoso, quindi, si può dedurre che un aumento della quantità di P550 abbia un effetto plasticizzante; la maggiore quantità di monomero a più alto peso moloecolare implica una riduzione del valore di Tg. Inoltre, alla quantità relativa al 60% di P250, i monomeri non sembrano essere molto miscibili tra di loro e le formulazioni appaiono non perfettamente omogenee. Quanto detto può essere osservato anche in Figura 7.7, infatti, le curve relative agli idrogeli formati dal 60% di P250 e dal 40% di P550, o da quelli composti dal 67% di P250 e dal 33% di P550, mostrano la presenza di due picchi corrispondenti alle due fasi formate dai monomeri che in tali quantità non sono più miscibili.



Figura 7.7: Andamenti del fattore di smorzamento *Tan* δ dei campioni con diverse percentuali P550/P250.

Composizione film	T _g [°C]
100% P550	7.4
80% P550 20% P250	21.0
67% P550 33% P250	23.5
60% P550 40% P250	30
40% P550 60% P250	39.1
33% P550 67% P250	48
20% P550 80% P250	53.3
100% P250	71.4

Tabella 7.2. Valori della temperatura vetrosa relativi ai film con diverse percentuali di P550/P250.

In Figura 7.8 vengono illustrati gli andamenti delle curve relative al fattore di smorzamento *Tan* δ corrispondenti ai campioni essiccati con 100% di PEGDMA e diversi phr di acqua. Gli idrogeli esaminati presentano da 0 phr a 100 phr di acqua e dalle curve relative alla *Tan* δ si nota come all'aumentare della quantità di acqua presente durante la reticolazione i valori della temperatura vetrosa diminuiscono. In particolare, il campione costruito in assenza di acqua mostra un valore di T_g pari a 6.6 °C, mentre, quello con 150 phr di acqua presenta un valore di T_g pari a -9.2 °C. Questi dati confermano quanto visto nel paragrafo relativo alla fotoreologia, infatti, i co-polimeri ottenuti in assenza di acqua mostrano una rigidità maggiore rispetto a 53 quelli che sono formati con diversi phr di acqua. Quindi, si può dedurre che all'aumentare della quantità di acqua, i campioni si comportano in modo via via sempre più gommoso.



Figura 7.8: Valori della temperatura vetrosa relativi ai film con il 100% di P550 e diversi phr di acqua

Andamenti simili a quelli relativi alle curve riportate in Figura 5.6 vengono osservati anche nelle curve relative a film costituiti da differenti percentuali di P550/P250 e diversi phr di acqua, come mostrato nelle Figure 7.9 a e b.



Figura 7.9: (a) Valori della temperatura vetrosa relativi ai film con 80% di P550 e 20% di P250 e diversi phr di acqua



Figura 7.9: (b) Valori della temperatura vetrosa relativi ai film con 60% di P550 e 40% di P250 e diversi phr di acqua

Vengono confrontate tra di loro le curve di $Tan \delta$ relative ai campioni formati da diverse percentuali di P550/P250 e 25 phr di acqua (Figura 7.10). Si è scelto di esaminare nel dettaglio i campioni con 25 phr di acqua perché nelle prove successive sarà questa la condizione utilizzata. Anche in questo caso si nota come all'aumentare della quantità di P550, a discapito di quella del monomero P250, la temperatura vetrosa aumenta, confermando ancora una volta come i campioni assumano sempre più caratteristiche gommose.



Figura 7.10: Andamenti del fattore di smorzamento $Tan \delta$ dei campioni con diverse percentuali P550/P250

7.1.3.1 Risultati relativi alla densità di reticolazione

L'analisi termica dinamo-meccanica fornisce anche informazioni relative alla densità di reticolazione degli idrogeli polimerici. Infatti, la densità di reticolazione ν si può calcolare mediante l'equazione 7.5

$$G' = \nu RT \tag{7.5}$$

dove ν , come già anticipato, è la densità di reticolazione espressa in mmol/cm³, R è la costante dei gas perfetti espressa in (Pa m³)/(mol K) e T la temperatura alla quale si arriva al plateau gommoso, da usare come riferimento per tutti i campioni, espressa in gradi Kelvin [230]. Per i campioni con la maggiore quantità di P550 il valore di G' relativo ad una temperatura è pari a 60 °C, mentre per i campioni con la maggiore quantità di P250, il valore di G' relativo ad una temperatura è pari a 100 °C. In Tabella 7.3 vengono riportati i valori di ν dei campioni con diverse percentuali P550/P250. Invece, in Tabella 7.4 vengono mostrati i valori di ν con il 100% di P550 e diversi phr di acqua. In entrambi i casi, le misure di ν confermano quanto abbiamo precedentemente visto, cioè aumentando la quantità di P250 e/o diminuendo la quantità di acqua, gli idrogeli risultano essere sempre più densi e, quindi, mostrano un comportamento vetroso sempre più spiccato. Si può quindi dire che i monomeri a base di PEG con un peso molecolare più basso rendono i film, oltre che più idrofobi, anche più densamente reticolati e rigidi (come già evidenziato dalla fotoreologia). In Figura 7.11 si può notare come in corrispondenza della temperatura vetrosa, il modulo G' perde quasi due ordini di grandezza, passando da stato vetroso a stato gommoso. A titolo di esempio nella Figura 5.9 viene riportato l'andamento della curva G' relativo al film costituito dal 100% di P550, ma lo stesso vale per tutti gli altri.

Campioni	ν (mmol/cm ³)
100% P550	19.44
60% P550 40% P250	25.88
40% P550 60% P250	19.99
33% P550 67% P250	31.00
20% P550 80% P250	32.25
100% P250	32.83

Tabella 7.3. Valori di v per i campioni con diverse percentuali di P550/P250 esaminati mediante DMTA .

Campioni	ν (mmol/cm ³)
100% P550	19.44
100% P550 25 phr H ₂ O	11.18
100% P550 50 phr H ₂ O	5.46
100% P550 100 phr H ₂ O	5.36

Tabella 7.4. Valori di ν per i campioni con il 100% di P550 e diversi phr di acqua esaminati mediante
DMTA.



Figura 7.11: Andamento del modulo G' del campione costituito dal 100% di P550

7.1.4 Prove di swelling

Gli idrogeli, se immersi in un ambiente acquoso, assorbono l'acqua e si rigonfiano fino al raggiungimento di dimensioni più grandi rispetto alle dimensioni originali. Attraverso le prove di swelling si determina il loro grado di rigonfiamento, espresso in termini percentuali. Maggiore sarà la quantità di acqua assimilata e maggiore sarà il peso rilevato, da cui è possibile ricavare il grado di rigonfiamento [231]. In Figura 7.12, vengono riportate le curve relative alla percentuale di swelling dei diversi reticoli polimerici degli idrogeli esaminati. Per tutti i campioni con una quantità maggiore di P550 si osserva sin da subito un rapido aumento dell'andamento delle curve in esame, sino ad un valore pari al 5% in media dopo 15 min, invece, i campioni con una quantità maggiore di P250 arrivano a quel valore di swelling dopo circa 480 min (8 ore). In particolare, il campione formato da 100% di P550 arriva al 5% di swelling dopo 2 min dall'immersione in acqua e il suo peso raggiunge un valore costante dopo circa 4 ore con una percentuale di swelling pari a 27%, mentre, il film formato da 100% P250 arriva ad un valore prossimo al 5% dopo circa 6 ore dalla sua immersione in acqua, raggiungendo un valore prossimo al 5% dopo circa 12 ore.

Dunque, il reticolo più idrofilo (100% P550) tende ad idratarsi subito, riuscendo ad inglobare al suo interno, dopo 400 min, una quantità di acqua superiore del 26% rispetto al reticolo più idrofobo (100% P250).



Figura 7.12: Andamenti relativi alla % swelling nel tempo degi idrogeli costituiti da diverse percentuali di P550/P250.

Dall'andamento riportato in Figura 7.13, si evince che il film costituito con solo P550 riesce ad inglobare più acqua, raggiungendo il plateau con un valore di swelling pari a circa 40,7% dopo 120 min dall'immersione in acqua. Il film costituito da solo P550, oltre ad essere più idrofilo, è anche quello che ha la maglia del reticolo più grande rispetto agli altri film e per tali motivi riesce ad inglobare una maggiore quantità di acqua in un tempo notevolmente ridotto rispetto agli altri. Se prendiamo in considerazione il film con il 20% di P250, la sua % di swelling arriva al plateau 90 min dopo rispetto al film con solo P550. Quindi, inserendo una modesta percentuale (20%) di monomero idrofobo P250, la quantità d'acqua che il film può inglobare si riduce di circa l'8%. Se consideriamo il film con la quantità massima di P250 (40%), si ottiene un valore costante di % di swelling dopo 300 min (5 ore). Pertanto, maggiore è la quantità di monomero P250 più lentamente si arriva al valore stazionario di % di swelling e la quantità di acqua inglobata dall'idrogelo si riduce drasticamente (la differenza della quantità di acqua inglobata nell'idrogelo formato da solo P250 rispetto a quello costituito da solo P550 è di circa il 17,3 %). Infine, confrontando la curva relativa al campione formato da P550 e 25 phr di acqua con guella relativa allo stesso film ma senza acqua della Figura 5.10 si nota come il plateau viene raggiunto circa 90 min prima. Quindi, si può affermare che gli idrogeli costituiti da 25 phr di acqua riescono ad inglobare più velocemente l'acqua rispetto a quelli polimerizzati senza acqua.



Figura 7.13: Andamenti relativi alla % swelling nel tempo degli idrogeli costituiti da diverse percentuali di PEGDMA/PEGDA e 25phr di acqua.

7.1.5 Ottimizzazione dei lavaggi degli idrogeli

Le misure di assorbanza rappresentano uno strumento utile a capire se, durante la fase di swelling, si verifica il rilascio di alcune molecole capaci di inibire la crescita dei microrganismi. Se i polimeri o le loro componenti dovessero risultare tossiche non sarebbe possibile utilizzarli per l'intrappolamento dei microrganismi. Dalle misure di assorbanza ottenute, si riescono ad ottimizzare i lavaggi degli idrogeli affinché le possibili molecole rilasciate durante il processo di swelling vengano eliminate.

Nella Figura 7.14 vengono riportati gli spettri dei campioni A e B prelevati dopo 120 min dall'immersione del film, costituito dal 100% di P550, in PBS e confrontati con lo spettro del campione C prelevato dopo 15 min dall'immersione dello stesso film in PBS. Si nota come gli spettri siano sovrapposti e che si rilevano dei valori di assorbanza tra 200 e 300 nm. Quindi, tutte le molecole che poi ritroveremo nella soluzione di lavaggio al termine della prova (dopo 120 min) vengono rilasciate dal film già nei primi 15 minuti dall'immersione. In Figura 7.15 sono visibili gli spettri dei campioni D prelevati dopo 15, 30, 60 e 120 min dall'immersione del film e anche in questo caso tra 200 e 300 nm vengono rilevate le concentrazioni delle molecole presenti. Tuttavia, poiché il PBS dei campioni D viene sostituito dopo 15, 30 e 60 minuti, a 120 minuti il film ha subito più lavaggi, di conseguenza, la curva si presenta meno pronunciata. Questo andamento si nota già dal campione prelevato dopo 60 min, mentre il campione prelevato dopo 15 minuti è quello che mostra una concentrazione maggiore di molecole. I medesimi trend delle curve vengono confermati dalle soluzioni in cui viene effettuato lo swelling di altri idrogeli costituiti da diverse percentuali di P550/P250.



Figura 7.14: Spettri di diversi campioni di soluzioni di swelling del film P550 prelevati rispettivamente dopo 120 min (A e B) e dopo 15 min (C).



Figura 7.15: Spettri dei campioni D delle soluzioni di swelling del film P550 prelevati dopo 15, 30, 60 e 120 min.

In considerazione del fatto che il fotoiniziatore (BAPO-OH) assorbe più o meno in corrispondenza di lunghezze d'onda che variano tra 200 e 450 nm, si è pensato di fare uno spettro del BAPO-OH diluito in PBS e le due curve ottenute sono mostrate in Figura 7.16. In dettaglio, la curva nera è lo spettro del BAPO-OH 0.1% (1 mg/ml) in PBS e quella rossa del BAPO-OH 0.01% (10⁻¹ mg/ml) in PBS. Infatti, è noto che i fosfati del fotoiniziatore assorbono la luce tra 200-250 nm e gli aromatici intorno a 250-300 nm. Un accenno dello stesso andamento della curva viene comunque visto negli spettri dei campioni D (Figura 7.15).



7.2 Intrappolamento dei microrganismi negli idrogeli polimerici

Nel prosieguo del lavoro si tratterà la biocompatibilità dei costituenti chimici del sistema polimerico e della loro efficienza di trattenimento dei microrganismi negli idrogeli fotoreticolati. In particolare, si valuterà la possibile inibizione della crescita dei microrganismi da parte dei monomeri P550 e P250 irraggiati e non irraggiati, mentre, si è deciso di non testare la possibile inibizione della crescita dei microrganismi a contatto con il BAPO-OH (fotoiniziatore) poiché è stata già appurata la biocompatibilità in un precedente lavoro [232].

7.2.1 Valutazione dell'inibizione della crescita dei microrganismi da parte dei monomeri P550 e P250

Le prove di compatibilità tra *P. fluorescens* e i componenti del film polimerico, sia in presenza che in assenza di radiazione luminosa, sono state condotte su terreni solidi DMS1 (terreno complesso) e M78 (terreno minimo), al fine di valutare se la crescita dei microrganismi è inibita allo stesso modo in entrambi i terreni utilizzati in tutte le prove (in M78 avviene la crescita in beuta nella prova di intrappolamento dei microrganismi e in camera di diffusione, mentre, in DSM1 vengono seminati i campioni prelevati e diluiti dalla camera di diffusione). Grazie a queste prove è stato possibile determinare l'effetto tossico dei monomeri sui microrganismi valutando la loro crescita a contatto con soluzioni di P550/P250, irraggiate e non irraggiate, diluite in PBS. Infatti, si vuole escludere la possibilità che i monomeri irraggiati possano generare specie inibenti la crescita dei *P. fluorescens*.

In primo luogo è stato preparato un controllo positivo per verificare la crescita dei microrganismi sui terreni solidi utilizzati. In Figura 7.17 viene mostrata la crescita di *P. fluorescens* rispettivamente sui terreni solidi DSM1 e M78. Le piastre sono state fotografate dopo 24 ore dalla semina e si nota come su di esse sia cresciuta una patina uniforme di microrganismi. Per ciascuna condizione sperimentale sono state condotte 3 ripetizioni (viene riportata l'immagine di una sola).



Figura 7.17: Crescita di P. fluorescens su terreni DSM1 e M78.

Nelle Figure 7.18 e 7.19 vengono riportate le immagini relative alle prove in cui i batteri, dispersi rispettivamente su piastre DSM1 ed M78, sono messi a contatto con un disco di carta dello stesso diametro degli idrogeli polimerici (25 mm) sul quale sono depositati 100 μ L di monomero P550 al 50% in PBS, irraggiato o non irraggiato per 10 min con la stessa lampada usata per polimerizzare i film. Dove la soluzione di monomero e PBS è colata oltre ai dischi di carta, si nota un alone di inibizione della crescita dei microrganismi, in modo analogo sia nel caso di monomero irraggiato che non irraggiato. Pertanto, non vi è una sostanziale differenza di effetti sulla crescita dei batteri nelle due diverse condizioni sperimentali.



Figura 7.18: Crescita di *P. fluorescens* sul terreno DSM1, a contatto con P550 irraggiato e non irraggiato.



Figura 7.19: Crescita di *P. fluorescens* sul terreno M78, a contatto con P550 irraggiato e non irraggiato.

Le Figure 7.20 e 7.21, invece, mostrano le prove di valutazione dell'inibizione della crescita di *P. fluorescens* a contatto con il monomero P250 al 50% in PBS, non irraggiato e irraggiato per 10 min, nelle stesse condizioni sopra riportate. In questo caso l'inibizione dovuta al monomero depositato è più evidente di quella osservata per il monomero P550. Infatti, l'inibizione della crescita batterica dovuta al P250 segue il gradiente di concentrazione del monomero, mostrando un alone di inibizione, in cui non vi è crescita di microrganismi, in prossimità dei bordi del disco di carta dove il monomero si presenta in concentrazioni maggiori; i batteri crescono dove la concentrazione del P250 risulta essere via via sempre più bassa. Quindi, si può concludere che i due monomeri presentano un certo grado di tossicità per i microrganismi. In particolare, a parità di volume, il P250 ha una concentrazione di gruppi acrilici maggiore rispetto al P550 ed essendo proprio i gruppi acrilici la parte non biocompatibile dei due monomeri [233], si può giustificare in questo modo la maggiore inibizione della crescita di *P. fluorescens* da parte del P250.

Inoltre, anche in questo caso non si osserva alcuna sostanziale differenza di effetti sulla crescita dei batteri nella condizione di irraggiamento rispetto a quella di non irraggiamento. Dunque, si può concludere che, irraggiando la soluzione contenente il monomero, la tossicità nei confronti dei microrganismi non cambia poiché non vengono generate specie inibenti la crescita di *P. fluorescens*.



Figura 7.20: Crescita di *P. fluorescens* sul terreno DSM1, a contatto con P250 irraggiato e non irraggiato.



Figura 7.21: Crescita di *P. fluorescens* sul terreno M78, a contatto con P250 irraggiato e non irraggiato.

7.2.2 Valutazione del cut-off del reticolo polimerico per il trattenimento dei microrganismi

Questa prova viene svolta in modo preliminare all'intrappolamento dei microrganismi all'interno della matrice polimerica. Lo scopo di questa prova è determinare il valore di cutoff del reticolo polimerico dei film preparati. In Figura 7.22 viene mostrata la camera di diffusione montata come descritto nel paragrafo 4.3.3: nella cella di sinistra (rispetto alla scritta) viene introdotta la biomassa (*P. fluorescens* o *R. mucilaginosa*) risospesa in M78/ME e standardizzata ad un OD pari a 10 (corrispondente a $2.01 \cdot 10^9$ CFU/mL per *P. fluorescens* e $2.19 \cdot 10^8$ CFU/mL per *R. mucilaginosa*), mentre a destra il terreno liquido M78/ME.

Sono state condotte tre prove sperimentali utilizzando *P. fluorescens* come microrganismo, mentre, come film sono stati selezionati quelli costituiti dalle seguenti formulazioni: 100% P550 e 25 phr di PBS, 67% P550 con 33% P250 e 25 phr di PBS, 40% P550 e 60% P250. Come si è visto nelle prove di caratterizzazione degli idrogeli, aumentando la quantità di P250

le maglie del reticolo polimerico diventano più strette e quindi la velocità con cui i batteri *P. fluorescens* attraversano il film sarà minore.



Figura 7.22: Camera di diffusione con soluzione di *P. fluorescens* in M78 nella cella di sinistra e solo M78 nella cella di destra.

In Figura 7.23 viene riportato il grafico relativo agli andamenti delle CFU/mL nel tempo relativi ai tre idrogeli testati in camera di diffusione. In particolare, dopo 8, 24, 48 e 72 ore dall'allestimento della camera di diffusione sono stati prelevati 50 uL di terreno M78 dalla cella di destra, con cui sono state preparate delle diluizioni seriali, in seguito, disseminate su piastre contenenti il terreno solido DSM1. Le piastre sono state mantenute a 20 °C, e dopo 24 ore dalla semina sono state contate le CFU/mL. Si nota come il film costituito dal 100% di P550 permetta ai microrganismi in soluzione nella cella di sinistra di attraversarlo e la loro presenza viene rilevata già dopo 8 ore $(1.05 \pm 0.32 \cdot 10^5 \text{ CFU/mL})$. Infatti, si vede come nel tempo il valore delle CFU/mL aumenti fino a raggiungere un valore di $8.13 \pm 3.23 \cdot 10^8$ CFU/mL al termine della prova (72 ore dall'allestimento della camera di diffusione), superiore di circa il 70% rispetto a quello relativo ai due film formati dal 67% di P550 e 33% di P250, e dal 40% di P550 e 60% di P250, con valori di CFU/mL pari a, rispettivamente, $2.37 \pm 0.70 \cdot 10^8$ e $2.72 \pm 0.82 \cdot 10^8$. Quindi, nella prova in cui è stato impiegato il film costituito dal 100% di P550, circa il 40% dei microrganismi ha superato la barriera costituita dal film. Anche l'idrogelo costituito dal 40% di P550 e 60% di P250 non riesce a trattenere i batteri, infatti, circa il 13% dei microrganismi ha superato la barriera costituita dal suddetto film. L'idrogelo formato dal 67% di P550 e 33% di P250 ha, invece, un comportamento intermedio rispetto ai due prima citati. Infatti, mostra una quantità di CFU/mL decisamente maggiori, sia dopo 24 ore che dopo 48 ore, rispetto a quelle rilevate con il film costituito dal 40% di P550 e 60% di P250, ma inferiori rispetto a quelle relative al film 100% P550 (soprattutto dopo 8 ore e dopo 24 ore). Dunque, i batteri posti nella cella di sinistra attraversano i suddetti film e giungono nella cella di destra con velocità differenti e in concentrazioni proporzionali alla dimensione della maglia del reticolo dei film. Non essendo riusciti a trovare la composizione del film tale per cui i batteri vengano trattenuti, si è deciso di testare il lievito R. mucilaginosa, di dimensioni maggiori rispetto ai batteri di cui si è discusso precedentemente (P. fluorescens ha una lunghezza variabile tra 1.4 e 2.2 μm e una larghezza di circa 0.9 μm [234], mentre *R. mucilaginosa* è pari a 6 μm) [224]. In Figura 7.24 viene riportata la camera di diffusione montata per eseguire le prove con i lieviti. I film testati, sono gli stessi utilizzati con P. fluorescens, ovvero 100% P550 e 25 phr di PBS, 67% P550 con 33% P250 e 25 phr di PBS, 40% P550 e 60% P250.



Figura 7.23: Andamenti delle CFU/mL di P. fluorescens nel tempo relativi ai diversi idrogeli.



Figura 7.24: Camera di diffusione con *R. mucilaginosa* nella cella di sinistra e ME nella cella di destra dopo 72 ore dall'allestimento della prova.

Nel grafico riportato in Figura 7.25, vengono messi a confronto i valori delle CFU/mL nel tempo relativi ai tre diversi film testati. Le prove con *R. mucilaginosa* sono state condotte seguendo la stessa metodologia impiegata per quelle con *P. fluorescens*.

Anche in questo caso i trend seguiti dalle tre curve mostrano una relazione lineare tra dimensione della maglia del reticolo del film e CFU/mL. Infatti, nel film costituito dal 100% di P550, avente le maglie del reticolo più grandi, già dopo 8 ore si riescono a rilevare delle CFU/mL pari a $7.50 \pm 3.54 \cdot 10^2$, mentre nel film con la maglia del reticolo più piccola (60% P250 e 40% P550), vengono rilevati i microrganismi solo dopo 72 ore con un valore di CFU/mL pari a $1.54 \pm 0.46 \cdot 10^5$. Il film costituito dal 67% di P550 e 33% di P250, ha un comportamento intermedio. Durante la prova in cui è stato impiegato il film costituito dal 100% di P550, si è notato che i microrganismi in soluzione attraversano il suddetto film sin da

subito e al termine della prova (72 ore) si ha un valore di CFU/mL pari a $6.20 \pm 0.28 \cdot 10^6$. Invece, il film costituito per il 60% dal monomero P250 e per il 40% dal monomero P550 non permette il passaggio dei lieviti fino a 48 ore. In questo intervallo di tempo, i microrganismi in soluzione con il terreno ME collocati nella cella di sinistra, non riescono ad attraversare il suddetto film, come è possibile osservare dal grafico in Figura 7.25.

Per un confronto immediato in Figura 7.26 vengono riportati i diversi valori delle CFU/mL nel tempo relativi ai due microrganismi. Analizzando i dati ottenuti con i due diversi tipi di microrganismi si può concludere che i batteri del ceppo *P. fluorescens* attraversano i film in modo più copioso rispetto ai lieviti del ceppo *R. mucilaginosa*, infatti, essendo più piccoli riescono ad attraversare più facilmente le maglie dei reticoli polimerici degli idrogeli. In particolare, si conta un numero di CFU/mL di *P. fluorescens* maggiore di un ordine di grandezza rispetto ad *R. mucilaginosa*. Nelle prove in cui si è testato il film costituito dal 100% P550, al termine della prova (72 ore), si rilevano $8.13 \pm 3.23 \cdot 10^8$ CFU/mL di *P. fluorescens* e $6.20 \pm 0.28 \cdot 10^6$ CFU/mL di *R. mucilaginosa*; in quelle in cui si è esaminato il comportamento del film costituito dal 40% di P550 e 60% di P250, al termine della prova (72 ore), si rilevano $2.72 \pm 0.82 \cdot 10^8$ CFU/mL di *P. fluorescens* e $1.54 \pm 0.46 \cdot 10^5$ CFU/mL di *R. mucilaginosa*.



Figura 7.25: Andamenti delle CFU/mL di R. mucilaginosa nel tempo relativi ai diversi idrogeli.


Figura 7.26: Andamenti delle CFU/mL di *P. fluorescens* e *R. mucilaginosa* nel tempo relativi ai diversi idrogeli.

7.2.3 Caratterizzazione degli idrogeli polimerici contenenti i microrganismi

Una volta caratterizzati tutti gli idrogeli fotoreticolati, valutata la possibile tossicità dei monomeri irraggiati o meno con luce visibile nei confronti dei microrganismi scelti e sviluppato un test in camera di diffusione per valutare la capacità di trattenimento dei microrganismi da parte dei film, sono state condotte delle prove preliminari di intrappolamento dei microrgamisi. In particolare, gli idrogeli con i microrganismi intrappolati vengono opportunamente caratterizzati dal punto di vista della cinetica di reticolazione, tramite fotoreologia in tempo reale, nonché dal punto di vista delle proprietà termiche e meccaniche, tramite analisi DMTA. In questo modo, si valuta come la presenza dei microrganismi influisca sulle proprietà chimico-fisiche degli idrogeli. Infatti, mentre nelle formulazioni precedentemente preparate sono stati inseriti 25 phr di PBS, nelle seguenti prove nel suddetto tampone sono stati risospesi i microrganismi con un OD₆₂₀ pari a 40. Vengono impiegati due diversi tipi di microrganismi unicellulari: *P. fluorescens* (batterio) e *R. mucilaginosa* (lievito).

7.2.3.1 Fotoreologia degli idrogeli contenenti P. fluorescens e R. mucilaginosa

Durante le prove di fotoreologia condotte in questo paragrafo, vengono prodotti idrogeli contenenti microrganismi nelle medesime condizioni di quelli privi di microrganismi (100% P550; 80% P550, 20% P250; 67% P550, 33% P250; 60% P550, 40% P250). Dal confronto tra le cinetiche di reazione delle tre tipologie di idrogeli non si osservano significative differenze, inoltre, anche il valore del modulo elastico G' è dello stesso ordine di grandezza (Figura 7.27).



Figura 7.27: Curve G' in fotoreologia degli idrogeli formati da 100% di P550 con 25 phr di PBS e 100% di P550 con 25 phr di *P. fluorescens/R. mucilaginosa* in PBS.

Lo stesso andamento delle curve G' viene riscontrato per tutte le altre formulazioni di idrogeli (diverse percentuali in peso di P550/P250) testate.

Nelle Figure 7.28 e 7.29 vengono rispettivamente riportati gli andamenti delle curve con diverse percentuali in peso di P550/P250 con 25 phr di *P. fluorescens* o *R. mucilaginosa* in PBS. È possibile osservare che, all'aumentare della quantità di P250 la cinetica di reazione diminuisce nello stesso modo mostrato in Figura 7.4 (Curve G' in fotoreologia degli idrogeli formati da diverse percentuali di P550/P250 e 25 phr di PBS). Quindi, è possibile concludere che la presenza dei microrganismi non influenza significativamente il processo di reticolazione. Tuttavia, si è provato a fotoreticolare senza introdurre nella formulazione il fotoiniziatore (BAPO-OH 0.2% wt), per valutare la capacità di entrambi i microrganismi di comportarsi come fotoiniziatori. La formulazione così preparata non ha subito reticolazione, quindi, si può affermare che *P. fluorescens* e *R. mucilaginosa* non agiscono da fotoiniziatori.

In Figura 7.30 si mettono a confronto quattro curve relative agli idrogeli costituiti dal 67% di P550 e 33% di P250 riportate a titolo di esempio, poichè gli stessi andamenti sono stati osservati per tutte le altre formulazioni testate.



Figura 7.28: Curve G' in fotoreologia degli idrogeli formati da diverse percentuali di P550/P250 e 25 phr di *P. fluorescens* in PBS.



Figura 7.29: Curve G' in fotoreologia degli idrogeli formati da diverse percentuali di P550/P250 e 25 phr di in PBS *R. mucilaginosa*.



Figura 7.30: Curve G' in fotoreologia degli idrogeli formati da PEGDMA e PEGDA con 25 phr di PBS/P. fluorescens/R. mucilaginosa in PBS.

7.2.3.2 Analisi DMTA dei campioni contenenti P. fluorescens e R. mucilaginosa

Nel presente paragrafo viene riportata la caratterizzazione degli idrogeli contenenti i microrganismi tramite analisi DMTA. Nelle Figure 7.31 e 7.32 vengono riportate le curve relative al fattore di smorzamento $Tan \delta$ rispettivamente dei campioni costituiti da diverse percentuali in peso di P550/P250 con 25 phr di P. fluorescens e R. mucilaginosa in PBS. Si nota come all'aumentare della frazione di P250 il picco della curva $Tan \delta$ corrispondente alla temperatura della transizione vetrosa, si sposta verso valori più alti, confermando come il peso molecolare influenzi le proprietà meccaniche degli idrogeli fotoreticolati anche in presenza dei microrganismi. I valori delle temperature vetrose sono riassunti nella Tabella 7.5, in cui appare evidente, confrontandoli con quelli ottenuti dai campioni privi di microrganismi, come la presenza di questi ultimi renda più gommoso lo stato fisico degli idrogeli. In particolare, gli idrogeli contenenti R. mucilaginosa presentano delle temperature vetrose decisamente più basse (Tg -4.2÷18.5 °C) sia rispetto agli idrogeli privi di microrganismi (Tg 7.4÷30 °C) che rispetto agli idrogeli contenenti P. fluorescens (Tg 4.7÷29 °C). Quindi, tra le due tipologie di microrganismi, i lieviti tendono a rendere più gommoso lo stato fisico degli idrogeli. È probabile che il contenuto in acqua dei microrganismi influenzi la densità di reticolazione, in particolare, essendo il lievito R. mucilaginosa di dimensioni maggiori rispetto al batterio P. fluorescens, l'idrogelo risulta meno densamente reticolato. Dalla Figura 7.33 si nota che, se il tampone fosfato introdotto nella formulazione contiene P. fluorescens o R. mucilaginosa, il picco corrispondente alla transizione vetrosa è spostato verso temperature più basse. Inoltre, sempre in Figura 7.33 è possibile visualizzare come i valori delle G' dei tre campioni, prima e dopo la transizione vetrosa, risultino tutti dello stesso ordine di grandezza (Tabella 7.6). I dati ottenuti mediante questa analisi mostrano che i microrganismi all'interno del reticolo non influenzano in modo rilevante le proprietà meccaniche della matrice polimerica, ma causano solo un abbassamento della Tg. Gli stessi

andamenti riportati in quest'ultima figura (Figura 7.33) sono stati riscontrati negli altri idrogeli, preparati con diverse quantità in peso di P550/P250 all'interno delle formulazioni che si è deciso di non riportare.

Composizione film	T _g [°C]	T _g [°C]	T _g [°C]
	P. fluorescens	R. mucilaginosa	
100% P550	4.7	-4.2	7.4
80% P550 20% P250	16.5	8.3	21.0
67% P550 33% P250	23.0	15	23.5
60% P550 40% P250	29	18.5	30

Tabella 7.5. Valori della temperatura vetrosa relativi ai film con diverse percentuali di PEGDMA/PEGDA e 25 phr *P. fluorescens/R. mucilaginosa* in PBS/privi di microrganismi.



Figura 7.31: Andamenti del fattore di smorzamento $Tan \delta$ dei campioni con diverse percentuali PEGDMA/PEGDA e 25 phr *P. fluorescens* in PBS.



Figura 7.32: Andamenti del fattore di smorzamento $Tan \delta$ dei campioni con diverse percentuali PEGDMA/PEGDA e 25 phr *R. mucilaginosa* in PBS.



Figura 7.33: Andamento del modulo G' e del fattore di smorzamento dei campioni costituiti dal 100% di PEGDMA Mn 550.

Composizione film	G' [Pa]	G' [Pa]
	(prima T _g)	(dopo T _g)
100% P550	$2.269 \cdot 10^9$	5.38·10 ⁷
100% P550 e 25 phr <i>P. fluorescens</i> in PBS	$2.727 \cdot 10^9$	$3.755 \cdot 10^7$
100% P550 e 25 phr <i>R. mucilaginosa</i> in PBS	1.143·10 ⁹	$2.655 \cdot 10^7$

Tabella 7.6. Valori dei moduli G' (prima e dopo Tg) degli idrogeli costitutiti dal 100% di P550 e
25phr di P.	fluorescens/R. mucilaginosa in PBS.

8. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Con il presente lavoro di tesi si è approfondito una possibile applicazione di monomeri acrilati a base di PEG. In particolare, ci si è focalizzati sull'intrappolamento dei batteri *P. fluorescens* e dei lieviti *R. mucilaginosa* all'interno di un idrogel polimerico fotoreticolato ottenuto a partire da una miscela contenente diverse quantità di PEGDMA Mw 550 (P550) e PEGDA Mw 250 (P250), un fotoiniziatore (BAPO-OH) e un tampone fosfato salino (PBS).

Anzitutto, dalla caratterizzazione degli idrogeli si è evidenziato come la fotoreticolazione di formulazioni, aventi tra loro diverse composizione di P550 e P250, ha permesso di creare reticoli con morfologia, proprietà meccaniche e capacità di rigonfiamento molto diverse. In particolare, gli idrogeli con maggiore concentrazione di P550 risultano essere più idrofili e gommosi, mentre quelli con una maggiore concentrazione di P250 generano idrogeli più idrofobi e con una dimensione inferiore delle maglie del reticolo.

Inoltre, è stata testata la presenza di un tampone salino acquoso (PBS), durante il processo di reticolazione, fondamentale per il successivo intrappolamento dei microrganismi.

La valutazione della biocompatibilità dei monomeri ha evidenziato la presenza di effetti di tossicità, in particolare da parte del monomero P250. Quindi, all'aumentare del peso molecolare dei monomeri la biocompatibilità diminuisce, probabilmente per l'aumento dei gruppi acrilici. In dettaglio, a parità di volume di monomeri, gli acrilati risultano essere più concentrati nel P250, pertanto, la causa dell'inibizione sulla crescita dei batteri potrebbe essere attribuibile proprio alla maggiore concentrazione degli acrilati nel monomero P250.

Le prove condotte in camera di diffusione, hanno permesso di osservare un differente comportamento non solo in relazione alla dimensione del reticolo polimerico, ma anche al microrganismo testato. La velocità con cui i microrganismi, attraversano i film è direttamente proporzionale alla dimensione della maglia del reticolo, ed inversamente proporzionale a quella del microrganismo testato. Infatti, a parità di film, *P. fluorescens*, che presenta dimensioni inferiori (circa 1-1.5 μ m) rispetto a *R. mucilaginosa* (circa 6 μ m), attraversa l'idrogelo più velocemente. Ciò è particolarmente evidente nel film con le maglie del reticolo polimerico più strette (40% P550 60% P250): dopo 24 ore il numero di batteri che hanno attraversato il film è pari a 2.72 $\cdot 10^8$ CFU/mL, mentre nel caso del lievito fino a 48 ore non si osserva il passaggio dei microrganismi, e solamente dopo 72 ore si rilevano 1.54 $\cdot 10^5$ CFU/mL. Nonostante le prove in camera di diffusione abbiano evidenziato il non completo trattenimento dei microrganismi, in particolare del batterio, si è deciso di effettuare i test di immobilizzazione, tenendo conto del possibile effetto di cross-linking [235].

Quindi, la ricerca della soluzione a questo inconveniente apre nuovi scenari a futuri studi sperimentali. Si potrebbe utilizzare una combinazione di monomeri idrofobi organizzata in una struttura multilayer, con ottimizzazione di membrane esterne che facciano passare i nutrienti ma non i microrganismi, così da permettere all'idrogelo di adempiere allo scopo per cui è stato creato. Un'altra alternativa potrebbe essere quella di cambiare i monomeri utilizzati, cercando di intrappolare i microrganismi in matrici polimeriche naturali, come proteine (per esempio collagene), alginati e carragenine.

I risultati ottenuti, tuttavia, consentono l'utilizzo dei lieviti *R. mucilaginosa* intrappolati in idrogeli polimerici per 48 ore.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Caplice E. and Fitzgerald G.F., 1999, Food fermetation: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, **50**(1–2), 131–149.
- [2] Oren A., 2010, Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ. Technol.*, **31**(8–9), 825–834.
- [3] Rokem J.S., Lantz A.E. and Nielsen J., 2007, Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Nat. Prod. Rep.*, **24**(6), 1262–87.
- [4] Lei Y., Chen W. and Mulchandani A., 2006, Microbial biosensors, *Anal. Chim. Acta*, **568**(1–2), 200–210.
- [5] Mosbach K. and Mosbach R., 1966, Entrapment of Enzymes and Mocroorganisms in Synthetic Cross-linked polymers and their Application in column Techniques, *Acta Chem. Scand.*, **20**(10), 2807–2810.
- [6] Cassidy M.B., Lee H. and Trevors J.T., 1996, Environmental applications of immobilized microbial cells: A review, *J. Ind. Microbiol.*, **16**(2), 79–101.
- [7] Jianlong W. and Quian Y., 1999, Microbial degradation of 4-chlorophenol by microorganisms entrapped in carrageenan-chitosan gels, *Chemosphere*, 38(13), 3109– 3117.
- [8] De-Bashan L.E. and Bashan Y., 2010, Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects, *Bioresour. Technol.*, **101**(6), 1611–1627.
- [9] Pal K., Banthia A.K. and Majumdar D.K., 2009, Polymeric hydrogels: Characterization and biomedical applications, *Des. Monomers Polym.*, **12**(3), 197–220.
- [10] Qiu Y. and Park K., 2001, Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **53**(3), 321-339.
- [11] Hoffman A.S., 2012, Hydrogels for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 18–23.
- [12] Amerio E., Sangermano M., Malucelli G., Priola A. and Voit B., 2005, Preparation and characterization of hybrid nanocomposite coatings by photopolymerization and sol-gel process, *Polymer*, 46(25), 11241–11246.
- [13] Klein S., Barsella A., Leblond H., Bulou H., Fort A., Andraud C. and Dorkenoo K., 2005, One-step waveguide and optical circuit writing in photopolymerizable materials processed by two-photon absorption, *Appl. Phys. Lett.*, 86(21), 21118.
- [14] Stansbury J.W., 2000, Curing Dental Resins and Composites by Photopolymerization, *J. Esthet. Dent.*, **12**(6), 300–308.
- [15] Baikerikar K.K. and Scranton A.B., 2001, Photopolymerizable liquid encapsulants for microelectronic devices, *Polymer*, **42**(2), 431–441.
- [16] Burdick J.A. and Anseth K.S., Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGDmodified PEG hydrogels for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 23(22), 4315–23, 2002.
- [17] Ifkovits J.L. and Burdick J.A., 2007, Review: Photopolymerizable and Degradable Biomaterials for Tissue Engineering Applications, *Tissue Eng.*, 13(10), 2369–2385.

- [18] Walling C. and Briggs E.R., 1946, The Thermal Polymerization fo mehtyl methacrylate, J. Am. Chem. Soc., 68(1044), 1141–1145.
- [19] Szumski M. and Buszewski B., 2009, Effect of temperature during photopolymerization of capillary monolithic columns, J. Sep. Sci., 32(15–16), 2574– 2581.
- [20] Yagci Y., Jockusch S. and Turro N.J., 2010, Photoinitiated polymerization: Advances, challenges, and opportunities, *Macromolecules*, **43**(15), 6245–6260.
- [21] Sun H.B. and Kawata S., 2004, Two-photon photopolymerization and 3D lithographic microfabrication, *Adv. Polym. Sci.*, **170**, 169–273.
- [22] Censi R., Vermonden T., Van Steenbergen M.J., Deschout H., Braeckmans K., De Smedt S.C., Van Nostrum C.F., Di Martino P., 2009, Photopolymerized thermosensitive hydrogels for tailorable diffusion-controlled protein delivery, J. *Control. Release*, 140(3), 230–236.
- [23] Carothers W.H., 1929, Studies on polymerization and ring formation. I. An introducion to the general theory of condensation polymers, *Journal of the American Chemical Society*, **51**(10), 2548–2559.
- [24] Flory P.J., 1946, Fundamental Principles of Condensation Polymerization., *Chem. Rev.*, **39**(1), 137–197.
- [25] Billmeyer F.W., 1971, Step-reaction (condensation) polymerization, *Textbook of polymer science*, Chap. 2, John Wiley & Sons, Canada.
- [26] Price C.C., 1943, Some Aspects of the Mechanism of addition polymerization, *Ann. New York Accademy Sci.*, **44**(1), 351–370.
- [27] Matyjaszewski K., Davis T.P., 2002, Copolymerization Kinetics, *Handbook of radical polymerization*, Chap. 5, John Wiley & Sons, Canada.
- [28] Furukawa J., 1962, Ionic Polymerization of Polar Monomers, *Polymer Science*, **3**, 487–509.
- [29] Kaur M. and Srivastava A.K., 2002, Photopolymerization: A review, J. Macromol. Sci. Polym. Rev., 42(4), 481–512.
- [30] Garcia C., Fimia A. and Pascual I., 2001, Holographic behavior of a photopolymer at high thicknesses and high monomer concentrations: Mechanism of photopolymerization, *Appl. Phys. B Lasers Opt.*, **72**(3), 311–316.
- [31] Croutxé-Barghorn C., Moireau P., Allonas X., Buguet J. and Pynaert R., 2013, Effect of reactive oxygen species on the kinetics of free radical photopolymerization, *Polym. Chem.*, **4**(8), 2475.
- [32] Decker C. and Jenkins A.D., 1985, Kinetic Approach of O₂ inhibition in UV and layer polymerizations, *Macromolecules*, **18**(6), 1241–1244.
- [33] Lee T.Y., Guymon C.A., Jönsson E.S. and Hoyle C.E., 2004, The effect of monomer structure on oxygen inhibition of (meth)acrylates photopolymerization, *Polymer (Guildf)*, **45**(18), 6155–6162.
- [34] Ligon S.C., Husàr B., Wutzel H., Holman R. and Liska R., 2013, Strategies to reduce oxygen inhibition in photoinduced polymerization, Chemical review, **114**(1), 557-589.
- [35] Andrzejewska E. and Andrzejewski M., 1998 "Polymerization kinetics of photocurable acrylic resins," J. Polym. Sci. Part A, Polym. Chem., **36**(4), 665–673.

- [36] Klingert B., Riediker M. and Roloff A., 1988, Light Sensitive Organometallic Compounds in Photopolymerization, *Comments Inorg. Chem.*, 7(3), 109–138.
- [37] Li Z., Shen W., Liu X. and Liu R., 2017, Efficient unimolecular photoinitiators for simultaneous hybrid thiol-yne-epoxy photopolymerization under visible LED light irradiation, *Polym. Chem.*, 8(9), 1579–1588.
- [38] Karaca Balta D., Karahan Ö., Avci D. and Arsu N., 2015, Synthesis, photophysical and photochemical studies of benzophenone based novel monomeric and polymeric photoinitiators, *Prog. Org. Coatings*, **78**, 200–207.
- [39] Person M.D., Kash P.W. and Butler L.J., 1992, A new class of Norrish type I process: alpha-bond cleavage upon $(n,\pi(C=O))$ Excitation in the Acid Halides, *The Journal of Physical Chemistry*, **96**(5), 2021–2023.
- [40] Heydarnezhad H.R., Pourabbas B. and Tayefi M., 2018, Conducting electroactive polymers via photopolymerization: A review on synthesis and applications, *Polym. Plast. Technol. Eng.*, **57**(11), 1093–1109.
- [41] Campos L.M., Mortko C.J. and Garcia-Garibay M.A., 2006, Norrish type I vs Norrish-Yang type II in the solid state photochemistry of Cis-2,6-Di(1-cyclohexenyl)cyclohexanone: A computational study, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **456**(1), 15–24.
- [42] Small R.D. and Scaiano J.C., 1977, Direct detection of the biradicals generated in the Norrish type II reaction, *Chem. Phys. Lett.*, **50**(3), 431–434.
- [43] Valdes-Aguilera O., Pathak C.P., Shi J., Watson D. and Neckers D.C., 1992, Photopolymerization Studies Using Visible Light Photoinitiators, *Macromolecules*, 25(2), 541–547.
- [44] Shao J., Huang Y. and Fana Q., 2014, Visible Light Initiating Systems for Photopolymerization: Status, Development and Challenges, *Polymer Chemistry*, 5(14), 4195–4210.
- [45] Elisseeff J.H., Manson P.N., Kim T.K., Williams C.G. and Malik A.N., 2004, Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation, *Biomaterials*, **26**(11), 1211–1218.
- [46] Müller G., Zalibera M, Gescheidt G., Rosenthal A., Santiso-Quinones G., Dietliker K. and Grützmacher H., 2015, Simple one-pot syntheses of water-soluble Bis(acyl)phosphane oxide photoinitiators and their application in surfactant-free emulsion polymerization, *Macromol. Rapid Commun.*, 36(6), 553–557.
- [47] Wang J., 2017, Synthesis and Application of Bis(acyl)phosphane Oxide Photoinitiators, PhD Thesis, ETH Zurich.
- [48] J. Wang, J. Cheng, J. Liu, Y. Gao, and F. Sun, 2013, Self-floating ability and initiating gradient photopolymerization of acrylamide aqueous solution of a water-soluble polysiloxane benzophenone photoinitiator, *Green Chem.*, 15(9), 2457–2465.
- [49] Müller G. S., 2013, Phosphorus based photoinitiators: synthesis and application, PhD Thesis, ETH Zurich.
- [50] Ramyadevi J., Jeyasubramanian K., Marikani A., Rajakumar G. and Rahuman A.A., 2012, Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles, *Mater. Lett.*, **71**, 114–116.
- [51] Beil A., Müller G., Käser D., Hattendorf B., Li Z., Krumeich F. and Grützamacher H.,2018, Bismesitoylphosphinic Acid (BAPO-OH): A Ligand for Copper Complexes

and Four-Electron Photoreductant for the Preparation of Copper Nanomaterials, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **57**(26), 7697–7702.

- [52] Benedikt S., Wanh J., Markovic M., Moszner N., Dietliker K., Ovsianikov and Liska R., 2016, Highly efficient water-soluble visible light photoinitiators, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, 54(4), 473–479.
- [53] Wang J., Chiappone A., Roppolo I., Shao F., Fantino E., Lorusso M. and Grützamacher H., 2018, All-in-One Cellulose Nanocrystals for 3D Printing of Nanocomposite Hydrogels, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 57(9), 2353–2356.
- [54] Moszner N., Fischer U.K., 2008, Ganster B., Liska R. and Rheinberger V., Benzoyl germanium derivatives as novel visible light photoinitiators for dental materials, *Dent. Mater.*, **24**(7), 901–907.
- [55] Li M., Chen Y., Zhang H. and Wang T., 2010, A novel ferrocenium salt as visible light photoinitiator for cationic and radical photopolymerization, *Prog. Org. Coatings*, vol. 68(3), 234–239.
- [56] Schweizer S., Telitel S., Lalevée J., Blanchard N., Kavalli T., Tehfe M.A. and Fouassier J.P., 2012, Photopolymerization of Cationic Monomers and Acrylate/Divinylether Blends under Visible Light Using Pyrromethene Dyes, *Macromolecules*, 45(17) 6864–6868.
- [57] Rivarola C. R., Biasutti M. A. and Barbero C. A., 2009, A visible light photoinitiator system to produce acrylamide based smart hydrogels: $Ru(bpy)_3^{2+}$ as photopolymerization initiator and molecular probe of hydrogel microenvironments, *Polymer (Guildf)*, **50**(14), 3145–3152.
- [58] Goodner M. D. and Bowman C. N., 2002, Development of a comprehensive free radical photopolymerization model incorporating heat and mass transfer eects in thick lms, Chemical Engineering Science, **57**, 1–14.
- [59] Makhlouf A.S.H. and Scharnweber D., 2015, UV-Curable Nanocomposite Coatings and Materials, in "Handbook of Nanoceramic and Nanocomposite Coatings and Materials", (S. Bastiani and M. Mohseni), Chap. 7, Elvesier, Butterworth-Heinemann, UK, Oxford.
- [60] Jandt K. D. and Mills R. W., 2013, A brief history of LED photopolymerization, *Dent. Mater.*, **29**(6), 605–617.
- [61] Malinauskas M., Farsari M., Piskarskas A. and Juodkazis S., 2013, Ultrafast laser nanostructuring of photopolymers: A decade of advances, *Phys. Rep.*, **533**(1), 1–31.
- [62] Beutel J., Chang C. and Sheeto J., 1974, *Photopolymerizable compositions with improved resistance to oxygen inhibition*, U.S. Patent Appl. NO. 3,844,790.
- [63] De Boer J., Visser R. J. and Melis G. P., 1992, Time-resolved determination of volume shrinkage and refractive index change of thin polymer films during photopolymerization, *Polymer (Guildf)*, **33**(6), 1123–1126.
- [64] Valletta G., Nicolais L., Maffezzoli A., Rengo S. and Pietra A.D., 2003, Photopolymerization of dental composite matrices, *Biomaterials*, **15**(15), 1221–1228.
- [65] Fang N., Sun C. and Zhang X., 2004, Diffusion-limited photopolymerization in scanning micro-stereolithography, *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.*, **79**(8), 1839–1842.
- [66] Chibata I. and Tosa T., 1983, Immobilized Cells: Historical Background, Applied

biochemistry and bioengineering, 4, 1-9.

- [67] Guisan J. M., 2006, *Immobilization of Enzymes and Cells*. Humana Press Inc., New Jersey.
- [68] Tosa T., Mori T., Fuse N. and Chibata I., 1967, Studies on continuous enzyme reactions. IV. Preparation of a DEAE-sephadex-aminoacylase column and continuous optical resolution of acyl-DL-amino acids, *Biotechnol. Bioeng.*, **9**(4), 603–615.
- [69] Katchalski-Katzir E., Immobilized enzymes-learning from past successes and failures, 1993, *Trends Biotechnol.*, **11**(11), 471–478.
- [70] Iyer P. V. and Ananthanarayan L., 2008, Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment, *Process Biochem.*, **43**(10), 1019–1032.
- [71] Tosa T., Sato T., Mori T. and I. Chibata, 1974, Basic Studies for Continuous Production of L-Aspartic Acid by Immobilized Escherichia coli Cells Downloaded from, *Appl. Microbiol.*, **27**(5), 886–889.
- [72] Bucke C. and Brown D. E., 1983, Immobilized Cells, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **300**(1100), 369–389.
- [73] Kosseva M. R., 2011, Immobilization of Microbial Cells in Food Fermentation Processes, *Food Bioprocess Technol.*, **4**(6), 1089–1118.
- [74] Akin C., 1987, Biocatalysis with immobilized cells, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **5**(1), 319–367.
- [75] Mensour N.A., Margaritis A., Briens C.L., Pilkington H. and Russell I., 1996, Application of immobilized yeast cells in the brewing industry, *Prog. Biotechnol.*, **11**, 661–671.
- [76] Gungormusler-Yilmaz M., Cicek N., Levin D.B. and Azbar N., 2016, Cell immobilization for microbial production of 1,3-propanediol, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 36(3), 482–494.
- [77] Sassolas A., Blum L. J. and Leca-Bouvier B.D., 2012, Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, *Biotechnol. Adv.*, **30**(3), 489–511.
- [78] Hackel U., Klein J. Megnet R. and Wagner F.,1975, Immobilisation of microbial cell in polymeric matrices, *Biotechnology and Industrial microbiology*, **1**(4), 291–293.
- [79] Nwankwegu A.S. and Onwosi C.O., 2017, Microbial cell immobilization: a renaissance to bioaugmentation inadequacies. A review, *Environ. Technol. Rev.*, 6(1), 186–198.
- [80] El-Mansi E.M.T., Bryce C.F.A., Demain A.L., Allman A.R., 2011, *Fermentation Microbioliology and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton.
- [81] Cantone S., Ferrerio V., Corici L., Ebert C., Fattor D., Spizzo P. and Gardossi L., 2013, Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: Criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods, *Chem. Soc. Rev.*, 42(15), 6262–6276.
- [82] Yokoi H., Maeda Y., Hirose J., Hayashi S. and Takasaki Y., 1997, "H₂ production by immobilized cells of Clostridium butyricum on porous glass beads," *Biotechnol. Tech.*, 11(6), 431–433.
- [83] Fiedurek J., 2001, Production of gluconic acid by immobilized in pumice stones mycelium of Aspergillus niger using unconventional oxygenation of culture, *Biotechnol. Lett.*, **23**(21), 1789–1792.

- [84] Thommes M., Physical adsorption characterization of nanoporous materials, 2010, *Chemie-Ingenieur-Technik*, **82**(7), 1059–1073.
- [85] Martins S.C.S., Martins C.M., Fiùza L.M.C.G. and Santaella S.T., 2013, Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater, *African J. Biotechnol.*, **12**(28), 4412–4418.
- [86] Krekeler C., Ziehr H. and Klein J., 1989, Physical methods for characterization of microbial cell surfaces, *Experientia*, **45**(11–12), 1047–1055.
- [87] Ahalya N., Ramachandra T.V. and Kanamadi R.D., 2003, Removal and Recovery of Heavy Metals by Biosorption, *Res. J. Chem. Environ.*, 7(4), 71–79.
- [88] Górecka E. and Jastrzębska M., 2011, Immobilization Techniques And Biopolymer Carriers A Review, *Biotechnol. Food Sci.*, **75**, 27–34.
- [89] Srivastava R.A.K. and Baruah J.N., 1986, Culture conditions for production of thermostable amylase by Bacillus stearothermophilus, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(1), 179–184.
- [90] Cazetta M.L., Celligoi M.A.P.C., Buzato J.B. and Scarmino I.S., 2007, Fermentation of molasses by Zymomonas mobilis: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production, *Bioresour. Technol.*, **98**(15) 2824–2828.
- [91] Paul G.C. and Thomas C.R., 1996, A structured model for hyphal differentiation and penicillin production using Penicillium chrysogenum, *Biotechnol. Bioeng.*, **51**(5), 558–572.
- [92] Núñez M.J. and Lema J.M., 1987, Cell immobilization: Application to alcohol production, *Enzyme Microb. Technol.*, **9**(11), 642–651.
- [93] Eş I., Vieira J.D.G and Amaral A.C., 2015, Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99(5), 2065–2082.
- [94] Groboillot A., Boadi D.K., Poncelet D. and Neufeld R.J., 1994, Immobilization of cells for application in food industry," *Crit. Rev. Biotechnol.*, **107**(2), 75–107.
- [95] Valuev L.I., Chupov V.V. and Plate N.A., 1994, Covalent immobilization of microorganisms in polymeric hydrogels, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **5**(1–2), 37–48.
- [96] Navarro J.M., Durand G., and De Rangueil A., 1977, Applied Microbiology Immobilization onto Porous Glass, *European journal of applied microbiology and biothecnology*, **4**(4), 243–254.
- [97] Messing R.A. and Oppermann R.A., 1979, *High surface low volume fungal biomass composite*, U.S. Patent Appl., No. 3,149,936.
- [98] Rogero S.O., Malmonge S.M., Lugão A.B., Ikeda T.I., Miyamaru L. and Cruz Á.S., 2003, Biocompatibility Study of Polymeric Biomaterials, *Artificial organs*, 27(5), 424– 427.
- [99] Jen A.C., Wake M.C. and Mikos A.G., 1996, Review: Hydrogels for cell immobilization, *Biotechnol. Bioeng.*, **50**(4), 357–364.
- [100] Cushing M.C. and Anseth K.S., 2007, Hydrogel cell cultures, *Science*, **316**(5828), 1133–1134.
- [101] Feder J. and Tolbert W.R., 1985, Use of cellular microencapsulation in large-scale production of monoclonal antibodies, in "Large scale mammalian cell culture", (R.

Rupp), Academic Press Inc., London.

- [102] Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banat I.M., Marchant R. and Koutinas A.A., 2004, Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review, *Food Microbiol.*, **21**(4), 377–397.
- [103] M. Gryta, 2002, The assessment of microorganism growth in the membrane distillation system, *Desalination*, 142(1), 79–88.
- [104] T. Lebeau, T. Jouenne, and G. A. Junter, 1997, Simultaneous fermentation of glucose and xylose by pure and mixed cultures of Saccharomyces cerevisiae and Candida shehatae immobilized in a two-chambered bioreactor, *Enzyme Microb Techno*, 21(4), 265–272.
- [105] Gouin S., 2004, Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends, *Trends Food Sci. Technol.*, **15**(7–8), 330–347.
- [106] Olabisi R.M., 2015, Cell microencapsulation with synthetic polymers, J. Biomed. Mater. Res. - Part A, 103(2), 846–859.
- [107] Rathore S., Desai P.M., Liew C.V., Chan L.W. and Heng P.W.S., 2013, Microencapsulation of microbial cells, *J. Food Eng.*, **116**(2), 369–381.
- [108] John R.P., Tyagi R.D., Brar S.K., Surampalli R.Y. and Prévost D., 2011, Bioencapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **31**(3), 211–226.
- [109] B. C. Larish, D. Poncelet, C. P. Champagne and R. J. Neufeld, 1994, Microencapsulation of Lactococcus Lactis subsp. cremoris, *Journal of microencapsulation*, 11(2), 189–195.
- [110] Lian B., Chen Y., Zhao J., Teng H.H., Zhu L. and Yuan S., 2008, Microbial flocculation by Bacillus mucilaginosus: Applications and mechanisms, *Bioresour*. *Technol.*, 99(11), 825–4831.
- [111] Soares E.V., 2011 Flocculation in Saccharomyces cerevisiae: A review, J. Appl. Microbiol., **110**(1), 1–18.
- [112] Vertès A.A., Qureshi N., Blaschek H.P. and Yukawa H., 2010, *Biomass to biofuels: Strategies for global industries*, Wiley, UK.
- [113] Pilkington P.H., Margaritis A., Mensour N.A. and Russell I., 1998, Fundamentals of immobilised yeast cells for continuous beer fermentation, *Journal of the Institute of Brewing*, **104**(1), 19–31.
- [114] Singh R. S. and Sooch B. S., 2009, High cell density reactors in production of fruits wine with special reference to cider – an overview, *Indian J. Nat. Prod. Resour.*, 8(4), 323–333.
- [115] Taylor R.F. and Schultz J.S., 1996, *Handbook of Chemical and Biological Sensors*, CRC Press, Boca Raton.
- [116] Yang Y., Zhao W., He J., Zhao Y., Ding F. and Gu X., 2011, Nerve conduits based on immobilization of nerve growth factor onto modified chitosan by using genipin as a crosslinking agent, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 79(3), 519–525.
- [117] Ramakrishna S.V. and Prakasham R.S., 1999, Microbial fermentations with immobilized cells, *Curr. Sci.*, 77(1), 87–100.
- [118] Buwalda S.J., Boere K.W.M., Dijkstra P.J., Feijen J., Vermonden T. and Hennink

W.E., 2014, Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials, *J. Control. Release*, **190**, 254–273.

- [119] Oyen M. L., 2013, Mechanical characterisation of hydrogel materials, *Int. Mater. Rev.*, 59(1), 44–59.
- [120] Peppas N.A., Hilt J.Z., Khademhosseini A. and Langer R., 2006, Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology, *Adv. Mater.*, 18(11), 1345–1360.
- [121] Ganji F., Vasheghani-Farahani S. and E. Vasheghani-Farahani, 2010, Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review, **19**(5), 375–398.
- [122] Tecon R. and Van Der Meer J.R., 2008, Bacterial biosensors for measuring availability of environmental pollutants, *Sensors*, **8**(7), 4062–4080.
- [123] Xu X. and Ying Y., 2011, Microbial biosensors for environmental monitoring and food analysis, *Food Rev. Int.*, **27**(3), 300–329.
- [124] Jin R. and Dijkstra P.J., 2010, Hydrogels for Tissue Engineering Applications, *Biomed. Appl. Hydrogels Handb.*, **23**, 203–225.
- [125] Gibas I. and Janik H., 2010, Review : Synthetic Polymer Hydrogels for Biomedical, *Chem. Technol.*, **4**(4) 297–304.
- [126] Ahmed E.M., 2015, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *J. Adv. Res.*, **6**(2), 105–121.
- [127] Ullah F., Othman M.B.H., Javed F., Ahmad Z. and Akil H.M., 2015, Classification, processing and application of hydrogels: A review, *Mater. Sci. Eng. C*, **57**, 414–433.
- [128] De Jong S.J., Van Eerdenbrugh B., Van Nostrum C.F., Kettenes-van den Bosch J.J. and Hennink W.E., 2001, Physically crosslinked dextran hydrogels by stereocomplex formation of lactic acid oligomers: Degradation and protein release behavior, J. Control. Release, 71(3), 261–275.
- [129] R. Fazel, 2011, Biomedical Engineering Frontiers and Challenges, InTech, Croatia.
- [130] Akhtar M.F., Hanif M. and Ranjha N.M., 2016, Methods of synthesis of hydrogels...A review, *Saudi Pharm. J.*, **24**(5), 554–559.
- [131] Nguyen Q.V., Huynh D.P., Park J.H. and Lee D.S., 2015, Injectable polymeric hydrogels for the delivery of therapeutic agents: A review, *Eur. Polym. J.*, **72**, 602–619.
- [132] Thakur V.K. and Thakur M.K., 2015, Recent advances in green hydrogels from lignin: A review, *Int. J. Biol. Macromol.*, **72**, 834–847.
- [133] Baroli B., 2004, Photopolymerization in drug delivery, tissue engineering and cell encapsulation: issue and potentialities, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **81**(4), 491–499.
- [134] Kolb H.C., Finn M.G. and Sharpless K.B., 2001, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angew. Chemie Int. Ed.*, **40**(11), 2004–2021.
- [135] Uliniuc A., Popa M., Hamaide T. and Dobromir M., 2012, New approaches in hydrogel synthesis-click chemistry: a review., *Cellul. Chem. Technol.*, **46**(1–2), 1–11.
- [136] Mather B.D., Viswanathan K., Miller K.M., and Long T.E., 2006, Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies, *Prog. Polym. Sci.*, 31(5), 487–531.

- [137] Tortora M., Cavalieri F., Chiessi E. and Paradossi G., 2007, Michael-type addition reactions for the in situ formation of poly(vinyl alcohol)-based hydrogels, *Biomacromolecules*, **8**(1), 209–214.
- [138] Moreira Teixeira L.S., Feijen J., Van Blitterswijk C.A., Dijkstra P.J. and Karperien M., 2012, Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering, *Biomaterials*, 33(5), 1281–1290.
- [139] Jaya M. and Vivek Kumar S., 2014, Cross-linking in Hydrogels A Review, Am. J. Polym. Sci., 4(2), 25–31.
- [140] Yalpani M., 1988, *Polysaccharides, Syntheses, Modifications and Structure/Property Relations*, Elvesier Science Publishers, Canada.
- [141] Yokoyama F., Masada I., Shimamura K., Ikawa T. and Monobe K., 1986, Morphology and structure of highly elastic poly(vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting, *Colloid Polym. Sci.*, **264**(7), 595–601.
- [142] Hennink W.E. and van Nostrum C.F., 2012, Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, pp. 223–236.
- [143] Pawar S.N. and Edgar K.J., 2012, Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications, *Biomaterials*, **33**(11), 3279–3305.
- [144] Augst A.D., Kong H.J. and Mooney D.J., 2006, Alginate hydrogels as biomaterials, *Macromol. Biosci.*, **6**(8), 623–633.
- [145] Hasnain M.S., Nayak A.K., 2019, Alginates Versatile Polymers in Biomedical Applications and Therapeutics, Apple Academic Press, Florida.
- [146] Cheetham P.S.J., Blunt K.W. and Bocke C., 1979, Physical Studies on Cell Immobilization Using Calcium Alginate Gels, *Biotechnol. Bioeng.*, **21**(12), 2155–2168.
- [147] Smidsrod O. and Skja G., 1990, Alginate as immobilization matrix for cells, *Rev. Philos. Psychol.*, **8**, 71–78.
- [148] Prevost H. and Divies C., 1992, Cream fermatation by a mixed culture of Lactococci entrapped in two-layer calcium alginate gel beads, *Biotechnol. Lett.*, **14**(7) 583–588.
- [149] Lee K. and Heo T.R., 2000, Survival of Bifidobacterium longum Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution, *Society*, 66(2), 869–873.
- [150] Meena K. and Raja T.K., 2006, Immobilization of Saccharomyces cerevisiae cells by gel entrapment using various metal alginates, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 22(6), 651–652.
- [151] Pourjavadi A., Sadeghi M. and Hosseinzadeh H., 2004, Modified carrageenan. 5. Preparation, swelling behavior, salt-and pH-sensitivity of partially hydrolyzed crosslinked carrageenan-graft-polymethacrylamide superabsorbent hydrogel, *Polym. Adv. Technol.*, **15**(11), 645–653.
- [152] Necas J. and Bartosikova L., 2013, Carrageenan: A review, Vet. Med. (Praha)., 58(4), 187–205.
- [153] Ghanbarzadeh M., Golmoradizadeh A. and Homaei A., 2018, Carrageenans and carrageenases: versatile polysaccharides and promising marine enzymes, *Phytochem. Rev.*, 17(3), 535–571.
- [154] Osuga J., Mori A., 1984, Acetic acid production by immobilized Acetobacter aceti

cells entrapped in a k-carrageenan gel, *Journal of fermentation technology*, **62**(2), 139-149.

- [155] Luong J.H.T., 1985, Cell immobilization in κ-carrageenan for ethanol production, *Biotechnol. Bioeng.*, 27(12), 1652–1661.
- [156] McHugh D.J., 1991, Worldwide distribution of commercial resources of seaweeds including Gelidium, *Hydrobiologia*, **221**(1), 19–29.
- [157] Stephen A.M., Phillips G.O. and Williams P.A, Alginates, 2016, in "Food Polysaccharides and Their Applications," Chap. 9, (Draget K.I., Moe S. T., Skjak-Bræk G. and Smidsrod O.), CRC Press, Boca Raton.
- [158] Brodelius P. and Nilsson K., 2002, Entrapment of plant cells in different matrices, *FEBS Lett.*, **122**(2), 312–316.
- [159] Corona-González R.I., Miramontes-Murillo R., Arriola-Guevara E., Guatemala-Morales G., Toriz G. and Pelayo-Ortiz C., 2014, Immobilization of Actinobacillus succinogenes by adhesion or entrapment for the production of succinic acid, *Bioresour. Technol.*, 164, 113–118.
- [160] Zhu H., Suzuki T., Tsygankov A.A., Asada Y. and Miyake J., 1999, Hydrogen production from tofu wastewater by Rhodobacter sphaeroides immobilized in agar gels, *Int. J. Hydrogen Energy*, **24**(4), 305–310.
- [161] Quinn F.X., Hatakeyama T., Yoshida H., Takahashi M. and Hatakeyama H., 1993, The conformational properties of gellan gum hydrogels, *Polym. Gels Networks*, 1(2), 93– 114.
- [162] P. E. Jansson, B. Lindbe, and P. A. Sandfor, 1983, Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by Pseudomonas elodea, *Carbohydrate research*, **124**(1), 135–139.
- [163] Oliveira J.T., Martins L., Picciochi R., Malafaya P.B, Sousa R.A., Neves N.M. and Reis R.L., 2010, Gellan gum: A new biomaterial for cartilage tissue engineering applications, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **93**(3), 852–863.
- [164] Sanderson G.R., Bell V.L. and Ortega D., 1990, A comparison of gellan gum, agar, k-carrageenan, and algin, *Cereal foods world*, **34**(12), 991-994.
- [165] Camelin I., Lacroix C., Paquin C., Prévost H., Cachon R. and Divies C., 1993, Effect of Chelatants on Gellan Gel Rheological Properties and Setting Temperature for Immobilization of Living Bifidobacteria, *Biotechnol. Prog.*, 9(3), 291–297.
- [166] Nag A., Han K.S. and Singh H., 2011, Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum, *Int. Dairy J.*, **21**(4), 247–253.
- [167] Moslemy P., Neufeld R.J. and Guiot S.R., 2002, Biodegradation of gasoline by gellan gum-encapsulated bacterial cells, *Biotechnol. Bioeng.*, **80**(2), 175–184.
- [168] Chattopadhyay S. and Raines R. T., 2014, Review collagen-based biomaterials for wound healing, *Biopolymers*, 101(8), 821–833.
- [169] Lee C.H., Singla A. and Lee Y., 2001, Biomedical Applications of collagen, *Int. J. Pharm.*, **221**, 1–22.
- [170] Antoine E.E., Vlachos P.P.P., and Rylander P.M.N., 2014, Review of Collagen I Hydrogels for Bioengineered Tissue Microenvironments: Characterization of Mechanics, Structure, and Transport, *Tissue Engineering Part. B*, 20(6), 683–696.

- [171] Kaya T., Nagamine K., Oyamatsu D., Shiku H., Nishizawa M. and Matsue T., 2003, Fabrication of microbial chip using collagen gel microstructure, *Lab Chip*, 3(4), 313–317.
- [172] Karube I., Kuriyama S., Matsunaga T. and Suzuki S., 1980, Methane production from wastewaters by immobilized methanogenic bacteria, *Biotechnol. Bioeng.*, 22(4), 847– 857.
- [173] Stolarzewicz I., Biaecka-Florjañczyk E., Majewska E. and Krzyczkowska J., 2011, Immobilization of Yeast on Polymeric Supports, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 25(1), 135– 144.
- [174] Smith E.A. and Oehme F. W., 1991, Acrylamide and Polyacrylamide: A Review of Production, Use, Environmental Fate and Neurotoxicity, *Rev. Environ. Health*, 9(4), 215–228.
- [175] Yurke B., 2004, Mechanical Properties of a Reversible, DNA-Crosslinked Polyacrylamide Hydrogel, *J. Biomech. Eng.*, **126**(1), 104.
- [176] White G.F. and Thomas O.R.T., 1990, Immobilization of the surfactant-degrading bacterium Pseudomonas C12B in polyacrylamide gel beads: I. Effect of immobilization on the primary and ultimate biodegradation of SDS, and redistribution of bacteria within beads during use, *Enzyme Microb. Technol.*, **12**(9), 697–705.
- [177] Vecchio A., Finoli C., Di Simine D., and Andreoni V., 1998, Heavy metal biosorption by bacterial cells, *Fresenius. J. Anal. Chem.*, **361**(4),338–342.
- [178] Chih C.C., Szu K.T. and Hsien K.H., 1999, Hydrogenotrophic denitrification with immobilized Alcaligenes eutrophus for drinking water treatment, *Bioresour. Technol.*, 69(1), 53–58.
- [179] Tucker M.D., Barton L.L. and Thomson B.M., 1998, Reduction of Cr, Mo, Se and U by Desulfovibrio desulfuricans immobilized in polyacrylamide gels, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 20(1), 13–19.
- [180] Gyles D.A., Castro L.D., Silva J.O.C. and Ribeiro-Costa R.M., 2017, A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations, *Eur. Polym. J.*, **88**, 373–392.
- [181] Isaka K., Date Y., Sumino T. and Tsuneda S., 2007, Ammonium removal performance of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria immobilized in polyethylene glycol gel carrier: Anammox bacteria immobilized in gel carrier, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76(6), 1457–1465.
- [182] Sumino T., Nakamura H., Mori N. and Kawaguchi Y., 1992, Immobilization of nitrifying bacteria by polyethylene glycol prepolymer, J. Ferment. Bioeng., 73(1), 37– 42.
- [183] Jiang S., Liu S. and Feng W., 2011, PVA hydrogel properties for biomedical application, J. Mech. Behav. Biomed. Mater., 4(7), 1228–1233.
- [184] El-Naas M.H., Al-Muhtaseb S.A. and Makhlouf S., 2009, Biodegradation of phenol by Pseudomonas putida immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel, J. Hazard. Mater., 164(2–3), 720–725.
- [185] Pattanapipitpaisal P., Brown N.L. and Macaskie L.E., 2001, Chromate reduction by Microbacterium liquefaciens immobilised in polyvinyl alcohol, *Biotechnol. Lett.*, 23(1), 61–65.

- [186] Bezbradica D., Obradovic B., Leskosek-Cukalovic I., Bugarski B. and Nedovic V., 2007, Immobilization of yeast cells in PVA particles for beer fermentation, *Process Biochem.*, 42(9), 1348–1351.
- [187] Lai Y.C. and Baccei L.J., 1991, Novel polyurethane hydrogels for biomedical applications, *J. Appl. Polym. Sci.*, **42**(12), 3173–3179.
- [188] Jianlong W., 2000, Production of citric acid by immobilized Aspergillus niger using a rotating biological contactor (RBC), *Bioresour. Technol.*, **75**(3), 245–247.
- [189] Dong X.Y., Bai S., and Sun Y., 1996, Production of L(+)-Lactic acid with Rhizopus Oryzae immobilized in polyurethane foam cubes, *Bioresour. Technol.*, **18**(2), 225–228.
- [190] Falamarzian M. and Varshosaz J., 1998, The effect of structural changes on swelling kinetics of polybasic/hydrophobic pH-sensitive hydrogels, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 24(7), 667–669.
- [191] Bromberg L.E. and Ron E.S., 1998, Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery, *Advansed drug delivery reviews*, 31(3), 197–221.
- [192] Kono K. and Imanishi Y., 1989, An insulin-releasing system that is responsive to glucose, *Journal of controlled release*, **10**, 195–203.
- [193] Mamada A., Tanaka T. and Irie M., 1990, Photoinduced phase transitions of gels, *Macromolecules*, **23**, 1517–1519.
- [194] Zhong X., Wang Y. and Wang S., 1996, Pressure dependance of the volume phase-transition of temperature-sensitive gels, *Chemical engineering science*, **51**(12), 3235–3239.
- [195] Peppas N.A., Keys K.B., Torres-Lugo M. and Lowman A.M., 1999, Poly(ethylene glycol)-containing hydrogels in drug delivery, *Journal of controlled release*, **62**, 81–87.
- [196] West J.L. and Hubbell J.A., 1995, Reactive polymers Photopolymerized hydrogel materials for drug delivery applications, *Science*, **25**, 139–147.
- [197] Nguyen K.T. and West J.L., 2002, Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications, *Biomaterials*, **23**(22), 4307–4314.
- [198] Gobin A.S., Schmedlen R.H., Tsai A.T., West J.L. and Mann B.K., Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: synthetic ECM analogs for tissue engineering, *Biomaterials*, 22(22), 3045–3051, 2002.
- [199] Liu L.S., Kost J., Yan F. and Spiro R.C., 2012, Hydrogels from biopolymer hybrid for biomedical, food, and functional food applications," *Polymers*, **4**(2), 997–1011.
- [200] Liu L.S., Liu C.K., Fishman M.L. and Hicks K.B., 2007, Composite films from pectin and fish skin gelatin or soybean flour protein, *J. Agric. Food Chem.*, **55**(6), 2349–2355.
- [201] Jang E., Son K.J., Kim B. and Koh W.G., 2010, Phenol biosensor based on hydrogel microarrays entrapping tyrosinase and quantum dots, *Analyst*, **135**(11), 2871–2878.
- [202] Wong L.S., Lee Y.H. and Surif S., 2013, Whole Cell Biosensor Using Anabaena torulosa with Optical Transduction for Environmental Toxicity Evaluation, J. Sensors, 2013, 1–8.
- [203] Rhodes M. E., 2009, The Characterization of Pseudomonas fluorescens, J. Gen. Microbiol., 21(1), 221–263.

- [204] Sivasakthi S., Usharani G. and Saranraj P., 2014, Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-Pseudomonas fluorescens and Bacillus subtilis: A review, *African J. Agric. Res.*, **9**(16), 1265–1277.
- [205] Canales A., Pareilleux A., Rols J.L., Goma G. and Huyard A., 1994, Decreased sludge production strategy for domestic wastewater treatment, *Water Sci. Technol.*, 30(8), 97– 106.
- [206] Simpson M.L., Sayler G.S., Applegate B.M., Ripp S., Nivens D.E., Paulus M.J., and Jellison Jr G.E., 1998, Bioluminescent-bioreporter integrated circuits form novel whole-cell biosensors, *Trends in Biotechnology*, 16(8), 332–338.
- [207] Khan M.W.A. and Ahmad M., 2006, Detoxification and bioremediation potential of a Pseudomonas fluorescens isolate against the major indian water pollutants, *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.*, **41**(4), 659–674.
- [208] Scales B.S., Dickson R.P., LiPuma J.J. and Huffnagle G.B., 2014, Microbiology, genomics, and clinical significance of the Pseudomonas fluorescens species complex, an unappreciated colonizer of humans, *Clin. Microbiol. Rev.*, **27**(4), 927–48.
- [209] J. M. Meyer and M. A. Abdallah, 2009, The Fluorescent Pigment of Pseudomonas fluorescens: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties, J. Gen. Microbiol., 107(2), 319–328.
- [210] Philson S.B. and Llinás M., 1982, Siderochromes from Pseudomonas fluorescens. I. Isolation and characterization., *J. Biol. Chem.*, **257**(14), 8081–8085.
- [211] Linget C., Azadi P., MacLeod J.K., Dell A. and Abdallah M.A., 1992, Bacterial siderophores: the structures of the pyoverdins of Pseudomonas fluorescens ATCC 13525, *Tetrahedron Lett.*, 33(13), 1737–1740.
- [212] Chiadò A., Varani L., Bosco F. and Marmo L., 2013, Opening study on the development of a new biosensor for metal toxicity based on pseudomonas fluorescens pyoverdine, *Biosensors*, **3**(4), 385–399.
- [213] Trögl J., Ripp S., Kuncova G., Sayler G.S., Churava A., Parik P. and Kubicova L., 2005, Selectivity of whole cell optical biosensor with immobilized bioreporter Pseudomonas fluorescens HK44, *Sensors Actuators, B Chem.*, **107**(1), 98–103.
- [214] Santacruz G., Bandala E.R. and Torres L.G., 2005, Chlorinated pesticides (2,4-D and DDT) biodegradation at high concentrations using immobilized Pseudomonas fluorescens, J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes, 40(4), 571–583.
- [215] Abouseoud M., Yataghene A., Amrane A. and Maachi R., 2008, Biosurfactant production by free and alginate entrapped cells of Pseudomonas fluorescens, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 35(11), 1303–1308.
- [216] Deligios M., Fraumene C., Abbondio M., Mannazzu I., Tanca A., Addis M.F. and Uzzau S., 2015, Draft genome sequence of Rhodotorula mucilaginosa, an opportunistic pathogen, *Genome Announc.* 3(2), 4–5.
- [217] Libkind D., Gadanho M., Van Broock M. and Sampaio J.P., 2008, Studies on the heterogeneity of the carotenogenic yeast Rhodotorula mucilaginosa from Patagonia, Argentina, *J. Basic Microbiol.*, **48**(2), 93–98.
- [218] Oh J., Jeong H. and Oh S., 2009, Characterization of optimal growth conditions and carotenoid production of strain Rhodotorula mucilaginosa HP isolated from larvae of Pieris rapae, *Entomol. Res.*, 39(6), 380–387.

- [219] Cheng Y.T. and Yang C.F., 2016, Using strain Rhodotorula mucilaginosa to produce carotenoids using food wastes, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, **61**, 270–275.
- [220] Zheng C., Zhou J., Qu B., Lu H. and Zhao H., 2009, Aerobic degradation of nitrobenzene by immobilization of Rhodotorula mucilaginosa in polyurethane foam, J. *Hazard. Mater.*, 168(1), 298–303.
- [221] Mironowicz A. and Siewinski A., 1986, Biotransformations. XIX. Reduction of some terpenic ketones by means of immobilized cells of rhodotorula mucilaginosa, *Acta Biotechnol.*, **6**(2), 141–146.
- [222] Wu Q., Zhao Y., Wang D. and Xu Y., 2013, Immobilized Rhodotorula mucilaginosa: A novel urethanase-producing strain for degrading ethyl carbamate, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 171(8), 2220–2232.
- [223] Fu M.L., Liu J., Chen Q.H., Liu X.J., He G.Q. and Chen J.C., 2010, Determination of ethyl carbamate in Chinese yellow rice wine using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 45(6), 1297– 1302.
- [224] Gan H.M., Thomas B.N., Cavanaugh N.T., Morales G.H., Mayers A.N., Savka M.A. and Hudson A.O., 2017, Whole genome sequencing of Rhodotorula mucilaginosa isolated from the chewing stick (Distemonanthus benthamianus): insights into Rhodotorula phylogeny, mitogenome dynamics and carotenoid biosynthesis, *PeerJ*, **5**, e4030.
- [225] Qin X.H., Gruber P., Markovic M., Plochberger B., Klotzsch E., Stampfl J. and Liska R., 2014, Enzymatic synthesis of hyaluronic acid vinyl esters for two-photon microfabrication of biocompatible and biodegradable hydrogel constructs, *Polymer Chemistry*, 5(22), 6523–6533.
- [226] Sobel J.D., Myers P.G., Kaye D. and Levison M.E., 1981, Adherence of candida albicans to human vaginal and buccal epithelial cells, *J. Infect. Dis.*, **143**(1), 76–82.
- [227] Foschia R., Jobin M. and Hengsberger S., 2009, Local dynamic mechanical analysis, *Micron*, **40**(1), 51–55.
- [228] Rieger J., 2001, Glass transition temperature Tg of polymers comparison of the values from differential thermal analysis (DTA, DSC) and dynamic mechanical measurements (torsion pendulum)," *Polym. Test.*, **20**(2), 199–204.
- [229] J. D. Menczel and R. B. Prime, 2009, Thermal analysis of polymers, Wiley, Canada.
- [230] Khonakdar H.A., Morshedian J., Wagenknecht U. and Jafari S.H., 2003, An investigation of chemical crosslinking effect on properties of high-density polyethylene, *Polymer*, 44(5), 4301–4309.
- [231] Chen J., Park H. and Park K., 1999, Synthesis of superporous hydrogels: Hydrogels with fast swelling and superabsorbent properties, *J. Biomed. Mater. Res.*, 44(1), 53–62.
- [232] Vicari P., 2018, Intrappolamento di microrganismi in idrogeli fotoreticolati per biosensoristica, Tesi di laurea, Politecnico di Torino.
- [233] Yong-Seok C., Ki-Hyun K., Dong-Gyun K., Hee Joong K., Sang-Ho C. and Jong-Chan L., 2014, Synthesis and Characterization of Self-Cross- Linkable and Bactericidal Methacrylate Polymers Having Renewable Cardanol Moiety for Surface Coating Applications, R. Soc. Chem., 4(8), 41195–41203.
- [234] Smets B. F., Grasso D., Engwall M. A. and Machinist B. J., 1999, Surface

physicochemical properties of Pseudomonas fluorescens and impact on adhesion and transport through porous media, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, **14**(1–4), 121–139.

[235] Raply R. and Walker J.M., 2009, *Molecular biology and biotechnology*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.