

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria dei Materiali**

Tesi di Laurea Magistrale

Studio di nuovi idrogeli a base di gelatina fotopolimerizzabili



Relatore

prof. Marco Sangermano

Candidato

Domenico Di Battista

Dicembre 2019

Sommario

1.	Introduzione e scopo del lavoro.....	1
2.	La fotopolimerizzazione	3
2.1	Le reazioni di polimerizzazione	3
2.2	Fotopolimerizzazione per addizione radicalica	4
2.3	Fotoiniziatore e meccanismo di fotoiniziazione.....	5
2.4	Vantaggi e limiti della fotopolimerizzazione	8
3.	Stampa 3D.....	9
3.1	descrizione e principi	9
3.2	Stampa 3D basata sulla fotopolimerizzazione	9
3.3	Digital light processing DLP.....	10
4.	Gli idrogeli.....	12
4.1	Proprietà e comportamento	12
4.2	Idrogeli naturali.....	13
4.2.1	La gelatina	14
4.2.2	Produzione della gelatina di pesce	15
4.3	Idrogeli sintetici	16
4.4	Metodi di sintesi degli idrogeli.....	17
4.4.1	Reticolazione fisica.....	17
4.4.2	Reticolazione chimica	18
4.5	Idrogeli a base di PEG	21
5.	Materiali e metodi	23
5.1	Sintesi degli idrogeli.....	23
5.2	Caratterizzazione degli idrogeli	25
5.2.1	Fotoreologia.....	25
5.2.2	Spettroscopia FTIR-ATR.....	25
5.2.3	Calorimetria a scansione differenziale – DSC.....	26
5.2.4	%Gel.....	26
5.2.5	Swelling	26
5.2.6	Analisi termica dinamo-meccanica DMTA.....	27

5.2.7	SEM – EDX	27
5.2.8	Stampa 3D	27
6.	Raccolta dati e discussione dei risultati.....	28
6.1	Fotoreologia	30
6.2	%Gel.....	32
6.3	FTIR-ATR	33
6.4	SEM.....	38
6.5	Caratterizzazione termica e meccanica – DMTA & DSC.....	41
6.6	Swelling.....	45
6.7	Stampa 3D	47
7.	Conclusioni e sviluppi futuri	49
	BIBLIOGRAFIA	53

1. Introduzione e scopo del lavoro

Gli idrogeli sono materiali con proprietà viscoelastiche [1] costituiti da un *network* tridimensionale di polimeri idrofilici reticolati [2] mediante legami fisici o chimici, definiti *crosslink*. Questi sistemi possiedono la capacità di inglobare acqua in quantità pari a poche percentuali fino a migliaia di volte il proprio peso [3].

Questi materiali sono presenti in natura da quando la vita sulla terra si è evoluta. I componenti della matrice extracellulari, i biofilm batterici e le strutture delle piante sono sistemi rigonfiati dall'acqua presenti in natura. La gelatina e l'agar sono conosciuti per essere stati impiegati per diverse applicazioni nelle prime fasi della storia dell'uomo. La storia moderna degli idrogeli, invece, può essere tracciata con precisione [4]. Nel 1936 i ricercatori DuPont hanno pubblicato uno studio relativo a nuovi polimeri metacrilici, in cui è stato presentato il polidrossietilmetacrilato (pHEMA), definito come un polimero vetroso, fragile e caratterizzato da particolare durezza. Per questi motivi, il pHEMA non ha ricevuto particolare interesse da parte della comunità scientifica fino al 1960 [4]. In quell'anno, Lim e Wichterle pubblicano uno studio relativo alla polimerizzazione del idrossietilmetacrilato (HEMA) [5], con un agente reticolante in presenza di acqua e altri solventi. Il materiale sintetizzato non era un polimero fragile, bensì un gel morbido, rigonfiato dall'acqua, elastico e trasparente. La prima applicazione di questo materiale fu nel settore oftalmico, in particolare per la produzione di lenti a contatto [4]. Questa innovazione ha portato alla comparsa delle lenti a contatto flessibili e diretto la ricerca verso il settore degli idrogeli in campo biomedicale come lo conosciamo oggi.

Lo scopo di questo lavoro di tesi consiste nella sintesi e la caratterizzazione di una nuova tipologia di idrogelo ibrido fotopolimerizzabile composto da PEGDA e gelatina, reticolato chimicamente.

Il PEGDA è un polimero ampiamente conosciuto ed utilizzato nell'ambito dei biomateriali, in particolare nella sintesi degli idrogeli grazie alla sua spiccata idrofilicità e alla sua biocompatibilità. Anche la gelatina, polimero naturale, è molto studiata in questo settore per la sintesi di idrogeli sia fisici (degradabili), grazie alle sue capacità intrinseche di gelazione, sia chimici (permanenti), con preventiva funzionalizzazione (un esempio molto utilizzato in questo senso consiste nella metacrilazione).

In questo lavoro di tesi, invece, la gelatina viene utilizzata senza preventiva modificazione, ma sfruttando la presenza di gruppi amminici per l'impiego come coinziatore in presenza di camforchinone. L'idrogelo viene quindi sintetizzato mediante un processo di fotopolimerizzazione radicalica, a partire da una formulazione acquosa composta da un pre-polimero, il polietilenglicole diacrilato (PEGDA), un iniziatore, il canforchinone, e da un coinziatore, la gelatina della pelle dei pesci.

Il canforochinone assorbe all'interno della regione di spettro della luce visibile. L'assorbimento porta alla formazione di uno stato eccitato della molecola, che evolve nella formazione di un radicale con

un meccanismo di tipo Norrish II, per cui, il radicale tende a strappare idrogeni da una molecola vicina. Generalmente, per aumentare l'efficienza del canforochinone vengono accoppiati composti contenenti ammine, possibilmente terziarie, a cui possano essere estratti gli idrogeni. L'ambizione è che sia la gelatina a svolgere il ruolo di donatore di idrogeni, data la presenza di gruppi amminici lungo le catene polipeptidiche che la costituiscono, e che venga incorporata chimicamente all'interno del reticolo.

Gli idrogeli sintetizzati sono stati caratterizzati sia da un punto di vista chimico-fisico, sia meccanico. Tramite analisi fotoreologiche è stata analizzata l'influenza del sistema iniziatore-gelatina sul tempo di inizio della formazione del reticolo e sulla sua cinetica. Con la stessa analisi è stato possibile valutare anche il comportamento meccanico del sistema, potendo osservare l'andamento del modulo conservativo G' durante la fotopolimerizzazione.

Test di %gel hanno dato la possibilità di valutare l'efficienza della fotopolimerizzazione, permettendo di valutare la quantità di materiale non coinvolta nel processo, quindi non legata chimicamente all'interno del reticolo. Sono state svolte le analisi spettroscopiche FTIR per valutare l'effettiva conversione dei gruppi funzionali interessati nella formazione del reticolo e per evidenziare la presenza della gelatina al suo interno.

Le prove di rigonfiamento (swelling) sono state effettuate per valutare la quantità di acqua che questi sistemi riescono ad inglobare. L'influenza della presenza della gelatina su temperature caratteristiche del polimero, come la temperatura di transizione vetrosa (T_g), è stata osservata con i test di scansione calorimetrica differenziale (DSC) ed analisi dinamo-termomeccaniche (DMTA).

La parte conclusiva del lavoro di tesi è relativa alla sintesi dell'idrogelo mediante stampa 3D, utilizzando una stampante di tipo DLP (Digital Light Processing).

Questo lavoro di tesi è organizzato in 5 capitoli. Il capitolo 2 è dedicato alla fotopolimerizzazione, con una parte iniziale introduttiva relativa ai processi di polimerizzazione in generale, per poi approfondire i vari stadi che sono coinvolti nella fotopolimerizzazione. Inoltre, vengono illustrati i sistemi fotoiniziatori che rendono possibile il processo, con particolare menzione per il camforochinone. Il capitolo si conclude con un'illustrazione dei vantaggi e degli svantaggi relativi al processo di sintesi utilizzato. Il capitolo 3 è relativo alla stampa 3D con un'introduzione generale e illustrazione di tutte le possibili tecniche, per poi approfondire il Digital Light Processing, oggetto di questo lavoro di tesi. Il capitolo 4 è dedicato agli idrogeli, iniziando con una descrizione del comportamento di questi materiali e passando per una classificazione. Viene illustrata nel dettaglio la gelatina e il suo processo di produzione. La seconda parte del capitolo è relativa ai metodi di sintesi degli idrogeli sia fisici che chimici. Inoltre, vengono brevemente presentati gli idrogeli smart ed un approfondimento relativo agli idrogeli fotoreticolabili a base di PEG. Il capitolo 5 è dedicato alla descrizione dei materiali utilizzati, dai parametri selezionati e metodologie per la sintesi e caratterizzazione dei materiali prodotti. Il capitolo 6 mostra i risultati conseguiti nella fase sperimentale. Nel capitolo finale vengono discussi i principali risultati ottenuti ed esposti possibili sviluppi futuri per l'approfondimento delle ricerche oggetto di questo lavoro di tesi.

2. La fotopolimerizzazione

2.1 Le reazioni di polimerizzazione

La polimerizzazione è una reazione in cui i monomeri vengono convertiti in polimeri [6]. I meccanismi con cui avviene la polimerizzazione possono essere divisi in due famiglie: per condensazione e per addizione. La polimerizzazione per condensazione si realizza con monomeri che possiedono gruppi funzionali come -COOH , -COOR , -COOOC- , COCl , -OH , -NH_2 , -CHO e -NCO [6]. L'avanzamento della reazione, dunque la crescita delle catene, avviene per successivi stadi di condensazione, attraverso l'unione di due molecole e l'eliminazione di una molecola di piccole dimensioni (condensato). La polimerizzazione per addizione è relativa ai monomeri che possiedono doppi legami o strutture ad anello e può procedere con un meccanismo di tipo radicalico, cationico oppure anionico, dipende dalla natura del monomero [6]. La natura dei reagenti determina le caratteristiche finali del materiale polimerizzato. Se i monomeri/oligomeri sono monofunzionali il materiale che si ottiene è un termoplastico, in cui le catene sono lineari o poco ramificate e che quindi interagiscono tra loro attraverso legami di tipo secondario (legami idrogeno, forze di Van Der Waals). Invece i sistemi polifunzionali danno origine a materiali che sono detti termoindurenti, in cui le catene sono legate tra di loro con legami chimici, che conferiscono infusibilità e insolubilità al materiale [7].

La fotopolimerizzazione è un processo di polimerizzazione specifico addizione attivato tramite l'irraggiamento di una formulazione reattiva con una radiazione di tipo luminoso, come raggi UV, IR, luce visibile, ma anche radiazioni ad elevata energia come raggi γ e fasci di elettroni [8]. All'interno del sistema reagente devono essere presenti molecole in grado di assorbire la radiazione e dare origine a specie reattive che possano innescare la reazione di polimerizzazione [7]. Le specie reattive possono essere radicali, cationi, oppure anioni. La formulazione reattiva è generalmente composta da monomeri oppure oligomeri, un fotoiniziatore e da additivi che dipendono dall'applicazione [9].

Nonostante la fotopolimerizzazione radicalica sia la più diffusa e utilizzata nei processi industriali, la polimerizzazione cationica ha ricevuto un forte interesse negli ultimi anni [10]. Infatti, la polimerizzazione cationica offre diversi vantaggi rispetto a quella radicalica, limitata a monomeri che possiedono doppi legami olefinici, mentre quella cationica è estesa a composti di diversa natura, come epossidi o gruppi vinileteri [10]. Inoltre, la polimerizzazione cationica non viene inibita dalla presenza dell'ossigeno, al contrario di quella radicalica, fattore che permette la sintesi di film più spessi. La polimerizzazione cationica invece necessita di un ambiente privo di umidità, che porta alla terminazione della reazione [10]. La polimerizzazione anionica non è sviluppata quanto le precedenti [10], ma si possono citare come esempio studi condotti sulla polimerizzazione di cianoacrilati [11]. Nel paragrafo successivo viene illustrata più dettagliatamente la fotopolimerizzazione per addizione radicalica, in quanto oggetto di questo lavoro di tesi.

2.2 Fotopolimerizzazione per addizione radicalica

Da quasi mezzo secolo la fotopolimerizzazione radicalica è alla base di molte applicazioni comuni, come coating, adesivi, inchiostri, lastre fotografiche e microelettronica. Meno conosciute ma non meno interessanti sono le applicazioni che questo processo trova nei laserdisc, otturazioni dentali e nella stampa 3D. In altri settori questo processo è tutt'ora oggetto di studi, per esempio nel campo dei biomateriali per ingegneria tissutale, microchip, resine ottiche, polimeri fotosensibili, cristalli liquidi, network interpenetranti, microlenti, multilayer o funzionalizzazioni superficiali [9].

Nella fotopolimerizzazione è l'energia fornita da un fascio di luce che dissocia le molecole dell'iniziatore per generare molecole eccitate, che poi evolvono nello stato di radicali liberi. Quest'ultimi, reagiscono con i doppi legami presenti all'interno del monomero o del pre-polimero [12].

Il meccanismo della fotopolimerizzazione per addizione radicalica è rappresentato in figura 1.1. Il primo stadio del processo viene descritto dalle reazioni di iniziazione (1), (2) e (3), in cui la radiazione luminosa $h\nu$ viene assorbita da parte del fotoiniziatore I, che genera i radicali $R\bullet$. Il radicale reagisce con il monomero/oligomero/pre-polimero, producendo il radicale $P_1\bullet$. Lo stadio successivo, detto di propagazione, consiste nell'accrescimento radicale $P_n\bullet$, che reagirà con i monomeri presenti nella formulazione, portando all'aumento del peso molecolare della catena. Lo stadio finale, di terminazione, viene rappresentato da due reazioni possibili: la (5) illustra la situazione nel quale due catene polimeriche in crescita si incontrano; reagendo tra loro possono formare un'unica catena, di dimensioni pari alla somma delle due al momento della reazione, oppure possono formare due catene polimeriche separate. La (6) invece, illustra la reazione tra la catena polimerica $P_n\bullet$ che reagisce con il radicale $R\bullet$ dato dal fotoiniziatore, che porta a terminazione la crescita della catena polimerica. Il modo in cui avviene la reazione di terminazione influisce sul peso molecolare finale nel caso di un polimero lineare, mentre nella polimerizzazione di sistemi reticolati questo fattore non è così significativo [13].

Iniziazione:



Propagazione:



Terminazione:



2.3 Fotoiniziatore e meccanismo di fotoiniziazione

Un fotoiniziatore è definito come una molecola o una combinazione di molecole che, una volta assorbita una radiazione luminosa, sono in grado di iniziare la polimerizzazione [14]. Sebbene dia il nome a tutto il processo, il ruolo che la luce svolge nella fotopolimerizzazione radicalica è ristretto al primo passaggio, cioè all'assorbimento e generazione delle specie iniziatrici. Quindi, nonostante il basso contenuto di iniziatore all'interno della formulazione fotopolimerizzabile, il fotoiniziatore gioca un ruolo da assoluto protagonista nel processo [10]. Lo spettro di assorbimento del fotoiniziatore è un fattore chiave. Infatti, deve essere compatibile con lo spettro di emissione della sorgente della radiazione. Il fotoiniziatore deve avere diverse caratteristiche: buona solubilità o compatibilità con il monomero/oligomero/per-polimero, buona stabilità, bassa tossicità, elevata reattività e non deve influire sulle proprietà finali del materiale polimerizzato [15].

Il sistema che dà inizio alla fotopolimerizzazione consiste in almeno un fotoiniziatore. Molto spesso, un coiniziatore, uno scavenger o un fotosensibilizzante vengono aggiunti alla formulazione. Il sistema fotopolimerizzante così costituito deve portare alla formazione dei radicali che possono così iniziare la polimerizzazione.

Un fotoiniziatore è generalmente una molecola organica, una volta che viene irraggiata dalla luce, la molecola passa dal suo stato fondamentale S_0 ad uno stato eccitato, di singoletto S_1 , in cui l'elettrone promosso allo stato eccitato non ha variato il suo spin elettronico. Lo stato di singoletto evolve in uno stato di tripletto T_1 tramite una conversione intersistema, in cui si ha l'inversione di spin elettronico. Lo stato di tripletto evolve a sua volta con la formazione del radicale, che potrà iniziare la polimerizzazione [15].

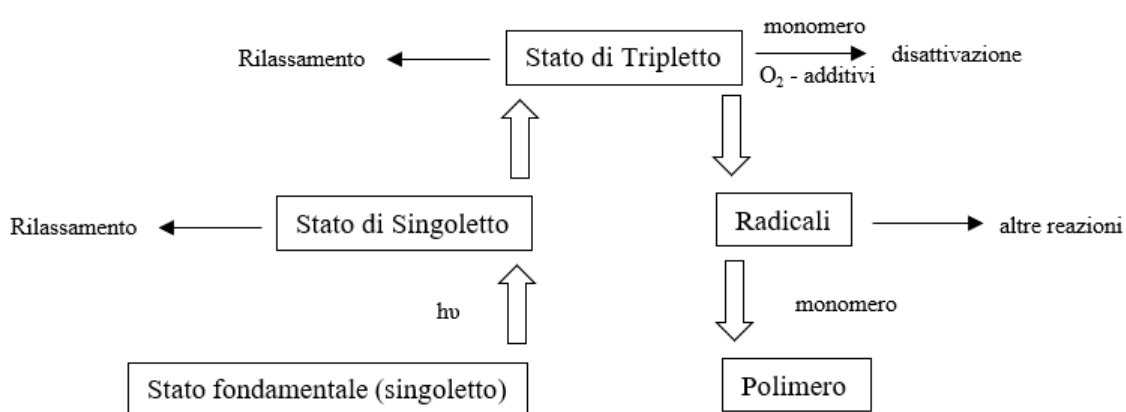


Figura 1: stadi dell'evoluzione della molecola di iniziatore dopo l'assorbimento di energia dalla radiazione incidente [16].

La molecola, dallo stato di tripletto, può evolvere in un radicale attraverso un meccanismo di scissione (tipo Norrish I), oppure con estrazione di idrogeno (tipo Norrish II) [10]. I fotoiniziatori di tipo Norrish I a seguito dell'eccitazione da parte della radiazione luminosa si scindono in modo omolitico, generando così da un'unica molecola, due radicali. Ne sono esempi gli eteri benzilici, perossidi e gli idrossifenilchetoni [15].

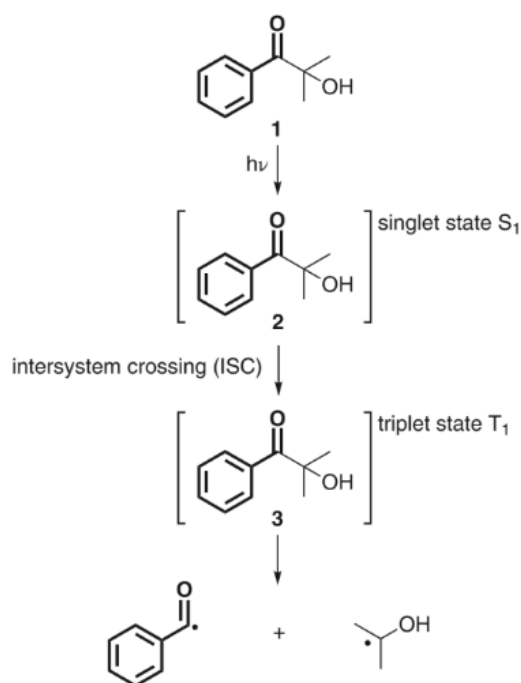


Figura 2: meccanismo di generazione di radicali con meccanismo di tipo Norrish I di un idrossifenilchetone [17].

I fotoiniziatori di tipo Norrish II generano radicali dall'interazione tra la molecola di iniziatore, allo stato di tripletto, e una molecola in grado di comportarsi da donatore di idrogeni (coiniziatore). Questi composti possono essere alcoli, esteri o tioli [17]. Tuttavia, le ammine risultano le più efficienti nel ruolo di donatori di idrogeni. In particolare, le ammine terziarie alifatiche, come la dimetiletanolammina o la trietanolanmina, sono state ampiamente utilizzate come coiniziatori, rimpiazzate tutt'oggi dalle ammine aromatiche, che sono più efficienti e meno volatili di rispetto a quelle alifatiche [17]. Ne sono esempi il canforochinone e i benzonfenoni [15].

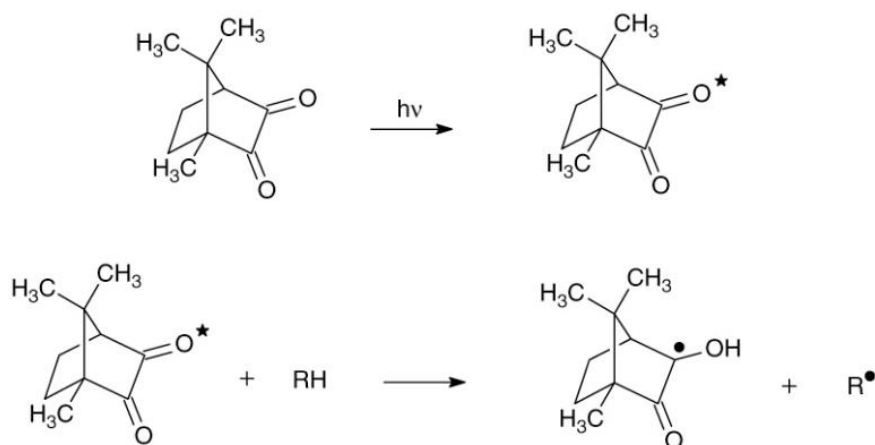


Figura 3: meccanismo di generazione dei radicali di tipo Norrish II del camforchinone [18].

In questo lavoro di tesi il fotoiniziatore utilizzato è il canforochinone, che appartiene alla categoria dei composti α -dichetoni alifatici [19]. Rientrando tra i fotoiniziatori di tipo Norrish II, una volta irraggiato forma una specie reattiva con l'eccitazione e complessazione di un coiniziatore, a cui segue un trasferimento elettrone-protone intermolecolare. Generalmente, il coiniziatore è un'ammina terziaria [20].

Il canforochinone ha un picco di assorbimento nella regione del visibile, per cui è ampiamente utilizzato in tutti quei settori in cui è obbligatoria una sorgente che emette in questa regione dello spettro, come per esempio nel settore dentale [12]. L'efficienza del fotoiniziatore però da solo è insufficiente, ma se accoppiato con ammine, generalmente terziarie, che svolgono un *ruolo* di elettrone/protone donatori o come agenti riducenti, costituisce un sistema molto performante. Infatti, i gruppi amminici ad esso accoppiati possiedono un potenziale di ossidazione più basso rispetto ad altri sistemi capaci di comportarsi da donatore di idrogeni; per questo motivo la reazione tra canforochinone ed ammina è favorita dal meccanismo che porta al trasferimento di un elettrone e di un protone [19]. Questa combinazione è molto utilizzata per la reticolazione di formulazioni metacriliche nel settore dentale.

Se il canforochinone viene inserito nella formulazione a concentrazioni troppo elevate l'effetto non è quello di aumentare la fotoreattività del sistema, bensì di diminuirla. Questo è dovuto all'effetto schermante, che favorisce lo spegnimento dei radicali formati anziché la crescita delle catene all'interno del sistema. Un altro limite è rappresentato dalla sua bassa solubilità in acqua, che ne restringe i campi di utilizzo, soprattutto per la formazione di idrogeli. Risulta dunque obbligatorio solubilizzarlo in opportuni solventi [19].

2.4 Vantaggi e limiti della fotopolimerizzazione

Diversi sono i vantaggi legati alla fotopolimerizzazione: la temperatura alla quale può avvenire il processo è assolutamente vantaggiosa, in quanto può realizzarsi a temperatura ambiente rispetto alla polimerizzazione iniziata per via termica. Un altro vantaggio legato alla temperatura del processo è che le reazioni indesiderate, come il trasferimento di catena, sono molto meno probabili nella fotopolimerizzazione rispetto a quella iniziata termicamente, in cui risultano molto più frequenti. Questo permette l'ottenimento di strutture polimeriche stereospecifiche, come i polimeri sindiotattici, che sono invece difficili da sintetizzare con polimerizzazioni iniziate per via termica. Un altro aspetto in cui la fotopolimerizzazione risulta vincente rispetto a quella termica si evidenzia quando si utilizzano monomeri con una bassa temperatura di *plafond*. Questi monomeri necessitano di processi a basse temperature, in caso contrario la depolimerizzazione domina sulla polimerizzazione. Vi sono settori in cui non è possibile applicare temperature elevate, il caso del settore dentale ne è un esempio, in cui vengono preferite formulazioni che induriscono per irraggiamento, possibilmente di luce visibile. L'energia totale richiesta per la fotopolimerizzazione risulta inferiore rispetto a quella termica ed è inoltre a minor impatto ambientale data la possibilità di essere svolta priva di solventi [12].

Vi sono anche dei limiti di questo processo, tra cui di grande importanza è l'azione inibitrice dell'ossigeno presente nell'aria, che limita lo spessore dei film sintetizzabili. Per aumentarne lo spessore, dunque, occorre utilizzare atmosfere inerti [12]. Un altro limite, che influisce anch'esso sulla dimensione del materiale ottenibile con questo processo, consiste nel fatto che l'intensità della radiazione non è costante lungo lo spessore della formulazione. Infatti, vi è un gradiente di intensità che risulta maggiore là dove la radiazione incide la formulazione, diminuendo con l'allontanarsi dalla superficie. Il gradiente di intensità risulta in un gradiente di conversione dei gruppi reattivi, per cui la polimerizzazione non risulta uniforme percorrendo lo spessore del materiale [21].

3. Stampa 3D

3.1 descrizione e principi

La stampa 3D, o Additive Manufacturing, consiste in un processo controllato da computer che realizza un prodotto strato dopo strato. Le istruzioni dell'oggetto da produrre vengono fornite alla stampante mediante un modello 3D, cioè un file creato con CAD (Computer Aided Design). L'oggetto viene sezionato in migliaia di livelli che vengono inviati alla stampante 3D tramite un file di comando che dirige il processo di stampa [22]. Dunque, è una tecnologia unica dal punto di vista della versatilità, che permette la fabbricazione di oggetti tridimensionali altamente personalizzabili, destinati a svariati campi di applicazione [23], come la soft robotic [24], l'ingegneria tissutale [25-27], la sintesi di matrici polimeriche conduttive per sensori di pressione [28], nel settore elettronico per la produzione di circuiti flessibili [29].

Al momento, esistono differenti tecnologie che rientrano all'interno della stampa 3D, tra cui l'estrusione di materiale fuso (FDM/FFF), la deposizione di energia diretta (il materiale viene fuso tramite un fascio ad elevata energia), le polveri solidificate (con fusione/unione di particelle, SLS), la fotopolimerizzazione (solidificazione del polimero dallo stato liquido: SLA, DLP e 2PP) e la laminazione di fogli (incollaggio di fogli, LOM) [22].

3.2 Stampa 3D basata sulla fotopolimerizzazione

La stampa 3D basata sulla fotopolimerizzazione consiste in un indurimento, strato dopo strato, di una resina foto-indurente da una sorgente UV/visibile. Le tecniche di stampa 3D che sfruttano la fotopolimerizzazione sono la stereolitografia SLA, il Digital Light Processing DLP, la stampa a 2 fotoni 2PP e il processo Continuous Liquid Interface Polymerization CLIP [22]. SLA e DLP sono le tecniche più diffuse commercialmente, differiscono tra di loro per la tipologia di sorgente luminosa e per alcune particolarità del processo [30].

La produzione di oggetti tramite stereolitografia consiste in una solidificazione localizzata di una resina attraverso la fotopolimerizzazione. Utilizzando un fascio controllato da computer o un proiettore digitale di luce, con una piattaforma di crescita guidata da computer, viene illuminata la superficie della resina in modo selettivo. Dunque, la resina solidifica fino ad uno spessore definito, causandone l'adesione alla piattaforma. Dopo la polimerizzazione del primo strato, la piattaforma si allontana dalla superficie, in modo che il primo strato reagito venga ricoperto da nuova resina liquida. Quindi viene irraggiato il secondo strato. Per garantire una buona adesione al primo strato

la profondità della polimerizzazione deve essere più grande della distanza che la piattaforma percorre tra lo strato precedente ed il successivo, così che avvenga la reazione dei gruppi funzionali non reagiti nel primo strato. La ripetizione della polimerizzazione, strato dopo strato, con l'abbassamento della piattaforma, porta alla formazione dell'oggetto. Generalmente, la conversione dei gruppi reattivi non è totale, per cui viene effettuato un trattamento di ulteriore fotopolimerizzazione (sotto luce UV), per migliorarne le proprietà meccaniche [31].

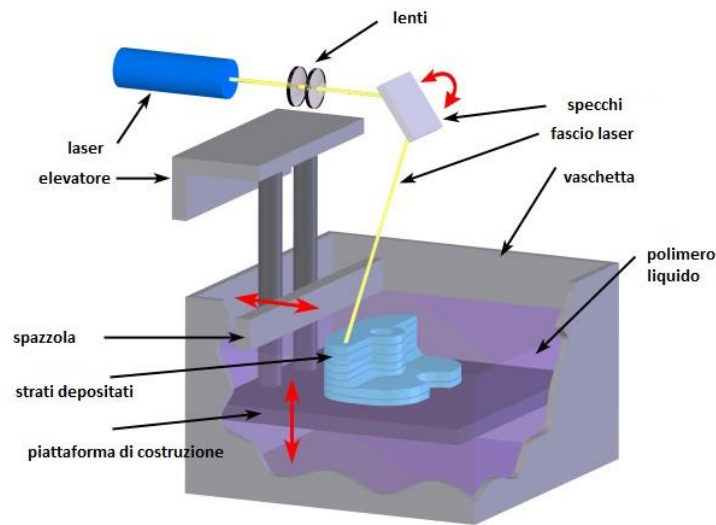


Figura 4: schema dell'apparato per la stereolitografia.

3.3 Digital light processing DLP

La tecnica nota come DLP (digital light processing) è schematizzata in **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.** La formulazione viene inserita all'interno di una vaschetta basculante, che ha la base trasparente. La piattaforma di crescita, che può scorrere nella direzione Z di crescita del materiale, si trova al di sopra della vaschetta e viene fatta aderire ad essa. L'irraggiamento avviene grazie ad una sorgente posizionata al di sotto della vaschetta, andando a colpire il DMD (Digital Micromirror Device), che consiste in un sistema di microspecchi in grado di modulare il fascio verso la base della vaschetta in modo da fotopolimerizzare la formulazione secondo le informazioni geometriche dell'oggetto che si vuole realizzare, fornite tramite software. Dopo aver polimerizzato il primo layer, di spessore definito all'inizio della stampa e per un tempo prestabilito, la piattaforma si muove dal basso verso l'altro. In questo modo, la formulazione si infila nello spazio generato tra la piattaforma con agganciato il primo layer e la vaschetta. Dopodiché avviene la

fotopolimerizzazione del secondo layer. La successione di queste operazioni genera l'oggetto desiderato, che rimarrà agganciato alla piattaforma di crescita e risulterà con la base verso l'alto [32].

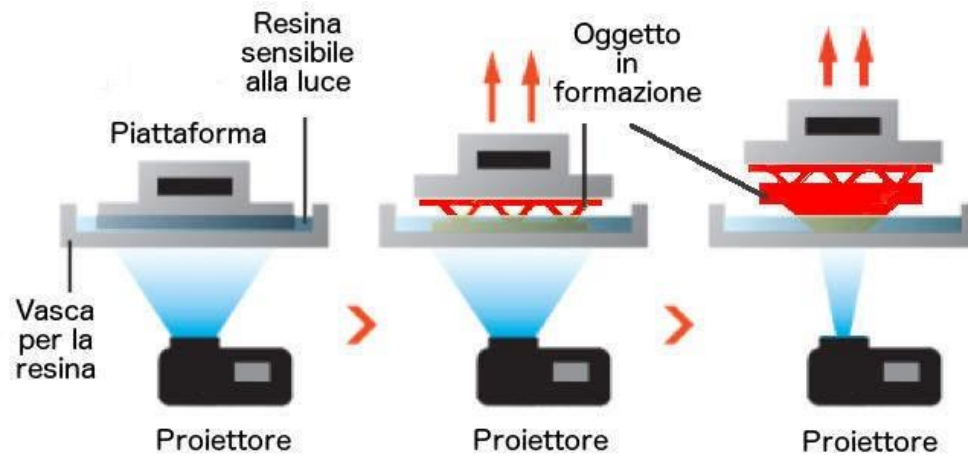


Figura 5: schema del Digital Light Processing (DLP).

4. Gli idrogeli

4.1 Proprietà e comportamento

Gli idrogeli sono costituiti da un network tridimensionale di molecole idrofile, in grado di inglobare grandi quantità di acqua, rigonfiandosi. Le unità ripetenti interagiscono con l'acqua tramite legami idrogeno, polari e ionici, permettendo così di inglobare quantità di acqua pari a diverse volte il peso iniziale del materiale stesso [33]. Questi materiali possono essere chimicamente stabili, oppure degradare ed eventualmente dissolversi; nel primo caso vengono definiti come idrogeli permanenti o chimici, caratterizzati da un network reticolato attraverso legami covalenti. Mentre nel secondo caso gli idrogeli vengono definiti reversibili o fisici, in cui il network è tenuto insieme da legami secondari (entanglements, legami idrogeno o forze idrofobe) [3].

La possibilità di essere realizzati, teoricamente, con qualsiasi polimeri idrosolubile, permette l'ottenimento di una vasta gamma di composizioni chimiche e proprietà fisiche. Inoltre, gli idrogeli possono essere sintetizzati in forme diverse, come lastre, microparticelle, nanoparticelle, coating e film. Per questo motivo sono ormai comunemente utilizzati nella pratica clinica, oppure nella medicina sperimentale per diversi campi di applicazione, come ingegneria tissutale e medicina rigenerativa, diagnostica, immobilizzazione cellulare, separazione di biomolecole o cellule, come materiale barriera per regolare l'adesione biologica [2].

Quando un idrogelo inizia ad assorbire acqua, le prime molecole entrano all'interno del network idratando i gruppi con maggiore affinità all'acqua, questa quantità viene definita "primary bound water". Dopo aver interagito con i gruppi polari il reticolo rigonfia, esponendo così i gruppi idrofobi che interagiscono a loro volta con le molecole d'acqua. Questa quantità viene definita "secondary bound water". Dopo che è avvenuta l'interazione tra l'acqua e i gruppi idrofili ed idrofobi, il network continua ad assorbire acqua che tende a portare a diluizione infinita il reticolo. Ad opporsi, i crosslink chimici o fisici presenti tra le catene. Il risultato di queste due forze opposte è il raggiungimento di un equilibrio ad un certo valore di rigonfiamento del reticolo, in cui si avrà un bilanciamento tra le forze di espansione del solvente, che porta all'abbassamento dell'entalpia del sistema, e le forze elastiche di contrazione del reticolo [1]. Sebbene sia i gruppi idrofili che idrofobi siano ormai saturi, vi è un'ulteriore quantità di acqua che viene inglobata, definita come free water o bulk water, che va a riempire lo spazio libero tra le catene [3]. Le capacità di rigonfiamento degli idrogeli è attribuito alla presenza di gruppi idrofilici (-OH, CONH₂, SOH₃) principalmente, e dipende da fattori come la struttura del reticolo e dal grado di reticolazione. Un elevato grado di rigonfiamento è dato da elevati pesi molecolari medi dei polimeri, che determina una bassa densità di crosslink. La struttura chimica del polimero determina il rapporto tra le specie idrofile e idrofobe [1].

La classificazione degli idrogeli può essere basata su diversi criteri, come l'origine del materiale che lo costituisce (sintetica, naturale e semi-sintetica), o la morfologia (particelle, polveri, sfere, membrane, fibre ed emulsioni), oppure il metodo di sintesi (graft-polymerization, crosslinking), o anche in base alla risposta del materiale dall'ambiente in cui si trova (idrogeli smart) [1].

Nel paragrafo successivo viene illustrata la classificazione in base alla natura del polimero che costituisce l'idrogelo.

4.2 Idrogeli naturali

Sono considerati idrogeli naturali quelli composti da polimeri esistenti in natura (e.g. cellulosa e chitosano). I polimeri naturali hanno solitamente caratteristiche di biocompatibilità, inerzia chimica, biodegradabilità e, in alcuni casi, funzioni biologiche specifiche [34], presentando spesso una buona citocompatibilità ed altri vantaggi rispetto ai polimeri sintetici, che li rendono molto appetibili per le applicazioni in campo biomedico, per esempio nella produzione di scaffold nell'ingegneria tissutale. La maggior parte dei polimeri naturali possiede inoltre dei siti reattivi che permettono la reticolazione ed altre modificazioni che danno la possibilità di funzionalizzare in un'ampia varietà di modi il materiale. I polimeri naturali sono principalmente basati sulle proteine e i polisaccaridi, data la loro abbondanza [35]. Le proteine utilizzate per la sintesi di idrogeli sono il collagene [36, 37], la gelatina [38], la fibrina [39, 40] e la seta [41]. Ci sono idrogeli formati dalla combinazione di proteine e polisaccaridi, detti idrogeli ibridi, come l'accoppiamento tra la gelatina e l'acido ialuronico [42], oppure tra la gelatina e il chitosano [43], o anche tra la fibrina e alginato [44].

Il collagene è il polimero derivato dai tessuti più utilizzato, è la componente principale della matrice extracellulare dei tessuti dei mammiferi, tra cui pelle, ossa, cartilagini, tendini e legamenti. È stato utilizzato per la sintesi di idrogeli fisici, dunque reversibili, sia idrogeli chimici, attraverso agenti che promuovono la reticolazione chimica, come la glutaraldeide [45] o la metacrilammide [46]. Il collagene possiede diverse caratteristiche che lo rendono interessante per la sintesi di scaffold o di pelli artificiali; la sua combinazione di amminoacidi viene riconosciuta dalle cellule che lo degradano attraverso gli enzimi. Inoltre, l'adesione cellulare è ottima, ma può essere alterata nel caso di modificazioni chimiche. La principale criticità legata agli idrogeli di collagene è la loro bassa resistenza, anche nel caso di quelli chimici [47]. Gli idrogeli di collagene sono stati utilizzati per la ricostruzione del fegato [48], di vasi sanguigni [49] e della pelle [50].

L'acido ialuronico è uno dei componenti delle matrici extracellulari e svolge un ruolo importante nelle guarigioni delle ferite [47]. Può essere utilizzato per la sintesi di idrogeli grazie ai crosslink promossi da composti come i derivati dell'idrazide. Viene degradato dalle cellule e possiede notevoli potenzialità per essere utilizzato come pelle artificiale [51] o per impianti intradermici [52]. L'acido ialuronico deve essere però purificato in modo ottimale, per evitare la trasmissione di malattie. Inoltre, gli idrogeli a base di acido ialuronico possiedono basse proprietà meccaniche [47].

L'idrogelo di fibrina viene prodotto dalla polimerizzazione enzimatica del fibrinogeno a temperatura ambiente, in presenza di trombina. Possiede il grande vantaggio che può essere sintetizzato direttamente dal sangue del paziente. La sua biocompatibilità lo rende assolutamente un materiale di rilievo in questo settore. Tuttavia, la fibrina possiede basse proprietà meccaniche, che sono necessarie perché possa essere di supporto alle cellule, che possono essere migliorate tramite l'uso di agenti reticolanti, che però sono spesso citotossici, quindi restringendone le possibilità di utilizzo [53].

Il chitosano è un polisaccaride derivato dalla chitina, non solubile a pH neutri a causa della presenza di molti gruppi amminici. Lo è però in soluzioni acide, fattore che limita le applicazioni del chitosano. Per questo, numerosi studi sono stati effettuati per la sua funzionalizzazione [54]. In campo biomedico è di interesse per la sua biocompatibilità, biodegradabilità e il suo effetto batteriostatico (capace di limitare/inibire la replicazione batterica). Inoltre, ha un ruolo attivo nella crescita e rigenerazione dei tessuti, promuovendo l'incremento dell'attività degli osteoblasti nella produzione del collagene ed avendo un'azione emostatica. Questi sono tutti aspetti cruciali nel campo dell'ingegneria tissutale [55]

4.2.1 La gelatina

La gelatina è un derivato del collagene, prodotta dalla rottura della sua struttura a tripla elica in molecole a singolo filamento [45]. La conversione idrolitica del collagene dà origine a molecole di massa variabile. Pertanto, la gelatina non è considerabile come un'unica entità chimica, ma una miscela di frazioni composte da amminoacidi, legati da legami peptidici, per formare polimeri con massa molecolare che varia da 15000 a 400000 Da [56].

La composizione chimica della gelatina è ben nota da più di mezzo secolo, grazie a studi dedicati, come il lavoro di Eastoe [57], che attraverso una separazione cromatografica a scambio ionico ha permesso la separazione dei costituenti del collagene. Gli amminoacidi che compongono il collagene sono 19, legati tra di loro in una sequenza parzialmente ordinata. A seconda del processo produttivo della gelatina, l'amminoacido predominante è l'alanina o la glicina, che costituiscono da un terzo fino alla metà degli amminoacidi residui [47]. La gelatina ottenuta dai pesci contiene notevoli quantità di serina e treonina rispetto ai mammiferi terrestri [47, 57].

Le proprietà fisico-chimiche della gelatina dipendono dall'ambiente in cui l'animale o il pesce vive e da cosa si nutre, dalle proprietà intrinseche del collagene da cui deriva, ma anche dalla metodologia di preparazione. Esistono infatti due modi per ottenerla: uno prevede l'utilizzo di una soluzione di alcali, mentre l'altro è un trattamento in soluzione acida [58].

La gelatina di pesce è ampiamente accettata da tutte le religioni e culture, a differenza di quella bovina, e non è affetta dal rischio di encefalopatia spongiforme bovina, comunemente conosciuta come morbo della mucca pazza. La pelle dei pesci costituisce il principale scarto dell'industria che

si occupa della trasformazione del pesce, inoltre, è anche un inquinante. Per cui, il suo utilizzo permetterebbe di ridurre l'impatto ambientale [59].

L'utilizzo mondiale di gelatina è di 200000 tonnellate per anno [58], quantità che si preveda raggiunga più di 500000 tonnellate nel 2024 [56]. Il 63% del totale è impiegato nel settore alimentare: formatore di gel nei dolci gelificati e confetture, agente montante nei marshmallow o nei torroni, colloide protettivo per confetture e nei gelati, agente legante nei formaggi e latticini, agente chiarificante nella birra, nel vino e nella frutta, formatore di film nei rivestimenti per la frutta e per le carni, addensante nelle bevande in polvere, sciroppi e zuppe, inoltre viene sfruttata nei processi di incapsulamento di pigmenti, fragranze e vitamine, emulsionante nelle salse e nei prodotti di pasticceria, stabilizzante negli yogurt e nei dessert, agente adesivo per legare le glasse e per legare i condimenti alle carni [56]. Il 31% dell'utilizzo mondiale è rivolto al settore farmaceutico, in particolare per l'incapsulamento di farmaci, oppure utilizzata come legante per la produzione di compresse. Il restante 6% comprende settori come quello fotografico, in cui la gelatina svolge un ruolo protettivo per i Sali d'argento, oppure nei rivestimenti abrasivi svolge il ruolo di legante tra il substrato di carta e le particelle abrasive. Viene utilizzata anche nella stampa con lo scopo di proteggere il pigmento che viene impresso sulla carta [56]. Nonostante la vasta gamma di settori in cui l'utilizzo della gelatina è ormai consolidato, troviamo nuovi campi in cui la gelatina è molto utilizzata: per esempio nell'ingegneria tissutale, grazie alla sua biocompatibilità e la sua capacità di gelazione. Inoltre, viene utilizzata per il rilascio di fattori di crescita per promuovere la vascolarizzazione di nuovi tessuti ingegnerizzati. I gel prodotti a base di gelatina possiedono basse proprietà meccaniche, che possono essere migliorate con funzionalizzazioni chimiche [45].

4.2.2 Produzione della gelatina di pesce

Il processo produttivo della gelatina può essere descritto in forma generale (figura 4.1). Inizialmente, la pelle di pesce viene lavata con acqua fredda in modo da rimuovere tutto il materiale in eccesso con riduzione della taglia della pelle. In seguito, il trattamento con una soluzione di alcali diluita, con successivo lavaggio abbondante per rimuovere gli eccessi di acido o di alcali e neutralizzazione con soluzione di acido minerale diluito o di alcali. Il lavaggio prosegue fino a quando la pelle trattata non risulta neutra. La pelle così neutralizzata viene trattata con acido citrico, a cui segue un ulteriore lavaggio per neutralizzarla nuovamente. Quindi, la pelle viene immersa in acqua a 55°C, per solubilizzare il collagene parzialmente degradato. Per rimuovere le impurità, la soluzione contenente la gelatina solubilizzata viene filtrata con cellulosa e seguentemente deionizzata con una resina a scambio ionico. La soluzione viene fatta evaporare, raggiungendo concentrazioni tra il 15% e il 45%. La soluzione così concentrata viene sottoposta ad ulteriore filtrazione, in modo da rimuovere qualsiasi sostanza indesiderata, quindi sterilizzata a temperature intorno ai 135°C per 8-12 h, poi raffreddata. Infine, viene essiccata e miscelata per ottenere la polvere di gelatina [59].

4.3 Idrogeli sintetici

Gli idrogeli sintetici sono un'interessante alternativa agli idrogeli naturali. I polimeri che si prestano alla formazione di questi materiali possono essere ingegnerizzati al fine di ottenere proprietà più controllate. Solitamente i polimeri utilizzati presentano elevata affinità con l'acqua e degradano più lentamente dei polimeri naturali [35]. Tra i polimeri più utilizzati sono il poliidrossimetilmetacrilato (pHEMA) [60], il polivinil alcol (PVA) [61] e il glicole polietilenico (PEG) [62].

Gli idrogeli a base di PEG sono ampiamente utilizzati e studiati, grazie alla versatilità del PEG ed alla sua eccellente biocompatibilità [63], non immunogenicità e resistenza all'adsorbimento di proteine. I PEG di per sé non è reattivo, quindi viene funzionalizzato con gruppi reticolanti tramite diverse metodologie, come acrilati, tioli, ammine e gruppi carbossilici [64]. Questa categoria di idrogeli vengono approfonditi con un paragrafo dedicato (p.21).

Il pHEMA è un polimero di tipo acrilato, idrofilo, che possiede eccellente biocompatibilità [65]. Gli idrogeli sintetizzati sono caratterizzati da elevati valori di swelling ed una spiccata permeabilità all'ossigeno [60]. Lo studio di Hendrick *et al.* [65] propone un metodo per la sintesi *in situ* di un idrogelo composito di pHEMA con nanoparticelle di TiO_2 (anatasio). Lo scopo è quello di aumentare l'indice di rifrazione R del polimero che, a causa dell'elevato contenuto di acqua, risulta inferiore allo standard per la produzione di lenti intraoculari (IOL). Il risultato è un idrogelo con particelle di TiO_2 di dimensioni nanometriche, che risultano efficaci nell'aumentare l'indice di rifrazione. Dunque, grazie alla flessibilità data dal polimero, e dalle proprietà ottiche modulate con il contributo delle nanoparticelle, l'idrogelo pHEMA- TiO_2 è un materiale di interesse per la fabbricazione delle IOL.

Il PVA è un polimero semicristallino, idrofilo e biodegradabile. Deriva dall'idrolisi del polivinilacetato (PVAc) [66]. La sua facilità con cui può essere processato, insieme alla sua economicità [67], lo hanno portato in primo piano negli studi farmaceutici, in particolare come matrici per ingegneria tissutale [66]. Il PVA forma idrogeli per semplici cicli di gelo-disgelo in ambiente acquoso, senza l'utilizzo di nessun agente reticolante. Questo metodo per la sintesi di idrogeli a base di PVA può essere utilizzato per la sintesi di idrogeli con proprietà meccaniche che variano a seconda della zona del materiale considerata. In questo senso, lo studio di Tae Ho Kim *et al.* [66] ha condotto alla sintesi di un idrogelo di PVA che presenta un gradiente di modulo elastico G' . Nel lavoro è stato prodotto il materiale in forma cilindrica, con un'estremità a contatto con idrogeno liquido, in questa configurazione il campione è stato sottoposto a cicli di gelo-disgelo. Il risultato è un idrogelo che presenta un gradiente di cristallinità (massimo nella zona di contatto con l'idrogeno liquido e minimo nell'altra estremità). Un recente lavoro, di Wahab *et al.* [68], mostra le potenzialità di un idrogelo di PVA per la sintesi del cerchione glenoideo, anello fibro-cartilagineo presente nell'articolazione scapolo-omerale. Tramite diverse concentrazioni di soluzioni acquose di PVA, è stato ottenuto un idrogelo che presenta regioni con diversa rigidità, partendo da soluzioni di PVA con concentrazioni differenti, sottoposte allo stesso numero di cicli gelo-disgelo e poi messe a contatto per favorire la diffusione.

4.4 Metodi di sintesi degli idrogeli

La reticolazione è il processo in cui si formano legami tra le catene o tra due punti della stessa catena, che permette dunque la formazione degli idrogeli. A seconda della natura della reticolazione possiamo distinguere gli idrogeli fisici, in cui le catene interagiscono tra di loro mediante legami secondari, oppure gli idrogeli chimici, in cui la reticolazione tra le catene avviene tramite la formazione legami chimici e ionici [69].

4.4.1 Reticolazione fisica

- Legami idrogeno: in questo caso le forze secondarie intra ed intermolecolari sono in grado di costruire un reticolo stabile in condizioni ambientali. Ne sono esempi gli idrogeli formati dalla combinazione tra il polivinilpirrolidone (PVP), polimero molto studiato in campo biomedico grazie alla sua eccellente biocompatibilità con i tessuti e alla sua bassissima citotossicità, e il polietilenglicole (PEG), anch'esso di interesse date le sue proprietà fisico-chimiche e biologiche. L'interazione si realizza tra i gruppi carbonilici del PVP e il gruppo ossidrilico terminale del PEG [70, 71]. Lo studio di Liu *et al* [70] mette in evidenza l'influenza della densità dei crosslink sulla T_g del complesso formato dai due polimeri.
- Graffaggi anfifilici e copolimeri a blocchi: le capacità di autoassemblaggio di copolimeri a blocchi vengono sfruttate per la sintesi di idrogeli o di micelle polimeriche, in cui le parti idrofobe del polimero si autoassemblano. I copolimeri a blocchi possono contenere catene idrofobe graffate con segmenti idrofili, oppure polimeri solubili in acqua a cui sono legate catene idrofobe. Per esempio, copolimeri costituiti da polibutilentereftalato (PBT) e polietilenglicole (PEG) vengono utilizzati per la formazione di idrogeli fisici, dunque reversibili, in cui vi sono presenti domini di PBT, più resistenti, dispersi in una fase amorfa costituita da segmenti idrofili di PEG e PBT, che presentano caratteristiche meccaniche inferiori [72]. Variando il rapporto in peso tra i due polimeri si modificano le proprietà peculiari degli idrogeli, come i valori di rigonfiamento all'equilibrio, comportamento meccanico, permeabilità e cinetica di degradazione [73]. Diversi studi dimostrano come il copolimero PBT/PEG sia ben tollerato e non causi effetti sistemici oppure alterazione dei tessuti [74].

Il copolimero PLA/PEG si auto assembla in strutture supramolecolari in ambiente acquoso, per questo può essere utilizzato sia come nanoparticelle contenenti farmaci, sia come idrogeli o scaffold per l'ingegneria tissutale [75]. Si possono sintetizzare idrogeli dalla modificazione idrofoba dei polisaccaridi, per indurre l'auto assemblaggio in acqua, come nel caso del destrano [76].

- Crosslink mediante cristallizzazione: sfrutta la natura semicristallina di alcuni polimeri. L'applicazione di cicli di congelamento e scongelamento a soluzioni acquose di polivinilalcol

(PVA) permette l'ottenimento di gel con proprietà meccaniche migliore rispetto ad altre tecniche [77]. Gli idrogeli di PVA sono costituiti da una complessa struttura, che si caratterizza per zone in cui il polimero è più concentrato di altre. Infatti, la struttura presenta aggregati cristallini di micelle di PVA ed una fase amorfa, in cui le catene del polimero sono rigonfiate dal solvente. Il grado di cristallinità determina le proprietà finali dell'idrogelo. Un grado elevato di cristallinità riduce l'elasticità e ne aumenta la fragilità, mentre un grado basso di cristallinità rende l'idrogelo meno omogeneo ed appiccicoso [77]. La produzione di questi idrogeli avviene soltanto con acqua e polimero, che li rende compatibili *in vivo* [78].

- Crosslink mediante interazioni ioniche: i gruppi ionici presenti nella catena di base determinano la formazione di interazioni tra le catene polimeriche. L'acido alginico, per esempio, è un polisaccaride presente nelle pareti cellulari. I gruppi carbossilici presenti lungo la catena sono capaci di legarsi con una varietà di metalli multivalenti M^{n+} , formando così degli idrogeli in cui la natura dei crosslink è di tipo ionico. L'alginato di calcio è senza dubbio il più diffuso idrogelo ionico utilizzato nell'industria biomedica [79].

4.4.2 Reticolazione chimica

L'interesse verso gli idrogeli reticolati chimicamente è cresciuto, soprattutto negli ultimi anni, grazie alle proprietà fisiche superiori rispetto agli idrogeli reticolati fisicamente [69].

- Crosslink mediante aldeidi: la glutaraldeide è poco costosa, altamente reattivo ed è molto solubile in ambiente acquoso. Queste caratteristiche permettono che venga utilizzato come agente reticolante per la sintesi di idrogeli chimici. La reazione di reticolazione si realizza tra la glutaraldeide e i gruppi ossidrilici o amminici presenti sulla catena del polimero. Lo studio di Zu *et al.* [80] relativo al rilascio di insulina per la cura del diabete evidenzia l'efficienza del materiale transdermico, un idrogelo di PVA e chitosano reticolato con glutaraldeide. Un altro studio d'interesse nel campo biomedico è quello di Tian [81], in cui viene sintetizzato un idrogelo chimico a base di collagene con questo agente reticolante, che permette di ottenere proprietà meccaniche superiori.
- Crosslink da reazioni di condensazione: le reazioni tra gruppi -OH, -NH con gruppi COOH o derivati, porta alla formazione di poliesteri o poliammidi [69], che possono essere utilizzate nella sintesi di idrogeli.
- Crosslink mediante irradiazioni ad alta energia: fasci di elettroni ad alta energia inducono la reticolazione e la sterilizzazione in un singolo passaggio. Questo metodo risulta vantaggioso in quanto non è necessario l'utilizzo di un agente reticolante [82], né un catalizzatore o un additivi, che possono variare le proprietà in termini di biocompatibilità [83]. Un altro

vantaggio è la possibilità di controllo del grado di reticolazione e la dimensione dei pori presenti all'interno dell'idrogelo sono controllabili variando la durata dell'irraggiamento [83]. Questo metodo è comunemente utilizzato per la sintesi di idrogeli a base di PVA, di PEG e di acido acrilico [82]. I raggi γ costituiscono un'altra soluzione per la formazione di questi materiali [84] [85].

- Crosslink mediante polimerizzazione radicalica: gli idrogeli a base di acido ialuronico vengono spesso prodotti con una funzionalizzazione preliminare dell'acido, che interessa i gruppi -OH ed -COOH, utilizzando solventi organici o reagenti, spesso tossici [86], per ottenere una reticolazione chimica anziché fisica, che migliora le proprietà meccaniche finali dell'idrogelo. Il lavoro di Das *et al.* [87] consiste nella sintesi di un idrogelo a base di acido ialuronico attraverso la polimerizzazione radicalica. L'acido ialuronico viene inizialmente trattato con perossisolfato di potassio $K_2S_2O_8$, portando alla formazione dei radicali sulle catene dell'acido ialuronico. Il graffaggio del polimero naturale avviene con l'idrossietilacrilato (2-HEA), che conferisce elasticità. La reticolazione si realizza con l'aggiunta di polietilenglicole diacrilato (PEGDA) in tre quantità diverse a tre soluzioni di partenza uguali. Le differenti quantità di PEGDA aggiunto hanno portato alla formazione di idrogeli molto diversi in termini di resistenza, grado di rigonfiamento dall'equilibrio e porosità.
- Crosslink mediante attività enzimatica: l'utilizzo di enzimi al fine di catalizzare la reticolazione polimerica è molto interessante per la formazione di idrogeli iniettabili, che si formano *in situ*, possibile perché le condizioni delle reazioni enzimatiche sono adatte all'ambiente fisiologico. Inoltre, questo rende possibile l'iniezione tramite una siringa della formulazione che contiene i precursori, che gelificheranno in un secondo momento all'interno dell'organismo, senza la formazione di sostanze tossiche. Si possono sintetizzare sia idrogeli fisici che chimici, dipende dall'attività dell'enzima stesso. Per esempio, il gel di fibrina viene formato dall'attività enzimatica della trombina, che converte il fibrinogeno in fibrina (monomero). I monomeri polimerizzano formando le fibre di fibrina, reticolate fisicamente [88]. Un enzima che permette la formazione di idrogeli chimici è la perossidasi del rafano, che catalizza l'accoppiamento ossidativo tra fenoli in presenza di perossido di idrogeno (H_2O_2), che ha la funzione di generare i radicali fenolici. Variando quantità presente di H_2O_2 si variano le proprietà finali dell'idrogelo. Infatti, un contenuto maggiore risulta in un grado di reticolazione maggiore, quindi in un grado di rigonfiamento all'equilibrio inferiore [88].
- "Click chemistry": si tratta di un approccio innovativo alla chimica, che consiste nella formazione di molecole complesse da altre molto più semplici, imitando i processi naturali. Introdotta da Sharpless nel 2001 [89], ha permesso di semplificare i processi con cui ottenere le proprietà interessate, anziché strutture complesse. Questo nuovo modo di vedere i processi coinvolge diversi meccanismi. In particolare, quelli più indicati per la sintesi di

idrogeli, sono l'addizione di Michael e la cicloaddizione Diels-Adler [90]. L'addizione di Michael è una reazione di addizione di un nucleofilo, come gli anioni enolati, che sono definiti come donatori di Michael, ad un composto contenente un carbonile α - β insaturo, che svolgono il ruolo di accettori di Michael [91]. Questa reazione è di interesse nel campo degli idrogeli, in quanto le condizioni in cui si realizza sono ampiamente compatibili con l'ambiente fisiologico, senza la necessità di utilizzare composti tossici [92]. Inoltre, diversi polimeri e precursori sono compatibili con questa reazione, con alti tassi di conversione e di velocità del processo. Può essere impiegata per la sintesi di polimeri lineari, ramificati, dendritici e network polimerici [91]. La cicloaddizione Diels-Adler è generalmente catalizzata da Cu(I), per questo non è adatta alla sintesi degli idrogeli in situ. Recentemente, sono stati riportati studi sulla possibilità di realizzare queste reazioni in assenza di Cu(I), con risultati molto promettenti [63]. Un'applicazione delle reazioni click è presentata nel lavoro di Zhu *et al.* [93], che ha lo scopo di sintetizzare una resina fotoreticolabile tramite la reazione click tra il gruppo tiolo e il gruppo etilenico. Tramite questa tipologia di reazione permette l'ottenimento della resina in una metodologia che non prevede l'utilizzo di reagenti tossici, migliorando le proprietà meccaniche della resina, che può essere utilizzata come scaffold o come substrato per colture cellulari.

4.5 Idrogeli a base di PEG

Gli idrogeli a base di PEG vengono ampiamente utilizzati come matrici per il rilascio di farmaco e come mezzi per il rilascio di cellule, nell'ambito della rigenerazione di tessuti [63]. La versatilità del PEG [94], insieme alla sua eccellente biocompatibilità, ha permesso la sintesi di numerosi sistemi nel campo biomedico. Infatti, gli idrogeli a base di PEG forniscono un ambiente unico che permette di inglobare in modo ottimale le cellule, in quanto le condizioni di polimerizzazioni sono favorevoli [95]. Generalmente, questi sistemi fotoreticolabili sono formati da molecole di PEG funzionalizzati, come il polietilenglicole diacrilato (PEGDA) o il polietilenglicole dimetacrilato (PEGDMA) (Figura 6).

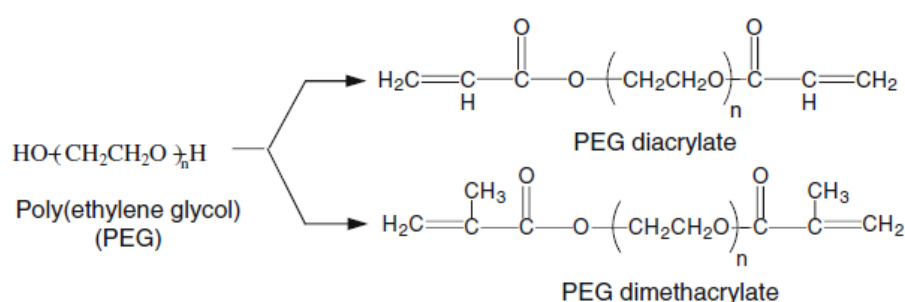


Figura 6: struttura molecolare del PEG e di due molecole funzionalizzate (PEGDA e PEGDMA) [63].

Il PEG può gelificare tramite diverse metodologie, sia per la sintesi di idrogeli fisici che chimici, con strutture relativamente stabili e con proprietà fisico-chimiche modulabili come la permeabilità, modulo, elasticità, contenuto di acqua all'equilibrio e velocità di degradazione [63]. Le reazioni di reticolazione del PEG sono principalmente basate sulla polimerizzazione radicalica, reazioni di condensazione e sulle reazioni click [64].

Il PEG presenta una spiccata idrofilicità, che lo rende unico nel panorama biomedico, in particolare per il rilascio di farmaci o incapsulamento per la crescita cellulare. In un PEG debolmente reticolato, il 95% della sua massa totale è costituita da acqua. L'alto contenuto di acqua lo rende molto simile ai tessuti naturali molli, creando così un ambiente adatto per molte biomolecole incapsulate, ma anche per le cellule. Per la rigenerazione di tessuti, offre un facile scambio tra nutrienti e scarto, fattore determinante per la sopravvivenza delle cellule nel lungo periodo [63].

I campi di applicazione e le possibilità di utilizzo possono essere ulteriormente ampliate se all'interno del reticolo vengono incorporati dei segmenti degradabili, come per esempio il PLA [96]. Questo dà la possibilità di poter modulare la degradazione dell'idrogelo, che è un fattore importante nella rigenerazione dei tessuti. In questo senso, l'idrogelo ibrido PLA/PEG/PLA studiato da Harrane [97], innovativo per l'anfifilicità dei pre-polimeri, presenta un tasso di degradazione tra 80% e 100% dopo sei mesi, adatto quindi alla rigenerazione dei tessuti.

Il PEGDA è un biomateriale fotopolimerizzabile assolutamente non tossico e facile da eliminare da parte del nostro organismo [98]. Gli idrogeli di PEGDA non supportano l'adesione cellulare e la loro proliferazione data la sua elevata inerzia chimica [99]. Per questo, il PEGDA è spesso usato in combinazione con polimeri naturali come collagene [100], gelatina [101] e chitosano [102].

Il lavoro di Wang *et al.* [101] consiste nella sintesi di un idrogelo ibrido GelMA/PEGDA. Gli idrogeli a base di gelatina mimano la matrice extracellulare e sono ottimi sotto un punto di vista biocompatibile, ma le proprietà meccaniche sono insufficienti. Per questo, la gelatina viene metacrilata. In questo caso, viene utilizzata l'anidride metacrilica per rendere la gelatina reticolabile (GelMA), dopodiché viene fatta avvenire la reticolazione mediante irraggiamento UV insieme ad un altro pre-polimero, il PEGDA. L'idrogelo ibrido prodotto viene confrontato con l'idrogelo di GelMA, con il risultato che le proprietà meccaniche sono a favore dell'idrogelo ibrido per diverse volte. Inoltre, l'idrogelo prodotto mostra una favorevole degradazione dopo 4 settimane.

La versatilità del PEGDA è utilizzata per la sintesi di sistemi fotoreticolabili non soltanto in campo biomedico. In questo senso, il lavoro di Ramendra K. *et al.* [103] propone la sintesi di un sistema composto dalla miscela polimerica PEDOT:PSS (polietilendiossitiolfene:polistirene solfonato) nota per le sue caratteristiche conduttive, inglobati in una matrice di PEGDA, reticolato mediante un processo di fotolitografia, completamente in fase acquosa. Il risultato è un sistema conduttivo composto da network interpenetranti, in cui un reticolo è quello di PEGDA e l'altro è quello della miscela conduttiva PEDOT:PSS, che possiede resistività, conduttanza e capacità di immagazzinare la carica elettrica molto promettenti. Questi idrogeli possono essere utilizzati come coating per elettrodi.

5. Materiali e metodi

5.1 Sintesi degli idrogeli

Il pre-polimero per la sintesi dell'idrogelo è il polietilenglicole diacrilato (PEGDA), con peso molecolare $M_n = 700$ g/mol, fornito da Sigma-Aldrich.

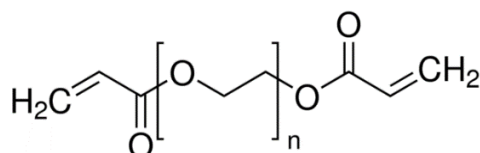


Figura 7: struttura del PEGDA.

La gelatina che deriva dalla pelle di pesce è solubile in acqua a temperatura ambiente, fornita da Sigma-Aldrich. La Figura 8 riporta un semplice schema della struttura chimica della gelatina.

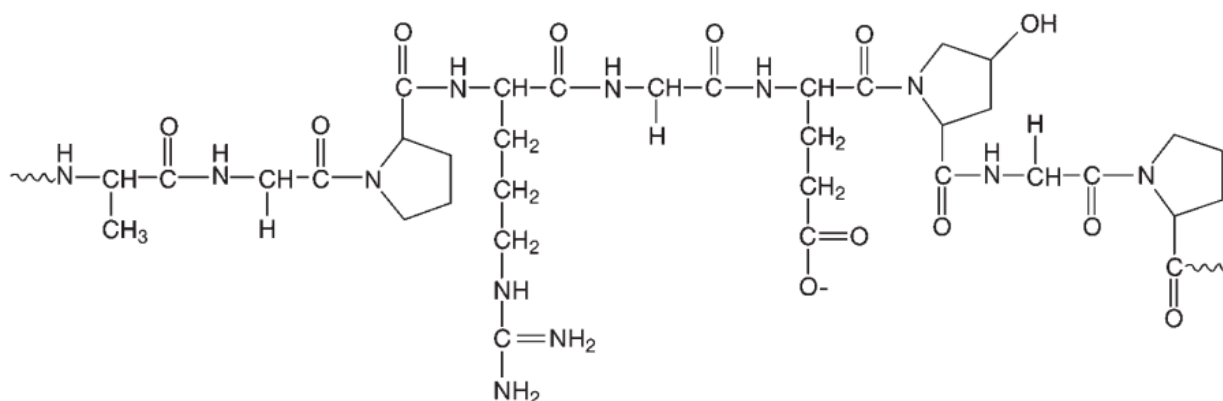


Figura 8: struttura chimica della gelatina [104].

Il fotoiniziatore selezionato è il canforochinone, uno dei sistemi fotosensibili attivi nel visibile più conosciuto e utilizzato, soprattutto nel settore dentale. La sua diffusione è dovuta soprattutto alla sua solubilità in una vasta gamma di resine metacriliche ed alla sua temperatura di conservazione [105]. Lo spettro di assorbimento del canforochinone presenta un picco di assorbimento nella regione del visibile: $\lambda_{\max} = 468$ nm [106].

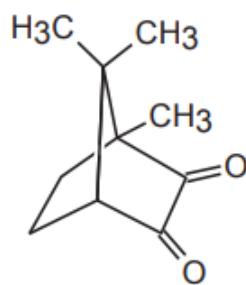


Figura 9: struttura del canforochinone [107].

La sintesi degli idrogeli passa attraverso la realizzazione della formulazione, che viene poi irradiata mediante luce visibile. Il primo passaggio per consiste nella solubilizzazione della gelatina in acqua distillata a 40°C. La soluzione viene lasciata in temperatura per 1h. Alla soluzione viene aggiunto, goccia a goccia, il PEGDA. La formulazione così formata viene lasciata ulteriormente ad agitare, sempre a 40°C. Il fotoiniziatore, prima di essere aggiunto alla formulazione, viene solubilizzato in etanolo (200 µl). Una volta disciolto il canforochinone, la soluzione viene aggiunta alla formulazione. L'insieme costituito viene oscurato, per impedire l'attivazione indesiderata della reazione di fotopolimerizzazione. L'irraggiamento della formulazione è svolto con la lampada Hamamatsu LC8 (15mW/cm²) per una durata di 15 min in atmosfera di Azoto.

La sintesi dei campioni parte da formulazioni uguali in peso all'interno di navicelle di polipropilene. Al fine di garantire più uniforme possibile la reticolazione ed omogeneo il sistema, a metà della durata dell'irraggiamento il campione è stato capovolto.

Le formulazioni sono state prodotte con differenti quantità di gelatina (

Tabella 1), mantenendo inalterato il rapporto tra PEGDA e acqua e la quantità di fotoiniziatore. Le quantità di gelatina vengono espresse in phr (per hundred rubber), riferito al quantitativo di PEGDA.

Nome campione	H ₂ O (%wt)	PEGDA (%wt)	CQ (phr*)	Gelatina (phr*)
PG - 5	65	35	2	5
PG - 10	65	35	2	10
PG - 15	65	35	2	15
PG - 30	65	35	2	30
PG - 50	65	35	2	50

Tabella 1: phr* riferito al peso di PEGDA.

5.2 Caratterizzazione degli idrogeli

Per una completa caratterizzazione fisico-chimica del materiale sintetizzato sono stati svolti test reologici e fotoreologici, analisi di spettroscopia FTIR in configurazione ATR, analisi DSC e test caratteristici per questa classe di materiali come prove di rigonfiamento (swelling) e di %gel. Inoltre, la superficie, la morfologia e la composizione chimica superficiale sono state analizzate mediante SEM.

5.2.1 Fotoreologia

I test di fotoreologia sono stati svolti con il reometro “Anton Paar MCR 302” in configurazione piatto-piatto. Questo tipo di reometro permette lo studio di sistemi fotosensibili tramite una base in vetro trasparente, al di sotto della quale è possibile installare la fibra che emette la radiazione. La sorgente di luce visibile è la lampada Hamamatsu LC8 (15mW/cm²). Il piatto superiore, di diametro pari a 25,00 mm, applica uno sforzo di taglio sulla formulazione durante la prova, svolta a temperatura ambiente. La distanza tra i due piatti è stata impostata in modo da formare film spessi 0,2mm. La frequenza angolare dello sforzo applicato è fissata a 10 rad/s, mentre l'ampiezza dello sforzo è pari al 5 %. Le prove sono state effettuate con l'irraggiamento che inizia dopo 1 min rispetto all'inizio dell'applicazione dello sforzo di taglio, registrando un punto al secondo.

I test di reologia permettono lo studio di sistemi che possiedono sia una componente elastica che una componente viscosa. Molti materiali, soprattutto biologici possiedono entrambe le proprietà, per questo vengono definiti materiali viscoelastici. Il reometro permette di separare la risposta elastica, in fase con lo stress applicato, dalla risposta viscosa, che invece possiede un certo ritardo di fase.

5.2.2 Spettroscopia FTIR-ATR

L'analisi spettroscopica degli idrogeli sintetizzati è svolta con lo strumento “FT-IR/ATR Thermo-Scientific™ Nicolet™ Smart iTX-Diamond”. I campioni prodotti vengono sottoposti ad essiccazione in stufa, sottovuoto, e quindi viene prelevata una sezione per la misura. Inoltre, per evidenziare la conversione dei gruppi coinvolti nella fotopolimerizzazione è stata analizzata anche una goccia prelevata da ogni formulazione iniziale.

5.2.3 Calorimetria a scansione differenziale – DSC

Le analisi DSC sono state svolte con lo strumento “TGA/DSC Mettler Toledo” su una porzione di ogni campione, del peso di circa 10 mg. L’intervallo di temperature in cui viene effettuato il test varia da -80°C a 120°C, con una rampa di temperatura di 10°C/min, in atmosfera inerte.

5.2.4 %Gel

Le prove %gel sono prove specifiche per questa categoria di materiali. I campioni sintetizzati vengono sottoposti a essiccazione in stufa, sottovuoto. Dopodiché, i campioni anidri vengono pesati prima del test e quindi immersi in acqua, a 40°C, per favorire la solubilizzazione della gelatina eventualmente non inglobata nel reticolo. La durata dell’immersione è di 24 h. I campioni vengono quindi seccati nuovamente, e poi ripesati. Viene infine effettuato un calcolo per determinarne la differenza di peso in termini percentuali (7), in cui W_f è il peso finale del campione e W_0 è il peso iniziale.

$$\%gel = \frac{W_f}{W_0} \cdot 100 \quad (7)$$

5.2.5 Swelling

Le prove di swelling permettono di valutare una delle proprietà più peculiari degli idrogeli, cioè la loro capacità di inglobare acqua all’interno del reticolo. Queste prove vengono svolte sui campioni sintetizzati sottoposti ad essiccazione in stufa, per garantire l’assenza di acqua nel peso iniziale del campione. I campioni anidri vengono pesati. Quindi, al tempo t_0 vengono immersi in acqua, e successivamente vengono estratti e pesati ad intervalli di 5 minuti per la prima ora, di 15 per la seconda ora e 30 minuti per la terza ora. La prova termina quando per un intervallo di tempo considerevole non si registra un aumento di peso del campione. Da queste prove viene determinato il massimo valore di rigonfiamento all’equilibrio S (swelling ratio) (8). In cui, W_s (weight swollen) è il peso del campione al massimo rigonfiamento, mentre W_d (weight dry) è il peso del campione iniziale [108].

$$S = \frac{W_s - W_d}{W_d} \cdot 100 \quad (8)$$

5.2.6 *Analisi termica dinamo-meccanica DMTA*

Le proprietà termomeccaniche dei campioni seccati sono state valutate con l'analisi DMTA. I campioni sono stati testati utilizzando lo strumento "Triton Technology TTDMA". La risposta del campione è stata valutata in un intervallo di temperatura che va da -40°C a 70°C, con una rampa termica di 3°C/min, ad una frequenza di 1 Hz ed una deformazione pari a 20 µm.

5.2.7 *SEM – EDX*

La caratterizzazione superficiale degli idrogeli sintetizzati è stata svolta con il FESEM (field-emission scanning electron microscope) "ZEISS SUPRA 40" che ha permesso l'analisi della superficie, in particolare per visualizzare la morfologia e la rugosità. I campioni, non conduttivi, sono stati sottoposti a metallizzazione con cromo per poterli analizzare. L'analisi EDX (energy-dispersive X-ray spectroscopy) è stata svolta con lo strumento "OXFORD INCA ENERGY 450" equipaggiato con un detector Si(Li) raffreddato con azoto liquido, con una risoluzione di 133 eV a MnK α , 70 eV a FK α e 66 eV a CK α , utilizzato per l'analisi della composizione chimica superficiale.

5.2.8 *Stampa 3D*

Lo strumento utilizzato per la stampa 3D dell'idrogelo è "Freeform Pico Plus 39 DLP printer (Asiga)", che possiede una risoluzione XY di 39µm. La sorgente della radiazione sono dei diodi che emettono luce, centrata su 405 nm. La piattaforma di crescita del materiale misura 50 mm × 30 mm × 150 mm. I layer hanno uno spessore che può variare da 10 a 100 µm.

I parametri di stampa utilizzati sono: spessore del layer 40 µm, intensità della radiazione 35 mW/cm² con tempi di esposizione alla luce per ogni layer pari a 18 s.

6. Raccolta dati e discussione dei risultati

I componenti delle formulazioni sono stati miscelati come descritto nel paragrafo precedente. L'utilizzo di quantità crescenti di gelatina influisce sulla viscosità e omogeneità delle formulazioni. I campioni prodotti presentano aspetti estetici diversi tra loro già a partire dalle formulazioni. Infatti, al crescere della gelatina le formulazioni risultano più opache e più viscosi. La gelatina tende a gelificare a temperatura ambiente per cui le formulazioni sono state mantenute costantemente sotto agitazione a 40°C, garantendo fluidità e impedendo una separazione di fase.

I campioni sono stati sintetizzati a partire da formulazioni uguali in peso, in azoto. La durata dell'irraggiamento è di 15 min. Al termine dell'esposizione alla luce visibile, i campioni sono stati rimossi dalla navicella.

Gli idrogeli prodotti sono caratterizzati da un colore giallo, conferito dall'iniziatore. Per favorirne l'eliminazione, ogni campione è stato immerso in acqua dopo la sintesi (Figura 10). Tutti i campioni, una volta immersi, mostrano la tendenza a perdere il colore giallo, dunque è intuibile il rilascio dell'iniziatore (Figura 12). Si ottiene una totale trasparenza in un arco di tempo di circa 3 ore, in acqua a temperatura ambiente.

Per confronto, è stato prodotto un campione di PEGDA reticolato. Mentre il campione di PEGDA reticolato è caratterizzato da un'elevata trasparenza e da una spiccata rigidità, sia allo stato rigonfiato sia allo stato essiccato, i campioni di PEGDA/gelatina presentano maggiore opacità, flessibilità e tendono maggiormente a aderire al supporto in cui vengono sintetizzati (Figura 11). Tutte queste caratteristiche sono sempre più pronunciate all'aumentare del contenuto di gelatina.

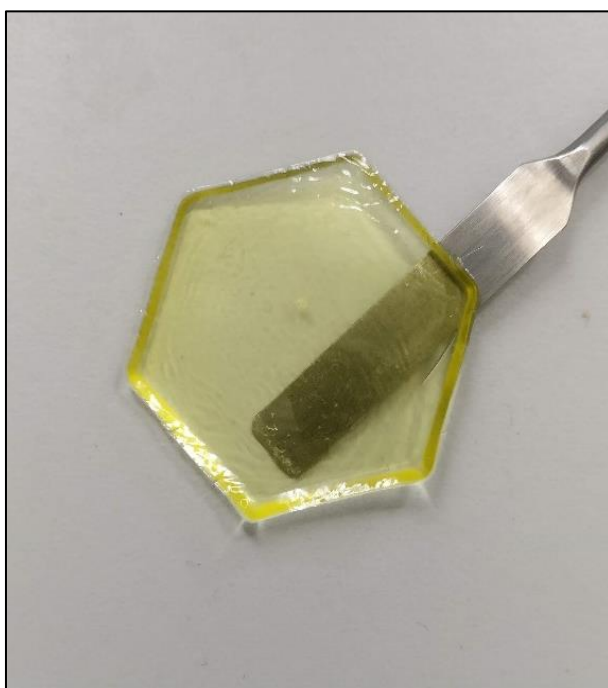


Figura 10: campione di PEGDA dopo la reticolazione.



Figura 11: campione PG 50.



Figura 12: campione PG 50 dopo il lavaggio.

6.1 Fotoreologia

Le prove di fotoreologia hanno permesso l'osservazione in tempo reale della cinetica di reticolazione. Il test consente di vedere la variazione del modulo conservativo G' e del modulo dissipativo G'' durante l'irraggiamento, e quindi la reticolazione. Il primo test fotoreologico è stato focalizzato sul fotoiniziatore. Sono state studiate le diverse formulazioni con quantitativi di canforochinone differenti (Figura 13): 1 phr, 2 phr e 4 phr. Il tempo di innesco della fotopolimerizzazione è lo stesso per tutte e tre le formulazioni, mentre si possono apprezzare sensibili differenze in termini di cinetica. Infatti, la curva che rappresenta il campione con 1 phr di canforochinone risulta meno inclinata di quelle contenenti 2 e 4 phr. Le formulazioni contenenti gli altri due valori di iniziatore invece presentano curve considerabili sovrapposte, senza particolari differenze nell'andamento della crescita del modulo G' . Non si apprezzano dunque particolari vantaggi in termini di cinetica di reazione e di valori di modulo finali. In generale una quantità di iniziatore insufficiente non genera sufficienti radicali che possano attivare la reticolazione non il massimo rendimento, ma nemmeno una quantità eccessiva risulta un approccio vincente, in quanto, se presente in maniera eccessiva, si ha un effetto schermante, di auto-spegnimento della molecola di iniziatore allo stato eccitato.

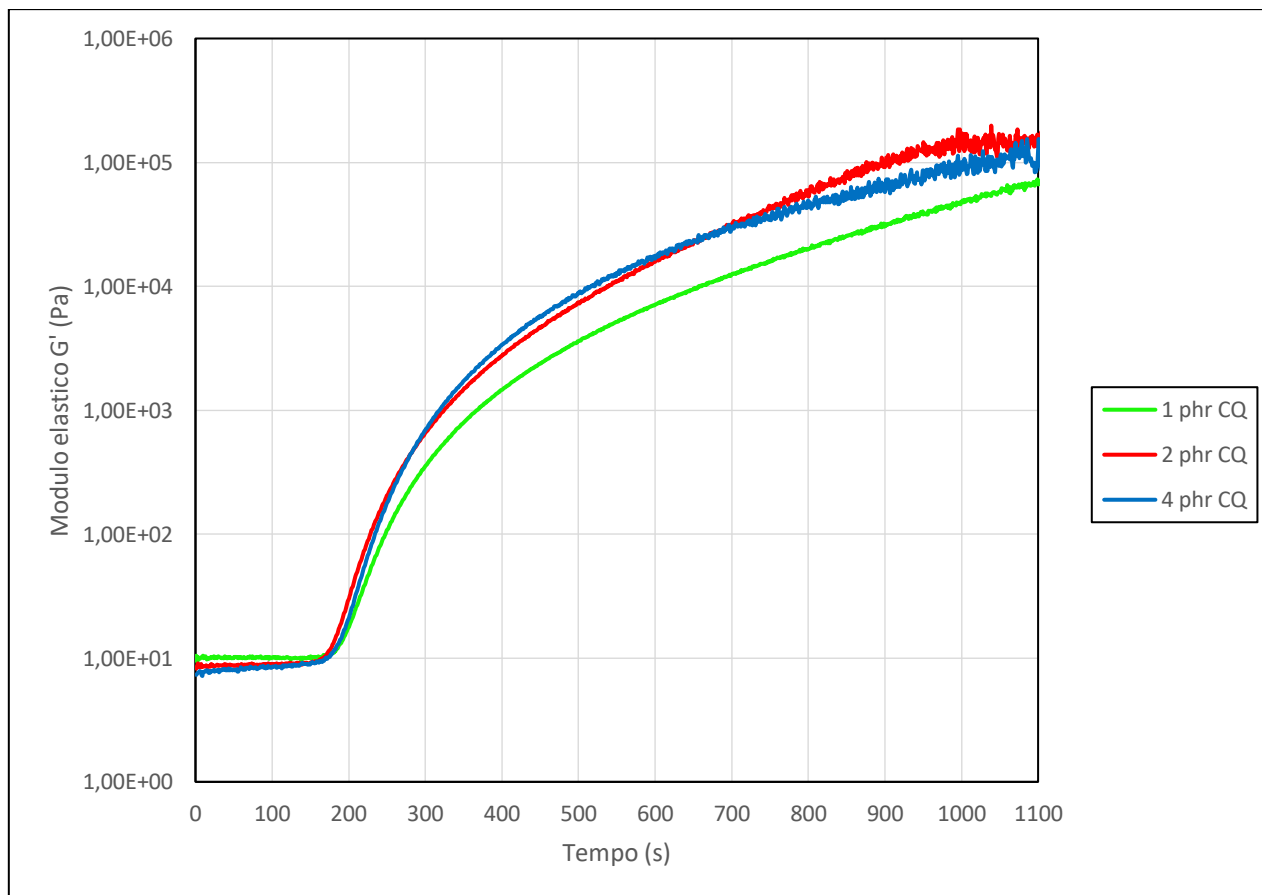


Figura 13: andamento del modulo conservativo G' del campione PG 10 con diverse concentrazioni di iniziatore (1, 2 e 4 phr).

Un secondo test fotoreologico è stato effettuato sui campioni che possiedono contenuti costanti di tutti i costituenti della formulazione, variando la concentrazione di gelatina (Figura 14). I risultati mostrano che tutti i campioni subiscono un aumento del modulo G' per tempi che vanno dai 150 s ai 180 s. A questo tempo occorre sottrarre il tempo, pari a 60 s, in cui non è avvenuto l'irraggiamento. Quindi per tutti i campioni la fotopolimerizzazione si innesca tra i 90 s e i 120 s dopo l'inizio dell'irraggiamento. Come si può vedere dalla figura, i campioni con contenuti di gelatina più alti hanno un aumento che si innesca per tempi minori. Inoltre, analizzando il grafico nel tratto di crescita di G' , a parità di tempo i campioni con più gelatina possiedono un modulo maggiore. Non vi sono invece differenze per quanto riguarda il modulo G' finale che si raggiunge al plateau. Infatti, il modulo finale risulta per tutti i campioni dello stesso ordine di grandezza (10^5 Pa).

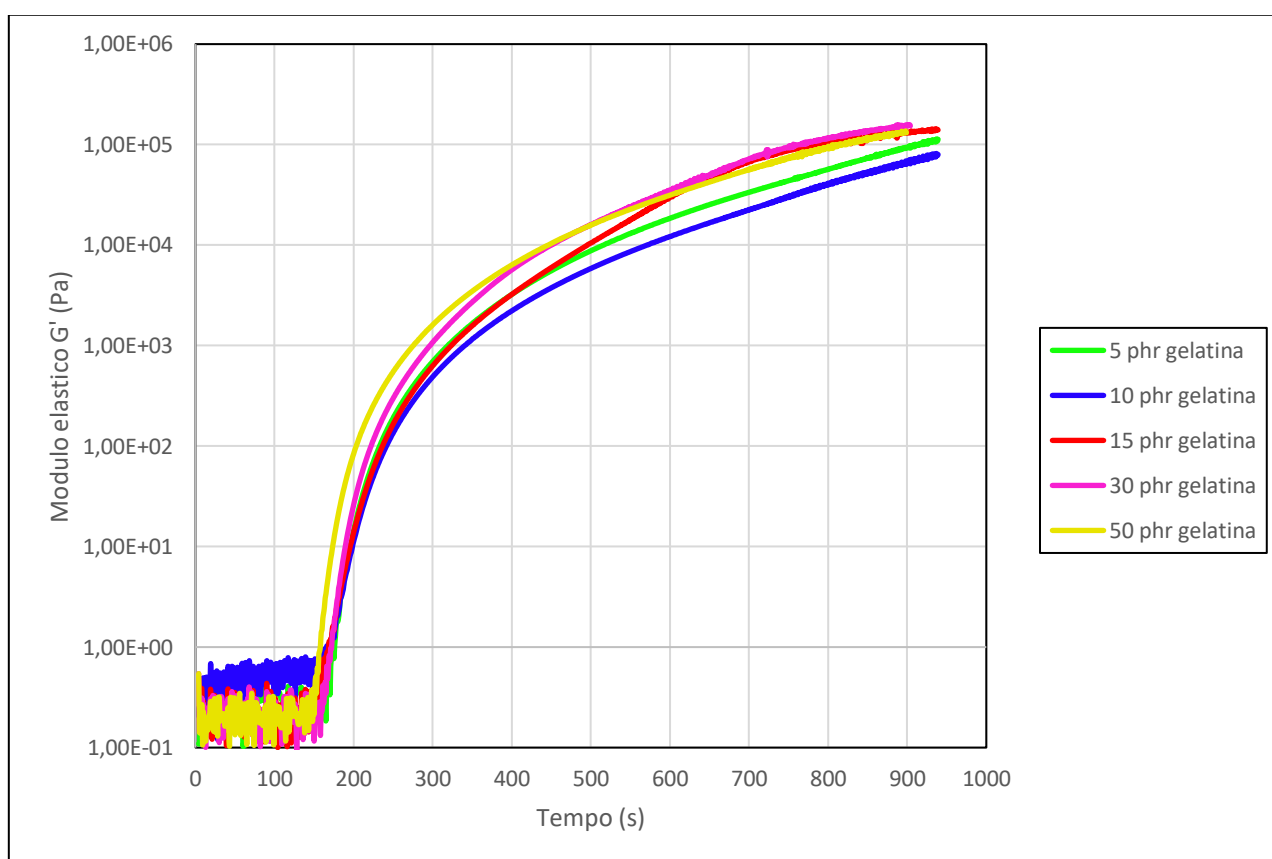


Figura 14: andamento del modulo conservativo G' per i diversi campioni di PEGDA/gelatina.

6.2 %Gel

Le prove di %gel permettono di valutare la quantità di materiale che non è stata coinvolta nella formazione del reticolo chimico, che dunque non è legata chimicamente ad esso. I campioni sono stati sottoposti ad immersione in acqua, a 40°C per 24 h. I risultati (Tabella 2) mostrano valori di %gel che superano per tutti i campioni il 90%. All'aumentare del contenuto di gelatina non si ha un calo del valore del %gel, che quindi indica che la gelatina entra all'interno del reticolo anche per i campioni con contenuti maggiori. Non è possibile distinguere se la quantità di materiale che abbandona il reticolo sia soltanto di PEGDA o di gelatina, e nemmeno in quali proporzioni.

Nome campione	%Gel
PG 5	93%
PG 10	95%
PG 15	94%
PG 30	93%
PG 50	98%

Tabella 2: valori di %gel.

6.3 FTIR-ATR

L'analisi spettroscopica FTIR in configurazione ATR ha permesso l'analisi della superficie dei campioni. Gli spettri FTIR mostrano i gruppi funzionali presenti all'interno del campione. In particolare, è stata analizzata la porzione di spettro che in cui vi è l'assorbimento dei gruppi acrilati, presenti nel PEGDA, coinvolti nella reazione di reticolazione. I picchi di assorbimento caratteristici del gruppo acrilato sono: 812 cm^{-1} , 1190 cm^{-1} , 1410 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} . Per poter constatare l'effettiva conversione dei picchi, è stata effettuata un'analisi spettroscopica sulle formulazioni di partenza e sugli idrogeli sintetizzati e poi seccati. Lo spettro rappresentato (Figura 15), mostra la conversione dei picchi relativi al gruppo acrilato in un campione di PEGDA polimerizzato.

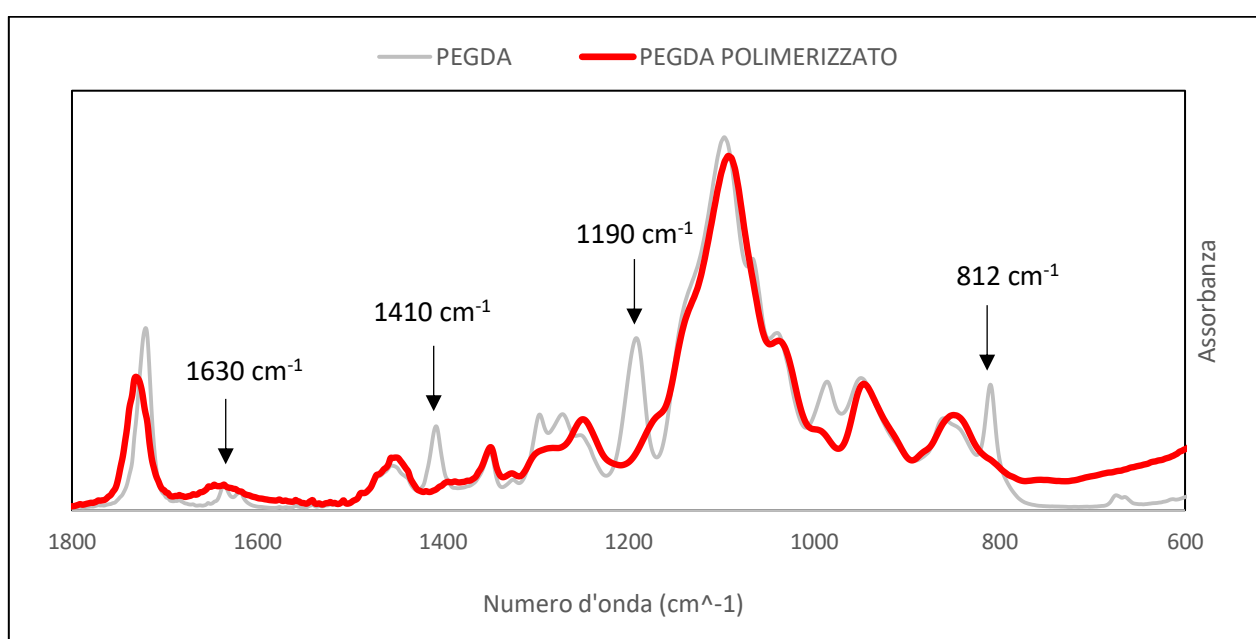


Figura 15: spettro di PEGDA prima della polimerizzazione (grigio) e dopo la reticolazione (rosso).

L'analisi spettroscopica è stata effettuata anche su di un campione di gelatina (Figura 16). Lo spettro mostra i picchi di assorbimento relativi al gruppo amminico, di interesse in quanto è il gruppo che permette alla gelatina di svolgere il ruolo di coiniziatore, cioè di donatore di idrogeno. In evidenza i picchi relativi al bending del gruppo -NH ($1650\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$), e il picco relativo allo stretching del gruppo amminico (3337 cm^{-1}).

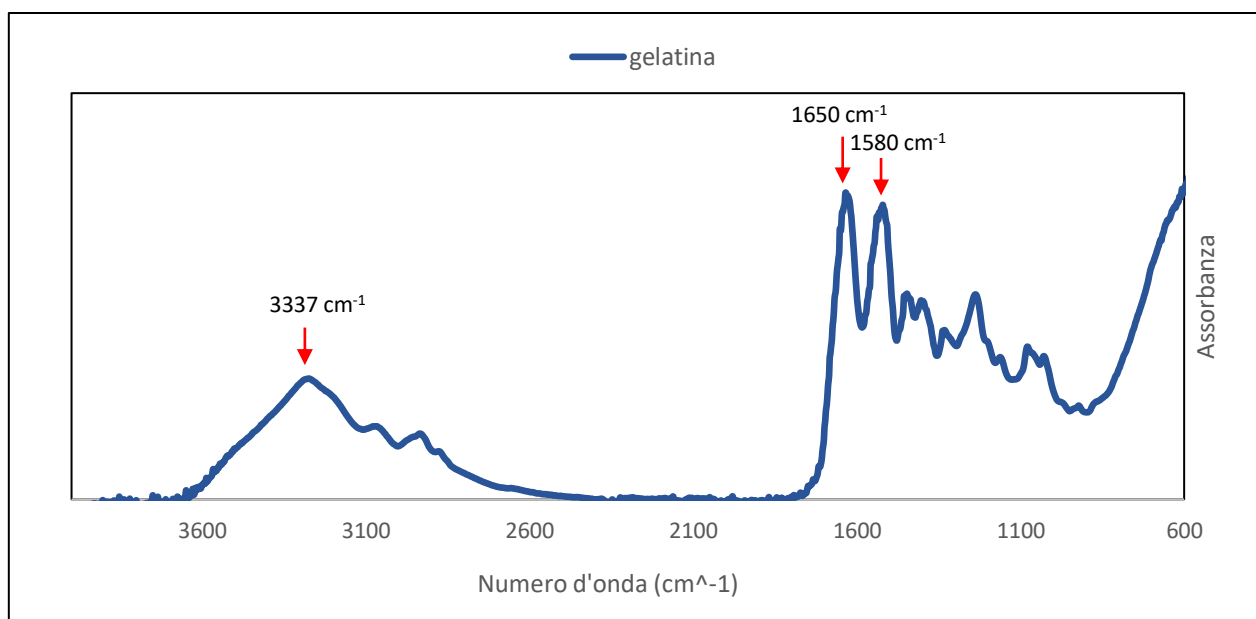


Figura 16: spettro della gelatina di pesce tal quale.

Per la costruzione degli spettri relativi ai campioni di PEGDA/gelatina sono state eseguite le analisi FTIR sulla formulazione e sul campione polimerizzato, precedentemente sottoposto a %gel e alla prova di rigonfiamento (swelling). Questa procedura garantisce la solubilizzazione della gelatina non coinvolta nella formazione del reticolo, ma solamente legata in modo fisico ad esso.

In Figura 17 sono gli spettri sovrapposti relativi al campione PG5. Si può apprezzare la scomparsa dei picchi del gruppo acrilato, indicando l'avvenuta reticolazione, e la presenza del picco relativo al bending nel gruppo -NH, confermando la presenza della gelatina all'interno del reticolo. Inoltre, si può notare che il picco relativo al bending del gruppo amminico sia concorrente rispetto ad uno dei picchi del gruppo acrilato.

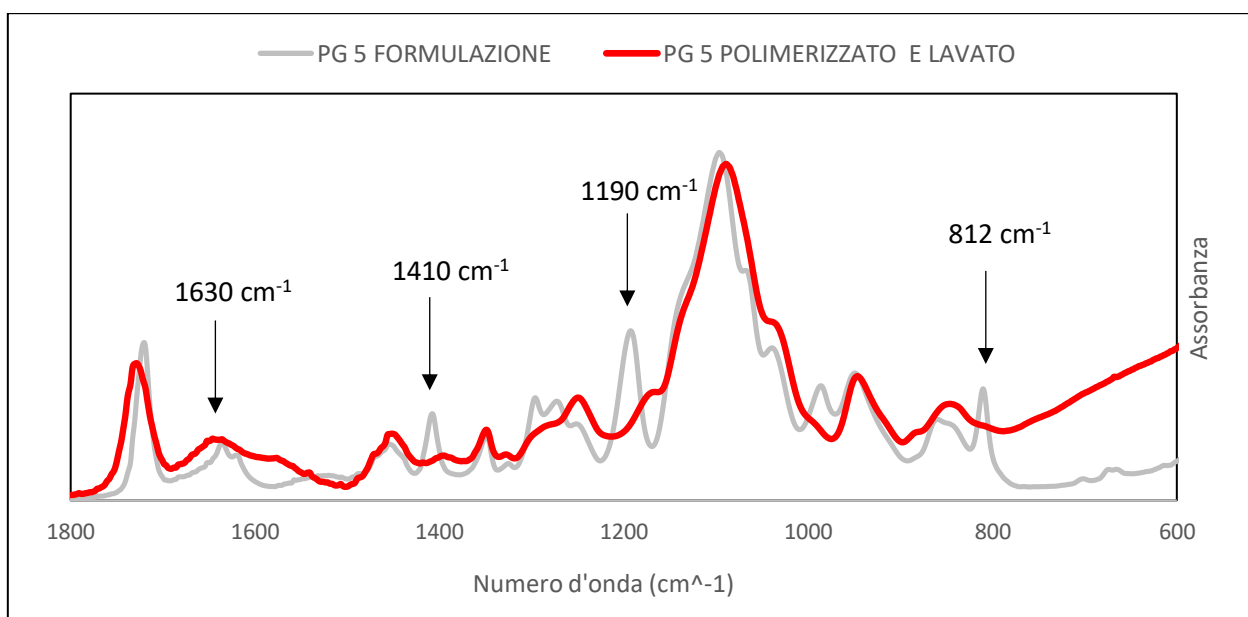


Figura 17: spettro di PG 5 prima della polimerizzazione (grigio) e dopo la reticolazione (rosso).

Nello spettro relativo campione PG10 (prima e dopo la polimerizzazione) si può osservare, come nel caso del PG5, la scomparsa dei picchi relativi al gruppo acrilato. Inoltre, si può vedere l'aumento del contenuto di gelatina presente all'interno sia della formulazione, sia all'interno del campione polimerizzato, con un picco di assorbimento più alto (1650-1580 cm^{-1}). Questo picco è concorrente ad uno di quelli relativi al gruppo acrilato, per cui in questa zona dello spettro è più difficile apprezzare la conversione. Invece, per quanto riguarda gli altri gruppi caratteristici del gruppo acrilato la conversione risulta più evidente.

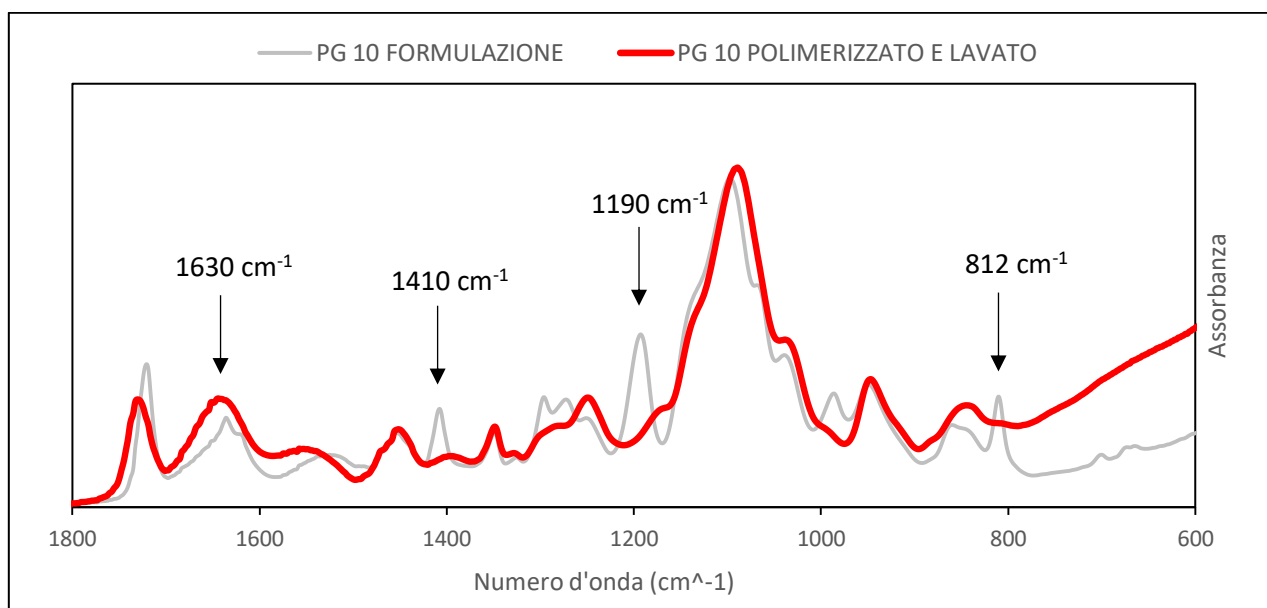


Figura 18: spettro di PG 10 prima della polimerizzazione (grigio) e dopo la reticolazione (rosso).

Gli spettri dei campioni con contenuti di gelatina superiore: PG15 (Figura 19), PG30 (Figura 20) e PG50 (Figura 20) rivelano il medesimo andamento dei precedenti. La crescente quantità di gelatina complica lo spettro, ma la conversione del gruppo acrilato risulta comunque apprezzabile.

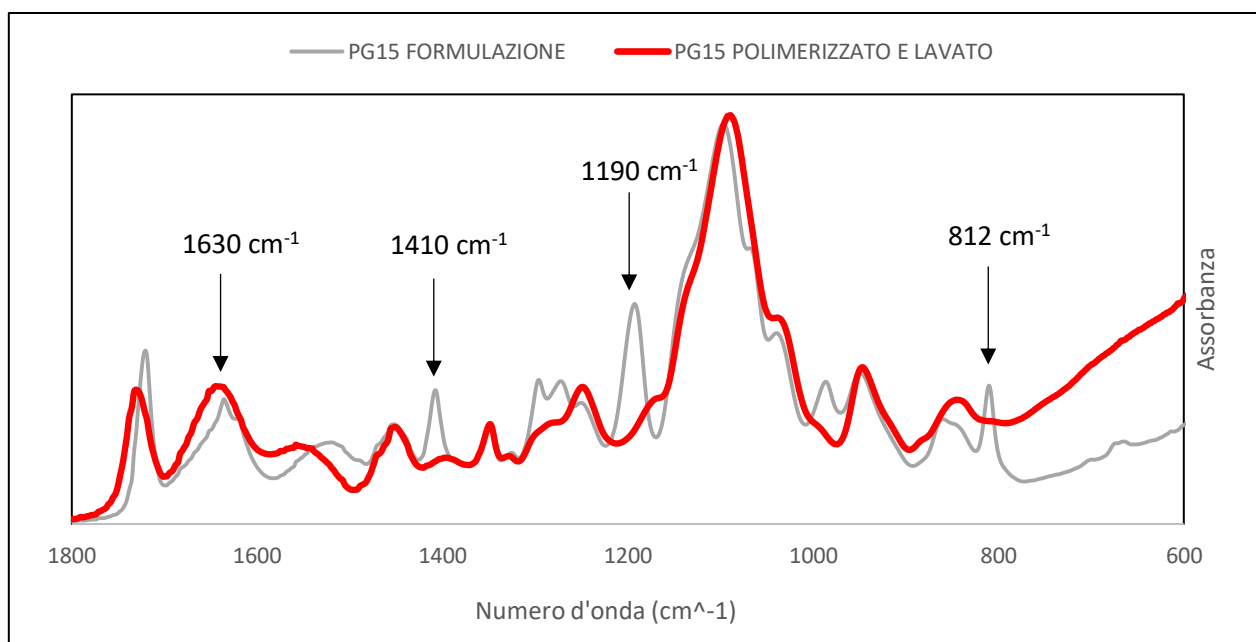


Figura 19: spettro di PG 15 prima della polimerizzazione (grigio) e dopo la reticolazione (rosso).

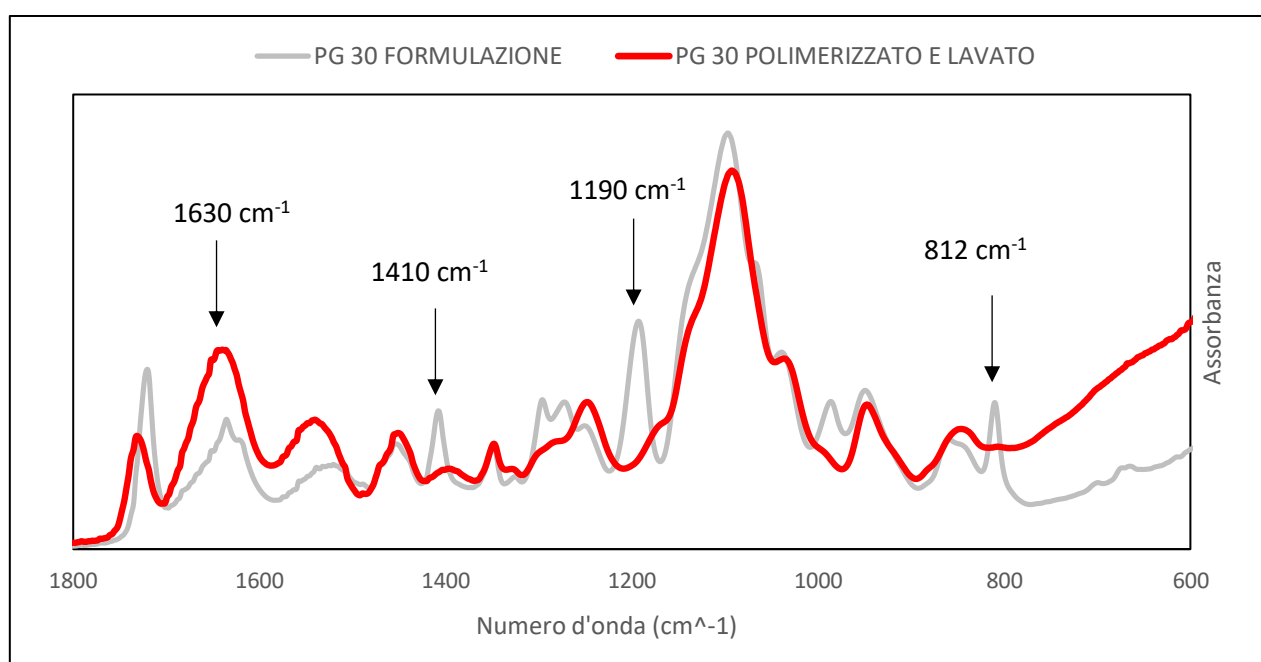


Figura 20: spettro di PG 30 prima della polimerizzazione (grigio) e dopo la reticolazione (rosso).

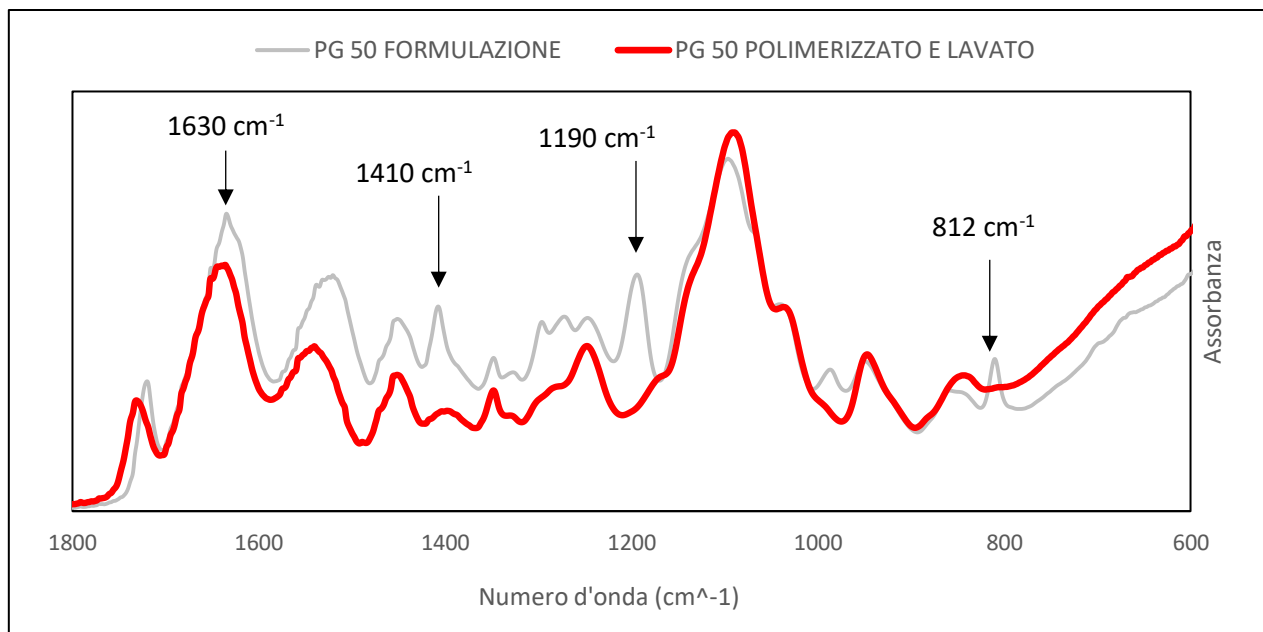


Figura 21: spettro di PG 50 prima della polimerizzazione (grigio) e dopo la reticolazione (rosso).

Gli spettri FTIR, dunque, confermano la presenza di gelatina in tutti i campioni. L'assorbimento relativo al gruppo amminico risulta sempre più intenso al crescere del contenuto di gelatina inizialmente solubilizzato nella formulazione. Questo risultato viene confermato anche nella zona relativa allo spettro in cui si ha l'assorbimento dello stretching del gruppo amminico (Figura 22).

Questi risultati sono coerenti con i valori di perdita di peso ottenuti con le prove di %gel, che mostrano una perdita di peso pressoché costante per i campioni. Per cui, da questi risultati si deduce che ad un aumento del contenuto di gelatina all'interno della formulazione risulta in un aumento di gelatina all'interno dell'idrogelo reticolata in modo chimico.

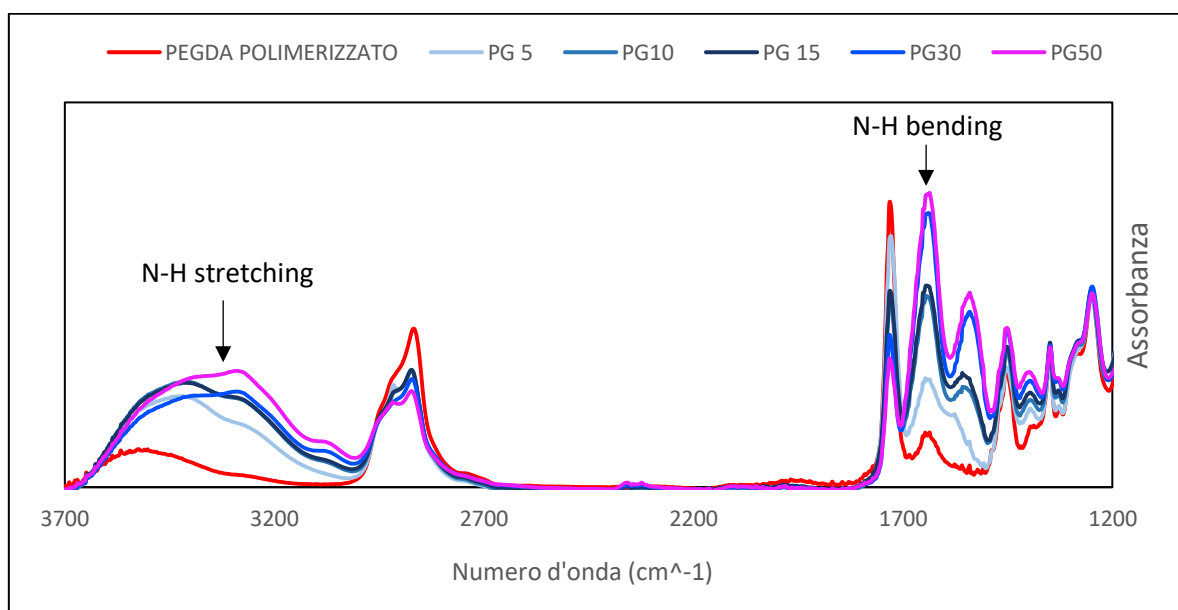


Figura 22: spettro di confronto tra i campioni PG 5, 10, 15, 30, 50 e il PEGDA (in rosso).

6.4 SEM

L'analisi SEM (scanning electron microscopy) è una delle tecniche più utilizzate per la caratterizzazione dei materiali, sia da un punto di vista morfologico che di composizione chimica [109]. L'immagine SEM si ottiene tramite un fascio di elettroni focalizzato, che scansiona la superficie del campione all'interno della camera di analisi [110]. L'interazione tra il fascio elettronico e il campione produce una serie di segnali, come elettroni retro diffusi (backscattered electrons BSEs), elettroni secondari (secondary electrons SEs) e raggi X, permettendo di ottenere informazioni sulla morfologia, natura delle fasi presenti, composizioni chimiche e la cristallografia del materiale in esame [109]. In aggiunta, il SEM può essere accoppiato con uno spettroscopio EDS (energy-dispersive spectrometer) per ottenere informazioni sulla chimica della superficie [110].

I campioni vengono cromati per consentire l'analisi, non trattandosi di materiali conduttivi. È stato prodotto un campione di PEGDA reticolato, per poter apprezzarne eventuali differenze in termini morfologici. Il campione di PEGDA (Figura 23) è caratterizzato da una certa fragilità e rigidità, per questo vi sono presenti numerose fratture all'interno del campione, dovute al processo di essiccazione. Dall'immagine si apprezza una superficie liscia.

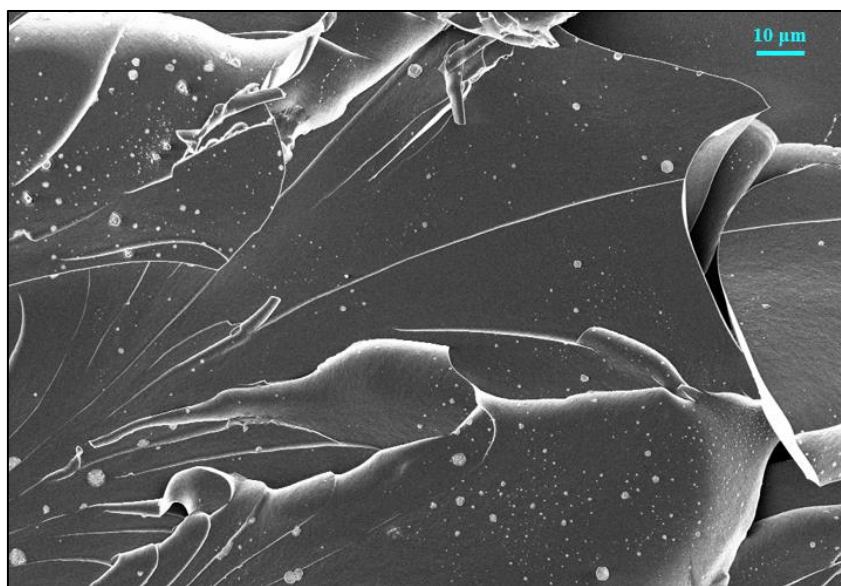


Figura 23: immagine SEM del PEGDA reticolato.

L'analisi EDS ha permesso lo studio della chimica superficiale dei campioni, in particolare l'analisi degli elementi presenti. Di seguito la regione di campione analizzato e i risultati in forma grafica dell'analisi EDS (Figura 24). Gli elementi presenti sono carbonio ed ossigeno, mentre il cromo è dato dalla metallizzazione del campione.

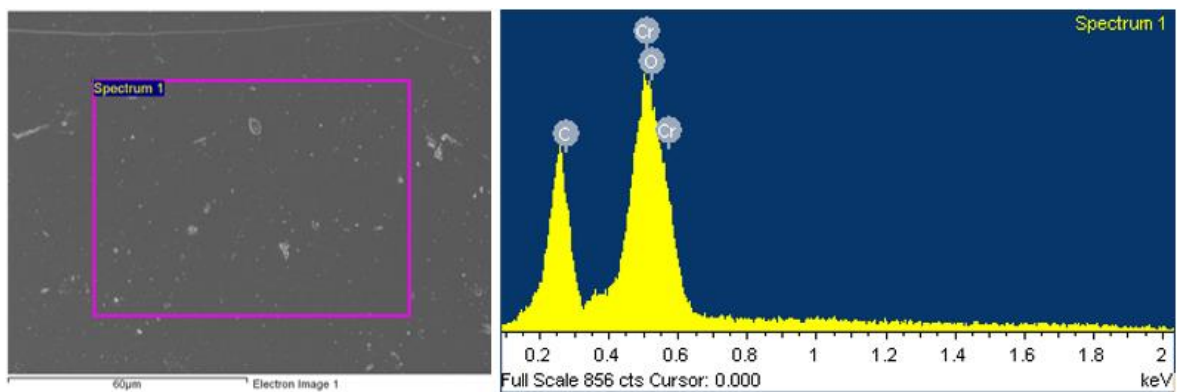


Figura 24: regione analizzata tramite EDX (sinistra) e grafico che illustra gli elementi presenti superficialmente (destra).

Elemento	%peso	%atomica
C	10.13	26.38
O	14.42	28.21
Cr	75.45	45.41

Tabella 3: % peso e % atomica degli elementi presenti nel campione di PEGDA reticolato.

I campioni di gelatina presentano una morfologia molto differente, soprattutto se confrontati con quella del PEGDA reticolato. Infatti, la superficie presenta una struttura interconnessa di creste e valli (Figura 25), caratteristica della gelatina, in quanto tende a gelificare.

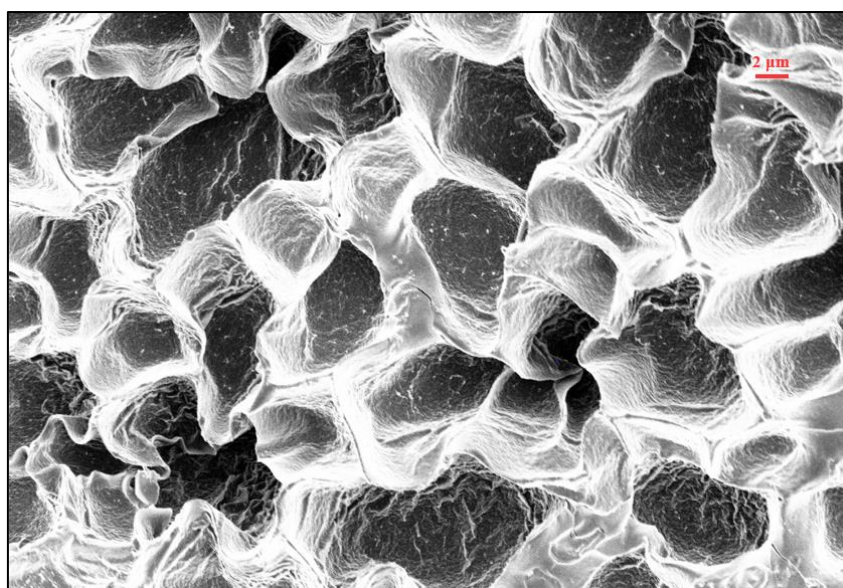


Figura 25: immagine SEM del campione PG 50.

L'analisi EDX (dispersive energy X-ray spectroscopy) (Figura 26) mostra la presenza di azoto, presente nei gruppi amminici della gelatina, per cui certificandone la presenza all'interno del reticolo.

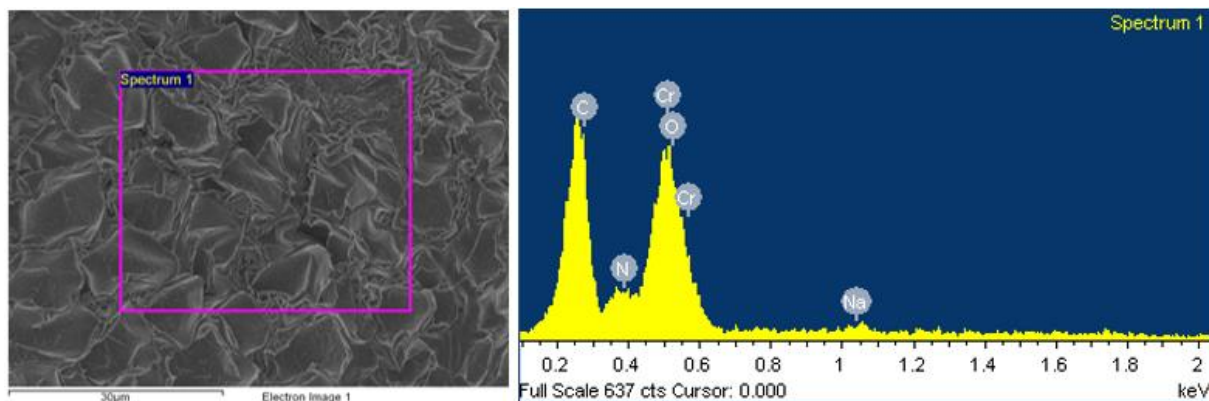


Figura 26: regione analizzata tramite EDX (sinistra) e grafico che illustra gli elementi presenti superficialmente (destra) per il campione PG 50.

La composizione del campione non è uniforme come si può vedere nella Tabella 4: % peso e % atomica degli elementi presenti nel campione PG 50., ricavata da due diversi punti dello stesso campione. In particolare, la presenza di azoto non è uniforme, come è prevedibile data la morfologia del campione. La presenza invece di sodio può essere dovuta ai sali eventualmente presenti nell'acqua durante il lavaggio del campione.

	Punto 1		Punto 2	
Elemento	%peso	%atomica	%peso	%atomica
C	18.11	36.95	4.83	14.77
N	4.06	7.10	2.18	5.73
O	17.23	26.39	8.68	19.94
Na	1.68	1.79	/	/
Cr	58.93	27.77	84.30	59.56

Tabella 4: % peso e % atomica degli elementi presenti nel campione PG 50.

6.5 Caratterizzazione termica e meccanica – DMTA & DSC

Per uno studio del materiale più approfondito sono state svolte le prove DMTA e DSC, sui campioni PEGDA/gelatina ed uno costituito soltanto da PEGDA, al fine di valutare l'influenza della gelatina sulle proprietà del reticolo.

La DMTA (dynamic mechanical thermal analysis) consiste in una misura della risposta dinamica di un campione di materiale [111], in cui vengono misurati lo smorzamento, definito dal parametro $\tan\delta$, il modulo conservativo G' e il modulo dissipativo G'' . Vengono riportati i diversi grafici ottenuti dal test dinamo-meccanico, da cui si può osservare come non vi siano particolari differenze tra la T_g del polimero e la T_g dei campioni che contengono anche la gelatina. Di seguito vengono riportati i grafici DMTA relativi a tutti i campioni, con andamento del modulo G' e di $\tan\delta$.

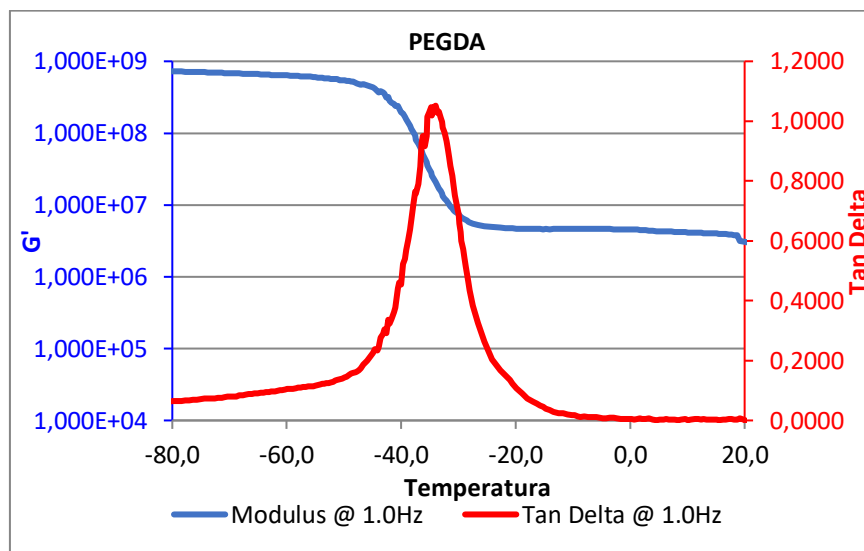


Figura 27: grafico DMTA con andamento del modulo G' e di $\tan\delta$ del campione di PEGDA.

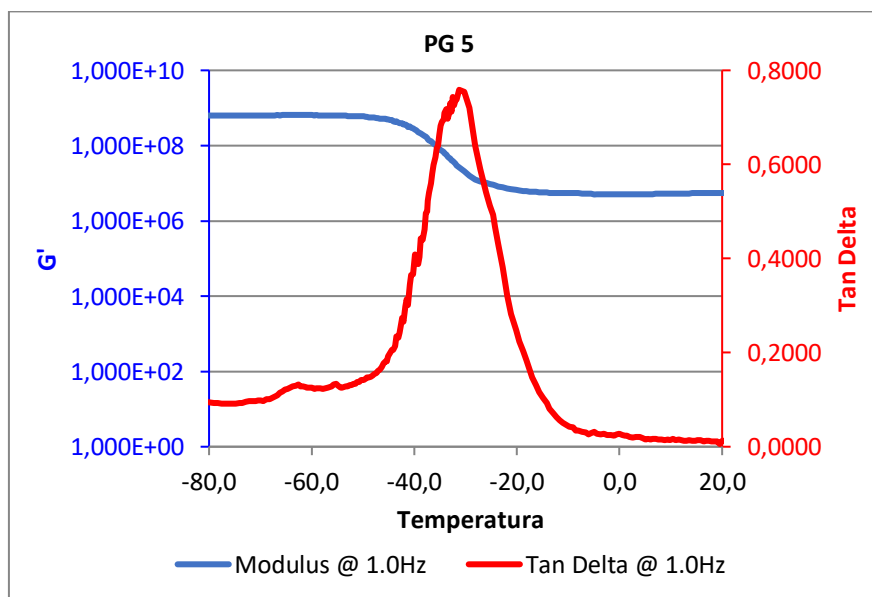


Figura 28: grafico DMTA con andamento del modulo G' e di $\tan\delta$ del campione PG 5.

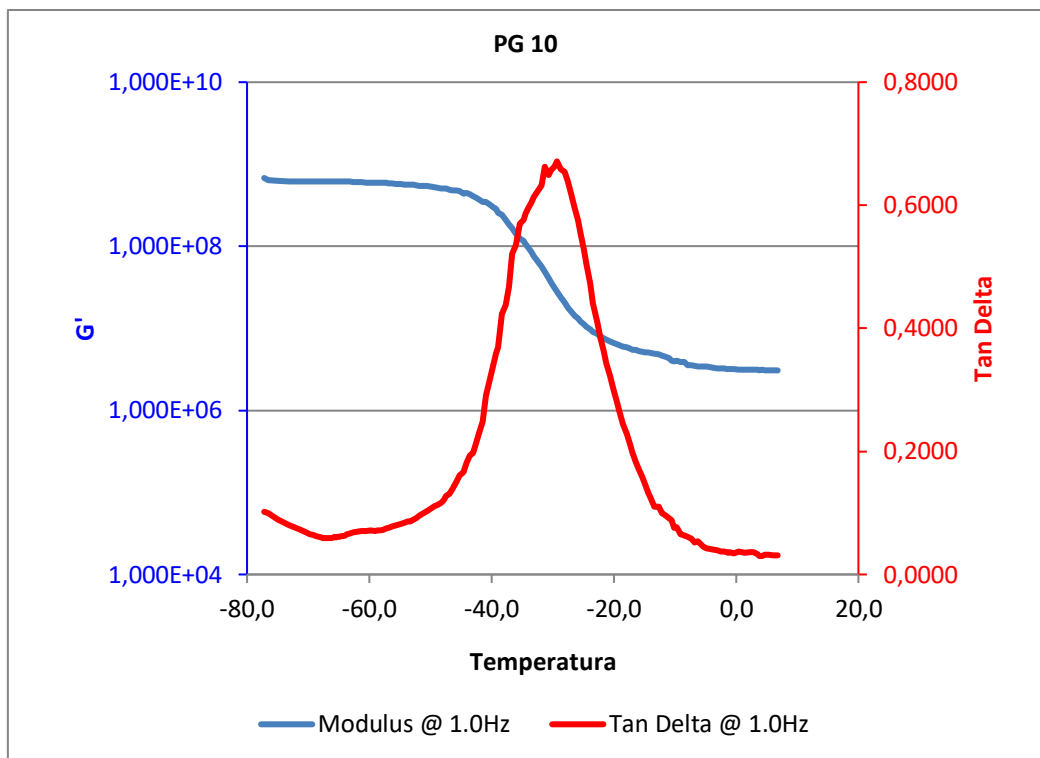


Figura 29: grafico DMTA con andamento del modulo G' e di $\tan\delta$ del campione PG 10.

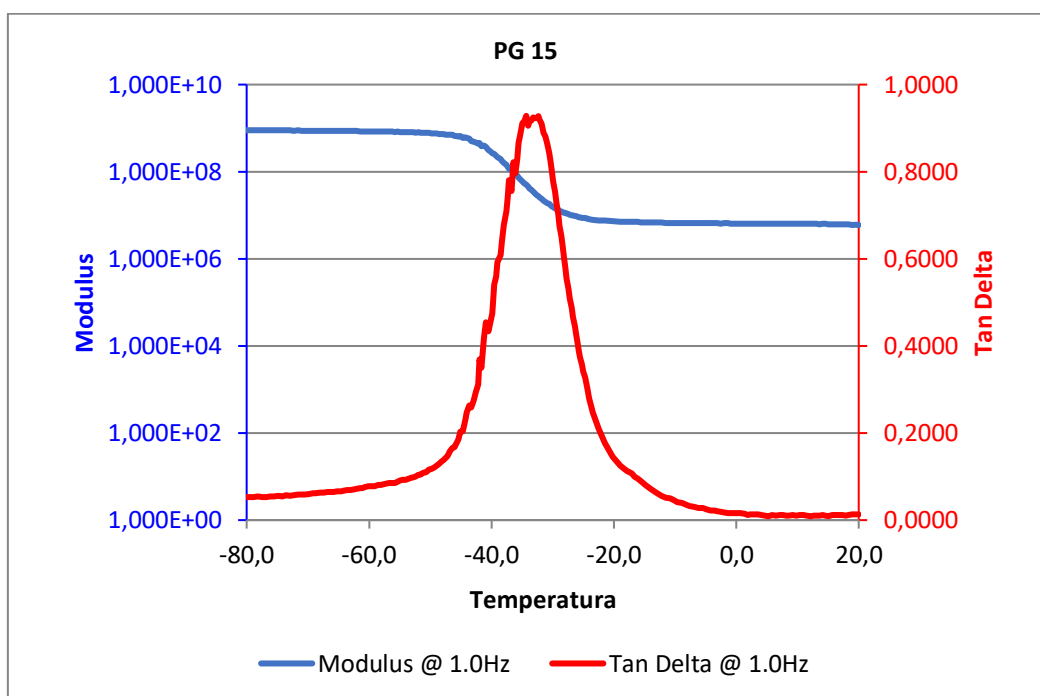


Figura 30: grafico DMTA con andamento del modulo G' e di $\tan\delta$ del campione PG 15.

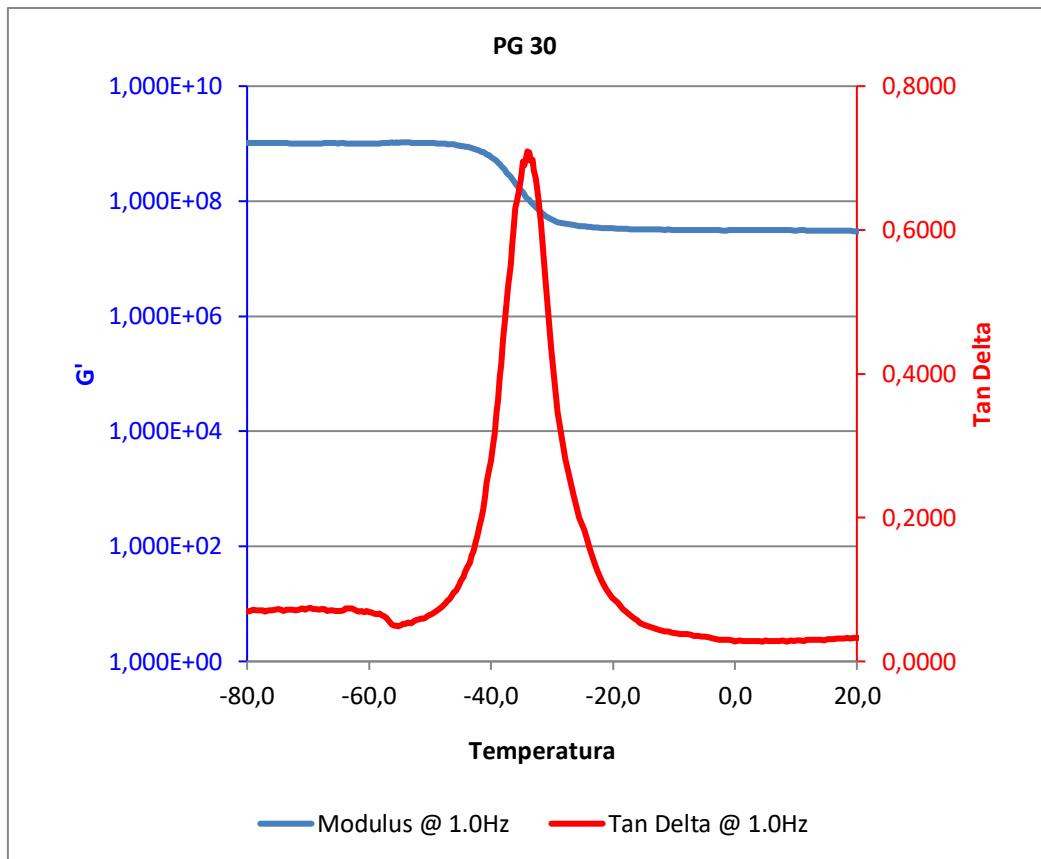


Figura 31: grafico DMTA con andamento del modulo G' e di $\tan\delta$ del campione PG 30.

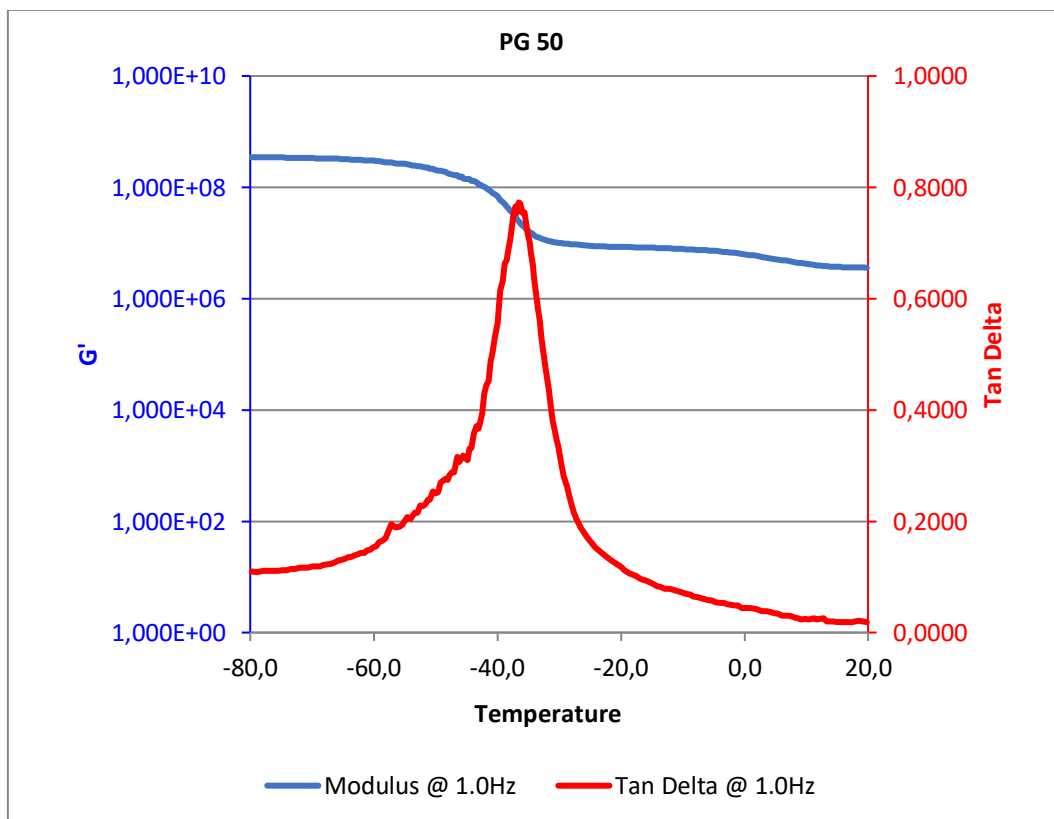


Figura 32: grafico DMTA con andamento del modulo G' e di $\tan\delta$ del campione PG 50.

I valori della T_g calcolati tramite la DMTA sui campioni PEGDA/gelatina (Tabella 5) presentano sensibili variazioni rispetto a quella del campione di polimero, in particolare nel caso del PG10 e del PG50, mentre per il resto dei campioni risultano molto simili alla T_g del PEGDA, con deviazioni inferiori al grado centigrado. Allo stato essiccato, quindi, il comportamento del materiale è dominato dal PEGDA, anche perché la gelatina è presente in minor quantità. I campioni sintetizzati sono caratterizzati da una spiccata fragilità, che li rende difficoltosi da testare.

Le misure della DSC risultano invece centrate intorno ad un unico valore (Tabella 5). Quindi, per la natura del materiale e la difficoltà di produrre i provini per la DMTA, i risultati della DSC risultano più affidabili. Quest'ultimi, mostrano come il comportamento prevalente sia quello del PEGDA, allo stato seccato, senza variazioni con l'aggiunta e aumento del contenuto di gelatina.

Nome campione	Modulo G' a 0°C (MPa)	T_g calcolata con DMTA (°C)	T_g calcolata con DSC (°C)
PEGDA	4,5	-34	-38
PG 5	5,1	-33,8	-38
PG 10	3,1	-29,7	-38
PG 15	6,5	-34,3	-38
PG 30	31,7	-34,0	-38
PG 50	6,2	-36,3	-38

Tabella 5: valori di modulo e T_g dei campioni sintetizzati.

6.6 Swelling

Le prove di swelling determinano il grado di rigonfiamento del materiale all'interno di un solvente [], in questo caso l'acqua. Per confronto e per valutare eventuali variazioni di comportamento del reticolo in termini di rigonfiamento è stato sottoposto alla prova anche un campione di PEGDA. I campioni testati mostrano tutti una cinetica di rigonfiamento che porta mediamente ad un valore di equilibrio tra i 60 min e i 90 min dopo l'immersione in acqua.

Il campione di PEGDA è quello che mostra il valore inferiore di rigonfiamento, con un valore di swelling medio del 91%, mentre i campioni di PEGDA/gelatina presentano valori nettamente superiori (Figura 33, Figura 34), con valori che superano i tutti i casi il 110%, con il picco del PG 50 con un grado di swelling del 118%.

Le proprietà di rigonfiamento degli idrogeli sono dovute alla presenza dei gruppi idrofili all'interno del reticolo. Per questo motivo il PEGDA, nonostante sia un polimero idrofilo, mostra un rigonfiamento inferiore. Gli idrogeli PEGDA/gelatina hanno un grado superiore con una spiccata cinetica di rigonfiamento, in quanto la gelatina presenta diversi gruppi idrofili lungo la catena.

I campioni non mostrano, invece, un andamento un aumento significativo del grado di swelling per contenuti di gelatina crescenti. Questo può essere dovuto al fatto che il grado di rigonfiamento è influenzato, oltre che dalla presenza di gruppi idrofili, anche dal grado di reticolazione. Un aumento del grado di reticolazione diminuisce il grado di swelling. Quindi potrebbe esserci una compensazione tra i due fattori.

In generale, quindi, i risultati indicano un effetto benefico dell'incorporamento della gelatina nella matrice di PEGDA.

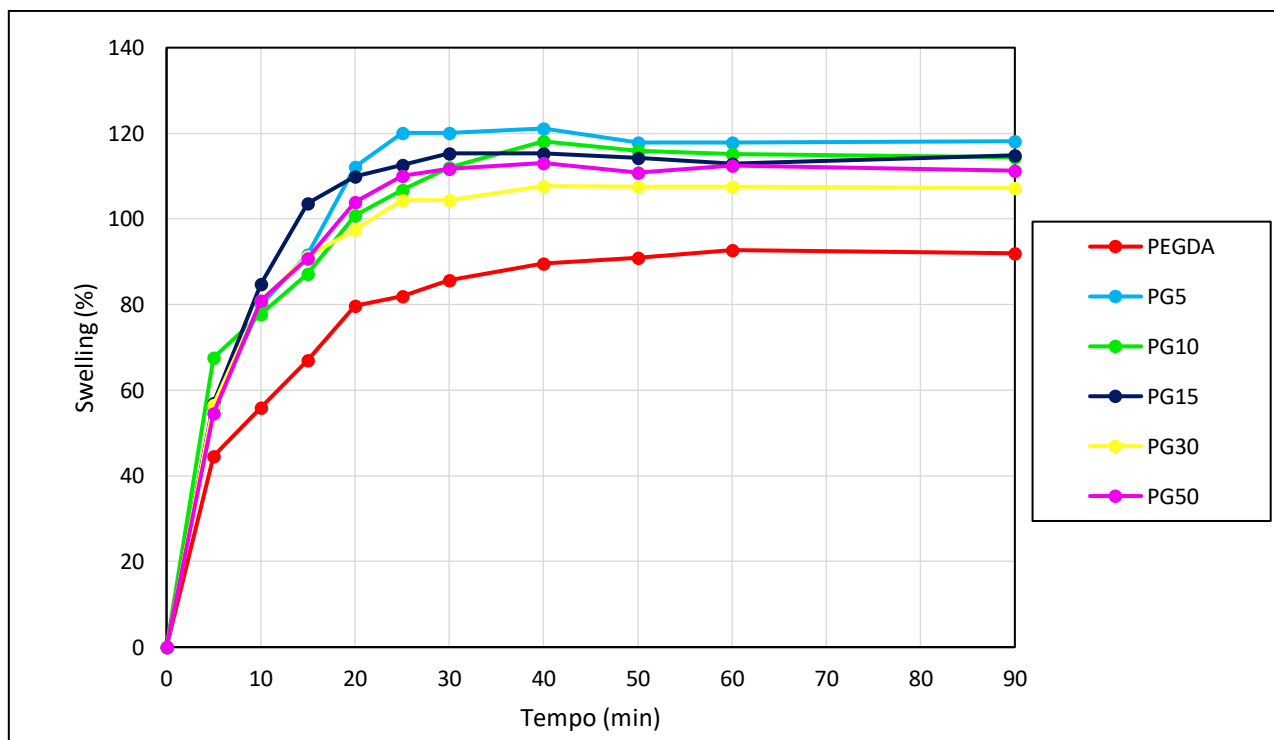


Figura 33: risultati della prova di rigonfiamento, si arriva all'equilibrio tra i 60 e i 90 min.

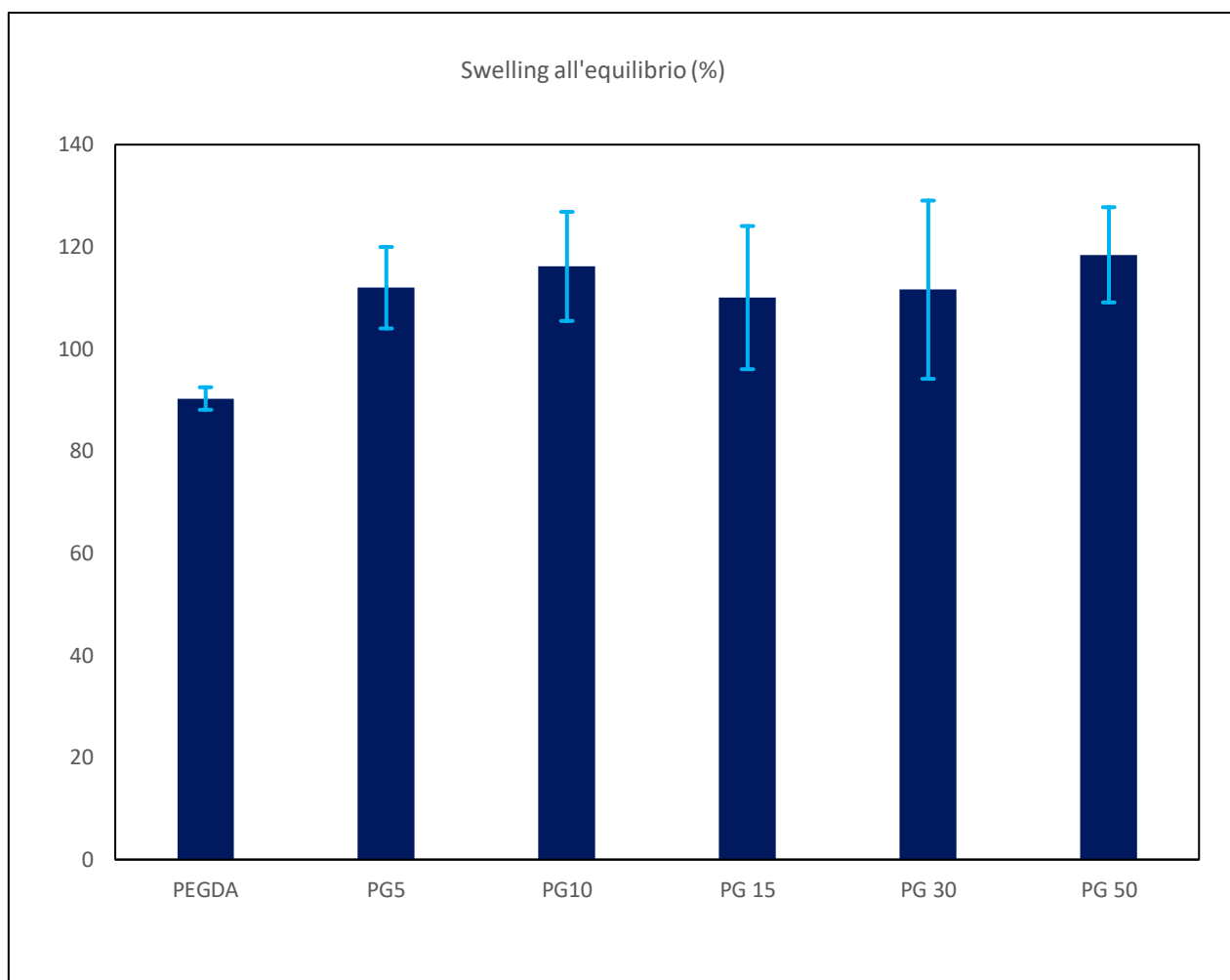


Figura 34: valori di swelling all'equilibrio, raggiunto tra i 90 e 120 min.

Il rigonfiamento è significativo anche in termini dimensionali (Figura 35). Si registra dunque un aumento di dimensioni tra lo stato seccato e lo stato rigonfiato che può essere anche pari al 40% del volume iniziale del campione.

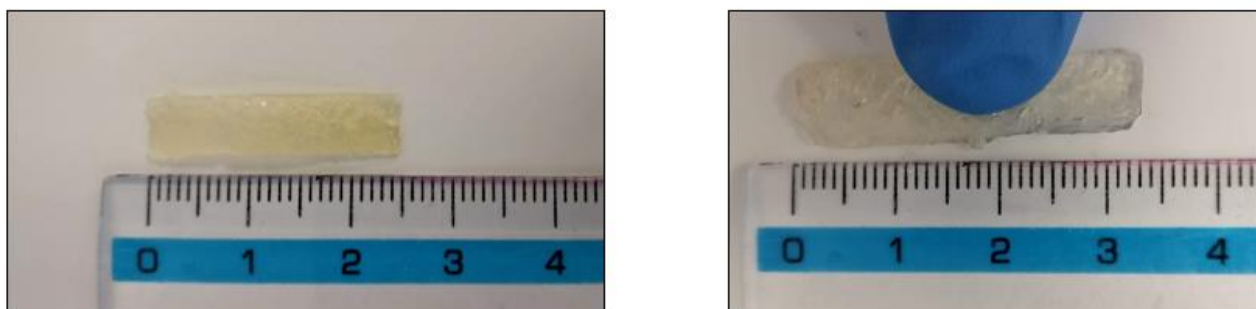


Figura 35: campione PG 10 allo stato seccato (sinistra) e allo stato rigonfiato (destra).

6.7 Stampa 3D

Il processo di stampa dell'idrogelo è passato attraverso l'ottimizzazione delle formulazioni e dei parametri di stampa. Inizialmente sono state testate formulazioni con contenuti di acqua variabili, dunque variando il rapporto acqua/PEGDA, ma lasciando invariato il rapporto PEGDA/gelatina e PEGDA/iniziatore.

La tendenza della gelatina a gelificare a temperatura ambiente nonostante la costante agitazione della formulazione, soprattutto nel caso dei campioni con contenuti più elevati, il mantenimento di essa a 40°C, per favorire sia la solubilizzazione, sia una viscosità opportuna, che fosse più favorevole per la stampa.

La stampante utilizzata permette il mantenimento della formulazione in temperatura della formulazione durante il processo di fotopolimerizzazione. Quindi, è stata impostata la temperatura di 40°C durante il processo di stampaggio.

Gli oggetti che sono stati selezionati per la stampa possiedono caratteristiche geometriche piuttosto semplici, come una struttura a nido d'ape (honeycomb) (Figura 37) oppure un cubo che presenta solamente spigoli e vertici (Figura 36), evitando la produzione di oggetti che presentassero dettagli inferiori al mm, in quanto questo materiale risulta totalmente nuovo nell'ambito della stampa 3D.

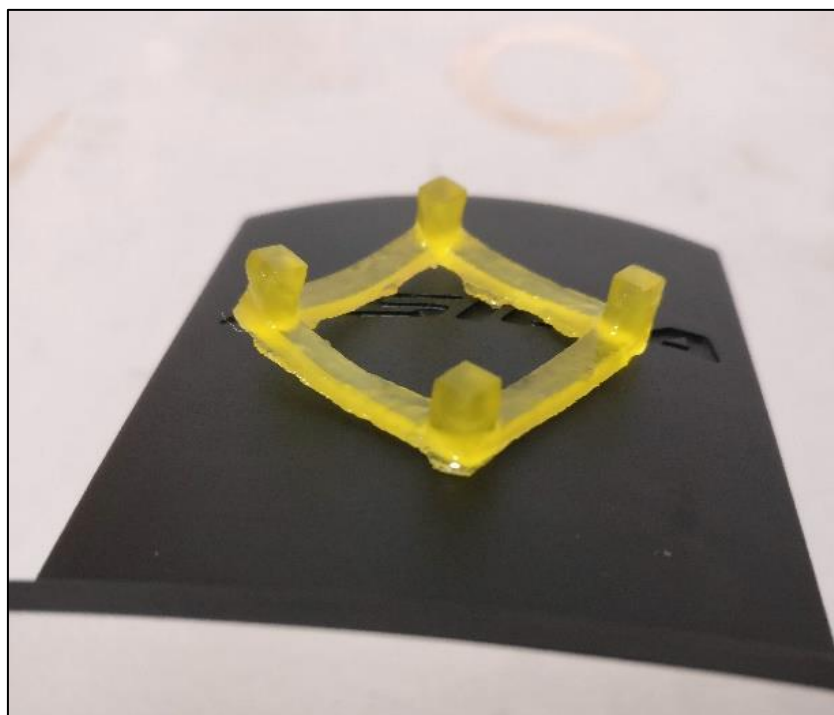


Figura 36: parziale struttura a cubo forato stampata con il campione PG 10.

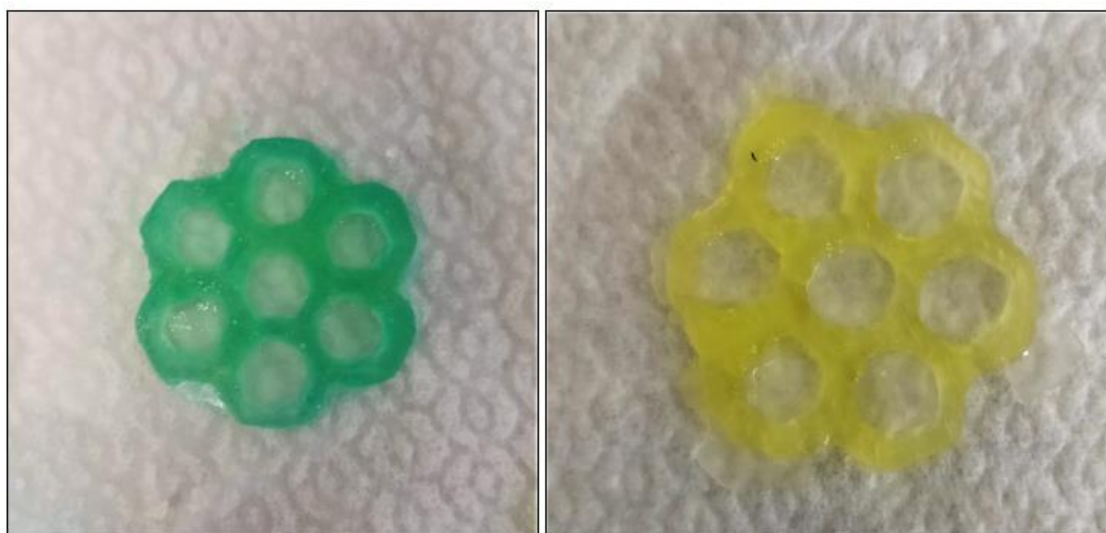


Figura 37: struttura a nido d'ape (honeycomb) utilizzando l'agente di contrasto (a sinistra) e senza (a destra).

Per facilitare l'autosostegno delle strutture stampate, sono stati impostati tempi di irraggiamento più alti per gli strati che rimangono adesi alla piattaforma di crescita. Inoltre, questo favorisce l'integrità della struttura una volta che viene rimossa dalla piattaforma, necessario in quanto gli oggetti prodotti presentano una certa fragilità, che comporta una particolare attenzione nella rimozione e nella manipolazione del campione.

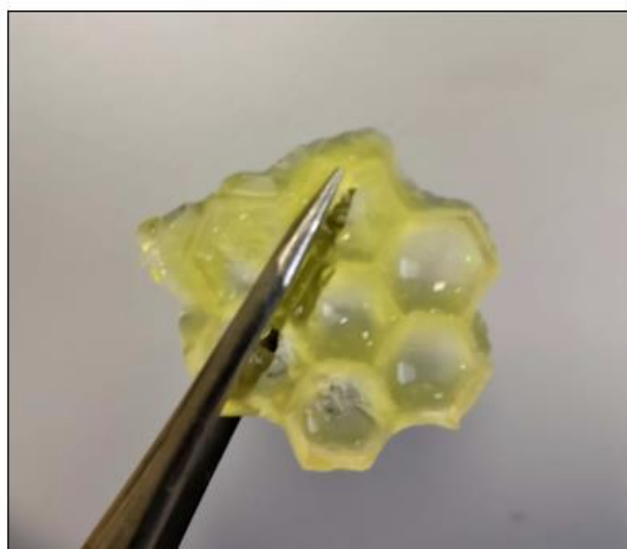


Figura 38: campione PG 30 stampato, prima della rimozione dalla piattaforma (a sinistra) e dopo (a destra).

I primi campioni ottenuti dimostrano che le formulazioni sviluppate sono stampabili, l'ottimizzazione del processo e eventualmente l'aggiunta di coloranti, solitamente utilizzati nelle formulazioni per la stampa al fine di ottenere migliori risoluzioni, potranno portare alla produzione di pezzi con maggiore precisione dimensionale.

7. Conclusioni e sviluppi futuri

Nel presente lavoro di tesi è stata studiata una nuova tipologia di idrogeli ibridi reticolati chimicamente sintetizzati tramite il processo di fotopolimerizzazione. I pre-polimeri che costituiscono il reticolo (polietilenglicole diacrilato e gelatina) sono ben noti nell'ambito di questi materiali, ma in questo lavoro di tesi è stato testato un nuovo tipo di approccio nella sintesi dell'idrogelo.

In particolare, è stata utilizzata la gelatina, senza preventiva funzionalizzazione, nel ruolo di coiniziatore del camporquinone, fotoiniziatore del tipo Norrish II per la reticolazione indotta da luce visibile del polietilenglicole diacrilato, con l'obiettivo che il biopolimero entrasse a far parte dell'idrogelo attraverso una reticolazione di tipo chimico, sfruttando i gruppi amminici presenti negli amminoacidi che lo compongono.

Le analisi chimico-fisiche svolte hanno permesso di poter valutare l'effettiva formazione del network polimerico e soprattutto l'incorporamento della gelatina all'interno di esso. Dunque, la gelatina può essere utilizzata nel ruolo di coiniziatore per il camforchinone.

Le prove di %gel, hanno permesso di valutare una buona efficienza del processo, date le basse percentuali (in tutti i casi inferiori al 8%) in peso di materiale che non ha partecipato alla reazione di reticolazione.

Le prove di fotoreologia hanno evidenziato che un ottimale contenuto di fotoiniziatore garantisce una resa migliore del processo di fotopolimerizzazione, sia in termini cinetici sia in termini di proprietà meccaniche finali del materiale. Inoltre, la fotoreologia ha permesso di valutare come al variare di contenuto di gelatina non si abbiano particolari effetti benefici in questo senso, indicando che ad un aumento del numero di gruppi amminici presenti nella formulazione non corrisponda una variazione significativa nella cinetica della reazione.

Le analisi FTIR-ATR e le immagini SEM, accoppiate con EDS per l'analisi della composizione chimica della superficie, hanno confermato l'avvenuta reticolazione, con la conversione dei picchi di assorbimento relativi al gruppo acrilato, e l'incorporamento della gelatina all'interno del reticolo, con la presenza dei picchi di assorbimento del gruppo amminico presenti nella gelatina. Inoltre, a livello morfologico, un aumento del contenuto di gelatina varia sensibilmente la struttura dell'idrogelo. Infatti, l'idrogelo di confronto costituito da PEGDA reticolato mostra una superficie piatta, mentre si ottiene una struttura interconnessa che presenta creste e valli nei campioni di PEGDA e gelatina.

L'analisi EDS ha evidenziato come l'idrogelo sia disomogeneo, in quanto l'azoto presente nella gelatina varia a seconda della regione analizzata. Quindi la tendenza della gelatina a gelificare si mostra all'interno dell'idrogelo.

I test di swelling, DMTA e DSC svolti sui campioni costituiti da PEGDA e gelatina e su un campione di PEGDA reticolato hanno mostrato come la gelatina non abbia particolari influenze sulle proprietà del materiale allo stato seccato. Infatti, non si registrano differenze tra le T_g registrate sui campioni. Le prove di swelling hanno mostrato un effetto benefico della presenza della gelatina all'interno del reticolo. Infatti, tutti i valori di rigonfiamento dei campioni sintetizzati superano nettamente i valori relativi al reticolo di PEGDA.

Allo stato rigonfiato i campioni presentano elasticità e flessibilità crescenti all'aumentare del contenuto di gelatina e sono nettamente superiori rispetto al campione di PEGDA reticolato, che invece mostra elevata fragilità e rigidità, mostrate anche nelle immagini SEM attraverso le numerose fratture createsi nel campione, non presenti in quelli costituiti da PEGDA e gelatina.

La sintesi dei campioni tramite DLP ha testimoniato che questi campioni risultino idonei ai processi di produzione mediante stampa 3D, che amplia lo scenario in termini di geometrie ottenibili e di conseguenza le applicazioni.

L'idrogelo sintetizzato con questo tipo di approccio ha mostrato risultati molto interessanti. In primo luogo, la possibilità di ottenere il crosslink della gelatina tal quale, senza funzionalizzazioni, permette di evitare i passaggi di funzionalizzazione che prevedono l'utilizzo di agenti non biocompatibili, nonché lunghi tempi di reazione e purificazione. In secondo luogo, l'utilizzo di una sorgente di luce visibile per la sintesi del materiale amplia le possibilità di applicazione per questo materiale. Infatti, sorgenti UV non sono favorevoli immaginando di inglobare colture cellulari nella sintesi del materiale, per esempio per la produzione di scaffold.

In questo lavoro di tesi è stato presentato un primo approccio alla sintesi di questi materiali. Gli sviluppi futuri possono sicuramente essere l'ottimizzazione della formulazione ed eventualmente i parametri per la sua sintesi. Inoltre, sono interessanti analisi relative alla sopravvivenza cellulare a lungo termine.

Per quanto riguarda la stampa 3D, è di interesse trovare ottimali formulazioni e parametri di stampa che permettano di ottenere geometrie più complesse, con più risoluzione e quindi più funzionali.

Indice delle figure

Figura 1: stadi dell'evoluzione della molecola di iniziatore dopo l'assorbimento di energia dalla radiazione incidente.....	5
Figura 2: meccanismo di generazione di radicali con meccanismo di tipo Norrish I di un idrossifenilchetone [16].....	6
Figura 3: meccanismo di generazione dei radicali di tipo Norrish II del camforchinone [17].....	7
Figura 4: schema dell'apparato per la stereolitografia.	10
Figura 5: schema del Digital Light Processing (DLP).....	11
Figura 6: struttura molecolare del PEG e di due molecole funzionalizzate (PEGDA e PEGDMA) [62].	21
Figura 7: struttura del PEGDA.	23
Figura 8: struttura chimica della gelatina [103].	23
Figura 9: struttura del canforochinone [106].	24
Figura 10: campione di PEGDA dopo la reticolazione.	28
Figura 11: campione PG 50.....	29
Figura 12: campione PG 50 dopo il lavaggio.	29
Figura 13: andamento del modulo conservativo G' del campione PG 10 con diverse concentrazioni di iniziatore (1, 2 e 4 phr).	30
Figura 14: andamento del modulo conservativo G' per i diversi campioni di PEGDA/gelatina.	31
Figura 15: spettro di PEGDA prima della polimerizzazione (grigio) e dopo la reticolazione (rosso).....	33
Figura 16: spettro della gelatina di pesce tal quale.	34
Figura 17: spettro di PG 5 prima della polimerizzazione (grigio) e dopo la reticolazione (rosso).....	34
Figura 18: spettro di PG 10 prima della polimerizzazione (grigio) e dopo la reticolazione (rosso).....	35
Figura 19: spettro di PG 15 prima della polimerizzazione (grigio) e dopo la reticolazione (rosso).....	36
Figura 20: spettro di PG 30 prima della polimerizzazione (grigio) e dopo la reticolazione (rosso).....	36
Figura 21: spettro di PG 50 prima della polimerizzazione (grigio) e dopo la reticolazione (rosso).....	37
Figura 22: spettro di confronto tra i campioni PG 5, 10, 15, 30, 50 e il PEGDA (in rosso).	37
Figura 23: immagine SEM del PEGDA reticolato.....	38
Figura 24: regione analizzata tramite EDX (sinistra) e grafico che illustra gli elementi presenti superficialmente (destra).....	39
Figura 25: immagine SEM del campione PG 50.....	39

<i>Figura 26: regione analizzata tramite EDX (sinistra) e grafico che illustra gli elementi presenti superficialmente (destra) per il campione PG 50.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 27: grafico DMTA con andamento del modulo G' e di $\tan\delta$ del campione di PEGDA.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 28: grafico DMTA con andamento del modulo G' e di $\tan\delta$ del campione PG 5.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 29: grafico DMTA con andamento del modulo G' e di $\tan\delta$ del campione PG 10.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 30: grafico DMTA con andamento del modulo G' e di $\tan\delta$ del campione PG 15.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 31: grafico DMTA con andamento del modulo G' e di $\tan\delta$ del campione PG 30.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 32: grafico DMTA con andamento del modulo G' e di $\tan\delta$ del campione PG 50.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 33: risultati della prova di rigonfiamento, si arriva all'equilibrio tra i 60 e i 90 min.</i>	<i>45</i>
<i>Figura 34: valori di swelling all'equilibrio, raggiunto tra i 90 e 120 min.</i>	<i>46</i>
<i>Figura 35: campione PG 10 allo stato seccato (sinistra) e allo stato rigonfiato (destra).....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 36: parziale struttura a cubo forato stampata con il campione PG 10.</i>	<i>47</i>
<i>Figura 37: struttura a nido d'ape (honeycomb) utilizzando l'agente di contrasto (a sinistra) e senza (a destra).</i>	<i>48</i>
<i>Figura 38: campione PG 30 stampato, prima della rimozione dalla piattaforma (a sinistra) e dopo (a destra).</i>	<i>48</i>

Indice delle tabelle

<i>Tabella 1: phr^* riferito al peso di PEGDA.</i>	<i>24</i>
<i>Tabella 2: valori di %gel.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabella 3: % peso e % atomica degli elementi presenti nel campione di PEGDA reticolato.</i>	<i>39</i>
<i>Tabella 4: % peso e % atomica degli elementi presenti nel campione PG 50.</i>	<i>40</i>
<i>Tabella 5: valori di modulo e T_g dei campioni sintetizzati.</i>	<i>44</i>

BIBLIOGRAFIA

1. Laftah, W.A., S. Hashim, and A.N. Ibrahim, *Polymer Hydrogels: A Review*. Polymer-Plastics Technology and Engineering, 2011. **50**(14): p. 1475-1486.
2. Hoare, T.R. and D.S. Kohane, *Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges*. Polymer, 2008. **49**(8): p. 1993-2007.
3. Hoffman, A.S., *Hydrogels for biomedical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012. **64**: p. 18-23.
4. Ratner, B.D., et al., *Biomaterials Science : An Introduction to Materials in Medicine*. 2004, London: London: Elsevier Science & Technology.
5. Wichterle, O. and D. LÍM, *Hydrophilic Gels for Biological Use*. Nature, 1960. **185**(4706): p. 117-118.
6. Al-Malah, K.I.M., *12.1.1 Polymerization Reactions*, in *Aspen Plus® - Chemical Engineering Applications*. John Wiley & Sons.
7. Beaman, J.J., *Solid freeform fabrication : a new direction in manufacturing : with research and applications in thermal laser processing*. 1997, Dordrecht; Boston: Kluwer Academic Publishers.
8. Morawetz, H., *Photoreactive polymers. The science and technology of resists*, by Arnost Reiser, John Wiley and Sons, New York, 1989, 409 pp. Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters, 1989. **27**(10): p. 404-405.
9. Craver, C.D. and C.E. Carraher Jr, *Applied polymer science: 21st century*. Journal of Chemical Education, 2002. **79**(8): p. 942.
10. Yagci, Y., S. Jockusch, and N.J. Turro, *Photoinitiated Polymerization: Advances, Challenges, and Opportunities*. Macromolecules, 2010. **43**(15): p. 6245-6260.
11. Kutal, C., P.A. Grutsch, and D.B. Yang, *A novel strategy for photoinitiated anionic polymerization*. Macromolecules, 1991. **24**(26): p. 6872-6873.
12. Nowak, D., et al., *Photopolymerization of hybrid monomers: Part I: Comparison of the performance of selected photoinitiators in cationic and free-radical polymerization of hybrid monomers*. Polymer Testing, 2017. **64**: p. 313-320.
13. Goodner, M.D. and C.N. Bowman, *Development of a comprehensive free radical photopolymerization model incorporating heat and mass transfer effects in thick films*. Chemical Engineering Science, 2002. **57**(5): p. 887-900.
14. Monroe, B.M. and G.C. Weed, *Photoinitiators for free-radical-initiated photoimaging systems*. Chemical Reviews, 1993. **93**(1): p. 435-448.
15. Fouassier, J.P., et al., *Photoinitiators for Free Radical Polymerization Reactions*. 2010. 351-419.
16. *Photochemistry and Photophysics of Polymer Materials*. 2010.
17. Zapka, W., *Handbook of Industrial Inkjet Printing: A Full System Approach*. 2017. 1-908.
18. Schroeder, W.F., et al., *Visible light polymerization of epoxy monomers using an iodonium salt with camphorquinone/ethyl-4-dimethyl aminobenzoate*. Polymer International, 2013. **62**(9): p. 1368-1376.
19. Kamoun, E.A., et al., *Carboxylated camphorquinone as visible-light photoinitiator for biomedical application: Synthesis, characterization, and application*. Arabian Journal of Chemistry, 2016. **9**(5): p. 745-754.
20. Klee, J.E., M. Maier, and C.P. Fik, *Applied Photochemistry in Dental Materials: From Beginnings to State of the Art*. 2015. 123-138.

21. Goodner, M.D. and C.N. Bowman, *Modeling and experimental investigation of light intensity and initiator effects on photopolymerization rate in optically opaque samples*. American Chemical Society, Polymer Preprints, Division of Polymer Chemistry, 1997. **38**(2): p. 456-457.
22. Van Wijk, A.J.M., *3D Printing with Biomaterials - Towards a Sustainable and Circular Economy*. 3D Printing with Biomaterials. 2015: IOS Press.
23. Smith, P.T., et al., *Chemical modification and printability of shear-thinning hydrogel inks for direct-write 3D printing*. Polymer, 2018. **152**: p. 42-50.
24. Han, D., et al., *Soft Robotic Manipulation and Locomotion with a 3D Printed Electroactive Hydrogel*. ACS applied materials & interfaces, 2018. **10**(21): p. 17512.
25. Distler, T. and A.R. Boccaccini, *3D printing of electrically conductive hydrogels for tissue engineering and biosensors – A review*. Acta Biomaterialia, 2019: p. <xocs:firstpage xmlns:xocs=""/>.
26. Zhu, W., et al., *Direct 3D bioprinting of prevascularized tissue constructs with complex microarchitecture*. Biomaterials, 2017. **124**: p. 106-115.
27. Markstedt, K., et al., *3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose-Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications*. Biomacromolecules, 2015. **16**(5): p. 1489.
28. Li, Y., et al., *High-piezoresistive sensitivity of silicone matrix composites with low metal filler content*. Materials Letters, 2016. **171**: p. 252-254.
29. Yi, Y., et al., *Biotemplated Synthesis of Transition Metal Nitride Architectures for Flexible Printed Circuits and Wearable Energy Storages*. Advanced Functional Materials, 2018. **28**(50): p. n/a-n/a.
30. Wang, Z., et al., *Visible Light Photoinitiation of Cell-Adhesive Gelatin Methacryloyl Hydrogels for Stereolithography 3D Bioprinting*. ACS applied materials & interfaces, 2018. **10**(32): p. 26859.
31. Melchels, F.P.W., J. Feijen, and D.W. Grijpma, *A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering*. Biomaterials, 2010. **31**(24): p. 6121-6130.
32. Hornbeck, L.J., *Digital Light Processing for high-brightness high-resolution applications*. 1997. p. 27-40.
33. Esmail, J., *Hydrogels in Tissue Engineering*. 2018: MDPI - Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
34. Grumezescu Alexandru, M., *Natural Polymer-Based Hydrogels as Scaffolds for Tissue Engineering*. 2016: Elsevier. 1-1.
35. Munim, S. and Z. Raza, *Poly(lactic acid) based hydrogels: formation, characteristics and biomedical applications*. Journal of Porous Materials, 2019. **26**(3): p. 881-901.
36. Helary, C., et al., *Concentrated collagen hydrogels as dermal substitutes*. Biomaterials, 2010. **31**(3): p. 481-490.
37. James-Bhasin, M., P.M. Siegel, and S.N. Nazhat, *A three-dimensional dense collagen hydrogel to model cancer cell/osteoblast interactions*. Journal of Functional Biomaterials, 2018. **9**(4): p. <xocs:firstpage xmlns:xocs=""/>.
38. Gnani, S., et al., *Gelatin-based hydrogel for vascular endothelial growth factor release in peripheral nerve tissue engineering*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2017. **11**(2): p. 459-470.
39. Yuan Ye, K., K.E. Sullivan, and L.D. Black, *Encapsulation of cardiomyocytes in a fibrin hydrogel for cardiac tissue engineering*. Journal of visualized experiments : JoVE, 2011(55).
40. Wang, X. and C. Liu, *Fibrin hydrogels for endothelialized liver tissue engineering with a predesigned vascular network*. Polymers, 2018. **10**(10).
41. Wang, H.Y. and Y.Q. Zhang, *Processing silk hydrogel and its applications in biomedical materials*. Biotechnology Progress, 2015. **31**(3): p. 630-640.

42. Lin, H., et al., *Optimization of photocrosslinked gelatin/hyaluronic acid hybrid scaffold for the repair of cartilage defect*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2019. **13**(8): p. 1418-1429.
43. Song, K., et al., *Three-dimensional dynamic fabrication of engineered cartilage based on chitosan/gelatin hybrid hydrogel scaffold in a spinner flask with a special designed steel frame*. Materials Science & Engineering C, 2015. **55**: p. 384-392.
44. Brito, I., et al., *Fibrin–alginate hydrogel supports steroidogenesis, in vitro maturation of oocytes and parthenotes production from caprine preantral follicles cultured in group*. Reproduction in Domestic Animals, 2016. **51**(6): p. 997-1009.
45. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Hydrogels for tissue engineering*. Chemical reviews, 2001. **101**(7): p. 1869.
46. Gaudet, I. and D. Shreiber, *Characterization of Methacrylated Type-I Collagen as a Dynamic, Photoactive Hydrogel*. Journal for Biophysical Chemistry, 2012. **7**(1): p. 1-9.
47. Djagny, K.B., Z. Wang, and S. Xu, *Gelatin: A Valuable Protein for Food and Pharmaceutical Industries: Review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2001. **41**(6): p. 481-492.
48. Yu, B. B., et al., *CULTIVATION OF HUMAN LIVER CELLS AND ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN PERFUSION BIOREACTOR*. Vestnik Transplantologii i Iskusstvennyh Organov, 2018. **20**(1): p. 70-78.
49. Patel, B., et al., *Self-assembled Collagen-Fibrin Hydrogel Reinforces Tissue Engineered Adventitia Vessels Seeded with Human Fibroblasts*. Scientific Reports, 2018. **8**(1).
50. Lotz, C., et al., *Cross-linked Collagen Hydrogel Matrix Resisting Contraction To Facilitate Full-Thickness Skin Equivalents*. ACS applied materials & interfaces, 2017. **9**(24): p. 20417.
51. Li, X., et al., *Effect of the hyaluronic acid-ploxamer hydrogel on skin-wound healing: in vitro and in vivo studies*. Animal Models and Experimental Medicine, 2019. **2**(2): p. 107-113.
52. Qian, W., et al., *Effect analysis of intradermal hyaluronic acid injection to treat enlarged facial pores*. Journal of Cosmetic Dermatology, 2018. **17**(4): p. 596-599.
53. Haugh, M.G., et al., *The application of plastic compression to modulate fibrin hydrogel mechanical properties*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2012. **16**(1): p. 66-72.
54. Aminabhavi, T.M. and S.P. Dharupaneedi, *Production of chitosan-based hydrogels for biomedical applications*. Vol. 1. 2016. 295-319.
55. Venkatesan, J., S.K. Kim, and T.W. Wong, *Chitosan and Its Application as Tissue Engineering Scaffolds*. 2015. 133-147.
56. ; Available from: https://www.strategyr.com/Marketresearch/Gelatin_Market_Trends.asp.
57. Eastoe, J.E., *The amino acid composition of fish collagen and gelatin*. The Biochemical journal, 1957. **65**(2): p. 363.
58. Badii, F. and N.K. Howell, *Fish gelatin: Structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins*. Food Hydrocolloids, 2006. **20**(5): p. 630-640.
59. Ali Md, E. and A. Nizar Nina Naquiah, *Gelatine, Collagen, and Single Cell Proteins as a Natural and Newly Emerging Food Ingredients*. 2018: Elsevier. 1-1.
60. Halpenny, G., et al., *Characterization of pHEMA-based hydrogels that exhibit light-induced bactericidal effect via release of NO*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2009. **20**(11): p. 2353-2360.
61. Du, P., et al., *Preparation and characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogel based three-dimensional dosimeter for radiotherapy*. Journal of Controlled Release, 2011. **152**: p. e193-e195.
62. Gou, X., et al., *Mechanical property of PEG hydrogel and the 3D red blood cell microstructures fabricated by two-photon polymerization*. Applied Surface Science, 2017. **416**: p. 273-280.

63. Lin, C.-C. and K. Anseth, *PEG Hydrogels for the Controlled Release of Biomolecules in Regenerative Medicine*. An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists, 2009. **26**(3): p. 631-643.
64. Sun, J., et al., *PEG derived hydrogel: A novel synthesis route under mild condition*. Materials Letters, 2012. **67**(1): p. 215-218.
65. Reinhardt, H.M., et al., *High refractive index TiO₂-PHEMA hydrogel for ophthalmological applications*. Journal of Materials Science, 2016. **51**(22): p. 9971-9978.
66. Kim, T.H., et al., *Creating stiffness gradient polyvinyl alcohol hydrogel using a simple gradual freezing–thawing method to investigate stem cell differentiation behaviors*. Biomaterials, 2015. **40**: p. 51-60.
67. Hassan, C.M. and N.A. Peppas, *Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods*. Advances in Polymer Science, 2000. **153**: p. 37-65.
68. Wahab, A.H.A., et al., *Developing functionally graded PVA hydrogel using simple freeze-thaw method for artificial glenoid labrum*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2019. **91**: p. 406-415.
69. Akhtar, M.F., M. Hanif, and N.M. Ranjha, *Methods of synthesis of hydrogels ... A review*. Saudi Pharmaceutical Journal, 2016. **24**(5): p. 554-559.
70. Liu, G., D.L. Xie, and C. Guan, *Complexation of poly(ethylene glycol) with poly(ethyl methacrylate-co-N-vinyl-2-pyrrolidone) gel based on hydrogen bonds*. Pol. J. Chem. Technol., 2013. **15**(3): p. 85-90.
71. Feldstein, M.M., G.A. Shandryuk, and N.A. Platé, *Relation of glass transition temperature to the hydrogen-bonding degree and energy in poly(N-vinyl pyrrolidone) blends with hydroxyl-containing plasticizers. Part 1. Effects of hydroxyl group number in plasticizer molecule*. Polymer, 2001. **42**(3): p. 971-979.
72. Bezemer, J.M., et al., *A controlled release system for proteins based on poly(ether ester) block-copolymers: polymer network characterization*. Journal of Controlled Release, 1999. **62**(3): p. 393-405.
73. Fakirov, S. and T. Gogeva, *Poly(Ether/Ester)s based on poly(tetramethylene terephthalate) and poly(ethylene glycol), 3. Effect of thermal treatment and drawing on the structure of the poly(ether/ester)s*. Die Makromolekulare Chemie, 1990. **191**(10): p. 2341-2354.
74. Beumer, G.J., et al., *Cell-seeding and in vitro biocompatibility evaluation of polymeric matrices of PEO/PBT copolymers and PLLA*. Biomaterials, 1993. **14**(8): p. 598-604.
75. Calucci, L., et al., *Self-aggregation of gel forming PEG-PLA star block copolymers in water*. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids, 2010. **26**(15): p. 12890.
76. Daoud-Mahammed, S., et al., *Spontaneous association of hydrophobized dextran and poly- β -cyclodextrin into nanoassemblies*. Journal of Colloid And Interface Science, 2007. **307**(1): p. 83-93.
77. Ricciardi, R., et al., *Investigation of the crystallinity of freeze/thaw poly(vinyl alcohol) hydrogels by different techniques*. Macromolecules, 2004. **37**(25): p. 9510-9516.
78. Nagura, M., T. Hamano, and H. Ishikawa, *Structure of poly(vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing and melting*. Polymer, 1989. **30**(4): p. 762-765.
79. Bruchet, M. and A. Melman, *Fabrication of patterned calcium cross-linked alginate hydrogel films and coatings through reductive cation exchange*. Carbohydrate Polymers, 2015. **131**: p. 57-64.
80. Zu, Y., et al., *Preparation and characterization of chitosan–polyvinyl alcohol blend hydrogels for the controlled release of nano-insulin*. International Journal of Biological Macromolecules, 2012. **50**(1): p. 82-87.
81. Tian, Z., W. Liu, and G. Li, *The microstructure and stability of collagen hydrogel cross-linked by glutaraldehyde*. Polymer Degradation and Stability, 2016. **130**: p. 264-270.

82. Mohamad, N., et al., *Bacterial cellulose/acrylic acid hydrogel synthesized via electron beam irradiation: Accelerated burn wound healing in an animal model*. Carbohydrate Polymers, 2014. **114**: p. 312-320.
83. Mohd Amin, M.C.I., et al., *Synthesis and characterization of thermo- and pH-responsive bacterial cellulose/acrylic acid hydrogels for drug delivery*. Carbohydrate Polymers, 2012. **88**(2): p. 465-473.
84. Kojima, T., et al., *Characterization of biopolymer hydrogels produced by γ -ray irradiation*. Radiation Physics and Chemistry, 2004. **71**(1-2): p. 235-238.
85. Kim, M.H. and W.H. Park, *Chemically cross-linked silk fibroin hydrogel with enhanced elastic properties, biodegradability, and biocompatibility*. International Journal of Nanomedicine, 2016. **11**: p. 2967-2978.
86. Roberts, J.J. and S.J. Bryant, *Comparison of photopolymerizable thiol-ene PEG and acrylate-based PEG hydrogels for cartilage development*. Biomaterials, 2013. **34**(38).
87. Das, D., T.T.H. Pham, and I. Noh, *Characterizations of hyaluronate-based terpolymeric hydrogel synthesized via free radical polymerization mechanism for biomedical applications*. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces, 2018. **170**: p. 64.
88. Lee, F., K.H. Bae, and M. Kurisawa, *Injectable hydrogel systems crosslinked by horseradish peroxidase*. Biomedical Materials, 2016. **11**(1): p. 014101.
89. Kolb, H.C., M.G. Finn, and K.B. Sharpless, *Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions*. 2001: Weinheim. p. 2004-2021.
90. Lallana, E., et al., *Click Chemistry with Polymers, Dendrimers, and Hydrogels for Drug Delivery*. An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists, 2012. **29**(4): p. 902-921.
91. Mather, B.D., et al., *Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies*. Progress in Polymer Science, 2006. **31**(5): p. 487-531.
92. Zhou, Y., et al., *Rapidly in situ forming adhesive hydrogel based on a PEG-maleimide modified polypeptide through Michael addition*. Official Journal of the European Society for Biomaterials, 2013. **24**(10): p. 2277-2286.
93. Zhu, Y., et al., *Directly photopatterning of polycaprolactone-derived photocured resin by UV-initiated thiol-ene "click" reaction: Enhanced mechanical property and excellent biocompatibility*. Chemical Engineering Journal, 2019. **366**: p. 112-122.
94. Nuttelman, C.R., et al., *Macromolecular monomers for the synthesis of hydrogel niches and their application in cell encapsulation and tissue engineering*. Progress in Polymer Science, 2008. **33**(2): p. 167-179.
95. Bryant, S.J., C.R. Nuttelman, and K.S. Anseth, *Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2000. **11**(5): p. 439-457.
96. Pertici, V., et al., *Degradable and Injectable Hydrogel for Drug Delivery in Soft Tissues*. Biomacromolecules, 2019. **20**(1): p. 149.
97. Harrane, A., et al., *Pla-based biodegradable and tunable soft elastomers for biomedical applications*. Biomedical Materials, 2011. **6**(6): p. 065006.
98. Sawhney, A.S., C.P. Pathak, and J.A. Hubbell, *Bioerodible hydrogels based on photopolymerized poly(ethylene glycol)-co-poly(.alpha.-hydroxy acid) diacrylate macromers*. Macromolecules, 1993. **26**(4): p. 581-587.
99. Tu, X., et al., *3D printed PEGDA microstructures for gelatin scaffold integration and neuron differentiation*. Microelectronic Engineering, 2016. **158**(C): p. 30-34.
100. Munoz-Pinto, D.J., et al., *Characterization of sequential collagen-poly(ethylene glycol) diacrylate interpenetrating networks and initial assessment of their potential for vascular tissue engineering*. Biomaterials, 2015. **40**: p. 32-42.
101. Wang, Y., et al., *Development of a photo-crosslinking, biodegradable GelMA/PEGDA hydrogel for guided bone regeneration materials*. Materials, 2018. **11**(8).

102. Neslihan, A., *SYNTHESIS OF CHITOSAN-BASED HYDROGEL BY USING PHOTOPOLYMERIZATION TECHNIQUE*. Anadolu University Journal of Science and Technology. A : Applied Sciences and Engineering, 2016. **17**(2): p. 391-400.
103. Pal, R.K., et al., *Mechanically robust, photopatternable conductive hydrogel composites*. Reactive and Functional Polymers, 2017. **120**: p. 66-73.
104. Kommareddy, S., D. Shenoy, and M. Amiji, *Gelatin Nanoparticles and Their Biofunctionalization*. 2007.
105. Xiao, P., et al., *Visible light sensitive photoinitiating systems: Recent progress in cationic and radical photopolymerization reactions under soft conditions*. Progress in Polymer Science, 2015. **41**(C): p. 32-66.
106. Lalevée, J., J.P. Fouassier, and J. Lalevee, *Dyes and Chromophores in Polymer Science*. 2015, London: London: Wiley.
107. Asmussen, S.V. and C.I. Vallo, *Thermal degradation of visible-light-cured thiol-methacrylate networks photoactivated with Camphorquinone*. Polymer Degradation and Stability, 2017. **137**: p. 244-250.
108. Trivedi, J.H., *Synthesis, characterization, and swelling behavior of superabsorbent hydrogel from sodium salt of partially carboxymethylated tamarind kernel powder- g -PAN*. Journal of Applied Polymer Science, 2013. **129**(4): p. 1992-2003.
109. Padua, G.W. and Q. Wang, *Nanotechnology Research Methods for Food and Bioproducts*. 2012, Hoboken, UNITED STATES: John Wiley & Sons, Incorporated.
110. Leng, Y., *Materials Characterization : Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods*. 2013, Weinheim, GERMANY: John Wiley & Sons, Incorporated.
111. Bussu, G. and A. Lazzeri, *On the use of dynamic mechanical thermal analysis (DMTA) for measuring glass transition temperature of polymer matrix fibre reinforced composites*. Journal of Materials Science, 2006. **41**(18): p. 6072-6076.