



**Politecnico
di Torino**

POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

A.a. 2020-2021

Sessione di Laurea Ottobre 2021

Tesi di Laurea Magistrale

Studio e utilizzo dell'olio di soia acrilato come agente di rinforzo meccanico in idrogeli fotoreticolati

Relatore:

Prof. Marco Sangermano

Co-relatore:

Prof.ssa Chiara Tonda Turo

Candidato:

Luca Botta

Sommario

1	Introduzione	5
2	Gli idrogeli.....	7
2.1	Definizione e proprietà di swelling.....	7
2.2	Applicazioni biomediche degli idrogeli.....	7
2.3	Reticolazione	8
2.3.1	Gel fisici.....	8
2.3.2	Gel chimici	9
2.3.3	Fotopolimerizzazione	9
2.4	Proprietà meccaniche degli idrogeli.....	12
2.5	Materiali per idrogeli.....	14
2.5.1	Gelatina di pesce e GelMA	14
2.5.2	PEGDMA	15
2.5.3	Olio di soia acrilato (ASO).....	16
2.5.4	Irgacure 819 (BAPO)	17
3	Materiali e metodi.....	19
3.1	Materiali	19
3.2	Sintesi della gelatina metacrilata	19
3.3	Sintesi dei polimeri	21
3.4	Caratterizzazione fisico-chimica degli idrogeli	23
3.4.1	Fotoreologia.....	23
3.4.2	FTIR	24
3.4.3	%Gel.....	26
3.4.4	DSC.....	26
3.4.5	DMTA.....	27
3.4.6	TGA	28
3.4.7	Swelling.....	29
3.4.8	Angolo di contatto	29
3.4.9	SEM.....	29
3.4.10	Test di compressione.....	30
3.5	Test cellulari.....	32
3.5.1	Test di citotossicità	32
3.5.2	Test di adesione cellulare	33
3.5.3	Saggio Falloidina	33
4	Risultati e discussione.....	35
4.1	Caratterizzazione fisico-chimica degli idrogeli	35

4.1.1	Fotoreologia.....	35
4.1.2	FTIR.....	36
4.1.3	%Gel.....	41
4.1.4	DSC.....	41
4.1.5	DMTA.....	43
4.1.6	TGA.....	46
4.1.7	Swelling.....	48
4.1.8	Angolo di contatto.....	50
4.1.9	SEM.....	52
4.1.10	Test di compressione.....	54
4.2	Test cellulari.....	56
4.2.1	Test di citotossicità.....	56
4.2.2	Test di adesione cellulare.....	56
4.2.3	Saggio Falloidina.....	58
5	Conclusioni e sviluppi futuri.....	60
6	Bibliografia.....	62

Abstract

Gli idrogeli sono costituiti da network polimerici idrofilici reticolati che data la loro biocompatibilità, l'alta disponibilità di precursori e il facile controllo delle proprietà fisico-chimiche sono dei materiali molto utilizzati nel campo della medicina rigenerativa. Le possibili applicazioni degli idrogeli riguardano: 1) il supporto ai tessuti biologici danneggiati come scaffolds bioattivi, 2) i sistemi a rilascio di farmaco (drug delivery systems), 3) le colture cellulari tridimensionali, 4) la biosensoristica e 5) la microfluidica. Tra le proprietà che maggiormente impattano l'interazione tra idrogelo e tessuti biologici figurano le proprietà meccaniche del materiale; in particolare la rigidità del materiale gioca un ruolo determinante nel successo o nel fallimento di un impianto. Data l'alta complessità del corpo umano, e l'ampio spettro di possibili rigidità dei tessuti biologici che varia dai 100 Pa del cervello fino ai 2-4 GPa del tessuto osseo, risulta importante progettare accuratamente il materiale in base all'applicazione scelta.

Lo scopo di questo lavoro di tesi consiste nell'utilizzare l'olio di soia acrilato (ASO) come agente di rinforzo meccanico biocompatibile per scaffold costituiti di gelatina metacrilata (GelMA) e polietilenglicole metacrilato (PEGDMA). A tal proposito sono stati sintetizzati dei copolimeri composti da GelMA/ASO e PEGDMA/ASO aventi diversi rapporti specifici per poter valutare come l'aggiunta di ASO possa influenzare le proprietà fisico-chimiche del copolimero. Gli idrogeli sono stati creati attraverso un processo di fotopolimerizzazione radicalica in presenza dell'Irgacure 819 (BAPO) utilizzato come fotoiniziatore. La composizione chimica e il grado di conversione del doppio legame C=C è stata valutata attraverso spettroscopia FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) e ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection Spectroscopy). La caratterizzazione reologica è stata utilizzata per valutare la reattività delle diverse formulazioni in seguito alla stimolazione ultravioletta. Per determinare la temperatura di transizione vetrosa (T_g) e la temperatura di degradazione dei polimeri (T_{deg}) sono state eseguite le seguenti caratterizzazioni termiche: DSC (Differential Scanning Calorimetry), DMTA Analysis (Dynamic Mechanical Thermal Analysis) e TGA (Thermogravimetric Analysis). Successivamente, si è testata la capacità di rigonfiamento in acqua e l'idrofilicità superficiale degli idrogeli attraverso swelling test e l'analisi dell'angolo di contatto. Le caratteristiche morfologiche dei copolimeri sono state osservate mediante Microscopio a Scansione Elettronica (SEM) mentre le proprietà meccaniche sono state valutate con un test di compressione uniaassiale. Infine, sono stati eseguiti dei test cellulari con dei fibroblasti umani (HH1) per determinare la citotossicità e le proprietà adesive degli scaffold.

Dalle prove di caratterizzazione fisico-chimica e dai test cellulari si evince che l'aggiunta di un rinforzante permette di modulare le proprietà chimiche e termo-meccaniche degli scaffold. Infatti, in funzione della quantità di ASO all'interno della formulazione, si può modificare la reattività del materiale, la T_g e la T_{deg} , il modulo di Young a compressione e il grado di rigonfiamento dell'idrogelo in acqua. Questi risultati hanno influenzato anche il comportamento cellulare, infatti il test di adesione superficiale tramite Cell Titer Blue e il saggio con la Falloidina hanno rivelato significative differenze tra i diversi copolimeri.

1 Introduzione

L'ingegneria tissutale rappresenta quella disciplina volta alla rigenerazione funzionale dei tessuti umani tramite l'utilizzo di cellule e biomateriali sulla base principi ingegneristici [1]. Tra i biomateriali più promettenti per applicazioni legate al tissue engineering figurano gli idrogeli, essi sono costituiti da network polimerici reticolati in grado di assorbire acqua e altri fluidi biologici senza dissolversi [2]. Il termine "idrogelo" compare nella letteratura scientifica attorno al 1900 per descrivere dei gel di sali inorganici. Tuttavia, solo dal 1960 Wichterle and Lim, riferendosi alla scoperta del poliidrossietil metacrilato (pHEMA), associano la parola idrogelo a dei network polimerici reticolati [3]. A partire dalla sintesi del pHEMA, il settore degli idrogeli ha suscitato sempre più interesse per la ricerca scientifica, in figura 1.1 è riportata un'immagine che riporta l'evoluzione del numero di articoli scientifici correlati agli idrogeli dagli anni '60 fino al 2014. Negli anni successivi alla scoperta di Wichterle and Lim la ricerca si è focalizzata sulla reticolazione di semplici polimeri sintetici per applicazione oftalmica e, a scopo di ricerca, nell'ambito del drug delivery. Tali polimeri venivano sintetizzati attraverso la polimerizzazione di monomeri idrosolubili oppure tramite reticolazione di polimeri idrofilici. Tra i primi materiali ad essere utilizzati a tale scopo troviamo: il poliidrossietil metacrilato (pHEMA), il polietilen glicole (PEG) e il polivinil alcol (PVA) [4]. Attorno agli anni '70 l'attività di ricerca si è spostata verso gli idrogeli termo-sensibili e pH-sensibili. Questa nuova generazione di idrogeli era capace di rispondere a ad un determinato stimolo, ad esempio, una variazione di acidità o di temperatura poteva stimolare il rilascio di un medicinale immagazzinato oppure una transizione sol-gel [5]. Appartengono a questa generazione i copolimeri formati da PEG e poliesteri (PLA, PLGA, PGA) e il Pluronic (PEO-PPO-PEO). Questa tipologia di polimeri è importante in quanto ha dato un notevole impulso all'applicazione "in situ" degli idrogeli [6]. Successivamente, a partire dagli anni '90, si è cercato di sintetizzare materiali che consentissero di modificare selettivamente le caratteristiche meccaniche, termiche e la velocità di degradazione mantenendo al contempo la possibilità di essere formati in situ. Tutto ciò ha permesso lo sviluppo di idrogeli sempre più complessi e avanzati con un livello di tossicità sempre più basso. Ad oggi, gli idrogeli sono diventati materiali molto interessanti per il mondo della medicina, infatti, agendo sulla composizione e i parametri di sintesi è possibile modulare le proprietà fisico-chimiche dei gel in modo da ottenere un materiale che approssima molto bene il microambiente cellulare. Inoltre, diversi medicinali e altre biomolecole possono essere incorporate all'interno del reticolo e rilasciate in ambiente fisiologico [4].

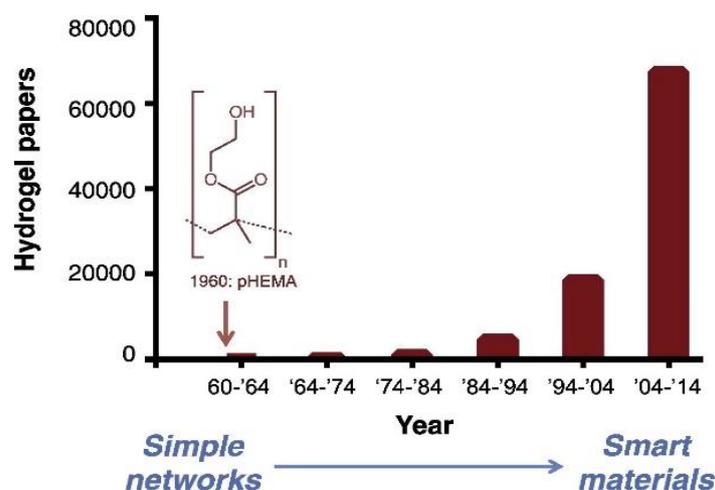


Figura 1.1: Evoluzione del numero di articoli scientifici riguardanti gli idrogeli

Tra i parametri che influenzano maggiormente il comportamento cellulare vi sono le proprietà meccaniche del substrato [7][8], e in particolare la rigidità del materiale. L'obiettivo di questo progetto di tesi è quello di studiare come il modulo elastico degli idrogeli possa influire sull'adesione e la proliferazione cellulare. Per esaminare questi aspetti si sintetizzeranno degli idrogeli composti da gelatina metacrilata (GelMA), polietilenglicole metacrilato (PEGDMA) e olio di soia acrilato (ASO) mediante fotopolimerizzazione radicalica. GelMA e PEGDMA rappresentano i componenti principali degli scaffold mentre l'ASO verrà utilizzato come materiale di rinforzo meccanico. I copolimeri verranno genericamente chiamati GelMA/ASO e PEGDMA/ASO, per ognuno di essi si sintetizzeranno 5 scaffold aventi diverse quantità di ASO in modo da modulare le proprietà meccaniche dei gel. Questi scaffold verranno poi caratterizzati dal punto di vista termico, meccanico e reologico. Infine si svolgeranno dei test cellulari, il primo test riguarderà la biocompatibilità degli idrogeli dove per biocompatibilità si intende la capacità di un materiale di svolgere la sua funzione all'interno del corpo umano senza generare prodotti di scarto tossici per l'organismo. Successivamente, si studieranno le proprietà adesive e proliferative.

Questo lavoro di tesi è suddiviso in 4 capitoli. Il capitolo 2 è dedicato agli idrogeli, vengono presentati gli aspetti generali, il processo di reticolazione e le applicazioni in campo biomedico. Dopodiché, viene illustrato nel dettaglio il processo di fotopolimerizzazione radicalica e gli stadi di inizio-propagazione-terminazione. Successivamente, vi sarà un paragrafo in cui vengono discusse le proprietà meccaniche degli idrogeli, dopo una breve introduzione che spiega come le proprietà meccaniche degli idrogeli possono influire sul comportamento cellulare, vengono descritti i principali metodi per modulare la rigidità di un idrogelo. Infine, vengono illustrate le principali tipologie di materiali usate per la produzione di idrogeli con un approfondimento sulla tipologia di fotoiniziatore e sui polimeri utilizzati nella tesi. Nel capitolo 3 vengono presentate le metodologie sperimentali utilizzate per la sintesi e la caratterizzazione gli idrogeli. il capitolo 4 è dedicato alla presentazione dei risultati ottenuti. Nel capitolo finale vengono discussi i risultati sperimentali ed esposte le conclusioni della tesi.

2 Gli idrogeli

2.1 Definizione e proprietà di swelling

Gli idrogeli sono costituiti da network polimerici più o meno complessi. Gli idrogeli, teoricamente, possono essere costituiti da un qualsiasi polimero idrofilico, ne consegue che il termine “Idrogelo” comprende una vasta gamma di polimeri con proprietà fisico-chimiche diverse. Tuttavia, solo i polimeri reticolati sono stabili in ambiente fisiologico. L’assorbimento di acqua, comunemente chiamato “swelling”, è la caratteristica principale degli idrogeli [9][10]. Solitamente la quantità di acqua immagazzinata è molto alta, questo conferisce agli idrogeli delle caratteristiche meccaniche molto simili a quelle dei tessuti naturali. Quando un idrogelo secco viene immerso in una soluzione acquosa, le molecole d’acqua iniziano a penetrare nelle maglie del polimero reticolato causando un’espansione del reticolo ed un aumento di peso dell’idrogelo. La capacità intrinseca degli idrogeli di assorbire acqua deriva dalla presenza di gruppi idrofilici all’interno della catena polimerica come ad esempio: $-NH_2$, $COOH$, $-OH$, $-CONH_2$, $-CONH-$ e $-SO_3H$. Il processo di swelling è limitato nel tempo in quanto le forze osmotiche vengono bilanciate dalla resistenza delle maglie del polimero; questo equilibrio di forze definisce il grado di rigonfiamento a regime, il quale può essere calcolato attraverso la formula:

$$\text{Grado di swelling} = \frac{(P_{\infty} - P_0) * 100}{P_0}$$

P_{∞} : *Peso a plateau*

P_0 : *Peso iniziale*

2.2 Applicazioni biomediche degli idrogeli

L’utilizzo degli idrogeli nel settore biomedico rappresenta l’applicazione più importante di questa tipologia di materiali, in figura 2.1 è riportata un’immagine che espone in quali campi della medicina possono essere impiegati gli idrogeli. Gli idrogeli, attualmente, possono essere utilizzati nel campo del drug delivery, come guida rigenerativa dei tessuti danneggiati (scaffold a base di idrogeli) oppure come gel iniettabili contenenti cellule e altre biomolecole [11][12]. In particolare, l’utilizzo degli idrogeli in ingegneria tissutale risulta di notevole importanza. Eventuali problematiche ai tessuti possono originarsi per varie cause, ad esempio interventi chirurgici o malattie. Il processo rigenerativo naturale prevede una migrazione di cellule adiacenti che iniziano a secernere matrice extracellulare (ovvero l’impalcatura naturale che guida la rigenerazione cellulare). Successivamente cominciano a proliferare riparando completamente il danno tissutale. Tuttavia, non sempre questa rigenerazione naturale è sufficiente a ricreare un tessuto funzionale se il danno è molto esteso. Si calcola che, nei soli Stati Uniti, siano più di 120'000 i casi in attesa di un trapianto e circa 8000 le persone che muoiono ogni anno per carenza di organi sostitutivi. In questo ambito l’ingegneria tissutale può fornire tessuti sintetizzati in vitro per un trapianto diretto oppure scaffolds come guida nella proliferazione delle cellule adiacenti [13][14][15]. Affinché un idrogelo possa essere utilizzato in ambito clinico deve soddisfare diversi requisiti legati alla non-tossicità [8]. Un idrogelo per supportare la crescita cellulare e il differenziamento deve essere chimicamente biocompatibile e i suoi prodotti di degradazione non devono essere tossici. Inoltre, idealmente, il materiale deve includere dei fattori di crescita o differenziativi, la struttura deve essere porosa e i pori devono essere interconnessi in modo che vi sia una distribuzione omogenea di nutrienti. Infine, lo scaffold deve resistere dal punto di vista meccanico alle sollecitazioni fisiologiche del sito di impianto [16][17].

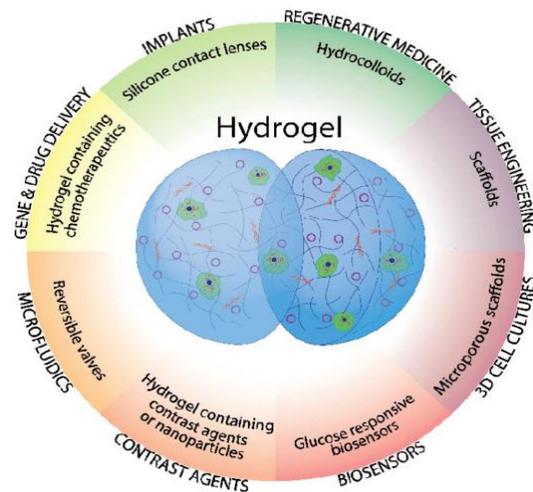


Figura 2.1: Applicazioni biomediche degli idrogeli

2.3 Reticolazione

La reticolazione è una reazione in cui si formano dei legami tra diverse catene polimeriche. In base al tipo di legame è possibile distinguere gli idrogeli fisici, le cui catene sono legate da interazioni secondarie, e gli idrogeli chimici, in cui la reticolazione prevede la formazione di legami chimici covalenti o ionici [18].

2.3.1 Gel fisici

Tra le possibili interazioni secondarie e meccanismi che generano i gel fisici possiamo trovare [9][10][18]:

- Legami ad idrogeno: in questo caso il nodo tra le catene è un legame ad idrogeno, esso si sviluppa tra molecole che presentano un legame covalente tra un atomo molto elettronegativo e l'idrogeno. Un esempio è il legame tra l'ossigeno del polietilenglicole e il gruppo carbonilico dell'acido acrilato/metacrilato.
- Polimeri anfifilici e copolimeri a blocchi: queste tipologie di polimeri possiedono la capacità di autoassemblarsi in un idrogel nel momento in cui vengono posti in soluzione acquosa. Le componenti idrofiliche del polimero interagiscono con l'acqua mentre i domini idrofobici si organizzano in micelle. Per esempio, i copolimeri a blocchi PEG/PBT oppure PEG/PLGA possono essere utilizzati per la sintesi di idrogeli fisici in cui il PEG costituisce la componente idrofila e il PBT e PLGA rappresentano la componente idrofoba.
- Cristallizzazione di stereocomplessi: La gelificazione mediante la formazione di miscele stereocomplesse tra polimeri aventi differente tatticità, tale miscelazione induce formazione di legami deboli che permettono l'assemblaggio della struttura supramolecolare. Le strutture stereocomplesse possiedono diverse proprietà rispetto ai leganti liberi, ad esempio la miscela tra l'acido L-polilattico e D-polilattico provoca un aumento della temperatura di fusione da 170 °C a 230 °C.
- Interazioni ioniche: in questo caso si utilizzano le cariche elettriche presenti all'interno della catena polimerica per far gelificare una soluzione polimerica, ad esempio per la sintesi di un idrogel a base di alginato si sfrutta l'interazione tra le cariche negative del gruppo carbossilico deprotonato e lo ione Ca^{2+} .
- Interazioni proteiche: in questo caso si utilizzano le interazioni tra proteine ingegnerizzate per far avvenire una transizione sol-gel, ad esempio il legame specifico tra anticorpo e antigene. Il vantaggio delle proteine ingegnerizzate è la possibilità di controllare le proprietà fisico-chimiche agendo sulla sequenza peptidica.

2.3.2 Gel chimici

Il processo di reticolazione chimica avviene attraverso una reazione di reticolazione, denominata "curing". Per mezzo di questa reazione la soluzione polimerica diventa un materiale solido reticolato attraverso l'instaurazione di legami forti tra le diverse catene. I gel reticolati chimicamente, sono più stabili e possiedono proprietà meccaniche migliori rispetto ai gel fisici [8][19].

- Reticolazione termica: In una reticolazione termica si utilizza un iniziatore termosensibile. Questo tipo di iniziatore, quando esposto a una fonte di calore, libera dei radicali liberi reattivi che provocano l'inizio della reazione di reticolazione. Tipici esempi di iniziatori termici sono l'azobisisobutirronitrile e il perossido di benzoile [20].
- Reticolazione mediante irraggiamento ad alta energia: Si sfrutta l'irraggiamento ad alta energia (100 KeV) attraverso raggi γ oppure e-beam per indurre la reticolazione di monomeri idrosolubili, un vantaggio di questa tecnica è che non è necessario utilizzare un agente di crosslinking né ulteriori additivi [21][22].
- Reticolazione attraverso fotopolimerizzazione radicalica: La fotopolimerizzazione radicalica è una polimerizzazione a catena in cui l'interazione tra raggi UV e un fotoiniziatore genera dei radicali liberi. I radicali liberi sono entità molecolari molto reattive che danno il via alla reazione di reticolazione. Se nella resina sono presenti delle insaturazioni, i radicali liberi tendono ad aprire il doppio legame C=C liberando un sito per la formazione di un legame di reticolazione [23][24].
- Reticolazione utilizzando gli enzimi: l'ultimo metodo di reticolazione prevede la sintesi di un legame covalente attraverso l'attività enzimatica. Si tratta di un metodo utilizzato soprattutto per la sintesi di idrogeli iniettabili per applicazioni in situ. Il processo prevede di iniettare i precursori polimerici nel corpo umano, i quali gelificano in un secondo momento attraverso l'azione degli enzimi [18].

2.3.3 Fotopolimerizzazione

La fotopolimerizzazione rappresenta una particolare reazione di polimerizzazione in cui si utilizza una radiazione luminosa come fonte di innesco della reazione [25]. Negli ultimi anni, la ricerca nell'ambito della fotopolimerizzazione ha suscitato grande interesse per motivi ecologici ed economici; si tratta infatti di una tecnica rapida, a bassa richiesta energetica, versatile, che non richiede alte temperature e non ha un rilascio di componenti volatili. La possibilità di poter creare i network a temperatura ambiente ha reso i polimeri fotoreticolabili molto utilizzati nelle applicazioni biomediche dove le alte temperature costituiscono un limite. I fotopolimeri sono attualmente utilizzati nel campo dell'ingegneria tissutale, medicina, microelettronica, ottica e nelle otturazioni dentali [26]. Le formulazioni fotoreticolabili sono costituite da una resina e da un fotoiniziatore che, se esposto a una radiazione UV o visibile, attiva la reazione di reticolazione attraverso la formazione di siti attivi [25].

Come è possibile osservare dalla figura 2.2, una formulazione fotoreticolabile è una miscela complessa che può essere costituita da numerosi componenti: una soluzione di monomeri e oligomeri, fotoiniziatore, solventi, stabilizzanti, fotosensibilizzanti. La soluzione di monomeri e oligomeri contiene le singole unità ripetenti che andranno a costituire polimero una volta reticolato. Solitamente, queste soluzioni di monomeri ed oligomeri contengono specie chimiche metacrilate/acrilate e possono presentare una struttura alifatica, cicloalifatica oppure aromatica. In genere, questi monomeri sono polifunzionali, ovvero possiedono più siti reattivi per ogni unità strutturale [25].

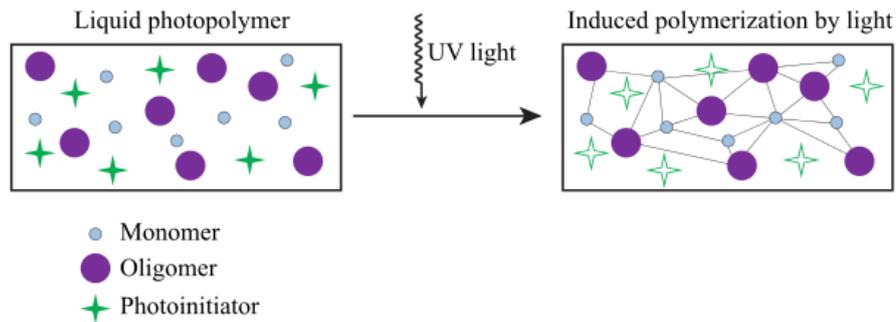


Figura 2.2: Fotoreticolazione di una soluzione polimerica

Il fotoiniziatore può essere utilizzato in combinazione con un fotosensibilizzante che serve ad aumentare il picco di assorbimento del fotoiniziatore [25]. Attraverso i raggi UV, il fotoiniziatore subisce una trasformazione e converte l'energia luminosa in energia chimica sottoforma di intermedi reattivi (radicali liberi) che danno il via alla reazione. Questa tipologia di fotopolimerizzazione è tipica dei materiali acrilati e metacrilati (vedi immagine 2.3). I fotopolimeri acrilati sono molto reattivi, tuttavia presentano una serie di svantaggi, ad esempio il restringimento post-polimerizzazione è abbastanza significativo (5-20% del volume) con conseguenti problematiche legate all'incurvamento e arricciamento del campione, inoltre la reazione viene inibita dall'ossigeno [19].

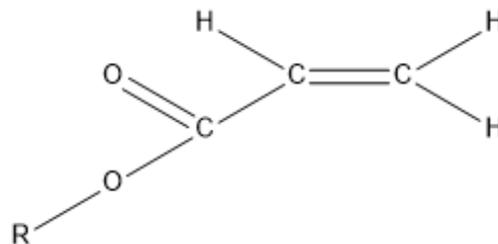


Figura 2.3: Gruppo funzionale acrilato

Come tutte le polimerizzazioni a catena, la fotopolimerizzazione radicalica si compone di 3 fasi: inizio-propagazione-terminazione, generalmente, queste reazioni formano delle catene polimeriche molto lunghe in tempi ristretti [20][23][24]. La fase iniziale si compone di due step, la formazione dei radicali liberi e l'addizione del primo monomero. La generazione dei radicali liberi è associata alla fotolisi del fotoiniziatore mentre il legame del primo monomero avviene attraverso la rottura del legame π del doppio legame (figura 2.4) [20].

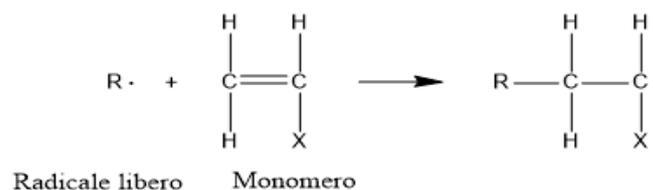


Figura 2.4: Inizio

Nella fase di propagazione i radicali reagiscono con le altre molecole di monomero generando dei macroradicali sempre più grandi, durante questa fase la soluzione diventa sempre più viscosa e solida. L'aggiunta dei monomeri alla catena polimerica avviene ricorsivamente, ogni volta che si lega un monomero all'estremità della catena si riforma il sito attivo per l'aggiunta del prossimo monomero (figura 2.5) [20].

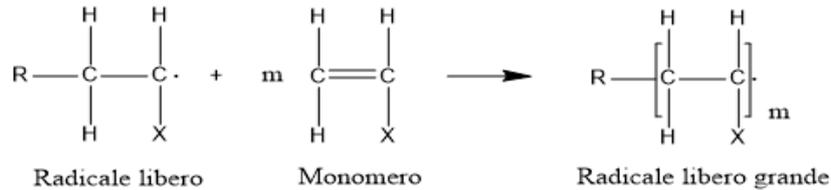


Figura 2.5: Propagazione

L'ultimo step della fotopolimerizzazione radicalica è la terminazione, quest'ultima fase avviene quando la resina fotopolimerizzabile diventa troppo viscosa per permettere la diffusione dei monomeri verso i siti attivi. la terminazione avviene attraverso la ricombinazione di due catene polimeriche (vedi immagine 2.6) oppure attraverso dismutazione (vedi immagine 2.7). La ricombinazione avviene quando due catene in accrescimento si uniscono tra di loro formando un'unica specie non radicale. Nella terminazione per dismutazione una catena polimerica si comporta come specie accettore mentre l'altra agisce come donatore. La forma più comune di dismutazione prevede la cattura di un atomo di idrogeno da parte della molecola accettore, al contempo, la catena donatrice subisce una reazione di eliminazione instaurando un doppio legame C=C.

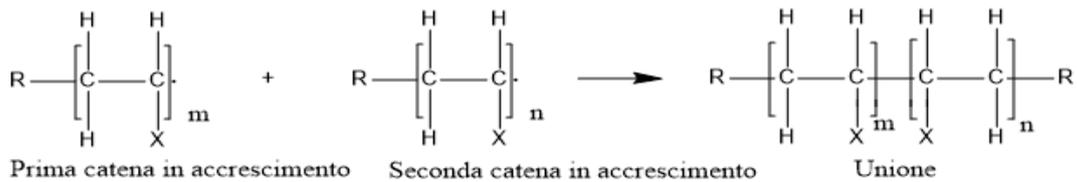


Figura 2.6: Ricombinazione

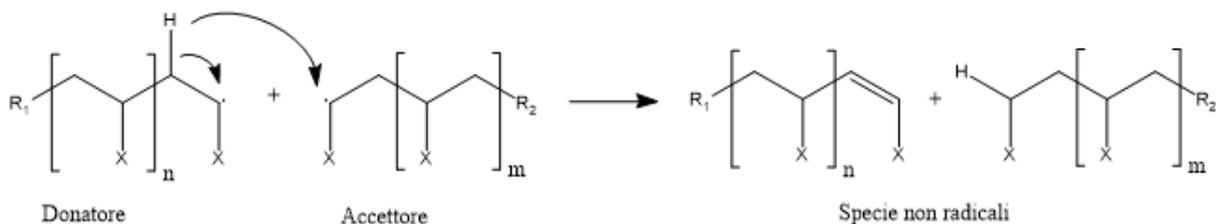


Figura 2.7: Dismutazione

2.4 Proprietà meccaniche degli idrogeli

Le proprietà meccaniche influenzano la compatibilità tra l'idrogelo e i tessuti biologici [7][8]. Le cellule umane sono continuamente sottoposte a diversi tipi di stimoli meccanici: taglio, compressione e trazione; pertanto, uno scaffold impiantato deve essere abbastanza rigido da sorreggere sé stesso e tutti i carichi fisiologici generati dai tessuti circostanti [23][27][28]. Tuttavia, non tutti i tessuti umani possiedono le stesse proprietà meccaniche, si pensi ad esempio alla differenza tra tessuto osseo e tessuto adiposo. Inoltre, la rigidità di un tessuto è influenzata dall'invecchiamento o da eventuali patologie che causano un rimodellamento della matrice extracellulare. Molti studi hanno evidenziato come l'impianto di materiali con caratteristiche meccaniche non conformi al tessuto sostituito portavano al fallimento dell'impianto [29]. Ne consegue l'importanza di poter modulare la rigidità di un idrogelo in modo da renderlo compatibile con diversi tessuti [30] (figura 2.8).

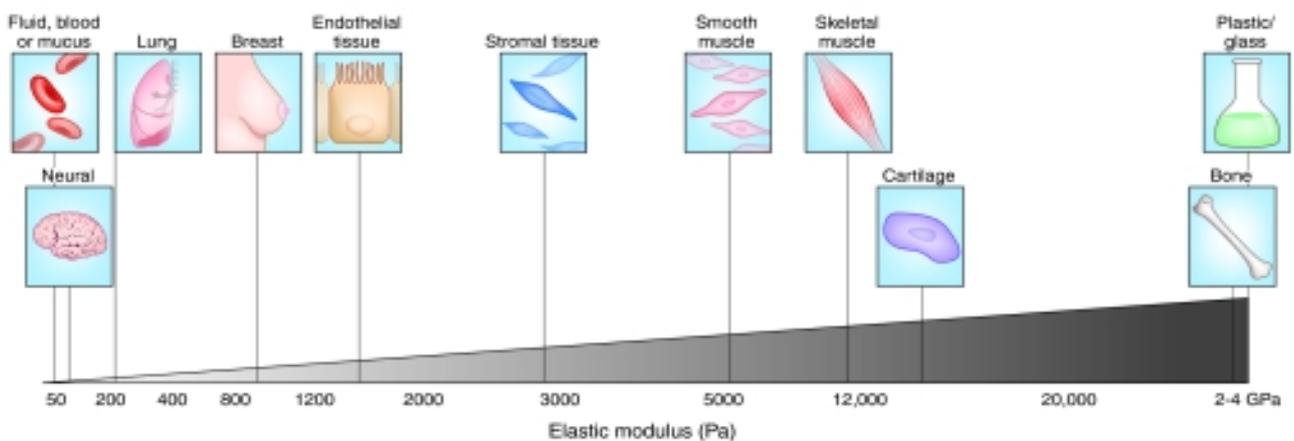


Figura 2.8: Rigidità dei tessuti umani

Infatti, la rigidità di un substrato influenza in modo molto consistente il comportamento cellulare. Le cellule, tramite i loro recettori integrinici, possono percepire le proprietà fisiche dei substrati attraverso il processo di meccano-trasduzione. Questi recettori connettono il substrato adesivo con i filamenti di F-actina del citoscheletro, a sua volta legato con il nucleo cellulare. Questo legame tra cellule e il mondo esterno è sia di tipo meccanico che biochimico, quando una cellula aderisce a un substrato adesivo riorganizza il suo citoscheletro e, attraverso meccanismi di signalling e pathway biochimici, trasmette al nucleo informazioni che possono regolare l'attività cellulare. A conferma di questo signalling cellulare, è stato osservato che è possibile indurre un differenziamento specifico verso linee cellulari diverse (osteociti, miociti, adipociti...) coltivando cellule staminali mesenchimali a contatto con substrati aventi diverse rigidità. Anche la migrazione cellulare risulta fortemente influenzata dalle proprietà meccaniche dello scaffold, infatti, le cellule generalmente tendono a migrare da zone più soft verso regioni più rigide [23][31][32].

Esistono diversi metodi per alterare il comportamento meccanico di uno scaffold, ad esempio, per i polimeri metacrilati è possibile agire sulle seguenti grandezze [33]:

- Concentrazione della soluzione del polimero
- Esposizione UV
- Temperatura di reticolazione
- Grado di metacrilazione
- Concentrazione di fotoiniziatore
- Intensità di radiazione UV
- Tipologia di solvente

Il metodo più semplice per alterare la rigidità di un polimero reticolato consiste nel modificare i parametri di reticolazione in quanto dipendono solamente dall'apparato sperimentale. Ad esempio, tempo di esposizione e intensità di radiazione luminosa influenzano il valore di rigidità dell'idrogel alterando il grado di conversione del doppio legame C=C. In figura 2.9 è possibile osservare l'andamento del modulo elastico in funzione di questi due parametri su un gel di poliacriammide [23][32][34].

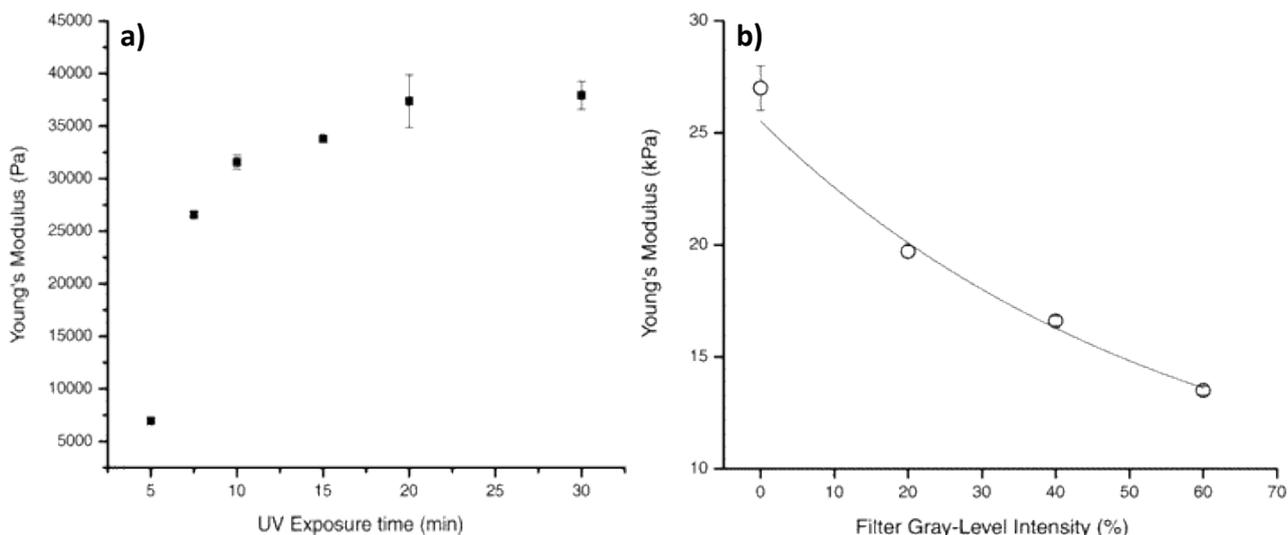


Figura 2.9: Andamento del modulo elastico in funzione del tempo di esposizione (a) e dell'intensità di radiazione (b) su un gel di poliacriammide

Un'altra tecnica per modificare le proprietà di un idrogel consiste nell'utilizzare un altro polimero come rinforzante. Infatti, la reticolazione di un idrogel copolimerizzato permette di combinare le caratteristiche meccaniche e termiche dei singoli polimeri [35]. Esistono innumerevoli materiali sintetici e naturali che possono essere utilizzati come sostegno meccanico, un esempio è il copolimero composto da GelMA e destrano metacrilato [35]. Il destrano metacrilato (DexMA) è un polisaccaride che possiede delle ottime proprietà meccaniche. La sintesi di un idrogel composto da entrambi i polimeri consente di accoppiare le ottime proprietà adesive della gelatina metacrilata con le proprietà meccaniche del destrano. In figura 2.10 è riportato l'effetto di irrigidimento provocato dall'aggiunta di DexMA con 3 diversi gradi di metacrilazione (L: basso, M: medio, H: alto) [35].

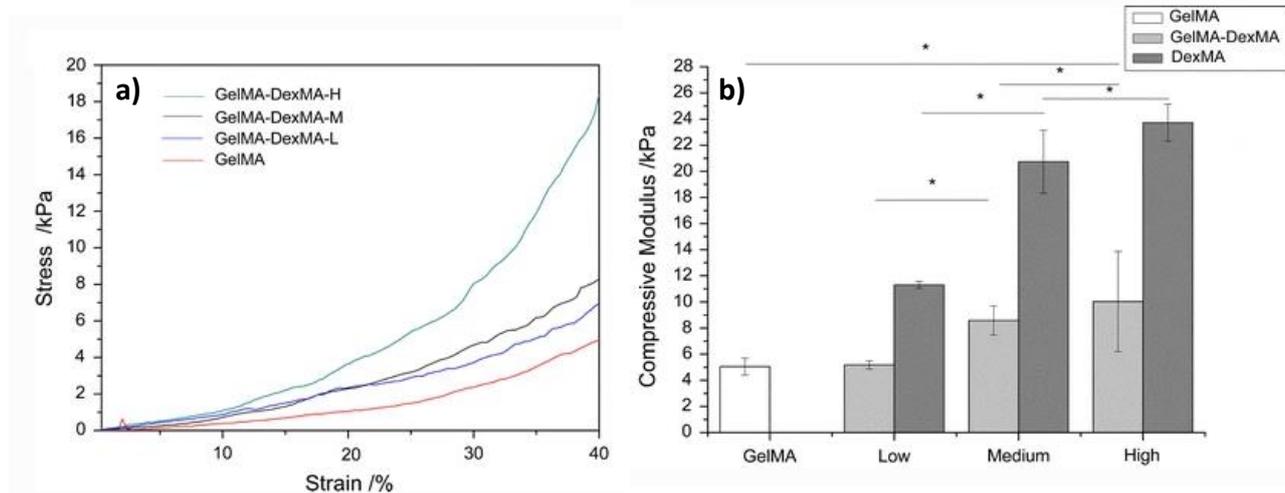


Figura 2.10: Curve sforzo deformazione (a) e misura del modulo elastico (b) dei provini GelMA/DexMA

Un altro materiale che è stato utilizzato come sostegno meccanico per idrogeli composti di gelatina metacrilata è l'alginato [36][37]. L'alginato è un copolimero naturale formato da blocchi di α -D-mannuronato (M) e β -L-gulonato (G) che forma un gel fisico in presenza di ioni Ca^{2+} tramite una reticolazione ionica. Accoppiando l'alginato con un polimero fotoreticolabile si genera un network interpenetrato che gelifica sia mediante interazioni fisiche che attraverso legami chimici, ciò permette un migliore controllo delle proprietà meccaniche dell'idrogelo [37].

L'olio di soia acrilato è stato utilizzato con successo per modulare le caratteristiche meccaniche e degradative di alcuni polimeri sintetici come l'acido polilattico [38] e per incrementare la resistenza meccanica di idrogeli a base di PVA [39]. Inoltre, presenta delle caratteristiche molto promettenti per un rinforzante. In particolare la biocompatibilità, il costo basso e la presenza di gruppi fotopolimerizzabili.

2.5 Materiali per idrogeli

I materiali per la produzione di idrogeli si suddividono in due grandi famiglie: polimeri naturali e polimeri sintetici. I polimeri naturali possono essere proteine come collagene, elastina, gelatina oppure polisaccaridi come amido, chitosano, alginato. Questi polimeri possono essere adesivi nei confronti delle cellule anche senza ulteriori modifiche superficiali, tuttavia possiedono una serie di svantaggi: sono poco stabili in ambiente fisiologico, generalmente possiedono scarse proprietà meccaniche, possono subire una veloce degradazione enzimatica e in base alla loro origine possono avere composizioni molto differenti. I polimeri sintetici come PEG, PLA, PLGA, al contrario, hanno migliori proprietà meccaniche, sono stabili in ambiente fisiologico e sono riproducibili, tuttavia non contengono sequenze adesive per le cellule. Solitamente queste due famiglie di materiali vengono combinate tra loro in modo da creare scaffolds con buone proprietà meccaniche e alte capacità adesive [16].

In questo lavoro di tesi si realizzeranno degli scaffold bioartificiali composti da: gelatina di pesce metacrilata (GelMA) e polietilenglicole dimetacrilato (PEGDMA) con olio di soia acrilato (ASO) come rinforzante. La GelMA verrà utilizzata per la sua elevata bioattività, il PEGDMA (derivante dal petrolio) verrà utilizzato per creare scaffold parzialmente bio.

2.5.1 Gelatina di pesce e GelMA

La gelatina è un polimero naturale che deriva dal collagene attraverso reazioni di denaturazione acida o basica [40]. Negli ultimi anni l'interesse verso la gelatina di pesce è cresciuto molto, essa è ampiamente accettata da tutte le religioni al contrario della gelatina bovina e suina, inoltre non è affetta dall'encefalopatia spongiforme bovina (morbo della mucca pazza). Il collagene, da cui proviene la gelatina, è una proteina fibrosa formata da una tripla elica di tropocollagene. I legami a idrogeno che mantengono uniti i tre filamenti di tropocollagene vengono rotti durante il processo di denaturazione e si genera una struttura di tipo *random coil* idrosolubile. Le proprietà fisico-chimiche della gelatina possono essere influenzate da innumerevoli fattori tra cui troviamo: la provenienza dell'animale, le condizioni ambientali e il metodo di denaturazione [41]. La gelatina presenta numerose caratteristiche che la rendono particolarmente adatta per le applicazioni biomedicali: è citocompatibile, biodegradabile, economica e non stimola la reazione del sistema immunitario. Essa mantiene le sequenze bioattive del collagene, ad esempio, la sequenza Arg-Gly-Asp (RGD) che promuove l'adesione, il differenziamento e la crescita cellulare [42]. Tuttavia, a causa del processo di denaturazione, la gelatina perde la stabilità strutturale del collagene e diventa idrosolubile, di conseguenza non è direttamente utilizzabile per la produzione di idrogeli [42]. Per ottenere un idrogelo mediante irraggiamento UV è necessario funzionalizzare la gelatina con gruppi fotoreticolabili come il gruppo metacrilato che comprende un doppio legame C=C (vedi figura 2.11 per la composizione chimica della gelatina e della GelMA) [40].

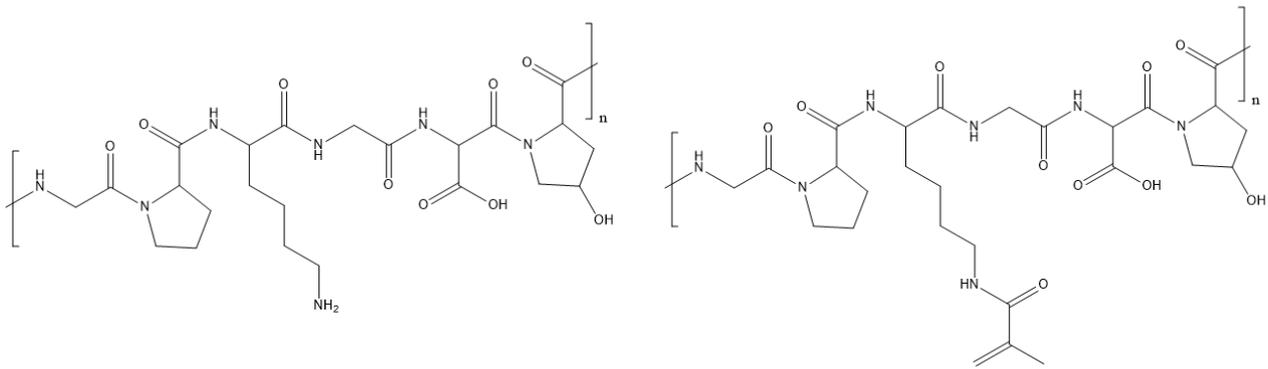


Figura 2.11: Struttura chimica della gelatina (a sinistra) e della GelMA (a destra)

Il polimero reticolato assume una superficie porosa con una dimensione media dei pori dell'ordine dei micrometri come riportato nell'immagine 2.12. Tale costituzione risulta molto importante per l'adesione e la crescita cellulare in quanto fornisce una superficie biomimetica e un corretto apporto di nutrienti [42][43].

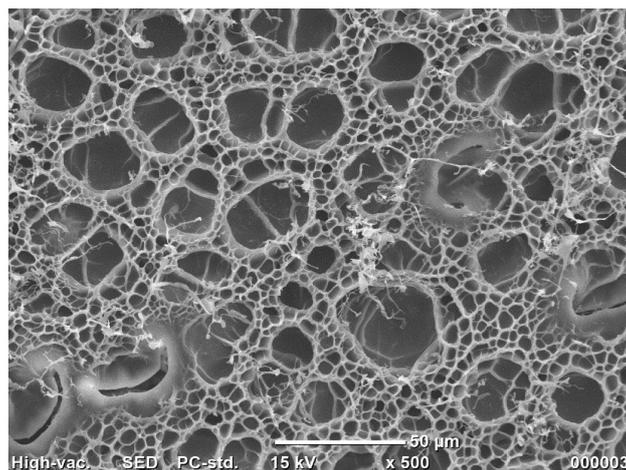


Figura 2.12: Morfologia di un idrogelo composto da GelMA

2.5.2 PEGDMA

Il PEGDMA (polietilenglicole dimetacrilato) formato da un polietere idrofilico con struttura lineare derivato dal petrolio (PEG) funzionalizzato alle estremità con due gruppi metacrilati come riportato in figura 2.13. La sintesi del PEGDMA prevede di far reagire il PEG con l'acido metacrilico per 4 giorni a temperatura ambiente. Successivamente, il PEGDMA viene ottenuto attraverso una precipitazione di dietil etere e una filtrazione a vuoto [44]. Il PEGDMA è un polimero commerciale molto utilizzato in drug delivery e nelle applicazioni che richiedono l'utilizzo di materiali antiadesivi. Gli scaffold basati sul PEG presentano numerosi vantaggi, sono biocompatibili, idrofilici, non scatenano la risposta immunitaria, oltre a ciò, siccome si basano su un polimero sintetico, permettono un facile controllo sull'architettura e sulla rigidità del polimero [45][46][47]. Tuttavia, gli idrogeli composti esclusivamente da PEGDMA, non costituiscono un ambiente ideale dal punto di vista cellulare, infatti a causa della loro natura bioinerte non supportano l'adesione e la proliferazione, in più, il PEG è un polimero non biodegradabile. A tal proposito, è possibile funzionalizzare gli idrogeli di PEG con dei peptidi adesivi per aumentare la bioattività del materiale, inoltre, per rendere il polimero più facilmente

degradabile dagli enzimi si può sintetizzare un copolimero inserendo anche dei poliesteri (PLA, PLGA e PGA) all'interno della catena [45].

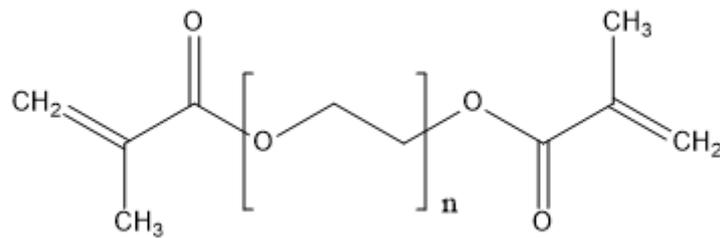


Figura 2.13: Struttura chimica del PEGDMA

2.5.3 Olio di soia acrilato (ASO)

Gli oli vegetali sono una miscela di lipidi derivante da semi o frutti oleosi, essi sono composti soprattutto da trigliceridi con una certa distribuzione di acidi grassi. Gli oli vegetali vengono principalmente associati settore agroalimentare, tuttavia, l'utilizzo come materiale per la sintesi dei polimeri rappresenta una valida alternativa ai tradizionali prodotti petrolchimici (vedi immagine 2.14 per le possibili applicazioni degli oli vegetali). Per quanto riguarda il settore biomedico, gli oli vegetali sono materiali molto interessanti data la loro biocompatibilità, biodegradabilità e i costi molto bassi [48][49]. Per tutti questi motivi, l'utilizzo di oli vegetali come copolimeri e additivi per la sintesi di materiali più ecologici dal punto di vista ambientale è una prassi sempre più in espansione [50]. Essi sono stati utilizzati per la realizzazione di un gran numero di biopolimeri:

- Poliesteri
- Poliuretani
- Poliammidi
- Polimeri vinilici
- Polimeri epossidici

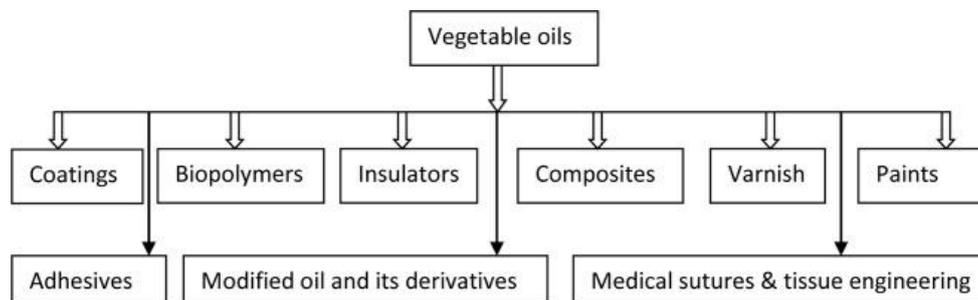


Figura 2.14: Applicazioni degli oli vegetali

L'olio di soia è un olio vegetale formato da trigliceridi aventi diversi tipi di acidi grassi (acido linoleico, stearico, palmitico). La caratteristica principale degli acidi grassi è l'elevata presenza di insaturazioni che consentono una facile funzionalizzazione. Per ottenere una resina fotoreticabile a base di olio di soia è innanzitutto necessario sintetizzare l'olio di soia epossidato (ESO), tale reazione viene realizzata miscelando l'olio di soia con acido perossiacetico. Successivamente, la reazione per la sintesi dell'ASO consiste nel far reagire l'ESO

con acido acrilico per 5 ore a 120 °C in presenza di un catalizzatore (trifenilfosfina) e un inibitore per impedire l'autopolimerizzazione del polimero. Il catalizzatore provoca l'apertura dell'anello epossidico dell'ESO e libera un sito di legame per l'acido acrilico formando l'olio di soia acrilato (vedi figura 2.15 per la struttura chimica dell'ASO). La soluzione viene poi miscelata con butanone per rimuovere l'acido acrilico non reagito [51][52].

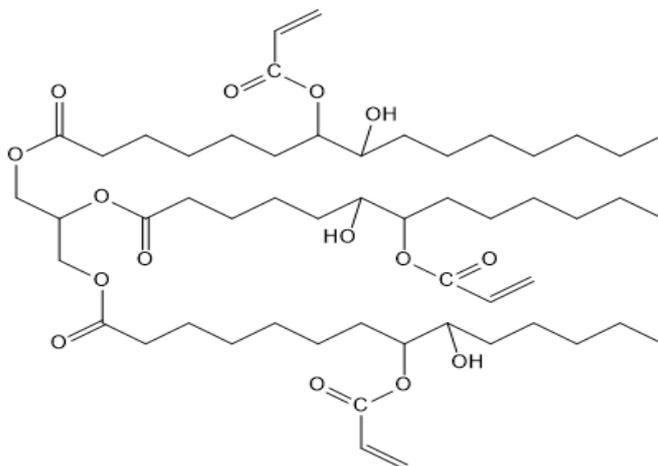


Figura 2.15: Struttura chimica dell'ASO

2.5.4 Irgacure 819 (BAPO)

Affinché possa avvenire la reazione di fotopolimerizzazione radicalica è necessario utilizzare un fotoiniziatore. Il fotoiniziatore è una specie chimica la cui decomposizione attraverso esposizione ai raggi UV, provoca il rilascio di intermedi di reazione reattivi, in questo caso, radicali liberi [24]. In base alla reazione che sviluppa le specie radicali, è possibile suddividere i fotoiniziatori in due tipologie:

- Fotoiniziatori di tipo I (reazione di Norrish I)
- Fotoiniziatori di tipo II (reazione di Norrish II)

In presenza di raggi UV, il fotoiniziatore di tipo I passa in uno stato eccitato e va incontro a una scissione omolitica del legame σ tra il carbonio carbonilico e il carbonio α come raffigurato in figura 2.16. tale scissione viene chiamata α -cleavage e genera due radicali: uno carbonilico e uno alchilico [19][53].

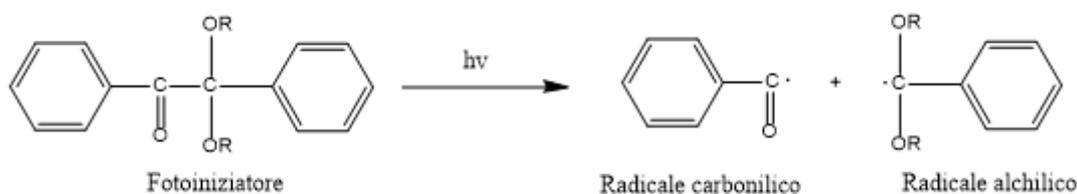


Figura 2.16: Fotolisi di un fotoiniziatore di tipo I

I fotoiniziatori di tipo I più utilizzati sono dei composti carbonilici aromatici che presentano dei sostituenti adatti all'assorbimento della luce: i chetoni aromatici (benzoino e derivati, eteri del benzoino e derivati, derivati dell'acetofenone), i chetoni alogenati e gli ammino-chetoni [53].

I fotoiniziatori di tipo II vengono utilizzati insieme a un co-iniziatore in grado di donare un atomo di idrogeno. Questo tipo di reazione consiste nel trasporto chimico del γ -idrogeno del co-iniziatore sull'ossigeno carbonilico del fotoiniziatore, l'energia per far avvenire questa cattura viene fornita mediante esposizione ai raggi UV. Il trasporto dell'idrogeno sull'iniziatore genera un diradiale reattivo che dà il via alla reticolazione (vedi immagine 2.17 per la reazione) [54].

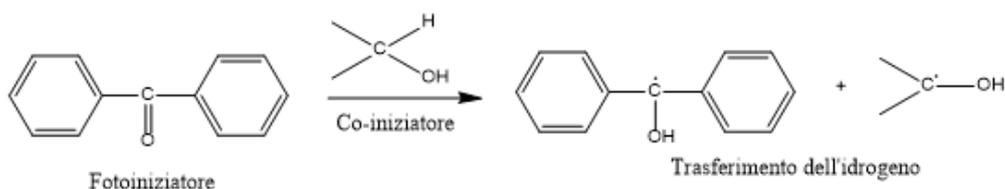


Figura 2.17: Fotoiniziatore di tipo II con un co-iniziatore donatore di idrogeno

I fotoiniziatori di tipo II più comuni sono i camforchinoni, i co-iniziatori più utilizzati sono le ammine, i tioli e gli alcoli.

Il fotoiniziatore utilizzato in questo progetto di tesi è l'Irgacure 819 (BAPO), la sua formula di struttura è rappresentata in figura 2.18. Il BAPO è un fotoiniziatore commerciale che, se esposto a radiazione UV, subisce la rottura di legami C-P attraverso una reazione di Norrish I. La fotolisi dei legami σ porta al rilascio di 4 radicali per ogni molecola di BAPO, questi radicali generano i siti attivi per la reticolazione dei polimeri GelMA/ASO e PEGDMA/ASO [55][56].

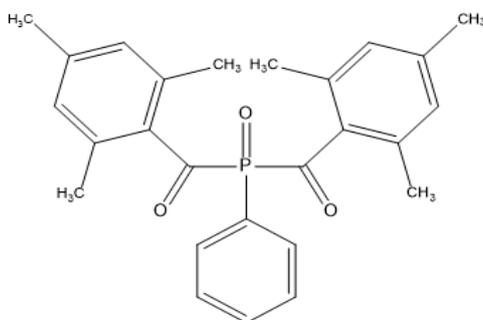


Figura 2.18: Struttura chimica del BAPO

3 Materiali e metodi

3.1 Materiali

Per la sintesi degli scaffold di GelMA/ASO e PEGDMA/ASO si farà uso di gelatina di pesce e polietilenglicole metacrilato con massa molare pari a 750 g/mol. Entrambi i precursori polimerici, così come l'olio di soia acrilato, sono forniti da Sigma-Aldrich.

3.2 Sintesi della gelatina metacrilata

Prima di reticolare i polimeri è necessario funzionalizzare la gelatina di pesce con gruppi metacrilati fotopolimerizzabili. La sintesi della GelMA si effettua mediante una reazione tra gelatina e anidride metacrilica in ambiente acquoso (vedi figura 3.1 per la reazione chimica).

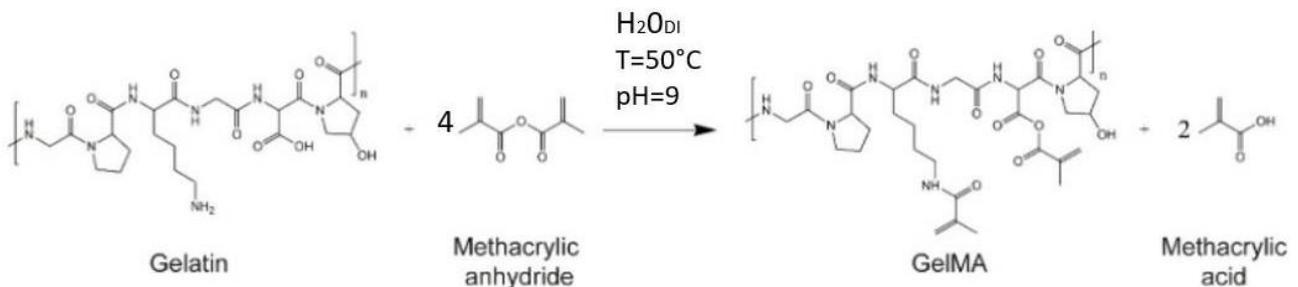


Figura 3.1: Reazione di sintesi della GelMA

In ambiente acquoso basico l'anidride metacrilica si scinde in due e reagisce con i gruppi amminici (-NH₂) della gelatina. Come sottoprodotto di reazione si ha la produzione di acido metacrilico che tende a bloccare la reazione, quindi è necessario aggiungere dell'idrossido di sodio (NaOH) in modo da mantenere un pH costante compreso fra 8 e 9. La sintesi prevede l'apporto di un eccesso di anidride metacrilica rispetto ai gruppi amminici della gelatina: per ogni mole di unità ripetitiva di gelatina si fanno reagire 4 moli di anidride metacrilica.

Esempio di calcolo:

1. Numero di moli di anidride metacrilica:

$$P_{gelatina} = 10,0156 \text{ g}$$

$$N_{gelatina} = \frac{P_{gelatina}}{P_{molecolare\ gelatina}} = \frac{10,0156 \text{ g}}{819 \text{ g/mol}} = 0,01223 \text{ mol}$$

$$N_{anidride} = 4 * N_{gel} = 0,04891 \text{ mol}$$

2. Quantità di anidride metacrilica:

$$P_{molecolare\ anidride} = 154,17 \text{ g/mol}$$

$$d_{anidride} = 1,04 \text{ g/ml}$$

$$P_{anidride} = N_{anidride} * P_{molecolare\ anidride} = 154,17 \text{ g/mol} * 0,04891 \text{ mol} = 7,54 \text{ g}$$

$$V_{anidride} = P_{anidride} / d_{anidride} = 7,25 \text{ ml}$$



Figura 3.2: Reazione di sintesi della GelMA

La reazione tra anidride metacrilica e gelatina impiega circa 24 ore a temperatura ambiente, tuttavia, è possibile ridurre il tempo a 3 ore ponendo il becher di reazione in un bagnomaria ad una temperatura compresa tra i 50 e i 60 gradi. In figura 3.2 è riportata un'immagine di come è stata svolta la reazione. Passate le 3 ore, occorre sottoporre la soluzione a dialisi in modo da eliminare le componenti non reagite, l'acido e il sale prodotto dalla reazione tra acido metacrilico e idrossido di sodio. La dialisi viene effettuata ponendo la soluzione in una membrana semipermeabile di cellulosa che una volta chiusa, viene messa in un contenitore cilindrico contenente acqua deionizzata per almeno due giorni. Con il passare del tempo i sali tenderanno a passare attraverso la membrana semipermeabile verso la soluzione ipotonica in modo da raggiungere l'equilibrio. Se, però, si effettuano diversi ricambi di soluzione dializzante i sottoprodotti di reazione (a basso peso molecolare) tenderanno ad uscire dai fori della membrana mentre all'interno rimarrà la GelMA. La soluzione di GelMA verrà quindi versata in diverse petri di vetro e lasciata ad essiccare sotto cappa (in figura 3.3 è riportata un'immagine della GelMA ottenuta con questo procedimento). Alternativamente all'essiccazione sotto cappa, è possibile effettuare una liofilizzazione.

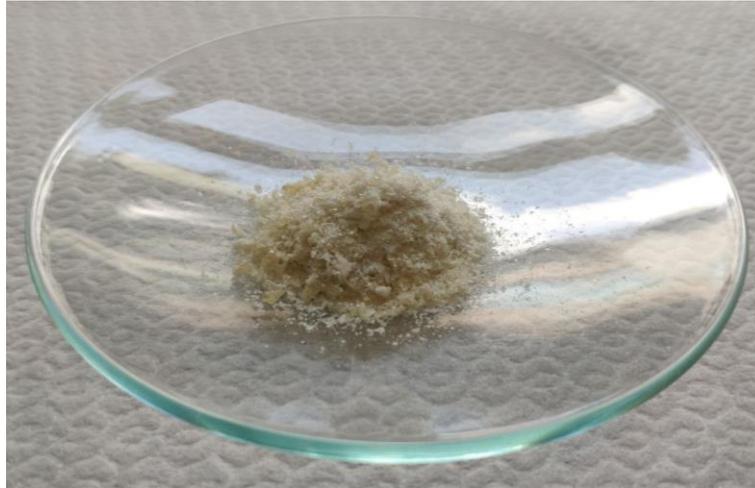


Figura 3.3: Polvere di GelMA ottenuta tramite essiccazione sotto cappa

3.3 Sintesi dei polimeri

I precursori polimerici (GelMA, ASO e PEGDMA) sono stati miscelati in diversi rapporti percentuali in peso. In particolare, le resine analizzate sono:

- PEGDMA 100% wt
- PEGDMA/ASO 80/20% wt
- PEGDMA/ASO 60/40% wt
- PEGDMA/ASO 50/50% wt
- ASO 100% wt
- GelMA 100% wt
- GelMA /ASO 80/20% wt
- GelMA /ASO 60/40% wt
- GelMA /ASO 50/50% wt

A temperatura ambiente PEGDMA e ASO sono liquidi compatibili, pertanto, per preparare una soluzione è sufficiente porre le giuste quantità in una provetta e miscelare attraverso un'ancoretta magnetica. La gelatina metacrilata a temperatura ambiente si presenta come un solido non miscibile in olio di soia, per cui, per creare una resina è necessario utilizzare un co-solvente a base di dimetilsolfossido con un rapporto minimo di 2:1 rispetto alla quantità di GelMA. Il dimetilsolfossido (DMSO), anch'esso fornito da Sigma-Aldrich, è un solvente polare aprotico molto utilizzato in chimica organica in quanto solubilizza un gran numero di composti polari e apolari [57]. La soluzione di GelMA e ASO in DMSO viene fatta scaldare a 50 °C in modo da favorire la formazione di una soluzione omogenea. Le formulazioni precedentemente indicate reticolano soltanto in presenza di un fotoiniziatore. Il fotoiniziatore utilizzato in questo progetto di tesi è l'Irgacure 819 (BAPO) con una quantità pari all'1% wt rispetto al peso della resina[55][56].

Dopo aver preparato le formulazioni fotopolimerizzabili è possibile procedere alla reticolazione. Si versa la soluzione in uno stampo e, successivamente, si pone lo stampo sotto una lampada UV, in figura 3.4 è possibile osservare il setup sperimentale. La tipologia di stampo utilizzato dipende dall'applicazione specifica del polimero, in questa tesi si sono utilizzati soprattutto stampi rettangolari con spessore 1 mm (FTIR, DSC, DMTA, TGA, SEM), cilindrici (Test a compressione) e a disco (Test cellulari), in figura 3.5 sono riportati dei polimeri ottenuti dai 3 diversi stampi. Per l'esposizione ai raggi UV si utilizza una lampada Dymax 5000-EC con potenza pari a 105 mW/cm² oppure una fibra Hamamatsu Lightningcure LC8 con potenza 90 mW/cm². La distanza tra sorgente e campione è fissata ed è pari a 6 cm, il tempo di esposizione è di 60 secondi e l'intensità luminosa selezionata è 100%. I campioni reticolati in DMSO sono stati posti successivamente in acqua deionizzata per rimuovere il solvente organico. Infine, dopo circa 48 ore, i polimeri sono stati lasciati seccare sotto cappa.

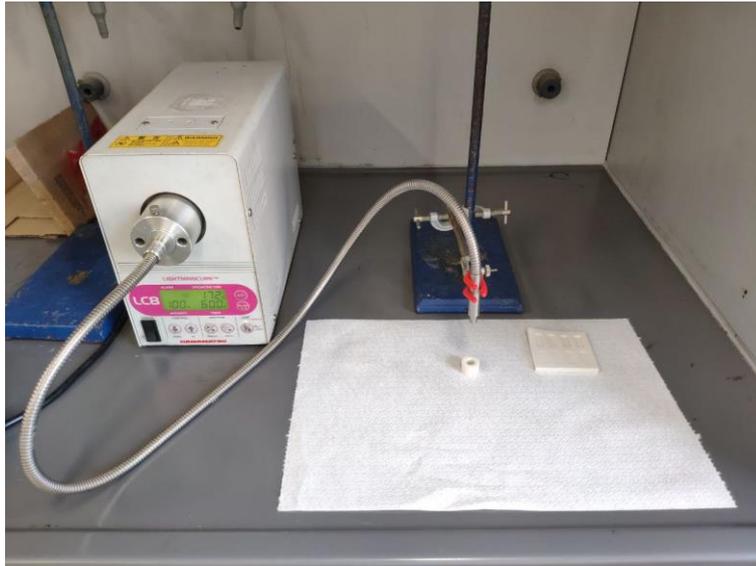
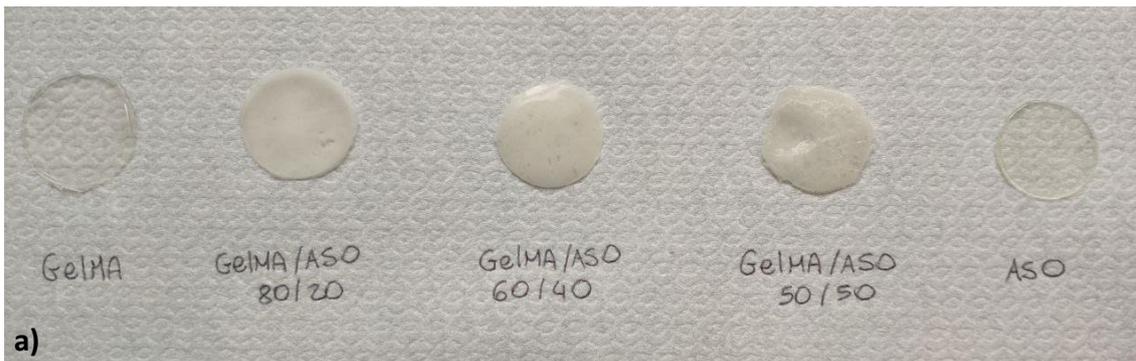


Figura 3.4: Reticolazione di un campione a forma cilindrica con la fibra Lightningcure



a)



b)



c)

Figura 3.5: Campioni a disco (a), rettangolari (b) e cilindrici (c) di PEGDMA/ASO e GelMA/ASO

3.4 Caratterizzazione fisico-chimica degli idrogeli

3.4.1 Fotoreologia

Un test di fotoreologia è una tecnica di caratterizzazione dei materiali utile a misurare rapide variazioni delle proprietà meccaniche durante il processo di reticolazione. Attraverso l'applicazione di uno sforzo di taglio accoppiato con l'esposizione ai raggi UV, il fotoreometro effettua una misura real time delle proprietà reologiche del campione di interesse [58]. Questa tecnica viene solitamente utilizzata per eseguire una misura dinamica del modulo conservativo (G') e del modulo dissipativo (G'') di un polimero durante la transizione sol-gel. In particolare, la strumentazione sottopone il campione a una deformazione ciclica nota (γ) e ne misura lo stress (τ_{xy}) e infine calcola il valore di G' e di G'' [58][59][60].

$$\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t)$$

$$\tau_{xy} = G' \gamma_0 \sin(\omega t) + G'' \gamma_0 \cos(\omega t)$$

A partire dalle misure di γ e di τ_{xy} è possibile ricavare G' e G'' per ogni istante temporale. Lo sforzo di taglio, in particolare, può essere scomposto in due componenti, una di queste risulta in fase con la deformazione γ ed è caratterizzata dal modulo G' . L'altra componente è in controfase rispetto alla deformazione, ed è definita da G'' . La misura di G' è correlata con la quantità di energia immagazzinata durante un ciclo di oscillazione, G'' è, invece, legato all'energia dissipata dagli attriti interni nel medesimo ciclo di oscillazione [58][59][60].

Il reometro utilizzato per effettuare il test è un "Anton Paar MCR 302" in modalità piatto-piatto (la strumentazione è riportata in figura 3.6). Per eseguire la misura si deposita la formulazione che si vuole studiare sul vetrino (piatto inferiore) trasparente agli UV. Successivamente, si attiva il motore lineare della macchina che fa scendere il piatto superiore mandandolo in contatto con la soluzione. La distanza piattino-vetrino prende il nome di gap ed è uno dei parametri che è necessario impostare per eseguire il test. Dopodiché si chiude la camera che contiene vetrino e piattino e si avvia la prova. Il test è composto da una serie di sollecitazioni cicliche a frequenza e ampiezza selezionabili dall'utente (in questo caso si imposta frequenza 1 Hz, amplitudine pari all'1% e un gap di 300 μm). Prima iniziare l'esposizione ai raggi UV è necessario aspettare 20/30 secondi in modo che i valori di G' e G'' possano stabilizzarsi. Dopodiché è possibile accendere la lampada e, osservando l'andamento del grafico G' in funzione del tempo, si può determinare la velocità di polimerizzazione delle formulazioni di GelMA/ASO e PEGDMA/ASO.



Figura 3.6: Reometro Anton Paar MCR 302

3.4.2 FTIR

La FTIR (Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier) è una tecnica spettroscopica che si basa sull'utilizzo di un fascio IR che viene convogliato attraverso il campione che si vuole analizzare. Lo spettrofotometro IR è normalmente costituito da una sorgente, un interferometro, un rivelatore e un computer (in figura 3.7 è rappresentato uno schema dei componenti dello spettrofotometro IR). La sorgente è l'elemento che emette un fascio di fotoni IR verso il campione posto su un substrato di silicio. Prima di impattare contro il campione, il fascio di fotoni viene fatto passare attraverso un interferometro, l'interferometro suddivide in due il fascio e, attraverso un sistema di specchi, genera un segnale interferente che contiene al suo interno tutte le frequenze IR. Il segnale interferente viene poi convogliato verso il campione, il quale, può assorbire o meno un determinato range di lunghezze d'onda in funzione dei suoi legami chimici. Il detector serve a captare lo spettro di assorbimento in uscita dal campione. Infine, il computer digitalizza il segnale e applica la trasformata di Fourier [61]. Lo spettro che si genera rappresenta un'impronta digitale dei campioni in quanto dipende unicamente dalla sua composizione chimica. Un tipico spettro IR esprime la trasmittanza (o l'assorbanza) in funzione del numero d'onda. Quando i fotoni IR impattano contro il materiale, causano delle transizioni vibrazionali a livello dei legami chimici del campione. Allo stesso modo delle transizioni elettroniche, le transizioni vibrazionali sono energeticamente quantizzate e si riferiscono a una ben precisa lunghezza d'onda (o frequenza) della radiazione incidente. Infatti, i legami chimici assorbono una caratteristica frequenza quando sono esposti a una radiazione IR. Di conseguenza, analizzando lo spettro del campione, è possibile identificare i gruppi funzionali caratteristici della GelMA, del PEGDMA e dell'ASO.

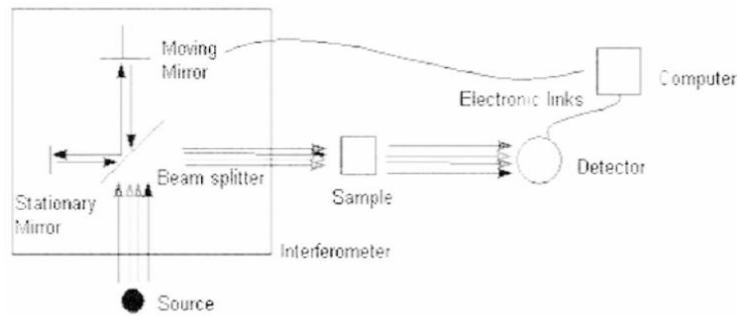


Figura 3.7: Componenti di uno spettrofotometro

Oltre alla classica spettroscopia a trasmissione che permette di analizzare solo campioni molto sottili, esiste una tecnica basata sul principio della riflettanza totale attenuata (ATR). In questo caso, il campione (solido o liquido) viene compresso sulla superficie di un cristallo (diamante) ad alto indice di rifrazione. Il fascio di fotoni IR dello strumento viene convogliato sul cristallo e subisce un fenomeno chiamato riflessione interna totale. Il fascio IR penetrando nel cristallo viene a contatto con la superficie del campione e viene in parte attenuato prima di essere riflesso all'interno del cristallo. Come riportato in figura 3.8, questo fenomeno di riflessione e assorbimento viene ripetuto più volte in modo tale che l'attenuazione dell'intensità del raggio IR sia sufficiente per essere rilevata dallo spettrofotometro.

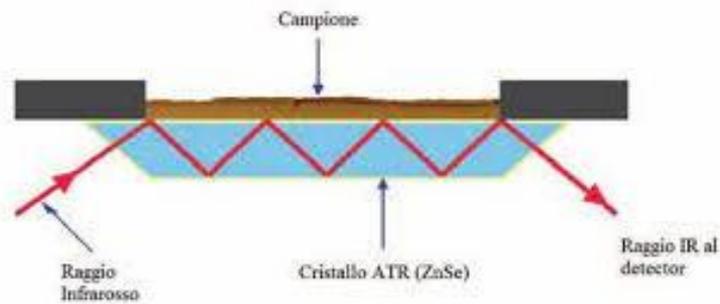


Figura 3.8: Funzionamento di una spettroscopia ATR

Per analizzare gli spettri FTIR a trasmissione e ATR-FTIR dei campioni di GelMA/ASO e PEGDMA/ASO si è usato un "FTIR/ATR ThermoScientific™ Nicolet™ Smart iTX-Diamond" (vedi immagine 3.9). Osservando gli spettri ATR-FTIR dei materiali utilizzati per sintetizzare gli idrogeli (gelatina, GelMA, PEGDMA e olio di soia) è stato possibile identificare i legami caratteristici dei materiali. Inoltre, esaminando i picchi relativi al doppio legame C=C presente nel gruppo metacrilato, si è potuto verificare la presenza di gruppi metacrilici sulla gelatina. Infine, si sono svolti delle FTIR a trasmissione pre e post reticolazione per calcolare il grado di conversione del doppio legame C=C.



Figura 3.9: FT-IR/ATR ThermoScientific™ Nicolet™ Smart iTX-Diamond

3.4.3 %Gel

Il test relativo al %gel è utile per avere indicazioni sull'efficienza di polimerizzazione. I campioni reticolati sono stati posti in una soluzione di cloroformio per 24 ore. Il cloroformio permette di solubilizzare ed estrarre le porzioni non reticolate di polimero. Confrontando il peso del campione originario con il residuo solido essiccato rimasto dopo le 24 h si è potuto calcolare la percentuale di polimero reticolato rispetto al peso totale del campione.

Il grado %gel è calcolato attraverso la formula:

$$\%gel = \frac{P_f * 100}{P_i}$$

P_f : Peso residuo

P_i : Peso iniziale

3.4.4 DSC

La DSC (Differential Scanning Calorimetry) è un'analisi termica che permette di determinare la temperatura di transizione vetrosa del materiale. Come riportato in figura 3.10, lo strumento utilizzato è una "DSC Mettler-Toledo". Il principio di base di questa tecnica consiste nel ricavare informazioni sul materiale riscaldandolo o raffreddandolo in maniera controllata secondo un programma termico definito dall'utente. In particolare, la DSC si basa sulla misura della differenza di flusso termico tra il campione in esame (crogiolo con campione) e uno di riferimento (crogiolo vuoto). Per effettuare la prova si è ritagliato un piccolo porzione di polimero anidro (4-8 mg) da porre nel crogiolo portacampione. Tale crogiolo è stato chiuso con un cappuccio bucato per evitare problematiche legate alla pressione interna. Il programma termico pianificato prevede un primo ciclo di riscaldamento da -70 °C a 100 °C seguito da un raffreddamento a -70 °C e, dopo un'isoterma a -70°C per stabilizzare la camera, si è effettuato un riscaldamento -70°C a 100 °C con una rampa termica di 10°C/min. Il primo ciclo di riscaldamento serve ad annullare eventuali stress-residui presenti nel campione e a eliminare eventuali picchi dovuti a reticolazioni secondarie. Inoltre, per evitare reazioni di ossidazione indesiderate, si è scelto di eseguire la prova in un'atmosfera inerte (N₂). Dal grafico calore/temperatura analizzato tramite software METTLER è stato possibile ricavare il punto di transizione vetrosa.



Figura 3.10: DSC Mettler-Toledo

3.4.5 DMTA

L'analisi DMTA (Dynamic Mechanical Analysis) è una tecnica di analisi termica che viene utilizzata per lo studio delle proprietà viscoelastiche dei polimeri. In una DMTA, solitamente, si applica uno sforzo sinusoidale al campione in esame con parametri definiti dall'utente (displacement e frequenza), la temperatura viene fatta variare secondo un programma termico modificabile che deve comprendere la presunta T_g del polimero analizzato. Anche in questo caso si sono utilizzati dei campioni rettangolari di GelMA/ASO e PEGDMA/ASO secchi. Il sistema sperimentale è riportato in figura 3.11 ed è composto da un "TTDMA Triton Technology-Mettler Toledo" e una bombola di azoto liquido per abbassare la temperatura di inizio analisi. Il displacement è pari a $20\ \mu\text{m}$ e la frequenza selezionata è 1Hz. La rampa di temperatura con cui sono state eseguite le prove varia in base alla tipologia del campione, per i campioni di PEGDMA/ASO, data la loro flessibilità, si è impostato un range tra i $-60\ ^\circ\text{C}$ e i $100\ ^\circ\text{C}$, per le formulazioni di GelMA/ASO più rigide si è optato per un intervallo da circa $0\ ^\circ\text{C}$ a $230\ ^\circ\text{C}$. Oltre a questi parametri è necessario misurare le dimensioni del campione da inserire all'interno dello strumento per ottenere dei valori assoluti. La strumentazione, attraverso la misura dello sforzo e della deformazione del polimero, determina il modulo conservativo (G'), il modulo dissipativo (G'') e il coefficiente di smorzamento ($\tan\delta=G''/G'$) in funzione della temperatura. A partire dall'andamento di $\tan\delta$ è stato possibile determinare la T_g , che può essere assunta pari al picco del coefficiente di smorzamento.



Figura 3.11: TTDMA Triton Technology-Mettler Toledo

3.4.6 TGA

La TGA (Thermogravimetric Analysis) è una tecnica sperimentale per la caratterizzazione della temperatura di degradazione dei polimeri. Il sistema sperimentale "TGA Mettler-Toledo" è rappresentato in figura 3.12, esso comprende una bilancia per pesare il campione studiato, un crogiolo di allumina che funge da contenitore termoresistente, una fornace, una termocoppia che costituisce il sistema di controllo della temperatura, infine è presente anche un impianto di ventilazione affinché l'atmosfera della camera possa essere controllata. La prova consiste nel sottoporre il campione anidro a un ciclo riscaldamento fino a 700 gradi e nel misurare la sua variazione di massa nel tempo. Anche in questo caso, come nella DSC, si è scelto di eseguire la prova in atmosfera inerte (N_2) per eliminare problematiche legate a reazioni di ossidazione. Il risultato finale è un grafico chiamato termogramma che riporta sull'asse Y la variazione % in peso e sull'asse X la temperatura del campione. Dal grafico si possono ricavare la temperatura di inizio degradazione (T_{id}) e la temperatura di degradazione (T_{deg}) dei polimeri valutando rispettivamente la temperatura per cui il campione mostra una perdita di peso del 5% della massa e la temperatura associata al flesso della curva %peso-tempo.

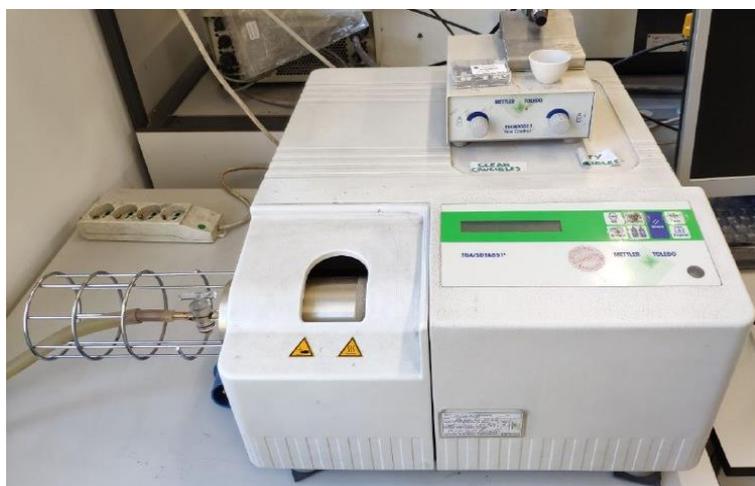


Figura 3.12: TGA Mettler-Toledo

3.4.7 Swelling

La prova di swelling è utile per caratterizzare l'idrofilicità e il rigonfiamento dei polimeri in ambiente acquoso. Il test prevede di inserire i campioni analizzati in acqua deionizzata e misurarne la variazione in peso a diversi intervalli temporali. Le prove di swelling sono eseguite sia a temperatura ambiente che a temperatura fisiologica (37 °C) in modo da evidenziare eventuali differenze nella velocità di rigonfiamento.

Lo swelling ratio è definito come:

$$\text{Swelling Ratio} = \frac{(P_i - P_0) * 100}{P_0}$$

P_i : *Peso al tempo i*

P_0 : *Peso iniziale*

3.4.8 Angolo di contatto

L'angolo di contatto è una grandezza termodinamica che descrive l'angolo all'interfaccia tra un substrato solido e una goccia di liquido. La misura dell'angolo di contatto permette di esaminare la bagnabilità di un polimero e di stimarne la sua tensione superficiale. Per analizzare la bagnabilità degli scaffold composti da PEGDMA, GelMA e ASO si sono utilizzati due tipologie di solventi:

- Acqua, ovvero un liquido polare
- Diiodometano, ovvero un solvente organico apolare

Lo strumento utilizzato è un "Krüss Drop Shape Analyzer-DSA100E", esso è composto da un ripiano mobile dove appoggiare il campione, una telecamera per scattare una foto alla goccia, un computer munito di software per l'elaborazione e la determinazione dell'angolo di contatto. Per avere un risultato statisticamente attendibile sono state eseguite 6 misure per ogni campione, successivamente tramite software software sono state calcolate la media e la deviazione standard.

3.4.9 SEM

Per analizzare le caratteristiche della superficie dei campioni di GelMA/ASO e PEGDMA/ASO si è fatto uso di un SEM "Jeol 6000 Plus" (raffigurato in figura 3.13). Il SEM è un microscopio a scansione che produce immagini di un campione attraverso un fascio focalizzato di elettroni. Viene spesso utilizzato per l'analisi superficiale in quanto gli elettroni del fascio interagendo con il materiale generando segnali che portano informazioni relative alla topografia del campione.

Il fascio elettronico viene generato da un filamento in tungsteno attraversato da corrente e viene focalizzato attraverso un sistema di lenti elettromagnetiche. Il fascio viene deflesso da una lente obiettivo in modo da permettere di scansionare le diverse aree del campione. Il SEM lavora in condizioni di vuoto in modo da evitare lo scattering degli elettroni del fascio con le molecole d'aria, che provocherebbe una perdita di risoluzione. Si evita inoltre la contaminazione superficiale del campione. Uno dei possibili effetti dell'interazione elettrone-materiale è il rilascio di elettroni secondari del campione (fascio ionizza gli atomi), che vengono captati dal rivelatore e convertiti in un segnale elettrico proporzionale al numero di elettroni secondari rilasciati. L'immagine viene ricostruita attraverso una matrice, ad ogni elemento corrisponde a una

posizione del cannone elettronico che scansiona la superficie del materiale e il valore di tale elemento è dettato dal segnale elettrico proveniente dal rivelatore. Un maggior numero di elettroni secondari determina quindi un pixel più luminoso, un minor numero implica un pixel più scuro. L'impatto continuo di elettroni su un materiale non conduttivo provocherebbe un accumulo di carica superficiale, risultando in un'immagine molto chiara. Per questo motivo, essendo gli scaffold di GelMA/ASO e PEGDMA/ASO non conduttivi, è necessario fissare i polimeri su dei substrati metallici e poi metallizzare la superficie attraverso uno sputtering di platino da 5 nm.



Figura 3.13: SEM Jeol 6000 Plus

3.4.10 Test di compressione

La prova a compressione uniassiale è stata eseguita con un "MTS QTest™/10" (riportato in figura 3.14). Tramite questa prova meccanica è possibile determinare lo sforzo a rottura (σ_{max}) e il modulo elastico (E) dei campioni rigonfiati in acqua. La prova a compressione è stata eseguita comprimendo fino a rottura un provino di forma cilindrica fra due superfici piane e parallele. Il campione viene posizionato sulla superficie inferiore che viene mantenuta fissa, al contrario, la superficie superiore viene montata su una traversa che si muove a velocità costante (5 mm/min). La strumentazione comprende anche due celle di carico, per i campioni più soft è stata utilizzata una cella da 50 N mentre per i campioni più rigidi si è optato per una cella da 500 N.



Figura 3.14: MTS QTest™/10

Lo sforzo a rottura viene calcolato attraverso l'equazione:

$$\sigma_{max} = \frac{F_{max}}{\pi r_0^2}$$

Dove F_{max} rappresenta il carico a rottura e r_0 il raggio dell'area base del provino.

Il modulo elastico E viene invece ricavato a partire dal grafico sforzo-deformazione del polimero. Lo sforzo istantaneo σ_i e la deformazione istantanea ε_i vengono calcolati attraverso le seguenti formule:

$$\sigma_i = \frac{F_i}{\pi r_0^2}; \varepsilon_i = \frac{\Delta l_i}{l_0}$$

dove Δl_i rappresenta l'iesima variazione di lunghezza del provino in seguito alla compressione del piatto superiore e l_0 la lunghezza iniziale del provino. Per ricavare r_0 e l_0 si sono misurati altezza e raggio del provino prima del test, Δl_i viene invece ottenuto a partire dai dati relativi al movimento della traversa.

Secondo la legge di Hooke vi è una relazione lineare tra σ e ε per valori inferiori al carico di snervamento:

$$\sigma = E \varepsilon$$

Per cui, per determinare il valore della rigidità del polimero, è sufficiente calcolare la pendenza della retta σ/ϵ nel tratto lineare elastico. In figura 3.15 è raffigurato il tipico comportamento meccanico di un provino sottoposto a un carico di compressione, è inoltre evidenziato il tratto lineare elastico. In questo caso particolare, per ogni formulazione si calcola il modulo elastico prendendo come riferimento il tratto di deformazione compreso tra lo 0% e il 10%.

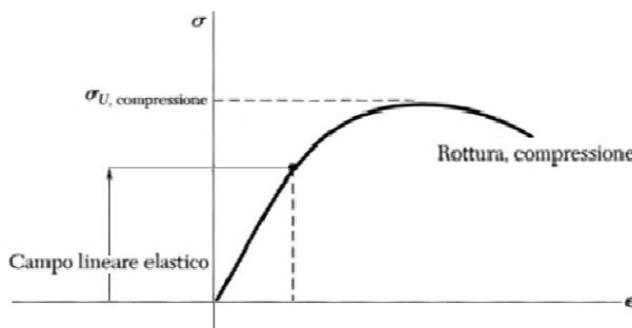


Figura 3.15: Curva sforzo-deformazione di un provino polimerico

3.5 Test cellulari

3.5.1 Test di citotossicità

Dopo aver sintetizzato e caratterizzato gli scaffold dal punto di vista meccanico, risulta necessario studiare la biocompatibilità dei polimeri ottenuti. Per valutare la biocompatibilità di un biomateriale bisogna eseguire dei test di citotossicità in modo da esaminare la capacità di un campione di inibire o promuovere la crescita cellulare. Siccome gli scaffold di PEGDMA, GelMA e ASO dovranno andare in contatto diretto con cellule ne consegue l'importanza di analizzare, tramite un test di citotossicità, se questi polimeri possano rilasciare sostanze che inducono l'apoptosi cellulare. Per effettuare i test di citotossicità sui polimeri di PEGDMA/ASO e GelMA/ASO reticolati in presenza di DMSO (DMSO rimosso prima del test, tramite estrazione di solvente in acqua), si è utilizzato un metodo indiretto usando come cellule fibroblasti di linea (HH1) e. Gli scaffold sono rimasti immersi in medium di coltura per 24 ore, successivamente, il liquido di coltura è stato prelevato e posto a contatto con le cellule HFF-1 adese su piastra e in coltura da 24h (concentrazione cellulare di semina 20.000 cell per 100 μ l in ciascun pozzetto di MW96). Infine, dopo altre 24 ore, si è effettuato un saggio colorimetrico Cell Titer Blue per valutare la vitalità cellulare, in questo modo è stato possibile quantificare la citotossicità dei materiali. Per ogni tipologia di scaffold si sono effettuati 6 ripetizioni in modo da ottenere un risultato statisticamente attendibile.

Di seguito vengono riportati i dettagli relativi al protocollo dei test indiretti effettuati. I fibroblasti sono conservati adesi a un substrato di polistirene, per effettuare il test è quindi necessario staccarli e porli nei pozzetti di una multiwell. Per prelevare le cellule si è utilizzato l'enzima tripsina, il quale fa assumere alle cellule una morfologia tondeggiante tipica delle cellule non adese. Tuttavia, prima di estrarre le cellule, si è realizzato un risciacquo in PBS per rimuovere le cellule morenti che avrebbero potuto falsare il risultato della prova. Dopo aver verificato il distacco delle cellule al microscopio, si è inserita una soluzione di medium di coltura fresco per inattivare la tripsina. Per avere risultati colorimetrici confrontabili è importante inserire la stessa quantità di cellule in ogni pozzetto della multiwell, in particolare, l'obiettivo era quello di inserire 20'000 cellule in ogni pozzetto da 100 μ l. Pertanto, utilizzando una camera di Neubauer si è eseguita una conta cellulare, dopodiché la soluzione è stata diluita in modo da ottenere la giusta concentrazione di cellule. A questo punto, tramite una pipetta, è stato possibile immettere le cellule all'interno della multiwell.

Dopo aver finito di preparare la multiwell contenente i fibroblasti, sono stati inseriti gli scaffold con il mezzo di coltura cellulare; la concentrazione stabilita era 1 ml di medium ogni 100 mg di polimero. Quindi si è pesato

ogni campione polimerico e, in seguito, si è immessa la quantità di medium necessaria per arrivare alla giusta concentrazione. Dopo 24 ore in incubatore, previa verifica dell'adesione delle cellule alla multiwell, è stato possibile rimuovere da tutti i pozzetti il liquido di coltura inserito il giorno precedente e immettere il medium rimasto a contatto con gli scaffold considerati. Prima di sostituire il medium bisogna sterilizzare il mezzo di coltura per evitare la contaminazione batterica. La sterilizzazione si può effettuare mediante esposizione ai raggi UV oppure tramite filtrazione (con dimensione dei pori non oltre i 0,2 μm). Infine, dopo ulteriori 24 ore in incubatore, si è eseguito il test colorimetrico Cell Titer Blue che permette di monitorare la vitalità cellulare analizzando la fluorescenza di un campione post-trattamento. Il Cell Titer Blue si basa sulla capacità delle cellule di metabolizzare la resazurina che viene ridotta in resorufina fluorescente. Le cellule vitali sono in grado di ridurre la resazurina, al contrario le cellule non vitali non riescono a metabolizzarla e non si genera la fluorescenza. Il grado di vitalità cellulare può essere letto sia in assorbanza che in fluorescenza, questo perché in seguito al metabolismo cellulare la colorazione della soluzione varia da blu a viola, al contempo è anche possibile visualizzare la fluorescenza della molecola eccitando la soluzione con un'onda elettromagnetica a 530 nm e visualizzando l'intensità di emissione a 590 nm. Per visualizzare i risultati occorre utilizzare uno spettrofotometro che permette di leggere il segnale sia in assorbanza che in fluorescenza, per ognuna delle 6 ripetizioni si è ottenute l'intensità di emissione, successivamente si è sottratto il bianco e si è calcolato il tasso di vitalità cellulare percentuale rispetto al controllo, infine si ricava l'indice di vitalità medio dei 6 campioni e la deviazione standard.

3.5.2 Test di adesione cellulare

Le cellule comunicano con un materiale mediante i recettori integrinici e proteoglicanici. Questi recettori della cellula mettono in comunicazione il substrato esterno con i filamenti di actina del citoscheletro, quando una cellula aderisce a un substrato adesivo riorganizza il suo citoscheletro e si appiattisce sul substrato formando un'adesione focale matura. Inoltre, in seguito a un'adesione focale, la cellula attiva una serie di segnalazioni a livello biochimico che regolano l'attività cellulare stimolando la proliferazione, la migrazione, oppure il differenziamento. Se, al contrario, una popolazione cellulare viene messa a contatto con un materiale scarsamente adesivo, la morfologia delle cellule rimane tondeggianti e si attiva la cascata biochimica che porta all'apoptosi, ovvero la morte programmata della cellula. Per analizzare se le cellule aderiscono o meno a un determinato substrato si sfrutta proprio la correlazione tra capacità adesive di un materiale e vitalità cellulare. Per effettuare il test, si è ripetuto il trattamento con la tripsina per staccare le cellule dal polistirene, successivamente si è eseguita la conta cellulare e si è concentrata la soluzione in modo da ottenere una concentrazione pari a 20'000 cellule ogni 10 μl di soluzione. Infine, è stata depositata una goccia da 10 μl in ogni pozzetto contenente i campioni. I campioni sono stati posti in incubatore e dopo 2h sono stati aggiunti 500 μl di terreno di coltura cellulare e si sono coltivate le cellule a contatto con lo scaffold per diversi time point: 24 ore, 72 ore e 7 giorni. Per ogni time point si è effettuato un saggio Cell Titer Blue in modo da avere un'indicazione quantitativa sul numero di cellule aderite al polimero.

3.5.3 Saggio Falloidina

Oltre al test colorimetrico Cell Titer Blue si è eseguito anche un saggio con la falloidina per osservare direttamente la morfologia delle cellule adese agli scaffold. Per questo test di morfologia si è preparata un'altra multiwell contenente 5 campioni per ogni time step. Dopodiché si è inserita nei pozzetti una soluzione di paraformaldeide al 4% per fissare le cellule. Successivamente, per proseguire l'analisi dell'adesione superficiale, si è utilizzato un marcatore fluorescente alla falloidina. La falloidina è un peptide ciclico contenuto all'interno dei funghi, essa si lega in modo selettivo alle subunità di F-actina del citoscheletro. Il legame provoca una diminuzione della costante di dissociazione delle subunità actiniche promuovendo la stabilizzazione del filamento e impedendone la depolimerizzazione. Questo legame selettivo

può essere sfruttato per determinare la distribuzione spaziale dei filamenti actinici di una cellula adesa ad un substrato, infatti, la falloidina può essere marcata con un tag fluorescente in modo da rendere visibile in microscopia la struttura dei filamenti di actina. Prima di utilizzare la falloidina si è aumentata la permeabilità della membrana cellulare in modo da facilitare l'ingresso del marcatore fluorescente all'interno delle cellule. A tal proposito, si è preparata una soluzione di TritonX in PBS (concentrazione pari a 0,5%) e si sono lasciati i campioni a contatto con 100 µl di soluzione di TritonX per 10 minuti. Successivamente si sono effettuati dei lavaggi in PBS. Dopodiché, per evitare problematiche derivanti dall'adesione aspecifica della falloidina, si è eseguito un pretrattamento in soluzione di BSA (Albumina Sierica Bovinica) per 30 minuti. Infine, si è realizzata la soluzione di falloidina in PBS con una proporzione pari a 0,5:200. Dopo aver lasciato i campioni a contatto con il colorante fluorescente (40 minuti) si è potuto analizzare in microscopia a fluorescenza (Nikon) l'adesione cellulare osservando la distribuzione spaziale dei filamenti actinici.

4 Risultati e discussione

In questo capitolo vengono presentati i risultati dei diversi test sperimentali effettuati. Per i test dove le misure sono state ripetute più volte viene riportato nel grafico o in tabella il valore medio con la deviazione standard associata.

4.1 Caratterizzazione fisico-chimica degli idrogeli

4.1.1 Fotoreologia

Il test di fotoreologia ha permesso lo studio delle proprietà reologiche dei campioni di PEGDMA/ASO e GelMA/ASO durante la transizione sol-gel, a partire dalla misura del modulo conservativo G' è stato possibile determinare la velocità di reticolazione dei polimeri. Analizzando i grafici riportati in figura 4.1, si può osservare come le tempistiche di polimerizzazione delle soluzioni PEGDMA/ASO siano diverse rispetto a quelle formate da GelMA/ASO. La gelatina metacrilata, infatti, possiede più gruppi reattivi rispetto al PEGDMA, ciò consente una cinetica di reticolazione più rapida. Le formulazioni a maggior contenuto PEGDMA necessitano di più tempo per arrivare a plateau e, inoltre, mostrano un ritardo nell'inizio della polimerizzazione rispetto a quelle con l'ASO. Come è possibile notare in figura 4.2, è presente un trend tra il ritardo dell'inizio della reazione e la concentrazione di ASO nella formulazione. Infatti, le soluzioni contenenti più olio di soia polimerizzano più velocemente, questo fenomeno avviene perché l'olio di soia acrilato ha in media 4 gruppi reattivi, il PEGDMA invece ne ha solo due, di conseguenza reticola più lentamente. Sempre dall'immagine 4.2 si evince che la cinetica di reazione delle formulazioni contenenti GelMA non viene influenzata dall'ASO, infatti esse reticolano in modo istantaneo indipendentemente dal rapporto specifico dei due componenti.

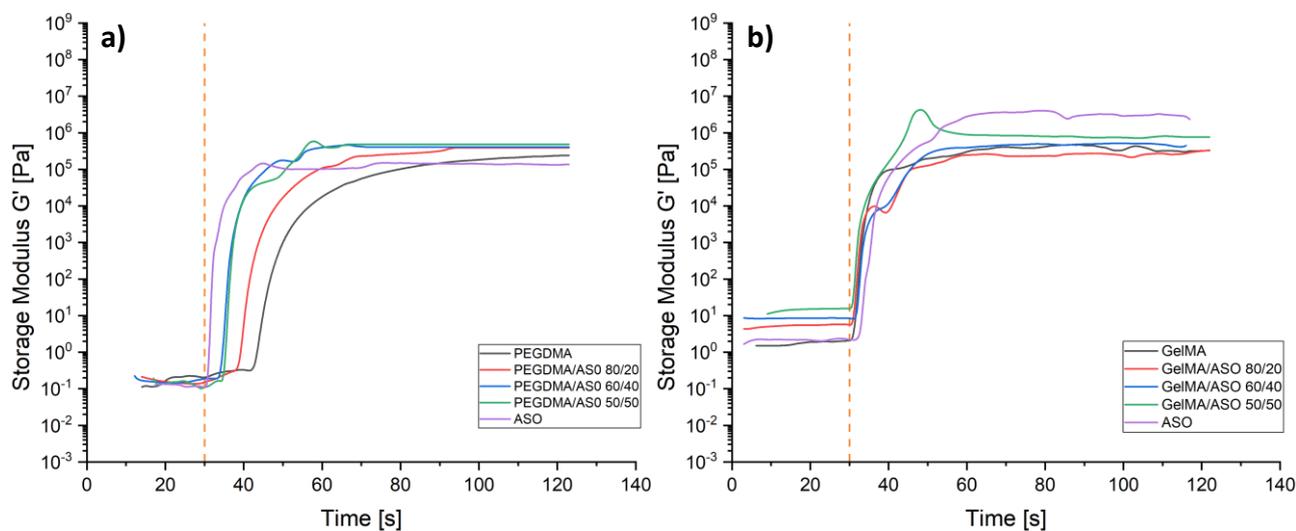


Figura 4.1: Andamento del modulo conservativo G' per gli idrogeli PEGDMA/ASO (a) e GelMA/ASO (b)

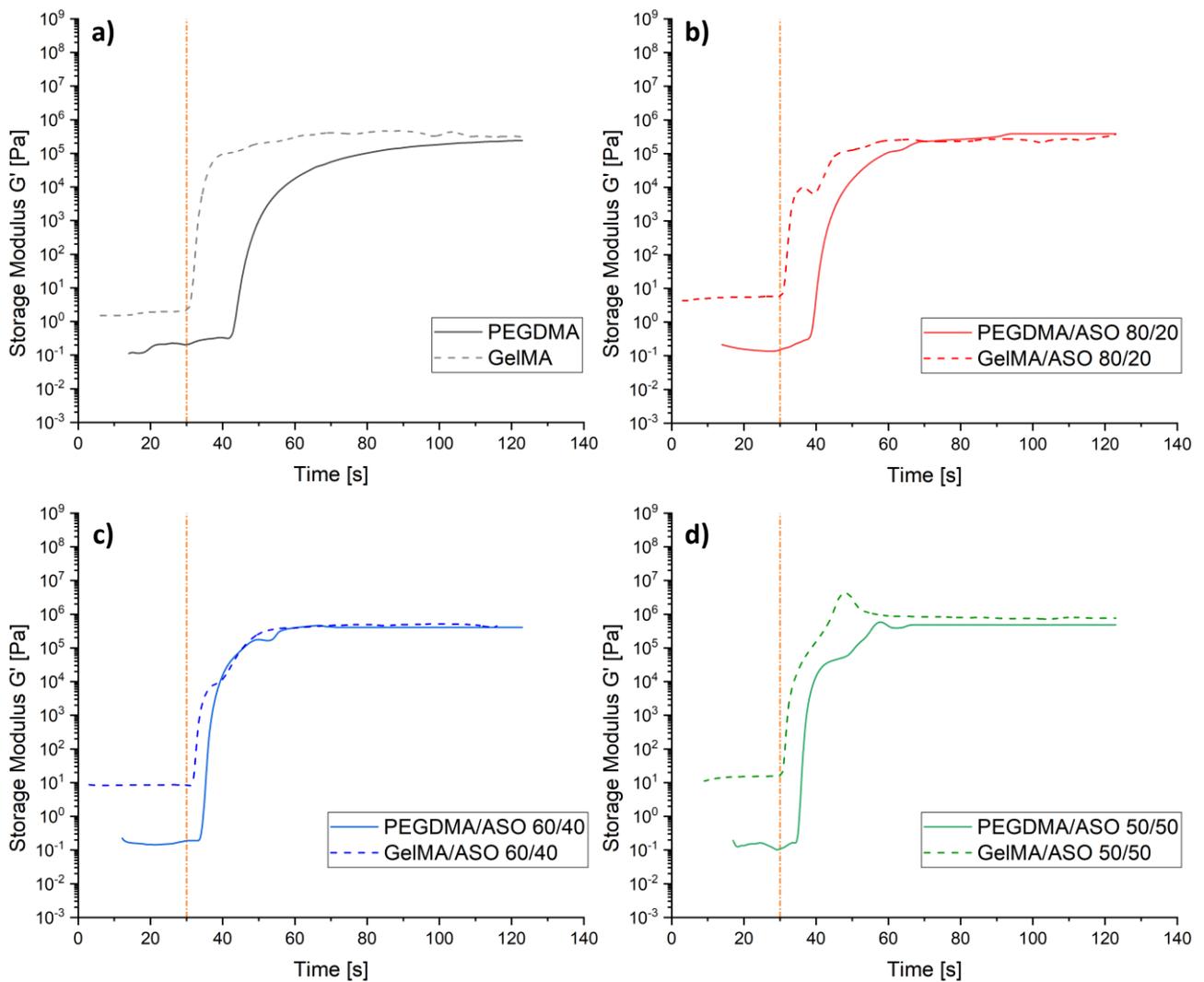


Figura 4.2: Confronto reattività PEGDMA/ASO e GelMA/ASO a parità di concentrazione di ASO

4.1.2 FTIR

Analizzando gli spettri ATR-FTIR della Gelatina, del GelMA, del PEGDMA e dell'ASO è stato possibile identificare la natura chimica dei precursori polimerici (vedi figure 4.3, 4.4, 4.5, 4.6). Gli spettri della gelatina e del GelMA risultano molto simili, infatti, gran parte della struttura non viene modificata dalla metacrilazione. Tuttavia, sono presenti alcune differenze nel passaggio da gelatina a GelMA:

- Aumenta l'intensità del picco a 1630 cm^{-1}
- Compare un picco a 815 cm^{-1}

Nel primo caso il picco a 1630 cm^{-1} era già presente nella gelatina a causa del doppio legame C=O, tuttavia nella GelMA l'intensità del picco aumenta come ci si aspetterebbe per l'aggiunta del gruppo metacrilato. A 815 cm^{-1} è possibile notare un nuovo picco che può essere attribuito alla vibrazione del doppio legame C=C.

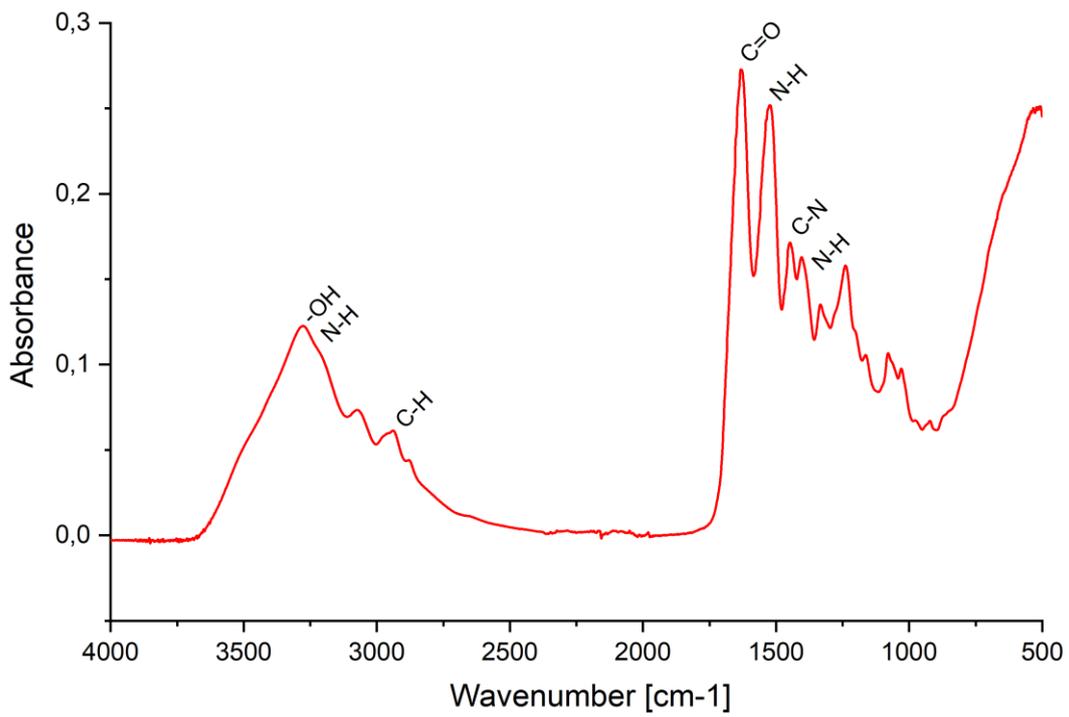


Figura 4.3: Spettro ATR-FTIR della gelatina

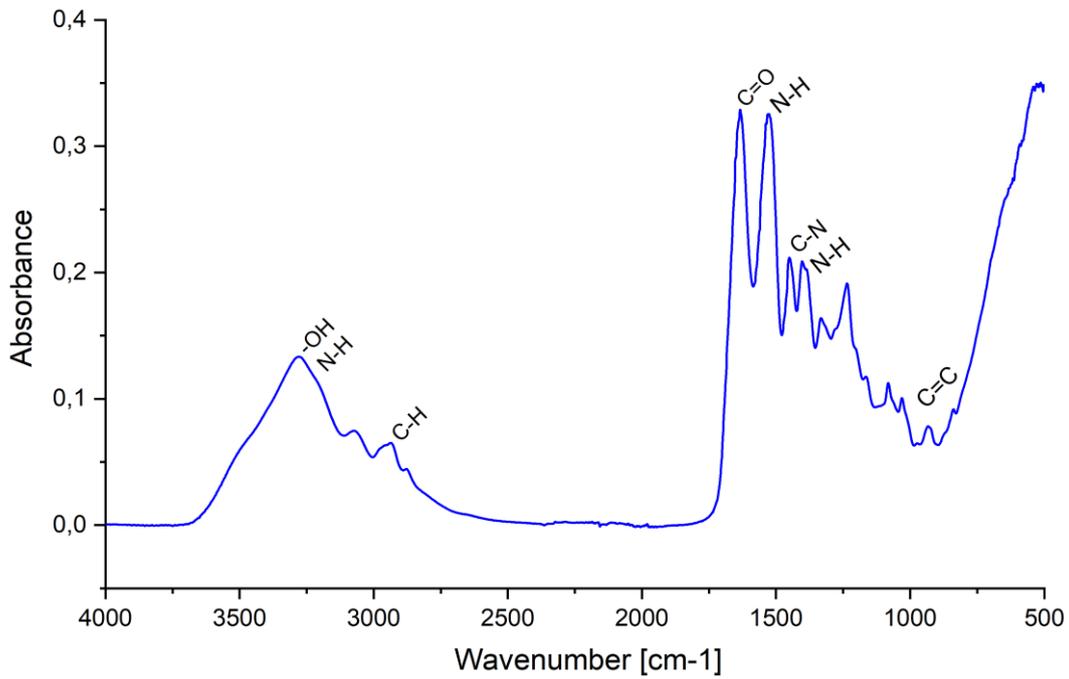


Figura 4.4: Spettro ATR-FTIR GelMA

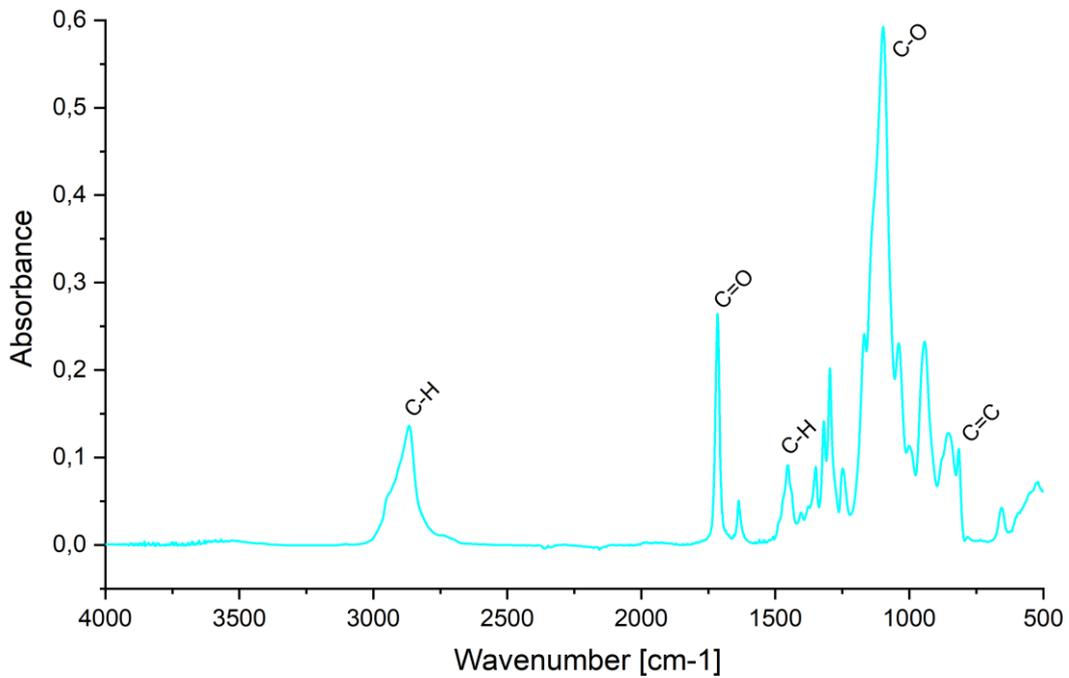


Figura 4.5: Spettro ATR-FTIR del PEGDMA

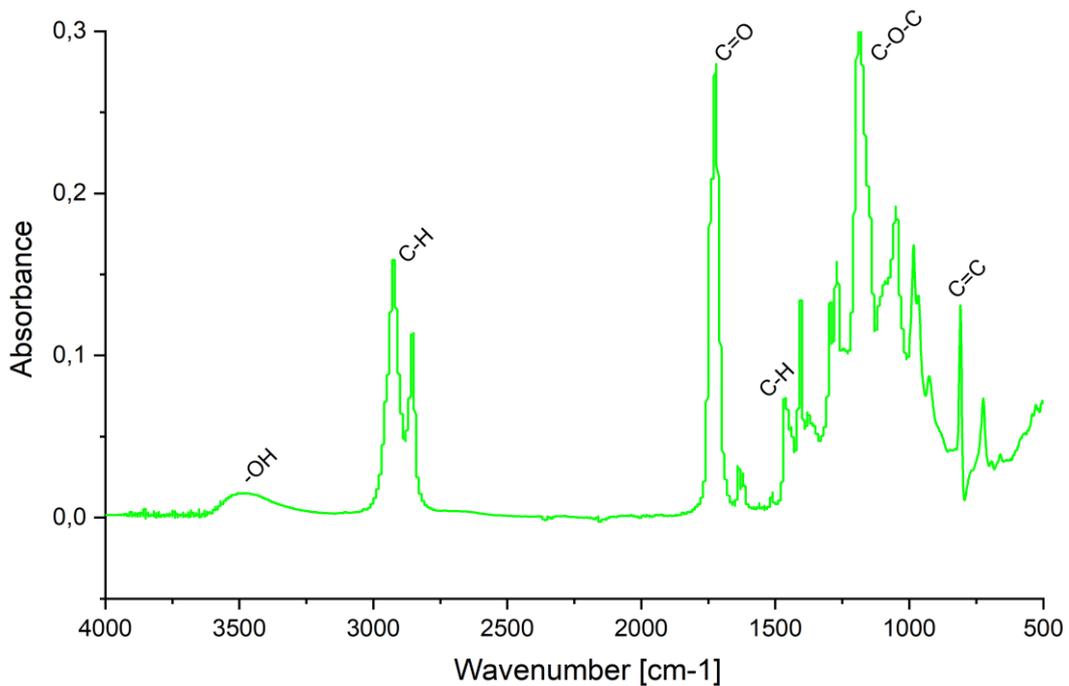


Figura 4.6: Spettro ATR-FTIR dell'ASO

Il segnale del picco a 815 cm⁻¹ è stato poi utilizzato come picco di riferimento nel calcolo della conversione del doppio legame C=C durante la polimerizzazione. Infatti, durante la reticolazione, i radicali liberi generati dai fotoiniziatori rompono il doppio legame presente nei monomeri di GelMA e PEGDMA. Osservando gli spettri FTIR a trasmissione pre e post polimerizzazione è possibile calcolare il grado di conversione C% analizzando le aree sottese al picco a 815 cm⁻¹:

$$C\% = \left(1 - \frac{A_{POST}}{A_{PRE}}\right) * 100\%$$

In tabella 4.1 e 4.2 sono riportati i valori di conversione dei vari campioni. Un basso valore C% è indice di un'apertura dei doppi legami incompleta, un valore C% alto implica una minor quantità di doppi legami non reagiti.

Formulazione	C%
ASO	42 %
PEGDMA/ASO 50/50	53 %
PEGDMA/ASO 60/40	53 %
PEGDMA/ASO 80/20	67 %
PEGDMA	68 %

Tabella 4.1: Grado di conversione C% campioni PEGDMA/ASO

Formulazione	C%
ASO	42 %
GelMA/ASO 50/50	64 %
GelMA/ASO 60/40	78 %
GelMA/ASO 80/20	86 %
GelMA	/

Tabella 4.2: Grado di conversione C% campioni GelMA/ASO

In entrambi gli scaffold di PEGDMA/ASO e di GelMA/ASO si può notare che l'aggiunta di olio di soia all'interno dello scaffold provoca una diminuzione del valore di C%. I valori di conversione più alti sono quelli associati a gel con la minore quantità di ASO, ovvero PEGDMA e GelMA/ASO 80/20 (68% e 86%) al contrario l'ASO puro presenta una C% pari a 42%, le composizioni intermedie presentano un grado di conversione compreso tra questi due estremi in funzione alla quantità di olio di soia presente all'interno della formulazione. Il basso grado di conversione dell'olio di soia può essere attribuito alla sua elevata viscosità. A parità di concentrazione di ASO si può inoltre notare che gli scaffold basati sulla gelatina presentano una C% più alta rispetto al PEGDMA, questo perché la gelatina presenta più gruppi metacrilati rispetto al PEGDMA, di conseguenza la reticolazione avviene più rapidamente e con una migliore efficienza.

Per avere una conferma qualitativa si è deciso di effettuare una ATR-FTIR sui polimeri reticolati andando ad analizzare il picco associato al doppio legame C=C, in figura 4.7 è raffigurato il picco a 815 cm^{-1} dei campioni di GelMA/ASO e PEGDMA/ASO.

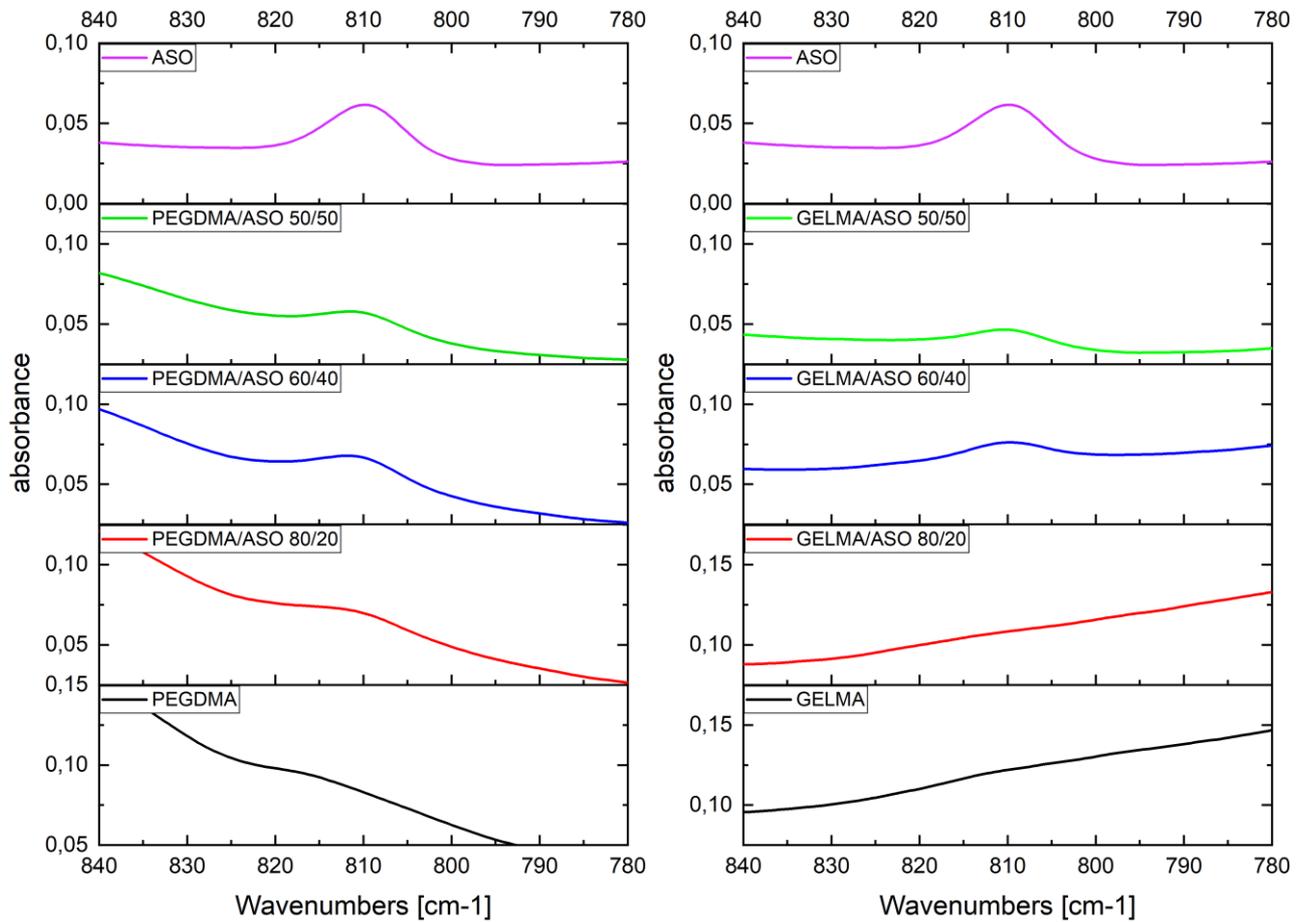


Figura 4.7: Picco ATR-FTIR a 815 cm^{-1} PEGDMA/ASO e GelMA/ASO

I risultati della ATR-FTIR degli scaffold di PEGDMA/ASO e di GelMA/ASO confermano il trend presente nelle precedenti analisi. Infatti, è possibile osservare come l'abbassamento del picco a 815 cm^{-1} sia correlato con la diminuzione della concentrazione specifica di ASO.

4.1.3 %Gel

Formulazione	% Gel
PEGDMA/ASO 50/50	90,2 %
PEGDMA/ASO 60/40	91,1 %
PEGDMA/ASO 80/20	93,9 %
PEGDMA	92,0 %
ASO	60,0 %

Tabella 4.3: Grado %Gel dei campioni PEGDMA/ASO

Dai risultati riportati in tabella 4.3 si evince che tutte le composizioni contenenti PEGDMA presentano una percentuale solida superiore al 90%, ciò implica che la maggior parte del campione presenta struttura polimerica reticolata mentre solo una piccola porzione non è polimerizzata. In accordo con dati relativi al grado di conversione C=C, l'ASO puro presenta una percentuale solida abbastanza bassa di circa il 60%.

4.1.4 DSC

I risultati del test sono rappresentati in figura 4.8, a partire dal grafico calore/temperatura si sono ricavate le T_g dei campioni in condizioni anidre (riportate in tabella 4.4 e 4.5). Le T_g dei copolimeri PEGDMA/ASO sono ampiamente inferiori allo zero, di conseguenza a temperatura ambiente i polimeri si trovano in uno stato gommoso in quanto la temperatura esterna è maggiore della temperatura di transizione vetrosa. In particolare, il polimero di PEGDMA puro è quello che presenta la T_g più bassa (-36,5 °C) mentre l'ASO ha una T_g compresa fra 0 °C e i 5 °C. Le formulazioni intermedie hanno una T_g compresa tra questi due estremi in funzione del rapporto reciproco dei due componenti. Gli idrogeli secchi costituiti da GelMA/ASO presentano una T_g compresa tra 80 °C e i 140 °C, quindi, a temperatura ambiente i polimeri sono rigidi. Il GelMA puro ha una T_g di 138,2 °C mentre le formulazioni intermedie presentano una transizione vetrosa più bassa in relazione al loro contenuto di ASO. Risulta importante osservare come l'aggiunta di olio di soia abbia due conseguenze opposte sugli scaffold in questione, inserire ASO all'interno dei gel PEGDMA/ASO irrigidisce la struttura provocando un aumento della T_g del polimero, al contrario, includere maggiori quantità di ASO all'interno degli idrogeli GelMA/ASO flessibilizza il network.

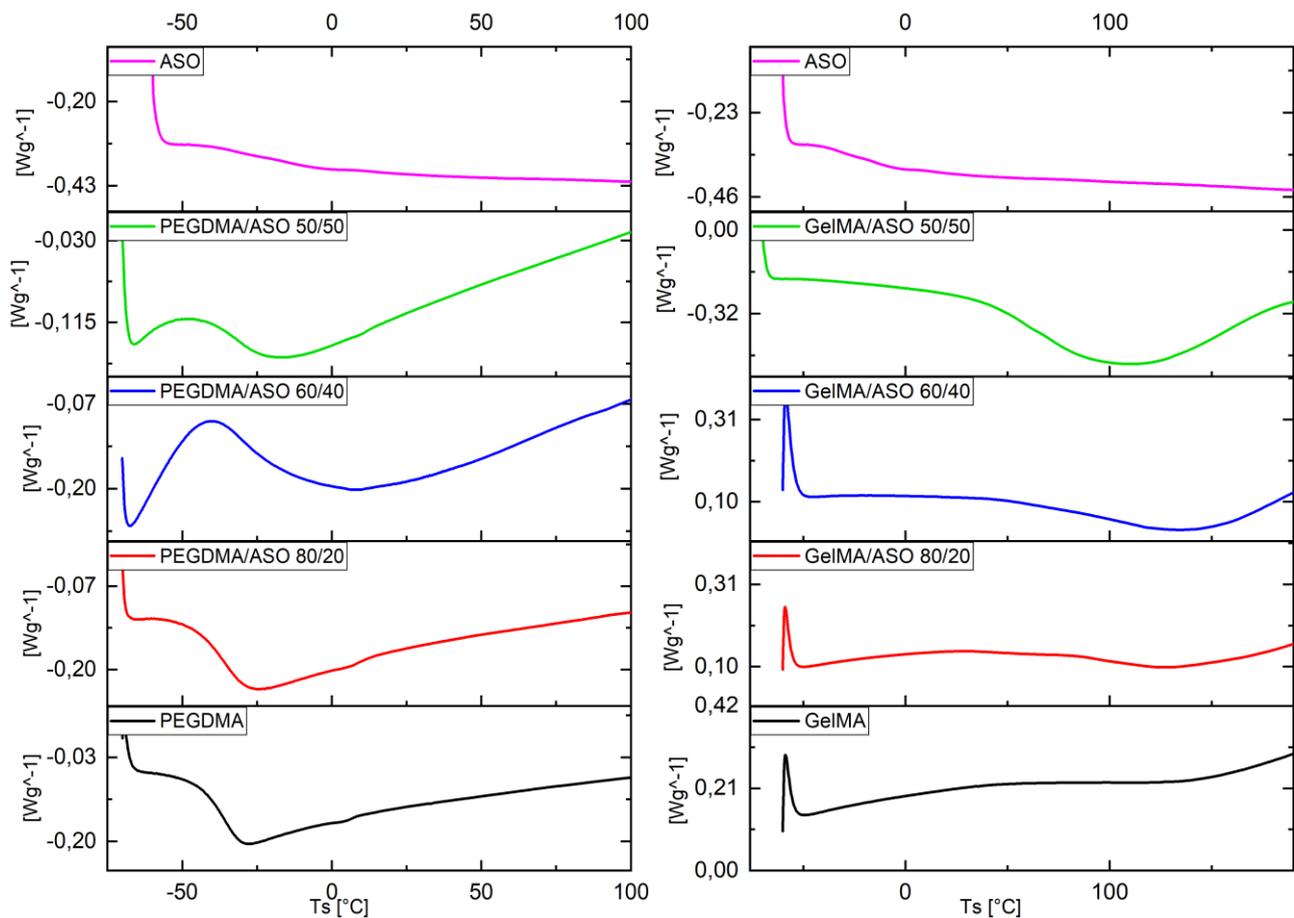


Figura 4.8: DSC degli scaffold PEGDMA/ASO e GelMA/ASO

Formulazione	T _g DSC
	°C
ASO	3,6
PEGDMA/ASO 50/50	-19,4
PEGDMA/ASO 60/40	-24,3
PEGDMA/ASO 80/20	-35,5
PEGDMA	-36,5

Tabella 4.4: T_g DSC PEGDMA/ASO

Formulazione	T _g DSC
	°C
ASO	3,6
GelMA/ASO 50/50	89,0
GelMA /ASO 60/40	126,8
GelMA /ASO 80/20	130,1
GelMA	138,2

Tabella 4.5: T_g DSC GelMA/ASO

4.1.5 DMTA

L'andamento del coefficiente di smorzamento dei campioni di PEGDMA/ASO e GelMA/ASO è raffigurato in figura 4.9 e 4.11, le temperature di transizione vetrosa dei polimeri sono riportate in tabella 4.6 e 4.7. il valore di modulo conservativo in funzione del tempo è invece rappresentato in figura 4.10 e 4.12. Le T_g dei campioni composti da PEGDMA/ASO si dimostrano in linea con i risultati ottenuti con la DSC, infatti le formulazioni PEGDMA e ASO presentano i due valori estremi e le formulazioni intermedie assumono una T_g intermedia. E' possibile inoltre constatare anche l'irrigidimento della struttura reticolata in seguito all'aggiunta di olio di soia. Dall'analisi DMTA dei polimeri GelMA/ASO si può notare che l'andamento del coefficiente di smorzamento mostra un doppio picco, questo doppio picco è dovuto ad una separazione di fase. Andando nello specifico, le DMTA GelMA/ASO 80/20, 60/40 e 50/50 assumono un andamento bifasico in cui i due polimeri di olio di soia e GelMA si separano e reticolando danno origine a due temperature di transizione vetrosa diverse. Il picco del GelMA (componente più rigido) è compreso tra i 160 °C e i 210 °C mentre l'ASO (componente meno rigido) risulta essere tra i 55 °C e i 105 °C. In particolare, la T_g relativa all'ASO per il campione 50/50 si assesta sui 56,4 °C, per il campione 60/40 si sposta a 90,9 °C, infine, nel caso 80/20 il picco è oltre i 100 °C. Quest'ultima osservazione dimostra che le due fasi polimeriche sono separate ma interpenetrate in quanto la rigidità di un network condiziona l'altro, infatti aumentando la concentrazione di GelMA (da 50/50 a 60/40 e poi a 80/20) il picco dell'ASO si sposta verso le alte temperature poiché è condizionato dalla rigidità del GelMA.

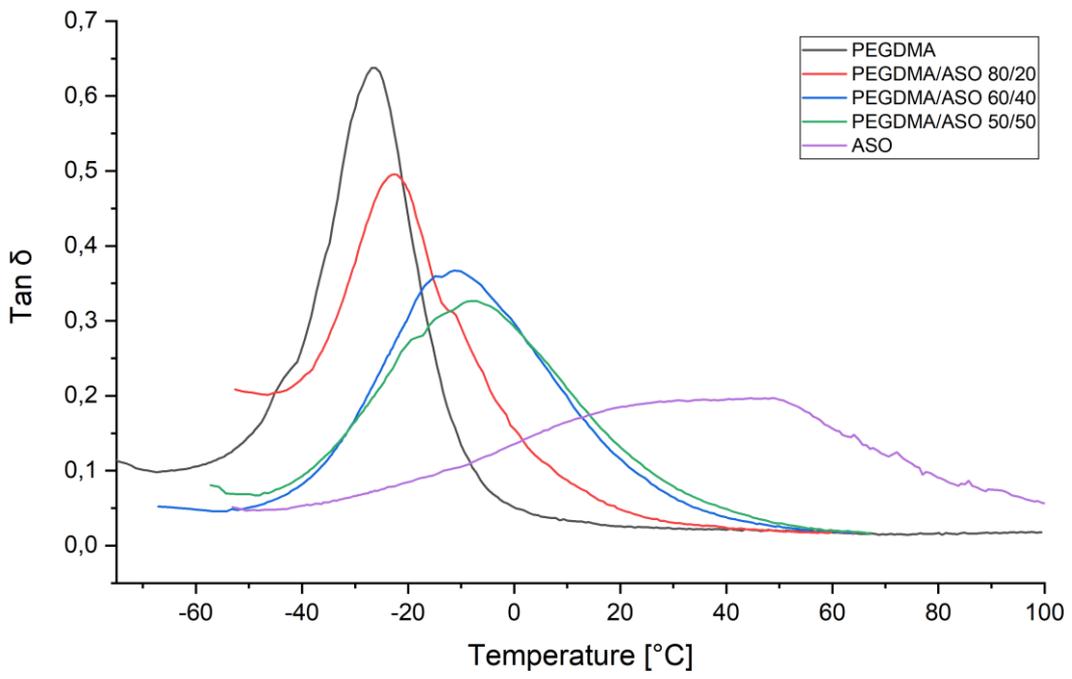


Figura 4.9: Tan δ PEGDMA/ASO

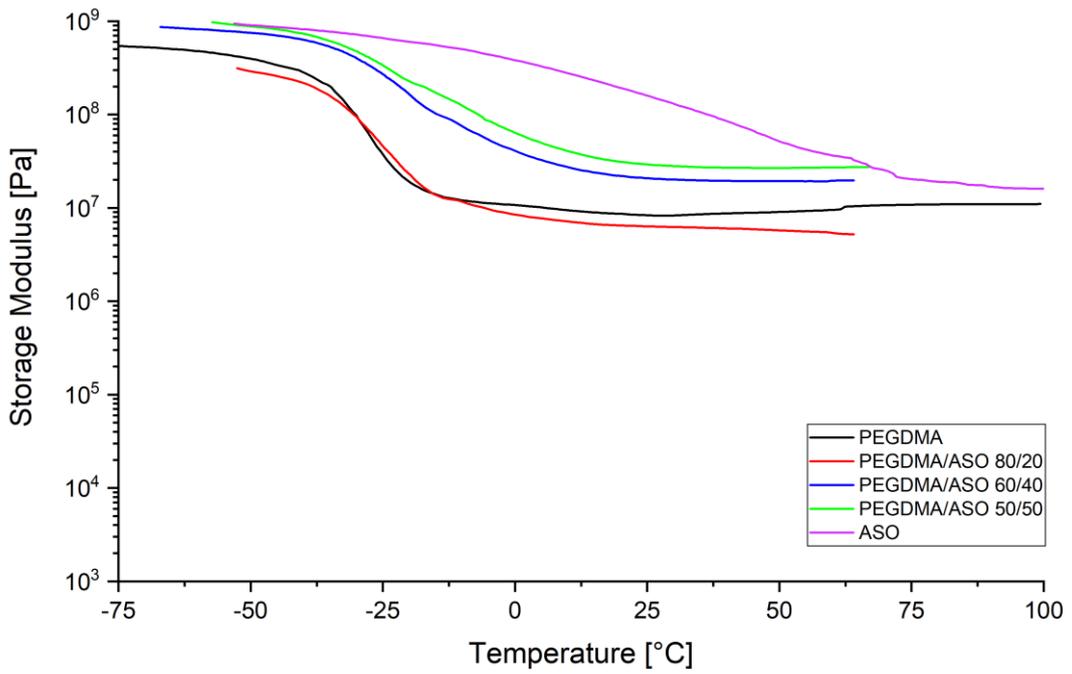


Figura 4.10: Storage modulus PEGDMA/ASO

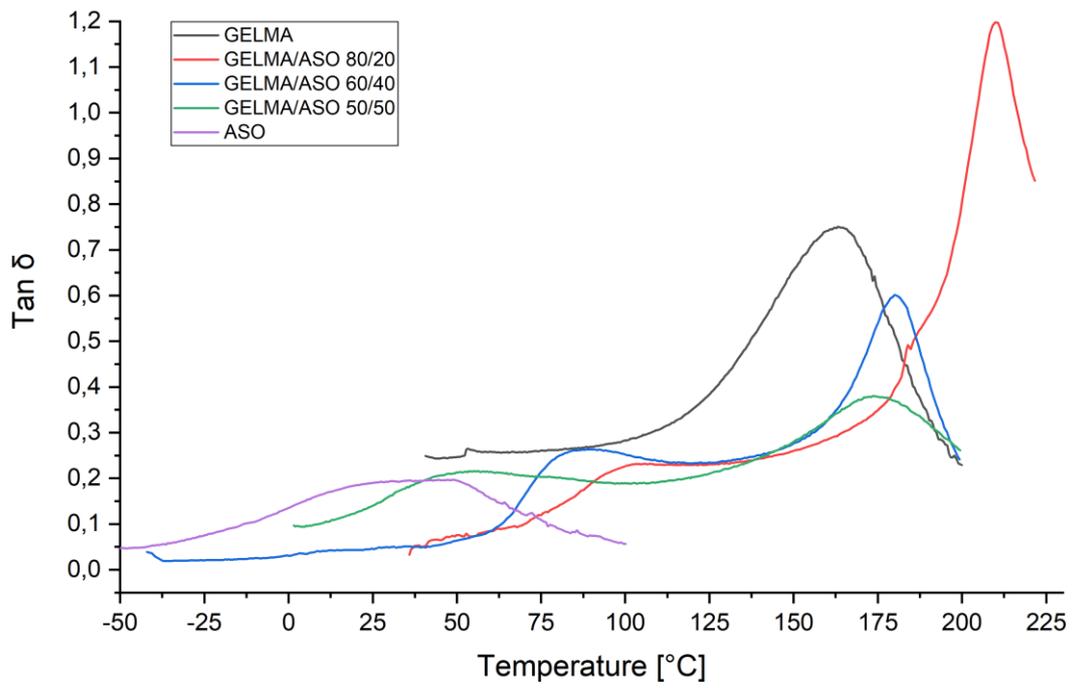


Figura 4.11: $\tan \delta$ GelMA/ASO

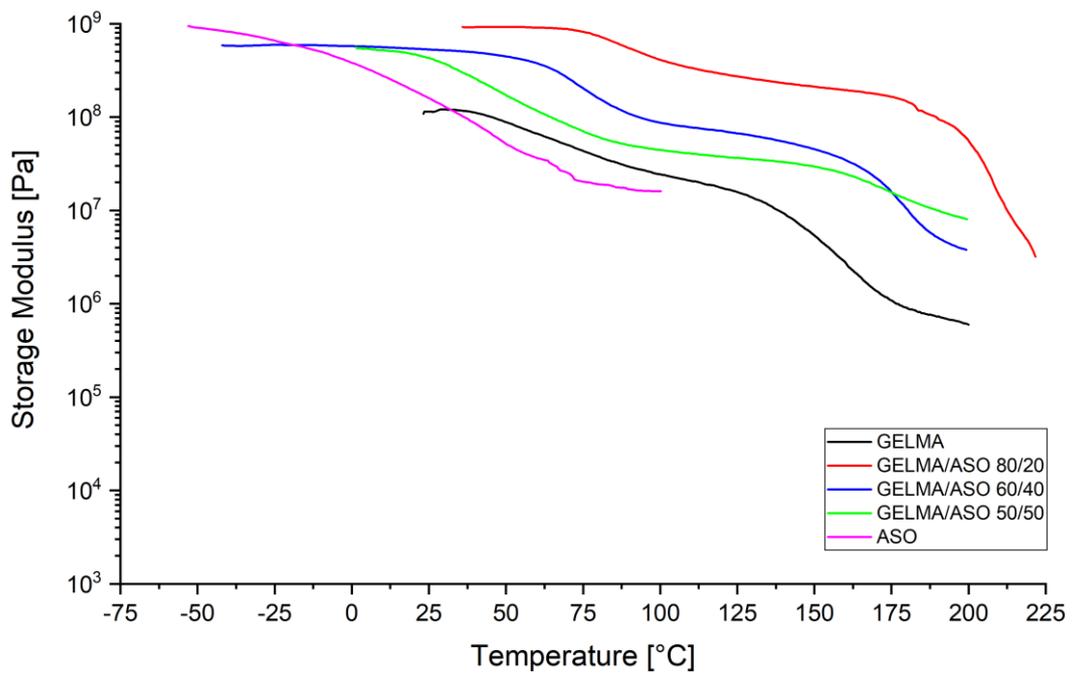


Figura 4.12: Storage modulus GelMA/ASO

Formulazione	T _g DMTA	
	°C	
ASO	45,0	
PEGDMA/ASO 50/50	-7,0	
PEGDMA/ASO 60/40	-11,3	
PEGDMA/ASO 80/20	-22,7	
PEGDMA	-26,1	

Tabella 4.6: T_g DMTA PEGDMA/ASO

Formulazione	T _g DMTA	
	°C	
ASO	45,0	
GelMA/ASO 50/50	56,4	174,0
GelMA /ASO 60/40	90,9	180,1
GelMA /ASO 80/20	105,9	209,9
GelMA	163,2	

Tabella 4.7 T_g DMTA GelMA/ASO

4.1.6 TGA

Le curve peso% in funzione del tempo degli idrogeli costituiti da PEGDMA/ASO e GelMA/ASO sono rappresentate rispettivamente in figura 4.13 e 4.14, i dati relativi a T_{id}, T_{deg} e al residuo post-degradazione dei copolimeri sono riportati nelle tabelle 4.8 e 4.9. Gli scaffold basati sul PEGDMA/ASO si dimostrano maggiormente resistenti alla degradazione termica in quanto sia T_{id} che T_{deg} risultano sensibilmente maggiori rispetto ai corrispettivi polimeri GelMA/ASO. La degradazione dei campioni di GelMA/ASO risulta fortemente dipendente dalla composizione specifica, infatti, più aumenta la concentrazione di ASO nello scaffold più quest'ultimo tende ad essere termoresistente. Si possono osservare anche delle differenze a livello del residuo; i campioni che contengono più olio di soia hanno prodotti di degradazione che volatilizzano completamente non lasciando residui, mentre le formulazioni composte principalmente da GelMA tendono ad avere un certo residuo in quanto il GelMA si degrada formando uno scheletro carbonioso che non volatilizza. Se si confrontano gli scaffold di PEGDMA e ASO si può notare che le temperature di degradazione sono simili e non si notano differenze significative a livello di residuo.

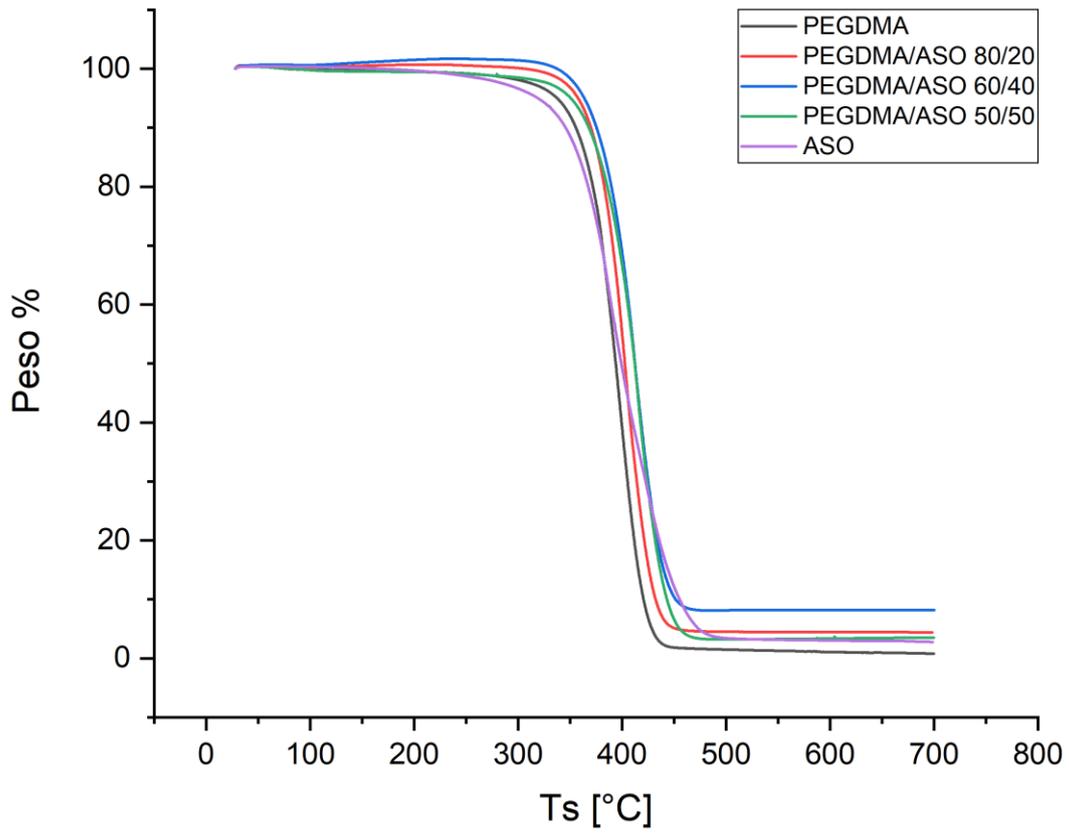


Figura 4.13: TGA campioni PEGDMA/ASO

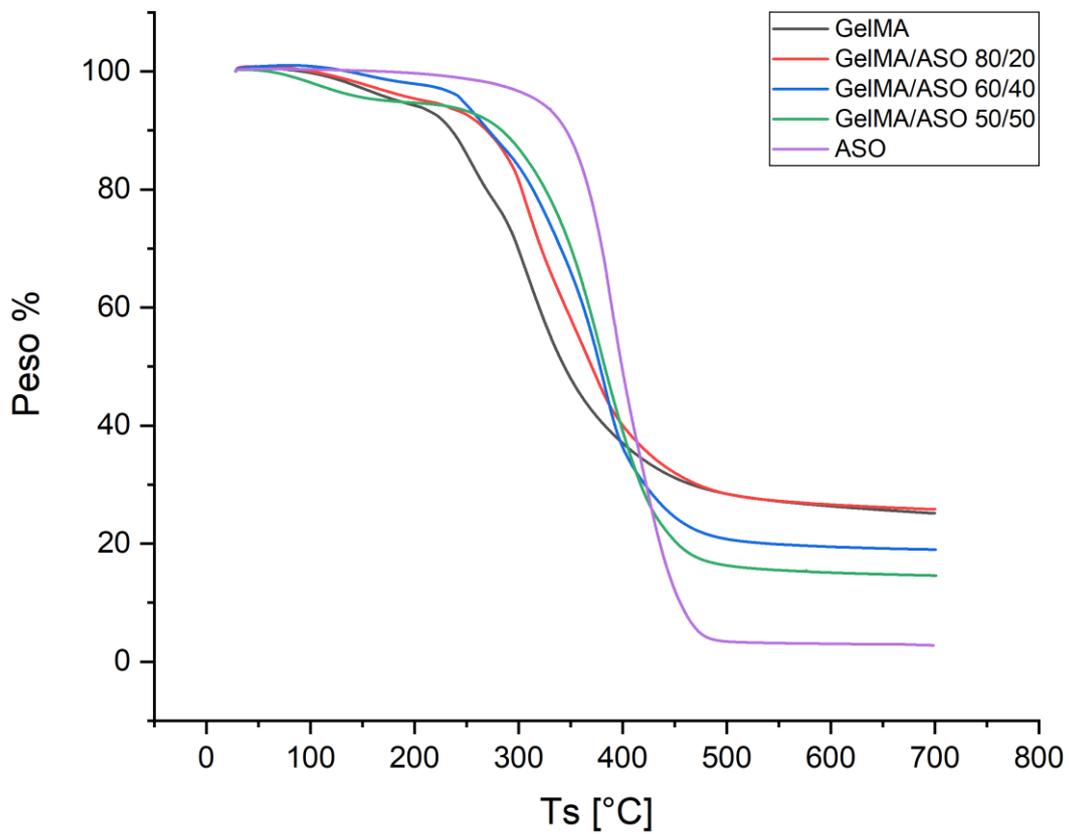


Figura 4.14: TGA campioni GelMA/ASO

Formulazione	T _{id}	T _{deg}	Residuo
	°C	°C	%
PEGDMA	337,7	398,5	0,8
PEGDMA/ASO 80/20	358,0	402,9	4,4
PEGDMA/ASO 60/40	363,8	412,6	8,2
PEGDMA/ASO 50/50	350,9	414,6	3,5
ASO	319,3	393,3	2,8

Tabella 4.8: TGA dei campioni PEGDMA/ASO

Formulazione	T _{id}	T _{deg}	Residuo
	°C	°C	%
GelMA	184,7	308,6	25,8
GelMA/ASO 80/20	210,9	307,5	25,1
GelMA/ASO 60/40	246,6	384,8	19,0
GelMA/ASO 50/50	215,8	382,2	14,6
ASO	319,3	393,3	2,8

Tabella 4.9: TGA dei campioni GelMA/ASO

4.1.7 Swelling

Il rigonfiamento in acqua a temperatura ambiente dei copolimeri PEGDMA/ASO e GelMA/ASO è rappresentato in figura 4.15 e 4.16, in figura 4.17 e 4.18 è riportato lo swelling degli stessi campioni ma condotto a temperatura fisiologica. Come è possibile notare dal valore di rigonfiamento a plateau, i gel composti principalmente da GelMA e PEGDMA sono quelli che rigonfiano di più in acqua essendo costituiti interamente da polimero idrofilico, man mano che si aumenta la quantità di ASO idrofobico diminuisce sia il la velocità di rigonfiamento iniziale che lo swelling a plateau. Confrontando i valori a plateau di grafici diversi si può osservare come la gelatina sia molto più idrofilica del PEGDMA, infatti, le formulazioni contenenti GelMA possono arrivare a un massimo di 100%-120% di rigonfiamento mentre i polimeri che includono il PEGDMA si fermano al 50%-55%.

L'effetto della temperatura si può studiare comparando gli swelling a 37 °C e quelli svolti a temperatura ambiente. Aumentando la temperatura non si osservano variazioni significative di swelling percentuale all'equilibrio, tuttavia, si può notare una differenza nella velocità iniziale di rigonfiamento. Infatti, il tratto iniziale delle curve a 37 °C risulta più ripido rispetto alle curve osservate a 20 °C, ne consegue che i copolimeri a 37 °C raggiungeranno il plateau in tempi inferiori rispetto ai corrispettivi scaffold a temperatura ambiente.

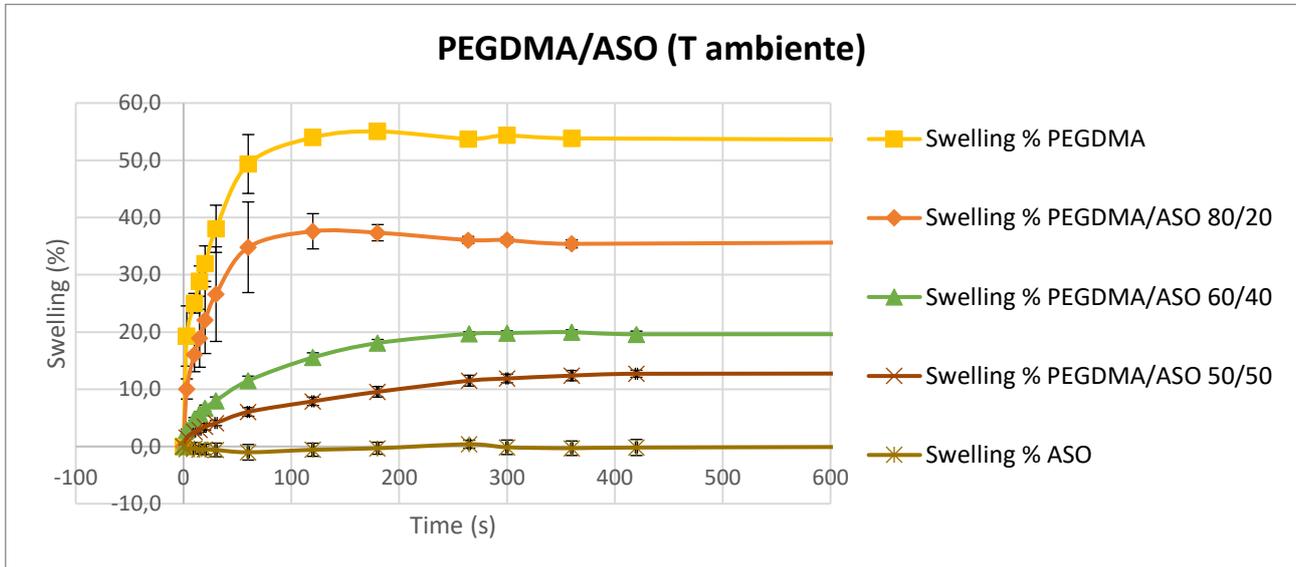


Figura 4.15: swelling dei campioni PEGDMA/ASO a temperatura ambiente

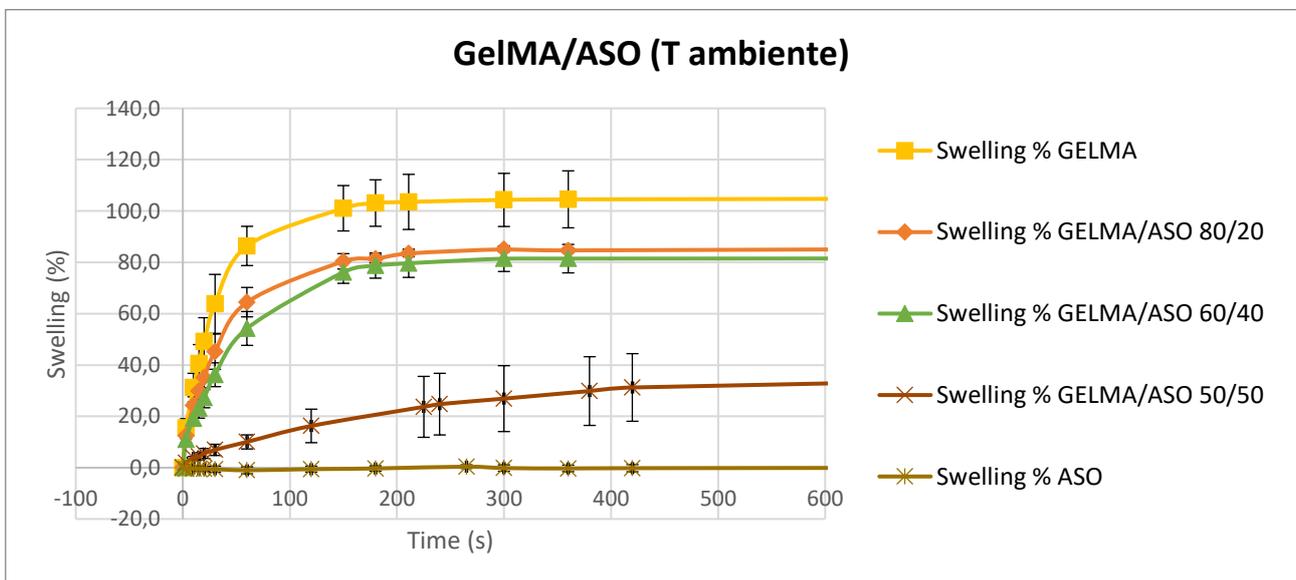


Figura 4.16: swelling dei campioni GelMA/ASO a temperatura ambiente

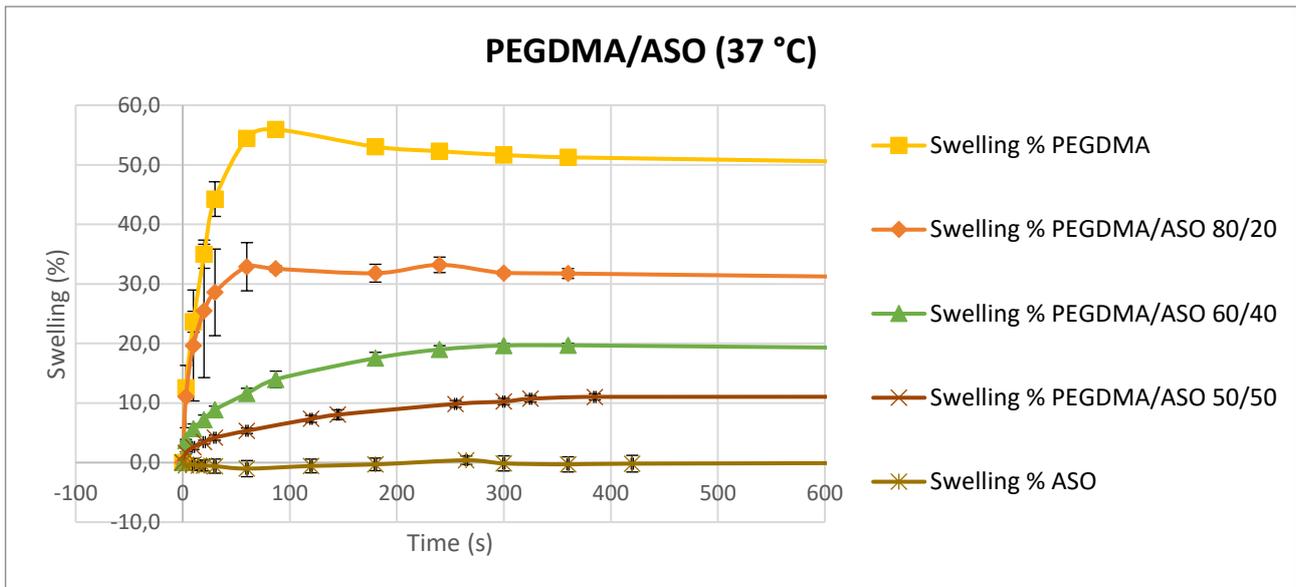


Figura 4.17: swelling dei campioni PEGDMA/ASO a 37°C

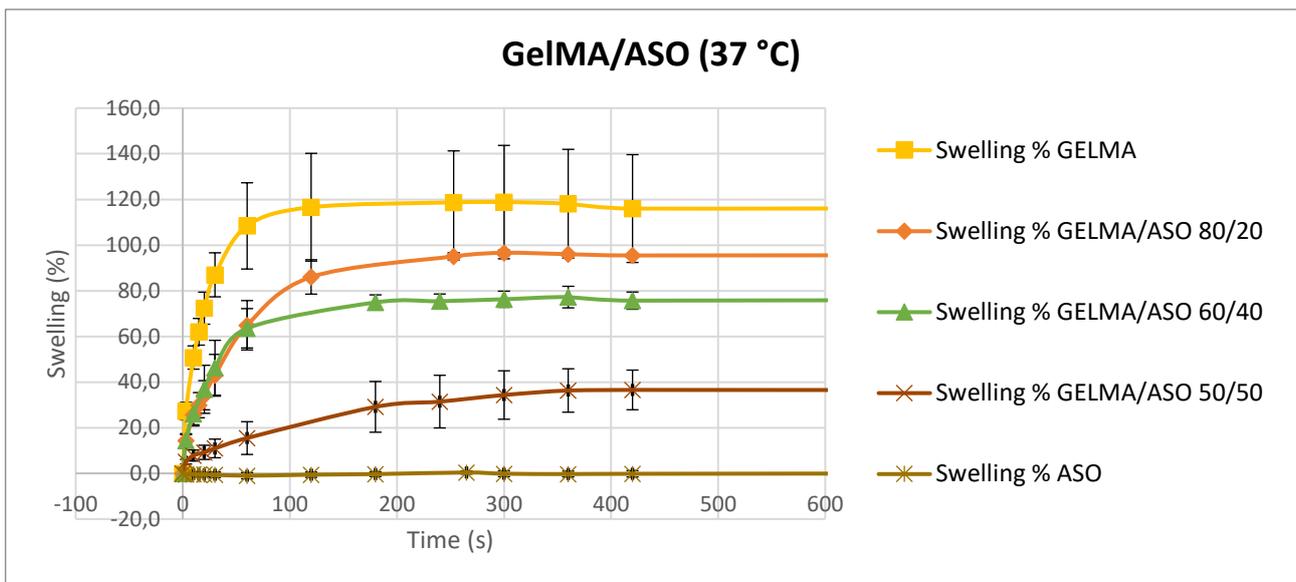


Figura 4.18: swelling dei campioni GelMA/ASO a 37°C

4.1.8 Angolo di contatto

L'angolo di contatto con acqua, diodometano e il valore di tensione superficiale degli idrogeli sono rappresentati nelle tabelle 4.10 e 4.11. Gli scaffold composti maggiormente da polimero idrofilico (PEGDMA e GELMA) presentano angoli di contatto molto bassi con acqua, al contrario gli angoli con diodometano organico sono molto più elevati rispetto alle altre formulazioni contenenti olio di soia. Man mano che si aumenta la concentrazione di ASO idrofobico si va verso la situazione opposta, gli angoli di contatto con acqua aumentano, al contempo gli angoli con diodometano diminuiscono.

Formulazione	Angolo con acqua	Angolo con CH ₂ I ₂	Tensione superficiale
	°	°	[mN/m]
PEGDMA	37,6 ± 1,27	35,0 ± 4,01	60,6
PEGDMA/ASO 80/20	37,9 ± 2,42	20,1 ± 1,57	62,6
PEGDMA/ASO 60/40	41,6 ± 4,40	20,0 ± 1,30	60,8
PEGDMA/ASO 50/50	42,3 ± 3,44	16,1 ± 2,48	60,9

Tabella 4.10: Angoli di contatto campione PEGDMA/ASO

Formulazione	Angolo con acqua	Angolo con CH ₂ I ₂	Tensione superficiale
	°	°	[mN/m]
GelMA	51,9 ± 2,6	47,2 ± 4,43	54,5
GelMA/ASO 80/20	56,8 ± 6,6	39,8 ± 2,26	48,8
GelMA/ASO 60/40	62,2 ± 2,5	37,3 ± 3,47	46,8
GelMA/ASO 50/50	70,7 ± 6,8	36,1 ± 1,47	43,9
ASO	85,3 ± 3,27	26,3 ± 1,76	45,8

Tabella 4.11: Angoli di contatto campione GelMA/ASO

4.1.9 SEM

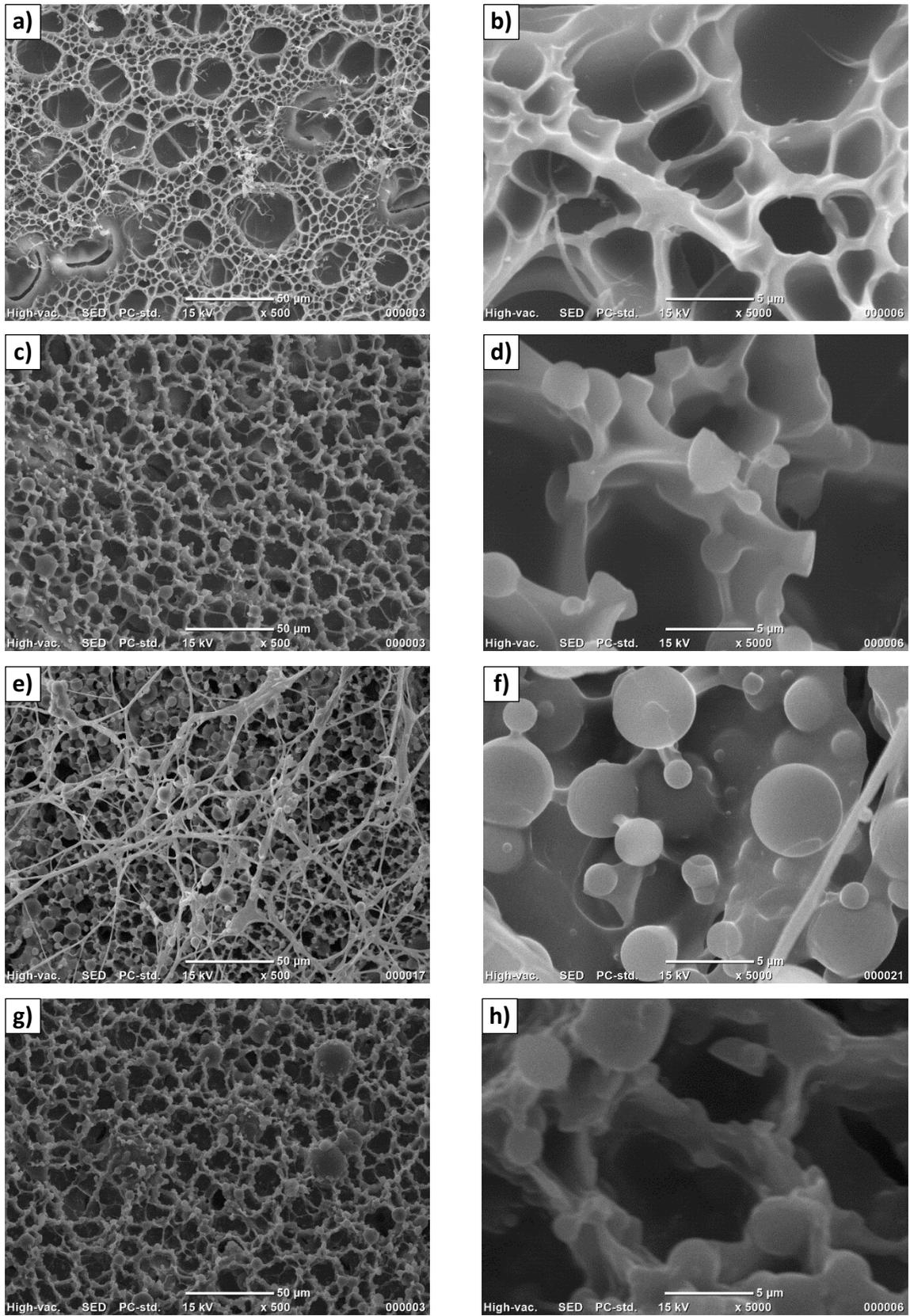
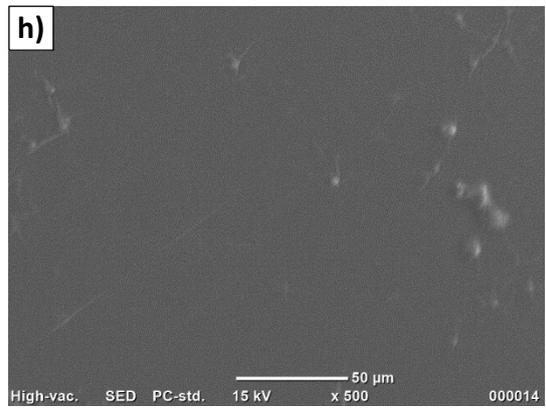
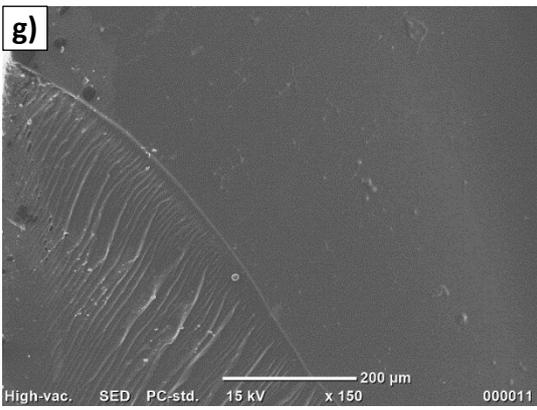
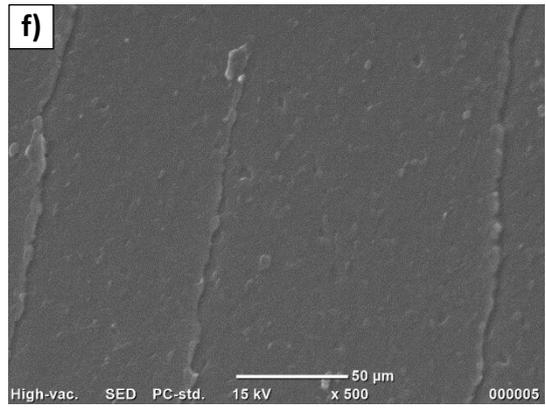
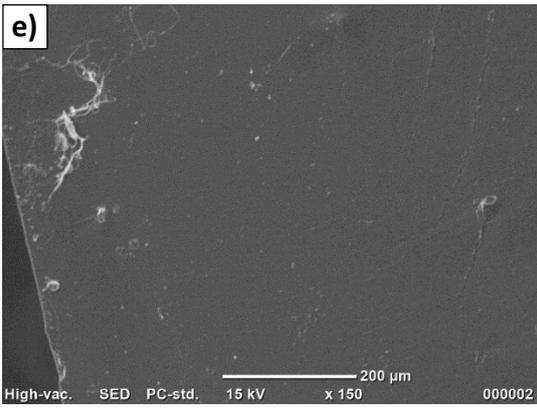
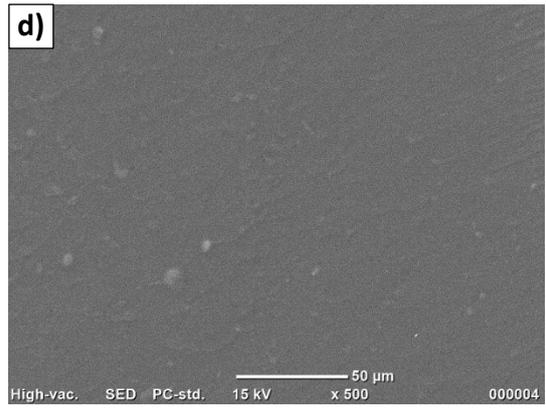
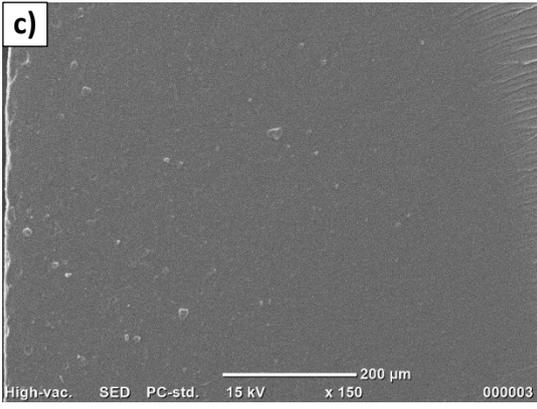
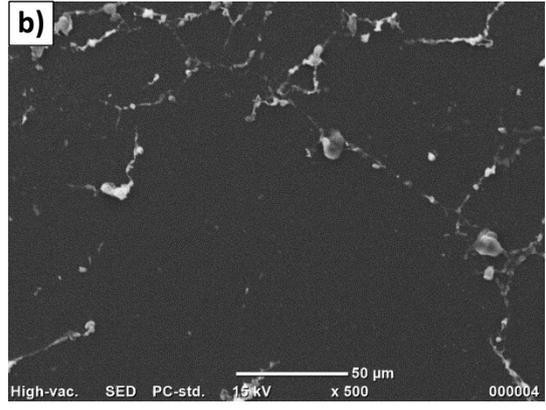
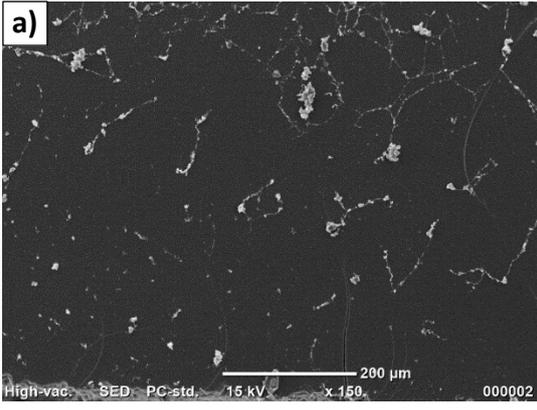


Figura 4.19: Ingrandimento x500 (a sinistra) e x5000 (a destra) del campione di GelMA (a, b), GelMA/ASO 80/20 (c, d), GelMA/ASO 60/40 (e, f), GelMA/ASO 50/50 (g, h).



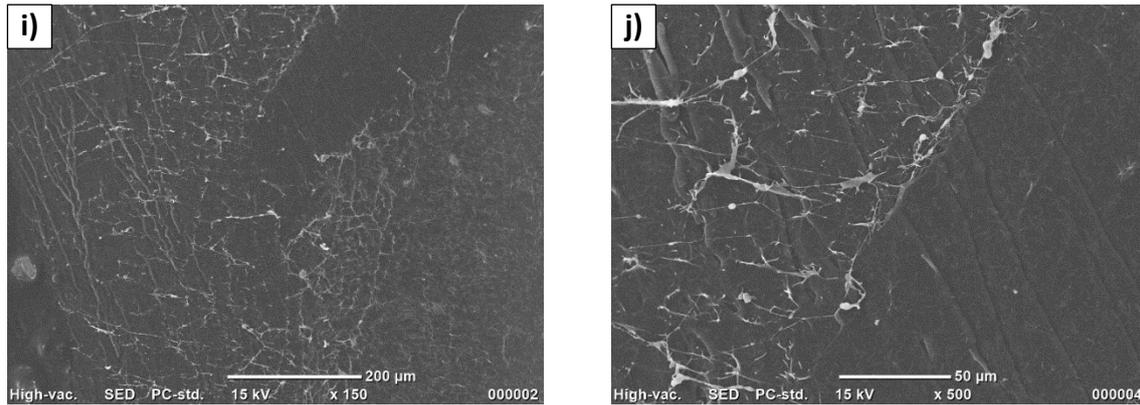


Figura 4.20: Ingrandimento x150 (a sinistra) e x500 (a destra) del campione di PEGDMA (a, b), PEGDMA/ASO 80/20 (c, d), PEGDMA/ASO 60/40 (e, f), PEGDMA/ASO 50/50 (g, h), ASO (i, j)

Le immagini topografiche dei campioni ottenute tramite SEM sono rappresentate in figura 4.19 e figura 4.20, analizzando le superfici dei campioni è possibile evidenziare la struttura porosa interconnessa degli scaffold GelMA/ASO. In particolare, l'idrogelo composto esclusivamente da GelMA possiede una struttura composta da sia macropori (circa 20/30 µm) che micropori di dimensione massima a 5 µm. Gli scaffold contenenti sia GelMA che ASO, a conferma dei risultati della DMTA, possiedono una porosità più omogenea con una parziale separazione di fase in cui la gelatina metacrilata forma la matrice e l'ASO il componente minoritario. Gli scaffold di PEGDMA, PEGDMA/ASO e ASO, a causa del rigonfiamento in acqua insufficiente, possiedono una topografia superficiale liscia priva di porosità.

4.1.10 Test di compressione

I valori di modulo elastico e sforzo a rottura ottenuti dal test a compressione sui copolimeri PEGDMA/ASO sono riportati in figura 4.21, i corrispettivi dati dei gel composti da GelMA e ASO sono riportati in figura 4.22. Analizzando il valore del modulo elastico a compressione degli scaffold di GelMA/ASO e PEGDMA/ASO è possibile verificare l'irrigidimento della struttura polimerica all'aumentare della concentrazione specifica di ASO. Più precisamente, l'olio di soia ha permesso di incrementare la rigidità dell'idrogelo di PEGDMA da 1,25 MPa (PEGDMA 100% wt) a circa 3,17 MPa (PEGDMA/ASO 50/50), per gli scaffold GelMA/ASO si sono registrate variazioni più contenute da circa 130 kPa a 170 kPa. Tale aumento è giustificato dal valore di rigidità dell'ASO notevolmente maggiore rispetto al PEGDMA e al GelMA.

Il valore di tensione a rottura risulta anch'esso influenzato dalla presenza del rinforzante meccanico. In funzione della quantità di ASO, il valore di σ_{max} degli scaffold di PEGDMA/ASO varia tra i 170 kPa a 1,5 MPa. Per gli idrogeli contenenti gelatina metacrilata si è registrato un aumento di tensione a rottura molto limitato tra gli scaffold GelMA 100% wt, GelMA/ASO 80/20 e 60/40 mentre per lo scaffold GelMA/ASO 50/50 si è rilevato un aumento di σ_{max} fino a 400 kPa pur con un'alta variabilità tra i diversi campioni.

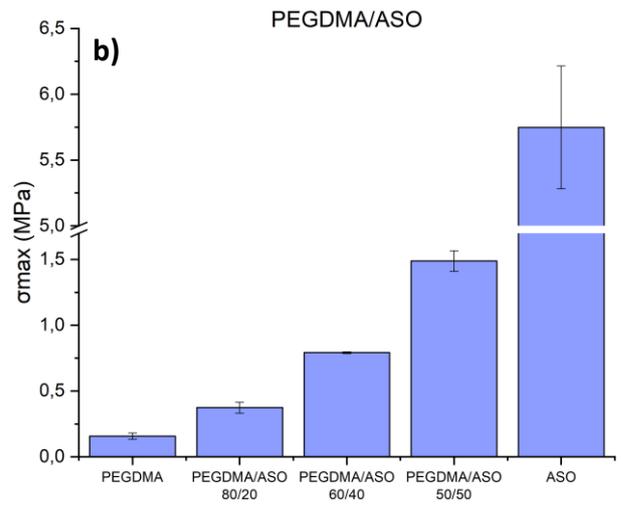
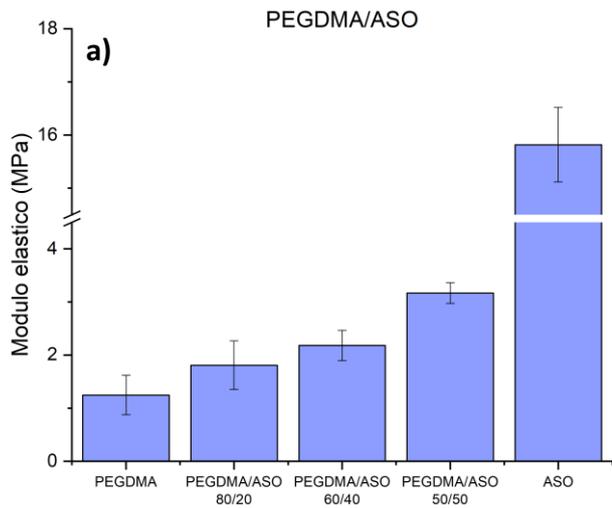


Figura 4.21: Modulo elastico a compressione (a) e sforzo a rottura (b) dei campioni di PEGDMA/ASO

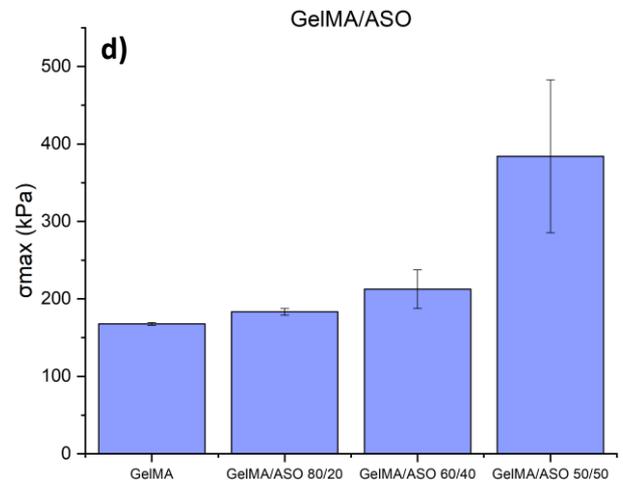
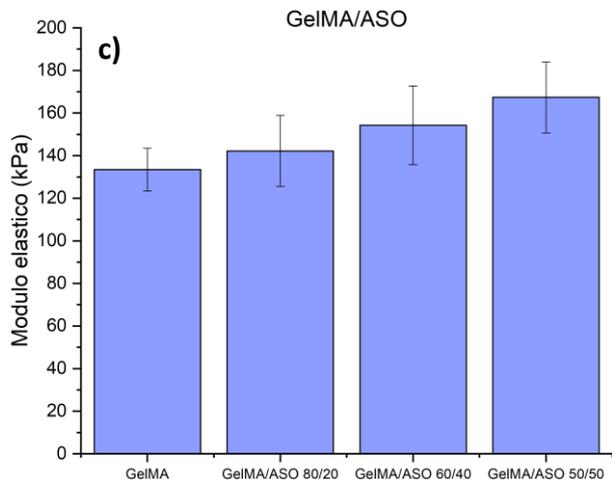


Figura 4.22: Modulo elastico a compressione (c) e sforzo a rottura (d) dei campioni di GelMA/ASO

4.2 Test cellulari

4.2.1 Test di citotossicità

Dai grafici di vitalità dei copolimeri PEGDMA/ASO (figura 4.23) e GelMA/ASO (figura 4.24) si possono ricavare diverse informazioni. Innanzitutto, nonostante la variabilità dei risultati (soprattutto per i campioni di GelMA/ASO), tutte le formulazioni presentano un grado di vitalità tale da garantire la biocompatibilità (>70% rispetto ai controlli). Analizzando più nel dettaglio i dati relativi ai polimeri GelMA/ASO si evince che i campioni migliori dal punto di vista della citotossicità sono quelli a composizione intermedia 80/20 e 60/40. Infatti, il valore di vitalità del GelMA puro è risultato più basso del previsto a causa di un leggero rilascio acido, verificato in modo semi-quantitativo con cartina al tornasole. Gli scaffold ad alto contenuto di ASO hanno valori di vitalità più bassi rispetto ai controlli, questo perché nel processo di scambio di solventi in acqua potrebbe non essersi liberato tutto il DMSO. Infatti, al contrario del GelMA, l'ASO è molto idrofobo quindi può aver trattenuto più solvente causando un valore più basso di vitalità cellulare dopo la semina. I dati di vitalità per i polimeri di PEGDMA/ASO sono più costanti e sono compresi tra il 100% e il 120% dei controlli. Tuttavia, anche per questa tipologia di polimeri si può osservare una leggera diminuzione dell'indice di vitalità per i campioni più idrofobici, la causa di questo trend è anch'essa associata all'estrazione incompleta di DMSO.

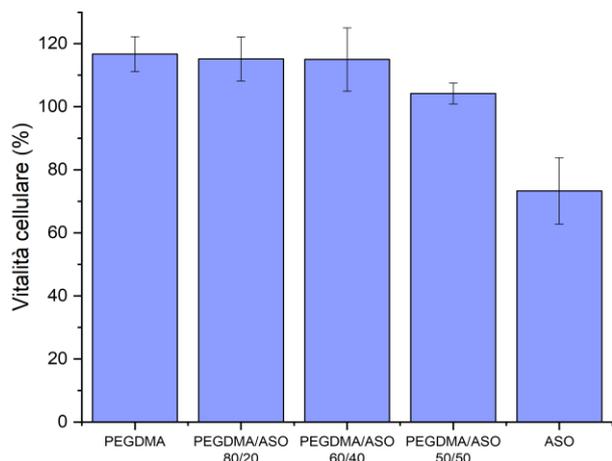


Figura 4.23: Test di citotossicità PEGDMA/ASO

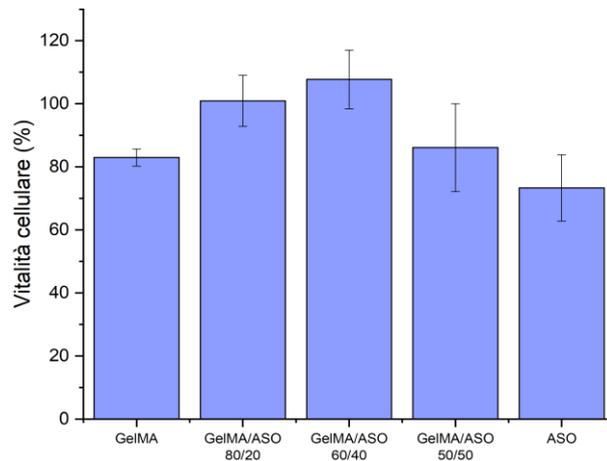


Figura 4.24: Test di citotossicità GelMA/ASO

4.2.2 Test di adesione cellulare

In figura 4.25 e 4.26 sono riportati i risultati del test di adesione per gli scaffold di PEGDMA/ASO e GelMA/ASO. Mediamente, tra i copolimeri PEGDMA/ASO, l'idrogel costituito da PEGDMA/ASO 50/50 è quello che maggiormente riesce a promuovere l'adesione cellulare. Quest'ultimo assume un tasso di vitalità attorno al 50% per tutti i time step. Al contrario, il PEGDMA 100% wt è il polimero che presenta i valori di adesione più bassi. Gli idrogeli PEGDMA/ASO 80/20 e 60/40 presentano dei valori di vitalità intermedi tra la combinazione 50/50 e il PEGDMA puro. L'ASO riporta un andamento poco ripetibile tipico dei materiali con scarse proprietà adesive.

Gli idrogeli costituiti da GelMA/ASO danno origine a un comportamento differente. I polimeri a minor contenuto di ASO, ovvero GelMA e GelMA/ASO 80/20, sono quelli che generano dei valori di vitalità più comparabili ai controlli nei diversi time step. Questi ultimi possiedono quindi il miglior comportamento sia in termini di adesione che in termini di proliferazione. Per gli idrogeli a maggior contenuto di polimero idrofobico si assiste a una diminuzione del tasso di vitalità cellulare all'aumento di quantità di ASO. Tuttavia, a 14 giorni la differenza tra la vitalità delle cellule sui campioni a maggior contenuto di ASO e quelli a maggior

contenuto di GelMA si assottiglia notevolmente. Infatti, se la formulazione 50/50 a 3 giorni possiede un grado di vitalità del 58%, a 14 giorni la vitalità aumenta fino al 75%. Analogamente, GelMA/ASO 60/40 a 3 giorni genera una vitalità del 76% mentre a 14 giorni l'indice aumenta fino al 94% rispetto ai controlli. Questo aumento di vitalità cellulare per i time step a lungo termine risulta correlato con la proliferazione dei fibroblasti adesi precedentemente.

In generale, gli scaffold costituiti da PEGDMA presentano un'adesione molto più bassa rispetto ai polimeri GelMA/ASO. Tale differenza risulta evidente soprattutto per le formulazioni a minor contenuto di ASO. Infatti, a causa delle loro caratteristiche chimico-superficiali, i substrati di PEGDMA/ASO non assumono le proprietà ottimali per favorire l'adesione. In particolare, l'assenza di sequenze adesive, la topografia superficiale liscia e la scarsa bagnabilità dell'ASO sono le due caratteristiche che maggiormente tendono ad inibire l'adesione e la proliferazione cellulare.

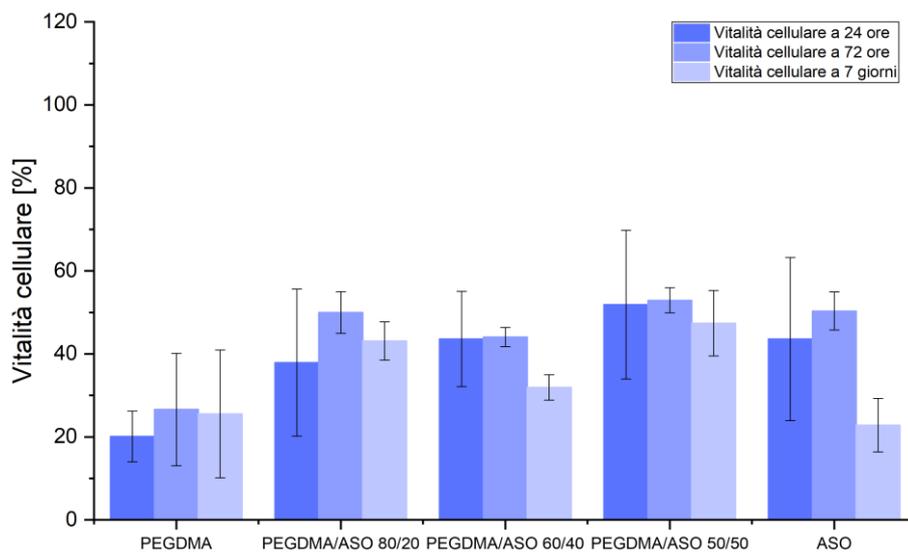


Figura 4.25: Test di adesione cellulare sui campioni PEGDMA/ASO

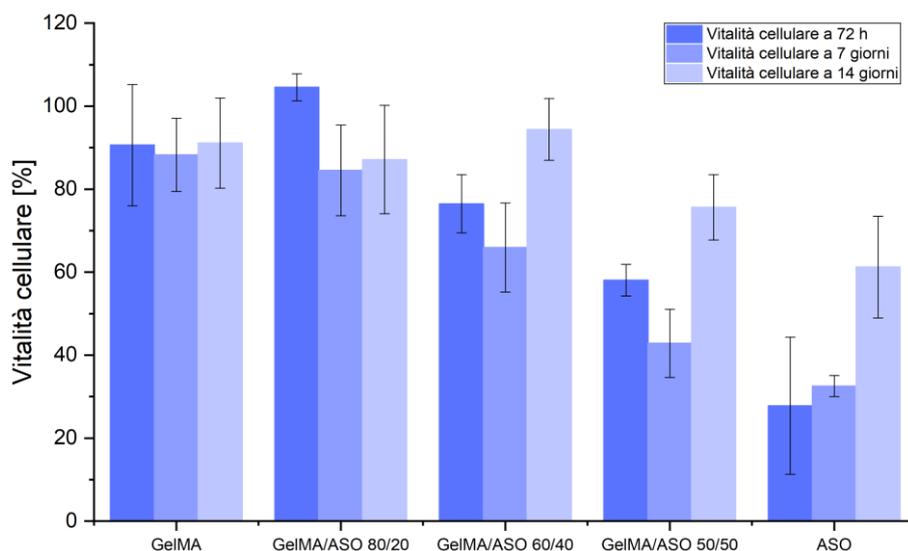


Figura 4.26: Test di adesione cellulare sui campioni GelMA/ASO

4.2.3 Saggio Falloidina

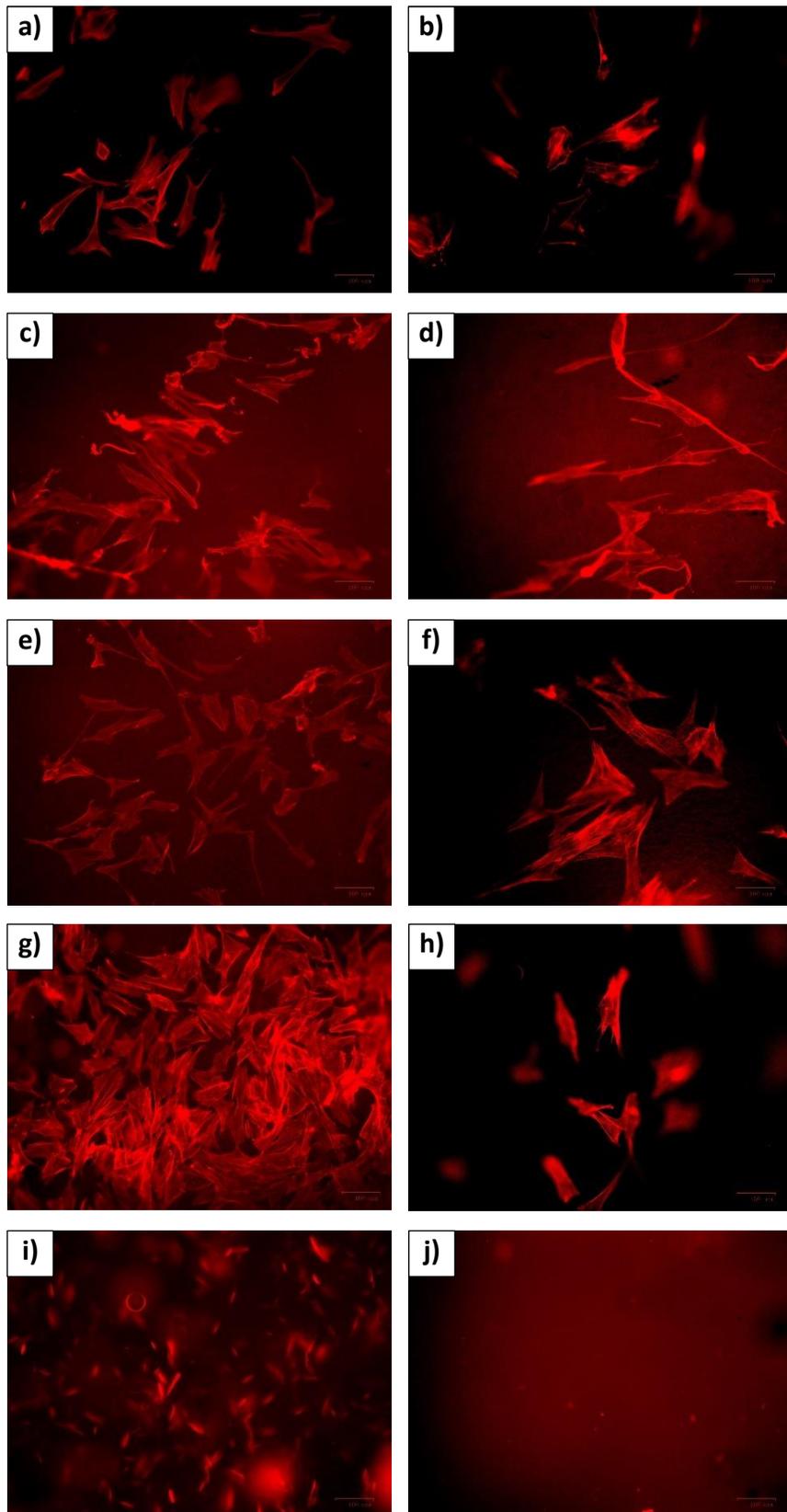


Figura 4.27: Saggio Falloidina a 72h (a sinistra) e 7 giorni (a destra) sui campioni di GelMA (a, b), GelMA/ASO 80/20 (c, d), GelMA/ASO 60/40 (e, f), GelMA/ASO 50/50 (g, h), ASO (i, j)

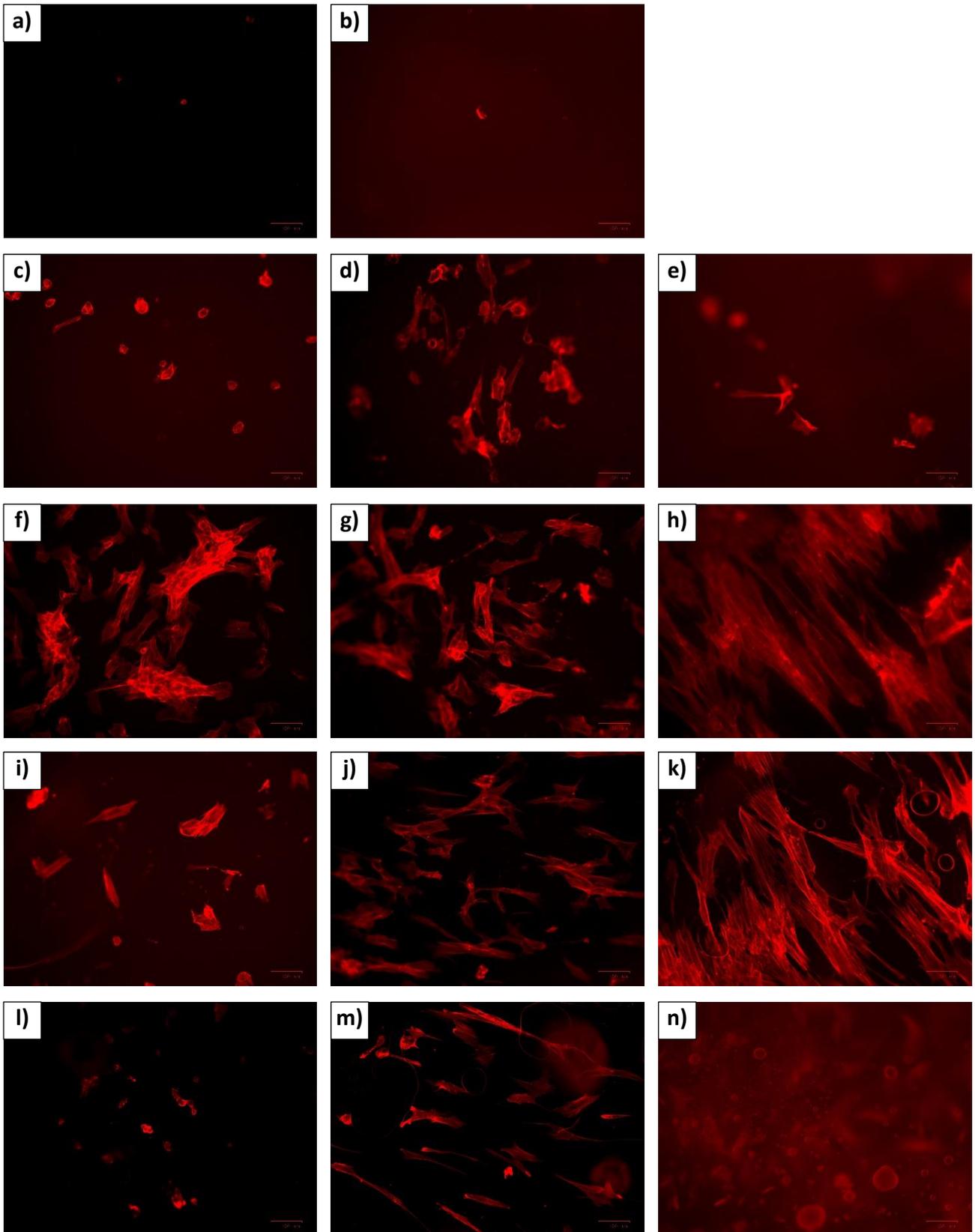


Figura 4.28: Saggio Falloidina a 24h (a sinistra), 72 ore (al centro) e 7 giorni (a destra) sui campioni di PEGDMA (a, b), PEGDMA/ASO 80/20 (c, d, e), PEGDMA /ASO 60/40 (f, g, h), PEGDMA /ASO 50/50 (i, j, k), ASO (l, m, n)

In figura 4.27 e 4.28 è riportata la morfologia delle cellule adese agli scaffold. Analizzando le immagini delle cellule adese sui copolimeri PEGDMA/ASO è possibile rilevare un comportamento comune tra i vari time step. In accordo con i dati della resazurina, gli scaffold molto idrofilici e molto idrofobici (PEGDMA e l'ASO) sembrano essere i substrati che meno promuovono l'adesione cellulare, infatti, le immagini 4.38, 4.39 e 4.43 presentano pochi fibroblasti con morfologia per lo più tondeggianti. Al contrario, gli scaffold a composizione intermedia (come il PEGDMA/ASO 60/40 e 50/50) sembrano avere maggiori capacità adesive in quanto le cellule sono presenti in maggior quantità e tendono ad appiattirsi di più.

Al contrario, sui substrati costituiti da GelMA/ASO si è riscontrato un gran numero di cellule adese su tutti i copolimeri. Infatti, a parità di concentrazione di ASO, gli scaffold composti da GelMA/ASO possiedono generalmente un numero maggiore di cellule adese rispetto ai corrispettivi copolimeri PEGDMA/ASO. In accordo al risultato del test di adesione, tale differenza è particolarmente evidente nel confronto tra GelMA-PEGDMA e GelMA/ASO 80/20-PEGDMA/ASO 80/20 mentre risulta meno marcata confrontando i copolimeri a maggior contenuto di ASO.

5 Conclusioni e sviluppi futuri

Nel presente lavoro di tesi si sono analizzate le proprietà fisico-chimiche di idrogeli fotoreticolati composti da GelMA e PEGDMA. Questi prepolimeri sono ben noti nel settore biomedico, tuttavia, essi presentano delle caratteristiche meccaniche ben definite mentre la rigidità dei tessuti umani varia da 100 Pa (tessuto cerebrale) fino a 2-4 GPa (osso corticale). Per questo motivo, si è utilizzato l'ASO come materiale di rinforzo meccanico per poter espandere il range di rigidità di questi idrogeli. L'ASO ha permesso di modulare la rigidità dell'idrogelo composto da PEGDMA/ASO in un range compreso tra circa 1 MPa e 3 MPa. Questi valori di modulo elastico sono molto simili a quelli ottenuti per la cartilagine (4-5 MPa), il midollo spinale (1-1,2 MPa) e per il nervo periferico (500 kPa-1MPa) [62] questo suggerisce una potenziale applicabilità di questi idrogeli come sostituti di questi tessuti. Inoltre, si può ipotizzare di utilizzare questa tipologia di scaffold per indurre il differenziamento specifico delle cellule staminali.

Per quanto riguarda gli idrogeli contenenti gelatina, il rinforzo meccanico ha consentito di incrementare la rigidità del copolimero del 30% definendo un range di utilizzo tra 130 e 170 kPa. Questi risultati rendono gli scaffold di GelMA/ASO più adatti ad essere utilizzati con tessuti che compongono la cornea (200 kPa) oppure la vescica (50-100 kPa) [62]. Risulta importante notare che, per la sintesi degli scaffold di GelMA/ASO, si sono realizzate delle soluzioni a massima concentrazione di gelatina. Ne consegue che l'intervallo 130-170 kPa rappresenta solo il limite superiore per questa tipologia di copolimeri. È possibile ipotizzare che, diminuendo la concentrazione di prepolimero in DMSO, si possa sintetizzare degli idrogeli di GelMA/ASO che presentano dei valori di rigidità inferiori. In questo contesto, l'utilizzo di un rinforzo meccanico a base di olio di soia potrebbe rappresentare una variabile di controllo in più per poter espandere il range di utilizzo a una data concentrazione di GelMA.

Confrontando i dati di adesione cellulare con i risultati del test a compressione e dell'angolo di contatto è possibile evidenziare una correlazione positiva tra la rigidità dei substrati costituiti di PEGDMA/ASO e la vitalità cellulare delle cellule adese. Per quanto riguarda gli scaffold di GelMA/ASO non si verifica lo stesso fenomeno, poiché in questo caso l'aggiunta di ASO non provoca un aumento di rigidità significativo. Come conseguenza, in questi idrogeli, le differenze di adesione possono essere correlate prevalentemente all'idrofilicità e alla bioattività della gelatina.

Si pone come obiettivo futuro di questo lavoro l'ottimizzazione dei parametri di sintesi in modo da aumentare il range di modularità degli scaffold costituiti da GelMA/ASO. Inoltre, un altro possibile sviluppo di questo progetto sarà sfruttare questi idrogeli per indurre il differenziamento specifico delle cellule staminali.

6 Bibliografia

- [1] Vacanti Joseph P, Langer Robert, *“Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation”*, The Lancet ,16 Sep 2004, Vol. 354
- [2] Sepehr Talebian, Mehdi Mehrali, Nayere Taebnia, Cristian Pablo Pennisi, Firoz Babu Kadumudi, Javad Foroughi, Masoud Hasany, Mehdi Nikkhah, Mohsen Akbari, Gorka Orive, Alireza Dolatshahi-Pirouz, *Self-Healing Hydrogels: The Next Paradigm Shift in Tissue Engineering?* Wiley Online Library, 14 Jun 2019
- [3] O. Wichterle, D. Lím, *Hydrophilic gels for biological use*, Nature, 1960, pp. 117-118
- [4] Sytze J. Buwalda, Kristel W.M. Boere, Pieter J. Dijkstra, Jan Feijen, Tina Vermonden, Wim E. Hennink, *Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials*, Journal of Controlled Release, 2014, Vol. 190, pp. 254-273
- [5] J. Kopeček, *Hydrogels: from soft contact lenses and implants to self-assembled nanomaterials*, J. Polym. Sci. A Polym. Chem., 6 Oct 2009, Vol. 47, pp. 5929-5946
- [6] S.W. Choi, S.Y. Choi, B. Jeong, S.W. Kim, D.S. Lee *Thermoreversible gelation of poly(ethylene oxide) biodegradable polyester block copolymers*, J. Polym. Sci. A Polym. Chem., 37 (1999), pp. 2207-2218
- [7] Xiang Dongfang, Wu Xin, Cao Wei, Xue Bin, Qin Meng, Cao Yi, Wang Wei, *Hydrogels With Tunable Mechanical Properties Based on Photocleavable Proteins*, Frontiers in Chemistry, 28 Jan 2020, Vol. 8
- [8] Brandon V. Slaughter, Shahana S. Khurshid, Omar Z. Fisher, Ali Khademhosseini, and Nicholas A. Peppas, *Hydrogels in Regenerative Medicine*, Advanced materials, 4 Sep 2009, Vol. 21, pp.3307-3329
- [9] W E Roorda, H E Boddé, A G De Boer, J A Bouwstra, H E Junginer, *Synthetic hydrogels as drug delivery systems*, Pharm. Weekbl. Sci. Ed., 22 Aug 1986, Vol. 8 pp. 165-189.
- [10] Faisal Raza, Hajra Zafar, Ying Zhu, Yuan Ren, Aftab -Ullah, Asif Ullah Khan, Xinyi He, Han Han, Md Aquib, Kofi Oti Boakye-Yiadom, Liang Ge, *A Review on Recent Advances in Stabilizing Peptides/Proteins upon Fabrication in Hydrogels from Biodegradable Polymers*, Pharmaceutics, 2018, Vol. 10
- [11] S. Baljit, et al., *Synthesis, characterization and swelling studies of pH responsive psyllium and methacrylamide based hydrogels for the use in colon specific drug delivery* Carbohydrate Polymers, Elsevier, 8 Feb 2007, Vol. 69
- [12] H.P. Tan, et al., *Injectable in situ forming biodegradable chitosan–hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering* Biomaterials, Elsevier, 23 Jan 2009, Vol. 30
- [13] Kang, J., Hu, J., Karra, R. et al., *Modulation of tissue repair by regeneration enhancer elements*, Nature, 12 Apr 2016, Vol. 532
- [14] By Brett A. Shook, Renee R. Wasko, Guillermo C. Rivera-Gonzalez, Emilio Salazar-Gatzimas, Francesc López-Giráldez, Biraja C. Dash, Andrés R. Muñoz-Rojas, Krystal D. Aultman, Rachel K. Zwick, Vivian Lei, Jack L. Arbiser, Kathryn Miller-Jensen, Damon A. Clark, Henry C. Hsia, Valerie Horsley, *Myofibroblast proliferation and heterogeneity are supported by macrophages during skin repair*, Science, 23 Nov 2018, Vol. 362
- [15] Minhan Zou, Xin Zhao, Xiaoxuan Zhang, Yuanjin Zhao, Chunwu Zhang, Keqing Shi, *Bio-inspired multiple composite film with anisotropic surface wettability and adhesion for tissue repair*, Chemical Engineering Journal, 21 May 2020, Vol. 398
- [16] A.S. Hoffman, *Hydrogels for biomedical applications*, Advanced Drug Delivery Rev, 13 Sep 2012, Vol. 64
- [17] K.Y. Lee, D.J. Mooney, *Hydrogels for tissue engineering*, Chem Rev, 31 May 2001, Vol. 101

- [18] Muhammad Faheem Akhtar, Muhammad Hanif, Nazar Muhammad Ranjha, *Methods of synthesis of hydrogels ... A review*, Saudi Pharmaceutical Journal, 24 Feb 2016, Vol. 24, pp. 554-559
- [19] Gibson I., Rosen D., Stucker B., "Photopolymerization Processes. In: Additive Manufacturing Technologies" Capitolo 4 "Vat Potopolymerization Process".
- [20] Felix R. P. Limberg, Tanja Schneider, Stefan Höfle, Felix Reisbeck, Silvia Janietz, Alexander Colsmann, Hartmut Krüger, *Ethynyl Ethers as Efficient Thermal Crosslinking System for Hole Transport Materials in OLEDs*, Advanced Functional Materials, 26 Oct 2016, Vol. 26, pp. 8505-8513
- [21] Ahmed, Enas M., *Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review*, Journal of Advanced Research, pp. 105-121, 2015.
- [22] E. Takács, K. Dajka, L. Wojnárovits, *Study of high-energy radiation initiated polymerization of butyl acrylate*, Radiation Physics and Chemistry, 27 Nov 2001, Vol. 63, pp. 41-44
- [23] Nicholas A. Chartrain, Christopher B. Williams, Abby R. Whittington, *A review on fabricating tissue scaffolds using vat photopolymerization*, Acta Biomaterialia, 2018, Vol. 74
- [24] Jean Pierre Fouassier, Jacques Lalevée, *Photoinitiators for Polymer Synthesis: Scope, Reactivity and Efficiency*, Capitolo 4 "Polymerization Reactions"
- [25] Jean Pierre Fouassier, Jacques Lalevée, "Photoinitiators for Polymer Synthesis: Scope, Reactivity and Efficiency", Capitolo 1 "Photopolymerization and Photo-Cross-Linking"
- [26] Jean Pierre Fouassier, Jacques Lalevée, "Photoinitiators for Polymer Synthesis: Scope, Reactivity and Efficiency", Capitolo 2 "experimental device and application"
- [27] S.J. Hollister, *Porous scaffold design for tissue engineering*, Nat. Mater., 4 Jul (2005)
- [28] S.J. Hollister, R.D. Maddox, J.M. Taboas, *Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints*, Biomaterials, 29 May 2002, Vol. 23, pp. 4095-4103
- [29] E. Kitamura, R. Stegaroiu, S. Nomura, O. Miyakawa, *Biomechanical aspects of marginal bone resorption around osseointegrated implants: considerations based on a three-dimensional finite element analysis*, Clin. Oral Implants Res., 10 Sep 2004, Vol. 15, pp. 401-412
- [30] R.G. Wells, *The role of matrix stiffness in regulating cell behavior*, Hepatology, 7 Jan 2008, Vol. 47, pp. 1394-1400
- [31] Xin Wu, Wenmao Huang, Wen-Hao Wu, Bin Xue, Dongfang Xiang, Ying Li, Meng Qin, Fei Sun, Wei Wang, Wen-Bin Zhang, and Yi Cao, *Reversible hydrogels with tunable mechanical properties for optically controlling cell migration*, Nano Research, 3 Oct 2018, Vol. 11
- [32] J.Y. Wong, A. Velasco, P. Rajagopalan, Q. Pham, *Directed movement of vascular smooth muscle cells on gradient-compliant hydrogels*, Langmuir, 9 Jan 2003, Vol. 19, pp. 1908-1913
- [33] Wouter Schuurman, Peter A. Levett, Michiel W. Pot, Paul René van Weeren, Wouter J. A. Dhert, Dietmar W. Huttmacher, Ferry P. W. Melchels, Travis J. Klein, Jos Malda, *Gelatin-Methacrylamide Hydrogels as Potential Biomaterials for Fabrication of Tissue-Engineered Cartilage Constructs*, Macromolecular Bioscience, 18 Feb 2013, Vol. 13, pp. 551-561
- [34] Patrick E. Donnelly, Tony Chen, Anthony Finch, Caroline Brial, Suzanne A. Maher, Peter A. Torzilli, *Photocrosslinked tyramine-substituted hyaluronate hydrogels with tunable mechanical properties improve immediate tissue-hydrogel interfacial strength in articular cartilage*, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 5 Feb 2017, Vol. 28, Pages 582-600

- [35] Wang, H., Zhou, L., Liao, J. et al., *Cell-laden photocrosslinked GelMA–DexMA copolymer hydrogels with tunable mechanical properties for tissue engineering*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 10 Jul 2014, Vol. 25, pp. 2173–2183
- [36] Michael Di Giuseppe, Nicholas Law, Braeden Webb, Ryley A. Macrae, Lawrence J. Liew, Timothy B. Sercombe, Rodney J. Dilley, Barry J. Doyle, *Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting*, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 21 Dec 2017, Vol. 79, pp. 150-157
- [37] Ana A. Aldana, Filippo Valente, Rodney Dilley, Barry Doyle, *Development of 3D bioprinted GelMA-alginate hydrogels with tunable mechanical properties*, Bioprinting, 17 Dec 2020, Vol. 21
- [38] L. Quiles-Carrillo, S. Duart, N. Montanes, S. Torres-Giner, R. Balart, *Enhancement of the mechanical and thermal properties of injection-molded polylactide parts by the addition of acrylated epoxidized soybean oil*, Materials & Design, 20 Nov 2017, Vol. 140, pp. 54-63
- [39] Sun, M., Qiu, J., Jin, S. et al., *High-strength and amphiphilic epoxidized soybean oil-modified poly(vinyl alcohol) hydrogels*, Polymer Bulletin, 18 Nov 2020
- [40] Kan Yue, Grissel Trujillo-de Santiago, Mario Moisés Alvarez, Ali Tamayol, Nasim Annabi, Ali Khademhosseini, *Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels*, Biomaterials, 28 Aug 2015, Vol. 73, pp. 254-271
- [41] Farah Badii, Nazlin K. Howell, *Fish gelatin: Structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins*, Food Hydrocolloids, 9 Sep 2005, Vol. 20, pp. 630-640
- [42] Wen Zhao, Xing Jin, Yang Cong, Yuying Liu, Jun Fu, *Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering*, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Vol. 18
- [43] Sandra Van Vlierberghe, Veerle Cnudde, Peter Dubruel, Bert Masschaele, An Cosijns, Ilse De Paepe, Patric J. S. Jacobs, Luc Van Hoorebeke, Jean Paul Remon, and Etienne Schacht, *Porous Gelatin Hydrogels: 1. Cryogenic Formation and Structure Analysis*, Biomacromolecules, 5 Jan 2007, Vol. 8, pp. 331–337
- [44] Sheng Lin-Gibson, Sidi Bencherif, James A. Cooper, Stephanie J. Wetzel, Joseph M. Antonucci, Brandon M. Vogel, Ferenc Horkay, and Newell R. Washburn, *Synthesis and Characterization of PEG Dimethacrylates and Their Hydrogels*, Biomacromolecules, 2004, Vol. 4, pp. 1280-1287
- [46] John A. Killion, Luke M. Geever, Declan M. Devine, James E. Kennedy, Clement L. Higginbotham, *Mechanical properties and thermal behaviour of PEGDMA hydrogels for potential bone regeneration application*, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 28 Apr 2011, Vol. 4, pp. 1219-1227
- [47] Guiping Ma, Dongzhi Yang, Qianzhu Li, Kemin Wang, Binling Chen, John F. Kennedy, Jun Nie, *Injectable hydrogels based on chitosan derivative/polyethylene glycol dimethacrylate/N,N-dimethylacrylamide as bone tissue engineering matrix*, Carbohydrate Polymers, 18 Sep 2009, Vol. 79, pp. 620-627
- [48] Vinay Sharma, P.P. Kundu, *Addition polymers from natural oils—A review*, Progress in Polymer Science, 13 Nov. 2006, Vol. 31, pp. 983-1008
- [49] F Li, M.V Hanson, R.C Larock, *Soybean oil–divinylbenzene thermosetting polymers: synthesis, structure, properties and their relationships*, Polymer, 1 Nov. 2001, Vol. 42, pp. 1567-1579
- [50] Muhammad Remanul Islam, Mohammad Dalour Hossen Beg, Saidatul Shima Jamari, *Development of vegetable-oil-based polymers*, Journal of Applied Polymer Science, 16 Apr 2014, Vol. 131
- [51] Liyu Fu, Liting Yang, Chunlan Dai, Chengshan Zhao, Lijun Ma, *Thermal and mechanical properties of acrylated epoxidized-soybean oil-based thermosets*, Journal of Applied Polymer Science, 28 Apr 2010, Vol. 117

- [52] Hongjie Liu, Wenchao Lu, Shaojie Liu, *Development of acrylated soybean oil-based UV-curable coatings with high impact strength from low viscosity oligomer*, Journal of Applied Polymer Science, 23 Aug 2017, Vol. 135
- [53] Jean Pierre Fouassier, Jacques Lalevée, “Photoinitiators for Polymer Synthesis: Scope, Reactivity and Efficiency”, Capitolo 8 “One-Component Photoinitiating Systems”
- [54] Jean Pierre Fouassier, Jacques Lalevée, “Photoinitiators for Polymer Synthesis: Scope, Reactivity and Efficiency”, Capitolo 9 “Two-Component Photoinitiating Systems”
- [55] Carine T.W. Meereis, Fernanda B. Leal, Giana S. Lima, Rodrigo V. de Carvalho, Evandro Piva, Fabrício A. Ogliari, *BAPO as an alternative photoinitiator for the radical polymerization of dental resins*, Dental Materials, 21 Jun 2014, Vol. 30, pp. 945-953
- [56] C Decker, K Zahouily, D Decker, T Nguyen, Thi Viet, *Performance analysis of acylphosphine oxides in photoinitiated polymerization*, Polymer, Vol. 42, 22 May 2001, pp. 7551-7560
- [57] Wancen Xie, Tong Li, Chen Chen, Haibo Wu, Songmiao Liang, Haiqing Chang, Baicang Liu, Enrico Drioli, Qingyuan Wang, and John C. Crittenden, *Using the Green Solvent Dimethyl Sulfoxide To Replace Traditional Solvents Partly and Fabricating PVC/PVC-g-PEGMA Blended Ultrafiltration Membranes with High Permeability and Rejection*, Industrial & Engineering Chemistry Research, 25 Mar 2019, Vol. 58, pp. 6413-6423
- [58] Ria D. Corder, Sumner C. Dudick, Jason E. Bara, and Saad A. Khan, *Photorheology and Gelation during Polymerization of Coordinated Ionic Liquids*, ACS Appl. Polym. Mater., 14 May 2020, Vol. 2, pp. 2397–2405
- [59] Bor-Sen Chiou and Saad A. Khan, *Real-Time FTIR and in Situ Rheological Studies on the UV Curing Kinetics of Thiol-ene Polymers*, Macromolecules, 17 Nov 1997, Vol. 30, pp. 7322–7328
- [60] Bor-Sen Chiou, Srinivasa R. Raghavan, and Saad A. Khan, *Effect of Colloidal Fillers on the Cross-Linking of a UV-Curable Polymer: Gel Point Rheology and the Winter–Chambon Criterion*, Macromolecules, 19 May 2001, Vol. 34, pp. 4526–4533
- [61] Sabu Thomas, Raju Thomas, Ajesh K. Zachariah, and Raghvendra Kumar, *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization Chapter 4*, Elsevier, 23 May 2017, Vol. 2
- [62] Carlos F. Guimarães, Luca Gasperini, Alexandra P. Marques & Rui L. Reis, *The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering*, Nature, 21 Feb 2020, Vol. 5, pp 351-370

Bibliografia delle immagini:

- Figura 1.1: Sytze J. Buwalda, Kristel W.M. Boere, Pieter J. Dijkstra, Jan Feijen, Tina Vermonden, Wim E. Hennink, *Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials*, Journal of Controlled Release, 2014, Vol. 190, pp. 254-273
- Figura 2.1: Anca Onaciu, Raluca Andrada Munteanu, Alin Iulian Moldovan, Cristian Silviu Moldovan and Ioana Berindan-Neagoe, *Hydrogels Based Drug Delivery Synthesis, Characterization and Administration*, Pharmaceuticals, 19 Jun 2019
- Figura 2.2: Marek Pagac, Jiri Hajnys, Quoc-Phu Ma, Lukas Jancar, Jan Jansa, Petr Stefek and Jakub Mesicek, *A Review of Vat Photopolymerization Technology: Materials, Applications, Challenges, and Future Trends of 3D Printing*, Polymers, 30 Jan 2021, Vol. 13
- Figura 2.3: Susan E.M. Selke and John D. Culter, *Plastics Packaging - Properties, Processing, Applications, and Regulations (3rd Edition)*, 2013

Figura 2.4: Susan E.M. Selke and John D. Culter, *Plastics Packaging - Properties, Processing, Applications, and Regulations (3rd Edition)*, 2013

Figura 2.5: Susan E.M. Selke and John D. Culter, *Plastics Packaging - Properties, Processing, Applications, and Regulations (3rd Edition)*, 2013

Figura 2.6: Dietrich Braun, Harald Cherdrón, Matthias Rehahn, Helmut Ritter, Brigitte Voit, *Polymer Synthesis: Theory and Practice*, 2013

Figura 2.7: Dietrich Braun, Harald Cherdrón, Matthias Rehahn, Helmut Ritter, Brigitte Voit, *Polymer Synthesis: Theory and Practice*, 2013

Figura 2.8: Thomas R Cox, Janine T Eler, *Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer*, PubMed, Mar 2011, Vol. 2, pp. 165-178

Figura 2.9: Patrick E. Donnelly, Tony Chen, Anthony Finch, Caroline Brial, Suzanne A. Maher, Peter A. Torzilli, *Photocrosslinked tyramine-substituted hyaluronate hydrogels with tunable mechanical properties improve immediate tissue-hydrogel interfacial strength in articular cartilage*, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 5 Feb 2017, Vol. 28, Pages 582-600

Figura 2.10: Wang, H., Zhou, L., Liao, J. et al., *Cell-laden photocrosslinked GelMA–DexMA copolymer hydrogels with tunable mechanical properties for tissue engineering*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 10 Jul 2014, Vol. 25, pp. 2173–2183

Figura 2.11: Struttura chimica della gelatina e della GelMA

Figura 2.12: Morfologia di un idrogelo composto da GelMA

Figura 2.13: Struttura chimica del PEGDMA

Figura 2.14: Muhammad Remanul Islam, Mohammad Dalour Hossen Beg, Saidatul Shima Jamari, *Development of vegetable-oil-based polymers*, Journal of Applied Polymer Science, 16 Apr 2014, Vol. 131

Figura 2.15: Struttura chimica dell'ASO

Figura 2.16: Jean Pierre Fouassier, Jacques Lalevée, "Photoinitiators for Polymer Synthesis: Scope, Reactivity and Efficiency", Capitolo 8 "One-Component Photoinitiating Systems"

Figura 2.17: Jean Pierre Fouassier, Jacques Lalevée, "Photoinitiators for Polymer Synthesis: Scope, Reactivity and Efficiency", Capitolo 8 "One-Component Photoinitiating Systems"

Figura 2.18: Struttura chimica del BAPO

Figura 3.1: Reazione di sintesi della GelMA

Figura 3.2: Reazione di sintesi della GelMA

Figura 3.3: Polvere di GelMA ottenuta tramite essiccazione sotto cappa

Figura 3.4: Reticolazione di un campione a forma cilindrica con la fibra Lightningcure

Figura 3.5: Campioni a disco, rettangolari e cilindrici di PEGDMA/ASO e GelMA/ASO

Figura 3.6: Reometro Anton Paar MCR 302

Figura 3.7: http://www4.hcmut.edu.vn/~huynhqinh/qpys/Tut_Spec/irspec3.htm

Figura 3.8: Andrea Gorassini, *Spettrofotometria infrarossa in riflettanza totale attenuata (FTIR-ATR)* <http://www.ipac.regione.fvg.it/userfiles/file/gorassini.pdf>

Figura 3.9: FT-IR/ATR ThermoScientific™ Nicolet™ Smart iTX-Diamond

Figura 3.10: DSC Mettler-Toledo

Figura 3.11: TTDMA Triton Technology-Mettler Toledo

Figura 3.12: TGA Mettler-Toledo

Figura 3.13: SEM Jeol 6000 Plus

Figura 3.14: MTS QTest™/10

Figura 3.15: Curva sforzo-deformazione di un provino polimerico

Figure 4.1-4.2: Risultati sperimentali Fotoreologia

Figure 4.3-4.7: Risultati sperimentali FTIR

Figura 4.8: Risultati sperimentali DSC

Figure 4.9-4.12: Risultati sperimentali DMTA

Figure 4.13-4.14: Risultati sperimentali TGA

Figure 4.15-4.18: Risultati sperimentali swelling test

Figure 4.19-4.20: Risultati sperimentali SEM

Figure 4.21-4.22: Risultati sperimentali test a compressione

Figure 4.23-4.24: Risultati sperimentali test di citotossicità

Figure 4.25-4.26: Risultati sperimentali test di adesione cellulare

Figure 4.27-4.28: Risultati sperimentali saggio falloidina

Bibliografia delle tabelle:

Tabella 4.1: Grado di conversione C% campioni PEGDMA/ASO

Tabella 4.2: Grado di conversione C% campioni GelMA/ASO

Tabella 4.3: Grado %Gel dei campioni PEGDMA/ASO

Tabella 4.4: T_g DSC PEGDMA/ASO

Tabella 4.5: T_g DSC GelMA/ASO

Tabella 4.6: T_g DMTA PEGDMA/ASO

Tabella 4.7 T_g DMTA GelMA/ASO

Tabella 4.8: TGA dei campioni PEGDMA/ASO

Tabella 4.9: TGA dei campioni GelMA/ASO

Tabella 4.10: Angoli di contatto campione PEGDMA/ASO

Tabella 4.11: Angoli di contatto campione GelMA/ASO

