



**Politecnico
di Torino**

POLITECNICO DI TORINO

Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

A.A. 2023/2024

**Sintesi e caratterizzazione di idrogeli
a base di gelatina metacrilata
funzionalizzata con dopamina**

Relatore

Dott. Ignazio Roppolo

Candidata

Giorgia Cosentino

Luglio 2024

Indice

Abstract	1
1. Introduzione.....	3
1.1. Biomateriali.....	3
1.2 Idrogeli	6
1.2.1. Gelatina	10
1.2.2. GelMA.....	13
1.2.3. GelMA-DOPA.....	16
1.3. Medicina rigenerativa e ingegneria dei tessuti	22
1.4. Scopo del lavoro.....	30
2. Materiali e metodi	31
2.1. Materiali	31
2.1.1. Sintesi del GelMA.....	31
2.1.2. Sintesi del GelMA-DOPA	32
2.1.3. Formulazioni di GelMA e GelMA-DOPA	33
2.2. Caratterizzazione del materiale	33
2.2.1. Spettroscopia IR	33
2.2.2. Spettroscopia ¹ H-NMR	35
2.2.3. Spettroscopia UV-VIS	36
2.2.4. Microscopia elettronica a scansione (SEM).....	37
2.2.5. Fotoreologia	38
2.2.6. Test di reticolazione.....	41
2.2.7. Swelling.....	42
2.2.8. %gel.....	43
2.2.9. Degradazione enzimatica	44
2.2.10. Stabilità nel tempo.....	45

2.2.11. Test di adesione	45
2.2.12. Stampa 3D	51
3. Risultati	53
3.1. Sintesi e caratterizzazione del materiale	53
3.1.1. Spettroscopia IR	54
3.1.2. Spettroscopia ¹ H-NMR	56
3.1.3. Spettroscopia UV-VIS	57
3.2. Preparazione e caratterizzazione degli idrogeli.....	59
3.2.1. Prove fotoreologiche	60
3.2.2. Prove di reticolazione.....	64
3.2.3. Prove di %gel	65
3.2.4. Prove di swelling e struttura degli idrogeli	66
3.2.5. Prove di degradazione e stabilità nel tempo degli idrogeli	69
3.2.6. Prove di adesione	70
3.2.7. Test preliminari di stampa 3D	72
4. Conclusioni e prospettive future	74
Bibliografia.....	76

Abstract

La gelatina metacrilata (GelMA) è un materiale largamente utilizzato nel campo della medicina rigenerativa e dell'ingegneria dei tessuti in virtù delle sue proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità e bioattività, nonché grazie alla possibilità di regolare le sue proprietà meccaniche tramite il grado di metacrilazione della gelatina. Il GelMA, infatti, è il prodotto della reazione di metacrilazione tra la gelatina, derivato del collagene, e l'anidride metacrilica, utilizzata per introdurre all'interno della struttura della gelatina dei gruppi metacrilato, fotosensibili, che permettono dunque di operare una reticolazione chimica tramite irraggiamento luminoso e di migliorare le proprietà meccaniche del materiale per applicazioni in campo biomedicale. Il suo utilizzo, spesso sotto forma di idrogel, spazia dal rilascio controllato di farmaci o biomolecole all'ingegneria dei tessuti, campo i cui attori principali sono cellule, scaffold e fattori di crescita.

In questo lavoro di Tesi, ci si concentrerà sulla progettazione e fabbricazione di uno scaffold biomimetico utile per applicazioni di *wound healing*, ossia di guarigione e rigenerazione tissutale di ferite cutanee. L'idea è stata quella di ottenere un idrogel biocompatibile e biodegradabile con proprietà adesive e, per raggiungere questo scopo, si è pensato di funzionalizzare il GelMA con la dopamina, amminoacido responsabile del meccanismo adesivo delle cozze grazie alla presenza di gruppi catecolo. In ambiente leggermente alcalino, infatti, i gruppi catecolo si ossidano diventando gruppi chinone: la reazione non è completa al 100%, quindi ci si troverà in uno stato di equilibrio con co-presenza di una certa quantità di amminoacido non ossidato, quindi in forma DOPA, e una quantità di amminoacido ossidato, dopachinone. La copresenza di DOPA e dopachinone è responsabile dell'adesione su superfici di qualsiasi natura chimica. La DOPA, grazie ai gruppi catecolo, può formare legami a idrogeno e complessi metallici con substrati di natura inorganica, mentre il dopachinone, grazie ai gruppi chinone, può formare legami covalenti con superfici di natura organica, principalmente con molecole che presentano gruppi amminici, gruppi tiolo o imidazolo. Lo scopo è stato quindi quello di sintetizzare e caratterizzare degli idrogeli di gelatina metacrilata funzionalizzata con dopamina (GelMA-DOPA) al fine di poterli poi impiegare come soluzione per il *wound healing* e renderli in questo modo uno strumento efficace per l'ingegneria dei tessuti.

Nel capitolo introduttivo del seguente lavoro, verrà dapprima posta l'attenzione sui biomateriali già citati, quindi il GelMA e il GelMA-DOPA, in modo tale da chiarirne le caratteristiche e lo

stato dell'arte. In seguito, verrà fatta una veloce digressione sulla medicina rigenerativa, e in particolare sull'ingegneria dei tessuti e sugli idrogeli, largamente utilizzati come scaffold, per rendere noto il contesto nel quale questi materiali vengono utilizzati.

Nel secondo capitolo, verranno presentati e descritti i metodi che hanno portato alla sintesi e alla caratterizzazione dei materiali.

Segue la parte di discussione dei risultati ottenuti dalle analisi e dalle prove esposte nel capitolo precedente, con un focus sul GelMA-DOPA e sulle differenze di quest'ultimo rispetto al GelMA.

Nel capitolo finale, verranno tratte le conclusioni del lavoro e verranno quindi approfonditi i possibili sviluppi futuri che potrebbero portare all'applicazione di questi idrogeli nel settore biomedicale.

1. Introduzione

In questo capitolo introduttivo, verrà fatta una panoramica sul mondo dei biomateriali, sulle loro caratteristiche e sui loro usi, entrando poi nel particolare dei materiali utilizzati per questo lavoro di Tesi, ovvero il GelMA e il GelMA-DOPA. Si approfondiranno anche i concetti di medicina rigenerativa e di ingegneria tissutale, grazie ai quali si andrà in ultimo a definire lo scopo pensato per i materiali oggetto di sintesi.

1.1. Biomateriali

Per biomateriali si intendono sostanze (diverse dai farmaci), o combinazioni di sostanze, di origine naturale o sintetica, che possono essere impiegate per un qualunque periodo di tempo, sia da sole sia come parte di un sistema, al fine di trattare, potenziare, sostituire qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo. [1]

La storia dei biomateriali può essere riassunta in tre tappe fondamentali:

- Prima generazione: il materiale doveva soddisfare il requisito essenziale di essere bioinerte, tipico di materiali che non comunicano con l'ambiente biologico e non determinano nessuna attività. In questo modo, era possibile ottenere una combinazione adeguata di proprietà fisiche, che andavano a mimare quelle del tessuto sostituito, e tossicità minima;
- Seconda generazione: il materiale doveva essere bioattivo, capace quindi di favorire interazioni dirette di tipo biochimico con il tessuto biologico, oppure riassorbibile, in grado di degradarsi chimicamente e riassorbirsi in maniera controllata;
- Terza generazione: il materiale deve essere sia bioattivo che riassorbibile.

Un concetto fondamentale per quanto riguarda i biomateriali è quello di biocompatibilità, che è la proprietà di un materiale che riesce a integrarsi perfettamente all'interno di un sistema biologico, senza scatenare una reazione immunitaria da parte dell'organismo o rilasciare sostanze tossiche a contatto con i fluidi corporei e, in particolare, nella fase di degradazione, qualora sia presente. [2]

Da un punto di vista tecnologico, un biomateriale ideale dovrebbe possedere:

- Buona stabilità chimica;

- Assenza di fenomeni tossici e cancerogeni, per evitare processi infiammatori provocati dalla presenza di un corpo estraneo o di assorbimento con produzione di sostanze tossiche e/o cancerogene;
- Assenza di fenomeni di rigetto;
- Assenza di effetti trombotici, per evitare la coagulazione del sangue qualora il biomateriale venga a contatto con il flusso sanguigno.

Un materiale biocompatibile deve inoltre presentare proprietà di resistenza meccanica opportune, relative al tessuto su cui viene impiantato, per evitare danni in seguito alla presenza di sollecitazioni non trascurabili. [1]

Oggigiorno, i biomateriali vengono utilizzati per gli usi più svariati in ambito medico: dalle protesi articolari alle valvole cardiache, fino alle applicazioni in ambito odontotecnico. Tra gli usi più frequenti e più al centro della ricerca scientifica, vi è sicuramente l'utilizzo dei biomateriali come composti principali degli *scaffold*, che altro non sono che matrici tridimensionali in grado di guidare le cellule nell'ingegnerizzazione di un tessuto e che quindi ne favoriscono lo sviluppo in seguito a un trauma o una lesione. Come vedremo in seguito, gli *scaffold*, insieme alle cellule e ai fattori di crescita, sono gli attori chiave dell'ingegneria dei tessuti, campo multidisciplinare che si occupa della progettazione e della creazione di organi e tessuti dal punto di vista dell'interazione tra biomateriale e sito biologico, in modo da poter provvedere alla rigenerazione del tessuto originario, ottenendo così una vera e propria sorta di replicante biologico naturale.

Per riuscire nel loro scopo, gli *scaffold* devono assolvere a due compiti principali: devono essere in grado di stimolare l'adesione cellulare e inoltre avere una funzionalità limitata nel tempo, così da, in un primo momento, guidare le cellule, farle proliferare e produrre la loro matrice extracellulare, e in seguito essere degradati grazie all'azione dagli enzimi.

Di seguito si riporta un elenco delle caratteristiche base che gli *scaffold* dovrebbero avere:

- Struttura tridimensionale: essa favorisce la comunicazione tra le cellule e viene ottenuta per permettere la migrazione cellulare, il passaggio di nutrienti e l'angiogenesi;
- Proprietà meccaniche: queste devono essere simili a quelle del tessuto del sito di impianto. È necessario scegliere il materiale giusto, l'architettura adatta, e trovare il giusto compromesso di rigidità: abbastanza per non generare compressione, ma non troppo rigido per non stimolare una risposta infiammatoria;

- Biodegradabilità con tasso controllabile, al fine di eguagliare la velocità di crescita cellulare o del tessuto. La matrice verrà difatti man mano allontanata dal sito di impianto o riassorbita dalle cellule;
- Chimica superficiale per garantire l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare. Il materiale deve quindi essere bioattivo, non inerte;
- Facilità di realizzazione e modellazione al fine di ottenere *scaffold* di varie forme e dimensioni;
- Biocompatibilità, sia dello *scaffold* che dei prodotti di degradazione.

Per realizzare gli scaffold, è possibile scegliere tra due tipologie di materiali: i materiali sintetici o i materiali naturali.

Per quanto riguarda i materiali sintetici, questi sono solitamente molto resistenti e stabili, perché di norma leggermente idrofobici o poco bagnabili, hanno una degradazione controllata e difficoltà nel bioriconoscimento.

I materiali di origine naturale, invece, risultano più biomimetici, più favorevoli all'adesione cellulare, maggiormente degradabili e più solubili grazie alle loro parti idrofiliche preponderanti. Hanno la caratteristica di assorbire molta acqua, il che risulta positivo perché in questo modo vanno a mimare accuratamente la matrice extracellulare, ma talvolta anche negativo perché rigonfiando possono perdere la loro forma. In contrasto ai materiali sintetici, hanno bassa rigidità e proprietà meccaniche peggiori, il che ha portato la ricerca a combinare più polimeri della stessa o di diversa natura al fine di ottenere il materiale più adatto allo scopo che si vuole raggiungere.

È possibile miscelare polimeri naturali tra loro: la matrice extracellulare è formata da una combinazione di polimeri naturali (proteine e polisaccaridi), quindi si può produrre in maniera ingegnerizzata una miscela con una composizione simile. Questi tipi di miscele vengono spesso utilizzati per produrre dei materiali biomimetici utilizzati principalmente per le loro caratteristiche biochimiche. Al contempo, è possibile miscelare polimeri sintetici, che siano biocompatibili e biodegradabili, con l'obiettivo finale di ottenere dei materiali con specifiche proprietà meccaniche, oppure per regolare i tempi di degradazione del materiale finale. Infine, è possibile combinare materiali naturali e sintetici e dar vita alle miscele bioartificiali, nelle quali il polimero sintetico sarà responsabile delle caratteristiche meccaniche e dei tempi di degradazione ottimale, mentre la componente naturale sarà importante per fornire le caratteristiche di adesione nei confronti delle cellule.

Soffermandoci sulla classe dei materiali naturali, di nostro interesse per questo lavoro di Tesi, bisogna innanzitutto tener presente che questi comprendono un'ampia varietà di polimeri, in particolare proteine e polisaccaridi. Essi hanno per lo più la capacità di supportare l'adesione delle cellule, perché presentano dei domini che si legano ai recettori integrinici delle cellule, stimolando la formazione di adesioni focali. Questo accade ad esempio quando il polimero naturale considerato è una proteina, composto largamente presente nei tessuti e nelle matrici extracellulari dei tessuti. In particolare, si parla di collagene ed elastina, ma anche di gelatina (derivato del collagene) e fibroina della seta. Tra i polisaccaridi, che supportano l'adesione cellulare è bene nominare il chitosano, largamente usato per scopi biomedicali. La capacità di far legare le cellule attraverso i domini integrinici esposti è fondamentale. Non tutti i polimeri naturali hanno questa caratteristica: è il caso dell'alginato, polisaccaride estratto dalle alghe, che, come tale, non presenta domini adesivi per la cellula.

Caratteristica molto interessante per i polimeri naturali è anche la loro biodegradabilità, ovvero la capacità di venire degradati dagli enzimi prodotti dalle cellule tramite un processo di idrolisi enzimatica. Questo vale per le proteine, quindi anche in questo caso collagene, gelatina, elastina e fibroina della seta, per alcuni polisaccaridi, ma non per tutti i materiali naturali: è di nuovo il caso dell'alginato, che, pur essendo molto utilizzato in medicina rigenerativa, non è biodegradabile, in quanto non sono presenti enzimi nel corpo umano che vadano a degradarlo.

I polimeri naturali hanno tuttavia, come accennato in precedenza, anche caratteristiche non ottimali. A contatto con l'ambiente acquoso, ad esempio, hanno bassa rigidità: sono quindi materiali soft e presentano basse proprietà meccaniche. Inoltre, in genere i polimeri naturali sono molto affini con l'acqua, ne assorbono molta e in alcuni casi si sciolgono a contatto con essa. Da ciò si può ben dedurre che hanno una certa instabilità a contatto con l'ambiente biologico, quindi un substrato completamente a base di polimero naturale è poco stabile e presenta una bassa stabilità di forma. Queste due caratteristiche hanno sicuramente margine di miglioramento e, come vedremo, oltre che creare una miscela bioartificiale, si può pensare di funzionalizzare il polimero naturale che si desidera utilizzare in modo tale da renderlo adatto all'uso cui si vuole destinare.

1.2 Idrogeli

Gli idrogeli sono definibili come reti tridimensionali (3D) costituite da molecole idrofile. La loro composizione li rende capaci di assorbire grandi quantità di acqua, inoltre permette e

facilita il loro ruolo di siti di adesione cellulare simili alla matrice extracellulare (ECM), influenzando così diversi processi biologici come la proliferazione e la differenziazione cellulare. All'elevato contenuto di acqua che sono in grado di incapsulare, si aggiungono proprietà chimiche e fisiche regolabili e la capacità di incapsulare cellule, macromolecole biologiche come peptidi, nucleotidi e anticorpi, e agenti terapeutici, che aprono loro una varietà di potenziali applicazioni nel campo biomedico. [3] Gli idrogeli, infatti, si fanno spazio tra le possibili soluzioni adottabili quando si tratta di guarigione delle ferite, misure antibatteriche, emostasi, riparazione ossea o della cartilagine, dispositivi bio-elettronici e vettori di farmaci, fattori di crescita o geni; possono inoltre fungere da *scaffold* per l'ingegneria dei tessuti, funzione che approfondiremo in questo lavoro. [4] Macroscopicamente, presentano infatti una consistenza *soft*, che li rende molto simili ai tessuti umani che non richiedono grandi proprietà meccaniche strutturali, quindi principalmente tessuti molli.

In genere, quando si parla di idrogeli ci si riferisce sempre a un insieme molto ampio di strutture in grado di assorbire un elevato quantitativo di acqua. In particolare, vengono riportati due principali esempi di famiglie di idrogeli:

- Idrogeli convenzionali;
- Idrogeli non rigonfianti.

La prima famiglia, quella degli idrogeli convenzionali, comprende sistemi che rigonfiano per effetto dell'assorbimento di acqua aumentando molto in dimensione. Come già detto, gli idrogeli vengono solitamente utilizzati come impalcature per l'ingegneria dei tessuti, come supporto temporaneo per le cellule oppure come veicolo per sistemi di somministrazione di farmaci. Sebbene sia noto che questi substrati, dopo un'attenta progettazione, presentino eccellenti proprietà fisiche, in alcuni casi potrebbero avere un'applicabilità limitata perché, a causa della differenza di pressione osmotica, "si gonfiano", perdendo in questo modo parte della loro tenacità meccanica. Questo fenomeno si verifica comunemente in gel ingegnerizzati costituiti da componenti naturali e in gel autoriparanti basati su legami incrociati non covalenti. [5] Per risolvere questa problematica, nel tempo i ricercatori hanno ideato la seconda famiglia di idrogeli, quella dei non rigonfianti, chiamata così in quanto questi incapsulano un certo quantitativo di acqua senza aumentare di volume. I primi idrogeli non rigonfianti risalgono agli anni '60, quando Wichterle e Lim scoprirono *network* che potevano essere utilizzati come lenti a contatto non rigonfianti. Tuttavia, l'interesse dei ricercatori per questi substrati ha iniziato a prender piede nel 2014, dopo la progettazione di un idrogelo robusto e non rigonfiabile senza isteresi meccanica ottenuta da Sakai et al. Da quel momento in poi, guidato anche

dall'avanzamento nella progettazione di idrogeli versatili con funzionalità affascinanti come autoriparazione, adesività, conduttività, iniettabilità e così via, lo sforzo dei ricercatori è stato quello di combinare la proprietà anti-rigonfiamento con determinate funzionalità per soddisfare l'applicazione pratica di questi costrutti. [6]

Oltre alla macro-classificazione in idrogeli convenzionali e non rigonfianti, è possibile classificare queste strutture in molteplici modi: quella che interessa maggiormente le applicazioni biomediche prevede la suddivisione in idrogeli di origine naturale, semi-sintetica (bioartificiale) e *smart*, termine con cui ci si riferisce a tutti gli idrogeli che sono in grado di modificare le loro caratteristiche fisiche a seguito di una modifica dell'ambiente esterno. Considerando che l'organismo è caratterizzato da condizioni specifiche, quali temperatura di 37°C e pH di 7.0, è possibile sfruttare variazioni di temperatura e pH per modificare le caratteristiche dell'idrogelo una volta che viene inserito all'interno del corpo umano. Un esempio calzante è quello dato dagli idrogeli termoreversibili, ovvero materiali che sono in grado di effettuare una transizione da uno stato liquido a uno stato di gel a opera della temperatura. Nello specifico, polimeri con domini idrofobici possono essere reticolati in un mezzo acquoso mediante gelificazione termica inversa, dove il segmento idrofobo è accoppiato al segmento idrofilo mediante innesto o copolimerizzazione. Questi materiali, essendo anfifilici, sono solubili in acqua a basse temperature: se la temperatura aumenta, aumenta anche l'entropia del solvente e il dominio idrofobo si aggrega per ridurre al minimo la loro area superficiale. Pertanto, la temperatura alla quale avviene la gelificazione dipende dalla concentrazione del polimero, dai blocchi idrofili e idrofobi e dalla natura chimica dei polimeri. I Pluronic e i Tetronic sono gli idrogeli termoreversibili più comunemente usati approvati dalla FDA e dall'EPA. [7]

Il grande interesse con cui vengono trattati gli idrogeli è dovuto, oltre che alla loro natura biomimetica e alla capacità di immagazzinare un buon quantitativo di acqua, al fatto che, andandoli a formulare con attenzione, si è in grado di inserire al loro interno altre caratteristiche che li possono rendere ancora più biomimetici. La loro composizione influenzerà di certo la loro capacità influenzare la risposta cellulare e l'adesione: più saranno simili alla ECM, più saranno biomimetici. Altri due parametri importanti che bisogna menzionare sono:

- Le proprietà meccaniche e la rigidità;
- La possibilità di avere siti degradabili enzimaticamente, per degradare il materiale nel tempo e permettere una migliore migrazione cellulare.

Una composizione simile alla ECM fisiologica viene ottenuta quando, ad esempio, all'interno della struttura dell'idrogelo è presente il motivo peptidico RGD, ovvero l'acido arginilglicilaspartico (Arg-Gly-Asp), tipico della fibronectina come di altre proteine presenti sulla matrice. Quando è presente, le cellule mostrano un'adesione migliore rispetto al caso in cui è assente. La morfologia degli idrogeli, principalmente dettata dalle catene polimeriche che lo compongono, influenza anch'essa la risposta cellulare e, in particolare, se si hanno strutture allineate, queste tendono a orientare le cellule verso l'allineamento caratteristico della struttura dell'idrogelo. [8]

Quello che brevemente manca da discutere sono le proprietà meccaniche e di degradazione. Le prime sono fondamentali, poiché le cellule sono molto sensibili alla meccanotrasduzione e quindi alle caratteristiche meccaniche del substrato su cui si trovano. Le proprietà di degradazione sono anch'esse molto importanti poiché influenzano fortemente la migrazione cellulare.

Gli idrogeli possono essere fabbricati utilizzando polimeri naturali, come quelli descritti in precedenza, ossia polisaccaridi e proteine, o polimeri sintetici, come ad esempio glicole etilenico (PEG) e alcol polivinilico (PVA), attraverso processi di reticolazione fisica (legame idrogeno, interazione idrofobica, ecc.) o chimica (polimerizzazione a radicali liberi, click chemistry, ecc.). La manipolazione delle caratteristiche fisico-chimiche di questi materiali, tra cui la resistenza meccanica, la porosità e la proprietà di assorbimento dell'acqua, può essere ottenuta modificando la composizione del polimero, il metodo di preparazione e il grado di reticolazione. [9]

Gli idrogeli naturali vengono ampiamente utilizzati grazie alla loro buona biocompatibilità e biodegradabilità, ma la loro applicazione è limitata a causa delle scarse proprietà meccaniche e della difficoltà di regolare i tassi di degradazione e la funzione biologica. D'altra parte, gli idrogeli costituiti da polimeri sintetici offrono una gamma più ampia di proprietà chimiche, fisiche e meccaniche. Nel tempo, i ricercatori hanno sviluppato con successo idrogeli che mostrano proprietà ad alta resistenza, autorigeneranti, reattive agli stimoli, adesive e antibatteriche, composti per lo più da materiali sintetici, che quindi mancavano di biocompatibilità. Per ovviare a questa problematica, sono comparsi idrogeli ibridi, costituiti da polimeri sintetici e naturali. L'ibridazione di polimeri sintetici e naturali in un'unica rete di idrogelo può formare una nuova classe di materiali con le proprietà vantaggiose di entrambi i tipi di materiali senza i rispettivi svantaggi. Rispetto agli idrogel monocomponenti, gli idrogel ibridi mostrano un miglioramento delle proprietà meccaniche e della biocompatibilità, che

riesce quindi a soddisfare maggiormente le proprietà richieste in campo biomedico. Sebbene i benefici siano interessanti, la ricerca attuale sugli idrogel ibridi sintetici-naturali risulta però ancora molto limitata. Non è banale, infatti, combinare polimeri idrofobi con polimeri naturali idrofili in una rete ibrida omogenea, in quanto, a differenza dei materiali compositi convenzionali, i componenti di questi materiali ibridi devono essere miscelati sia a livello nano che molecolare. [3]

Risulta comunque possibile, come vedremo, ottenere idrogeli monocomponenti funzionali per applicazioni biomediche andando ad apportare delle opportune modifiche e funzionalizzazioni alla struttura principale del polimero utilizzato. Nel caso di questo lavoro di Tesi, il polimero di partenza scelto è stato la gelatina, le cui caratteristiche e modifiche verranno descritte nel paragrafo a seguire.

1.2.1. Gelatina

I tessuti hanno due componenti: le cellule e la matrice extracellulare. Le caratteristiche di un tessuto dipendono quindi da queste due parti, ed è anche per questo motivo che esistono tessuti molto variegati: ricchi di cellule e con poca matrice extracellulare, come ad esempio lo strato più esterno dell'epidermide, oppure tessuti composti da una parte cellulare molto scarsa e da molta matrice, come nel caso del derma, ovvero la parte più profonda della pelle.

La matrice extracellulare (ECM) è a sua volta formata da tre componenti importanti:

- Proteine: si dividono in strutturali e fibrose, che rappresentano la struttura portante e danno le caratteristiche meccaniche alla matrice, come il collagene e l'elastina, e adesive, come la fibronectina o l'alanina;
- Eteropolisaccaridi, formati dai glicosamminoglicani, polisaccaridi che, quando legati ad una catena proteica, formano i proteoglicani;
- Liquido interstiziale, grazie al quale la matrice extracellulare si mantiene altamente idratata.

La matrice extracellulare funge da impalcatura fisica dei tessuti e svolge un ruolo chiave nella trasduzione del segnale, nel comportamento cellulare e nella riparazione dei tessuti. Simulando l'ECM, i ricercatori sono riusciti a ottenere la crescita e la differenziazione cellulare all'esterno dell'organismo, concetto importante nella costruzione artificiale dei tessuti biologici. [10]

Essendo la proteina più abbondante nella matrice extracellulare, il ruolo del collagene è stato nel tempo altamente investigato e ancora oggi si conducono continuamente esperimenti relativi agli idrogel biologicamente attivi utilizzati come substrati per varie applicazioni. [10]

Il collagene, come anticipato, è una proteina strutturale presente nei tessuti molli e duri ed è costituito da una struttura amminoacidica particolare, formata da catene denominate catene α : nella struttura primaria, formata da oltre 400 amminoacidi, si ha la ripetizione di una tripletta: glicina-x-y, con tipicamente $x = \text{prolina}$ e $y = \text{idrossiprolina}$. Ogni singola catena polipeptidica tende ad assumere una struttura secondaria elicoidale sinistrorsa, mentre, a un livello di complessità maggiore, tre catene α si auto-assemblano e formano una tripla elica, che prende il nome di tropocollagene, che viene stabilizzata da interazioni principalmente secondarie, come i legami a idrogeno e ionici, o da legami covalenti tra le tre catene. Le molecole di tropocollagene si assemblano tra loro in file parallele sfalsate, formando microfibrille submicroscopiche spesse 20-100 nm, che andranno a loro volta a formare fibrille microscopiche e, assemblandosi ulteriormente, arrivano infine a formare le fibre di collagene. Si avrà quindi il passaggio da microfibrille a fibrille a fibre di collagene, base dei tessuti.

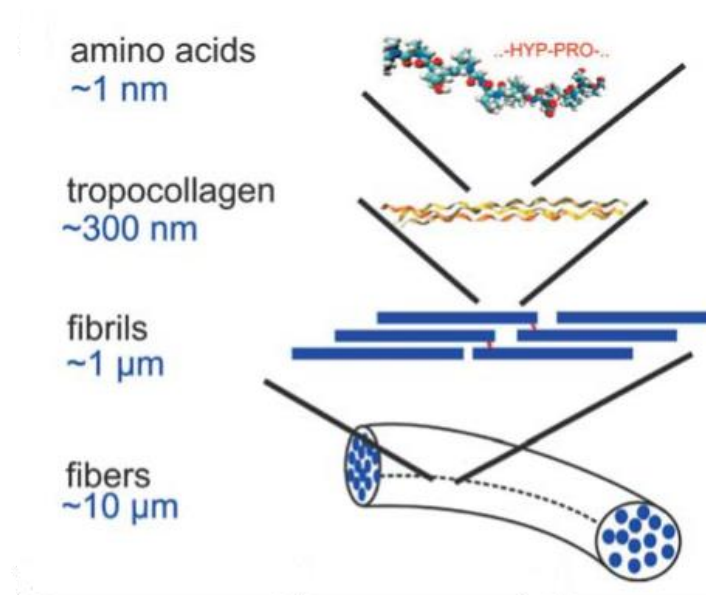


Figura 1.1 Struttura del collagene [11]

Tra i vari tipi di collagene, che sono in tutto 28, il collagene di tipo I comprende il 70-80% del derma, mentre i tipi II e III costituiscono i componenti principali della cartilagine e dei vasi sanguigni. Esso fornisce resistenza meccanica ai tessuti, e, grazie alla presenza di siti bersaglio

per i recettori delle integrine, stimola l'adesione e la proliferazione cellulare e supporta anche la formazione di tessuto. Il collagene utilizzato per applicazioni biomediche deriva principalmente da fonti bovine o equine e si ritrova maggiormente in formulazioni per medicazioni delle ferite che favoriscono la coagulazione del sangue, come ad esempio il prodotto *Colgel* (*Laboratoire Interphar, Aubervilliers, Francia*), sviluppato a partire dalla polvere di collagene, oppure come componente in materiali biocompositi con altri polimeri, sotto forma di idrogel iniettabili, membrane e film. [12]

Tra i vantaggi del collagene utilizzato come materiale per applicazioni biomediche, viene annoverato il fatto che è biodegradabile, biocompatibile e ben riconosciuto dall'organismo, dunque bioattivo. Tra gli svantaggi, invece, bisogna sicuramente porre l'attenzione sul fatto che sia tipicamente un materiale costoso e delicato da maneggiare, considerando il suo livello organizzativo molto complesso e la possibilità molto concreta che la sua struttura terziaria, elemento centrale che determina le sue prestazioni meccaniche ed estremamente simile a ciò che si ha *in vivo*, possa venire danneggiata.

Proprio per ovviare a ciò, nel tempo si è pensato di utilizzare un derivato del collagene, in modo tale da mantenere le sue caratteristiche positive e superare questi *handicap*: la gelatina. La struttura del collagene può essere infatti rotta separando le triple eliche, avvolte tra loro, mantenendo comunque la struttura primaria; questo viene solitamente fatto tramite idrolisi del collagene di tipo I, che può avere natura fisica, chimica o enzimatica. [12] In questo modo, i costi si abbassano e si elimina la necessità di dover maneggiare il prodotto con cura perché la struttura terziaria non esiste più.

La gelatina è un biopolimero di derivazione naturale ampiamente comune nella vita quotidiana e trova ampie applicazioni nella lavorazione di alimenti, prodotti farmaceutici e cosmetici. Grazie alla presenza nella sua struttura di sequenze RGD, composte dai peptidi Arg-Gly-Asp, che promuovono l'adesione, la diffusione e la differenziazione cellulare, e di sequenze di metalloproteinasi della matrice (MMP), che invece facilitano la degradazione enzimatica, presenta ottime proprietà di biocompatibilità e degradabilità. [9] Per questo motivo, è ampiamente utilizzata nel campo dei biomateriali per diversi scopi, tra cui ad esempio:

- Preparazione di idrogeli di gelatina metacrilata per simulare la matrice extracellulare;
- Fabbricazione di *scaffold* in spugna di gelatina/poli(acido lattico) per la rigenerazione dei tessuti;
- Sviluppo di *scaffold* compositi in nanofibra di cellulosa e gelatina;

- Creazione di *scaffold* di idrogeli chitosano-gelatina;
- Bioinchiostro per il progresso delle tecnologie di biostampa 3D.

Tramite tecniche di estrazione diverse, come i pretrattamenti acidi o alcalini, si arriva alla produzione rispettivamente di gelatina anionica di tipo A, derivata da pelli suine, o gelatina di tipo B, derivata da pelli bovine. [10]

La gelatina ha molte proprietà fisiche e chimiche interessanti, tra cui l'idrofilicità, la sua capacità di interazione con cellule e tessuti e il fatto che è in grado di formare in modo reversibile un gel a temperature relativamente basse, essendo un materiale termosensibile. Gli idrogeli composti di sola gelatina, però, non riescono spesso a soddisfare i requisiti dei materiali utilizzabili per scopi medici poiché la sensibilità termica e le caratteristiche di degradazione non lo rendono un materiale stabile e le sue proprietà meccaniche non sono ottimali. Per questo motivo, la gelatina viene adattata: la molecola di gelatina contiene infatti molti gruppi reattivi, come i gruppi carbossilici $-\text{COOH}$, amminici $-\text{NH}_2$ e ossidrilici $-\text{OH}$, che ne consentono la modifica e la funzionalizzazione per regolare il suo comportamento di gelificazione e le proprietà meccaniche. [13]

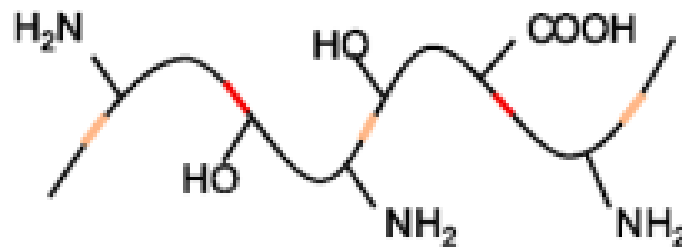


Figura 1.2 Struttura della gelatina [14]

1.2.2. GelMA

La modifica della gelatina può avvenire seguendo diverse strade; quella comunemente più usata prevede la sua reticolazione, che può essere categorizzata in tre famiglie:

- Reticolazione chimica: prevede la modifica della struttura della molecola oppure l'aggiunta alla formulazione di reticolanti in modo da determinare la formazione di legami covalenti di gruppi funzionali esposti lungo la catena, in particolare tra i gruppi amminici;

- Reticolazione fisica: sfrutta degli stimoli fisici, come ad esempio il plasma o le radiazioni gamma, per indurre la formazione di legami covalenti;
- Reticolazione enzimatica: sfrutta la presenza di un enzima aggiunto alla formulazione che va a catalizzare la reazione tra determinati gruppi funzionali presenti sulla catena.

In particolare, la formazione di gelatina metacrilata (GelMA) può avvenire per sostituzione di gruppi amminici ($-NH_2$) e idrossile ($-OH$) sulle catene laterali della gelatina con il gruppo metilacrilato attraverso una reazione di metacrilazione, i cui reagenti sono appunto la gelatina e l'anidride metacrilica (MA), la quale conferisce alla gelatina la capacità di essere fotoreticolabile tramite l'introduzione di gruppi fotosensibili nella catena, ossia i gruppi metacrilato. Questa reazione permette al GelMA di mantenere in maniera integrale all'interno della sua struttura la maggior parte dei peptidi Arg-Gly-Asp (RGD), fattori dei meccanismi di adesione, diffusione e differenziazione cellulare, e le metalloproteinasi della matrice (MMP), che invece supportano la degradazione enzimatica da parte di macrofagi, monociti, cellule sinoviali e cellule epiteliali; in questo modo, il GelMA risulta essere un materiale unico nel suo genere in quanto a biocompatibilità e degradabilità. [14]

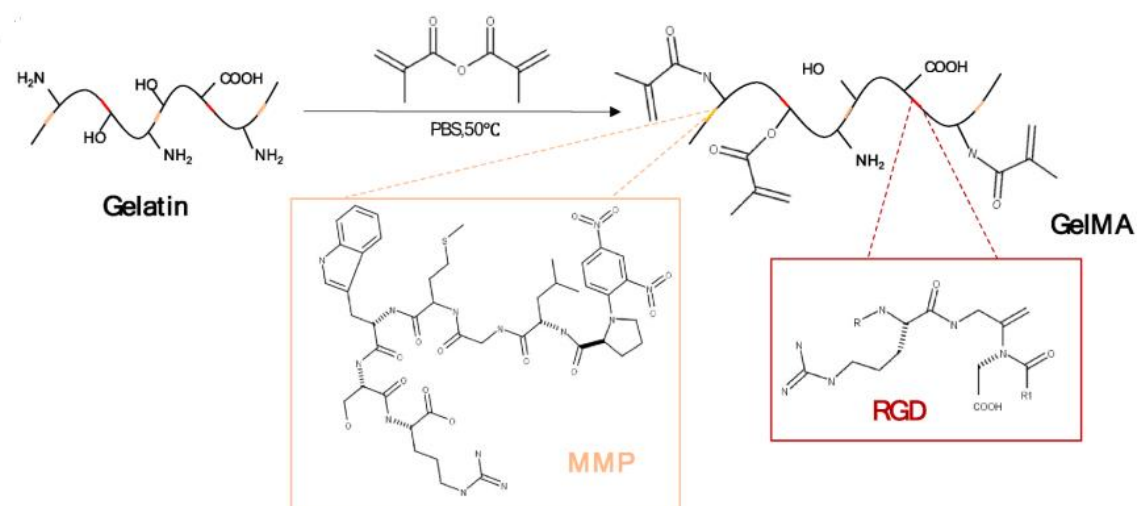


Figura 1.3 Reazione di metacrilazione della gelatina [14]

Per quanto riguarda la produzione di GelMA, il ruolo della reticolazione fisica è meno importante rispetto a quello della reticolazione chimica, che viene invece preferito nelle applicazioni biomediche perché ne permette una produzione riproducibile e maggiormente controllabile. Modificando la struttura iniziale della gelatina, risulta infatti concretamente più

semplice controllare il tasso di sostituzione di MA, in inglese definito *Degree of Functionalization* (DoF), parametro molto significativo per questo materiale. [14] Il grado di sostituzione dei gruppi metacrilato è definito come il rapporto tra il gruppo amminico funzionalizzato ($-NH_2$) e il totale dei gruppi amminici disponibili prima della reticolazione, e può essere misurato utilizzando la spettroscopia H-NMR. [9] Gli idrogeli di GelMA che presentano basso grado di sostituzione, ad esempio, hanno meno siti di reticolazione, il che li porta ad avere una maggiore libertà molecolare e una minore densità, con conseguente maggiore permeabilità per l'aria e gli ioni. Nel frattempo, nella struttura sono presenti gruppi amminici $-NH_2$ liberi, che quindi sono in grado di supportare l'innesto di altri gruppi funzionali che potrebbero conferire proprietà aggiuntive agli idrogeli, come ad esempio avviene per le funzionalizzazioni con ammonio quaternario, gruppi catecolo e così via. Per di più, i gruppi carbossilici $-COOH$ presenti nella struttura hanno la capacità di favorire il rilascio di farmaci regolato dal pH influenzando la solubilità. [14]

Come si è precedentemente accennato, i sostituenti metacrilato conferiscono proprietà di fotoreticolazione al GelMA, che migliorano alcuni aspetti degli idrogeli: essi diventano difatti più semplici da personalizzare, presentano plasticità e miglioramento nella manipolazione e anche proprietà meccaniche migliorate. La fotoreticolazione degli idrogeli può avvenire utilizzando luce ultravioletta (UV) o luce visibile attraverso l'aggiunta alle formulazioni di prepolimero di un foto-iniziatore, come ad esempio il litio 2,4,6-trimetilbenzoilfosfonato (LAP) o il 2-idrossi-4-(2-idrossietossi)-2-metilpropiofenone (IC-2959). [9]

Oltre al grado di sostituzione, è possibile quindi regolare altri parametri per controllare le proprietà che si vogliono ottenere dai propri idrogeli di GelMA; tra queste, vanno citate:

- La concentrazione della massa polimerica;
- La concentrazione del fotoiniziatore;
- L'intensità della luce ultravioletta;
- Il tempo di esposizione alla luce ultravioletta.

Alla possibilità di regolare le caratteristiche, vanno aggiunte la minore citotossicità e le eccezionali proprietà reologiche del metacrilato, che rendono il GelMA un materiale morbido e promettente come vettore nelle applicazioni biomediche. [14]

Gli idrogeli di GelMA foto-reticolati, ad esempio, risultano ad oggi i candidati ideali per diverse tecniche di somministrazione di agenti terapeutici: prodotti sotto forma di microgel o nanogel,

vengono infatti caricati con farmaci o cellule per ottenere una somministrazione iniettabile minimamente invasiva. [14]

Un' enfasi particolare viene però posta nel suo utilizzo nell'ingegneria dei tessuti, campo che verrà approfondito in seguito, e ancor più nello specifico nel *bioprinting*, tecnologia nascente che consente una disposizione spaziale precisa di materiali e cellule biologici. Gli idrogeli di GelMA vengono dunque spesso utilizzati come *scaffold* per la rigenerazione di tessuti di diversa natura, come è possibile notare in *Figura 1.4*, scopo per cui, tra l'altro, sono stati pensati per questo lavoro, sebbene non verranno utilizzati nella loro forma pura, ma a seguito di una funzionalizzazione tramite dopamina. [9]

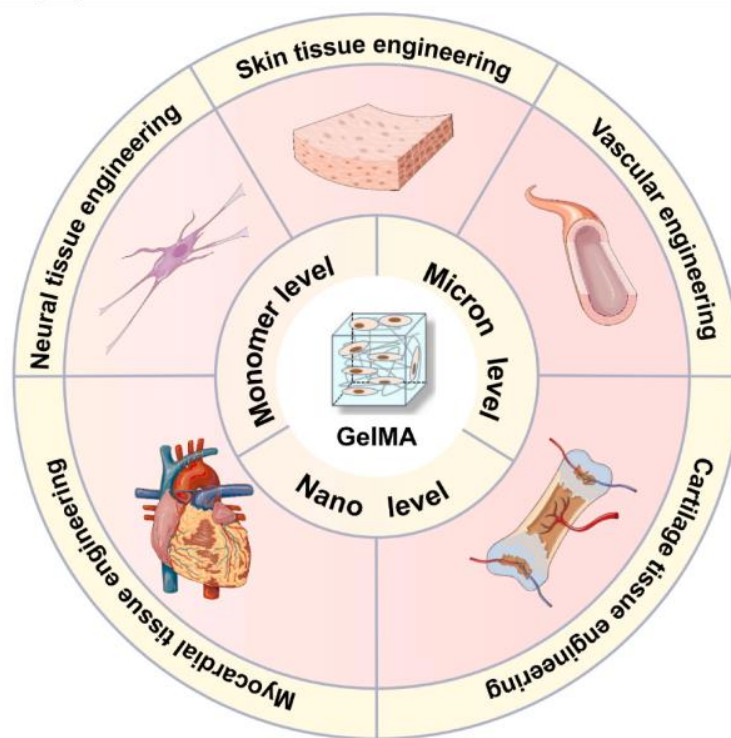


Figura 1.4 Applicazioni del GelMA nel campo dell'ingegneria dei tessuti [9]

1.2.3. GelMA-DOPA

Come già discusso nei paragrafi precedenti, il GelMA presenta caratteristiche molto migliorate rispetto alla gelatina: tramite la sua fotoreticolazione, è possibile modularne le proprietà meccaniche, risulta più stabile e può essere utilizzato per diverse applicazioni. Questo è stato reso possibile grazie all'introduzione dei gruppi metacrilato, che sono andati a legarsi ai gruppi

amminici $-NH_2$ della gelatina; nella struttura di quest'ultima, però, sono presenti altri gruppi, ovvero i gruppi carbossilici $-COOH$, che possono essere sfruttati per un'ulteriore modifica. È quello che accade ad esempio quando si decide di produrre un idrogel che presenta tutti i vantaggi del GelMA con l'aggiunta di proprietà adesive, che altri non è che il materiale protagonista di questo lavoro, ossia il GelMA-DOPA.

Per capire le motivazioni che hanno portato all'utilizzo della dopamina per questa sintesi, è necessario fare un passo indietro e porre l'attenzione sul fatto che, recentemente, si è fatto largo tra i ricercatori il pensiero di sfruttare la natura cercando di ricreare i meccanismi adesivi che la caratterizzano: tra questi, i principali studiati sono i meccanismi adesivi di cozze, vermi policheti marini denominati "vermi del castello di sabbia" (*sandcastle worms*) e lumache di terra il cui nome scientifico è *Arion subfuscus*. [4]

Questo perché ci si è resi conto che l'utilizzo di adesivi di natura sintetica porta con sé non poche problematiche quando questi vengono utilizzati a contatto con l'ambiente umido. Tra questi fenomeni, che portano a una notevole limitazione delle loro *performance*, è necessario citare:

- Fenomeni di plasticizzazione, che portano a un abbassamento della temperatura di transizione vetrosa del materiale e a una sua deformabilità, che fa sì si abbia meno forza di adesione tra le due superfici a contatto. I fenomeni di plasticizzazione sono tra l'altro legati a quelli di rigonfiamento, perché, quando viene assorbita l'acqua dai gruppi più idrofilici, l'adesivo rigonfia e nello stesso tempo subisce una plasticizzazione, rendendo il legame meno forte;
- Degradazione dovuta al contatto con l'acqua qualora il materiale presenti gruppi idrolizzabili. Questo può portare a erosione superficiale oppure a idrolisi in *bulk* di tutto l'adesivo;
- Formazione di cricche di distacco, con conseguente inserimento di acqua tra l'adesivo e il materiale e successivo distacco.

Il cianoacrilato è la colla sintetica più comunemente utilizzata per la chiusura delle ferite superficiali. Nonostante la sua buona forza adesiva, esso presenta uno svantaggio importante di cui non si è ancora parlato: è in grado, infatti, di generare una grande quantità di calore *in situ* durante il processo di polimerizzazione ed è stato dimostrato che i suoi prodotti di degradazione sono tossici e ne vanno quindi certamente a limitare le applicazioni. Per questo motivo, si è pensato nel tempo di trovare soluzioni alternative e magari biologiche: è il caso della colla di

fibrina, composta da fibrinogeno e trombina. Anche in questo caso però, nonostante i vantaggi relativi alla sua biodegradabilità, essa è associata alla possibilità di trasferire malattie legate al sangue e ai costi elevati dovuti al suo complesso processo di fabbricazione. [15]

In alternativa, il meccanismo adesivo della cozza marina ha dunque destato molto interesse tra gli scienziati soprattutto perché le cozze sono in grado di aderire in maniera molto salda, nonostante l'ambiente difficile e turbolento che caratterizza le acque marine, a superfici di qualsiasi natura, sia organica che inorganica.

Analizzando meglio questo meccanismo, si nota che l'adesione si instaura grazie a una serie di filamenti, chiamati filamenti del bisso, che partono da una radice formando uno stelo da cui si diramano tanti piccoli fili che terminano sul substrato di adesione formando delle placche adesive di circa 2-3 mm. Questi filamenti sono proteici, quindi formati esclusivamente da proteine; nello specifico, presentano un cuore di collagene, diversi tipi di proteine collageniche, e hanno uno *shell*, quindi una superficie, caratterizzato da proteine polifenoliche. La struttura proteica è molto complessa e la struttura del filo è caratterizzata all'incirca da 30 proteine. I filamenti del bisso presentano inoltre una composizione particolare, una struttura gerarchica, che permette loro di avere delle proprietà meccaniche che variano gradualmente dalla zona prossimale, ovvero dal corpo molle del mollusco, alla zona distale, quindi vicina alla placca di adesione. Vicino al corpo molle del mollusco i filamenti sono molto più deformabili, meno rigidi e meno resistenti, mentre, man mano che ci si avvicina alla placca, le caratteristiche meccaniche cambiano e quindi diminuisce l'allungamento percentuale a rottura, mentre aumentano rigidità e resistenza meccanica.

Le proteine vengono denominate con l'acronimo Mfp, dove fp sta per *foot proteins* (proteine del piede del mollusco). Sulla superficie esterna del filamento si trova la proteina fp1, mentre a diretto contatto con il substrato, sulla placca di adesione, si trovano la Mfp-3 e la Mfp-5. Altre proteine caratteristiche sono la Mfp-2 e Mfp-4, che si trovano sopra la placca e mediano l'interazione della placca con il resto del filamento.

Queste proteine sono dunque responsabili del comportamento adesivo del mollusco perché coinvolgono la chimica del catecolo e complessi poli-elettrolitici. La presenza consistente della proteina adesiva Mfp-5, caratterizzata a sua volta dall'abbondanza di gruppi catechina, contribuisce all'adesione iniziale a un substrato bagnato: la catechina presenta i gruppi catecolo, composti da un anello benzenico e due gruppi ossidrilici adiacenti, i quali riescono a legarsi alla superficie idrofila tramite legami idrogeno e interagiscono elettrostaticamente con la superficie

dell'ossido metallico. L'anello benzenico dal canto suo forma interazioni π - π e in questo modo vengono a formarsi interazioni idrofobiche su superfici idrofobiche. Inoltre, l'adesione stabile dei molluschi marini nell'acqua di mare non si limita a quella dovuta alla concentrazione di proteina Mfp-5. Nell'acqua di mare, che risulta essere alcalina, oppure tramite l'aggiunta di forti ossidanti, i gruppi catechina vengono convertiti in gruppi chinonici: essi si legano covalentemente alle superfici dei tessuti attraverso vari percorsi di reazione, portando alla reticolazione tra proteine che contribuisce alle proprietà elastiche dei molluschi. I gruppi chinonici ossidati sono altamente reattivi ai residui di lisina e cisteina legati ai tessuti tramite addizione nucleofila o formazione di immina. [4]

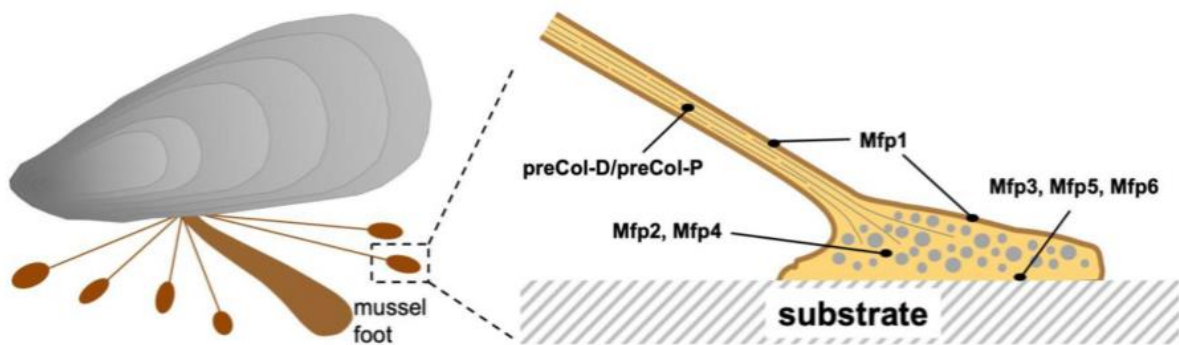


Figura 1.5 Meccanismo adesivo della cozza [16]

Queste proteine sono ricche dell'amminoacido DOPA (diidrossifenilalanina); in particolare nella Mfp-1 si trova circa il 10-15% di DOPA, mentre se ne trova in abbondanza (20-27%) nella Mfp-3 e Mfp-5. La DOPA è il principale responsabile del meccanismo adesivo perché caratterizzata dai gruppi catecolo di cui si è discusso pocanzi: in ambiente leggermente alcalino, la DOPA si troverà in equilibrio con il dopachinone, in seguito all'ossidazione dei gruppi catecolo in gruppi chinone. La reazione di ossidazione non sarà mai completa al 100%, ma tenderà a uno stato di equilibrio, che determinerà la capacità di adesione su superfici di qualsiasi natura chimica: la DOPA, grazie ai gruppi catecolo, formerà legami idrogeno e complessi metallici con substrati di natura inorganica, mentre il dopachinone, grazie ai gruppi chinone, reattivi con molecole che presentano gruppi amminici, gruppi tiolo o gruppi imidazolo, può formare dei legami covalenti con superfici di natura organica.

I ricercatori hanno quindi ben pensato di utilizzare i meccanismi di adesione delle proteine di adesione dei mitili per modificare chimicamente i *network* di idrogeli tramite l'inserimento di gruppi catecolo.

È possibile produrre materiali adesivi seguendo tre vie principali:

1. Produrre polimeri che contengono i catecoli in catena principale;
2. Produrre polimeri che espongono lateralmente dei gruppi catecolo;
3. Produrre polimeri che hanno gruppi terminali a base di gruppi catecolo, come se fossero molecola "a stella".

Nella prima strategia, l'idea è quella di produrre un polimero interamente a base di gruppi catecolo, il che risulta molto semplice perché il monomero da cui si parte potrebbe essere la stessa DOPA. Si potrebbe usare anche la dopamina, che si differenzia dalla DOPA esclusivamente per un piccolo dettaglio, ossia manca del gruppo carbossilico $-COOH$, ma per il resto si trovano sia il gruppo amminico che il gruppo catecolo, fondamentali per far avvenire la reazione chimica che porta alla funzionalizzazione dei polimeri.

Per prima cosa, viene preparata una soluzione di DOPA o dopamina in ambiente acquoso e si procede facendo ossidare il gruppo catecolo a gruppo chinone. Questo può avvenire in tre modi: aggiungendo alla soluzione un agente chimico ossidante, aggiungendo un enzima con una funzione ossidante, oppure facendo avvenire l'ossidazione in maniera del tutto spontanea, come accade in ambiente marino, modificando il pH della soluzione portandolo a valori dell'intorno di 8.5. Quest'ultima strategia è solitamente la favorita perché più economica e soprattutto perché non necessita di agenti chimici aggiuntivi. A questo punto, i gruppi catecolo diventano gruppi chinone, reattivi nei confronti dei gruppi amminici: ha dunque inizio la polimerizzazione, che porterà alla formazione di un polimero reticolato con struttura ramificata. Solitamente, questa strategia viene utilizzata per produrre dei *coating*: andando a inserire un substrato all'interno della soluzione, la poliDOPA o la polidopamina andranno a depositarsi nel tempo sulla sua superficie, ottenendo un rivestimento di spessore variabile.

La seconda strategia è invece basata sulla produzione di polimeri che presentano i gruppi catecolo in catena laterale ed è applicabile, seguendo due metodi differenti, sia a polimeri sintetici che a polimeri naturali.

Per quanto riguarda i polimeri sintetici, è possibile sintetizzare dei copolimeri partendo da monomeri che presentano un doppio legame carbonio-carbonio e che espone lateralmente un gruppo catecolo. La polimerizzazione sarà in questo caso una polimerizzazione radicalica, che

quindi andrà a sfruttare il doppio legame C=C: in presenza di un fotoiniziatore, si avrà l'addizione di un nuovo monomero in corrispondenza del doppio legame attivato. Il risultato finale sarà un polimero lineare nel caso in cui il monomero di partenza sia utilizzato con i gruppi catecolo in forma protetta, mentre si avrà un polimero molto ramificato e reticolato utilizzando un monomero di partenza non protetto.

I polimeri ottenuti sono molto versatili e possono essere utilizzati per fare dei rivestimenti o all'interno di gel adesivi.

Nel caso dei polimeri naturali, invece, non sarà necessario fare delle sintesi partendo da monomeri, in quanto si avrà già a disposizione il polimero naturale, che verrà semplicemente modificato. Si andranno infatti a sfruttare i gruppi carbossilici –COOH esposti lateralmente nella catena del polimero, che risultano semplici da modificare e sui quali è quindi possibile aggirare facilmente molecole che espongono gruppi amminici, come ad esempio la dopamina. I gruppi carbossilici vengono solitamente trattati utilizzando la chimica delle carbodiimmidi: attraverso questi agenti, i gruppi –COOH vengono attivati e in questo modo risultano in grado di reagire successivamente con le ammine della dopamina. Dopo l'attivazione con le carbodiimmidi, infatti, la dopamina si andrà a legare ai –COOH formando un legame ammidico e in questo modo il polimero andrà ad esporre lateralmente i gruppi catecolo.

Anche in questo caso, i polimeri ottenuti possono essere sfruttati per svariate applicazioni in ambito biomedicale, sempre nel settore dei rivestimenti e dei gel adesivi.

La terza e ultima strategia, la più semplice, consiste nel modificare le catene di polimero con dei gruppi catecolo terminali. Anche in questo caso, questo tipo di modifica permette di avere delle molecole utilizzabili per rivestimenti, da applicare su nanoparticelle o superfici di altro tipo, o per produrre idrogeli iniettabili adesivi.

In questo lavoro di Tesi, verrà utilizzata la seconda strategia: partendo dal polimero naturale GelMA, infatti, se ne andrà a modificare la struttura inserendo dei gruppi catecolo in catena laterale, attivando i gruppi carbossilici tramite l'utilizzo delle carbodiimmidi e arrivando alla formazione di legami ammidici in seguito alla reazione con la dopamina. In questo modo, si arriverà al materiale finale di nostro interesse, il GelMA-DOPA.

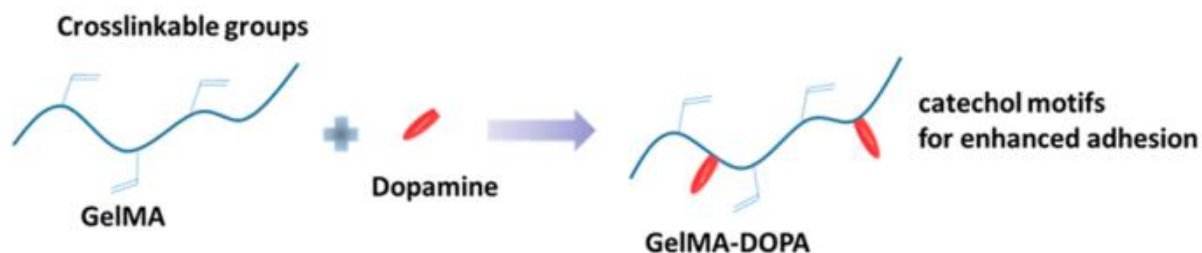


Figura 1.6 Funzionalizzazione del GelMA in GelMA-DOPA [17]

1.3. Medicina rigenerativa e ingegneria dei tessuti

I materiali di cui si è discusso nei paragrafi precedenti hanno un ruolo di riguardo nella medicina rigenerativa e, in particolare, nell'ingegneria dei tessuti. In questo paragrafo, verranno date le definizioni e discussi gli scopi di questi campi e, in secondo luogo, verranno presentati degli esempi pratici di applicazione della GelMA-DOPA, con un focus particolare per il suo uso nel *wound healing*.

La medicina rigenerativa è un campo di ricerca che permette di sostituire o rigenerare le cellule, i tessuti e gli organi umani, in modo da recuperare la normale funzione. Essa è dunque finalizzata a recuperare la salute dell'uomo e si fonda sul concetto di rigenerazione, andando a rimpiazzare il tessuto danneggiato e/o stimolando i meccanismi di riparazione del corpo per guarire i tessuti precedentemente irreparabili o organi. Inoltre, permette agli scienziati di produrre e far crescere tessuti o organi in laboratorio, grazie anche all'utilizzo di bioreattori, in modo tale da avere substrati su cui poter effettuare test preliminari su farmaci e agenti terapeutici oppure da poter trapiantare con sicurezza, in modo tale da poter risolvere il problema della mancanza di organi disponibili per la donazione. [18]

La medicina rigenerativa include:

- Terapia cellulare: prevede l'iniezione in area danneggiata di cellule a scopo rigenerativo ed è attualmente studiata per problemi cardiovascolari, diabete insulino-dipendente, danni alla spina dorsale, morbo di Parkinson e Alzheimer;
- Terapia genica: terapia che vuole cambiare il comportamento della cellula a scopo rigenerativo andando a inserire opportuni geni all'interno del corredo genetico cellulare. La sicurezza del risultato viene controllata *in vitro*, selezionando solo le cellule con il materiale genetico che si desidera ottenere, che verranno poi impiantate nel paziente;

- Medicina molecolare: prevede lo sviluppo di farmaci che stimolano la rigenerazione e l'utilizzo di agenti terapeutici con funzione rigenerativa, come ad esempio l'estradiolo, che impedisce la formazione delle cicatrici da ferita e ha funzione rigenerativa. Altre medicine molecolari costituiscono un complemento alla terapia cellulare, come ad esempio i farmaci per il controllo della pressione del sangue, che possono prevenire danni al tessuto cardiaco rigenerato dalle cellule staminali;
- Ingegneria dei tessuti: prevede il mantenimento, il recupero o la sostituzione di tessuti e organi attraverso la combinazione di *scaffold*, cellule e molecole. Sfrutta i biomateriali, grazie ai quali si producono matrici tridimensionali che possono guidare le cellule a ingegnerizzare un tessuto *in vitro* o *in vivo*.

Soffermandoci su quest'ultima, l'ingegneria tissutale, o *Tissue Engineering* (TE), è un campo multidisciplinare che include medicina, biologia, genomica, robotica e ingegneria chimica e biomedica.

I suoi attori chiave sono lo *scaffold*, ossia una matrice tridimensionale porosa che corrisponde a un sistema per la coltura cellulare e che viene utilizzato per l'adesione iniziale delle cellule, le cellule e i fattori di crescita, che stimolano la proliferazione o il differenziamento cellulare: questi tre elementi vengono definiti "la triade della TE". L'ingegneria tissutale si occupa quindi della progettazione e della creazione di organi e tessuti non dal punto di vista della ricerca di materiali inerti nell'organismo, bensì dal punto di vista dell'interazione tra materiale e sito biologico, in modo da poter realizzare la rigenerazione del tessuto e dell'organo originario, ottenendo così una vera e propria sorta di replicante biologico naturale, dove il supporto artificiale, quando presente, viene generalmente degradato nel tempo.

Come anticipato, vi sono due tipi di approccio:

1. *In vitro*: le cellule vengono seminate su uno *scaffold* tramite un opportuno mezzo di coltura all'interno di un contenitore o in un bioreattore. Il tessuto prodotto potrà essere usato come modello per la ricerca oppure essere impiantato;
2. *In vivo*: lo *scaffold* viene impiantato direttamente su un tessuto. Esso può essere privo di cellule, ma provvisto di fattori di crescita che ne operano il richiamo, oppure già provvisto di cellule. Nell'ultimo caso, lo *scaffold* che può venire impiantato subito dopo la coltura oppure si aspetta prima la proliferazione delle cellule *in vitro*. L'approccio *in vivo* comporta comunque dei rischi, come ad esempio il riconoscimento di tessuto

estraneo da parte del sistema immunitario. Da qui, nasce la necessità dello *scaffold* di essere biomimetico e con proprietà meccaniche simili a quelle del tessuto sostituito.

L'ingegneria tissutale quindi, seppur ancora in fase di sviluppo, sembra poter essere applicata alla rigenerazione di tessuti di varia natura: dal tessuto osseo a quello cardiaco, al tessuto epatico a quello nevoso, finanche al tessuto cutaneo, che è sicuramente uno dei più soggetti a danni e ferite perché è quello più esposto al mondo esterno.

Il tessuto cutaneo, come è possibile notare in *Figura 1.7*, è generalmente considerato composto da tre diversi strati: epidermide, derma e ipoderma, che sono rispettivamente le regioni più esterna, intermedia e più interna, caratterizzata da un ruolo unico nel funzionamento del tessuto stesso. [19]

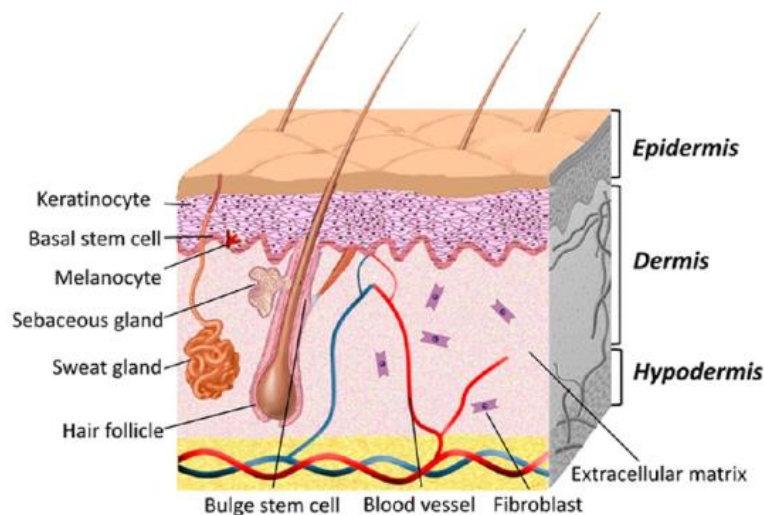


Figura 1.7 Rappresentazione tessuto cutaneo [19]

L'epidermide, che si trova nella regione più esterna del tessuto cutaneo, è costituita da una regione sottile e biologicamente attiva, anche se prevalentemente acellulare. Essa funge da barriera contro le forze ambientali esterne come infezioni, tossine e radiazioni ultraviolette (UV). Oltre a ciò, aiuta anche in vari processi fisiologici, come ad esempio la generazione di ormoni. Lo strato intermedio, che si trova immediatamente sotto l'epidermide, è costituito dal derma, un tessuto connettivo denso che contiene vari enzimi, nicchie di cellule staminali, vasi sanguigni, nervi, tessuto adiposo, fibre muscolari e varie ghiandole e follicoli piliferi. Lo strato più interno invece, sotto il derma, è lo strato dell'ipoderma, che è essenzialmente tessuto adiposo vascolarizzato. Esso fornisce resistenza meccanica e proprietà termoregolatrici al tessuto. Oltre

al loro ruolo nel funzionamento del tessuto cutaneo, tutti e tre gli strati differiscono significativamente in termini di cellularità, fenotipi cellulari, composizione biochimica e proprietà meccaniche. [19]

Essendo un tessuto metabolicamente attivo, il tessuto cutaneo subisce frequenti rimodellamenti, prevalentemente a causa della desquamazione cellulare nello strato epidermico. Tuttavia, l'interruzione del processo di rimodellamento impedisce la guarigione spontanea, portando alla formazione di tessuto cicatriziale. La guarigione delle ferite procede tipicamente con quattro fasi principali, con significativa sovrapposizione tra esse: la formazione di ematomi (emostasi), l'infiammazione, la formazione di neo-tessuti grazie alla proliferazione cellulare e infine il rimodellamento dei tessuti, con la fase finale che porta alla formazione di tessuto cicatriziale. [19]

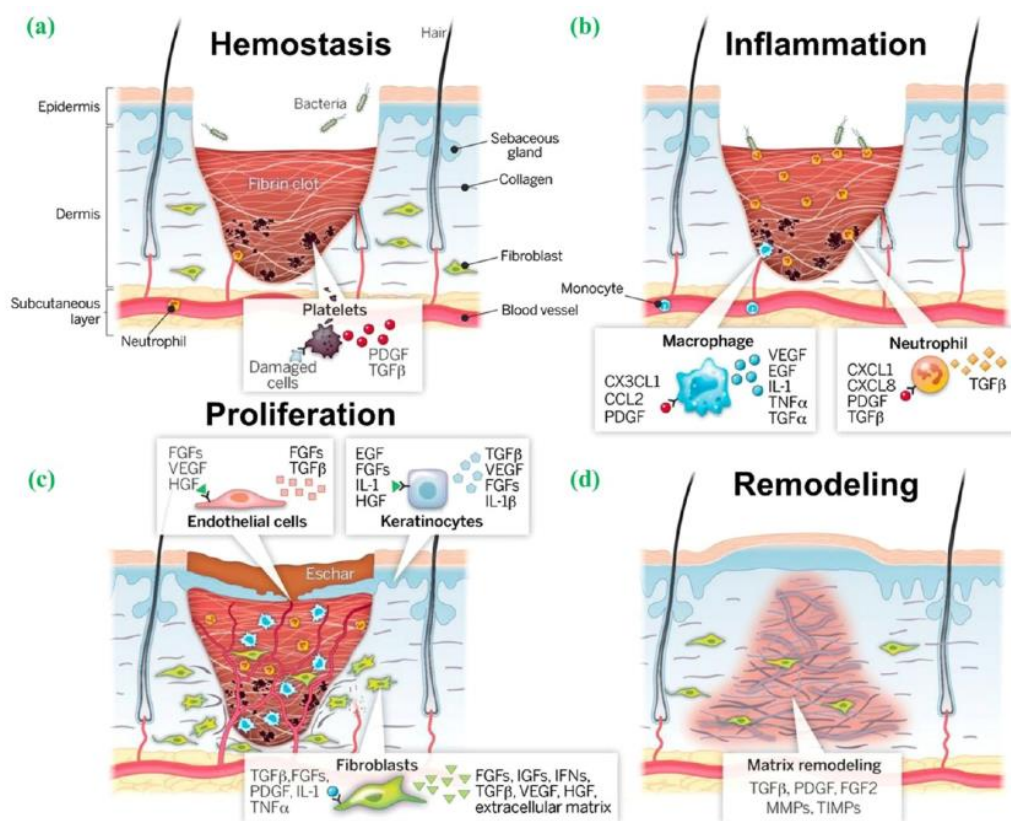


Figura 1.8 Fasi della guarigione di una ferita [20]

Subito dopo il verificarsi del trauma, si ha un effetto emostatico provocato dall'aggregazione piastrinica e dalla formazione di coaguli di fibrina e il processo di guarigione della ferita viene rapidamente trasferito allo stadio infiammatorio. In questa fase, le cellule infiammatorie,

principalmente neutrofili e monociti, vengono reclutate nel sito e differenziate in macrofagi. La risposta infiammatoria risultante va a rimuovere corpi estranei, batteri e tessuti endogeni danneggiati, e anche a secernere chemochine e fattori di crescita (GF) per attirare ulteriormente le cellule. Il numero di neutrofili solitamente diminuisce significativamente dopo 3 giorni dalla ferita e, mentre i globuli bianchi si allontanano, i macrofagi continuano a eliminare i detriti e a secernere GF e proteine, attirando le cellule del sistema immunitario verso la ferita per promuovere la riparazione dei tessuti e attivando la fase di proliferazione. In questa fase, i fibroblasti e i cheratinociti sulla superficie della ferita generano del tessuto rosa chiaro per riempire il difetto, che prende il nome di tessuto di granulazione per via della sua forma simile alla granulazione. Esso contiene principalmente cellule infiammatorie, fibroblasti e alcuni nuovi capillari e, in concomitanza alla sua formazione, le cellule basali attorno al tessuto difettoso continuano a proliferare e migrare verso la superficie della ferita per formare nuove cellule epiteliali. Si arriverà dunque alla fase di ri-epitelizzazione nel momento in cui l'intera ferita sarà ricoperta dalle cellule epiteliali. Nel sito della ferita si vedrà una deposizione di collagene, principalmente di tipo III, e anche uno sviluppo di micro-vasi o capillari, già esistenti nel tessuto di granulazione. Successivamente, si passa alla fase finale di rimodellamento: la produzione e la decomposizione del collagene, che nel frattempo passa da tipo III a tipo I, tendono a bilanciarsi, con un conseguente aumento della resistenza del nuovo tessuto. Si riduce anche il numero dei capillari, che via via vengono convertiti in piccole arterie e vene; inoltre, cominciano a rigenerarsi appendici cutanee come capelli, ghiandole sudoripare e sebacee. Infine, la matrice precedentemente formata si convertirà lentamente in pelle funzionale o tessuto cicatriziale semi/non funzionale. [20]

Per ottenere una rigenerazione cutanea veloce e di alta qualità, nel tempo sono stati sviluppati una serie di biomateriali biomimetici il cui scopo risulta proprio essere quello di riparare, sostituire e regolare i tessuti disfunzionali in modo da ripristinare l'omeostasi della pelle. Come è possibile notare in *Figura 1.9*, a ogni componente del tessuto cutaneo sono state associate una o più soluzioni per raggiungere una rigenerazione ottimale.

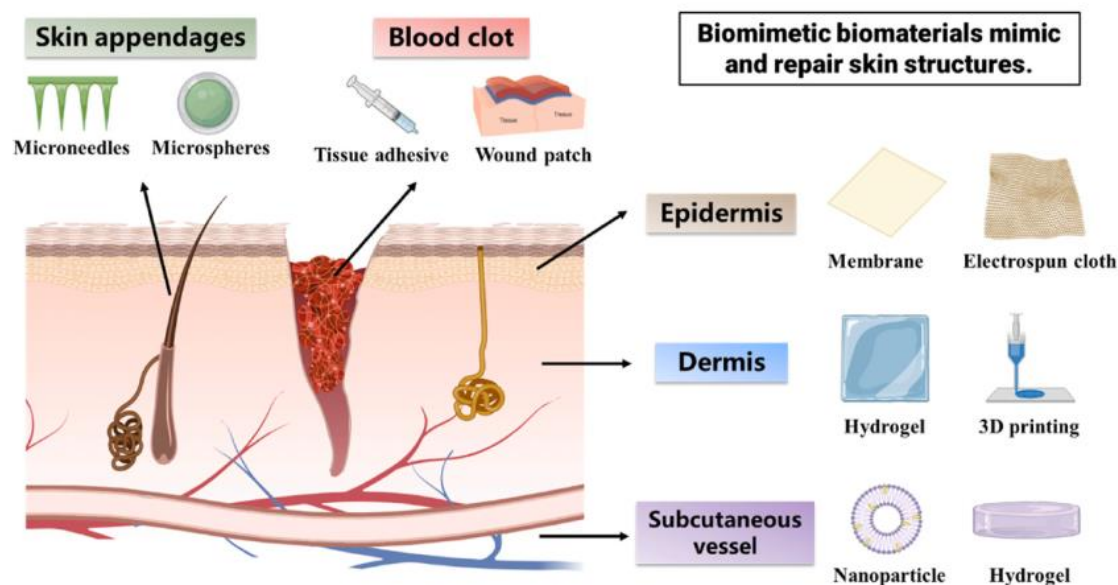


Figura 1.9 Soluzioni per rigenerazione del tessuto cutaneo [21]

Da questo schema, risulta lampante che, tra le soluzioni proposte, gli idrogeli ricoprono un ruolo di spicco: oltre che essere sfruttati per rigenerare il derma o lo strato sub-cutaneo della pelle, rientrano anche nei materiali utilizzati nel 3D *printing* e negli adesivi tissutali finalizzati alla coagulazione. Le loro ormai ben note proprietà di biocompatibilità, idrofilicità e biodegradabilità li rendono particolarmente adatti alla gestione delle ferite, senza contare che la possibilità di modificarne le catene polimeriche permette di dar vita a idrogeli con caratteristiche ben precise, quali ad esempio l'iniettabilità, le proprietà autoriparanti, l'attività antibatterica o antiossidante, l'adesione e così via.

Riassumendo lo stato dell'arte inerente all'utilizzo di questi materiali per il *wound healing*, ossia per la rigenerazione delle ferite, è possibile dire che gli idrogeli vengono principalmente utilizzati come:

- Medicazioni con proprietà emostatiche e adesive: la proprietà emostatica degli idrogel non è supportata solamente dalla sigillatura fisica, ma anche dall'assorbimento dell'estratto della ferita che porta a un arricchimento dei fattori di coagulazione. L'emostasi viene spesso combinata con l'adesività degli idrogeli bioadesivi, i quali permettono un'adesione prolungata al sito della ferita, evitando il potenziale rischio di infezione causata dal contatto tra il materiale e l'ambiente esterno;
- Medicazioni con proprietà antiossidanti e antinfiammatorie: come già discusso, una corretta infiammazione è essenziale nella riparazione delle ferite, quindi il controllo

dell'infiammazione deve essere una caratteristica importante nelle medicazioni per ferite. Un'infiammazione eccessiva può infatti portare a stress ossidativo e a un forte aumento delle specie reattive dell'ossigeno, che potrebbero causare danni quali la perossidazione lipidica o l'ossidazione del DNA e delle proteine. Gli antiossidanti sono in grado di neutralizzare i radicali liberi, eliminando così il loro potenziale dannoso;

- Medicazioni con proprietà di rilascio controllato: la struttura porosa degli idrogel li rende adatti ad accogliere un'ampia varietà di sostanze al loro interno e a rilasciarle lentamente in punti specifici. Il rilascio locale di cellule esogene o citochine ha mostrato un buon vantaggio nel promuovere la guarigione delle ferite;
- Medicazioni autoriparanti: oltre all'adesione e alle proprietà che permettono una rapida emostasi, la barriera fisica formata dalla presenza degli idrogeli è anche utile per prevenire infezioni batteriche esterne. Gli idrogeli generalmente sono però soggetti a rotture o fratture se esposti a tensioni esterne, il che potrebbe certamente portare a un'invasione di batteri esterni e a una conseguente infezione della ferita. Il concetto di idrogeli autoriparanti prevede l'utilizzo di questi materiali "intelligenti" in grado di riparare i propri danni funzionali e strutturali. Gli idrogeli autoriparanti possono essere suddivisi in idrogeli autoriparanti fisici e idrogeli autoriparanti chimici in base al meccanismo di guarigione. I primi ricostruiscono le reti formando interazioni non covalenti tra molecole, oligomeri o catene polimeriche; i secondi, invece, formano *network* di ricostruzione attraverso legami covalenti dinamici;
- Medicazioni reattiva agli stimoli: si tratta di idrogeli sensibili a cambiamenti dell'ambiente esterno, come temperatura, pH o luce, in grado di avere una modifica nella loro forma o dimensione;
- Medicazioni conduttive: la barriera cutanea è formata dalla combinazione delle cariche positive presenti nella ferita e delle cariche negative attorno all'intera pelle. Il campo elettrico nella sede della ferita è considerato un segnale direzionale che porta le cellule a migrare nel sito del danno durante la guarigione. [20]

Entrando nello specifico del materiale utilizzato per questo lavoro di Tesi, ossia il GelMA-DOPA, è possibile ad oggi trovare in letteratura diverse soluzioni pensate nel tempo per applicarlo nel campo del *wound healing*.

Nel 2021, Zhou et al. hanno progettato con successo un idrogelo adesivo a base di gelatina metacrilata funzionalizzata con dopamina (GelMA-DOPA) con forte adesività tissutale e proprietà antibatteriche, che ha dimostrato proprietà meccaniche regolabili ed elasticità ottimale

grazie al *network* formato in seguito a una doppia reticolazione, ottenuta attraverso la reticolazione con perossidasi di rafano (HRP)/perossido di idrogeno (H₂O₂) e luce ultravioletta (UV). Questo dispositivo ha mostrato un'ottima capacità emostatica in confronto a un sanguinamento incontrollato *in vivo* e, in più, ha presentato proprietà antibatteriche significative grazie al rilascio di H₂O₂ in seguito alla sua formazione. Inoltre, ulteriori studi sul costrutto lo hanno ritenuto in grado di promuovere un'efficiente rigenerazione della pelle con la formazione di annessi quando questo veniva caricato con il fattore di crescita epidermico (EGF). [22]

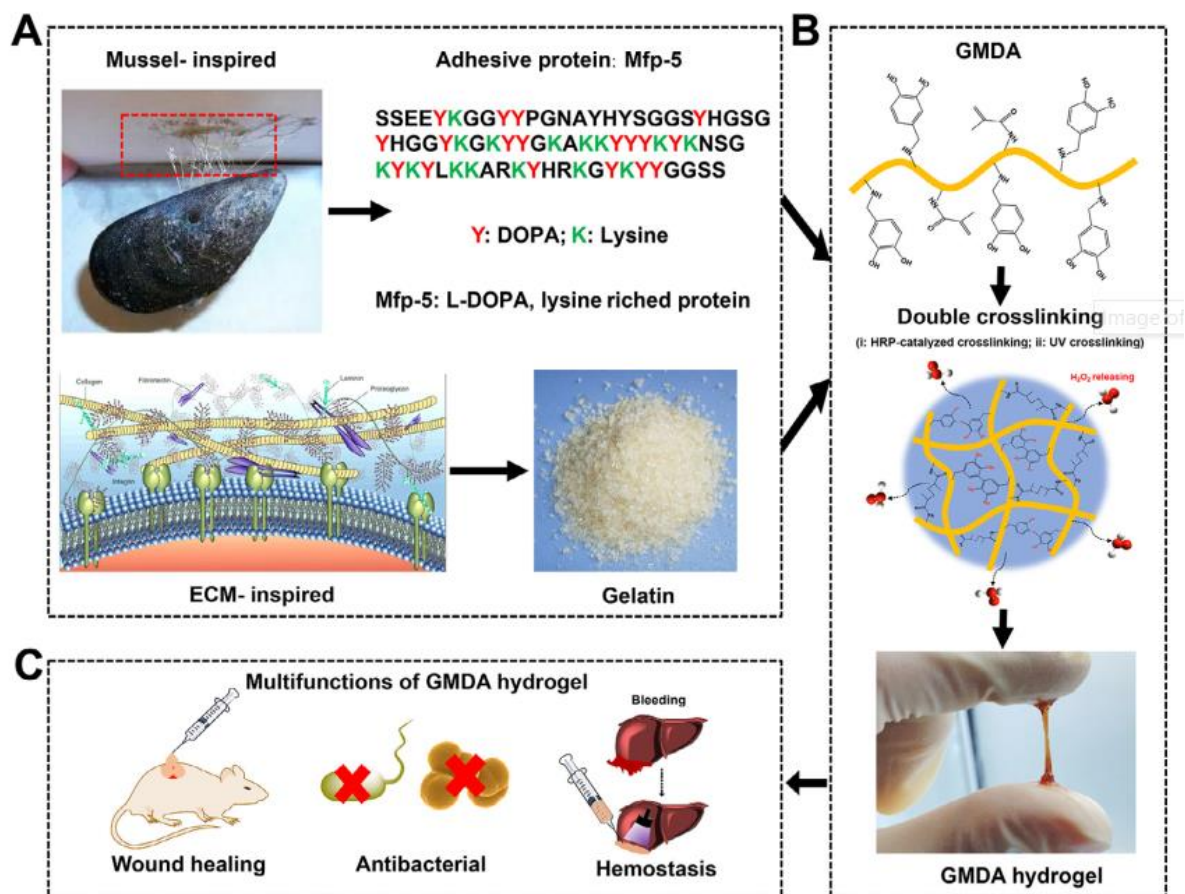


Figura 1.10 Lavoro di Zhou et al. [22]

L'anno successivo, nel 2022, il lavoro di Liu et al. ha portato allo sviluppo di un idrogelo GelMA-DOPA nanofibroso, ottenuto mediante elettrofilatura, altamente adesivo, estensibile e traspirante. La reticolazione di questo costrutto viene definita ibrida, perché mediata sia dai gruppi metacrilato irraggiati da luce UV, sia dal processo di elettrofilatura *in situ*. [23]

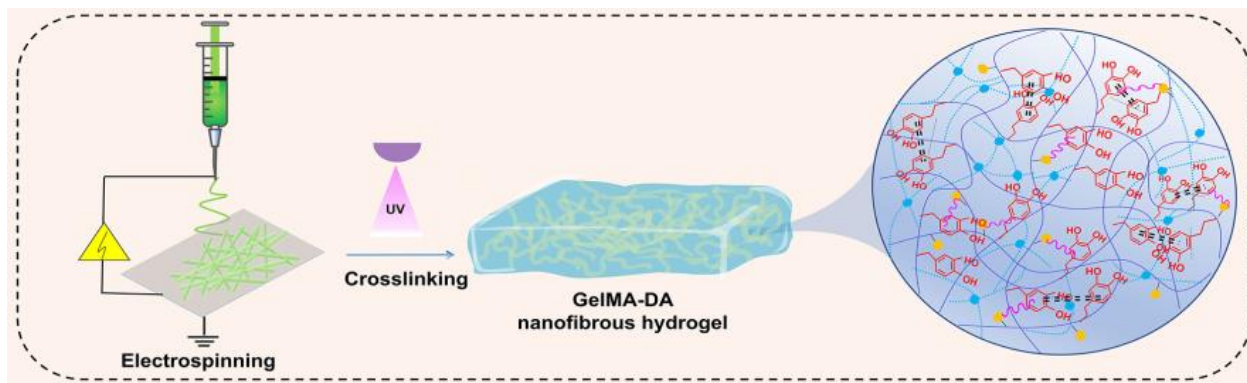


Figura 1.11 Elettrofilatura idrogelo di GelMA-DOPA di Liu et al. [23]

Infine, nel 2023, Wang et al. hanno prodotto un idrogelo di GelMA-DOPA incorporando al suo interno anche vescicole extracellulari derivate da cellule staminali mesenchimali (MSC-EV). I risultati hanno dimostrato che questo materiale possedeva buone proprietà di morbidezza, adesività e capacità di assorbimento, nonché un'elevata biocompatibilità. Inoltre, si è visto come l'incorporazione delle MSC-EV ha promosso la migrazione cellulare e l'angiogenesi *in vitro*. Questo modello di idrogelo è stato pensato dai ricercatori per il trattamento di ferite diabetiche. [24]

Da questi esempi risulta quindi evidente come il GelMA-DOPA possa confermarsi una valida scelta come materiale da utilizzare nella progettazione di dispositivi dediti alla rigenerazione cutanea e al *wound healing*.

1.4. Scopo del lavoro

Per questo lavoro di Tesi, si è quindi deciso di progettare un idrogelo di GelMA-DOPA valutando una sua possibile applicazione nel campo del *wound healing* appena descritto. Si è partiti dalla sintesi della gelatina metacrilata (GelMA), che è stata in seguito funzionalizzata con dopamina per arrivare al prodotto finale, ossia il GelMA-DOPA. Quest'ultimo è stato quindi caratterizzato, mettendolo spesso a confronto con il GelMA, per valutarne le proprietà chimiche e fisiche.

2. Materiali e metodi

In questo capitolo verranno descritti i metodi che hanno portato alla sintesi e alla caratterizzazione del materiale oggetto di studio, ossia del GelMA-DOPA.

2.1. Materiali

I materiali utilizzati per questo lavoro di Tesi sono stati: gelatina (Bloom 50-120, tipo B, Merck, G6650), soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco (DPBS, Merck, D1408), anidride metacrilica (MAA, Merck, 276685), acqua deionizzata (ddH₂O), acido 2-(N-Morpholin)etan-solfonico (MES), 1-etil-3 (3-dimetilaminopropil) carbodiimide (EDC), N-idrossisuccinimide (NHS), dopamina cloridrato, acido cloridrico (HCl), dimetilsolfossido (DMSO), water-soluble TPO (TPO-SDS), polietilenglicole diacrilato con peso molecolare medio 575 (PEGDA 575).

2.1.1. Sintesi del GelMA

Come già accennato nel capitolo 1, la gelatina è un biopolimero derivato dalla denaturazione del collagene. Al fine di renderla utilizzabile per i nostri scopi, è necessario modificarla chimicamente tramite l'aggiunta di gruppi metacrilici alla sua struttura al fine di renderla compatibile col processo di fotopolimerizzazione. Per fare ciò, si è ricorso a una reazione di metacrilazione tra i gruppi amminici della catena di gelatina e l'anidride metacrilica. Nella *Figura 2.1* viene rappresentata la reazione di metacrilazione della gelatina.

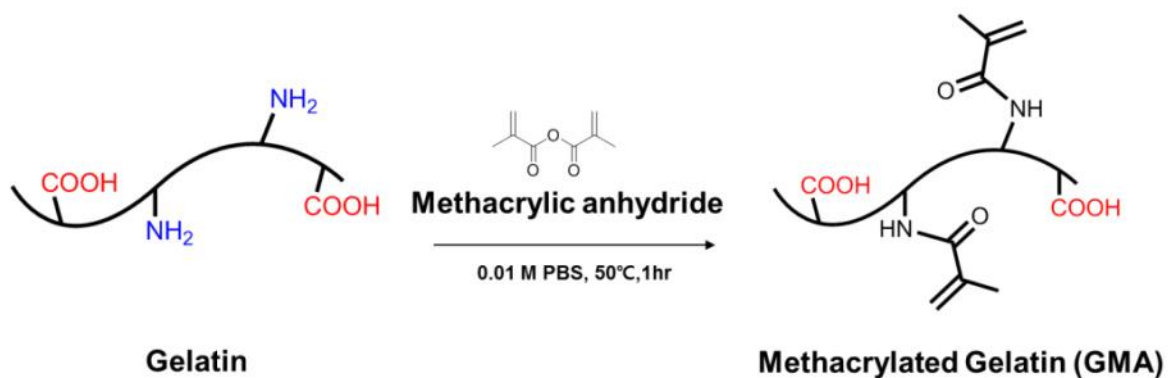


Figura 2.1 Reazione di metacrilazione del GelMA [25]

Come spiegato precedentemente, l'esposizione del GelMA a radiazione ultravioletta, in presenza di un opportuno foto-iniziatore, permette la fotoreticolazione.

Il protocollo di sintesi è stato descritto per la prima volta da Van Den Bulcke [26]: la gelatina di tipo B, quindi di origine bovina, è stata disciolta in una soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco a 50°C per 1 ora, in modo tale da ottenere una concentrazione del 10% w/v. Per introdurre i gruppi metacrilato, sono stati aggiunti goccia a goccia 2 mL di anidride metacrilica sotto agitazione continua; sulla base di esperienze precedenti, in questo modo, è stato ottenuto un livello di funzionalizzazione (*Degree of Functionalization, DoF*) pari al 40% [27]. La reazione è durata 2 ore al buio a 40°C sotto agitazione magnetica ed è stata in seguito interrotta diluendo la miscela di reazione con un volume uguale di DPBS.

La soluzione risultante è stata, quindi, dializzata in ddH₂O utilizzando membrane di cellulosa (limite del peso molecolare di 12–14 kDa, Merck D9527) per 2 settimane a 40°C in agitazione magnetica a 200 rpm. Per rimuovere completamente l'anidride metacrilica non reagita, si è provveduto al cambio dell'acqua due volte al giorno.

2.1.2. Sintesi del GelMA-DOPA

Dopo aver sintetizzato il GelMA, si è passati alla funzionalizzazione di quest'ultimo tramite la dopamina; in questo modo, è stato ottenuto il materiale di nostro interesse, ossia il GelMA-DOPA. Nella *Figura 2.2* viene schematizzata la sintesi del GelMA-DOPA.

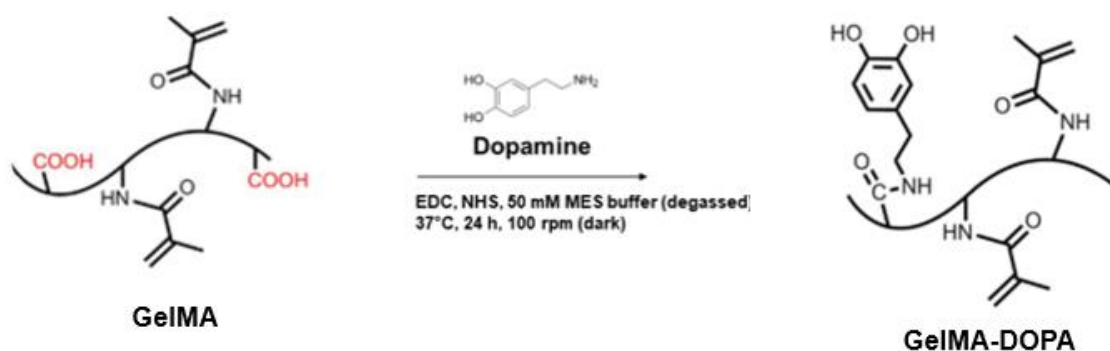


Figura 2.2 Sintesi del GelMA-DOPA [25]

Nello specifico, 1.5 g di GelMA sono stati disciolti in 150 mL di soluzione MES degassata (50 mM) a 37 °C per 30 minuti sotto agitazione magnetica a 200 rpm. Per l'attivazione dei gruppi carbossilici della catena di GelMA, è stata sfruttata la chimica delle carbodiimmidi: alla soluzione sono stati infatti aggiunti EDC (862.6 mg) e NHS (518 mg). Infine, dopo 20 minuti di agitazione magnetica, alla miscela è stato aggiunto dopamina cloridrato (853.4 mg) disciolto in 4.5 mL di soluzione MES (50 mM). La soluzione è quindi stata mantenuta sotto agitazione magnetica a 200 rpm a 37°C e al buio per 24 ore.

Si è poi proseguito dializzando la soluzione, utilizzando delle membrane di cellulosa (limite del peso molecolare di 12 kDa, Merck D9527) per 3 giorni. Nello specifico, i primi due giorni la soluzione è stata dializzata in una soluzione di HCl 0.0001 M, mentre il terzo giorno in acqua deionizzata. La dialisi è stata condotta a 37°C sotto agitazione magnetica a 200 rpm e il cambio di soluzione è stato effettuato ogni 24 ore. [28]

2.1.3. Formulazioni di GelMA e GelMA-DOPA

Le formulazioni fotoreticolabili di GelMA e GelMA-DOPA sono state preparate solubilizzando i materiali in acqua deionizzata con una concentrazione di 15% w/v. Per fare avvenire la fotoreticolazione, è stato aggiunto un fotoiniziatore, il TPO-SDS, con concentrazione 0.75% w/v. Per assicurare una completa omogenizzazione delle formulazioni, le soluzioni sono state poste in sonicatore a 45°C per 30 minuti.

2.2. Caratterizzazione del materiale

Dopo aver sintetizzato il materiale, si è passati alla caratterizzazione dello stesso, in modo tale da verificare la corretta riuscita della sintesi e analizzarne le proprietà chimiche.

2.2.1. Spettroscopia IR

La spettroscopia infrarossa o spettroscopia IR è una tecnica spettroscopica di assorbimento normalmente utilizzata per lo studio dei legami chimici. Si basa sul principio secondo cui viene ottenuto un parziale assorbimento della radiazione infrarossa irraggiata sul materiale in analisi quando questo presenta uno specifico legame: questo accade perché i fotoni della radiazione portano a stati di vibrazione caratteristici del legame chimico eccitato, causando l'assorbimento.

In questo modo, si ottengono informazioni circa la presenza o assenza di specifici gruppi funzionali all'interno di una molecola analizzando lo spettro di assorbimento, andando a valutare la lunghezza d'onda in corrispondenza dei picchi e la relativa area sottesa.

Per effettuare l'analisi, è stato utilizzato lo spettrometro FT-IR Nicolet iS50 in modalità ATR. Il *range* di numeri d'onda scelto è stato 4000-550 cm^{-1} . Gli spettri sono stati poi analizzati utilizzando il *software Omnic*.

In questo lavoro di Tesi, la spettroscopia IR è stata utilizzata per valutare la presenza di dopamina all'interno della struttura del GelMA-DOPA sintetizzato; in particolare, si è andati alla ricerca di questi picchi caratteristici:

- 870 cm^{-1} : gruppi catecolo
- 932 cm^{-1} : anelli benzenici della dopamina
- 1018 cm^{-1} : anelli benzenici della dopamina

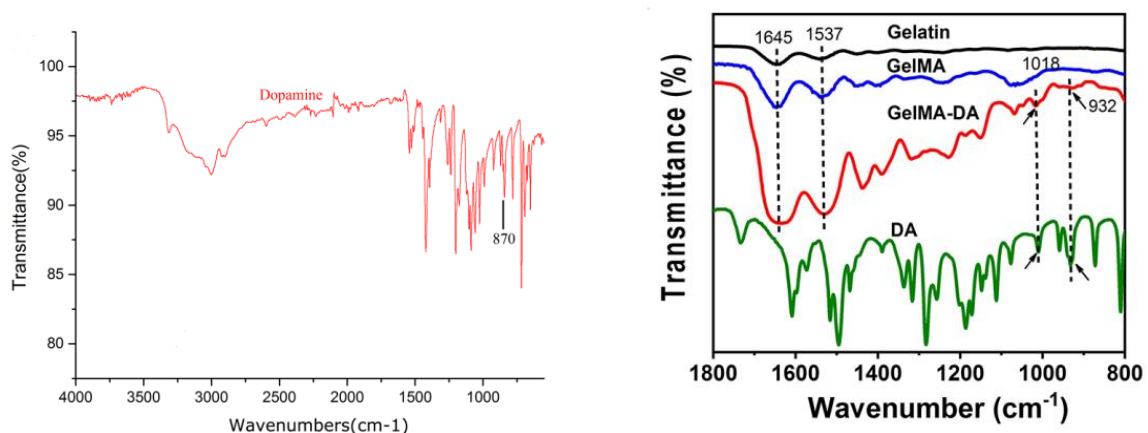


Figura 2.3 Spettri IR caratteristici della dopamina [29], [30]

I materiali analizzati sono stati la dopamina, la gelatina di tipo B utilizzata per la sintesi, il GelMA e il GelMA-DOPA liofilizzati.

2.2.2. Spettroscopia $^1\text{H-NMR}$

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare, detta anche spettroscopia $^1\text{H-NMR}$, è una tecnica analitica utilizzata per determinare la struttura molecolare e la composizione chimica di un campione.

Essa permette di analizzare il comportamento degli spin dei nuclei componenti il campione in analisi in presenza di un forte campo magnetico. Quello che si verifica è l'assorbimento nel campione di precise radiofrequenze da parte di specifici nuclei dopo aver applicato un campo magnetico esterno stazionario e un campo magnetico variabile. L'energia assorbita, dopo aver promosso una transizione di spin dei nuclei, viene poi riemessa, rilevata e riportata su uno spettro $^1\text{H-NMR}$.

Lo spettrofotometro utilizzato è il Bruker Avance III HD, il *chemical shift* (δ) è fornito in ppm e l'analisi è stata effettuata in dimetilsolfossido (DMSO).

Anche la spettroscopia $^1\text{H-NMR}$, come la spettroscopia IR, è stata utilizzata per verificare l'avvenuta funzionalizzazione con dopamina del GelMA-DOPA sintetizzato. Nello specifico, si è andati a esaminare la presenza di picchi nella regione caratteristica delle catene aromatiche (6.5-7.0 ppm).

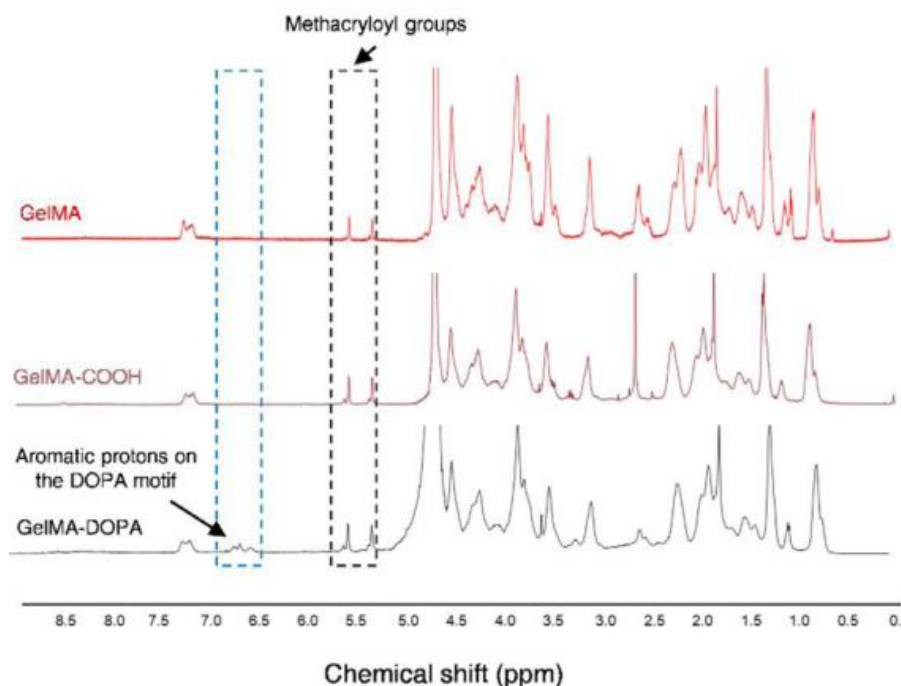


Figura 2.4 Spettri $^1\text{H-NMR}$ GelMA e GelMA-DOPA [31]

2.2.3. Spettroscopia UV-VIS

La spettroscopia UV-VIS è un'analisi spettroscopica che sfrutta l'assorbimento di radiazioni delle lunghezze d'onda appartenenti al campo dell'UV (da 200 a 400 nm) e del visibile (da 400 a 800 nm) per valutare la presenza e la quantità di molecole o gruppi funzionali all'interno del campione oggetto d'analisi. L'assorbimento del fotone ultravioletto o visibile porta infatti all'eccitazione dello stato elettronico della materia, che verrà tradotta nella presenza di picchi di altezza variabile – proporzionale all'intensità dell'assorbimento stesso – a determinate lunghezze d'onda nello spettro.

L'assorbimento determinato dalla transizione elettronica ottenuta a seguito dell'irraggiamento segue la legge di Lambert-Beer:

$$\log \frac{I_0}{I} = A = \epsilon lc$$

Dove:

- I_0 è l'intensità del raggio incidente;
- I è l'intensità del raggio trasmesso;
- A è l'assorbimento;
- ϵ è il coefficiente di assorbimento molare caratteristico del materiale in analisi;
- l è il cammino ottico percorso dalla radiazione;
- c è la concentrazione molare della soluzione.

Lo strumento utilizzato è lo spettrofotometro Cary 5000 e l'analisi è stata condotta valutando l'assorbimento tra 200 e 500 nm. Le formulazioni di GelMA e GelMA-DOPA oggetto d'analisi sono state preparate con una concentrazione di 2 mg/mL in acqua deionizzata.

Come per le due prove di spettroscopia già discusse, anche questa analisi è stata condotta per verificare la presenza della dopamina all'interno del nostro prodotto di sintesi; nello specifico, si è andati a ricercare la presenza di un picco a 280 nm, caratteristico dei gruppi catecolo.

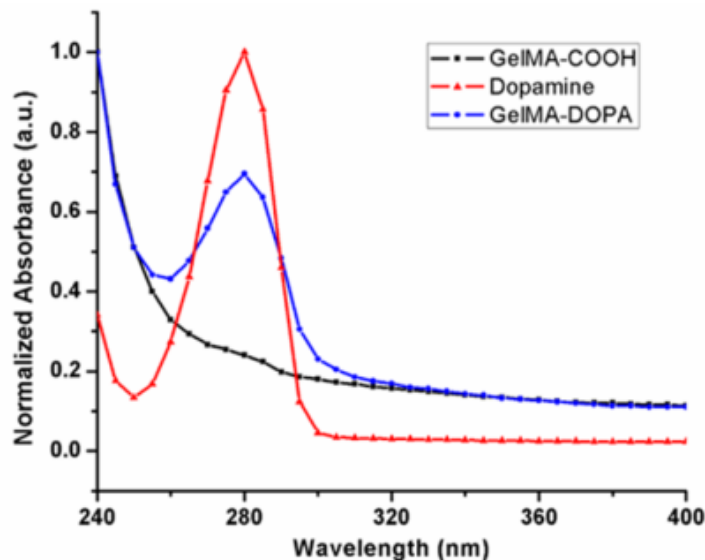


Figura 2.5 Spettro UV dopamina e GelMA-DOPA [17]

Inoltre, essendo la spettroscopia UV-VIS un'analisi quantitativa oltre che qualitativa, tramite la costruzione di una retta di calibrazione ottenuta analizzando diverse concentrazioni di dopamina (1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM, 0.125 mM, 0.0625 mM) e tramite lo spettro ottenuto dall'analisi, è stato possibile valutare la quantità di dopamina presente nel campione e, di conseguenza, la quantità di dopamina aggraffata al GelMA-DOPA in seguito alla funzionalizzazione. [17]

2.2.4. Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Il microscopio elettronico a scansione, o SEM, è uno strumento comunemente utilizzato per tecniche di imaging ad alta risoluzione che sfrutta l'interazione tra un fascio di elettroni e gli atomi che compongono il campione; quest'ultima porta all'emissione di elettroni che producono segnali rilevati dal detector dello strumento e utilizzati per generare le immagini.

Esso permette di ottenere informazioni di carattere morfologico e strutturale e, nel nostro caso, è stato utilizzato per valutare le eventuali differenze tra i campioni di GelMA e GelMA-DOPA liofilizzati. [32]

Il microscopio utilizzato per l'analisi è il Phenom ProX Desktop SEM.

2.2.5. Fotoreologia

La fotoreologia è una disciplina che permette lo studio dei cambiamenti del comportamento viscoelastico dei materiali in seguito all'esposizione degli stessi a una fonte luminosa, tra cui ad esempio la luce UV. Tramite analisi fotoreologiche è quindi possibile ottenere informazioni relative al tempo di reticolazione della formulazione, alla sua velocità di polimerizzazione e all'andamento dei moduli conservativo (G') e dissipativo (G'').

G' e G'' descrivono il comportamento viscoelastico di un materiale polimerico: più nello specifico, G' dà informazioni sul comportamento elastico del materiale a seguito di una deformazione, mentre G'' dà informazioni su quello viscoso. Quando il modulo viscoso G'' supera il modulo elastico G' , il materiale si trova nel suo stato liquido, mentre, al contrario, se G' supera G'' il materiale è un solido. Dai grafici ottenuti dalle prove di fotoreologia è quindi possibile ottenere informazioni circa lo stato del materiale, ma anche informazioni relative al cambiamento dello stesso, ad esempio a seguito di una reticolazione post esposizione a radiazione luminosa. Come accennato in precedenza, infatti, è possibile determinare il momento in cui G' supera G'' (*gel point* o *t gel*) e anche la velocità con cui la formulazione in analisi reticola a seguito dell'irraggiamento (*delay time*), rappresentata dalla pendenza delle curve dei moduli. La prova che si effettua per ricavare queste informazioni prende il nome di *Time Sweep Test* e permette di valutare, ad ampiezza e frequenza costante dell'oscillazione imposta al campione, la sua cinetica di reticolazione nel tempo.

Prima di poter effettuare delle prove di *Time Sweep*, è necessario possedere un'informazione preliminare ottenuta tramite una prova che prende il nome di *Amplitude Sweep Test*. Essa permette di determinare la regione di viscoelasticità lineare (LVE) della formulazione testata, definita come *range* all'interno del quale, al variare dell'ampiezza delle oscillazioni sinusoidali a cui il materiale viene sottoposto, il logaritmo dei moduli si mantiene costante: questo dà informazioni circa la resistenza alle deformazioni del campione. In particolare, esisterà un valore di ampiezza dell'oscillazione, identificato come γ_L , che indicherà il limite di resistenza meccanica del materiale rispetto alle sollecitazioni applicate. Nella *Figura 2.6* è possibile notare la rappresentazione grafica del fenomeno appena descritto. [33]

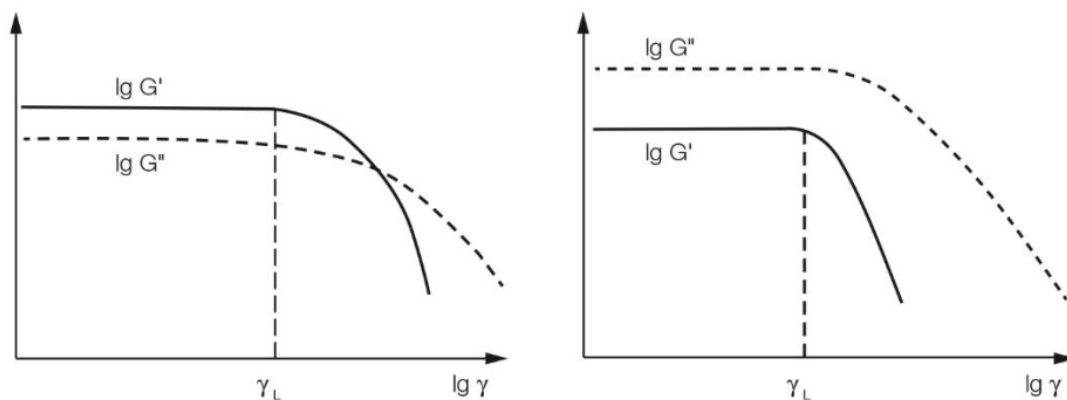


Figura 2.6 Curve d'esempio di Amplitude Sweep Test

I parametri utilizzati per effettuare il test di *Amplitude Sweep* sono riportati nella *Tabella 2.1*.

Distanza tra i piatti [μm]	200
Range ampiezza di oscillazione [%]	0.01-500
Frequenza di oscillazione [Hz]	1
Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]	25
Numero di misure [-]	20

Tabella 2.1 Parametri Amplitude Sweep Test

La regione LVE corrisponde quindi al tratto di deformazioni per cui è possibile dire che il campione viene sollecitato in maniera elastica e non distruttiva: per questo motivo, conoscendo questo *range*, è possibile scegliere il valore di oscillazione ideale, appartenente alla suddetta regione di linearità, per effettuare le successive prove di fotoreologia, che vengono svolte invece ad un valore di oscillazione costante. Se ci si dovesse trovare al di fuori della regione LVE, infatti, si andrebbe sicuramente incontro alla rottura del network polimerico del materiale.

Per le prove è stato utilizzato il reometro Anton Paar MCR 302 con configurazione di tipo piatto-piatto (diametro del piatto 25 mm) e la lampada UV Hamamatsu LC8. Il piatto inferiore del reometro era costituito di quarzo in modo da permettere il passaggio della radiazione UV.

Nella *Figura 2.7* si può osservare la configurazione del reometro utilizzata per le prove di fotoreologia. [34]

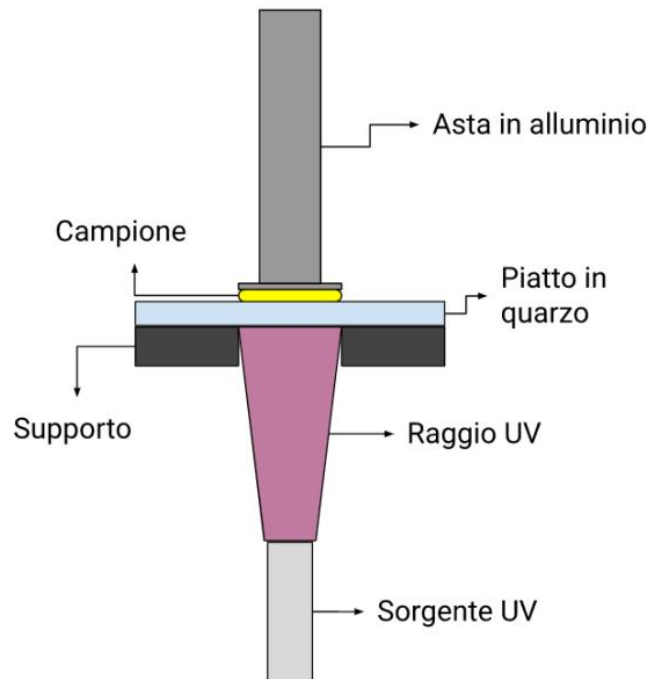


Figura 2.7 Configurazione reometro per prove di fotoreologia

I parametri utilizzati per effettuare le prove di fotoreologia sono riportati nella *Tabella 2.2*.

Distanza tra i piatti [μm]	200
Ampiezza di oscillazione [%]	25
Frequenza di oscillazione [Hz]	1
Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]	25
Istante accensione lampada UV [s]	30

Tabella 2.2 Parametri prove di fotoreologia

La prova di *Time Sweep* viene effettuata seguendo tre passaggi:

1. Monitoraggio dell'andamento dei moduli G' e G'' ;
2. Accensione della lampada UV;
3. Monitoraggio dell'andamento dei moduli G' e G'' fino al raggiungimento di un *plateau*.

Un ulteriore test che permette di valutare l'andamento di G' e G'' è il *Frequency Sweep*: si tratta di un test condotto ad oscillazione con ampiezza costante (appartenente alla regione LVE) e frequenza variabile.

I parametri utilizzati per effettuare il test di *Frequency Sweep* sono riportati nella *Tabella 2.3*.

Distanza tra i piatti [μm]	200
Ampiezza di oscillazione [%]	25
Range frequenza di oscillazione [Hz]	0.1-100
Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]	25

Tabella 2.3 Parametri Frequency Sweep Test

Le prove di fotoreologia sono state effettuate su formulazioni di GelMA e GelMA-DOPA in modo tale da poter effettuare un confronto tra i due materiali. Le formulazioni analizzate erano soluzioni acquose di GelMA e GelMA-DOPA con concentrazione 15% w/v e, come fotoiniziatore, è stato utilizzato il TPO-SDS con concentrazione 0.75% w/v. Per assicurare una completa omogenizzazione delle formulazioni, le soluzioni sono state poste in sonicatore a 45 $^{\circ}\text{C}$ per 30 minuti. Le prove sono state condotte gocciolando 7-8 gocce di formulazione sul piatto inferiore del reometro.

2.2.6. Test di reticolazione

Per ottimizzare l'ottenimento dei campioni di idrogel, sono stati condotti dei test di reticolazione. In particolare, queste prove hanno avuto l'obiettivo di determinare le tempistiche ottimali di irraggiamento UV sulle formulazioni in analisi. Sono quindi stati condotti dei test a diversi tempi di reticolazione: nello specifico, i campioni sono stati irraggiati per 1, 3 e 5 minuti.

Le formulazioni di GelMA e GelMA-DOPA utilizzate per queste prove erano soluzioni acquose al 15% w/v con aggiunta di TPO-SDS con concentrazione 0.75% w/v come foto-iniziatore. Per assicurare una completa omogenizzazione delle formulazioni, le soluzioni sono state poste in sonicatore a 45°C per 30 minuti prima dell'esposizione alla radiazione UV.

Le prove di reticolazione sono state effettuate utilizzando dei *mold* cilindrici in silicone di 10 mm di diametro e 3 mm di spessore, all'interno dei quali sono stati colati 250 μ L di formulazione. La reticolazione è stata indotta dalla lampada UV Hamamatsu LC8 posta ad una distanza dalla superficie del *mold* di 4.4 cm e utilizzata con intensità al 100% pari a 50 mW/cm².

2.2.7. Swelling

Gli idrogeli sono network polimerici 3D idrofilici in grado di assorbire e contenere una considerevole quantità di acqua. L'acqua assorbita dall'idrogelo può essere di due tipologie: acqua libera e acqua legata. L'acqua legata, a differenza dell'acqua libera, ha interazione diretta con le catene del polimero. Quando un idrogelo secco viene posto in acqua, questo inizia a rigonfiare: la prima acqua che interagisce con esso si va a legare con le catene e con le parti idrofiliche e corrisponde all'acqua legata primaria. Rigonfiandosi dopo questo primo passaggio, l'idrogelo inizierà a esporre parti meno idrofiliche, che porteranno altra acqua a legarsi ai gruppi meno idrofilici: in questo caso, si parla di acqua legata secondaria. A questo punto, tutti i gruppi in grado di legarsi con l'acqua arriveranno a saturazione e il resto dell'acqua assorbita viene chiamata libera ed è spinta nell'idrogelo dalla pressione osmotica. Quello che porta la pressione osmotica a opporsi al fenomeno di diluizione infinita che porterebbe allo scioglimento del polimero sono le forze elastiche del network. La pressione osmotica e le forze elastiche, dunque, si bilanciano e ciò che si ottiene è un equilibrio di swelling.

Le prove di swelling sono state dunque effettuate proprio per valutare la capacità degli idrogeli sintetizzati di rigonfiare e inglobare acqua.

I campioni utilizzati per le prove di swelling sono stati ottenuti preparando formulazioni in acqua deionizzata di GelMA e GelMA-DOPA al 15% w/v con aggiunta di TPO-SDS allo 0.75% w/v come foto-iniziatore. Per assicurare una completa omogenizzazione delle formulazioni, le soluzioni sono state sonicate a 45°C per 30 minuti prima dell'esposizione alla radiazione UV. In seguito, si è passati al riempimento di *mold* cilindrici in silicone ($\varnothing = 10$ mm, $h = 3$ mm) con 250 μ L di formulazione e la soluzione è stata irraggiata con la lampada UV Hamamatsu LC8 per 5 minuti, a un'intensità di 50 mW/cm² e a una distanza dalla superficie del *mold* di 4.4 cm.

I campioni sono stati conservati in delle provette Eppendorf da 2 mL e posti in congelatore a -20°C per una notte, per poi essere liofilizzati per le 72 ore successive. Per ogni formulazione si è provveduto a preparare un triplicato dei campioni.

Al termine della liofilizzazione, i campioni sono stati pesati, in modo tale da ottenere il loro peso iniziale w_0 , e in seguito sono stati immersi in 6 mL di PBS e posti in una piastra basculante per 24 ore.

Passate le 24 ore, i campioni sono stati recuperati, tamponati per eliminare l'acqua in eccesso posta sulla loro superficie e pesati nuovamente.

Da queste prove, è stato possibile ricavare la percentuale di rigonfiamento degli idrogeli in analisi attraverso la seguente formula:

$$SW (\%) = \left(\frac{w}{w_0} - 1 \right) \cdot 100$$

Dove:

- $SW (\%)$ corrisponde alla percentuale di rigonfiamento dei campioni
- w corrisponde al peso del campione dopo il rigonfiamento
- w_0 corrisponde al peso iniziale del campione liofilizzato

2.2.8. %gel

Questa analisi viene effettuata in modo tale da verificare la presenza di legami chimici degradabili, legami fisici non stabili oppure di una densità di reticolazione bassa che porta le catene dell'idrogelo non legate a essere rilasciate nel tempo, se immerse in mezzo acquoso.

I campioni utilizzati per le prove di %gel sono stati ottenuti preparando formulazioni in acqua deionizzata di GelMA e GelMA-DOPA al 15% w/v utilizzando il TPO-SDS allo 0.75% w/v come foto-iniziatore. Per assicurare una completa omogenizzazione delle formulazioni, le soluzioni sono state messe a sonicare a 45°C per 30 minuti prima dell'esposizione alla radiazione UV. In seguito, i *modali* cilindrici in silicone ($\varnothing = 10$ mm, $h = 3$ mm) sono stati riempiti con 250 μ L di formulazione e la soluzione è stata irraggiata con la lampada UV Hamamatsu LC8 per 5 minuti, a un'intensità di 50 mW/cm² e a una distanza dalla superficie del *mold* di 4.4 cm. Per ogni formulazione si è provveduto a preparare un triplicato dei campioni.

I campioni sono stati conservati in delle provette Eppendorf da 2 mL a -20°C per una notte, per poi essere liofilizzati per le 72 ore successive. Al termine della liofilizzazione, i campioni sono stati pesati, in modo tale da ottenere il loro peso iniziale w_0 .

In seguito, si è provveduto all'immersione degli stessi in 6 mL di PBS per 48 ore sotto agitazione continua tramite utilizzo di una piastra basculante.

Infine, i campioni sono stati recuperati, liofilizzati per 72 ore e nuovamente pesati.

Dalla prova, è possibile ricavare la percentuale di perdita di peso dell'idrogelo definita come:

$$Gel\ Fraction\ (\%) = \left(\frac{w}{w_0} \right) \cdot 100$$

Dove:

- *Gel Fraction (%)* corrisponde alla percentuale di perdita di peso dell'idrogelo
- w corrisponde al peso del campione dopo la seconda liofilizzazione
- w_0 corrisponde al peso iniziale del campione liofilizzato

2.2.9. Degradazione enzimatica

I campioni di idrogelo di GelMA e GelMA-DOPA sono stati sottoposti a delle prove di degradazione enzimatica per valutare il loro comportamento a seguito dell'esposizione all'enzima collagenasi.

Gli idrogeli per questa prova sono stati ottenuti da formulazioni di GelMA e GelMA-DOPA al 15% w/v in acqua deionizzata con foto-iniziatore TPO-SDS allo 0.75% w/v. Per omogeneizzare le formulazioni, queste sono state sonicate a 45°C per 30 minuti. I *modali* cilindrici in silicone ($\varnothing = 10$ mm, $h = 3$ mm) sono stati in seguito riempiti con 200 μ L di formulazione e la soluzione è stata irraggiata con la lampada UV Hamamatsu LC8 per 5 minuti, a un'intensità di 50 mW/cm² e a una distanza dalla superficie del *modali* di 4.4 cm. Per ogni formulazione si è provveduto a preparare un triplicato dei campioni.

I campioni sono stati trasferiti in provette Eppendorf da 2 mL e conservati a -20°C per una notte, per poi essere liofilizzati per le 72 ore successive. Al termine della liofilizzazione, i campioni sono stati pesati, in modo tale da ottenere il loro peso iniziale w_0 .

In seguito, si è provveduto all'immersione degli stessi in 6 mL di PBS per 24 ore sotto agitazione in modo tale da permettere loro di raggiungere il loro equilibrio di rigonfiamento e,

successivamente, ciascun campione rigonfiato è stato trasferito in 1.5 mL di PBS contenente l'enzima collagenasi di tipo XI a concentrazione 0.75 U/mL e conservato a 37°C.

Per verificare l'andamento nel tempo della degradazione, i campioni sono stati mantenuti nella soluzione enzimatica per intervalli di tempo differenti: 0h, 4h, 8h, 24h. Al termine del *time step* prestabilito, i campioni sono stati recuperati, liofilizzati per 72 ore e infine nuovamente pesati.

Il test dà come risultato il peso residuo percentuale degli idrogeli oggetto d'analisi, calcolato tramite la formula:

$$RW (\%) = \left(\frac{w}{w_0} \right) \cdot 100$$

Dove:

- $RW (\%)$ corrisponde alla perdita di peso percentuale dell'idrogelo dovuta alla degradazione operata dall'enzima
- w corrisponde al peso del campione degradato
- w_0 corrisponde al peso iniziale del campione liofilizzato

2.2.10. Stabilità nel tempo

Per valutare la stabilità dei prodotti di sintesi, si è pensato di osservare il comportamento nel tempo dei materiali sia sotto forma di campione liofilizzato che sotto forma di idrogelo reticolato.

I campioni sono stati conservati in *vial* sigillati da Parafilm per evitare l'eccessiva esposizione all'aria.

2.2.11. Test di adesione

Come già descritto nell'Introduzione al paragrafo 1.2.3., la funzionalizzazione del GelMA con la dopamina è stata effettuata per conferire proprietà adesive agli idrogeli tramite l'introduzione di gruppi catecolo nella struttura del polimero. Per valutare l'adesione degli idrogeli a substrati di diversa natura, si è pensato di effettuare dei *lap-shear test* usufruendo di una macchina a trazione Z5 a colonna singola con cella di carico da 500 N.

Una prima prova è stata effettuata valutando l'adesione di idrogeli di GelMA e GelMA-DOPA a dei vetrini da laboratorio. Le formulazioni utilizzate erano soluzioni acquose di GelMA e

GelMA-DOPA al 15% w/v con TPO-SDS al 0.75% w/v come foto-iniziatore. Per assicurare una completa omogenizzazione delle formulazioni, le soluzioni sono state sonicate a 45°C per 30 minuti prima dell'esposizione alla radiazione UV.

20 µL di formulazione sono stati colati grazie all'ausilio di una micropipetta sulla superficie di un vetrino e un secondo vetrino è stato poi messo a contatto della stessa formulazione andando a creare un'area sovrapposta di 2.5 x 4 cm². Il campione è stato infine irraggiato tramite lampada UV Hamamatsu LC8 per 5 minuti, a una distanza dalla superficie del secondo vetrino di 9.4 cm. Nella *Figura 2.8* è possibile notare la configurazione del campione. [17]

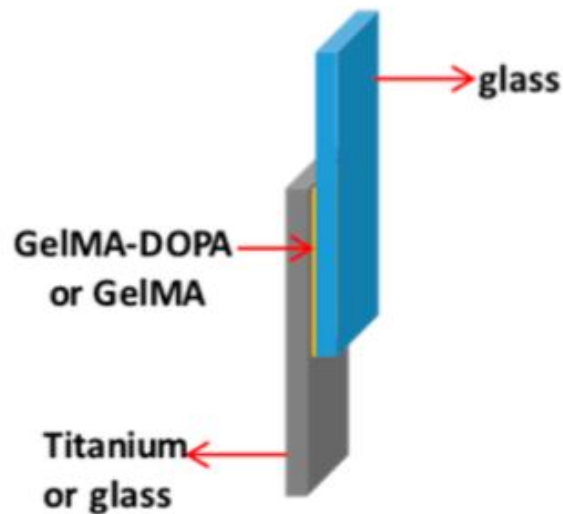


Figura 2.8 Configurazione campione vetrino – vetrino

I campioni sono stati prodotti in triplicato e posizionati sulla macchina a trazione come mostrato in *Figura 2.9*.



Figura 2.9 Configurazione macchina a trazione – campione

I parametri scelti per il *tensile test* sono riportati nella *Tabella 2.4*.

Speed [mm/min]	1
Maximum displacement [mm]	20
Maximum load [N]	400
Preload [N]	0
Breaking force [N]	300

Tabella 2.4 Parametri tensile test per campioni preparati con vetrino

In seguito, si è deciso di verificare l'adesione a un secondo tipo di substrato, ossia della pelle porcina. Le formulazioni utilizzate sono state le stesse citate per le precedenti prove su vetrino. In questo caso, 50 μL di formulazione sono stati colati grazie all'ausilio di una micropipetta sulla superficie di un vetrino e un campione di pelle porcina ($2.5 \times 4 \text{ cm}^2$) è stato posto a contatto con la formulazione creando un'area di sovrapposizione di $2.5 \times 2.5 \text{ cm}^2$. Il campione è stato irraggiato dalla parte del vetrino per permettere il passaggio della radiazione luminosa tramite lampada UV Hamamatsu LC8 per 5 minuti, a una distanza dalla superficie del vetrino di 9.4 cm e sottoponendolo a un peso di 110 g per favorire una maggiore aderenza tra i due substrati e cercare di garantire una migliore uniformità del film di formulazione sull'area predisposta al test. Nella *Figura 2.10* è possibile notare la configurazione del campione [35], mentre nella *Figura 2.11* esempi di campioni realizzati.

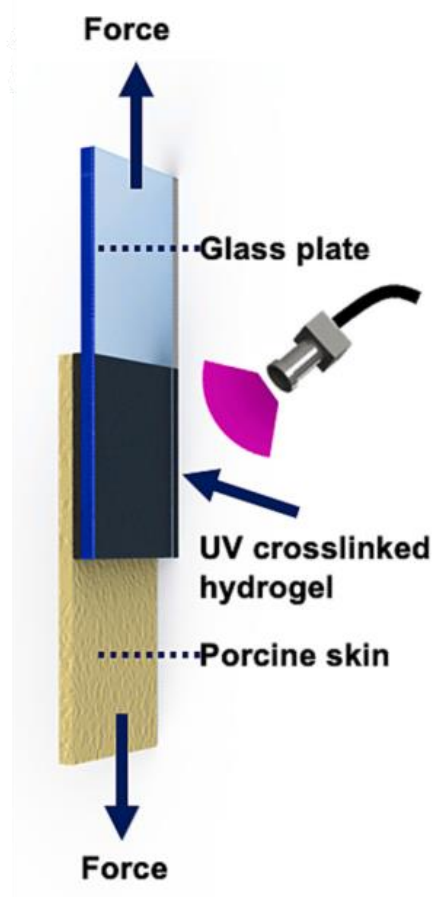


Figura 2.10 Configurazione campione vetrino – pelle porcina

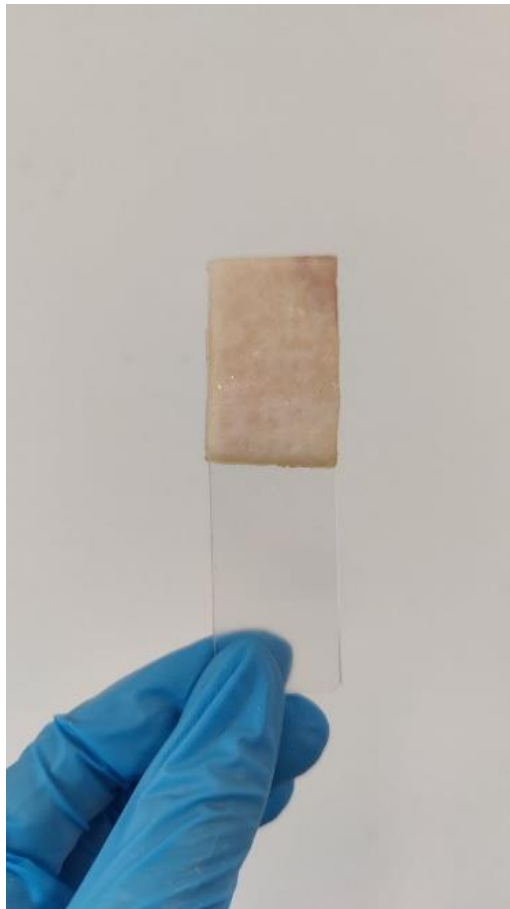
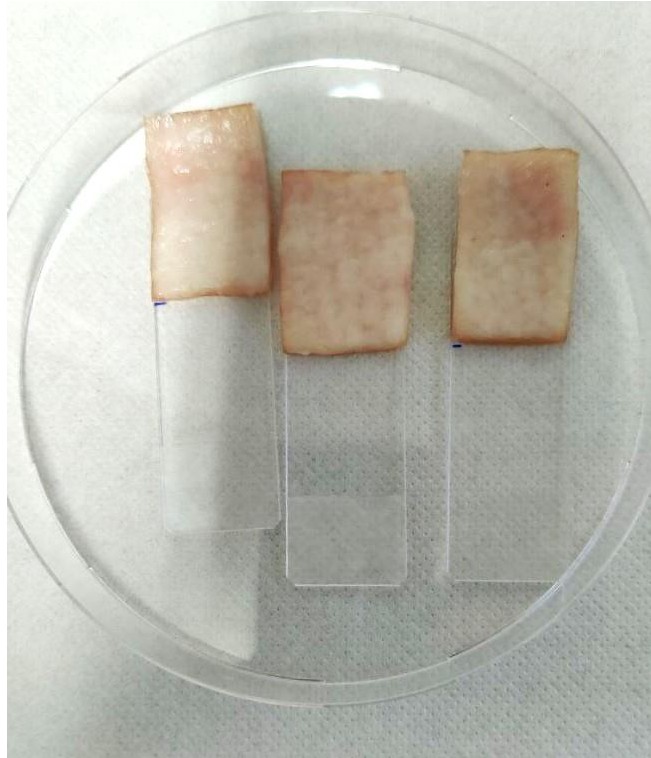


Figura 2.11 Campioni vetrino – pelle porcina

I campioni sono stati prodotti in triplicato e posizionati sulla macchina a trazione come mostrato in *Figura 2.12*.

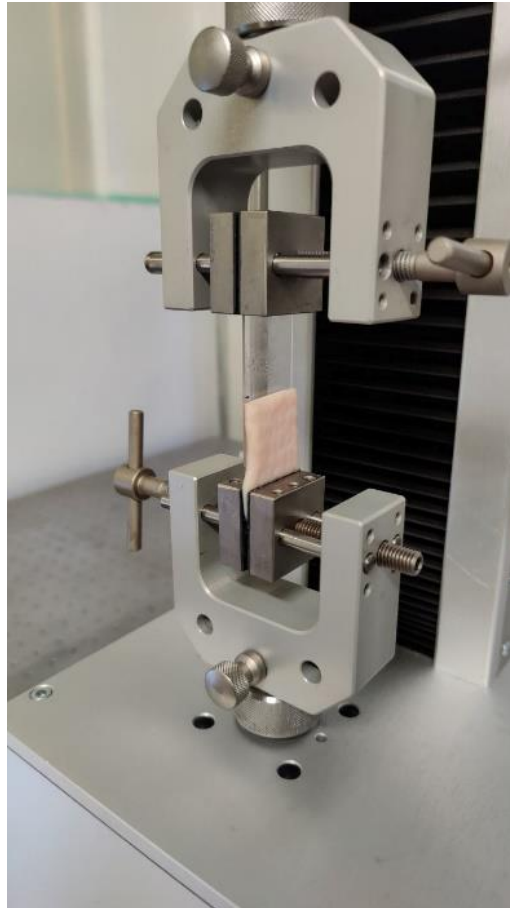


Figura 2.12 Configurazione macchina a trazione – campione

I parametri scelti per il *tensile test* sono riportati nella *Tabella 2.5*.

Speed [mm/min]	5
Maximum displacement [mm]	20
Maximum load [N]	400
Preload [N]	0
Breaking force [N]	300

Tabella 2.5 Parametri tensile test per campioni preparati con pelle porcina

2.2.12. Stampa 3D

Per valutare se la formulazione prodotta fosse adatta anche a processi di stampa 3D, è stato effettuato un *material test* utilizzando la stampante *Asiga MAX UVX27*, prodotta dall'azienda *Asiga* e mostrata nella *Figura 2.13*. [36]



Figura 2.13 Asiga MAX UVX27

La stampante sfrutta la tecnologia DLP (*Digital Light Processing*), che consiste nell'utilizzo di una sorgente di luce LED per la realizzazione di un fotopolimero uno strato per volta partendo da una formulazione liquida. Nel caso specifico della stampante utilizzata per il test, la sorgente luminosa aveva una lunghezza d'onda di 385 nm (*high power UV LED*) e una risoluzione in pixel di 27 μm sul piano x-y. Il *software* utilizzato per l'impostazione del modello e dei parametri di stampa è stato fornito dalla stessa *Asiga* e ha il nome di *Asiga Composer*; tramite esso, è possibile stabilire il modello che si vuole dare al proprio fotopolimero, acquisibile da *file* in vari formati, tra cui STL, SLC, PLY e STM, e selezionare i parametri per ottimizzare il proprio processo di stampa. [36]

Il processo di stampa vede dapprima la disposizione della formulazione sul fondo trasparente di una vaschetta e in seguito l'approccio della piattaforma di stampa a quest'ultima, seguito dall'irraggiamento proveniente dal basso che durerà per il tempo impostato nei parametri. Lo

strato fotopolimerizzato rimarrà adeso alla testa di stampa, motivo per cui, dopo la formazione del primo *layer*, questa si allontanerà dalla vaschetta permettendo alla formulazione liquida di ricompattarsi per poi approcciarla nuovamente e proseguire con la formazione dei *layer* successivi. Al termine della stampa, il fotopolimero dovrà essere staccato delicatamente dalla testa di stampa con l'ausilio di una lametta.

Come accennato in precedenza, la stampante è stata utilizzata per effettuare un *material test* sulle formulazioni di GelMA e GelMA-DOPA già testate precedentemente tramite lampada UV, alle quali è stato però aggiunto il PEGDA 575 per migliorare le caratteristiche di stampabilità del polimero. Nello specifico, le formulazioni acquose sono state preparate utilizzando GelMA e GelMA-DOPA al 15% w/v, TPO-SDS al 0.75% w/v come foto-iniziatore e PEGDA 575 al 0.5% v/v. L'intensità della sorgente luminosa è stata impostata a 30 mW/cm^2 e le prove sono state effettuate a tre diversi tempi di esposizione: 10 secondi, 20 secondi e 30 secondi.

Sono infine state condotte delle prove di fotoreologia sulle formulazioni con aggiunta di PEGDA per valutarne il comportamento e per avere un confronto con quelle preparate senza la sua aggiunta. I parametri utilizzati per effettuare le prove sono riportati nella *Tabella 2.2*.

3. Risultati

In questo capitolo verranno presentati e discussi i risultati delle prove di caratterizzazione descritte nel capitolo precedente.

In primo luogo, verrà validato il protocollo di sintesi utilizzato per funzionalizzare la gelatina con gruppi metacrilati e dopamina.

Successivamente, si porrà l'attenzione sulla fabbricazione di idrogeli tramite processi di fotopolimerizzazione: dalla preparazione e caratterizzazione delle formulazioni a base di gelatina funzionalizzata, allo studio delle proprietà di swelling, %gel, degradazione ed adesione degli idrogeli ottenuti. Le prove sperimentali sono state effettuate mettendo a confronto campioni a base di GelMA-DOPA con campioni a base di GelMA, al fine di valutare i cambiamenti verificatisi a valle della funzionalizzazione con dopamina.

Infine, si farà un accenno a test preliminari di stampa 3D.

3.1. Sintesi e caratterizzazione del materiale

Come descritto nei Paragrafi 2.1.1 e 2.1.2, la sintesi del GelMA-DOPA ha previsto due step: dapprima, la reazione di metacrilazione della gelatina, [26] e, in seguito, la funzionalizzazione della gelatina metacrilata (GelMA) così ottenuta con la dopamina, per sintetizzare il prodotto finale desiderato, ossia il GelMA-DOPA [28].

In seguito al processo di liofilizzazione, il GelMA-DOPA si presenta come un solido soffice, di un colore bianco brillante e di una consistenza molto simile a quella del cotone idrofilo (*Figura 3.1*).



Figura 3.1 GelMA-DOPA liofilizzato

Per verificare l'effettivo aggraffaggio della dopamina al GelMA e, di conseguenza, per confermare la validità del protocollo di sintesi utilizzato per ottenere il GelMA-DOPA, sono state condotte analisi spettroscopiche.

3.1.1. Spettroscopia IR

La spettroscopia IR è stata utilizzata per verificare la presenza di dopamina nella struttura del GelMA-DOPA sintetizzato. A tal fine, è stata eseguita un'analisi spettroscopica preliminare volta all'individuazione dei segnali tipici della catecolammina utilizzata come co-reagente nel protocollo di sintesi sopra descritto. Lo spettro della dopamina è riportato in *Figura 3.2*: il picco a 870 cm^{-1} (in blu) è tipico dei gruppi catecolo [29], mentre i due picchi a 932 cm^{-1} (in verde) e 1018 cm^{-1} (in rosso) sono caratteristici dell'anello benzenico della dopamina [30].

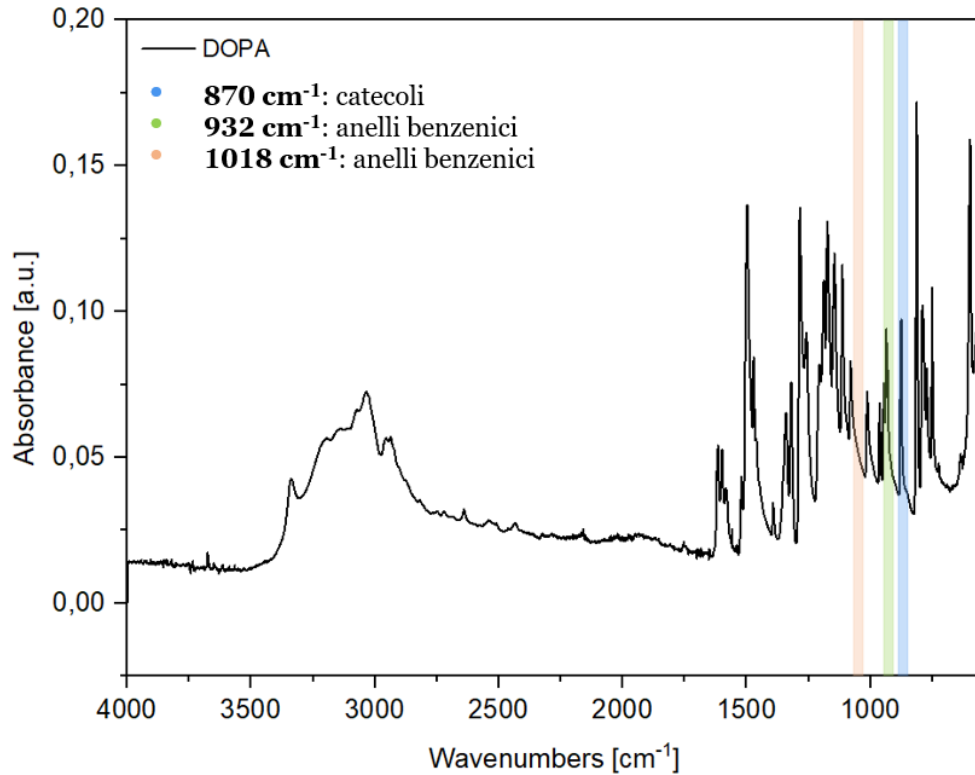


Figura 3.2 Spettro IR della dopamina

In seguito, sono stati messi a confronto gli spettri della gelatina utilizzata per la sintesi, del GelMA e del GelMA-DOPA sintetizzato (*Figura 3.3*). Come mostrato in figura, non è stato possibile confermare la presenza della dopamina lungo la catena del GelMA-DOPA a causa di una sovrapposizione dei picchi caratteristici della catecolammina sopra riportati alcuni picchi della gelatina.

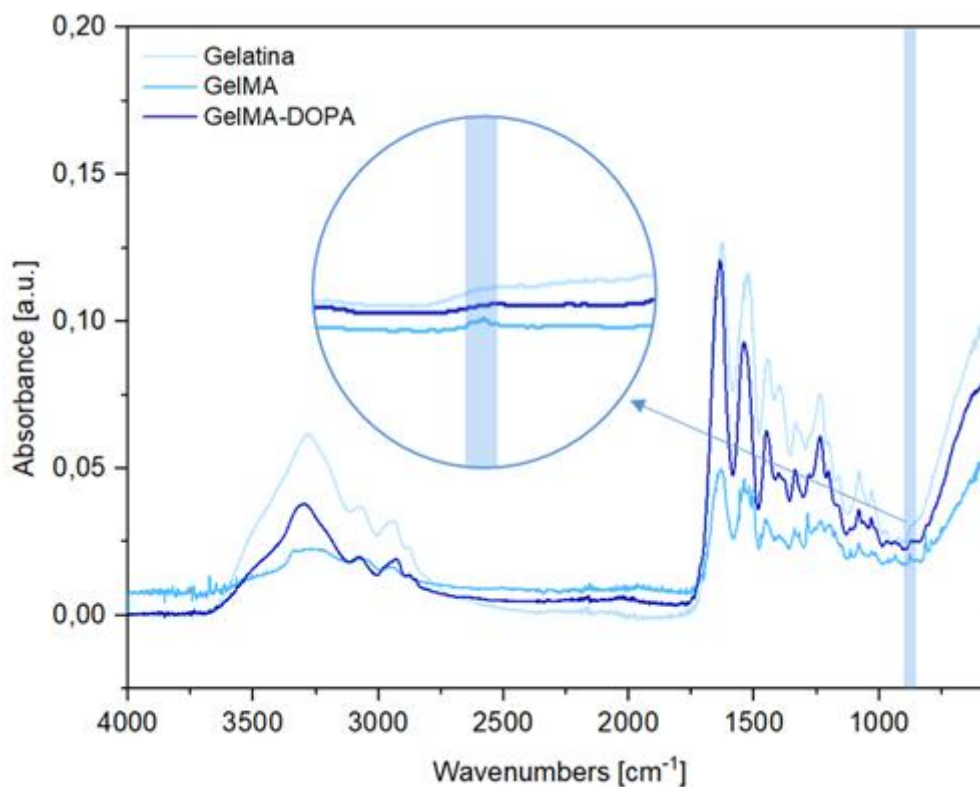


Figura 3.3 Spettri IR di Gelatina, GelMA e GelMA-DOPA

Pertanto, si è reso necessario proseguire con ulteriori analisi spettroscopiche.

3.1.2. Spettroscopia $^1\text{H-NMR}$

L'effettiva funzionalizzazione del GelMA con dopamina è stata successivamente confermata tramite spettroscopia $^1\text{H-NMR}$. Come si può osservare in *Figura 3.4*, in cui si riportano gli spettri $^1\text{H-NMR}$ di GelMA, GelMA-DOPA e dopamina (DOPA), i picchi caratteristici dei protoni aromatici della dopamina sono chiaramente osservabili nello spettro del GelMA-DOPA intorno a 6.5-7.0 ppm. [31]

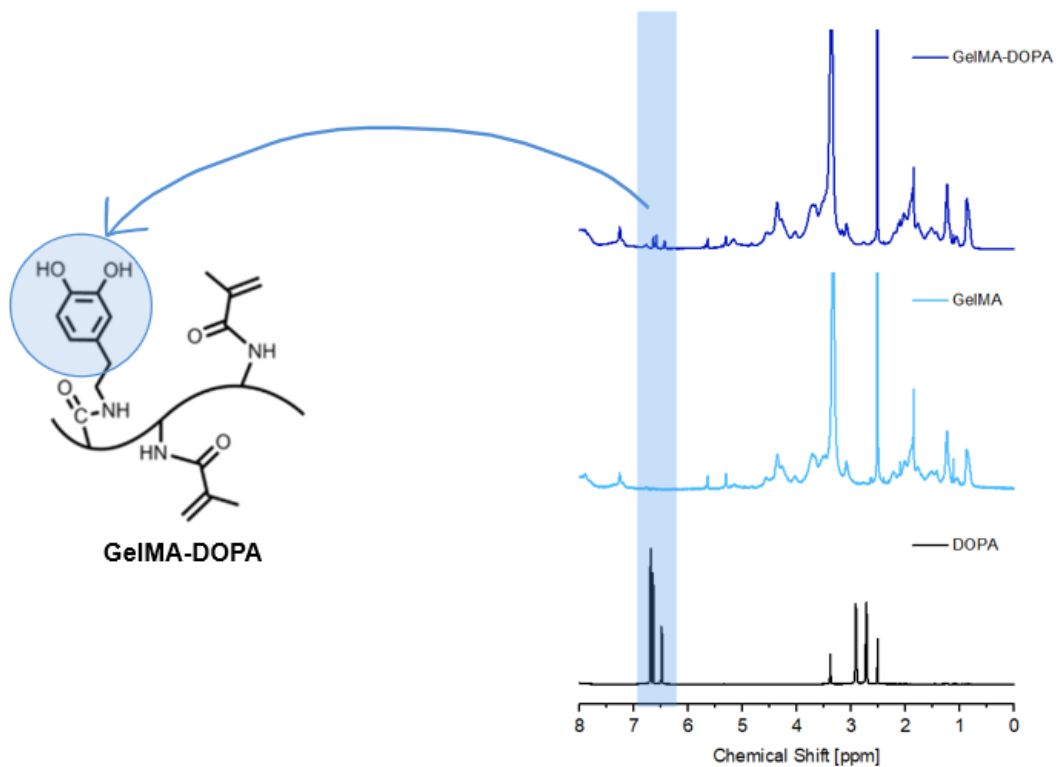


Figura 3.4 Spettri $^1\text{H-NMR}$ di dopamina, GelMA e GelMA-DOPA

Sulla base di tali risultati, è stato dunque possibile convalidare il protocollo di sintesi utilizzato per produrre il GelMA-DOPA.

3.1.3. Spettroscopia UV-VIS

L'effettiva funzionalizzazione del GelMA con dopamina è stata ulteriormente confermata tramite spettroscopia UV-Vis. Infatti, come mostrato in *Figura 3.5*, il tipico picco di assorbimento della dopamina a 280 nm [17], risulta chiaramente evidente nello spettro del GelMA-DOPA.

Tale tecnica spettroscopica è stata però principalmente sfruttata per valutare la quantità di catecolammina effettivamente graffata sulla catena del GelMA.

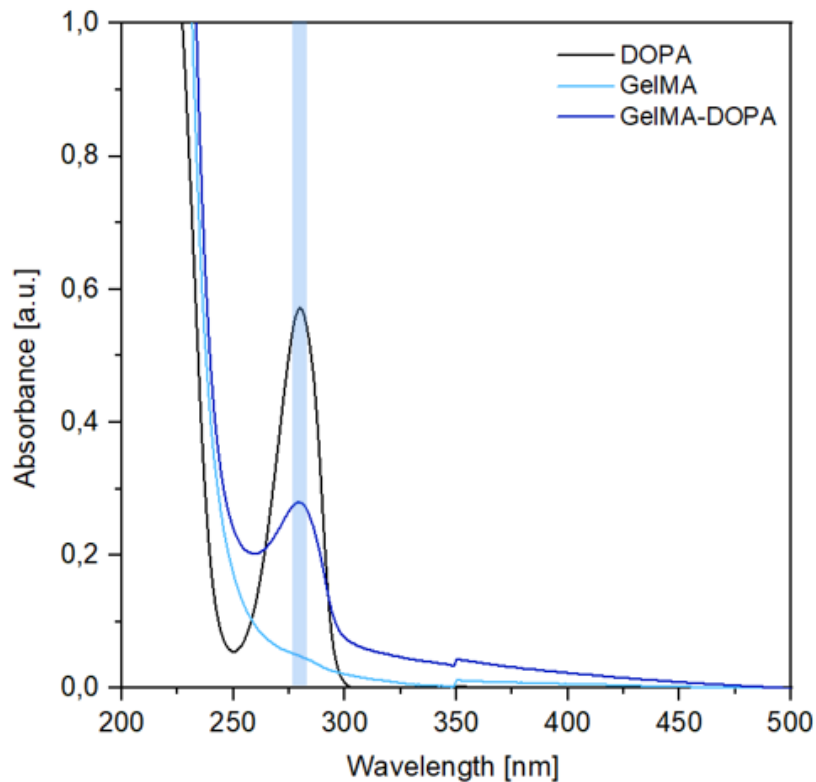


Figura 3.5 Spettri UV-VIS di dopamina, GelMA e GelMA-DOPA

Sulla base di una curva di calibrazione ottenuta da studi spettroscopici preliminari effettuati su soluzioni acquose a concentrazione crescente di dopamina (1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM, 0.125 mM, 0.0625 mM, *Figura 3.6*), è stato infatti possibile calcolare 0.25 millimoli di dopamina per ogni grammo di GelMA-DOPA. Considerando la quantità di dopamina utilizzata per la sintesi, pari a circa 3 millimoli per ogni grammo di GelMA da funzionalizzare, si è potuta stimare con buona approssimazione una percentuale di aggraffaggio pari all'8%.

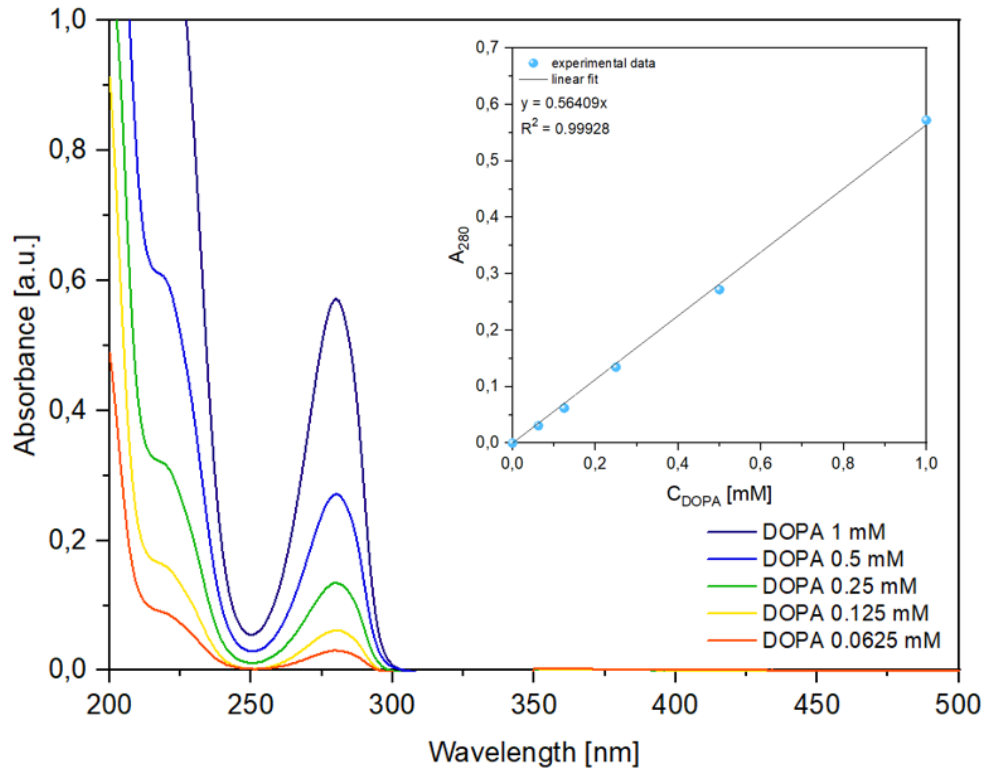


Figura 3.6 Retta di calibrazione

3.2. Preparazione e caratterizzazione degli idrogeli

Le formulazioni fotoreticolabili, utilizzate come precursori per la fabbricazione di idrogeli, di sono state preparate solubilizzando in acqua deionizzata il GelMA-DOPA (15% w/v, concentrazione scelta sulla base di studi precedenti effettuati dal gruppo di ricerca) e aggiungendo come fotoiniziatore idrosolubile il TPO-SDS (0.75% w/v). [37]

A titolo di confronto, sono state preparate formulazioni contenenti GelMA non funzionalizzato con dopamina (Figura 3.7).

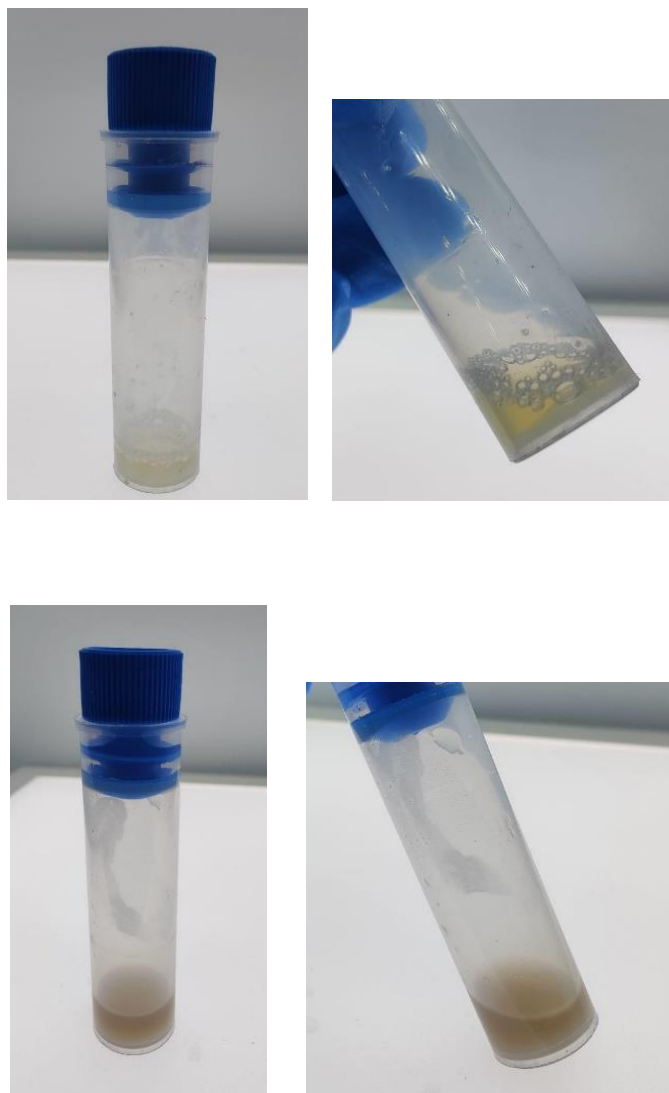


Figura 3.7 Formulazioni di GelMA (in alto) e GelMA-DOPA (in basso)

3.2.1. Prove fotoreologiche

Successivamente, sono state condotte misure di fotoreologia al fine di valutare la reattività delle formulazioni e, in particolare, il tempo di irraggiamento necessario per raggiungere il punto di gelo (gel point) e la velocità di reticolazione.

Innanzitutto, è stata eseguita una misura di *Amplitude Sweep* (Figura 3.8, parametri utilizzati riportati in Tabella 2.1) su una formulazione di GelMA, in modo tale da determinare il valore di deformazione che ci permettesse di lavorare all'interno della regione di viscoelasticità lineare (LVE).

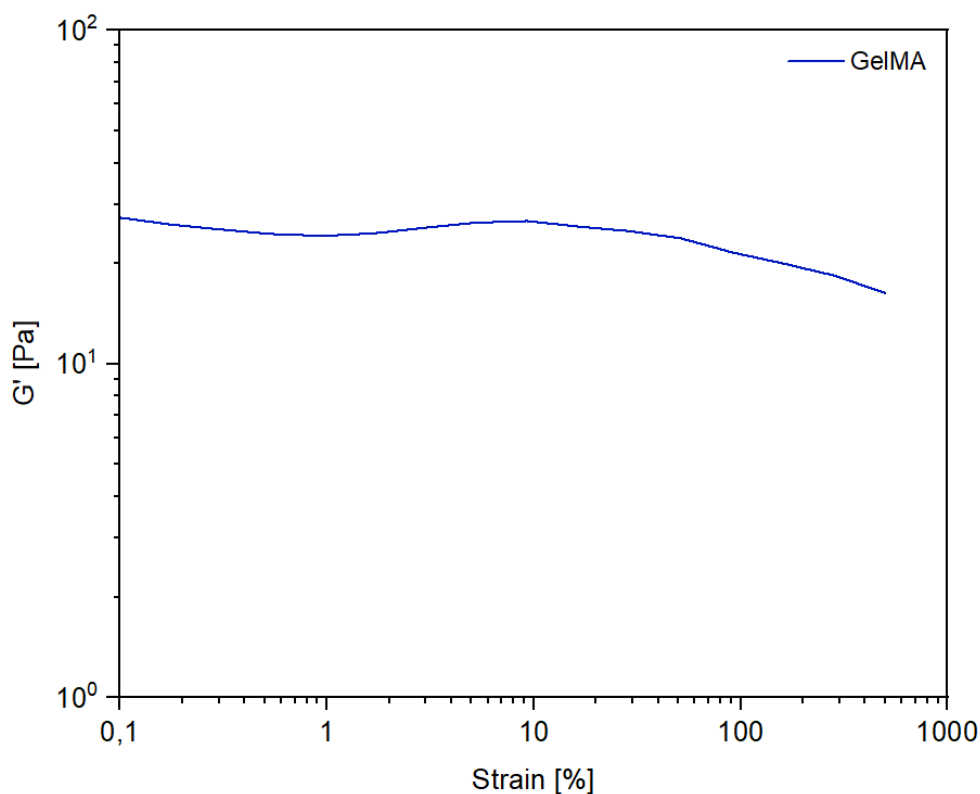


Figura 3.8 Amplitude Sweep Test della formulazione a base di GelMA

Determinato questo valore, pari a circa il 25%, si è quindi passati ai test di fotoreologia (parametri riportati in *Tabella 2.2*), da cui è emerso che le formulazioni di GelMA e GelMA-DOPA presentavano una reattività piuttosto differente. Osservando il grafico in *Figura 3.9*, è possibile constatare come, in seguito all'accensione della lampada UV a 30 s dall'inizio del test, vi sia un netto ritardo nell'attivazione della reazione di fotopolimerizzazione della formulazione contenente GelMA-DOPA rispetto a quella a base di GelMA.

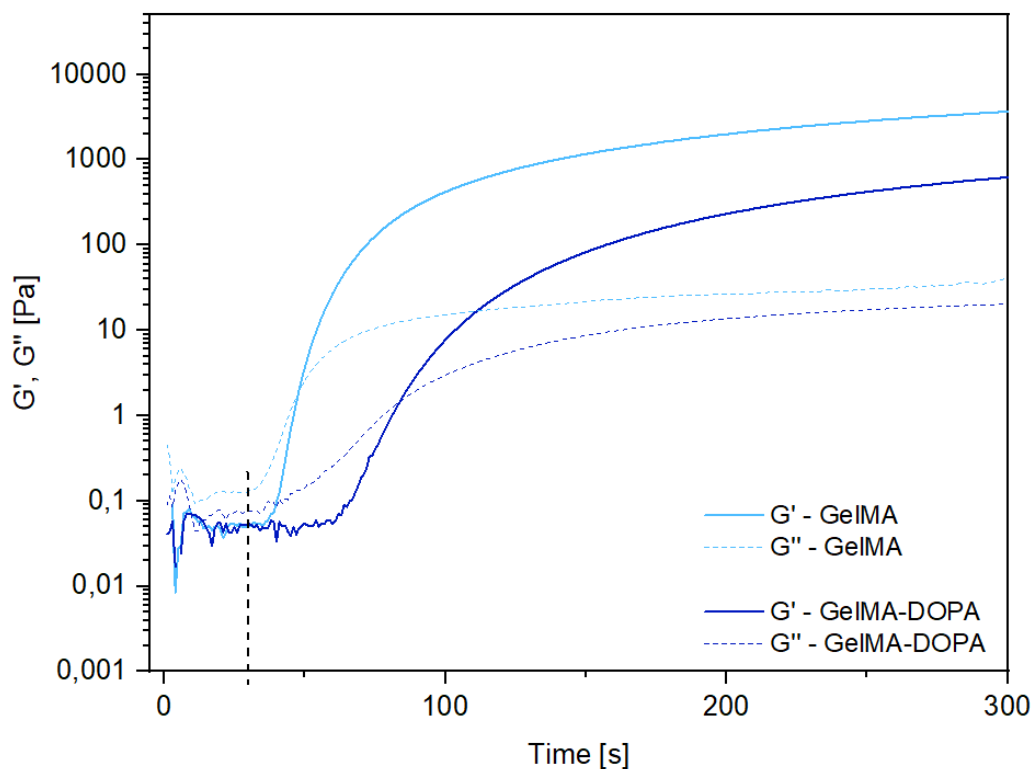


Figura 3.9 Curve fotoreologiche relative a formulazioni a base di GelMA o GelMA-DOPA

Inoltre, il *gel point*, ovvero il punto d'incrocio tra G' e G'' , è stato raggiunto molto più velocemente nel caso della formulazione a base di GelMA (*gel point* = 15 s) rispetto alla formulazione contenente GelMA-DOPA (*gel point* = 56 s). Analogamente, la velocità di reticolazione: di quest'ultima formulazione (0.023 Pa/s) è risultata essere molto più lenta rispetto a quella di GelMA (4.6 Pa/s). Tali differenze in termini di reattività e di cinetica di fotopolimerizzazione possono essere associate a fenomeni di ingombro sterico delle catene di GelMA-DOPA che limitano la mobilità dei macro-radicali generati. Per effetto dell'ingombro sterico provocato dalla presenza dei gruppi catecolo, infatti, i gruppi metacrilato risultano impediti nella reazione: questo si traduce in un effettivo rallentamento nella reticolazione dell'idrogelo. I risultati sopra descritti sono stati riassunti nel grafico riportato in Figura 3.10.

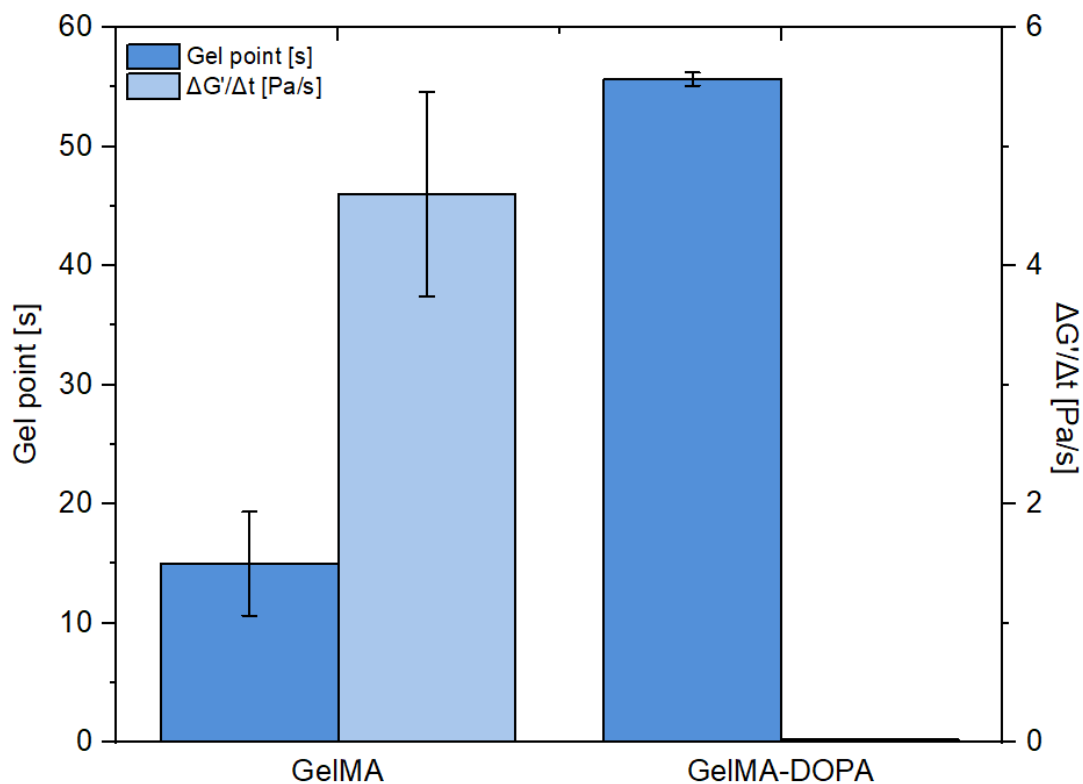


Figura 3.10 Gel point e velocità di reticolazione delle formulazioni a base di GelMA o GelMA-DOPA

In ultimo, a seguito delle misure di fotoreologia e, di conseguenza, su formulazioni già reticolate, è stato effettuato un *Frequency Sweep Test*, utilizzando i parametri mostrati in *Tabella 2.3*, che ha rivelato una differenza tra i valori del modulo elastico degli idrogeli fotopolimerizzati. Il valore di G' della formulazione a base di GelMA-DOPA reticolata risulta difatti inferiore a quello della formulazione contenente GelMA (*Figura 3.11*), il che risulta in linea con quanto osservato nelle curve di G' mostrate in *Figura 3.10*.

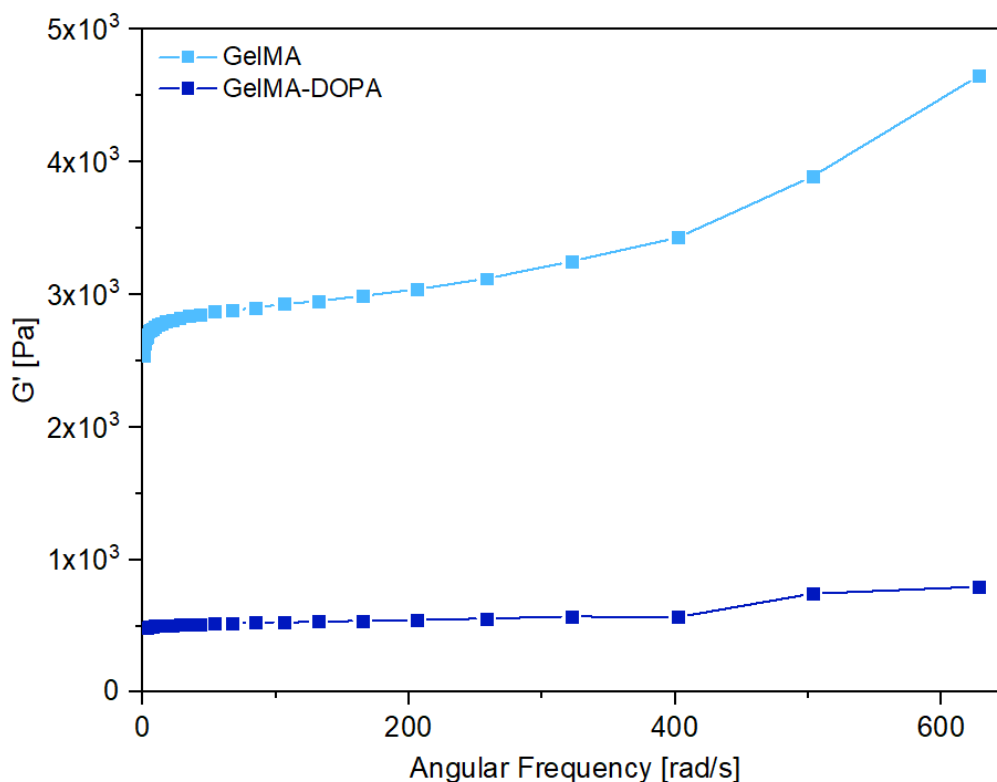


Figura 3.11 Frequency Sweep Test effettuato su idrogeli fotopolimerizzati una volta terminata la misura fotoreologica

3.2.2. Prove di reticolazione

A seguito delle prove fotoreologiche, sono state eseguite prove di reticolazione al fine di stabilire i parametri ottimali di irraggiamento per la fabbricazione di idrogeli tramite fotopolimerizzazione. I test sono stati condotti secondo il metodo descritto al paragrafo 2.2.6.

Le formulazioni a base di GelMA o GelMA-DOPA sono state irraggiate con luce UV per intervalli di tempo crescenti. Si è infatti constatato che, sebbene la formulazione a base di GelMA reticolasse in modo omogeneo anche per tempi di irraggiamento inferiori (es. 1 min), quella di GelMA-DOPA restava per lo più liquida. Si è reso pertanto necessario aumentare il tempo di esposizione fino a 5 minuti, in modo tale da consentire una reticolazione soddisfacente anche per l'idrogelo a base di GelMA-DOPA. Malgrado ciò, quest'ultimo è risultato comunque meno definito rispetto a quello ottenuto a partire da formulazioni contenenti GelMA (Figura 3.12): sul fondo del *mold* cilindrico in silicone utilizzato per preparare gli idrogeli, infatti, nonostante l'intervallo di 5 minuti di esposizione UV, era comunque possibile riscontrare una certa quantità di formulazione di GelMA-DOPA non reagita. Fenomeno, questo, pressoché

irrilevante nel caso della reticolazione di formulazioni contenenti GelMA. A seguito di questo test, si è dunque deciso di irraggiare entrambe le formulazioni con luce UV per 5 minuti.

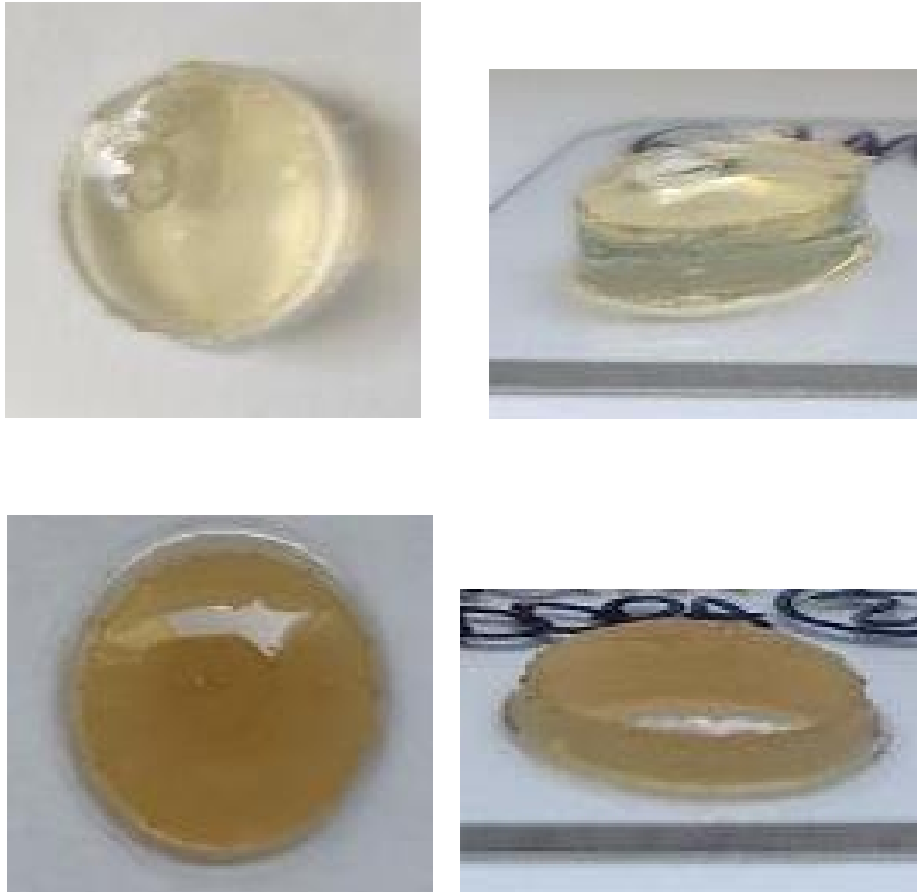


Figura 3.12 Idrogeli di GelMA (in alto) e GelMA-DOPA (in basso)

3.2.3. Prove di %gel

I risultati delle prove di %gel effettuate, il cui protocollo è riportato al paragrafo 2.2.8, hanno ulteriormente confermato la differenza di reattività tra le due formulazioni. I campioni di GelMA-DOPA hanno infatti mostrato una *gel fraction* pari a circa il 73%, a dispetto dell'83% ottenuto dai campioni di GelMA (Figura 3.13). Questa differenza è sempre da attribuire all'inferiore reattività mostrata dalla formulazione di GelMA-DOPA, causata dall'ingombro sterico provocato dai gruppi catecolo e causa della minore reticolazione degli idrogeli.

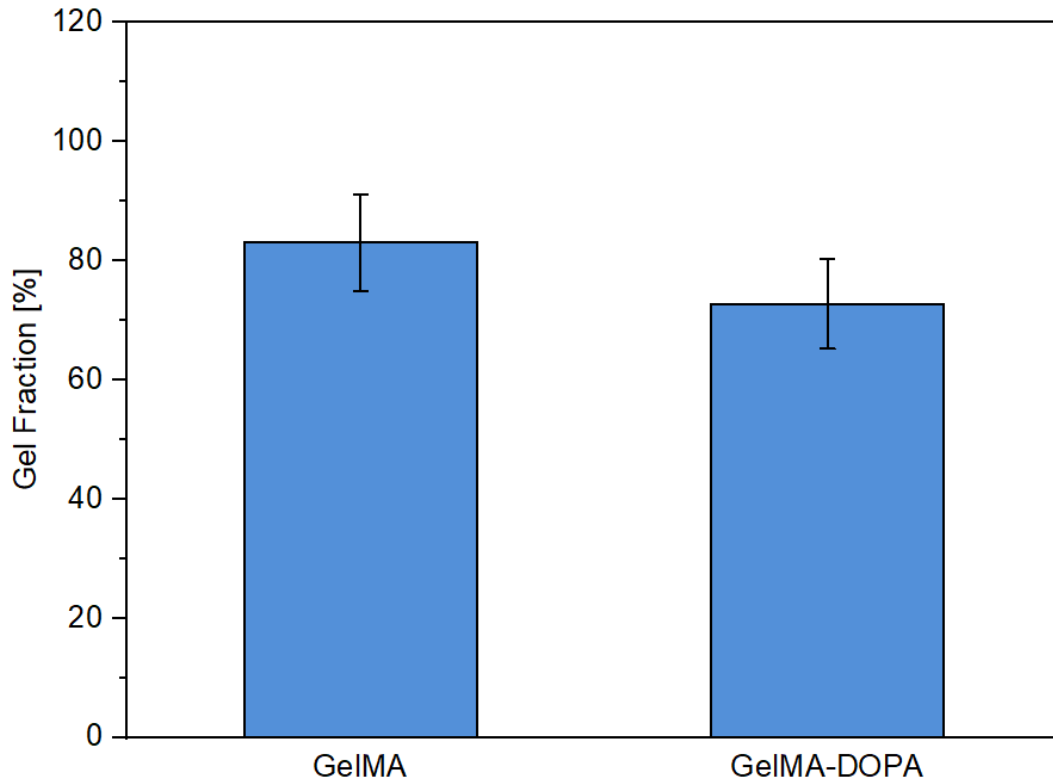


Figura 3.13 %gel di idrogeli a base di GelMA o GelMA-DOPA

3.2.4. Prove di swelling e struttura degli idrogeli

Le prove di swelling sono state effettuate per monitorare la capacità di idrogeli di GelMA e GelMA-DOPA liofilizzati di rigonfiare una volta immersi in acqua. Come noto, infatti, gli idrogeli sono network polimerici idrofilici in grado di assorbire notevoli quantità di acqua, capacità da analizzare per studiarne in maniera più puntuale le possibili applicazioni. Il protocollo seguito per le prove di *swelling* è riportato al paragrafo 2.2.7.

I risultati, riportati in *Figura 3.14*, mostrano un comportamento sostanzialmente differente da parte dei due campioni: mentre gli idrogeli di GelMA hanno raggiunto un rapporto di rigonfiamento pari a circa il 920%, quelli di GelMA-DOPA si sono fermati a circa il 600%.

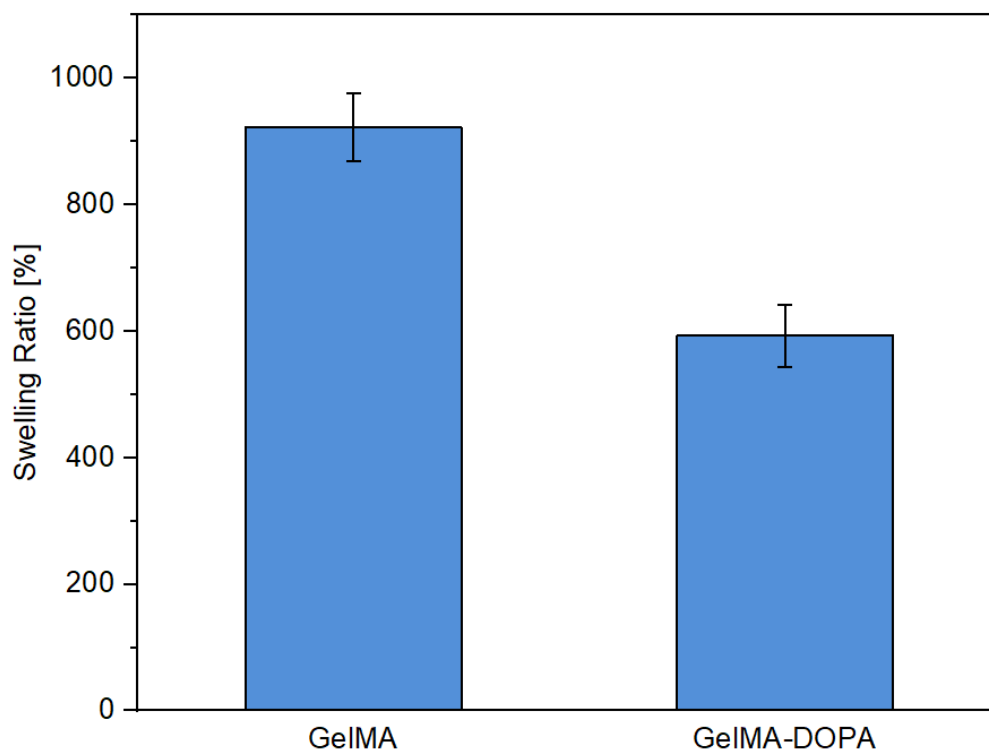


Figura 3.14 Swelling di idrogeli liofilizzati a base di GelMA o GelMA-DOPA

Questo comportamento è da attribuirsi alla struttura stessa degli idrogeli e alla maggiore idrofobicità del GelMA-DOPA rispetto al GelMA. Da uno studio effettuato al microscopio a scansione elettronica (SEM), le cui immagini sono mostrate in *Figura 3.15* e *3.16*, la struttura degli idrogeli di GelMA-DOPA post-liofilizzazione è difatti risultata nettamente più compatta rispetto a quella dei campioni di GelMA. Questo fenomeno è da attribuirsi alla composizione stessa dei campioni: l'idrofobicità dei gruppi catecolo inseriti a seguito della funzionalizzazione del GelMA ha difatti provocato un collasso del network di GelMA-DOPA durante la liofilizzazione, causato sia dall'ingombro sterico dei suddetti gruppi sia dalle interazioni idrofobiche che sono venute a formarsi durante l'essiccamento, il che ha reso la struttura dell'idrogelo liofilizzato meno porosa. [38]

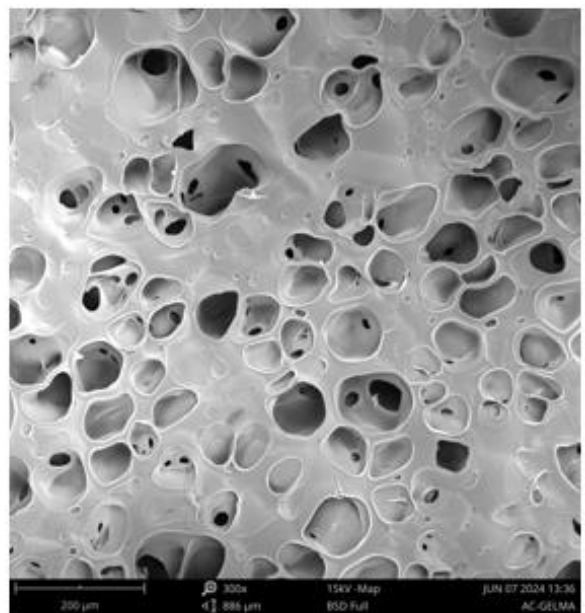
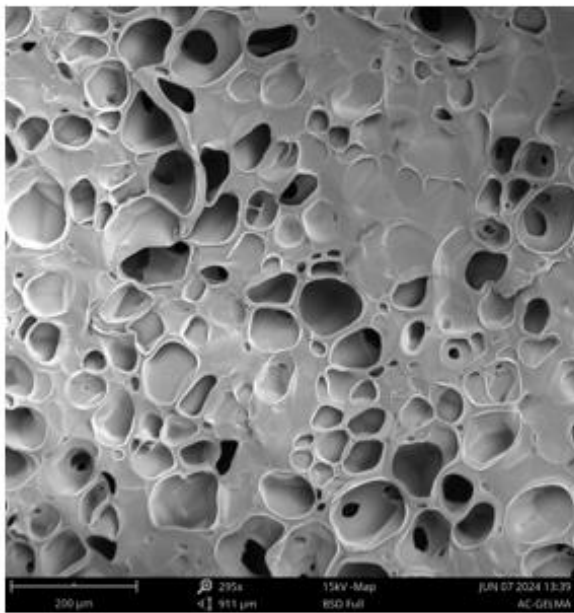


Figura 3.15 Immagini SEM – idrogelo liofilizzato di GelMA

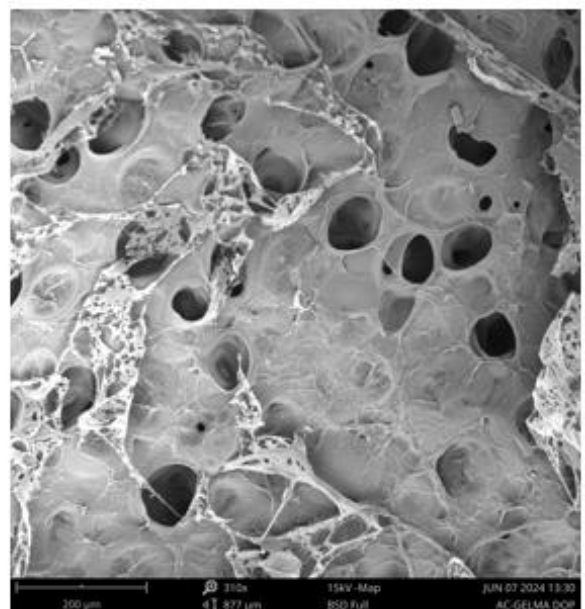
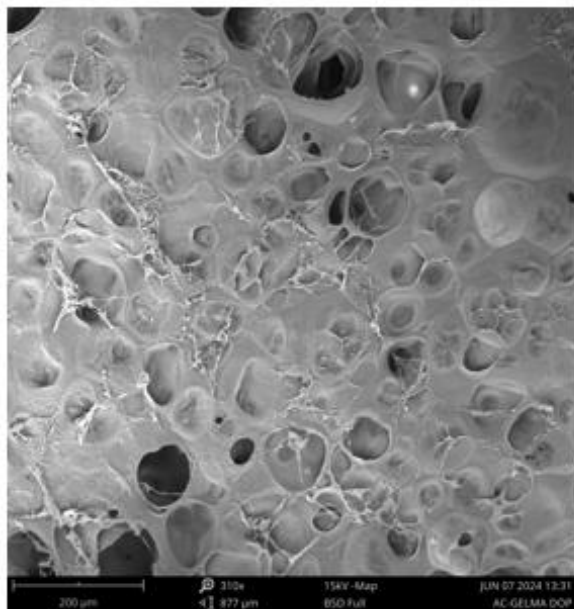


Figura 3.16 Immagini SEM – idrogelo liofilizzato di GelMA-DOPA

3.2.5. Prove di degradazione e stabilità nel tempo degli idrogeli

Avendo ideato queste matrici con l'idea di applicarle come soluzioni per il *wound healing*, si è reso necessario testarne la stabilità a seguito dell'esposizione a enzimi solitamente presenti in ambiente fisiologico. Nello specifico, si è deciso di utilizzare una soluzione contenente l'enzima collagenasi in quanto presente nella matrice extracellulare e responsabile della rottura dei legami peptidici caratterizzanti la catena del collagene e, di conseguenza, della gelatina. [39] Il protocollo seguito per le prove di degradazione enzimatica è riportato al paragrafo 2.2.9.

I risultati, riportati in *Figura 3.17*, hanno mostrato un comportamento degli idrogeli in linea con quanto riportato in letteratura. Gli idrogeli di GelMA, infatti, dopo 24 ore di immersione in PBS, hanno raggiunto una percentuale di peso residuo pari a circa il 30% [27], mentre quelli di GelMA-DOPA hanno raggiunto un valore pari a circa il 55% [24].

Tale differenza in termini di degradazione è attribuibile al minor rigonfiamento dei campioni di GelMA-DOPA rispetto a quelli di GelMA: uno swelling inferiore comporta infatti una minore diffusione della soluzione enzimatica all'interno del network e, di conseguenza, una minore degradazione della matrice.

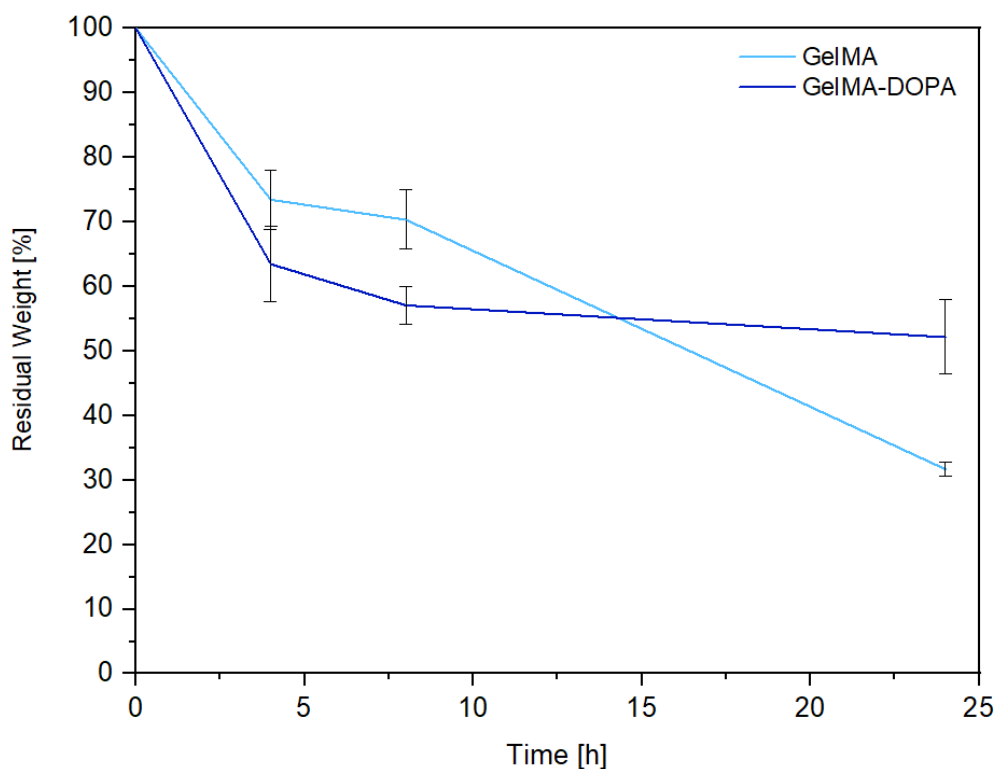


Figura 3.17 Degradazione enzimatica di idrogeli a base di GelMA o GelMA-DOPA

Per quanto riguarda i test di stabilità nel tempo descritti al paragrafo 2.2.10, in un intervallo di tempo pari a circa 3 mesi, non si sono riscontrate sostanziali differenze né negli idrogeli, né, tantomeno, nei campioni liofilizzati conservati.

3.2.6. Prove di adesione

Per valutare eventuali cambiamenti nelle proprietà adesive degli idrogeli a seguito della funzionalizzazione del GelMA con la dopamina, sono stati condotti dei test di adesione dapprima su campioni vetrino – vetrino [17] e, in seguito, su campioni vetrino – pelle porcina [35]. I test sono stati condotti secondo i metodi descritti al paragrafo 2.2.11.

In prima analisi, sono stati esaminati i campioni vetrino – vetrino testando due condizioni, di seguito indicate come *dry* e *wet*. In quest'ultimo caso, i campioni sono stati mantenuti in acqua deionizzata per circa 2 ore prima di essere sottoposti alla prova di trazione. I risultati ottenuti in entrambe le condizioni sono riportati in *Figura 3.18*.

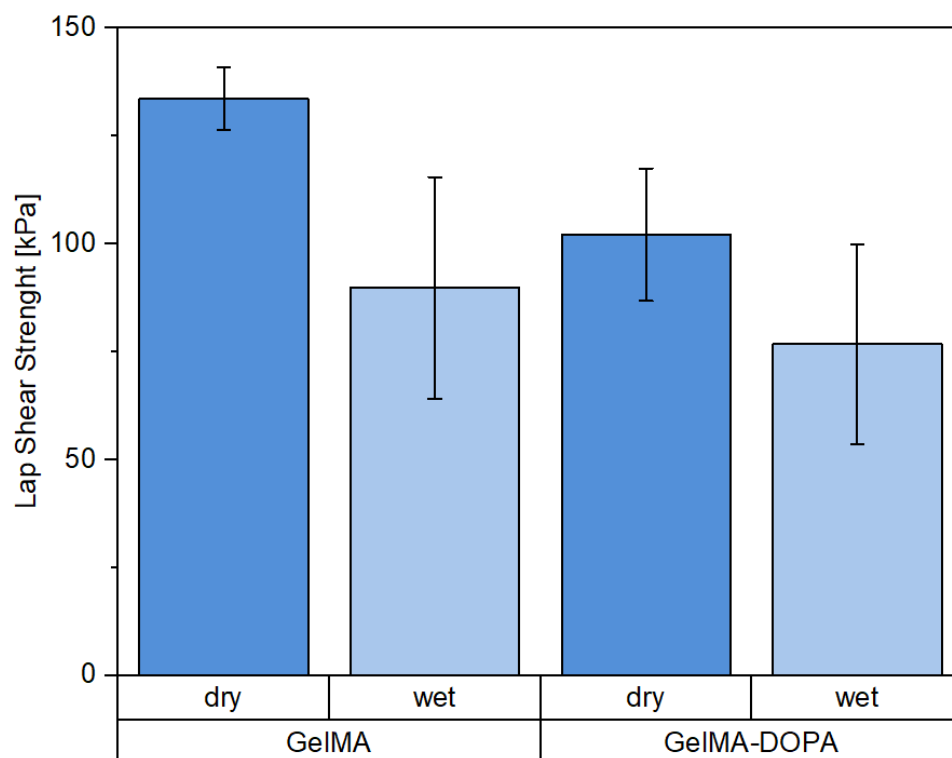


Figura 3.18 Lap shear test – campioni vetrino-vetrino

I risultati hanno evidenziato come i campioni in condizioni *dry* abbiano presentato una resistenza a rottura maggiore rispetto a quelli in condizioni *wet*, e, in particolare, come i campioni di GelMA siano risultati più resistenti al taglio rispetto a quelli di GelMA-DOPA, sebbene i valori possano considerarsi sostanzialmente confrontabili, soprattutto nel caso dei campioni testati in condizioni *wet*.

I test effettuati su campioni preparati con pelle porcina sono stati condotti esclusivamente nella condizione *dry*. In questo caso, è stata notata un'inversione di tendenza: i campioni di GelMA-DOPA, infatti, sono risultati essere, seppur soltanto di qualche centinaio di Pascal, più resistenti dei campioni di GelMA (Figura 3.19). Inoltre, è possibile apprezzare una differenza molto evidente tra i valori misurati su questi campioni e quelli ottenuti testando i campioni vetrino – vetrino: questi ultimi hanno superato in resistenza quelli preparati con pelle porcina, con un divario di più di 100 Pa.

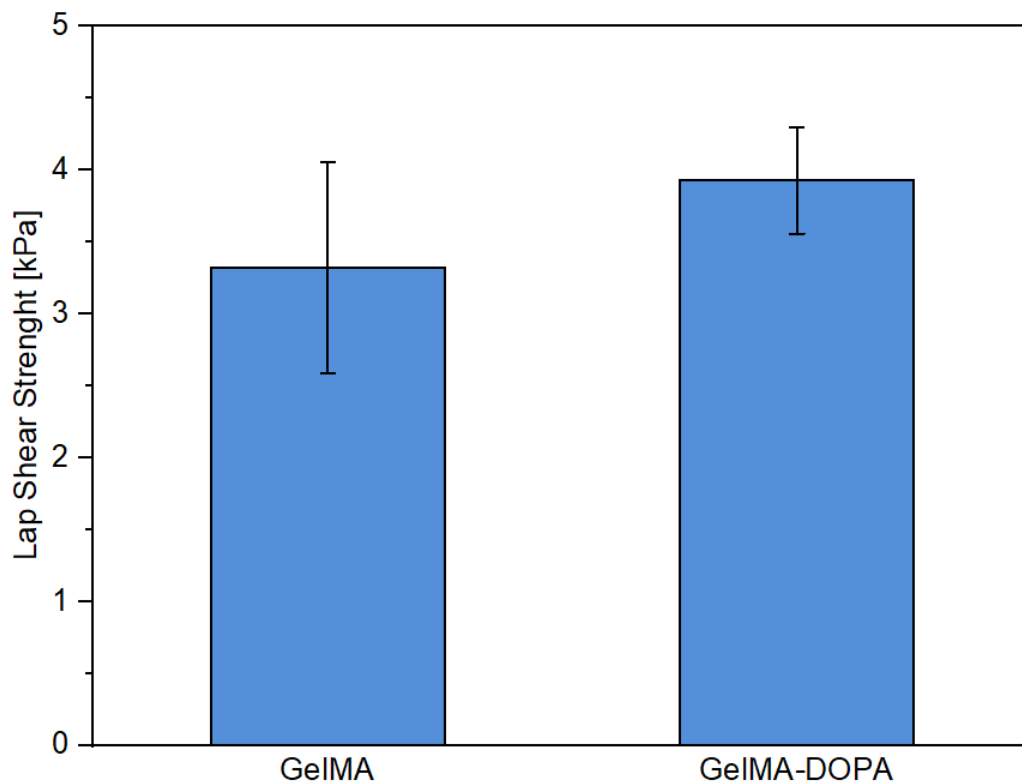


Figura 3.19 Lap shear test – campioni vetrino-pelle porcina

3.2.7. Test preliminari di stampa 3D

In ultimo, si è deciso di effettuare dei test preliminari sulle formulazioni per valutarne il possibile utilizzo in applicazioni di stampa 3D. A tal fine, per risolvere i problemi di limitata reattività della formulazione di GelMA-DOPA e per garantire una buona stabilità meccanica del prodotto stampato, e quindi per migliorarne la stampabilità, si è deciso di modificare le formulazioni tramite l'aggiunta di un'aliquota di PEGDA 575, un oligomero sintetico diacrilato largamente usato per la fabbricazione di idrogeli ibridi. [40] La preparazione delle formulazioni e il metodo seguito per i test sono indicati al paragrafo 2.2.12.

Come confermato da misure fotoreologiche, l'aggiunta di PEGDA comporta una maggiore reattività delle formulazioni (*Figura 3.20*). Nello specifico, i tempi di reticolazione della formulazione di GelMA si sono accorciati da 15 a circa 3 secondi, mentre quelli della formulazione di GelMA-DOPA sono passati da circa 56 a 32 secondi. Le velocità di reticolazione invece sono entrambe aumentate: si è passati da 5 a 66 Pa/s per la formulazione di GelMA e da 0.023 a 7 Pa/s per quella di GelMA-DOPA. I risultati ottenuti sono riassunti nel grafico in *Figura 3.21*.

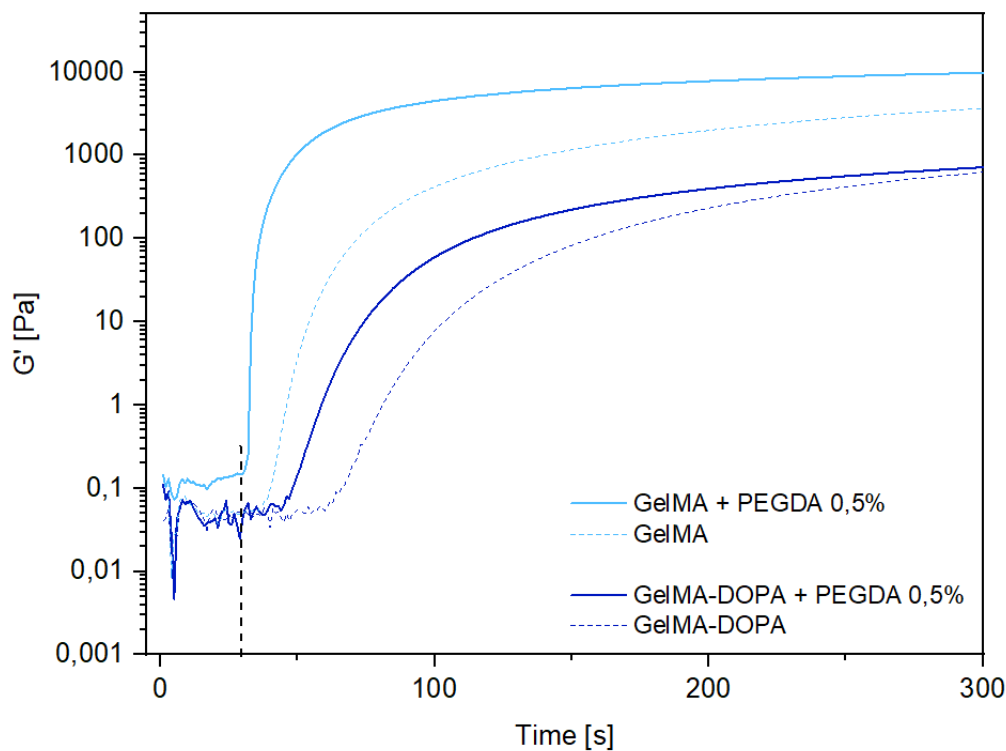


Figura 3.20 Curve fotoreologiche relative a formulazioni a base di GelMA o GelMA-DOPA con o senza PEGDA

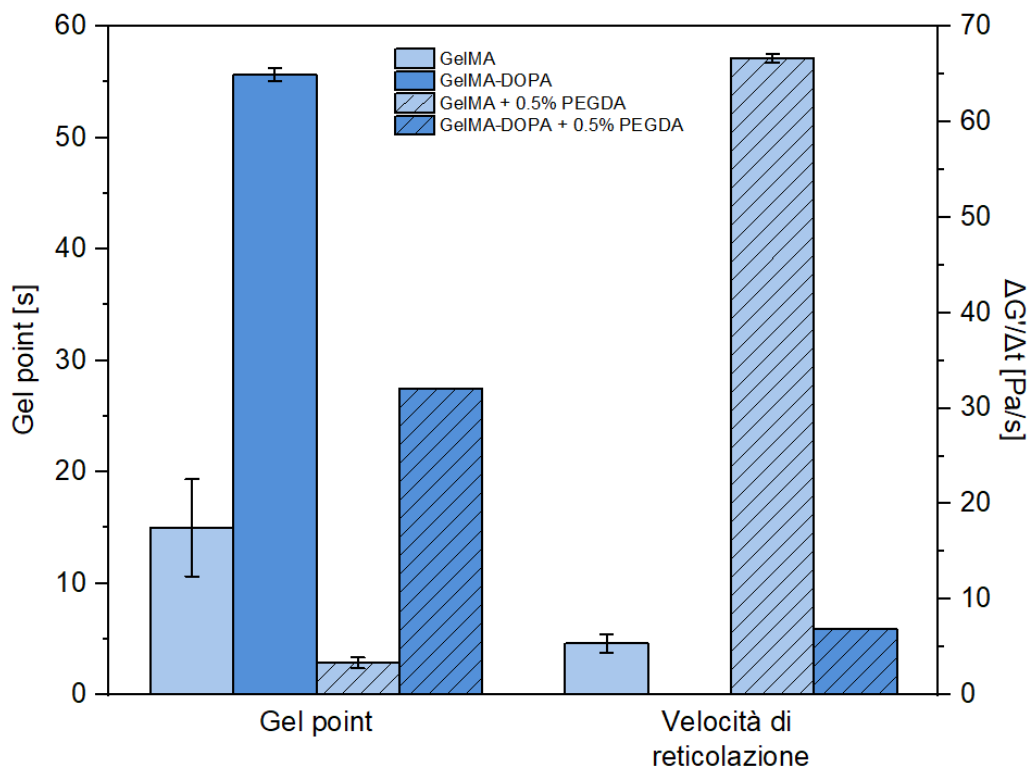


Figura 3.21 Confronto tra gel point e velocità di reticolazione delle formulazioni a base di GelMA o GelMA-DOPA con o senza PEGDA

Da questi risultati si può dedurre che l'utilizzo del PEGDA può confermarsi anche nel nostro caso certamente funzionale alla preparazione di formulazioni finalizzate alla stampa 3D.

Sulla base di questi risultati, sono state eseguite prove preliminari di stampa 3D utilizzando la funzione *material test*, che consente di valutare la stampabilità di una resina in funzione del tempo di irraggiamento o dell'intensità della radiazione luminosa incidente. Nello specifico, è stato possibile constatare una buona stampabilità di entrambe le formulazioni di GelMA o GelMA-DOPA contenenti PEGDA, per esposizioni di 20 e 30 secondi, il che lascia ben sperare per una futura applicazione di tali materiali nel campo della stampa 3D.

4. Conclusioni e prospettive future

Questo lavoro di Tesi ha avuto come obiettivo quello di sintetizzare e caratterizzare idrogeli a base di gelatina metacrilata (GelMA) attribuendo loro proprietà adesive in modo tale da renderli strumenti applicabili in ambito biomedicale e, in particolare, per poterli adoperare come soluzione funzionale per il *wound healing*. Per arrivare a un prodotto finale con queste caratteristiche, l'idea è stata quella di funzionalizzare il GelMA con la dopamina e, in questo modo, sfruttare il meccanismo adesivo dei molluschi, come ad esempio le cozze, per ottenere la sintesi del GelMA-DOPA, con il quale sono stati in seguito preparati degli idrogeli, *network* ideali per applicazioni di questo tipo.

Una panoramica relativa ai biomateriali e alle loro proprietà ha caratterizzato l'incipit del capitolo introduttivo, che è proseguito dando una descrizione degli idrogeli e delle peculiarità che ne permettono l'utilizzo in campo biomedico. Si è quindi giunti alla presentazione dei materiali attori principali di questo lavoro: partendo dal collagene ed esponendone vantaggi e svantaggi, si è passati per un approfondimento sulla gelatina e sui metodi che rendono possibile la sua reticolazione, fino ad arrivare alla descrizione del GelMA, delle sue caratteristiche e possibili applicazioni. Dopodiché, si è concentrata l'attenzione sui meccanismi adesivi, in particolare su quello della cozza, per giungere alle motivazioni che hanno comportato la scelta della dopamina come molecola da utilizzare per l'attribuzione di proprietà adesive agli idrogeli e alla spiegazione del processo seguito per la funzionalizzazione del GelMA e il conseguente ottenimento del GelMA-DOPA. Il capitolo si è dunque concluso con un excursus sulla medicina rigenerativa e sull'ingegneria tissutale, sui processi che regolano la guarigione di ferite a livello fisiologico e sulle soluzioni ad oggi adoperate per accelerarli e ottimizzarli.

Il secondo capitolo ha avuto come fine quello di esporre i materiali e i metodi che sono stati utilizzati per sintetizzare e caratterizzare dapprima il materiale di partenza, ovvero il GelMA-DOPA, e successivamente i suoi idrogeli. Sono state condotte delle analisi spettroscopiche per valutare la corretta riuscita della funzionalizzazione tramite dopamina e, in seguito, prove fotoreologiche, di *swelling*, %gel e degradazione per caratterizzare gli idrogeli. Per valutarne le proprietà adesive, i campioni sono stati testati tramite la macchina a trazione e, infine, sono stati effettuati test preliminari sulle formulazioni per valutarne l'utilizzo per applicazioni di stampa 3D.

Nel terzo capitolo sono stati presentati i risultati delle analisi e delle prove descritte nel capitolo precedente. Le analisi spettroscopiche, nello specifico quelle di spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ e UV-

VIS, hanno permesso di validare il protocollo di sintesi tramite la conferma della presenza dei gruppi catecolo della dopamina lungo la catena del GelMA-DOPA sintetizzato. Prove fotoreologiche e di reticolazione hanno consentito di stabilire i parametri ottimali per la produzione degli idrogeli, nonché di osservare una minore reattività delle formulazioni di GelMA-DOPA rispetto a formulazioni di sola GelMA, dovuta all'ingombro sterico che l'inserimento di gruppo catecolo ha provocato in seguito alla funzionalizzazione e confermata dalle prove condotte a posteriori. Grazie ai test di adesione, è stato possibile individuare un comportamento comparabile tra campioni di GelMA e GelMA-DOPA e, infine, test preliminari condotti alla stampante 3D su formulazioni che hanno previsto l'aggiunta di PEGDA 575 per migliorarne le proprietà di stampabilità hanno portato a risultati soddisfacenti, che permettono di auspicare un utilizzo del GelMA-DOPA per applicazioni di questo tipo.

Nell'ottica di ottenere idrogeli di GelMA-DOPA funzionali per applicazioni di *wound healing*, si potrebbe prendere in considerazione l'idea di ottimizzare ulteriormente il protocollo di sintesi del materiale in modo da accrescerne maggiormente le proprietà adesive. Come riscontrato nei risultati acquisiti dai test alla macchina a trazione, l'aggraffaggio di dopamina dell'8%, ottenuto a seguito della funzionalizzazione attuata seguendo il protocollo descritto in questo lavoro di Tesi, non è risultato soddisfacente al fine di conseguire un'adesione superiore dei campioni di GelMA-DOPA rispetto a quelli di GelMA. Si potrebbe dunque valutare l'idea di compiere uno step aggiuntivo nella funzionalizzazione del GelMA: in letteratura, diversi studi, tra cui in particolare quello condotto dal gruppo di ricerca di Cheng et al. [17], hanno riportato concentrazioni di dopamina nel GelMA-DOPA più elevate rispetto a quelle ottenute in questo lavoro operando uno step intermedio di funzionalizzazione del GelMA tramite aggiunta di anidride succinica per ottenere GelMA-COOH. Tramite questa funzionalizzazione e quindi grazie alla presenza più numerosa di gruppi carbossilici lungo la catena di GelMA, si avrebbe a disposizione una quantità maggiore di siti fruibili per la formazione di legami ammidici con i gruppi amminici presenti sulla molecola di dopamina e, di conseguenza, in seguito alla sintesi del GelMA-DOPA, un'esposizione maggiore di gruppi catecolo lungo la sua catena.

Inoltre, si potrebbe pensare di operare una valutazione della citocompatibilità del materiale, al fine di stabilirne la sicurezza a seguito di un suo futuro impianto in ambiente fisiologico.

Infine, potrebbe rivelarsi interessante porre maggiore attenzione al processo di stampa 3D, in modo tale da ottimizzarne i parametri e, in questo modo, poter ottenere idrogeli dalle geometrie complesse compatibili con la varietà delle ferite corporee che si verificano quotidianamente.

Bibliografia

- [1] “[https://www.treccani.it/enciclopedia/biomateriali_\(Universo-del-Corpo\)/](https://www.treccani.it/enciclopedia/biomateriali_(Universo-del-Corpo)/)”
- [2] “<https://it.wikipedia.org/wiki/Biomateriale>”
- [3] J. Liang, P. J. Dijkstra, A. A. Poot, and D. W. Grijpma, “Hybrid Hydrogels Based on Methacrylate-Functionalized Gelatin (GelMA) and Synthetic Polymers,” *Biomedical Materials & Devices*, vol. 1, no. 1, pp. 191–201, Mar. 2023, doi: 10.1007/s44174-022-00023-2.
- [4] S. Long, C. Xie, and X. Lu, “Natural polymer-based adhesive hydrogel for biomedical applications,” Jun. 01, 2022, *John Wiley and Sons Inc.* doi: 10.1049/bsb2.12036.
- [5] H. Kamata, Y. Akagi, Y. Kayasuga-Kariya, U. Il Chung, and T. Sakai, “‘Nonswellable’ hydrogel without mechanical hysteresis,” *Science (1979)*, vol. 343, no. 6173, pp. 873–875, 2014, doi: 10.1126/science.1247811.
- [6] Y. Zhan, W. Fu, Y. Xing, X. Ma, and C. Chen, “Advances in versatile anti-swelling polymer hydrogels,” Aug. 01, 2021, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.msec.2021.112208.
- [7] F. Ullah, M. B. H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, and H. M. Akil, “Classification, processing and application of hydrogels: A review,” Dec. 01, 2015, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.msec.2015.07.053.
- [8] E. C. González-Díaz and S. Varghese, “Hydrogels as extracellular matrix analogs,” Sep. 01, 2016, *MDPI*. doi: 10.3390/gels2030020.
- [9] A. Guo, S. Zhang, R. Yang, and C. Sui, “Enhancing the mechanical strength of 3D printed GelMA for soft tissue engineering applications,” Feb. 01, 2024, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.mtbio.2023.100939.
- [10] B. Feng *et al.*, “Collagen-based biomaterials in organoid technology for reproductive medicine: composition, characteristics, and applications,” Dec. 01, 2023, *Springer*. doi: 10.1186/s42825-023-00142-6.
- [11] R. Cicchi, N. Vogler, D. Kapsokalyvas, B. Dietzek, J. Popp, and F. S. Pavone, “From molecular structure to tissue architecture: Collagen organization probed by SHG microscopy,” *J Biophotonics*, vol. 6, no. 2, pp. 129–142, Feb. 2013, doi: 10.1002/jbio.201200092.

- [12] G. Kaur, G. Narayanan, D. Garg, A. Sachdev, and I. Matai, “Biomaterials-Based Regenerative Strategies for Skin Tissue Wound Healing,” May 16, 2022, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acsabm.2c00035.
- [13] J. Liang, P. J. Dijkstra, A. A. Poot, and D. W. Grijpma, “Hybrid Hydrogels Based on Methacrylate-Functionalized Gelatin (GelMA) and Synthetic Polymers,” *Biomedical Materials & Devices*, vol. 1, no. 1, pp. 191–201, Mar. 2023, doi: 10.1007/s44174-022-00023-2.
- [14] Y. Zhang, J. Lv, J. Zhao, G. Ling, and P. Zhang, “A versatile GelMA composite hydrogel: Designing principles, delivery forms and biomedical applications,” Oct. 10, 2023, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2023.112370.
- [15] A. H. J. Gowda *et al.*, “Design of tunable gelatin-dopamine based bioadhesives,” *Int J Biol Macromol*, vol. 164, pp. 1384–1391, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.195.
- [16] D. W. R. Balkenende, S. M. Winkler, and P. B. Messersmith, “Marine-inspired polymers in medical adhesion,” Jul. 01, 2019, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.03.059.
- [17] H. Cheng *et al.*, “Mussel-Inspired Multifunctional Hydrogel Coating for Prevention of Infections and Enhanced Osteogenesis,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 9, no. 13, pp. 11428–11439, Apr. 2017, doi: 10.1021/acsami.6b16779.
- [18] “https://it.wikipedia.org/wiki/Medicina_rigenerativa.”
- [19] G. Kaur, G. Narayanan, D. Garg, A. Sachdev, and I. Matai, “Biomaterials-Based Regenerative Strategies for Skin Tissue Wound Healing,” May 16, 2022, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acsabm.2c00035.
- [20] Y. Liang, J. He, and B. Guo, “Functional Hydrogels as Wound Dressing to Enhance Wound Healing,” Aug. 24, 2021, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acsnano.1c04206.
- [21] M. Wang, Y. Hong, X. Fu, and X. Sun, “Advances and applications of biomimetic biomaterials for endogenous skin regeneration,” Sep. 01, 2024, *KeAi Communications Co*. doi: 10.1016/j.bioactmat.2024.04.011.

- [22] F. Zhou *et al.*, “Bioinspired, injectable, tissue-adhesive and antibacterial hydrogel for multiple tissue regeneration by minimally invasive therapy,” *Appl Mater Today*, vol. 26, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.apmt.2021.101290.
- [23] Y. Liu *et al.*, “Highly Adhesive, Stretchable and Breathable Gelatin Methacryloyl-based Nanofibrous Hydrogels for Wound Dressings,” *ACS Appl Bio Mater*, vol. 5, no. 3, pp. 1047–1056, Mar. 2022, doi: 10.1021/acsabm.1c01087.
- [24] Y. Wang *et al.*, “In situ photo-crosslinked adhesive hydrogel loaded with mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promotes diabetic wound healing,” *J Mater Chem B*, vol. 11, no. 4, pp. 837–851, Dec. 2022, doi: 10.1039/d2tb02371g.
- [25] J. Y. Kim, S. B. Ryu, and K. D. Park, “Preparation and characterization of dual-crosslinked gelatin hydrogel via Dopa-Fe³⁺ complexation and fenton reaction,” *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 58, pp. 105–112, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.jiec.2017.09.014.
- [26] A. I. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E. H. Schacht, M. Cornelissen, and H. Berghmans, “Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels,” *Biomacromolecules*, vol. 1, no. 1, pp. 31–38, 2000, doi: 10.1021/bm990017d.
- [27] C. G. Gaglio, D. Baruffaldi, C. F. Pirri, L. Napione, and F. Frascella, “GelMA synthesis and sources comparison for 3D multimaterial bioprinting,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 12, 2024, doi: 10.3389/fbioe.2024.1383010.
- [28] W. Dai *et al.*, “3D Bioprinting of Heterogeneous Constructs Providing Tissue-Specific Microenvironment Based on Host–Guest Modulated Dynamic Hydrogel Bioink for Osteochondral Regeneration,” *Adv Funct Mater*, vol. 32, no. 23, Jun. 2022, doi: 10.1002/adfm.202200710.
- [29] X. Zhou *et al.*, “Three-Dimensional-Bioprinted Dopamine-Based Matrix for Promoting Neural Regeneration,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 10, no. 10, pp. 8993–9001, Mar. 2018, doi: 10.1021/acsami.7b18197.
- [30] Y. Liu *et al.*, “Highly Adhesive, Stretchable and Breathable Gelatin Methacryloyl-based Nanofibrous Hydrogels for Wound Dressings,” *ACS Appl Bio Mater*, vol. 5, no. 3, pp. 1047–1056, Mar. 2022, doi: 10.1021/acsabm.1c01087.

- [31] H. Cheng *et al.*, “Sprayable hydrogel dressing accelerates wound healing with combined reactive oxygen species-scavenging and antibacterial abilities,” *Acta Biomater*, vol. 124, pp. 219–232, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.actbio.2021.02.002.
- [32] Y. Wang *et al.*, “In situ photo-crosslinked adhesive hydrogel loaded with mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promotes diabetic wound healing,” *J Mater Chem B*, vol. 11, no. 4, pp. 837–851, Dec. 2022, doi: 10.1039/d2tb02371g.
- [33] “<https://wiki.anton-paar.com/it-it/scansioni-di-ampiezza/>.”
- [34] B. Tosetto, “Utilizzo di coloranti sensibili ad agenti nucleofili nello sviluppo di materiali stampabili 3D,” 2021.
- [35] F. Cheng, L. Xu, X. Zhang, J. He, Y. Huang, and H. Li, “Generation of a photothermally responsive antimicrobial, bioadhesive gelatin methacryloyl (GelMA) based hydrogel through 3D printing for infectious wound healing,” *Int J Biol Macromol*, vol. 260, Mar. 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.129372.
- [36] “<https://www.asiga.com/max-x/>.”
- [37] W. Tomal and J. Ortyl, “Water-soluble photoinitiators in biomedical applications,” May 01, 2020, *MDPI AG*. doi: 10.3390/POLYM12051073.
- [38] A. Salerno, R. Borzacchiello, and P. A. Netti, “Pore structure and swelling behavior of porous hydrogels prepared via a thermal reverse-casting technique,” in *Journal of Applied Polymer Science*, Dec. 2011, pp. 3651–3660. doi: 10.1002/app.34778.
- [39] J. H. Pang, C. Wischke, and A. Lendlein, “In vitro Degradation Analysis of 3D-architected Gelatin-based Hydrogels,” *MRS Adv*, vol. 5, no. 12–13, pp. 633–642, 2020, doi: 10.1557/adv.2019.441.
- [40] Y. Wang *et al.*, “Development of a photo-crosslinking, biodegradable GelMA/PEGDA hydrogel for guided bone regeneration materials,” *Materials*, vol. 11, no. 8, Aug. 2018, doi: 10.3390/ma11081345.