



**Politecnico  
di Torino**

Politecnico di Torino

Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

A.a. 2024/2025

Sessione di Laurea Luglio 2025

**Sintesi e caratterizzazione di idrogeli con  
proprietà adesive migliorate per  
applicazioni biomedicali**

Relatori:

Prof. Ignazio Roppolo

Prof.ssa Francesca Frascella

Correlatore:

Dr. Andrea Cosola

Candidata:

Marta Ligorio



# Sommario

Abstract.....	1
1. Introduzione.....	3
1.1 Biomateriali .....	3
1.2 Medicina Rigenerativa e Ingegneria dei tessuti.....	4
1.3 Idrogeli e Wound Healing.....	8
Idrogeli fisici .....	10
Idrogeli chimici .....	12
1.4 Gelatina Metacrilata (GelMA).....	15
1.5 Meccanismo adesivo della DOPA .....	20
1.6 Combinazione GelMA-DOPA.....	22
1.7 Principi di fotopolimerizzazione e stampa 3D.....	24
1.8 Obiettivo del lavoro di tesi .....	29
2. Materiali e Metodi .....	30
2.1 Materiali.....	30
2.1.1 Sintesi della GelMA .....	30
2.1.2 Sintesi della GelMA-COOH.....	32
2.1.3 Sintesi della Gelma-COOH-DOPA.....	34
2.1.4 Sintesi GelMA-DOPA.....	35
2.1.5 Preparazione delle formulazioni .....	35
2.2 Caratterizzazione dei materiali .....	36
2.2.1 Spettroscopia infrarossa .....	36
2.2.2 Spettroscopia <sup>1</sup> H-NMR.....	37
2.2.3 Spettroscopia UV-VIS.....	38
2.2.4 Fotoreologia .....	40
2.2.5 Swelling.....	43
2.2.6 Gel content .....	44
2.3 Caratterizzazione delle proprietà meccaniche .....	45
2.3.1 Test di adesione.....	45
2.4 Analisi biologiche e funzionali.....	47
2.4.1 Trattamento delle cellule con mezzo condizionato .....	47
2.4.3. Saggio MTT per la valutazione della vitalità cellulare.....	50

2.4.4 Immunofluorescenza.....	51
2.5 Stampa 3D.....	53
3. Risultati.....	56
3.1 Caratterizzazione dei materiali .....	56
3.1.1. Spettroscopia IR .....	57
3.1.2 Spettroscopia <sup>1</sup> H-NMR.....	60
3.1.3 Spettroscopia UV-VIS.....	62
3.1.4. Fotoreologia.....	65
3.1.6 Gel content .....	68
3.1.5 Swelling.....	69
3.2 Caratterizzazione delle proprietà meccaniche .....	70
3.2.1 Test di adesione .....	70
3.3 Analisi biologiche e funzionali.....	71
3.3.1 Prove di mezzo condizionato – Test di vitalità cellulare.....	71
3.3.2. Prove di mezzo condizionato – Immunofluorescenza.....	73
3.4 Stampa 3D.....	75
Conclusioni.....	78
Bibliografia.....	81

# Abstract

La medicina rigenerativa è un campo innovativo della medicina focalizzato sulla riparazione e rigenerazione funzionale dei tessuti danneggiati attraverso l'impiego combinato di biomateriali, cellule e fattori bioattivi. In particolare, gli idrogeli risultano essere strutture ideali per applicazioni biomedicali, essendo dei network idrofilici in grado di rigonfiare in ambiente acquoso, caratteristica che li rende molto simili alla matrice extracellulare (ECM). Presentano inoltre un'elevata biocompatibilità e proprietà chimico-fisiche modulabili, risultando adatti all'impiego come scaffold in ingegneria tissutale e wound healing.

Tra i materiali adoperati per la sintesi di idrogeli, un materiale che ha attirato particolarmente attenzione è la Gelatina Metacrilata (GelMA). Si tratta di un materiale derivato dalla gelatina modificato con gruppi metacrilati che ne permettono la fotopolimerizzazione, mantenendo le proprietà bioattive del collagene e consentendo la modulazione delle proprietà meccaniche dell'idrogelo risultante.

Tuttavia, la GelMA presenta una limitata adesività ai tessuti, soprattutto in ambienti umidi, il che può limitarne l'efficacia in applicazioni cliniche quali riparazione di tessuti molli e guarigione di ferite.

Per superare questo limite, si è adottata una strategia ispirata al meccanismo adesivo dei mitili marini. Questi organismi utilizzano proteine adesive contenenti DOPA (diidrossifenilalanina) per aderire a superfici di qualsiasi tipo, siano esse organiche o inorganiche, anche in condizioni umide e dinamiche. La DOPA, infatti, è in grado di formare molteplici interazioni come legami a idrogeno e legami covalenti anche in presenza di acqua, risultando quindi essere un elemento chiave nella progettazione di adesivi biofunzionali.

In questo lavoro di tesi è stato quindi sviluppato un idrogelo innovativo, ottenuto combinando le proprietà della GelMA con quelle della DOPA con l'obiettivo di preservare la bioattività del materiale e migliorarne significativamente l'adesione in ambienti umidi.

La sintesi è avvenuta in due passaggi principali che portano alla formazione della GelMA-COOH-DOPA: l'introduzione di gruppi carbossilici tramite succinilazione del GelMA e la successiva coniugazione di dopamina cloridrato mediante chimica delle carbodiimmidi, al fine di massimizzare la funzionalizzazione del materiale.

Questo lavoro di tesi si compone di tre capitoli principali. Il primo capitolo introduce i concetti di biomateriali, medicina rigenerativa, ingegneria dei tessuti e ruolo degli idrogeli. Vengono poi approfondite le caratteristiche della GelMA e il meccanismo adesivo della DOPA.

Nel secondo capitolo, vengono illustrati i metodi sperimentali adottati per la sintesi e caratterizzazione dei materiali, includendo caratterizzazioni chimico-fisiche nonché meccaniche e biologiche. Inoltre, è stato studiato il comportamento delle formulazioni in termine di reticolazione, rigonfiamento, degradazione e adesione. Vengono inoltre descritte le analisi biologiche preliminari tramite mezzo condizionato e alcune prove di stampa 3D.

Il terzo capitolo è dedicato alla discussione dei risultati ottenuti, con particolare enfasi sul confronto tra GelMA e GelMA-COOH-DOPA, evidenziando l'influenza della DOPA sulle proprietà del materiale.

Nel capitolo finale, vengono presentate le conclusioni del lavoro e possibili sviluppi futuri, in particolare in ambito clinico per la rigenerazione tissutale e la guarigione di ferite complesse.

# 1. Introduzione

## 1.1 Biomateriali

I biomateriali sono sostanze contenute in sistemi terapeutici e diagnostici che vengono a contatto con tessuti e fluidi biologici. Sono utilizzati in molte preparazioni farmaceutiche come, ad esempio, rivestimenti per compresse o capsule oppure come componenti di cerotti transdermici. Rivestono un ruolo centrale nell'ambito dei dispositivi extracorporei, come lenti a contatto e dializzatori renali e sono componenti essenziali di impianti, bypass vascolari e pacemaker cardiaci. [1]

Un biomateriale, quindi, è un materiale che si interfaccia bene con i sistemi biologici per svolgere una o più funzioni. Si parla di doppia interazione tra biomateriale e organismo che lo ospita: il biomateriale provoca una risposta biologica dell'organismo e l'organismo "risponde" con interazioni che possono avvenire a diversi livelli come fisico-chimico, molecolare e cellulare. Un concetto fondamentale da introdurre parlando di biomateriali è la biocompatibilità, ossia l'abilità di un materiale di agire determinando una appropriata risposta dell'ospite in una data applicazione. [2]

Eseguire una classificazione dei biomateriali è importante per poter scegliere il materiale più idoneo a seconda dell'applicazione clinica. In particolare, nell'ambito della medicina rigenerativa e dell'ingegneria tissutale, l'interesse è rivolto verso materiali che siano non solo biocompatibili ma anche in grado di interagire attivamente con l'ambiente cellulare e guidare i processi di riparazione e rigenerazione [3].

È possibile quindi classificare i biomateriali sia in base alla loro composizione chimico-fisica, distinguendo tra materiali polimerici, ceramici, vetrosi e metallici [4], sia in funzione della loro interazione con i tessuti biologici, suddividendoli in bioinerti, bioattivi e biorisorbibili [5].

I materiali bioinerti non interagiscono affatto con l'ambiente fisiologico circostante, e vengono pertanto selezionati per ridurre al minimo la risposta immunitaria. I materiali bioattivi, al contrario, promuovono l'adesione e la proliferazione cellulare, facilitando

l'integrazione con i tessuti. Infine, i materiali biorassorbibili sono in grado di degradarsi gradualmente nel corpo, permettendo la rigenerazione del tessuto nativo [6].

Considerando la diversificata offerta di materiali, i polimeri risultano tra i più utilizzati grazie alla loro versatilità, biocompatibilità e facilità di modifica chimica, e possono essere ulteriormente suddivisi in due macrocategorie: naturali e sintetici. I polimeri derivati da fonte naturale, come il collagene, la gelatina, l'acido ialuronico e la fibrina, garantiscono elevate biocompatibilità ed interazione con l'ambiente fisiologico in quanto presentano una composizione simile ai costituenti dei tessuti umani. Tuttavia, le loro limitate proprietà meccaniche possono limitarne l'uso in applicazioni che richiedono un'elevata robustezza del materiale. Per questo motivo, spesso si ricorre all'utilizzo di polimeri sintetici, come il polietilenglicole (PEG), il policaprolattone (PCL) o l'acido polilattico (PLA) che consentono, invece, di avere migliore resistenza meccanica ed un maggior controllo del comportamento in vivo. [7][8]

Facendo riferimento all'argomento di questa tesi, nei paragrafi successivi ci si focalizzerà sull'impiego di biomateriali polimerici e particolare attenzione verrà rivolta nei confronti della Gelatina Metacrilata (GelMA), un biopolimero versatile e bioattivo particolarmente adatto per applicazioni nell'ambito dell'ingegneria tissutale, e sulla sua modifica con gruppi catecolo derivanti dalla dopamina (DOPA), con l'obiettivo di migliorarne le proprietà adesive in ambiente umido.

## **1.2 Medicina Rigenerativa e Ingegneria dei tessuti**

La medicina rigenerativa rappresenta un settore innovativo della medicina orientato alla riparazione e/o rigenerazione di tessuti o organi, con l'obiettivo di ripristinare funzionalità fisiologiche compromesse da, malattie, traumi, difetti congeniti o invecchiamento. Grazie alla combinazione di diversi approcci tecnologici, tra cui l'utilizzo di biomateriali, cellule staminali, fattori di crescita e tecniche di ingegneria tissutale, la medicina rigenerativa si

distingue nettamente dagli approcci tradizionali basati sul trapianto di organi, offrendo soluzioni più complesse, personalizzate e orientate alla rigenerazione del tessuto nativo. [9]

Gli approcci tecnologici utilizzati per la medicina rigenerativa comprendono:

- Medicina molecolare: si focalizza sullo sviluppo di nuovi farmaci in grado di stimolare un'azione rigenerativa.
- Terapia genica: prevede la modifica dell'espressione genica delle cellule, al fine di favorire processi rigenerativi.
- Terapia cellulare: consiste nell'iniezione di cellule con l'obiettivo di ripristinare la popolazione cellulare in aree danneggiate. L'efficacia della terapia può essere migliorata combinando le cellule con biomateriali che ne supportino la funzione rigenerativa.
- Ingegneria dei tessuti: consiste nello sviluppo di matrici tridimensionali che possano ospitare le cellule e indurne il comportamento desiderato, promuovendo in tal modo la formazione di nuovi tessuti e organi.

Ponendo l'attenzione sull'ingegneria tissutale, essa si basa su quattro componenti principali (Figura 1.1):

- Cellule isolate, che possono essere progenitrici o cellule staminali, che costituiscono la base cellulare del sistema. Grazie alla loro capacità di auto-rinnovamento e differenziazione contribuiscono direttamente alla rigenerazione o alla sostituzione del tessuto danneggiato [10].
- Scaffold tridimensionali, realizzati con biomateriali che possono essere di origine naturale o sintetica, che offrono supporto meccanico e biochimico essenziale per favorire l'adesione, la crescita e l'organizzazione cellulare, mimano la matrice extracellulare (ECM) dei tessuti e favoriscono la migrazione, la proliferazione e la diffusione di nutrienti [8].

- Molecole segnale, come proteine e fattori di crescita, che guidano le funzioni cellulari desiderate, regolando processi come proliferazione, differenziazione e rimodellamento tissutale [11].
- Bioreattori, che rappresentano piattaforme tecnologicamente avanzate in grado di riprodurre in vitro condizioni fisiologiche controllate come flussi, stimoli meccanici o scambio di nutrienti, favorendo in questo modo l'espansione cellulare, la differenziazione e la maturazione del tessuto [12].

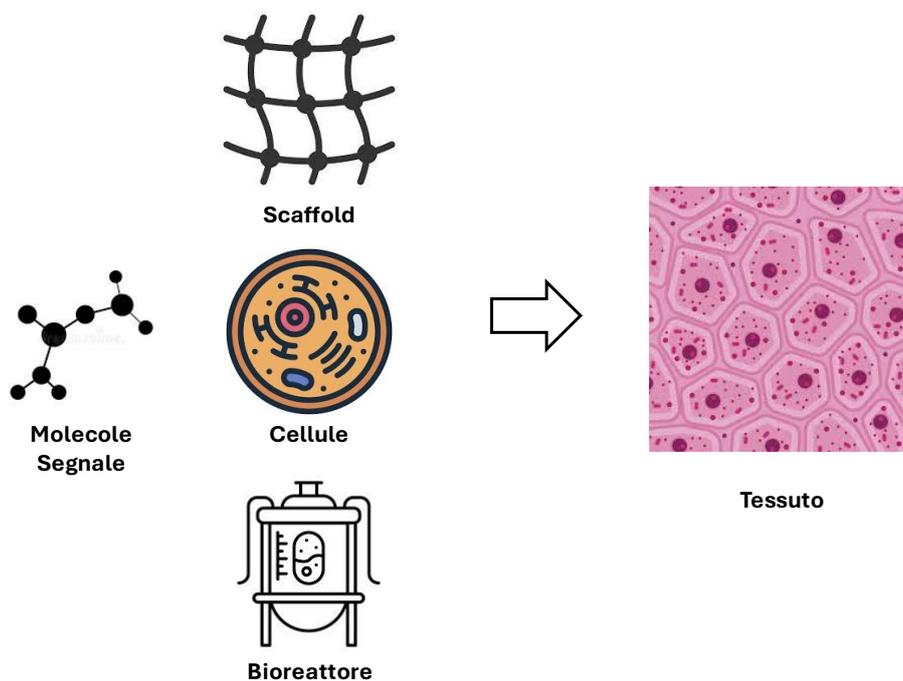


Figura 1.1: Illustrazione schematica delle quattro componenti chiave dell'ingegneria dei tessuti. Fonte propria.

La strategia più comune per sviluppare organi e tessuti (Figura 1.2) prevede l'isolamento di specifiche cellule del tessuto in analisi tramite biopsia del paziente, che vengono successivamente coltivate in vitro, espanse e seminate su scaffold tridimensionali. Gli scaffold tridimensionali svolgono diverse funzioni, come favorire le interazioni tra cellule e biomateriale, promuovere l'adesione cellulare, consentire un adeguato trasporto di nutrienti e fattori di crescita per garantire sopravvivenza, differenziazione e proliferazione cellulare.

Una volta caricati con le cellule specifiche, gli scaffold vengono poi trapiantati nel paziente utilizzando tecniche poco invasive o mediante intervento chirurgico [12].

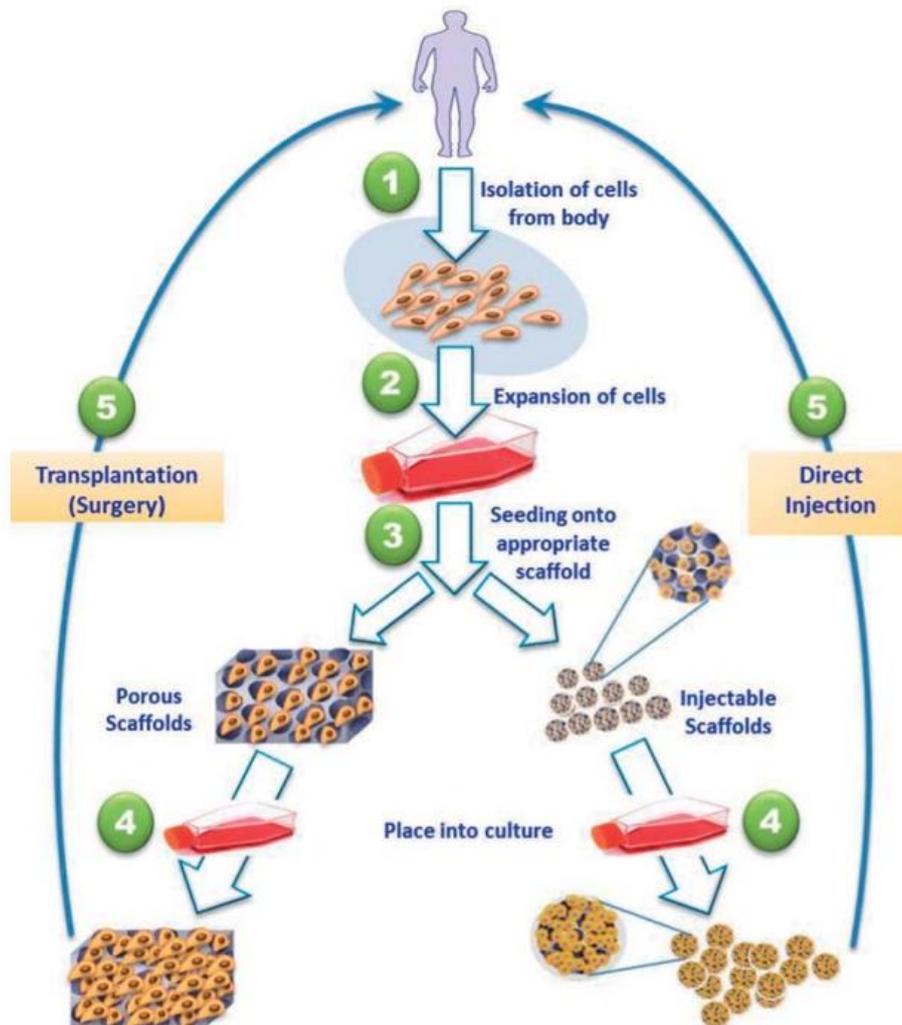


Figura 1.2: Illustrazione schematica di uno degli approcci più comune dell'ingegneria dei tessuti. Le cellule vengono isolate dal paziente tramite biopsia, espanse in vitro, seminate dello scaffold e trapiantate nel paziente tramite iniezione o impianto chirurgico. [12]

Segue che uno degli elementi fondamentali per il successo dell'ingegneria tissutale è proprio la progettazione di scaffold che abbiano caratteristiche ottimali. In questo contesto, gli idrogeli, che presentano delle caratteristiche molto simili alla matrice extracellulare naturale, si sono rivelati particolarmente adatti a supportare l'adesione, proliferazione e differenziazione cellulare. Inoltre, grazie alla loro elevata capacità di assorbire acqua, sono in grado di fornire un microambiente ideale per la crescita cellulare, promuovendo in tal modo la rigenerazione del tessuto danneggiato in modo efficace e controllato.

### 1.3 Idrogeli e Wound Healing

Nella vita quotidiana si possono verificare frequentemente dei danni ai tessuti, derivanti da diversi fattori come interventi chirurgici, ustioni, malattie cutanee, ecc, che compromettono i meccanismi essenziali di protezione dei tessuti, dando origine a una ferita [13].

La guarigione delle ferite (wound healing) è un processo biologico dinamico e complesso che comprende tre fasi: infiammazione, proliferazione e rimodellamento, durante le quali si ha la riparazione dei tessuti danneggiati e la chiusura della ferita [14], [15].

Un alleato promettente in questo processo è rappresentato dagli idrogeli, ossia dei network tridimensionali idrofilici che sono in grado di assorbire acqua e rigonfiarsi, mantenendo la loro forma e aumentando in volume, quando immersi in un ambiente acquoso. Come illustrato in Figura 1.3, le caratteristiche peculiari degli idrogeli si allineano con quelle desiderabili nei materiali utilizzati per la guarigione funzionale delle ferite [16]. In primo luogo, l'elevato contenuto di acqua permette agli idrogeli di mantenere un ambiente umido, riducendo il rischio di formazione di cicatrici, fornendo sensazione di freschezza nel paziente e una bassa aderenza ai tessuti, contribuendo così a diminuire la sensazione di dolore [17]. Inoltre, l'elevato volume libero facilita la trasmissione dell'ossigeno, permettendo al tessuto di respirare. In ultimo, gli idrogeli possono essere opportunamente modificati per presentare proprietà antibatteriche utili a prevenire infezioni della ferita [18].

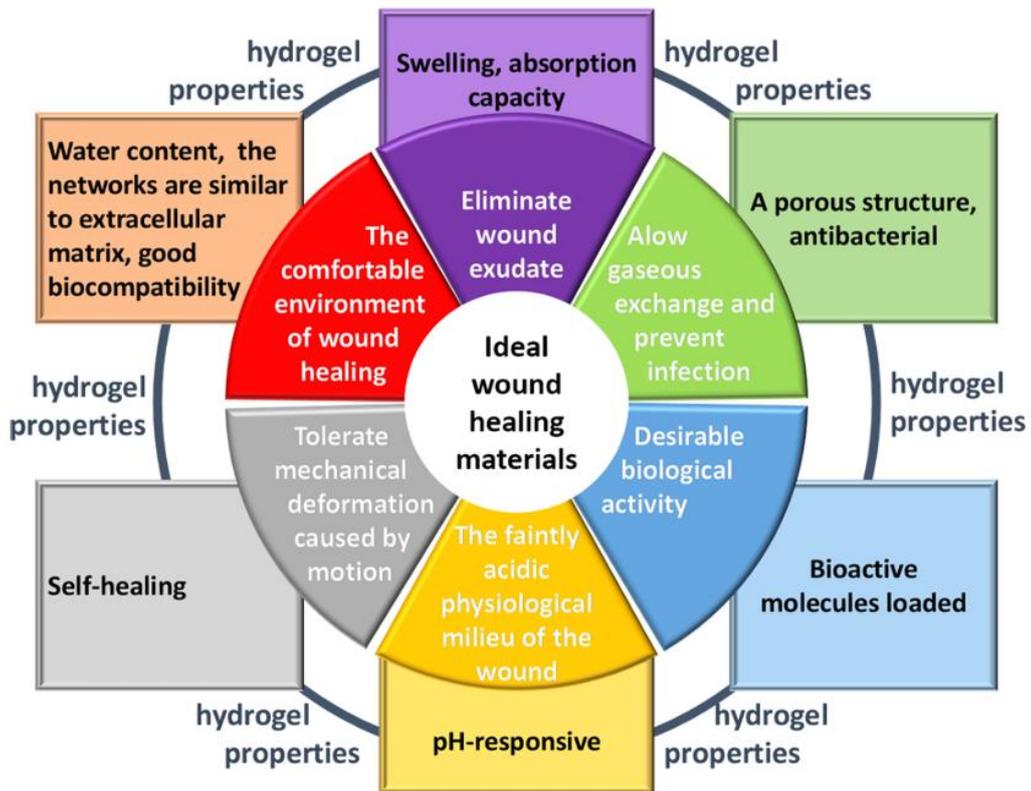


Figura 1.3: Grafico comparativo delle proprietà degli idrogeli e delle caratteristiche che i materiali devono possedere per la guarigione delle ferite [16].

È possibile classificare gli idrogeli in diversi modi a seconda delle caratteristiche considerate, come mostrato in Figura 1.4. Una delle classificazioni più comuni si basa sul tipo di legame che sostiene la loro struttura tridimensionale. In questo caso è possibile distinguere che idrogeli fisici e chimici.

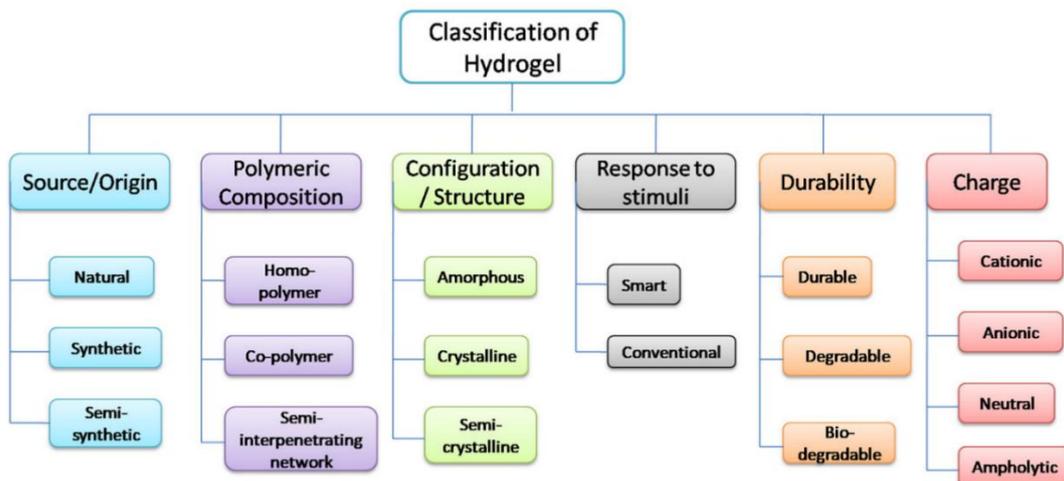


Figura 1.4: Classificazione degli idrogeli [19]

## Idrogeli fisici

Gli idrogeli fisici sono network polimerici tridimensionali caratterizzati da interazioni non covalenti, ossia forze deboli e reversibili che non comportano la formazione di legami chimici permanenti. Tra queste interazioni vi sono legami a idrogeno, interazioni idrofobiche e legami metallo-ligando. I legami ad idrogeno si instaurano tra un atomo di idrogeno legato ad un atomo elettronegativo (come idrogeno o azoto) e un secondo atomo elettronegativo ad esso vicino. le interazioni idrofobiche si verificano tra gruppi apolari in ambiente acquoso, che tendono ad aggregarsi per minimizzare la loro esposizione all'acqua. In ultimo, i legami metallo-ligando sono complessi coordinativi tra ioni metallici e gruppi donatori di elettroni presenti sulla catena polimerica [20].

Uno dei grandi vantaggi degli idrogeli fisici rispetto a quelli chimici è che non necessitano di procedure di polimerizzazione che potrebbero danneggiare le cellule, quali l'irraggiamento con luce UV e/o l'utilizzo di solventi organici e crosslinker che potrebbero rimanere intrappolati nel network [21].

Tra i possibili idrogeli fisici si possono ottenere alcune caratteristiche come:

- Idrogeli sensibili al pH: si tratta di idrogeli che vanno incontro a swelling a seconda di variazioni del pH. Tali idrogeli sono caratterizzati dalla presenza di polimeri che presentano gruppi idrolizzabili (come gruppi  $-COOH$  e  $-NH_2$ ) definiti come polielettroliti che possono diventare policationi o polianioni a seconda che ci si trovi in condizioni di pH acido o basico e quindi sono in grado di acquisire o cedere protoni. Questo comportamento induce fenomeni di ionizzazione a pH specifici, con conseguente aumento della carica superficiale delle catene polimeriche che genera repulsioni elettrostatiche interne che determinano l'espansione della rete polimerica e il conseguente rigonfiamento per assorbimento di acqua (Figura 1.5) [22].

Un esempio tipico di idrogelo sensibile alle variazioni del pH è dato dagli idrogeli a base di chitosano. Il chitosano è un polisaccaride naturale che possiede gruppi amminici in grado di protonarsi in ambiente acido rendendolo solubile e capace di

rigonfiarsi grazie alla repulsione elettrostatica tra le cariche positive generate lungo la catena. Al contrario, in condizioni basiche, la deprotonazione riduce la carica e porta alla contrazione della rete o alla sua precipitazione, riducendo la capacità di swelling [23].

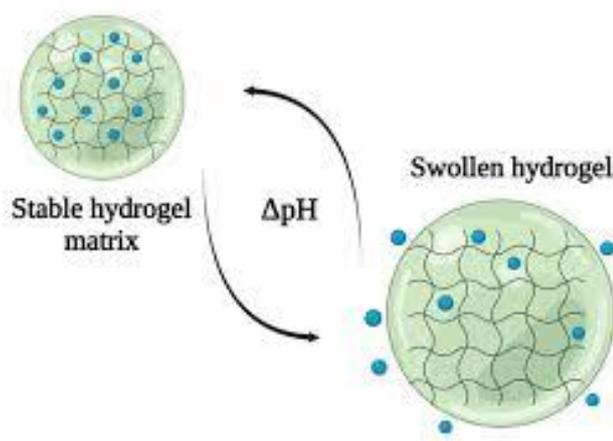


Figura 1.5: Swelling di un idrogelo caricato con un farmaco dovuto a un cambiamento di pH nell'ambiente. [22]

- Idrogeli iono-sensibili: sono idrogeli a base di materiali polimerici in grado di modificare alcune proprietà come il grado di reticolazione, il volume o la permeabilità in risposta alla presenza di ioni specifici. In particolare, questi sistemi sfruttano interazioni fisiche reversibili tra i gruppi funzionali della rete polimerica e ioni (cationi o anioni) bi/tri/multivalenti che fungono da ponti di reticolazione dinamici.

Un esempio tipico è dato dall'alginato, un polisaccaride naturale che va incontro a reticolazione ionica in presenza di ioni calcio. Più nello specifico, l'alginato possiede la capacità di subire una transizione sol/gel quasi indipendente dalla temperatura in presenza di cationi bivalenti. Il meccanismo di reticolazione dell'alginato viene definito come egg-box (Figura 1.6) e rappresenta l'esito di interazioni forti e specifiche tra gli ioni bivalenti e i gruppi carbossilici presenti nelle unità di acido guluronico dell'alginato [24].

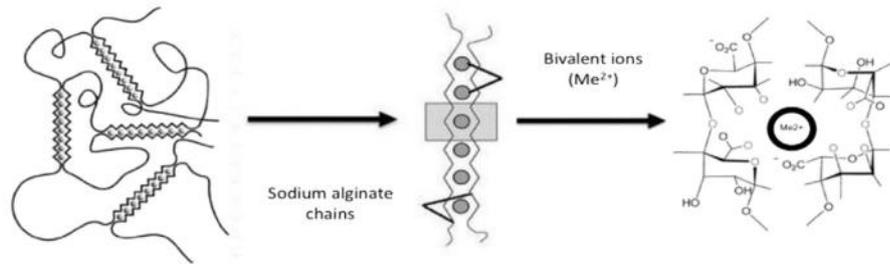


Figura 1.6: gelificazione dell'alginate secondo il modello "egg-box" [24].

- Idrogeli termosensibili: sono in grado di modificare il proprio stato fisico (sol/gel) o il grado di rigonfiamento in seguito a variazioni di temperatura (Figura 1.7). Questo comportamento termoresponsivo deriva dalla presenza di blocchi idrofilici e blocchi idrofobici nella stessa catena, la cui interazione con l'ambiente acquoso varia in funzione della temperatura. Si distinguono due comportamenti principali: la transizione sol-gel avviene all'aumentare della temperatura (LCGT) oppure al diminuire della temperatura (UCGT). Esempi tipici di polimeri utilizzabili per formare idrogeli termosensibili sono chitosano, collagene e agarosio [25].

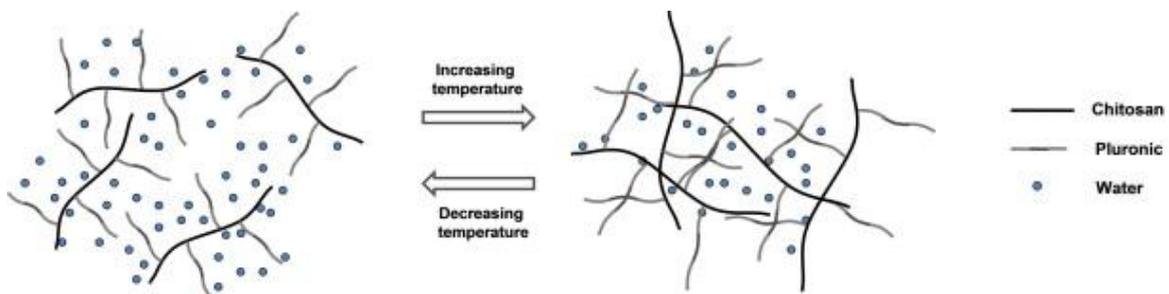


Figura 1.7: Formazione di un idrogelo termosensibile [26].

## Idrogeli chimici

Gli idrogeli chimici, invece, sono caratterizzati dalla presenza di legami covalenti che si formano tra le catene polimeriche, consentendo così di ottenere strutture reticolate particolarmente stabili e difficilmente solubili in solventi. Gli idrogeli chimici consentono pertanto di superare i limiti degli idrogeli fisici, presentando proprietà meccaniche migliorate

e tempi di degradazione più lunghi [27]. Caratteristiche, queste, particolarmente vantaggiose per applicazioni che richiedono resistenza e stabilità meccanica.

Esistono diversi metodi per ottenere idrogeli reticolati chimicamente, ma la maggior parte di essi si basa sulla copolimerizzazione radicalica:

- La reazione a catena (Figura 1.8) sfrutta una reazione radicalica in cui sono coinvolti uno o più monomeri vinilici (dotati di doppi legami tra atomi di carbonio) e, in alcuni casi, un monomero funzionale o un crosslinker, in grado di connettere più catene tra di loro.

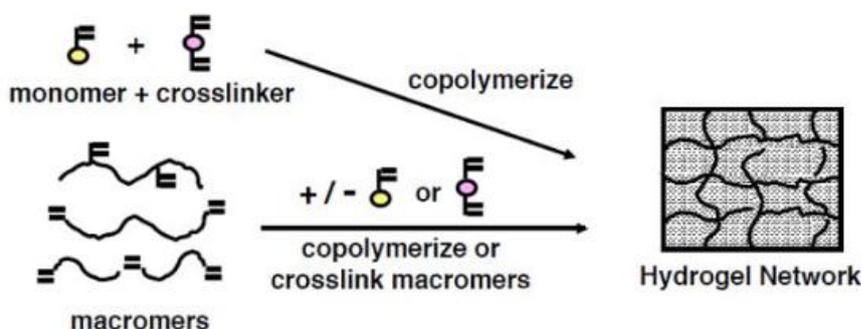


Figura 1.8: Sintesi di idrogeli chimici mediante copolimerizzazione a radicali liberi [28].

Il processo di polimerizzazione radicalica si compone di tre fasi principali: iniziazione, propagazione e terminazione.

Durante l'iniziazione un iniziatore, che può essere fotochimico o termico, genera radicali liberi per rottura omolitica. Nella fase di propagazione i radicali generati attaccano i doppi legami dei monomeri, innescando la crescita delle catene polimeriche. Infine, la crescita delle catene si interrompe (terminazione) quando due catene radicaliche in crescita si incontrano e si uniscono formando un legame covalente stabile ed eliminando i radicali terminali, oppure quando un radicale attivo trasferisce il proprio centro reattivo ad una nuova specie, come un altro monomero, interrompendo la crescita della catena originale ma generando un nuovo radicale che può iniziare una nuova propagazione.

Nel caso in cui si utilizzino monomeri a bassa massa molecolare, è necessario includere nella reazione un crosslinker bifunzionale o multifunzionale. Qualora si partisse invece da macromerici, ossia polimeri funzionalizzati con gruppi reattivi come i metacrilati (come ad esempio la gelatina metacrilata, GelMA, oggetto di questo studio), la formazione della rete può avvenire direttamente tra le catene stesse, senza necessità di ulteriori agenti reticolanti. In entrambi i casi la reazione può essere attivata attraverso iniziatori chimici, oppure tramite irradiazione utilizzando raggi UV, fasci di elettroni, raggi gamma, raggi X o microonde [28].

- La reazione a stadi (Figura 1.9), invece, si basa su reazioni tra polimeri già preformati e agenti reticolanti bifunzionali o multifunzionali che consentono la formazione di legami covalenti tra catene polimeriche ad alto peso molecolare.

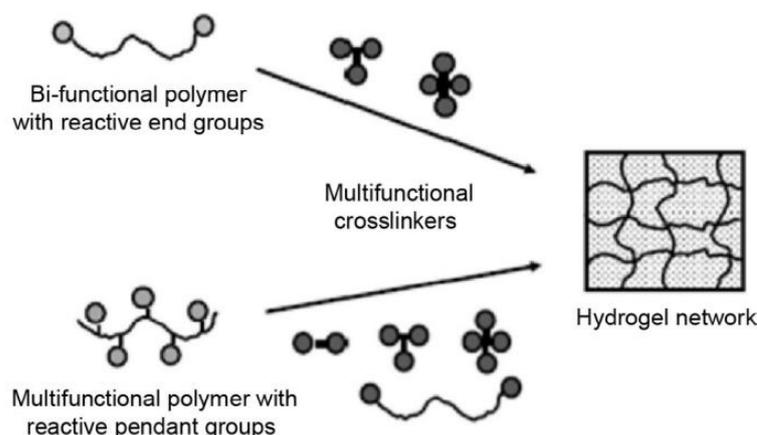


Figura 1.9: Sintesi di idrogeli chimici tramite reticolazione tra agenti reticolanti multifunzionali e polimeri reattivi [28].

La reazione a stadi può avvenire secondo due approcci. Nel primo caso si utilizza un polimero lineare o ramificato contenente gruppi funzionali come ammine, epossidi, tioli o gruppi carbossilici, che viene fatto reagire con un reticolante contenente due o più gruppi reattivi complementari. Ad esempio, un polimero dotato di gruppi amminici può essere reticolato con un agente contenente epossidi tramite reazioni di addizione nucleofila oppure con gruppi aldeidici tramite reazioni di Schiff. Allo stesso modo, un polimero contenente gruppi carbossilici può essere reticolato attraverso

reazioni di formazione di esteri o amidi utilizzando carbodiimmidi o altri agenti attivanti.

Nel secondo approccio si parte da catene polimeriche dotate di gruppi funzionali lungo la loro struttura, come ad esempio idrossili o tioli, che vengono fatte reagire con agenti bifunzionali come il glutaraldeide (che reagisce con gruppi amminici formando ponti imminici) o molecole contenenti doppi legami acrilici, nel caso in cui si impieghino reazioni di Michael (come l'addizione di un tiolo a un gruppo vinilico) [28].

Tra gli idrogeli chimici studiati per le applicazioni nel wound healing, la gelatina metacrilata (GelMA), un biopolimero ottenuto tramite la modifica della gelatina con gruppi metacrilati fotopolimerizzabili, risulta essere un materiale particolarmente promettente nel campo dell'ingegneria tissutale grazie alla sua biocompatibilità, alle sue proprietà meccaniche modulabili, ed anche grazie alla versatilità della sua struttura chimica che offre diverse possibilità di funzionalizzazione [29].

## 1.4 Gelatina Metacrilata (GelMA)

La gelatina è un biopolimero naturale che si ottiene tramite idrolisi parziale del collagene, una proteina naturale presente nei tessuti animali, nonché la più abbondante del corpo umano, costituendo circa il 90% della matrice organica dei tessuti. Data l'elevata biocompatibilità, biodegradabilità, biorisorbibilità, citocompatibilità ed idrofilicità del collagene, ne consegue che i suoi derivati siano tra i materiali più promettenti per la sintesi di idrogeli per applicazioni in ambito biomedicale. Esistono però 28 tipi di collagene, che si differenziano tra loro dal punto di vista strutturale. Il più studiato ed utilizzato in ambito biomedicale risulta però essere il collagene di tipo I, essendo anche il più abbondante nei tessuti. La struttura primaria del collagene, ossia la sua sequenza di amminoacidi, è data da una ripetizione di glicina, prolina e idrossiprolina. Esse sono legate tra di loro mediante legami peptidici, costituendo quella che è la struttura ad  $\alpha$ -elica, ossia la struttura secondaria del collagene. Nel momento in cui tre  $\alpha$ -eliche formano tra loro dei legami ad idrogeno, riescono a costituire una tripla elica destrorsa chiamata tropocollagene che rappresenta la

struttura terziaria del collagene. Le diverse triple eliche si assemblano tra loro formando le microfibrille, costituendo un'unità strutturale ancora più complessa [30]. È possibile osservare le differenti strutture del collagene in Figura 1.10.

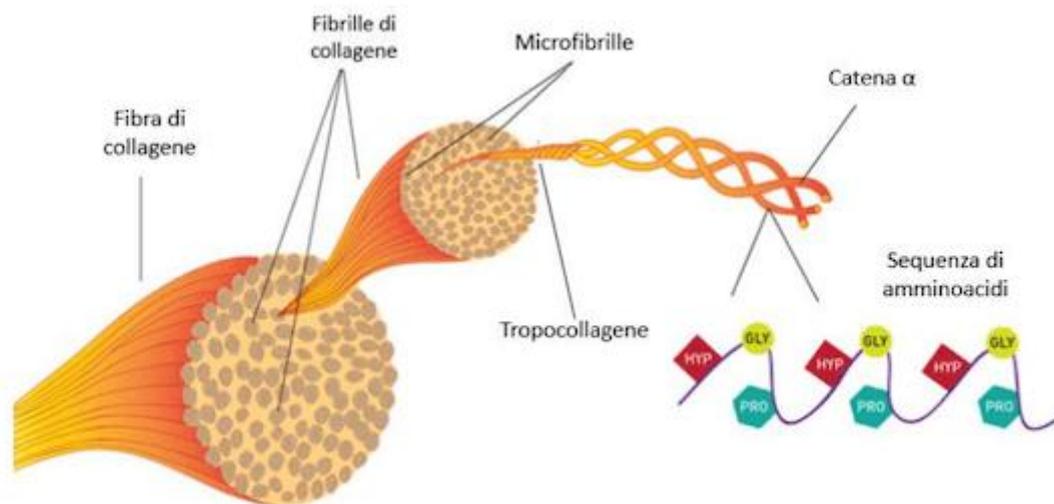


Figura 1.10: Struttura del collagene. <https://www.chimica-online.it/biologia/fibre-collagene.htm>

Data questa struttura caratteristica molto complessa, risulta evidente come possa essere delicato, e di conseguenza costoso (100 mg di collagene hanno un costo di 800 euro circa), estrarre il collagene dai tessuti mantenendone intatta la struttura a tripla elica

Per questo motivo, spesso si opta per l'utilizzo della gelatina come alternativa al collagene. La gelatina, infatti, viene ottenuta tramite denaturazione del collagene, mantenendo così molte delle sue caratteristiche, come biodegradabilità, bioattività, e biocompatibilità [30], ma con un costo decisamente più contenuto.

In Figura 1.11 sono riportati i processi di produzione della gelatina che sono sostanzialmente due:

- Gelatina di tipo B: ottenuta tramite processo di denaturazione del collagene in ambiente alcalino.
- Gelatina di tipo A: ottenuta tramite processo di denaturazione del collagene in ambiente acido.

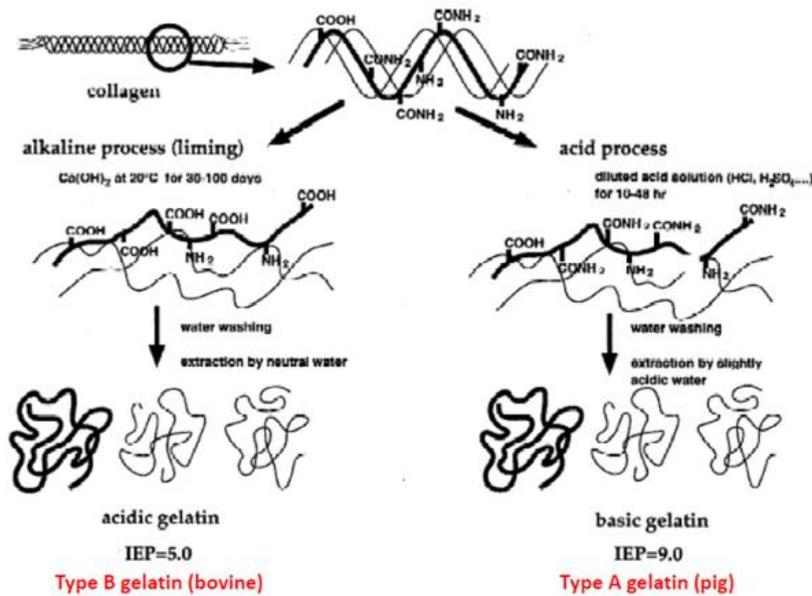


Figura 1.11: Processi di produzione della Gelatina a partire dal collagene [30].

La gelatina possiede quindi la stessa composizione chimica del collagene, ossia le stesse strutture amminoacidiche, perdendo però la struttura a tripla elica che viene completamente denaturata durante il processo. Inoltre, in quanto macromolecola naturale, la gelatina presenta una struttura simile a quella della matrice extracellulare (ECM) nativa, il che la rende particolarmente adatta per la coltura cellulare in vitro [31]. La gelatina contiene infatti la sequenza peptidica RGD (arginina-glicina-acido aspartico) che favorisce la crescita cellulare e contiene motivi degradabili da metalloproteinasi della matrice (MMP) che regolano la degradazione enzimatica della matrice [32],[33].

Un'altra proprietà della gelatina è la sua buona solubilità in ambiente acquoso. Caratteristica questa, che, se da un lato rappresenta un punto a favore in quanto l'acqua è un solvente ottimale e non tossico, dall'altro implica che un eventuale scaffold a base di gelatina debba essere necessariamente reticolato, per garantirne la stabilità meccanica in ambiente acquoso. In particolare, la gelatina può essere reticolata mediante funzionalizzazione dei suoi gruppi laterali, come nel caso della gelatina metacrilata (GelMA) [34].

Van den Bulcke e i suoi collaboratori hanno introdotto per primi una modifica della gelatina che consiste nella sostituzione dei suoi gruppi amminici e/o idrossili con gruppi metacrilici (MA), in modo tale da ottenere un derivato reticolabile con conseguente miglioramento delle

proprietà meccaniche. Tale processo consente di mantenere molte delle caratteristiche bioattive della gelatina come la biocompatibilità, la bassa immunogenicità e la presenza di sequenze RGD, importanti per l'adesione e proliferazione cellulare. Durante la sintesi del GelMA infatti, solo una piccola percentuale dei residui amminoacidici (circa il 5%) viene coinvolta nella reazione, lasciando così intatte le sequenze RGD e, preservandone quindi le funzioni biologiche (Figura 1.12) [35], [36].

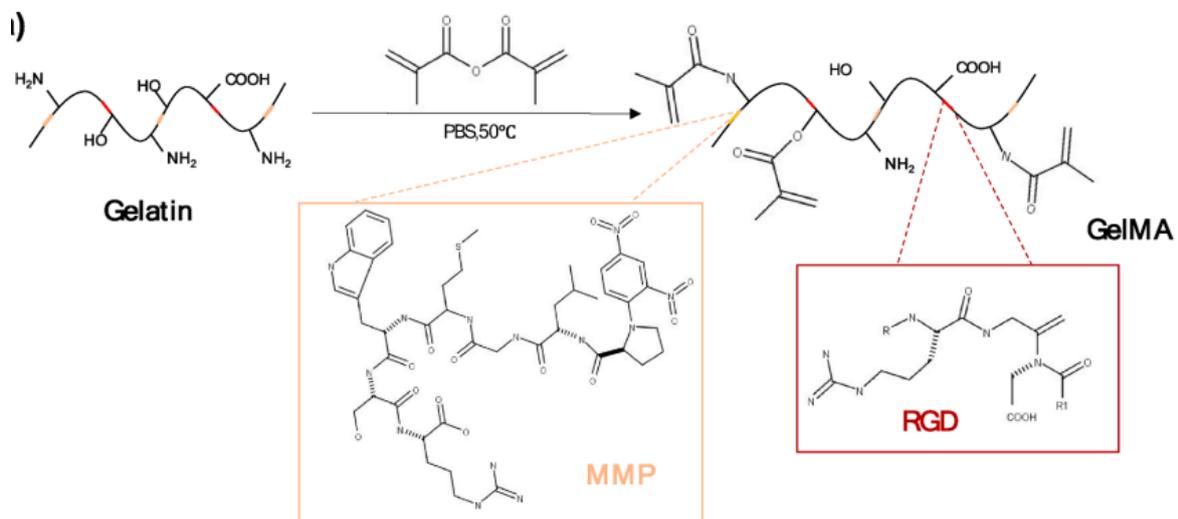


Figura 1.12: Immagine schematica della struttura del GelMA [37].

A differenza della gelatina, la GelMA può essere reticolata in modo controllato attraverso diverse strategie sfruttando la reattività dei gruppi metacrilici, tra cui le più comuni sono la fotopolimerizzazione mediante luce UV o visibile (in presenza di fotoiniziatori quali gli idrossichetoni o i derivati degli ossidi di bisacilfosfina solubili in acqua), le reazioni di tipo enzimatico o le reazioni di Michael.

In particolare, la reticolazione fotoindotta, consente la formazione di strutture tridimensionali stabili e altamente riproducibili (Figura 1.13) rendendo la GelMA un materiale ideale per applicazioni in ingegneria tissutale e bioprinting. Tuttavia, è importante sottolineare che la modifica chimica con gruppi metacrilici, pur offrendo vantaggi in termini di lavorabilità e controllo strutturale, può anche comportare una maggiore citotossicità

rispetto alla gelatina, specialmente in caso di presenza di residui di fotoiniziatori o a causa di una fotopolimerizzazione incompleta [38].

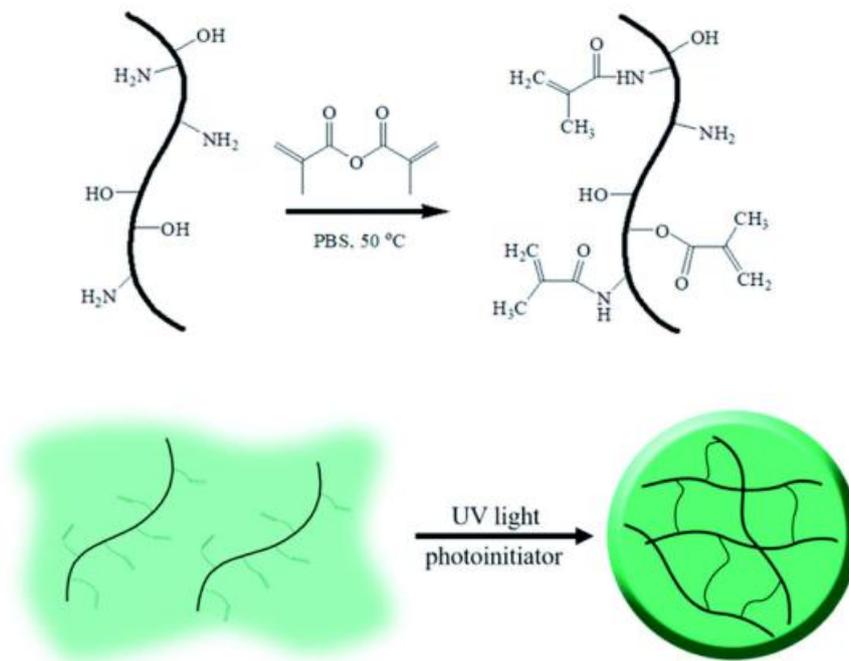


Figura 1.13: Rappresentazione della sintesi di GelMA e della sua fotopolimerizzazione [38].

Rispetto ad altri idrogeli la GelMA presenta un grande vantaggio, ossia la possibilità di modulare le proprietà meccaniche variando diversi parametri come la concentrazione di GelMA, il tipo di fotoiniziatore utilizzato (come il lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate - LAP), il tempo di fotoreticolazione e la dose di radiazione UV impiegata durante la fase di fotopolimerizzazione [39], [40].

Grazie alla sua struttura tridimensionale e alla presenza dei motivi RGD e MMP, la GelMA è ampiamente usata nelle colture cellulari. Inoltre, è utilizzabile anche nell'ambito di autotrapianti e allotrapianti, per accelerare la guarigione e il recupero funzionale delle aree danneggiate [41].

In questo lavoro di tesi, la GelMA rappresenta il materiale di partenza per la realizzazione di un idrogelo da utilizzare nel campo del wound healing. Considerando le sue eccellenti proprietà bioattive ma la limitata adesività intrinseca, la GelMA è stata funzionalizzata chimicamente per enfatizzarne le capacità adesive, al fine di promuovere una migliore interazione con i tessuti danneggiati e favorire il processo rigenerativo.

## 1.5 Meccanismo adesivo della DOPA

Un aspetto cruciale nella progettazione di scaffold riguarda l'adesione in ambienti umidi, in quanto la presenza di acqua interferisce con la formazione di legami interfacciali efficaci e duraturi tra i materiali e tessuti biologici. A tal proposito, l'attenzione dei ricercatori si è concentrata sullo studio di alcuni organismi marini, in particolare di quegli invertebrati capaci di aderire in modo temporaneo o permanente a superfici in condizioni di ambiente dinamico come quello marino.

Tra tutti i molluschi marini, il mitilo blu (*Mytilus edulis*) è stato scelto come modello per la ricerca biomimetica data la sua capacità di attaccarsi ad una varietà di superfici in ambienti acquosi utilizzando un adesivo naturale incredibilmente forte e duraturo. Attualmente, non esistono colle sintetiche che abbiano le stesse proprietà di quelle prodotte da tali molluschi, ovvero che possano essere applicate in ambiente acquoso e che siano allo stesso tempo impermeabili e resistenti alle forze turbolente.

La maggior parte delle biomolecole con proprietà adesive utilizzate nella ricerca appartengono alla famiglia delle scleroproteine. Tuttavia, Waite [42] ha evidenziato come queste proteine posseggano un'insolubilità relativa, una resistenza all'idrolisi proteolitica ed ad altri processi di degradazione. Per questo motivo, l'attenzione si è spostata sulle proteine adesive delle cozze, ovvero proteine polifenoliche atossiche, biodegradabili ed a bassa immunogenicità [43].

Il meccanismo adesivo delle cozze ha le sue origini nel bisso, in particolare nelle placche di adesione dei suoi filamenti, il cui ruolo è quello di legare la cozza alle superfici. Lo stelo del bisso, mostrato in Figura 1.15, è ancorato ai muscoli retrattori bissali, delle strutture flessibili con dimensioni variabili (circa 0,1 mm di diametro e 2-4 cm di lunghezza) con caratteristiche meccaniche differenti, che originano dallo stelo stesso. Ogni filamento è costituito da un nucleo interno flessibile e collagenoso, circondato da uno strato esterno meccanicamente più resistente costituito da proteine polifenoliche reticolate [43].

La struttura del bisso culmina in una placca di dimensioni variabili che possono dipendere sia dalla grandezza dell'animale ma anche dalla sua età. Inoltre, è stato osservato che alcuni fattori ambientali come salinità, temperatura, pH, stagione e tipo di substrato, affiancati ad altri fattori di tipo biologico come età e stato metabolico dell'animale, influenzano l'efficienza e la forza di adesione del bisso alle superfici [44].

La formazione della placca avviene tramite la deposizione di proteine, ad oggi sono state identificate cinque proteine adesive specializzate: Mefp-1, Mefp-2, Mefp-3, Mefp-4 e Mefp-5.

In Figura 1.14 è mostrata la localizzazione delle proteine adesive nel bisso di *M. Edulis*.

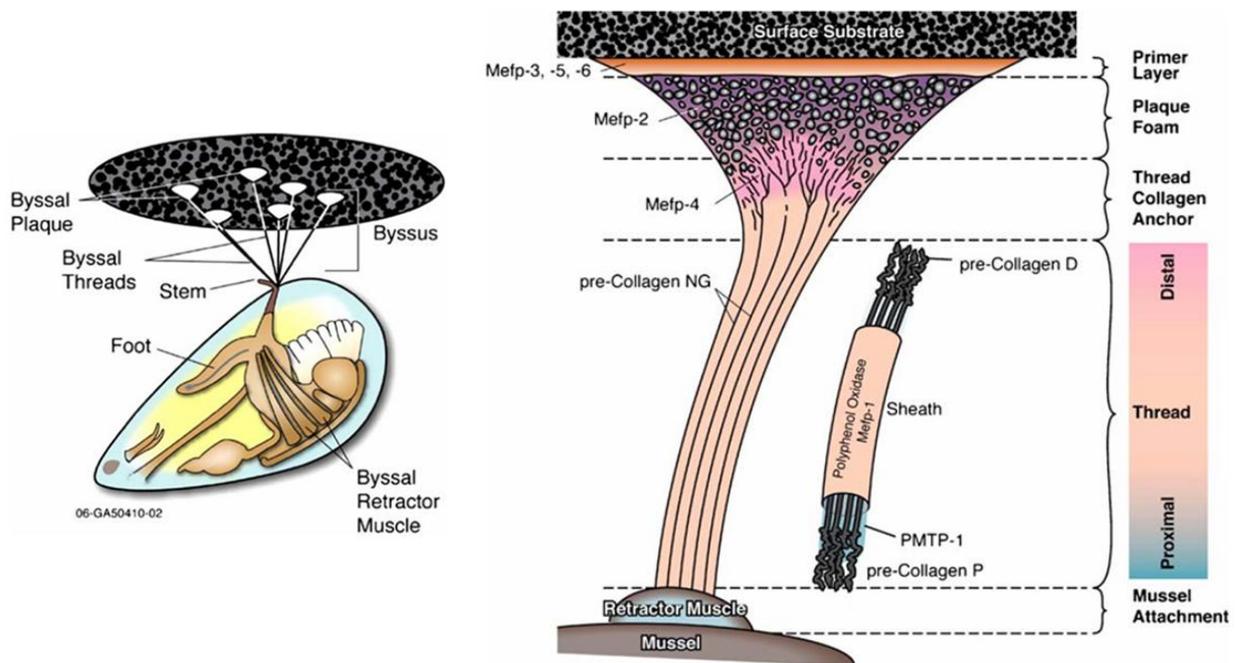


Figura 1.14: A sinistra: Anatomia della specie *M. edulis* e struttura del bisso. A destra: Posizione delle proteine adesive identificate nel bisso di *M. Edulis* [43].

Dato che queste proteine risultano essere molto resistenti in ambiente acquoso, garantendo una salda adesione, si è cercato di sviluppare una colla biologica capace di resistere alle condizioni dinamiche e umide tipiche dell'ambiente in vivo.

In particolare, l'adesione dipende da un componente amminoacidico, la diidrossifenilalanina (DOPA), che si ottiene attraverso un processo di ossidazione a partire dalla tirosina che in ambiente marino tende parzialmente ad ossidarsi in dopachinone (Figura 1.15). Si osservato

che entrambe le forme (quindi DOPA e la sua forma ossidata dopachinone) sono presenti nelle proteine del mollusco e in particolare il dopachinone, coinvolgendo i gruppi chinone, è responsabile del legame con superfici di natura organica che presentano gruppi tiolo o gruppi amminici; la DOPA invece, coinvolgendo i gruppi catecolo, è responsabile delle interazioni con superfici inorganiche, ad esempio quelle metalliche con cui forma legami metallici, ma è in grado anche di formare legami a idrogeno con superfici sia organiche che inorganiche [45]. Nell'ambito della progettazione di scaffold viene generalmente utilizzata la DOPA, in particolare per funzionalizzare idrogeli superficialmente oppure per modificare chimicamente i polimeri precursori, così da ottenere materiali con proprietà adesive.

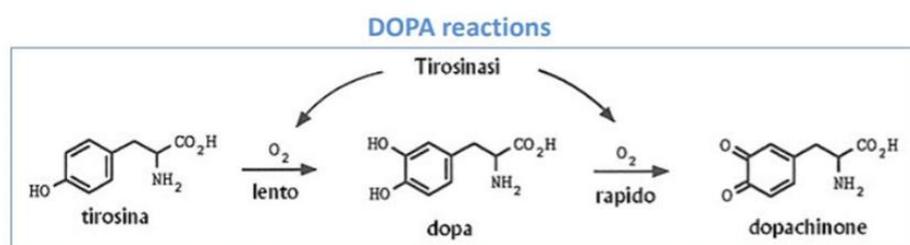


Figura 1.15: Reazione tramite cui si ottiene DOPA e la sua forma ossidata dopachinone. Fonte propria.

## 1.6 Combinazione GelMA-DOPA

La coniugazione della GelMA con la DOPA è un approccio volto ad ottenere degli idrogeli biocompatibili, fotoreticolabili, e che preservino sequenze bioattive utili all'adesione e alla proliferazione cellulare ma che presentino al contempo proprietà adesive migliorate sfruttando la capacità dei gruppi catecolo di interagire con substrati di diversa natura tramite legami a idrogeno e/o interazioni di tipo covalente.

In letteratura sono descritti diversi approcci con cui i ricercatori hanno cercato di integrare GelMA e DOPA. Ad esempio, in un lavoro di Liu et al. (2022) è stato sviluppato un sistema GelMA-DOPA integrato in una matrice nanofibrosa prodotta tramite elettrospinning (Figura 1.16). L'obiettivo era quello di ottenere un materiale con proprietà meccaniche

ottimizzate, ed un'adesività migliorata grazie ad un'ottima distribuzione dei gruppi catecolo all'interno delle fibre [46].

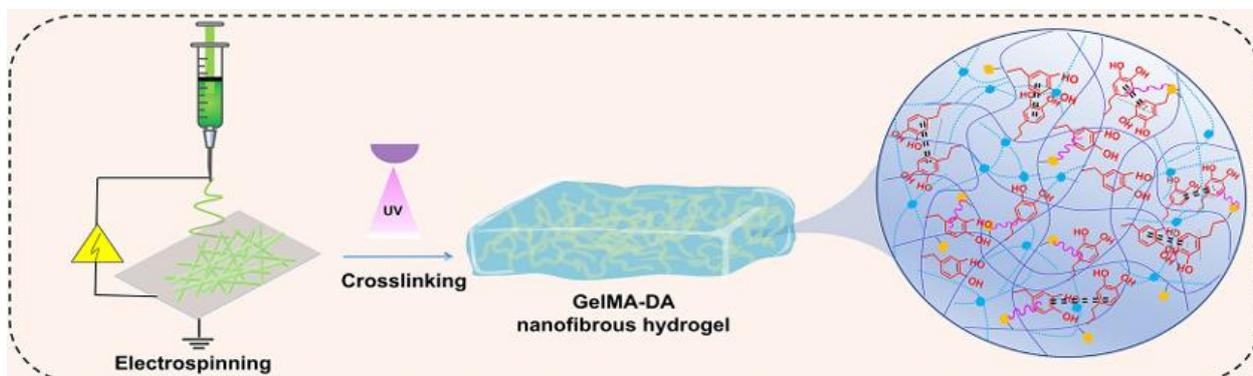


Figura 1.16: Fabbricazione di idrogeli nanofibrosi ottenuti tramite electrospinning [46].

Un altro esempio è fornito dal lavoro di Wang et al (2023) in cui è stato sviluppato, tramite reazione di amidazione, un coniugato GelMA-DOPA quale precursore di idrogeli fotoreticolabili con proprietà adesive da utilizzare nel campo della cura del diabete. Gli idrogeli così ottenuti sono stati poi utilizzati per l'incapsulamento di vescicole cellulare (EVs) al fine di ottenere un rilascio prolungato nell'ambiente dov'è presente la ferita [47].

Altre strategie, invece, prevedono l'inclusione di biomateriali aggiuntivi, come nel caso di Pacelli et al. (2018) in cui, sfruttando un processo di doppia reticolazione, è stato sviluppato un idrogelo (Figura 1.17) costituito da GelMA e alginato, utilizzabile per modulare la differenziazione osteogenica di cellule staminali adulte. La coniugazione con DOPA è stata ottenuta modificando la superficie dell'idrogelo mediante deposizioni di polidopamina. Quest'ultima, legandosi alla superficie, ha generato una superficie adesiva e reattiva in grado di legare farmaci bioattivi come il dexametasone, consentendone un rilascio prolungato [48].

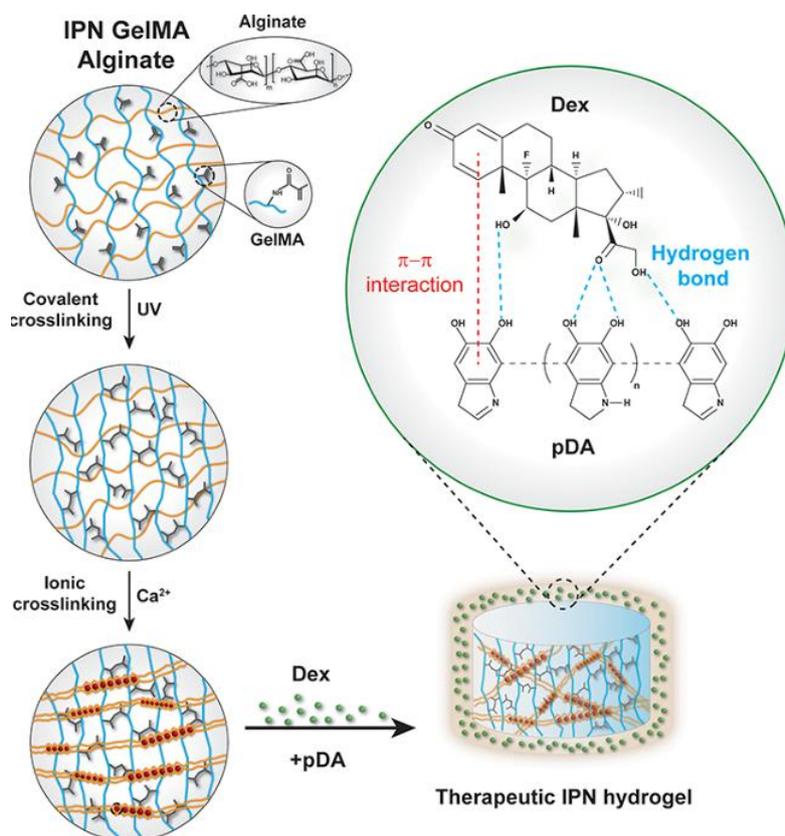


Figura 1.17: Rappresentazione schematica della composizione dell'idrogelo sintetizzato da Pacelli et al. [48].

Questi esempi riportati dimostrano come l'introduzione della DOPA all'interno di sistemi a base di GelMA possa garantire l'acquisizione di proprietà adesive, in particolare in condizioni umide quali quelle fisiologiche.

## 1.7 Principi di fotopolimerizzazione e stampa 3D

La fotopolimerizzazione è un processo chimico che consente la formazione di reti polimeriche tridimensionali attraverso l'esposizione a una sorgente luminosa, generalmente UV o luce visibile, in presenza di uno o più fotoiniziatori. Questo meccanismo risulta essere particolarmente significativo nella sintesi e nella stampa di idrogeli fotosensibili, come nel caso degli idrogeli a base GelMA, dove i gruppi metacrilici presenti lungo la catena polimerica vengono attivati per avviare la reticolazione della rete polimerica [49].

Il processo di fotopolimerizzazione avviene in tre fasi principali:

- Iniziazione: il fotoiniziatore assorbe l'energia luminosa e si scinde generando radicali liberi altamente reattivi;
- Propagazione: i radicali attaccano i doppi legami carbonio-carbonio dando inizio alla formazione della catena polimerica;
- Terminazione: due radicali si combinano, concludendo la crescita della catena polimerica [50].

Considerando il caso della GelMA, in seguito alla generazione di un radicale libero dato dall'esposizione alla luce in presenza di un fotoiniziatore, i gruppi metacrilato presenti sulle catene di GelMA polimerizzano attraverso un meccanismo di polimerizzazione radicalica per addizione, formando così una rete tridimensionale costituita da catene di gelatina collegate tramite brevi segmenti di polimetacrilato (Figura 1.18) [34].

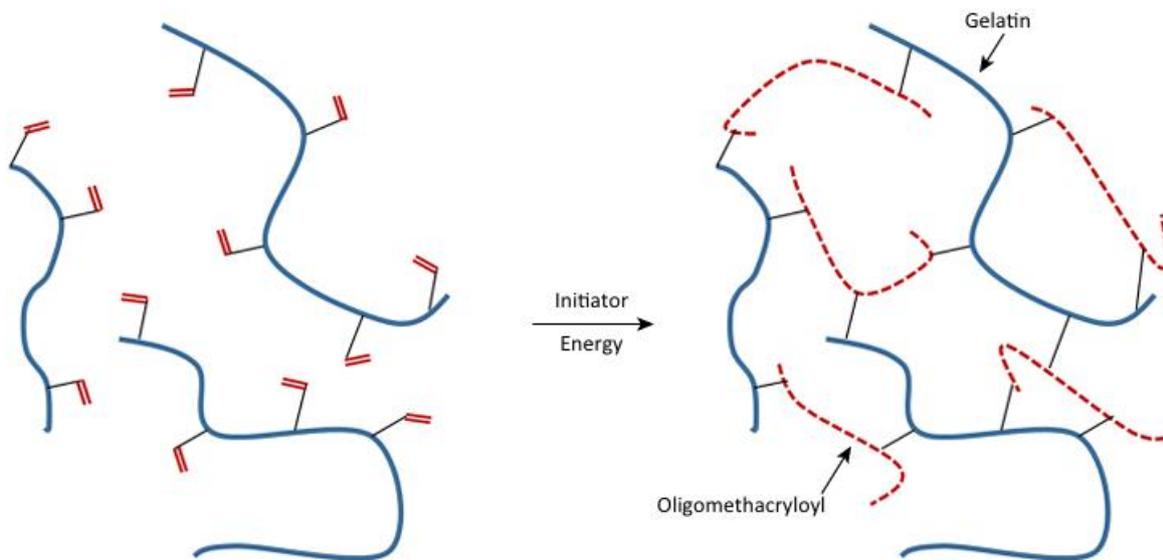


Figura 1.18: Attraverso la polimerizzazione radicalica le catene di gelatina vengono connesse tramite brevi catene di polimetacrilato [34].

La possibilità di controllare con precisione il tempo di reticolazione e di confinare localmente il processo ha fatto della fotopolimerizzazione una tecnica ideale per essere integrata in processi di prototipazione rapida, tra cui la stampa 3D.

La stampa 3D fa parte di quelle che vengono definite come tecniche di prototipazione rapida e permettono di ottenere scaffold in maniera perfettamente riproducibile grazie ad un'interfaccia software che permette di regolarne la produzione. In queste tecniche si parte sempre dal modello 3D che si vuole ottenere costruendolo tramite programmi CAD. Una volta ottenuto il modello, lo si trasforma in un file STL discretizzandolo in meche triangolari. Il passaggio successivo è lo slicing in cui si passa dalla struttura 3D in un numero discreto di strutture bidimensionali. Per ogni layer bidimensionale si identificano dei parametri chiave come spessore e geometria e tali informazioni vengono trasformate in Gcode, ossia il linguaggio che può essere letto dalla macchina con cui verrà realizzata la struttura desiderata. Quando lo scaffold è pronto viene ripulito dai residui e rifinito prima di essere utilizzato. In figura 1.19 è possibile osservare in uno schema i passaggi appena descritti.

Le tecniche di prototipazione rapida presentano diversi vantaggi come la possibilità di ottenere forme complesse che possano rispecchiare il difetto da riparare nel tessuto del paziente garantendo allo stesso tempo un gran livello di automazione che porta ad un rapporto favorevole tra il costo della tecnica e la sua efficienza [51].

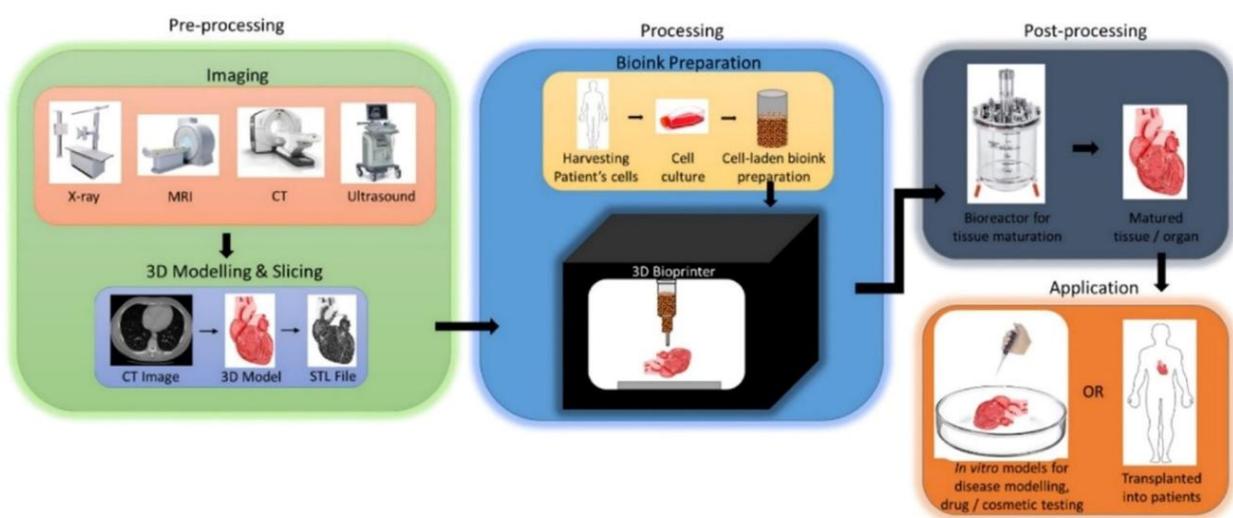


Figura 1.19: Rappresentazione schematica di un processo di prototipazione rapida [52]

Tra le varie tecnologie di stampa 3D disponibili, quelle basate sulla fotopolimerizzazione si sono dimostrate particolarmente efficaci per la fabbricazione di idrogeli, grazie alla possibilità

di innescare la reticolazione del materiale tramite esposizione selettiva alla luce. In queste tecniche, la solidificazione di un materiale liquido fotosensibile avviene per esposizione strato per strato e il processo può essere implementato in due configurazioni: bottom-up e top-down.

Nella configurazione bottom-up (Figura 1.16), utilizzata in questo lavoro di tesi, il materiale viene fotoreticolato dal basso verso l'alto. Il piano di stampa è posizionato al di sopra della vaschetta contenente la resina fotopolimerizzabile e si solleva progressivamente ad ogni layer stampato mentre la luce viene proiettata dal basso. Questo approccio presenta diversi vantaggi come la minore quantità di materiale richiesta, una maggiore risoluzione verticale e una minore esposizione alla luce diffusa, tuttavia, richiede un'adeguata ottimizzazione del sistema di distacco del layer, per evitare eventuali deformazioni dovute alla forte adesione della struttura alla superficie.

Nella configurazione top-down (Figura 1.20) il piano di stampa si trova al di sotto della vaschetta e la luce viene proiettata dall'alto. Questo consente una polimerizzazione più stabile nelle prime fasi ma comporta un maggiore spreco di materiale e una minore compatibilità con materiali molto viscosi o delicati, come nel caso degli idrogeli [53].

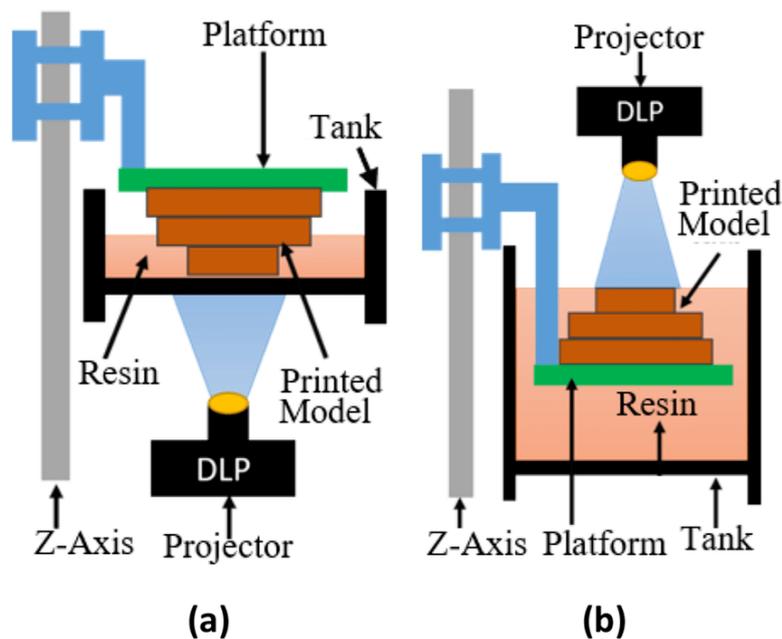


Figura 1.20: (a) configurazione bottom-up; (b) configurazione top-down [54].

Tra le tecniche di stampa 3D basate sulla fotopolimerizzazione, la stampa Digital Light Processing (DLP) rappresenta una delle metodologie più utilizzate per la realizzazione di idrogeli ad alta risoluzione. Questa tecnica, utilizzata nel presente lavoro di tesi, si basa sulla proiezione di immagini digitali strato per strato, mediante l'impiego di un chip costituito da microspecchi mobili (DMD – Digital Micromirror Device) che consente la reticolazione simultanea di interi layer del modello tridimensionale (Figura 1.21). La tecnologia DLP si distingue per la capacità di esporre un intero layer del modello 3D in una singola proiezione, garantendo così una maggiore velocità di stampa e uniformità nella reticolazione. Il sistema può essere configurato sia in modalità bottom-up che top-down, ma trova ampia applicazione nella configurazione bottom-up in quanto è possibile ridurre l'uso del materiale, aumentare la risoluzione, permettendo facilmente la stampa di materiali soft come gli idrogeli.

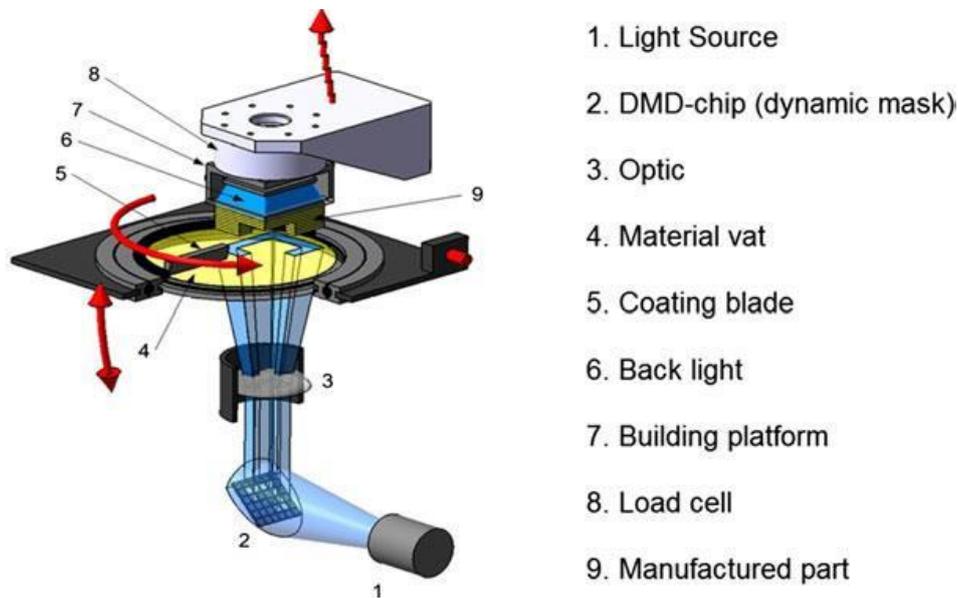


Figura 1.21: Rappresentazione schematica di una stampa DLP basata su dispositivo a micromirror digitali (DMD) [55].

Grazie all'elevata precisione geometrica e alla possibilità di personalizzare la progettazione, la stampa DLP viene oggi largamente impiegata nell'ambito ingegneria tissutale per la produzione di scaffold, nella cura personalizzata delle ferite e nello sviluppo di sistemi intelligenti per il rilascio controllato di farmaco o altre sostanze bioattive [56].

## 1.8 Obiettivo del lavoro di tesi

A tal proposito, il presente lavoro di tesi si propone di sviluppare e caratterizzare un idrogel bioadesivo a base di GelMA funzionalizzata con gruppi catecolo derivanti dalla DOPA, ottenuto con una strategia di coniugazione volta a garantirne la compatibilità cellulare ed a migliorarne al tempo stesso l'adesione, per potenziali applicazioni nell'ambito della medicina rigenerativa e, in particolare, nel wound healing. Per ottenere la macromolecola di interesse massimizzando al contempo la densità di gruppi catecolo nella rete polimerica della GelMA, si è adottato un approccio sintetico basato su una sequenza di tre reazioni. Dapprima, la gelatina è stata parzialmente funzionalizzata con gruppi metacrilici per renderla fotopolimerizzabile. Successivamente, la GelMA così ottenuta è stata modificata tramite succinilazione, con l'obiettivo di introdurre un numero maggiore di gruppi carbossilici rispetto a quelli presenti lungo la catena. Infine, la dopamina è stata legata covalentemente ai gruppi carbossilici introdotti lungo la GelMA sfruttando la chimica delle carbodiimmidi, ottenendo così un derivato della GelMA (GelMA-COOH-DOPA) con un'elevata densità di gruppi catecolo.

Il materiale sintetizzato è stato successivamente caratterizzato per analizzarne le proprietà chimico-fisiche, e meccaniche, nonché per valutarne la risposta biologica in vitro.

L'obiettivo complessivo è dimostrare che, un aumento controllato della quantità di gruppi catecolo, consente di ottenere un idrogel maggiormente adesivo, mantenendo allo stesso tempo biocompatibilità e reticolabilità, rendendolo pertanto un candidato promettente per applicazione nel wound healing e nella medicina rigenerativa.

## 2. Materiali e Metodi

### 2.1 Materiali

Gelatina (Bloom 50-120, tipo B, G6650), soluzione salina tamponata con fosfati (DPBS, D1408), anidride metacrilica (MAA, 276685), , acido 2-(N-Morpholin)etan solfonico (MES), 1-etil-3 (3-dimetilaminopropil) carbodiimide (EDC), N-idrossisuccinimide (NHS), dopamina cloridrato, acido cloridrico (HCl), dimetilsolfossido (DMSO), anidride succinica, trietilammina, idrossido di sodio, e Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate sono stati acquistati da Merck Italia e utilizzati senza ulteriori purificazioni.

#### 2.1.1 Sintesi della GelMA

La GelMA si ottiene tramite una reazione di metacrilazione tra l'anidride metacrilica ed i gruppi amminici e ossidrilici presenti lungo la catena della gelatina (Figura 2.1), che permette di ottenere dei macromeri funzionalizzati con gruppi metacrilici. [34]

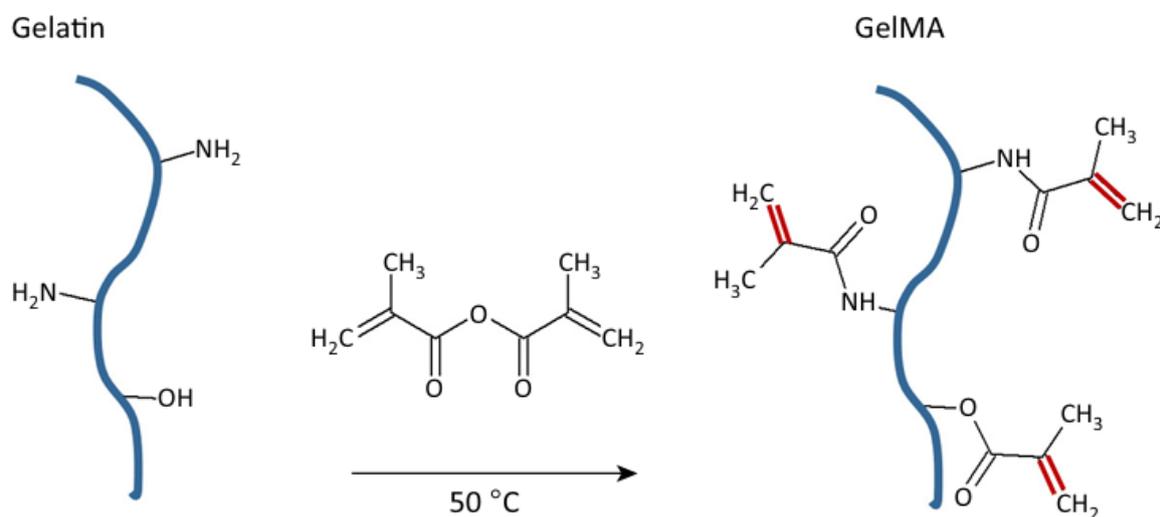


Figura 2.1: La reazione dell'anidride metacrilica con i gruppi amminici e ossidrilici presenti sulla gelatina porta alla formazione dei macromeri di GelMA [34].

Utilizzando la GelMA così ottenuta, è possibile fabbricare idrogeli in presenza di un fotoiniziatore sfruttando una reazione di polimerizzazione fotoindotta. Per poter progettare

un idrogelo a base di GelMA bisogna dapprima selezionare un opportuno grado di funzionalizzazione (DoF) della gelatina, che dipende dalla quantità di anidride metacrilica utilizzata nella sintesi dei macromeri della GelMA [34].

Per questo lavoro di tesi, si è scelto di ottimizzare il protocollo di sintesi per ottenere un DoF (definito d'ora in avanti nel testo come "Low") pari al 60% cca. Questo grado di funzionalizzazione garantisce un buon equilibrio tra reticolabilità e biocompatibilità, mantenendo elevate le proprietà biologiche tipiche della gelatina.

In particolare, la GelMA è stata sintetizzata seguendo il protocollo riportato da Van Den Bulcke [32]. Per prima cosa, 10 g di gelatina di tipo B sono stati sciolti in una soluzione 10% w/v di DPBS alla temperatura di 50 °C. Successivamente è stata aggiunta tramite l'impiego di un gocciolatore una quantità di anidride metacrilica pari a 2 ml in modo da ottenere il grado di funzionalizzazione voluto ("Low"). La reazione è stata stoppata dopo due ore aggiungendo pari volume di DPBS. La soluzione ottenuta è stata poi inserita in membrane da dialisi di cellulosa e sottoposta a dialisi per 7 giorni in acqua distillata alla temperatura di 40 °C con un ricambio della stessa due volte al giorno in modo tale da rimuovere l'anidride metacrilica non coinvolta nella reazione. In ultimo, la soluzione ottenuta è stata liofilizzata per 7 giorni così da ottenere la GelMA sotto forma di una spugna bianca (Figura 2.2).



*Figura 2.2: GelMA liofilizzata. Fonte propria.*

## 2.1.2 Sintesi della GelMA-COOH

Il passaggio successivo consiste nell'ottenere una variante modificata della GelMA ottenuta tramite reazione di succinilazione. Questo processo sfrutta la reazione chimica tra l'anidride succinica ed i gruppi amminici residuali presenti nella GelMA, ovvero quei gruppi amminici volutamente non sostituiti durante la reazione metacrilazione (Figura 2.3), al fine di introdurre un maggior numero di gruppi carbossilici (-COOH) sulla catena polipeptidica della GelMA. Tali gruppi offrono la possibilità di ulteriori funzionalizzazioni [57] e verranno sfruttati nello step successivo per legare la dopamina alla GelMA.

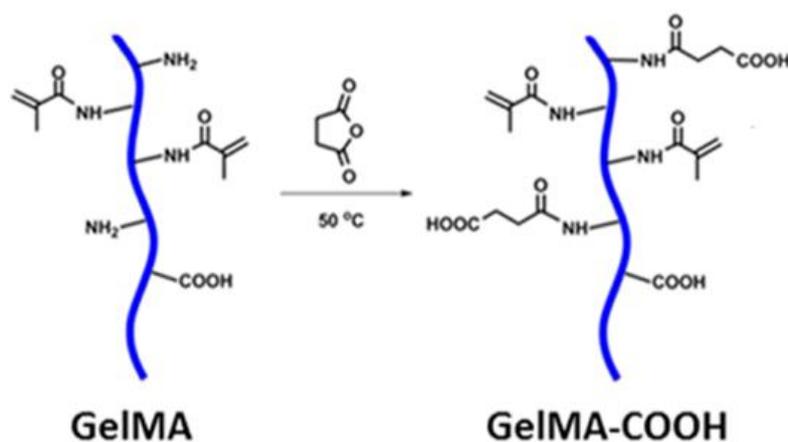


Figura 2.3: Rappresentazione schematica della reazione di succinilazione della GelMA [36]

La GelMA ottenuta dalla precedente reazione è stata pertanto impiegata per lo step di sintesi successivo seguendo il protocollo di Cheng et al. [36]. In particolare, 2,0 g di GelMA sono stati disciolti in 40 mL di DPBS alla temperatura di 50 °C in condizioni di agitazione continua. Successivamente è stato aggiunto alla soluzione 1,0 mL di trietilammina ed una soluzione di anidride succinica (1,0 g) disciolta in 20 mL di DMSO mediante l'ausilio di un gocciolatore (Figura 2.4). La reazione ha potuto proseguire per tutta la notte, per poi essere diluita con 100 mL di PBS. La soluzione è risultata neutra mediante misurazione del pH con cartina al tornasole, qualora in pH misurato fosse diverso da quello neutro è necessario

correggerlo mediante l'aggiunta graduale di una soluzione 0,1 M di HCl. La soluzione così ottenuta è stata posta membrane da dialisi per una settimana a temperatura ambiente per rimuovere le impurità ed infine liofilizzata così da ottenere il macromero GelMA-COOH sotto forma di una spugna bianca.



*Figura 2.4: Set up sperimentale per la sintesi della GelMA-COOH. Fonte propria.*

### 2.1.3 Sintesi della Gelma-COOH-DOPA

Il terzo step di sintesi è finalizzato al conferimento delle proprietà adesive al materiale. In particolare, la DOPA è stata legata covalentemente alla catena della GelMA-COOH sfruttando la chimica delle carbodiimmidi, [46] (Figura 2.5).

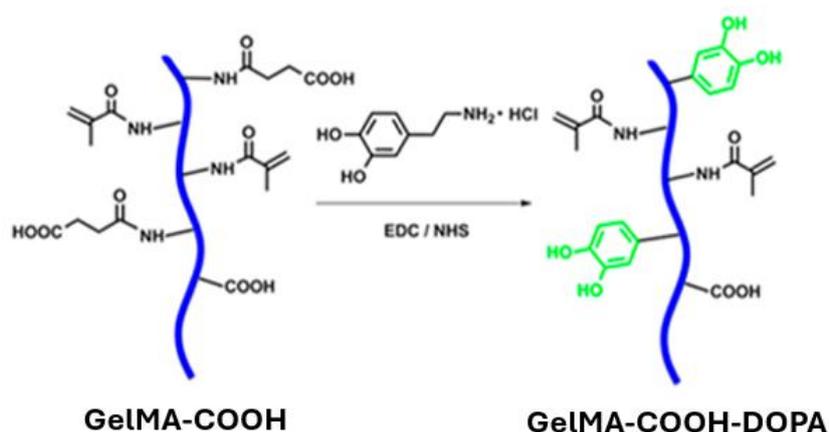


Figura 2.5: Rappresentazione schematica della reazione tra GelMA-COOH e DOPA. [36]

Per funzionalizzare la GelMA-COOH con la DOPA, è stato seguito il protocollo di Cheng et al. [36]. Per prima cosa, la GelMA-COOH (1,0 g) ottenuta dalla precedente sintesi è stata disciolta in una soluzione di MES buffer (50mM, pH 5) ad una temperatura di 30 °C. La soluzione è stata bubblata per 15 minuti con Argon in modo da ottenere un ambiente inerte. Sono quindi state aggiunti EDC (0,20 g), NHS (0,30 g) e dopamina cloridrato (0,20 g) sempre sotto flusso di Argon per evitare fenomeni ossidativi. La soluzione è stata tenuta sotto agitazione continua in ambiente inerte per tutta la notte ad una temperatura controllata di 25°C (il set-up sperimentale è riportato in Figura 2.6: per poter lasciar avvenire la reazione in ambiente inerte, è stato adoperato un palloncino carico di argon, collegato al pallone di reazione mediante una siringa). Successivamente, la soluzione è stata sottoposta a dialisi in HCl 0.01 M per quattro giorni per rimuovere le impurità ed infine liofilizzata.



*Figura 2.6: Set up sperimentale per la sintesi della GelMA-COOH-DOPA. Fonte propria.*

## **2.1.4 Sintesi GelMA-DOPA**

Per poter effettuare alcuni confronti nelle caratterizzazioni, è stato anche prodotto un lotto di GelMA-DOPA seguendo gli stessi passaggi del paragrafo 2.1.3, ma utilizzando con la differenza la GelMA al posto della GelMA-COOH durante la sintesi.

## **2.1.5 Preparazione delle formulazioni**

Le formulazioni fotoreticolabili di GelMA, GelMA-COOH, GelMA-COOH-DOPA e GelMA-DOPA sono state preparate solubilizzando i materiali in acqua deionizzata a diverse concentrazioni: 10%, 15% e 20% w/v. Per fare avvenire la fotoreticolazione, è stato aggiunto a ciascuna soluzione il fotoiniziatore Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP), con concentrazioni di 2,5 o 5,0 mg/mL. Le soluzioni sono state omogeneizzate mediante l'utilizzo del sonicatore a 45°C per 15 minuti, al fine di garantire la completa

dissoluzione del materiale e del fotoiniziatore. La scelta di testare diverse concentrazioni di ciascun materiale e del fotoiniziatore è stata effettuata per valutare l'influenza della densità polimerica sulla fotoreticolazione, al fine di individuare la concentrazione ottimale per ottenere gel stabili e rapidamente reticolabili durante l'irraggiamento con UV.

## **2.2 Caratterizzazione dei materiali**

### **2.2.1 Spettroscopia infrarossa**

La spettroscopia infrarossa (IR) è una tecnica analitica che consente di identificare un dato materiale sfruttando le interazioni che intercorrono tra le radiazioni elettromagnetiche nel campo dell'infrarosso ed i legami chimici. Questa tecnica si basa sull'interazione tra una radiazione policromatica (compresa tra 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ ) e le molecole del campione. Quando la radiazione incide sul materiale, solo le frequenze corrispondenti ai moti vibrazionali dei legami chimici presenti vengono assorbite, mentre le altre vengono trasmesse senza modifiche. L'assorbimento si verifica se la frequenza della radiazione è in risonanza con una vibrazione molecolare attiva nel dipolo: in questo caso, parte dell'energia viene trasferita al campione, causando una riduzione dell'intensità del raggio trasmesso. Al contrario, se non vi è corrispondenza, il raggio attraversa il campione senza variazioni di intensità. Il risultato finale è uno spettro IR che rappresenta l'assorbanza in funzione della frequenza (espressa in numero d'onda,  $\text{cm}^{-1}$ ). L'analisi dello spettro consente di ottenere informazioni qualitative sulla composizione del materiale, valutando la posizione, l'intensità e la forma dei picchi caratteristici, ciascuno associato a specifiche vibrazioni di legami chimici.

Per effettuare l'analisi è stato utilizzato lo spettrofotometro FT-IR Nicolet iS50 in modalità ATR (Figura 2.7), che consente di effettuare un'analisi prettamente superficiale del materiale in esame (profondità di indagine che va da 0,5 a 5 micron). [58]



Figura 2.7: FT-IR Nicolet iS50 in modalità ATR. Fonte: <https://www.thermofisher.com>

Gli spettri sono stati registrati tra  $4000\text{-}550\text{ cm}^{-1}$ , ed infine analizzati utilizzando il software *Omnisc*. Sono stati analizzati i materiali seguenti: Gelatina B, GelMA low, GelMA-COOH, GelMA-COOH-DOPA, e GelMA-DOPA.

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

La spettroscopia NMR è un'analisi che permette di caratterizzare le molecole dal punto di vista chimico, determinandone la struttura molecolare. Più nello specifico si analizzano le relazioni che intercorrono tra le radiazioni nel campo delle radiofrequenze (4 e 900 MHz) ed i nuclei di specifici atomi presenti nel campione. L'analisi NMR scelta in questo caso è quella protonica, in cui si prende in considerazione il protone ( $^1\text{H}$ ) che, avendo un'abbondanza naturale elevata, garantisce in uscita un segnale ben definito. Dal punto di vista del funzionamento dell'analisi, si identificano due fasi:

1. Si effettua la magnetizzazione del campione imponendo un campo magnetico esterno in modo tale che i vettori del momento angolare del nucleo atomico che prima erano disposti in modo casuale si allineino parallelamente alla direzione del campo magnetico;
2. Si colpisce il campione con le radiazioni elettromagnetiche nel campo delle radiofrequenze in modo tale che alla frequenza di risonanza essi vadano incontro ad un fenomeno di risonanza.

A questo punto, si registra il segnale che viene rilasciato dai nuclei durante la fase di rilassamento ottenendo un segnale chiamato FID. Tale segnale viene elaborato matematicamente applicando la trasformata di Fourier fino ad ottenere in uscita lo spettro NMR desiderato. Per eliminare la variabilità dello strumento gli spettri vengono riportati in intensità in funzione del chemical shift (spostamento chimico,  $\delta$ , fornito in ppm). [59] [60]

Per questo lavoro di tesi è stato utilizzato lo spettrometro Bruker Avance III HD (300 MHz) (Figura 2.8), e l'analisi è stata effettuata in fase liquida solubilizzando una piccola quantità di materiale in esame (cca 10 mg) in acqua deuterata (D<sub>2</sub>O). Questa misurazione è stata effettuata presso l'Università di Cagliari, grazie alla preziosa collaborazione del gruppo della Prof.ssa Annalisa Chiappone.



Figura 2.8: Spettrometro Bruker Avance III HD. Fonte: <https://www.bruker.com>

### 2.2.3 Spettroscopia UV-VIS

La spettroscopia UV-VIS è una tecnica di spettrofotometria di assorbimento che interessa le radiazioni luminose della regione dello spettro elettromagnetico appartenenti al campo del visibile (350 – 700 nm) e del vicino ultravioletto (200 – 350 nm). Le radiazioni in queste gamme di lunghezza d'onda possiedono energia sufficiente per provocare delle transizioni energetiche degli elettroni esterni delle molecole sia che essi siano o meno impegnati in un legame. Quando un fascio di luce attraversa una soluzione contenente specie assorbenti, una parte della radiazione viene assorbita in corrispondenza delle lunghezze d'onda

caratteristiche della molecola, mentre la parte restante viene trasmessa. L'intensità dell'assorbimento dipende direttamente dalla concentrazione del composto assorbente e consente di ottenere informazioni qualitative (presenza di una specie) ma anche informazioni quantitative (concentrazione). Lo spettro risultante riporta l'assorbanza in funzione della lunghezza d'onda e l'analisi delle bande di assorbimento consente di caratterizzare i composti in analisi.

Appositi dispositivi detti rivelatori sono in grado di misurare l'intensità del flusso luminoso, vengono misurate:

- $I_0$ : intensità del flusso luminoso all'ingresso della cella con il campione;
- $I$ : intensità del flusso luminoso all'uscita della cella con il campione.

La frazione di luce trasmessa rispetto a quella incidente è definita trasmittanza  $T$  (Equazione (1)) ed esprime quale frazione della luce incidente ha attraversato il campione senza essere assorbita e può assumere valori compresi tra 0 e 1.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

L'entità della radiazione assorbita è detta più comunemente assorbanza  $A$  che è pari al logaritmo del reciproco della trasmittanza (Equazione (2)).

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I} \quad (2)$$

Secondo la Legge di Lambert – Beer (Equazione (3)) è possibile calcolare la concentrazione di campione in funzione del suo assorbimento.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (3)$$

Dove:

- $A$  = assorbanza del campione
- $\varepsilon$  = coefficiente di estinzione molare, specifico per ogni sostanza
- $c$  = cammino ottico [cm]
- $d$  = concentrazione [mol/L]

Dunque, l'assorbanza è proporzionale sia alla concentrazione della sostanza assorbente sia allo spessore dello strato attraversato, per cui più elevata è la concentrazione delle molecole che passano dallo stato fondamentale a quello eccitato, maggiore sarà l'assorbanza. [61]

Per questo lavoro di tesi è stato utilizzato lo spettrofotometro Cary 5000 (Figura 2.9) e l'analisi è stata condotta valutando l'assorbimento di soluzioni acquose contenenti l'analita in esame nell'intervallo spettrale compreso tra 200 e 500 nm. Sono state realizzate una serie di soluzioni acquose contenenti dopamina cloridrato in concentrazioni differenti in un range da 0,05 a 1 mM, per ottenere una curva di calibrazione, mentre le soluzioni di GelMA, GelMA-COOH, GelMA-COOH-DOPA e GelMA-DOPA sono state preparate ad una concentrazione di 2 mg/mL in acqua deionizzata. I valori di assorbanza a 280 nm sono stati comparati alla curva di calibrazione per calcolare la quantità di gruppi catecolo. La scelta della lunghezza d'onda a 280 nm è motivata dalla presenza di un picco di assorbimento caratteristico dei gruppi aromatici contenenti anelli catecolici, come quelli presenti nella dopamina, che mostrano una forte assorbanza in questa regione dello spettro UV-VIS. [36]



Figura 2.9: Spettrofotometro Cary 5000. Fonte: <https://www.agilent.com>

## 2.2.4 Fotoreologia

Le analisi di fotoreologia vengono utilizzate per studiare come una determinata formulazione cambia le sue proprietà in seguito ad un irraggiamento luminoso, potendo ottenere informazioni circa la tempistica con cui questo processo avviene, sulle cinetiche di transizione

sol-gel e infine informazioni sulle proprietà meccaniche. Lo strumento utilizzato è il reometro il cui set-up prevede la presenza di un piatto inferiore fermo e di uno superiore che si abbassa fino ad entrare in contatto con il campione che viene caricato tra i due piatti. Nelle analisi di tipo fotoreologico, in particolare, il piatto inferiore deve consentire l'irraggiamento luminoso che viene fornito dal basso; pertanto, si possono utilizzare piatti in quarzo o in vetro (Figura 2.10). L'analisi svolta è condotta nel tempo, ciò significa che l'ampiezza della deformazione e la frequenza di oscillazione vengono mantenute costanti e vengono monitorati i valori di  $G'$  e  $G''$  nel tempo. Le curve che si ottengono riportano in ordinata i moduli  $G'$  e  $G''$  che danno informazioni rispettivamente sul comportamento elastico e viscoso del campione, in ascissa è invece riportato il tempo. Si può identificare se il sistema abbia un comportamento sol o gel a seconda della mutua posizione delle due curve: se  $G' > G''$  la formulazione si comporta come un gel; viceversa, se  $G'' > G'$  allora il sistema è in fase sol. [62].



Figura 2.10: Set up reometro per analisi di fotoreologia. [63]

Per le prove di fotoreologia è stato utilizzato il reometro Anton Paar MCR 302 con una configurazione di tipo piatto-piatto (con diametro del piatto pari a 25 mm, piatto inferiore in vetro), equipaggiato con una lampada UV Hamamatsu LC8. (Figura 2.11)



Figura 2.11: A sinistra un'immagine del reometro Anton Paar MCR; a destra un'immagine della lampada UV Hamamatsu LC8. Fonte: <https://www.anton-paar.com> <https://www.hamamatsu.com/>

Una volta impostati i parametri del test, viene fatta partire la prova monitorando i valori di  $G'$  e  $G''$ , viene poi accesa la luce che irradia il campione per un tempo definito. Viene infine monitorato il valore di  $G'$  e  $G''$  fino al raggiungimento del plateau.

Le prove di fotoreologia sono state effettuate su formulazioni di GelMA, GelMA-COOH e GelMA-COOH-DOPA preparate come descritto nel paragrafo 2.1.5. Sul piatto in vetro del reometro è stata posizionata una quantità di circa 200  $\mu\text{L}$ . I parametri utilizzati per effettuare le prove di fotoreologia sono riportati nella tabella 2.1.

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

Tabella 2.1: Parametri utilizzati durante la prova di fotoreologia

## 2.2.5 Swelling

La caratteristica fondamentale di un idrogelo è proprio la sua capacità di rigonfiare se immerso in acqua. L'acqua assorbita può essere di due tipologie: acqua legata ed acqua libera. Immergendo in acqua un idrogelo secco, l'acqua tenderà ad interagire legandosi con le catene idrofiliche, iniziando a rigonfiare. Si parla in questo caso di acqua legata primaria. Successivamente, l'idrogelo espone le sue parti meno idrofiliche alle quali si legherà la cosiddetta acqua secondaria. A questo punto si è giunti a saturazione completa di tutti i gruppi in grado di legarsi con l'acqua, il resto dell'acqua assorbita è perciò definita come libera essendo spinta all'interno dell'idrogelo grazie alla pressione osmotica. Si raggiunge una situazione di equilibrio, detta equilibrio di swelling, in cui la pressione osmotica e la forza elastica del network polimerico si bilanciano.

Il test di swelling consiste nel pesare un campione di idrogelo secco ed immergerlo in un mezzo acquoso. Dopo un intervallo di tempo prestabilito il campione viene prelevato e pesato. Il parametro che si vuole calcolare è il grado di swelling calcolato tramite la Formula (4) dove  $W$  rappresenta il peso del campione dopo il rigonfiamento e  $W_0$  il peso iniziale del campione liofilizzato. [64]

$$SW \% = \frac{W - W_0}{W_0} \times 100 \quad (4)$$

Le prove di swelling sono state effettuate su campioni fotopolimerizzati di GelMA, GelMA-COOH, GelMA-COOH-DOPA e GelMA-DOPA, con una concentrazione del 20% di polimero e 5,0 mg/mL di fotoiniziatore, ottenuti come descritto nel paragrafo 2.1.5.

Le soluzioni ottenute sono state colate in degli stampi cilindrici in silicone in una quantità di circa 150  $\mu$ L e irraggiate tramite l'utilizzo della lampada UV Hamamatsu LC8 per 5 minuti ad un'intensità di 50 mW/cm<sup>2</sup> ad una distanza lampada-stampo di 3 cm (Figura 2.12). I campioni ottenuti sono stati posti in Eppendorf da 2 mL e posti in congelatore a T -20 °C per 24 ore, per poi passare a T -80 °C per 24 ore ed infine liofilizzati per 72 ore.

Terminata la liofilizzazione, i campioni sono stati pesati per poi essere immersi in 10 mL di PBS per 24 ore. Trascorso questo tempo i campioni sono stati recuperati, asciugati per eliminare l'acqua in eccesso ed infine nuovamente pesati.



Figura 2.12: Campioni di GelMA-COOH-DOPA ottenuti tramite protocollo di fotopolimerizzazione descritto. Fonte propria.

## 2.2.6 Gel content

Questa analisi viene effettuata per valutare la densità di reticolazione ottenuta tramite fotopolimerizzazione. Come descritto nel paragrafo precedente, una volta che l'idrogelo secco viene immerso in mezzo acquoso tende a rigonfiare e, così facendo, a rilasciare le catene polimeriche che non sono chimicamente legate. Pertanto, lo studio della perdita di peso può essere sfruttato per analizzare l'efficienza del processo di reticolazione. Il set-up sperimentale è lo stesso utilizzato per le prove di swelling, con la differenza che, al termine dello swelling, l'idrogelo viene liofilizzato prima di essere pesato nuovamente.

Il gel content può essere pertanto calcolato utilizzando la Formula seguente: (5) dove  $W_{Dti}$  è il peso dell'idrogelo secco dopo la seconda liofilizzazione mentre  $W_0$  è il peso iniziale dell'idrogelo secco. [64]

$$GC (\%) = \frac{W_{Dti}}{W_0} \times 100 \quad (5)$$

Il procedimento adottato per l'analisi è lo stesso del paragrafo 2.2.5 con lo step aggiuntivo di liofilizzare nuovamente i campioni per 72 ore dopo averli prima posti in freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

per 24 ore e successivamente a -80 °C per 24 ore. I campioni sono stati recuperati e pesati in modo da poter determinare il weight loss.

## **2.3 Caratterizzazione delle proprietà meccaniche**

### **2.3.1 Test di adesione**

Come discusso in precedenza, l'introduzione dei gruppi catecolo lungo la catena della GelMA ha come scopo quello di conferire proprietà adesive al materiale. Per valutare questa caratteristica sono quindi stati condotti dei lap-shear test mediante l'utilizzo di una macchina a trazione Z5 a colonna singola con cella di carico da 500 N. Quello che si è valutato è l'adesione degli idrogeli a base di GelMA e GelMA-COOH-DOPA alla pelle porcina. I campioni da testare sono stati preparati versando dapprima 100  $\mu$ L di formulazione (concentrazione del materiale 20%, 5,0 mg/mL LAP) sulla superficie di un vetrino da laboratorio di dimensioni 2,5 x 5 cm<sup>2</sup>. Successivamente una porzione di pelle porcina delle stesse dimensioni del vetrino è stata posizionata sulla superficie del vetrino bagnata dalla formulazione in modo da creare un'area di contatto tra pelle e vetrino di 2,5 x 2,5 cm<sup>2</sup>. La formulazione è stata infine irraggiata per 5 minuti utilizzando una lampada UV Hamamatsu LC8 posta a una distanza di 5 cm dalla superficie del vetrino. Per permettere un contatto omogeneo tra la pelle e la formulazione durante la polimerizzazione è stato utilizzato un peso di 125 g, come mostrato in Figura 2.13, dove è possibile vedere il set up utilizzato per la polimerizzazione ed i campioni ottenuti.

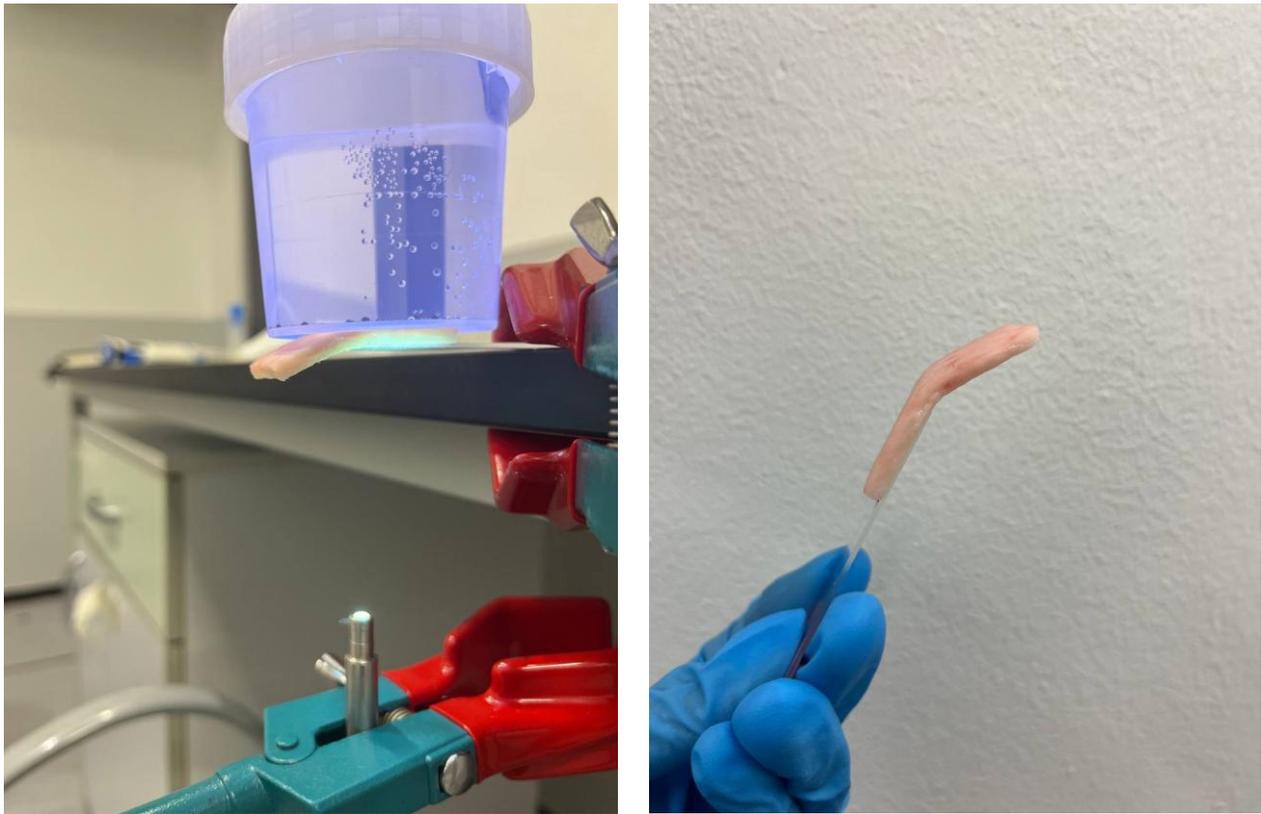


Figura 2.13: a sinistra il set-up sperimentale per la preparazione dei campioni; a destra i campioni ottenuti. Fonte propria.

Sono stati prodotti cinque campioni per formulazione che sono poi stati posizionati nella macchina a trazione come mostrato in Figura 2.14. Le proprietà adesive sono state valutate calcolando la resistenza a taglio del materiale, ottenuta dividendo il carico di rottura per l'area di contatto. Per ridurre la variabilità del test e per evitare che la pelle porcina potesse scivolare durante la quest'ultima è stata rivestita con del nastro adesivo. In Tabella 2.2 sono riportati i parametri scelti per il test.

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

Tabella 2.2: parametri utilizzati per il lap-shear test.



*Figura 2.14: posizionamento del campione all'interno della macchina a trazione. Fonte propria.*

## **2.4 Analisi biologiche e funzionali**

### **2.4.1 Trattamento delle cellule con mezzo condizionato**

Per poter eseguire i test, sono stati preparati dei campioni fotopolimerizzati di GelMA-COOH-DOPA e GelMA da utilizzare come confronto. I campioni sono stati preparati come descritto nel paragrafo 2.1.5 con una concentrazione 20% w/v ed è stato utilizzato il fotoiniziatore LAP con una concentrazione di 5 mg/mL. Le soluzioni ottenute sono poi state trasferite in degli stampi cilindrici in silicone con l'ausilio di una micropipetta. In ciascuno stampo era presente una quantità di 50  $\mu$ L che è stata fatta polimerizzare per 5 minuti tramite l'utilizzo della lampada UV Hamamatsu LC8 ad un'intensità di 50 mW/cm<sup>2</sup> ad una distanza lampada-stampo di 5 cm. I campioni ottenuti sono stati posti in piastre petri (Figura 2.15) con circa 6 mL di PBS per poter essere sterilizzati.



Figura 2.15: Campioni di GelMA e GelMA-COOH-DOPA utilizzati per le prove di mezzo condizionato. Fonte propria.

I campioni sono stati sterilizzati mediante esposizione ai raggi UV per 30 minuti per ciascuno, sotto cappa a flusso laminare, e conservati in contenitore sterile. I campioni così sterilizzati sono stati successivamente trasferiti in piastre petri da XX cm di diametro, disponendo tre campioni per ciascuna piastra. Ad ogni piastra sono stati aggiunti 20 mL di PBS, al fine di consentire il rigonfiamento dei campioni (swelling). Le piastre sono quindi state poste in incubatore overnight a T 37 °C in atmosfera umidificata con il 5% di CO<sub>2</sub>.

A questo punto, i campioni rigonfiati sono stati prelevati e posti in falcon per essere immersi nel mezzo di coltura (DMEM alto glucosio (Sigma, D5648) arricchito con 15 % FBS, 1% pen/strepto, 1% piruvato di sodio, 1% L-glutammina), in particolare sono stati posti tre campioni per ciascuna falcon da 50 ml a cui sono stati aggiunti 15 mL di mezzo di coltura. Questo volume consente di ottenere un sufficiente quantitativo di mezzo condizionato per la coltura delle linee cellulari sottoposte a test. Si ottengono così 5 mL di mezzo condizionato per ciascun campione ottenuto dalla fotopolimerizzazione di una goccia di formulazione da 50 µL.

Le falcon contenenti i campioni immersi nel mezzo sono state incubate per 72 ore (overweekend) a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Passati tre giorni, il mezzo condizionato è stato raccolto e trasferito in nuove falcon: due aliquote di GelMA e GelMA-COOH-DOPA sono state

conservate in frigorifero a 4 °C per l'uso a breve termine, mentre le aliquote non immediatamente utilizzate sono state congelate per eventuali test futuri.

Per i test con mezzo condizionato è stata selezionata la linea cellulare HFF1, fibroblasti umani, a passaggio P15 (ATCC, SCRC-1041).

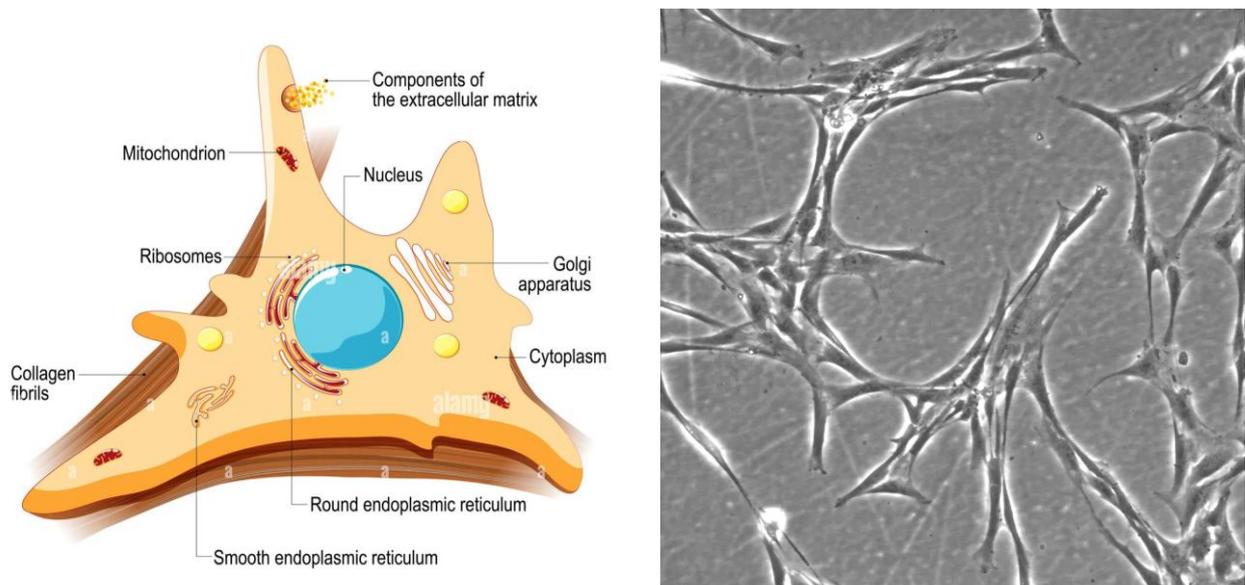


Figura 2.16: a sinistra una rappresentazione schematica di una cellula di fibroblasto, <https://www.alamy.it/> ; a destra i fibroblasti HFF1 <https://www.cytion.com/it/>.

Le cellule sono state coltivate in piastre petri nel mezzo di coltura DMEM riportato precedentemente fino a confluenza. Le cellule sono state poi tripsinizzate e raccolte per poter preparare la sospensione cellulare. Il volume di sospensione richiesto è stato raccolto e centrifugato. Il surnatante è stato rimosso e le cellule sono state risospese direttamente nel mezzo condizionato. Le cellule risospese nel mezzo condizionato sono state seminate in piastre multiwell da 96 con una densità cellulare di 5000 cellule per pozzetto in modo da essere pronte per i successivi saggi biologici, in particolare sono stati eseguiti il saggio MTT per valutare l'attività metabolica cellulare e l'immunofluorescenza mediante la fissazione dei campioni per le colorazioni con i coloranti DAPI e falloidina. Sono stati scelti due time point (1 e 5 giorni) per entrambi i saggi per osservare l'attività cellulare e il mezzo di coltura è stato cambiato ogni due giorni [65].

### 2.4.3. Saggio MTT per la valutazione della vitalità cellulare

Il saggio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) è un metodo ampiamente utilizzato per valutare la vitalità e la proliferazione cellulare in colture bi/tridimensionali. Il test si basa sulla capacità delle cellule metabolicamente attive di ridurre il sale tetrazolico giallo (MTT) in cristalli insolubili di formazano che presentano un tipico colore blu/viola (Figura 2.17). L'intensità della colorazione prodotta (solubilizzata in DMSO) è direttamente proporzionale al numero di cellule vive e può essere quantificata mediante lettura spettrofotometrica a 570 nm con correzione a 650 nm per il background [66], [67].

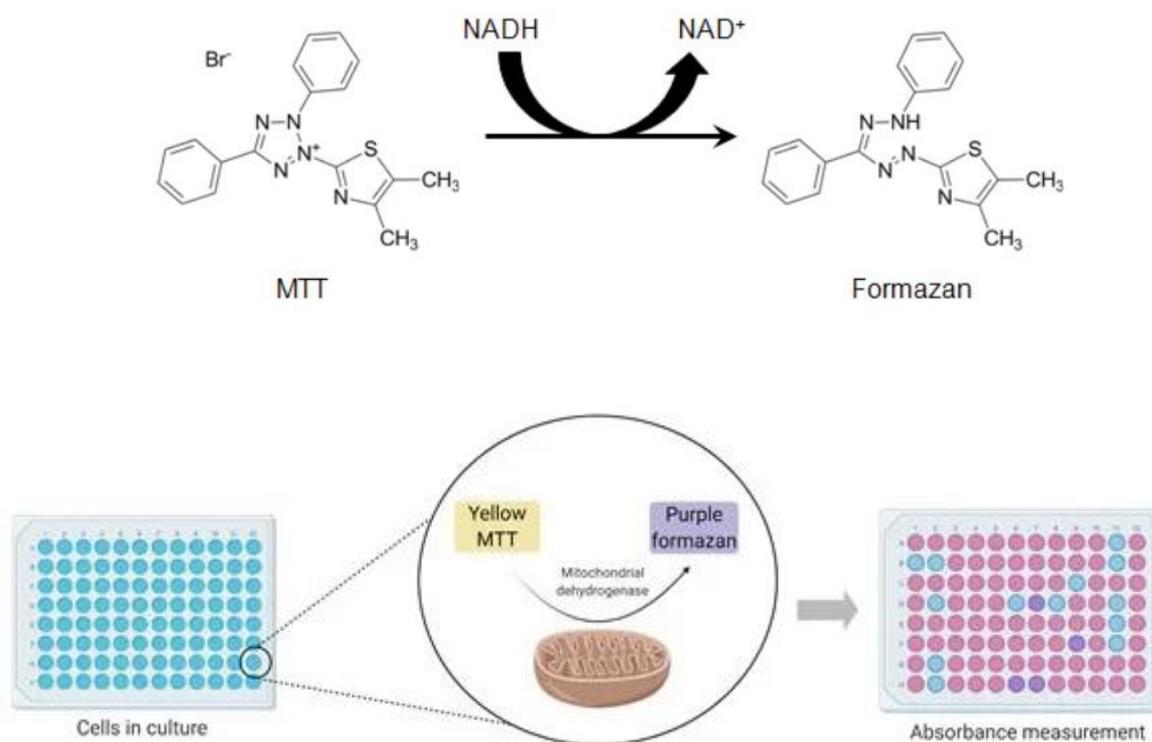


Figura 2.17: In alto: strutture chimiche del reagente MTT e del prodotto colorato formazano [67]; In basso: rappresentazione del cambio di colore dovuto alla reazione chimica che trasforma l'MTT in formazano <https://researchtweet.com/mtt-assay-protocol-for-cell-viability/>.

Nel presente lavoro, il saggio MTT è stato utilizzato per valutare la vitalità cellulare nelle prove di mezzo condizionato.

In particolare, nei time point stabiliti (1 e 5 giorni), è stata preparata una soluzione di MTT in mezzo di coltura con una concentrazione di 0,5 mg/mL. Dopo aver rimosso con cautela il mezzo di coltura dai pozzetti della multiwell sono stati aggiunti in ciascun pozzetto 200  $\mu$ L della soluzione di MTT, facendo attenzione a pipettare il liquido lungo le pareti per evitare il distacco cellulare. Le cellule sono poi state incubate per due ore a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Successivamente la soluzione contenente MTT è stata rimossa e sostituita con 200  $\mu$ L di DMSO per solubilizzare i cristalli di formazano. Le piastre sono state coperte con alluminio e poste su piastra basculante per un'ora. Infine, ne è stata letta l'assorbanza a 570-650 nm con lo spettrofotometro Synergy HTX Multimode Reader (Figura 2.18).



Figura 2.18: Spettrofotometro Synergy HTX Multimode Reader. <https://www.agilent.com>

Una volta ottenuti i dati dalla lettura in assorbanza, il segnale a 650 nm è stato sottratto da quello a 570 ( $\lambda_{570} - \lambda_{650}$ ) e a questo valore è stato sottratto il valore del bianco ( $\lambda_{\text{Signal}} - \lambda_{\text{Blank}}$ ). Sono poi stati ricavati i valori medi e le deviazioni standard e sono stati rappresentati graficamente in istogrammi.

#### 2.4.4 Immunofluorescenza

L'immunofluorescenza è una tecnica di microscopia utilizzata per visualizzare la presenza, la distribuzione e l'organizzazione di strutture cellulari attraverso l'utilizzo di sonde fluorescenti. Questa tecnica si basa sull'interazione tra anticorpi marcati con fluorofori e antigeni bersaglio presenti sulle cellule oppure sull'impiego di molecole fluorescenti che si

legano a strutture cellulari specifiche. Le molecole fluorescenti vengono eccitate tramite esposizione a lunghezze d'onda specifiche, il che induce l'emissione di luce a una lunghezza d'onda più alta, rilevabile tramite filtri ottici specifici presenti nel microscopio a fluorescenza o nel microscopio confocale.

Nel presente lavoro sono stati utilizzati due coloranti fluorofori: DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo) e falloidina coniugata a fluoroforo. Il DAPI è un fluoroforo che si lega in maniera selettiva alla doppia elica del DNA, con una particolare affinità per le regioni ricche in adenina-timina (AT) e consente la visualizzazione dei nuclei cellulari. L'emissione fluorescente avviene tipicamente in azzurro/blu sotto eccitazione UV (358 nm) [68].

La falloidina, invece, è un composto ciclico estratto dal fungo *Amanita phalloides*, in grado di legarsi in modo specifico ai filamenti di actina (F-actina) presenti nel citoscheletro cellulare. Quando viene coniugata con fluorofori (e.g. Alexa Fluor 488 o TRITC), permette l'osservazione dettagliata dell'organizzazione citoscheletrica e della morfologia cellulare. Nella presente analisi è stata utilizzata falloidina coniugata al fluoroforo verde Alexa Fluor 488 che presenta un picco di eccitazione a circa 495 nm e un'emissione a circa 519 nm, generando una fluorescenza di colore verde brillante rilevabile al microscopio. Il legame della falloidina con il citoscheletro è altamente stabile e non permeabile alle cellule vive; pertanto, la falloidina viene impiegata su cellule precedentemente fissate e permeabilizzate [69], [70].

Il protocollo sperimentale adottato per la colorazione prevede l'utilizzo combinato di questi due marcatori. Dopo il periodo di coltura prestabilito (1 e 5 giorni) i campioni sono stati lavati con PBS 1x per 5 minuti a temperatura ambiente per rimuovere il mezzo di coltura residuo. Le cellule sono state fissate mediante incubazione in paraformaldeide al 4% per 15 minuti a temperatura ambiente e al termine del fissaggio sono stati eseguiti tre lavaggi consecutivi in PBS (5 minuti ciascuno). Successivamente, è stata effettuata la permeabilizzazione cellulare con Triton X-100 allo 0,1% in PBS per 10 minuti, in modo da facilitare l'ingresso delle molecole fluorescenti. Dopo un ulteriore ciclo di tre lavaggi in PBS (5 minuti ciascuno), i campioni sono stati incubati con un mix di colorazione contenente

DAPI (0,5  $\mu$ M) e falloidina-Alexa Fluor 488 (0,5  $\mu$ g/mL) in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente, al riparo dalla luce. Infine, sono stati eseguiti due lavaggi finali da 5 minuti ciascuno in PBS prima di osservare i campioni al microscopio Nikon Eclipse Ti2 dotato di sistema confocale a disco rotante (spinning disk) Crest X-Light (Figura 2.19).



Figura 2.19: microscopio Nikon Eclipse Ti2 dotato di sistema confocale a disco rotante (spinning disk) Crest X-Light.  
<https://www.microscope.healthcare.nikon.com/>

## 2.5 Stampa 3D

Per valutare il potenziale utilizzo della GelMA-COOH-DOPA quale precursore per la fabbricazione di idrogeli per applicazioni biomedicali tramite tecnologie di stampa 3D, sono stati eseguiti dei test di stampabilità utilizzando una Asiga MAX UVX27 (Figura 2.20). A scopo comparativo, è stata stampata anche una formulazione di GelMA, utilizzata come materiale di riferimento. Per entrambe le formulazioni, la concentrazione del macromero è stata mantenuta al 20% w/v, mentre quella del fotoiniziatore (LAP) è stata fissata a 5 mg/mL.

La stampante utilizzata in questo lavoro di tesi si basa sulla tecnologia DLP (Digital Light Processing). In questo sistema, una sorgente luminosa ad elevata potenza con una lunghezza d'onda di 385 nm, proietta in sequenza le immagini digitali dei singoli layer del modello

tridimensionale con una risoluzione sul piano x-y di 27  $\mu\text{m}$  per pixel, attivando in tal modo la polimerizzazione selettiva della resina disposta in una vaschetta trasparente.



Figura 2.20: Stampante Asiga MAX UVX27. <https://www.asiga.com/max-x>

La stampa avviene in modalità bottom-up, ossia la piattaforma di stampa si muove verticalmente all'interno della vaschetta, permettendo la reticolazione del materiale a contatto con il fondo ottico tramite esposizione alla luce UV. Al termine di ogni esposizione, la piattaforma si solleva per separare lo strato appena polimerizzato e si abbassa nuovamente all'altezza dello strato seguente. Questo ciclo viene ripetuto fino alla formazione completa del costruito. L'accuratezza e l'adesione tra gli strati dipendono da parametri specifici come velocità e distanza di separazione, tempi di attesa, spessore del layer e intensità luminosa, impostabili in modo personalizzato.

L'intero processo di modellazione e configurazione dei parametri è stato gestito tramite il software Asiga Composer, fornito dalla stessa casa produttrice. Tale software consente di importare modelli tridimensionali in diversi formati compatibili (tra cui STL, SLC, PLY e STM) e di definire i parametri operativi di stampa [71].

I parametri di stampa sono stati ottimizzati per ciascuna formulazione mediante test preliminari al fine di garantire una polimerizzazione omogenea, un'adesione efficace tra strati successivi e una buona stabilità meccanica della struttura ottenuta. Tali parametri sono riportati all'interno della Tabella 2.3.

Parametri	GelMA	GelMA-COOH-DOPA
Slice thickness (mm)	0,05	0,05
Build platform temperature (°C)	30	30
Light Intensity (%)	40	40
Initial exposure time (s)	8,0	11,0
Layer exposure time (s)	6,0	9,0
XY compensation (mm)	-0,05	0,0
Separation speed (mm/s)	4,0	4,0
Separation distance (mm)	10,0	10,0
Approach speed (mm/s)	4,3	4,3
Post-exposure delay (s)	1,0	1,0
Post-separation delay (s)	1,0	1,0
Post-approach delay (s)	1,0	1,0

*Tabella 2.3: Parametri sperimentali di stampa utilizzati per la stampa di campioni di GelMA e GelMA-COOH-DOPA*

## 3. Risultati

### 3.1 Caratterizzazione dei materiali

Come descritto nei paragrafi 2.1.1, 2.1.2 e 2.1.3, il macromero di interesse GelMA-COOH-DOPA, è stato ottenuto adottando un approccio sintetico basato su una sequenza di tre reazioni. In primo luogo, la gelatina è stata sottoposta a metacrilazione, sostituendo parzialmente i gruppi amminici e/o ossidrili con gruppi metacrilici, al fine di ottenere la GelMA, un derivato fotopolimerizzabile (Figura 3.1).

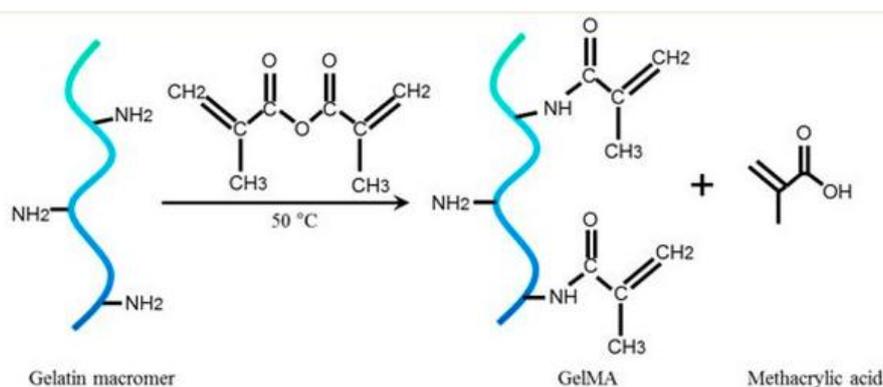


Figura 3.1: Schema sintetico della sintesi di GeLMA a partire dalla Gelatina [72].

Successivamente, la GelMA è stata ulteriormente funzionalizzata tramite succinilazione per ottenere la GelMA-COOH, un derivato caratterizzato da una maggiore densità di gruppi carbossilici lungo la sua catena. Infine, sfruttando la chimica delle carbodiimmidi, i gruppi carbossilici sono stati attivati ed utilizzati come siti attivi per legare covalentemente la dopamina, ottenendo così la macromolecola GelMA-COOH-DOPA, ricca di gruppi catecolo con proprietà adesive e, al tempo stesso, di gruppi metacrilici fotopolimerizzabili in presenza di un opportuno fotoiniziatore (Figura 3.2).

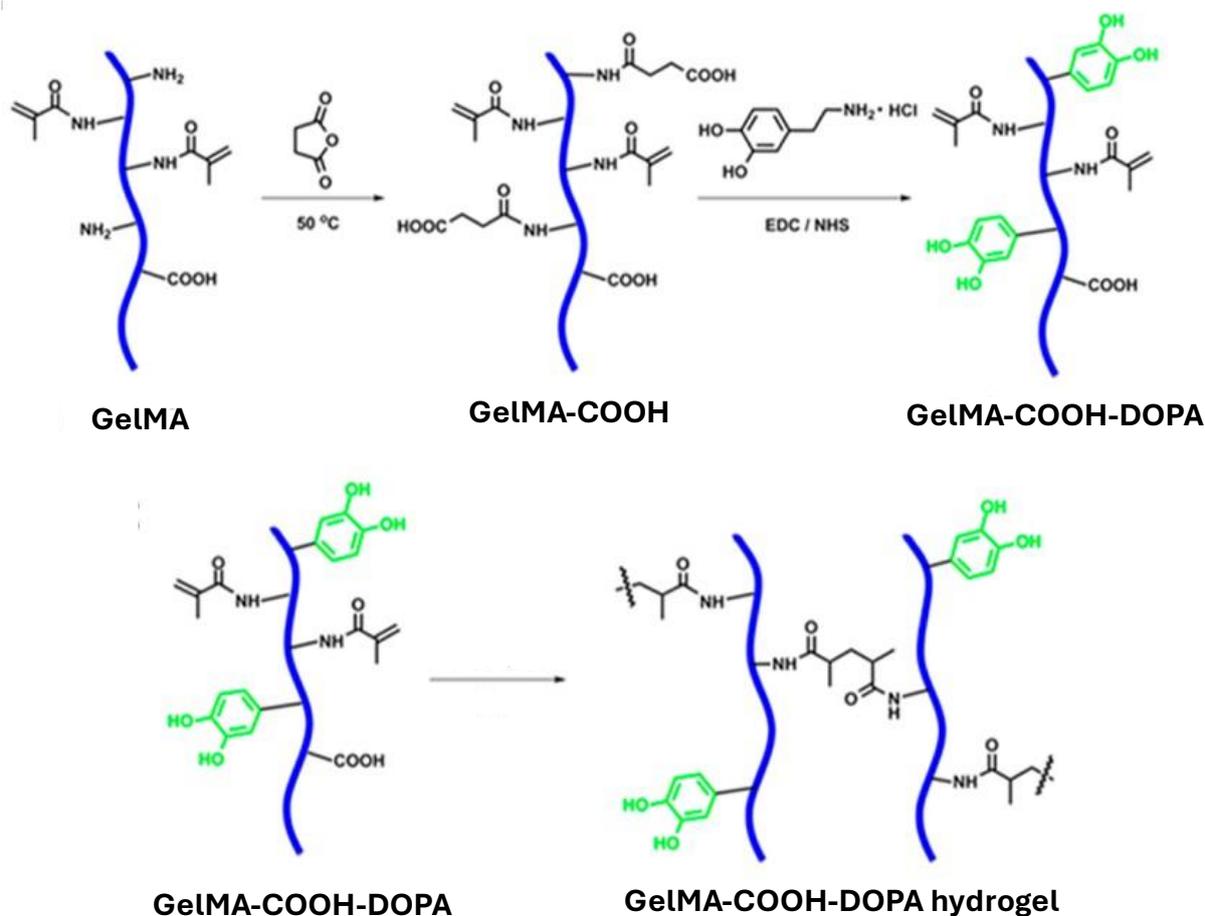


Figura 3.2: In alto: Schema sintetico delle sintesi di GelMA-COOH e GelMA-COOH-DOPA a partire dalla GelMA. In basso: Formazione di un network polimerico a base di GelMA-COOH-DOPA dopo l'esposizione ai raggi UV in presenza di un foto-iniziatore. [36]

### 3.1.1. Spettroscopia IR

La spettroscopia IR è stata utilizzata per identificare i macromerici sintetizzati (GelMA, GelMA-COOH, GelMA-COOH-DOPA e GelMA-DOPA) e, di conseguenza, validare il protocollo di sintesi descritto in precedenza. La gelatina di tipo B è stata ugualmente analizzata, ed il suo spettro utilizzato come controllo. I risultati ottenuti sono riportati in Figura 3.3.

Lo spettro della gelatina mostra bande caratteristiche riconducibili alla natura proteica del materiale. Si osservano infatti: un segnale ampio tra 3300-3400 cm<sup>-1</sup> attribuibile allo stretching dei gruppi -OH ed -NH presente negli amminoacidi della gelatina; un segnale nella regione di 1640 cm<sup>-1</sup> (Amide I), associato allo stretching C=O del legame peptidico; una

banda secondaria intorno ai  $1540\text{ cm}^{-1}$  (Amide II) correlata alla deformazione N-H ed allo stretching C-N [73].

Considerando lo spettro della GelMA low, non è stato possibile osservare la comparsa delle nuove bande riconducibili all'introduzione dei gruppi metacrilici ( $1635\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$  e  $810\text{-}950\text{ cm}^{-1}$  [74]), a causa della sovrapposizione con i segnali derivanti dalle vibrazioni dei gruppi funzionali già presenti lungo la catena della gelatina.

Per quanto riguarda lo spettro della GelMA-COOH è stato identificato un picco centrato a circa  $798\text{ cm}^{-1}$  non presente nello spettro della GelMA. Questa banda può essere attribuita ai cosiddetti "out of plane bending" dei gruppi  $\text{CH}_2$  appartenenti al gruppo succinico introdotto tramite la modifica chimica descritta nel paragrafo 2.1.2. Quanto osservato risulta coerente con la letteratura relativa ai composti succinilati, in cui le bande comprese tra  $790$  e  $850\text{ cm}^{-1}$  vengono tipicamente attribuite alle vibrazioni del sistema C-C-COOH o del gruppo metilenico adiacente al carbossile [75].

Questo segnale, tuttavia, non è più visibile nello spettro della GelMA-COOH-DOPA. Una possibile spiegazione è legata alla funzionalizzazione della macromolecola con la dopamina, che comporta la sostituzione del carbossile con un gruppo ammidico e, conseguentemente, una variazione nelle vibrazioni caratteristiche del suo intorno chimico. Ciononostante, non è stato possibile confermare in modo univoco la presenza della dopamina lungo la catena della GelMA-COOH-DOPA, a causa di una sovrapposizione dei segnali caratteristici della DOPA (Figura 3.4) e della gelatina.

Sulla base di tali considerazioni, si evince che l'analisi IR non risulta sufficiente per confermare le avvenute funzionalizzazioni e, pertanto, si è reso necessario l'utilizzo di ulteriori tecniche di caratterizzazione chimica al fine di validare il protocollo di sintesi seguito.

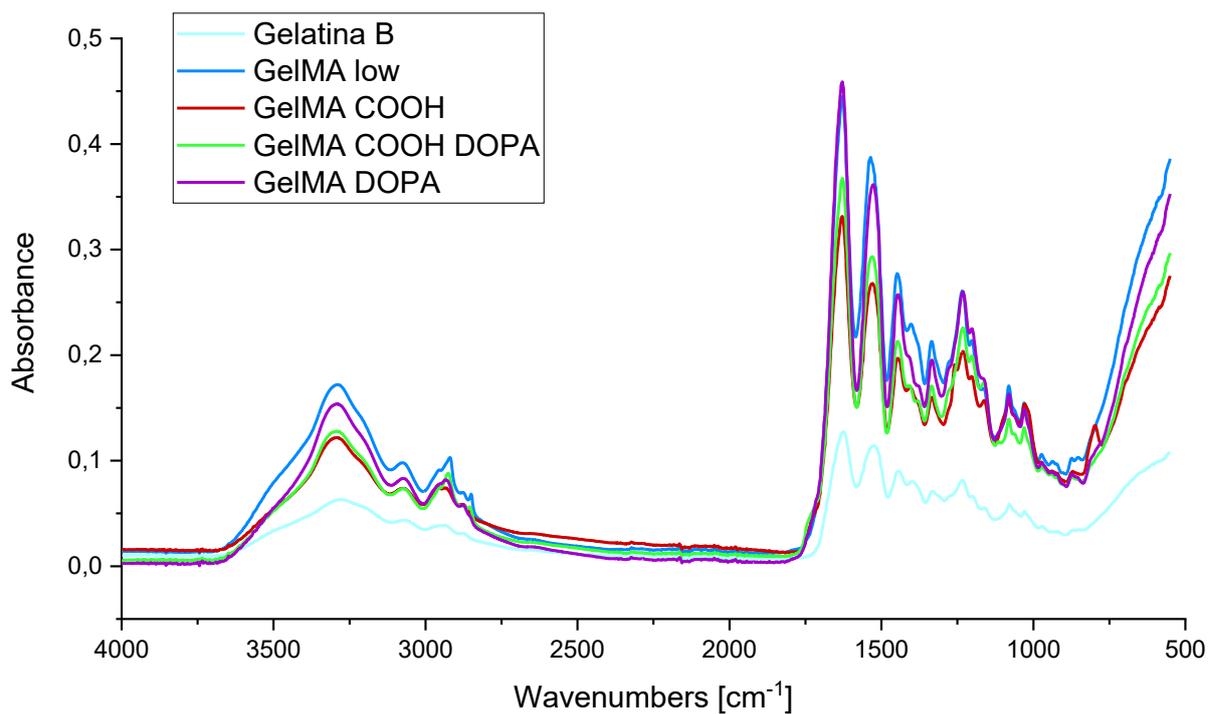


Figura 3.3: Spettro FT-IR di Gelatina B, GelMA low, GelMA-COOH, GelMA-COOH-DOPA, GelMA-DOPA.

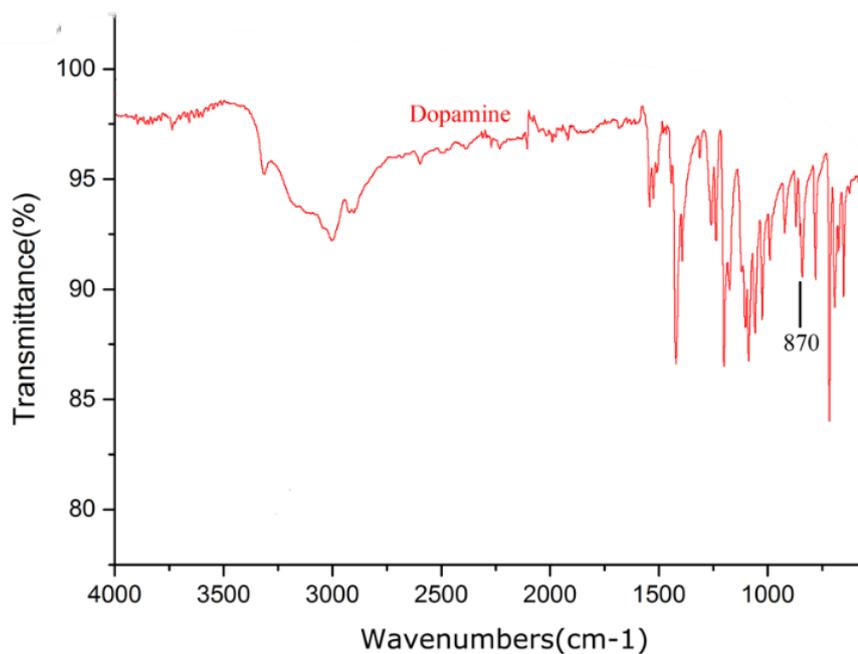


Figura 3.4: Spettro IR della dopamina. [76]

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

L'effettivo successo delle sintesi è stato confermato mediante spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$ . Gli spettri ottenuti sono riportati nelle Figure 3.5, 3.6 e 3.7.

Come si può osservare in Figura 3.5, la comparsa dei picchi caratteristici attribuibili ai protoni acrilici ed ai protoni metilici del gruppo metacrilato nello spettro del GelMA a 5-6 ppm, ed a 2-2,5 ppm, provano l'avvenuta metacrilazione della gelatina tramite sostituzione parziale dei gruppi amminici e/o ossidrilici con gruppi metacrilici, ulteriormente confermata dalla concomitante diminuzione del segnale a 2,8 ppm associato ai gruppi metilenici della lisina presenti nella catena della gelatina. [77] Dato, questo, che conferma la formazione di nuovi legami ammidici.

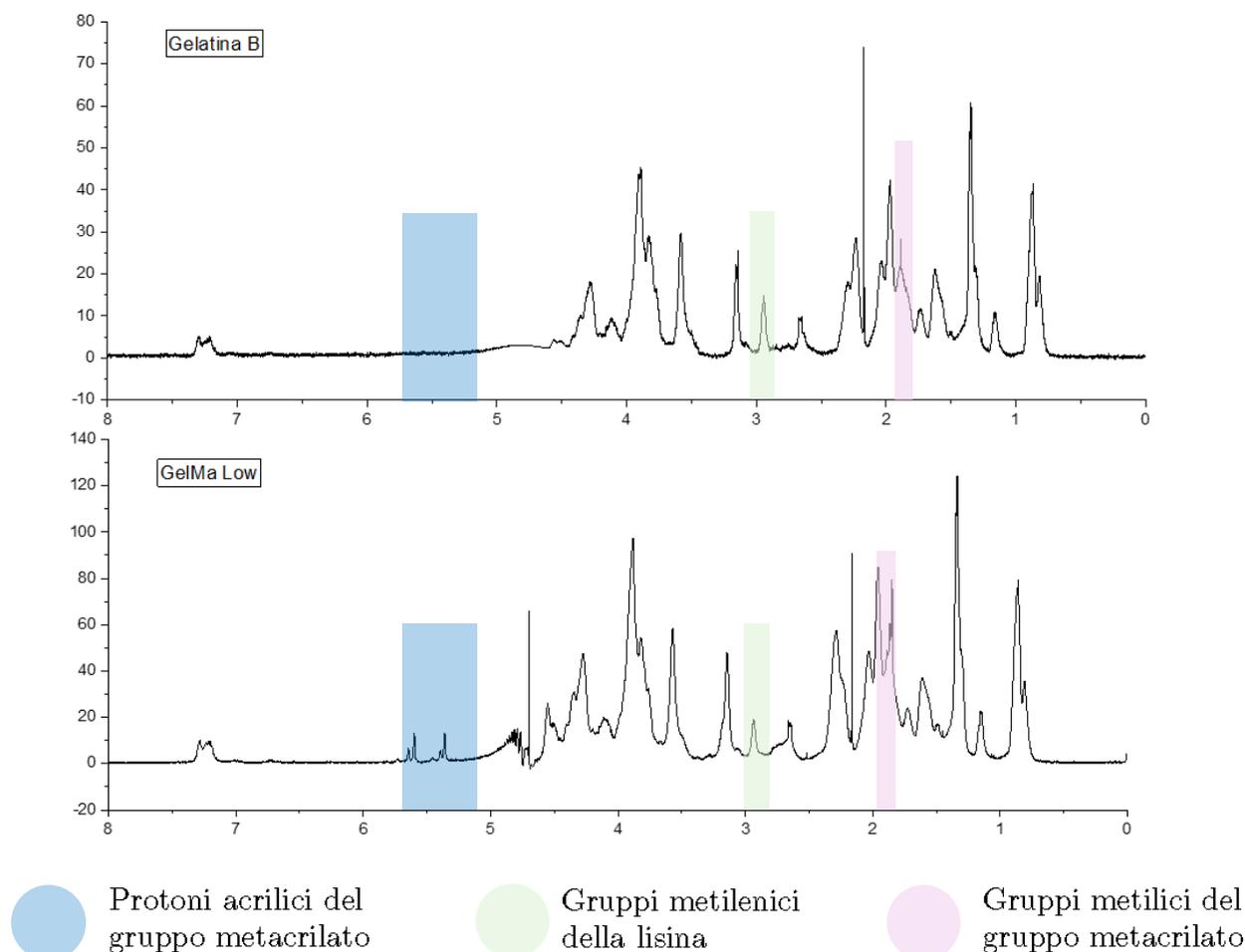


Figura 3.5: Confronto tra gli spettri NMR di Gelatina B e GelMA low.

Confrontando invece gli spettri di GelMA e GelMA-COOH (Figura 3.6) si può notare come il segnale associato ai gruppi metilenici della lisina residua non sia più rilevabile nello spettro di GelMA-COOH. Questa evidenza conferma l'avvenuta modifica dei gruppi amminici residui a seguito della reazione di succinilazione, la quale comporta una modifica dell'intorno chimico dovuta alla formazione di nuovi legami ammidici. Inoltre, è possibile osservare un cambiamento nei segnali evidenziati nella figura compresi tra 2,5 e 2 ppm che potrebbe essere legata ai metileni adiacenti ai nuovi gruppi carbossilici introdotti durante la reazione. [78]

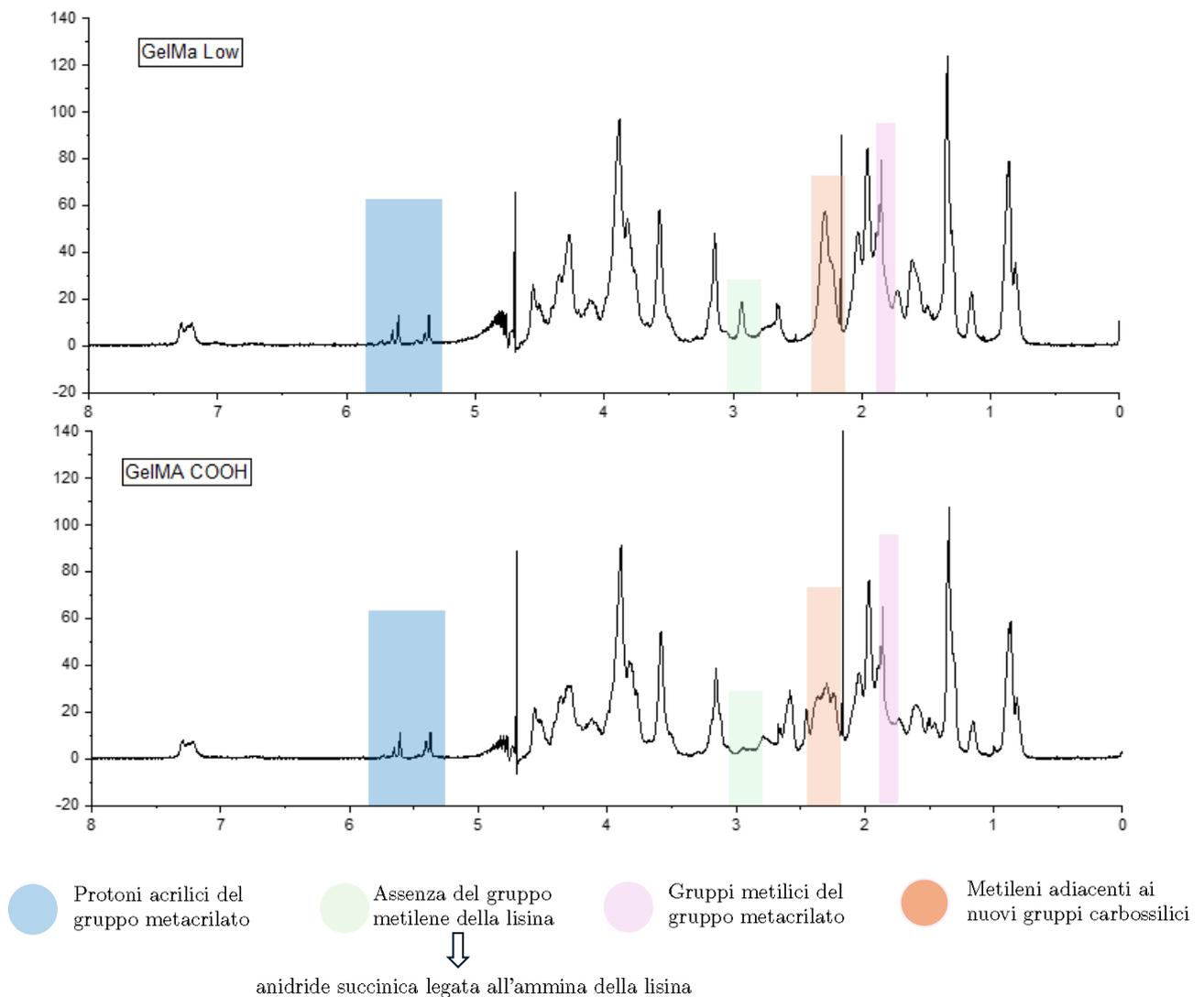


Figura 3.6: confronto tra gli spettri NMR di GelMA low e GelMA-COOH.

In ultimo, confrontando gli spettri di GelMA-COOH e GelMA-COOH-DOPA (figura 3.7) è possibile osservare nello spettro di quest'ultima la presenza dei tipici picchi associati ai protoni aromatici della dopamina tra 6,7 e 6,9 ppm. Allo stesso tempo, nel range tra 3,5 e 3 ppm è evidenziata la presenza di picchi relativi ai protoni metilenici del catecolo [79] [80]. Sulla base di tali risultati è stato quindi possibile convalidare il protocollo di sintesi utilizzato.

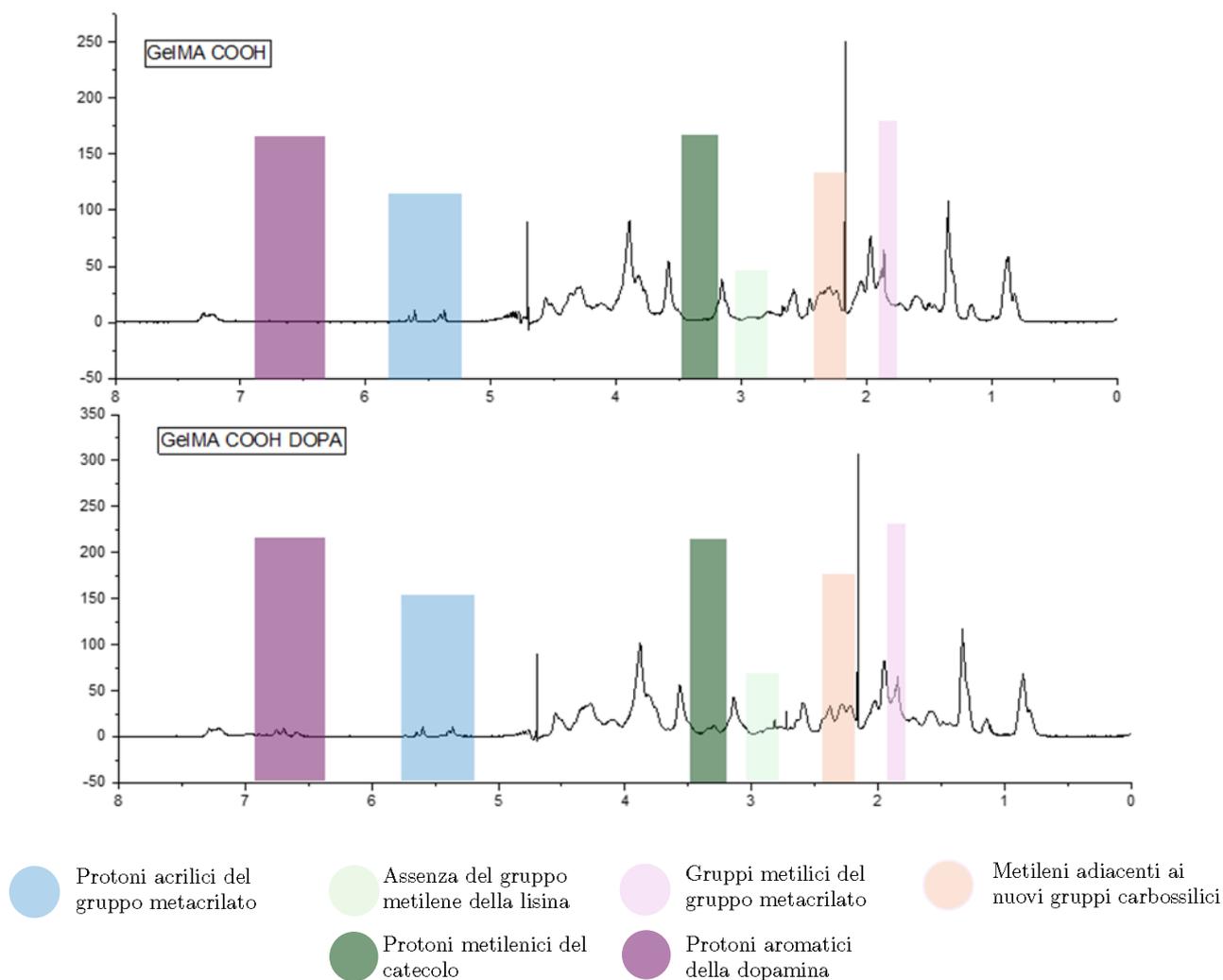


Figura 3.7: confronto tra gli spettri NMR di GelMA-COOH e GelMA-COOH-DOPA.

### 3.1.3 Spettroscopia UV-VIS

Un'ulteriore conferma del successo della sintesi della GelMA-COOH-DOPA è stata ottenuta tramite spettroscopia UV-VIS, in quanto il tipico picco di assorbimento della dopamina a

cca 280 nm risulta chiaramente evidente nello spettro della molecola di interesse (Figura 3.8) [81].

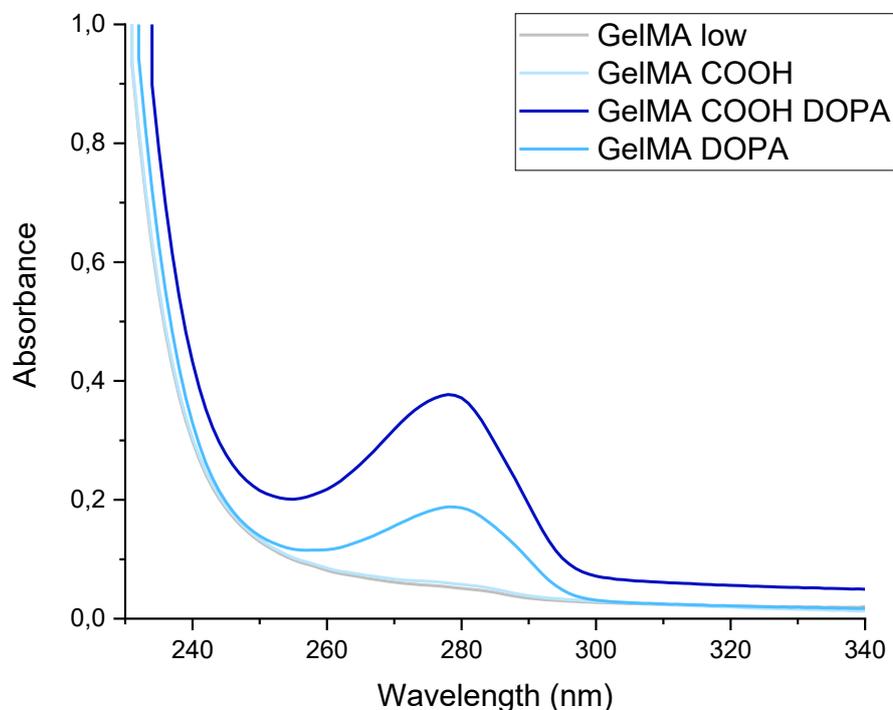


Figura 3.9: spettroscopia UV-VIS dei campioni GelMA low, GelMA-COOH, GelMA-COOH-DOPA e GelMA-DOPA. La presenza dei picchi centrati in 280 nm indica la presenza di dopamina nelle formulazioni.

Inoltre, sfruttando una curva di calibrazione (Figura 3.9) ottenuta misurando l'assorbanza a 280 nm di una serie di soluzioni standard a concentrazioni crescenti di dopamina cloridrato, come descritto nel paragrafo 2.2.3, è stato possibile quantificare la concentrazione di dopamina effettivamente legata alla catena della GelMA-COOH-DOPA. Per confermare l'effettivo vantaggio derivante dalla succinilazione, ovvero il secondo step di sintesi volto ad aumentare la concentrazione di gruppi carbossilici e, di conseguenza, a massimizzare la funzionalizzazione finale con dopamina, sono state eseguite analisi aggiuntive utilizzando la GelMA-DOPA, molecola ottenuta direttamente dalla GelMA, senza alcuna reazione intermedia.

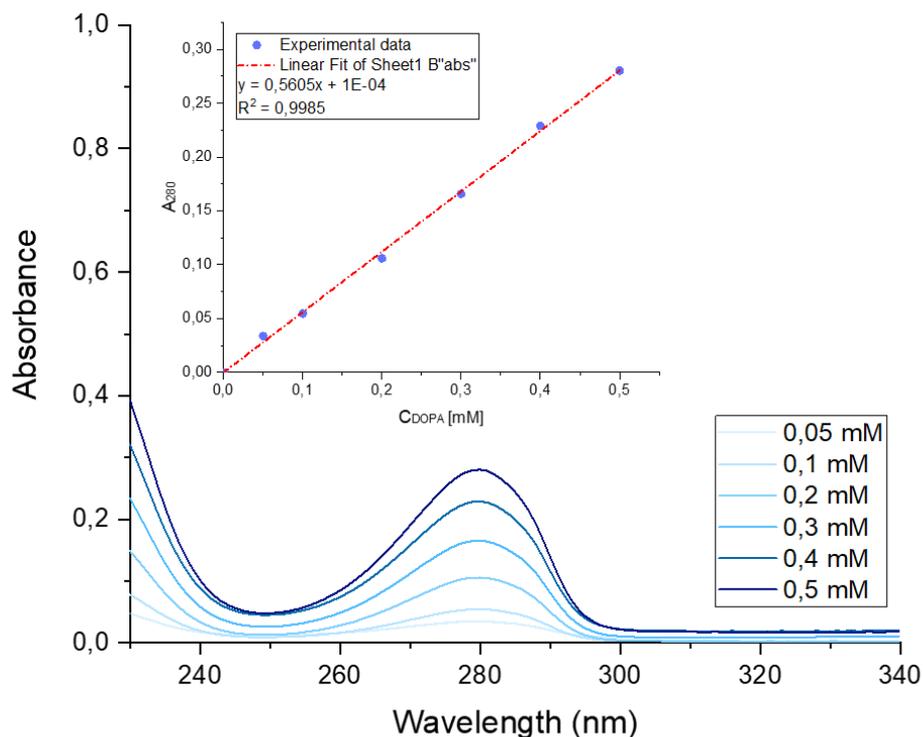


Figura 3.9: In basso lo spettro UV-VIS di soluzioni contenenti dopamina cloridrato in differenti concentrazioni; in alto la retta di calibrazione ottenuta relazionando l'assorbanza misurata a 280 nm alla relativa concentrazione.

I risultati ottenuti (Tabella 3.1) hanno evidenziato la maggior concentrazione di dopamina nei campioni di GelMA-COOH-DOPA rispetto a quelli di GelMA-DOPA, confermando l'efficacia del protocollo di sintesi scelto e, di conseguenza, la maggior efficienza di funzionalizzazione a seguito dell'aumento nella densità dei gruppi carbossili lungo la catena della gelatina.

Caratteristica	GelMA-DOPA	GelMA-COOH-DOPA
Assorbanza a 280 nm	0,18654	0,37152
Concentrazione di dopamina [mM]	0,3336	0,6626
Millimoli di dopamina per grammo di GelMA/GelMA-COOH	0,1663	0,3313

Tabella 3.1: confronto tra i parametri ottenuti tramite analisi UV-VIS di GelMA-DOPA e GelMA-COOH.

### 3.1.4. Fotoreologia

Le prove fotoreologiche sono state eseguite al fine di valutare la reattività dei macromeri sintetizzati.

Inizialmente sono state analizzate formulazioni con una concentrazione di macromero pari al 10% w/v e di fotoiniziatore (LAP) pari a 2,5 mg/mL. I risultati ottenuti (figura 3.10) mostrano che, se da un lato le formulazioni di GelMA e GelMA-COOH presentano una rapida cinetica di fotopolimerizzazione, come evidenziato dalla crescita repentina del modulo  $G'$  immediatamente dopo all'accensione della lampada, dall'altro la fotopolimerizzazione della formulazione contenente GelMA-COOH-DOPA sembra non attivarsi nemmeno inseguito ad esposizione prolungata, rimanendo liquida per tutta la durata del test. Questo comportamento può essere attribuito ai gruppi catecolo introdotti, i quali vanno ad aumentare l'ingombro sterico delle catene polimeriche, limitando la reattività del macromero.

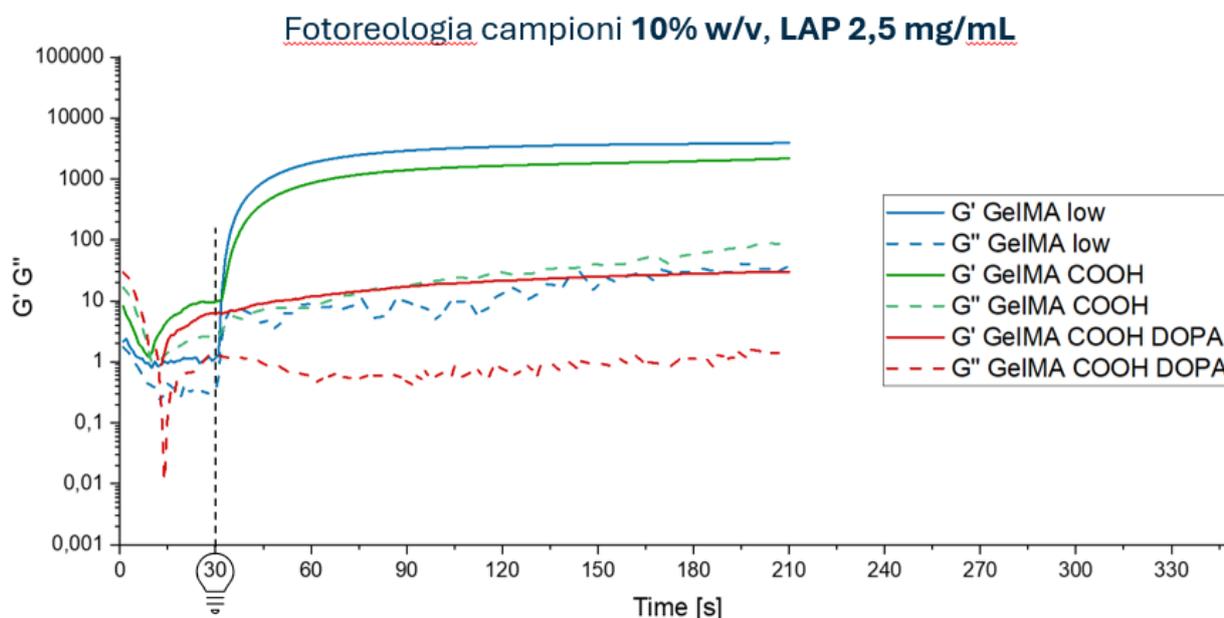


Figura 3.10: Curve raffiguranti i moduli  $G'$  e  $G''$  delle formulazioni GelMA, GelMA-COOH, GelMA-COOH-DOPA, con una concentrazione del 10% w/v, concentrazione fotoiniziatore: 2,5 mg/mL

Ci si è quindi soffermati sull'ottimizzazione della formulazione contenente GelMA-COOH-DOPA, andando ad aumentare in modo progressivo la concentrazione della stessa e del fotoiniziatore, al fine di massimizzarne la reattività. Come mostrato in figura 3.11, l'aumento delle concentrazioni di GELMA-COOH-DOPA e LAP al 20% w/v e 5,0 mg/mL, rispettivamente, si è tradotto in un considerevole incremento della cinetica di fotopolimerizzazione (rapida impennata della curva  $G'$  e raggiungimento del plateau dopo circa 60 s di irraggiamento).

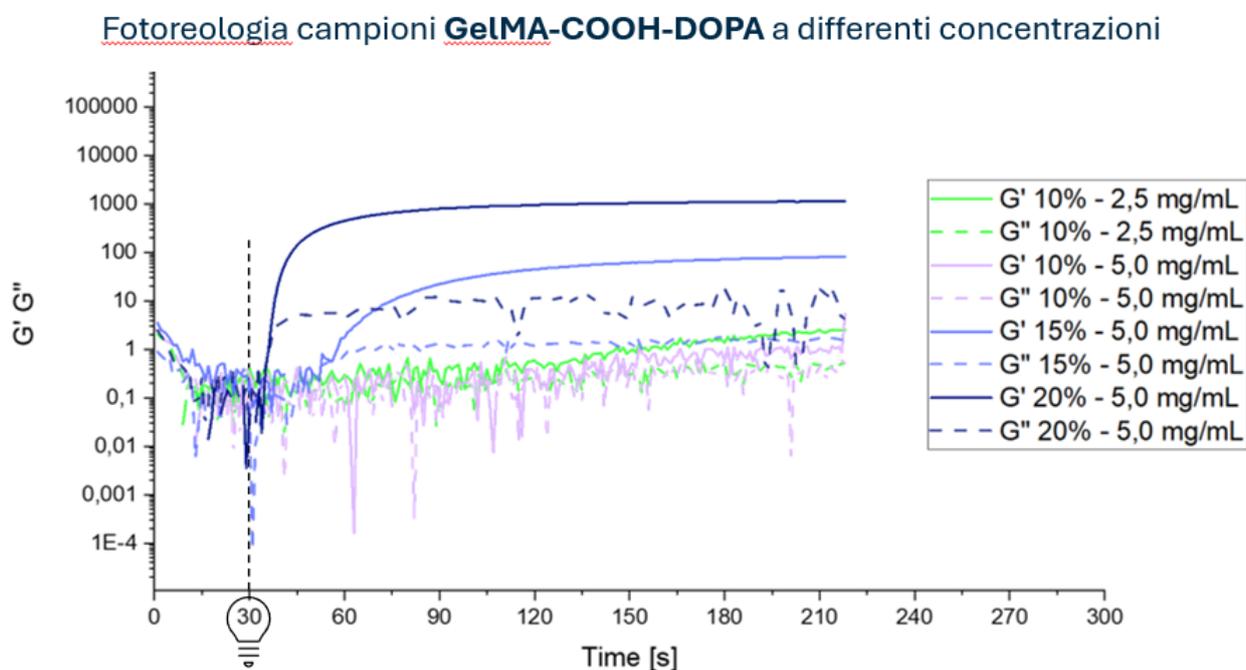


Figura 3.11: Curve raffiguranti i moduli  $G'$  e  $G''$  di GelMA-COOH-DOPA con concentrazioni variabili. Concentrazione del fotoiniziatore anch'essa variabile.

A questo punto la prova fotoreologica è stata eseguita nuovamente utilizzando per tutte e tre le formulazioni analizzate le concentrazioni ottimali di macromero e fotoiniziatore trovata precedentemente. I risultati ottenuti, riportati in Figura 3.12, hanno rivelato nuovamente differenze significative nella reattività delle formulazioni contenenti dopamina, mostrando un ritardo nell'attivazione della reazione di fotopolimerizzazione e nella gelificazione, una cinetica rallentata, e valori di  $G'$  a plateau inferiori. Per interpretare tale risultato è necessario capire quali siano le interazioni tra le molecole di dopamina ed i derivati della

gelatina in modo da poter spiegare il comportamento degli idrogeli in esame a livello molecolare [82].

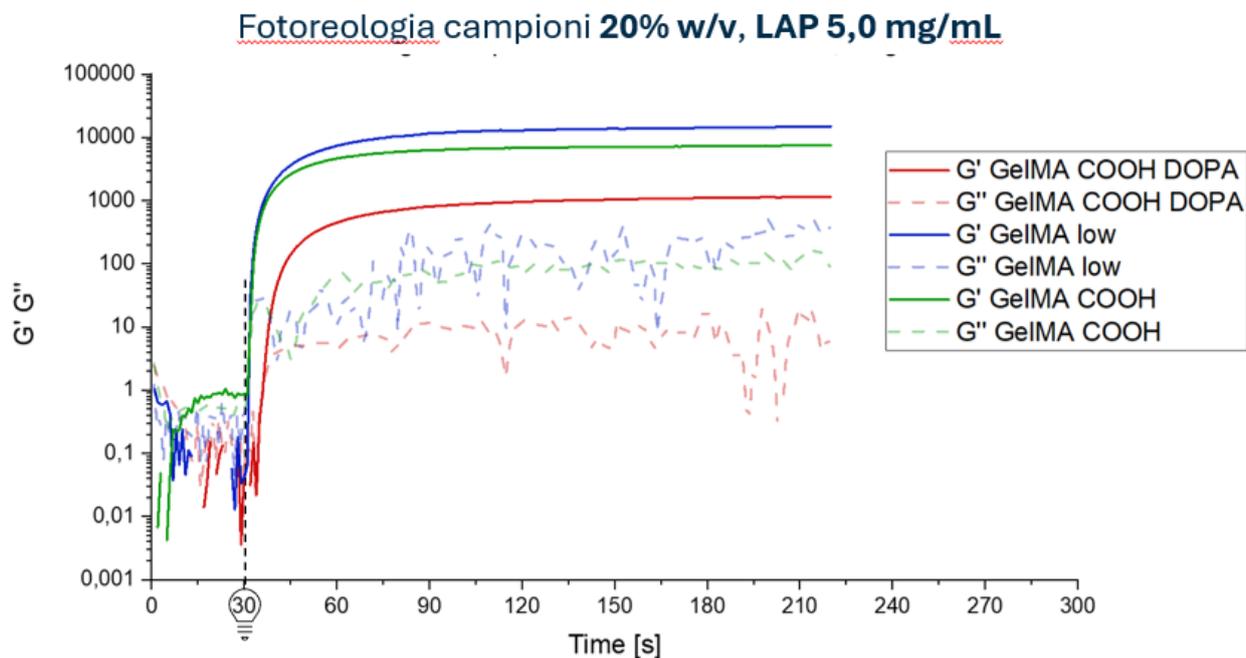


Figura 3.12: Curve raffiguranti i moduli  $G'$  e  $G''$  delle formulazioni GelMA, GelMA-COOH, GelMA-COOH-DOPA.

Le molecole di dopamina possono influenzare negativamente l'efficienza della fotoreticolazione della GelMA modificata. In particolare, i gruppi catecolo introdotti tramite funzionalizzazione con dopamina possono generare un ingombro sterico attorno ai gruppi metacrilici, limitando l'accessibilità ai siti reattivi coinvolti nella reazione di fotopolimerizzazione. Questo ostacolo può ridurre la formazione di una rete tridimensionale efficiente e, di conseguenza, la densità di reticolazione. Inoltre, le interazioni  $\pi$ - $\pi$  tra i gruppi aromatici della dopamina e i residui aromatici presenti nelle catene laterali della gelatina possono stabilizzare temporaneamente conformazioni locali della catena, ma al contempo ridurre la flessibilità molecolare, necessaria per ottenere un alto grado di reticolazione (Figura 3.13). Nel complesso, tali fattori contribuiscono a una diminuzione della conversione dei gruppi funzionali e alla formazione di un gel con caratteristiche meccaniche inferiori [29].

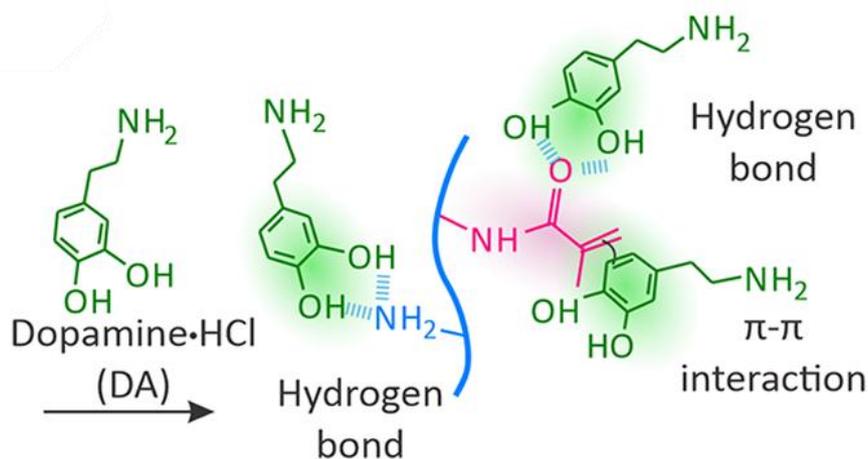


Figura 3.13: Aggregazione fisica delle molecole di dopamina (DA) attorno alle macromolecole di GelMA, mediata da legami a idrogeno e interazioni  $\pi$ - $\pi$ . [29]

### 3.1.6 Gel content

L'analisi relativa alla perdita di peso ha permesso di valutare la quantità di polimero reticolato, cioè la frazione polimerica che rimane insolubile (i.e. gel content, GC%) per effetto della formazione di legami covalenti durante la fotopolimerizzazione e, di conseguenza, l'efficienza della reticolazione fotoindotta delle diverse formulazioni. I risultati ottenuti (Figura 3.15), sebbene indichino una buona efficienza di fotopolimerizzazione (GC>80%) indipendentemente dal macromero utilizzato, hanno evidenziato come la frazione insolubile diminuisca nei campioni realizzati con GelMA-COOH e soprattutto con GelMA-COOH-DOPA, suggerendo un minor grado di reticolazione rispetto al GelMA low.

Come discusso nel paragrafo 3.1.5, questo risultato può essere attribuito alla presenza delle molecole di DOPA, i cui gruppi catecolo possono interferire con la fotoreticolazione della GelMA. In particolare, i gruppi aromatici della DOPA, attraverso interazioni non covalenti come legami a idrogeno e interazioni  $\pi$ - $\pi$  con le catene polimeriche, possono aumentare l'ingombro sterico attorno ai gruppi metacrilici, riducendone l'accessibilità ai radicali liberi generati dal fotoiniziatore. Questa interferenza molecolare ostacola l'efficienza della reticolazione, comportando un maggior grado di molecole non reagite. Di conseguenza, una maggiore frazione di polimero non reticolato, estratto dal sovente in questa prova [83].

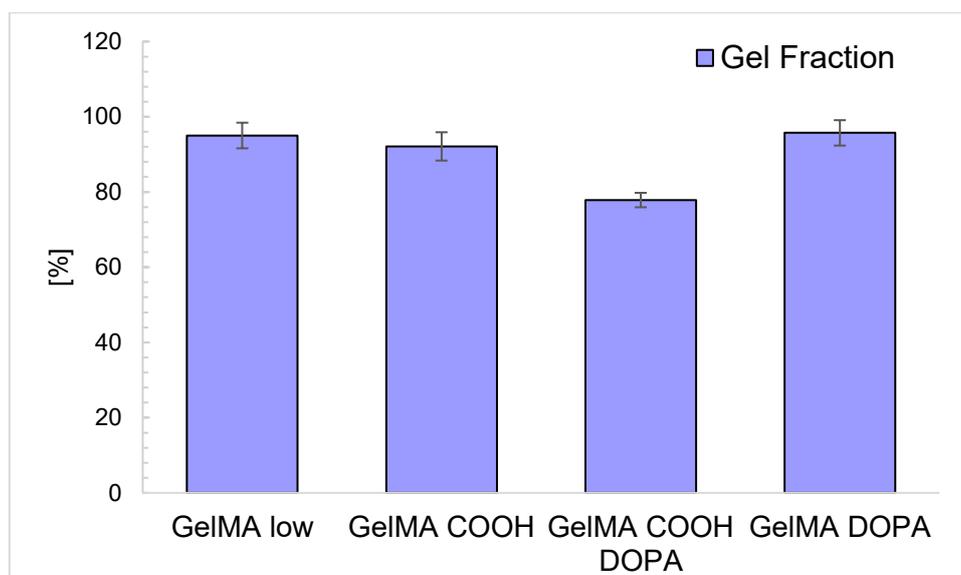


Figura 3.15: Gel Fraction percentuale riguardante le formulazioni GelMA low, GelMA-COOH, GelMA-COOH-DOPA e GelMA-DOPA.

### 3.1.5 Swelling

Le prove di swelling sono state eseguite al fine di valutare la capacità di rigonfiamento in acqua degli idrogeli in funzione del macromero utilizzato. Come mostrato in Figura 3.14, lo swelling degli idrogeli preparati con i derivati della GelMA aumenta con l'aumentare dei gruppi carbossilici lungo la catena, mentre diminuisce successivamente alla funzionalizzazione con la dopamina. Questi risultati trovano spiegazione considerando le modifiche chimiche apportate durante i diversi stadi di reazione. La funzionalizzazione della GelMA con gruppi carbossilici idrofilici comporta un aumento dell'idrofilicità del network polimerico e, di conseguenza, un maggior grado di rigonfiamento in ambiente acquoso [84]. Al contrario, l'introduzione di gruppi idrofobici, quali i gruppi catecolo della dopamina, riduce inevitabilmente la capacità degli idrogeli a base di GelMA-COOH-DOPA di assorbire acqua, nonostante la presenza di gruppi -OH teoricamente idrofili. Questo comportamento può essere attribuito alla natura stessa delle strutture aromatiche della dopamina che tendono ad incorporare meno acqua, limitando l'espansione dell'idrogelo in ambiente acquoso [83].

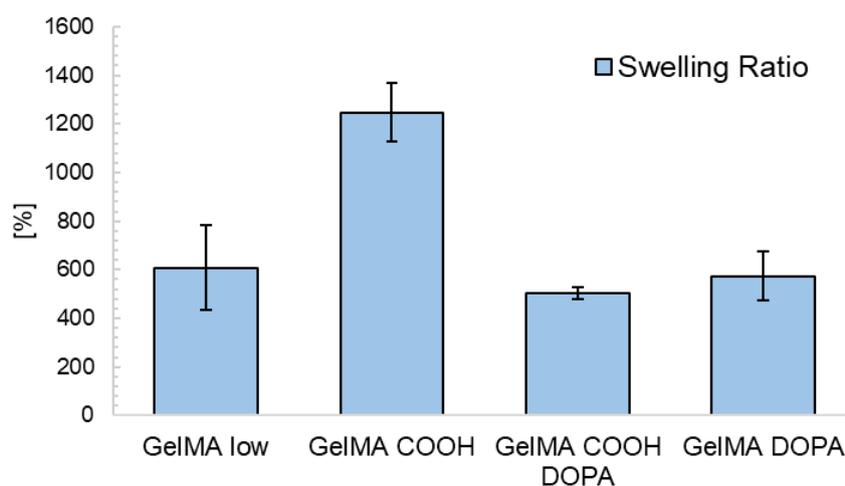


Figura 3.14: Swelling Ratio percentuale di idrogeli a base GelMA low, GelMA-COOH, GelMA-COOH-DOPA e GelMA-DOPA.

## 3.2 Caratterizzazione delle proprietà meccaniche

### 3.2.1 Test di adesione

Per valutare l'efficacia della funzionalizzazione con dopamina nel migliorare la capacità adesiva degli idrogeli, sono stati eseguiti dei test di adesione su campioni a base di GelMA e GelMA-COOH-DOPA. I risultati ottenuti (Figura 3.16) mostrano come la presenza di dopamina lungo la catena si traduca effettivamente in una migliorata capacità adesiva. La resistenza al taglio degli idrogeli aumenta infatti cca del 30% (GelMA=0,42 kPa; GelMA-COOH-DOPA=0,55 kPa), confermando il ruolo chiave dei gruppi catecolo nell'aumentare l'adesività della rete polimerica.

Questi risultati sono coerenti con quanto riportato in letteratura sull'effetto dei gruppi catecolo nell'aumentare la forza adesiva degli idrogeli. In particolare, Liu et al. (2022) hanno ottenuto un valore massimo di adesione pari a 9,1 kPa su pelle porcina fresca, utilizzando idrogeli nanofibrosi a base di GelMA funzionalizzati con dopamina, testati tramite lap shear test in condizioni simili a quelle del presente studio [46]. Sebbene i valori ottenuti in questo lavoro siano inferiori, la tendenza di aumento dell'adesività in seguito alla coniugazione con

dopamina risulta confermato. Le differenze nei valori ottenuti possono essere attribuite al diverso grado di reticolazione, alla formulazione e alla natura chimico-fisica del sistema.

L'impiego della pelle di maiale come substrato rappresenta una scelta più sfidante dal punto di vista meccanico, data la variabilità intrinseca del tessuto, ma consente al contempo di riprodurre meglio le condizioni fisiologiche reali in cui questi idrogeli potrebbero essere applicati, ad esempio come patch bioadesivi per la pelle umana. L'aumento della forza adesiva osservato nella formulazione GelMA-COOH-DOPA può quindi essere interpretato come una conferma funzionale dell'efficacia della dopamina anche in ambienti complessi, consolidando il potenziale di questi materiali in applicazioni biomediche in vivo.

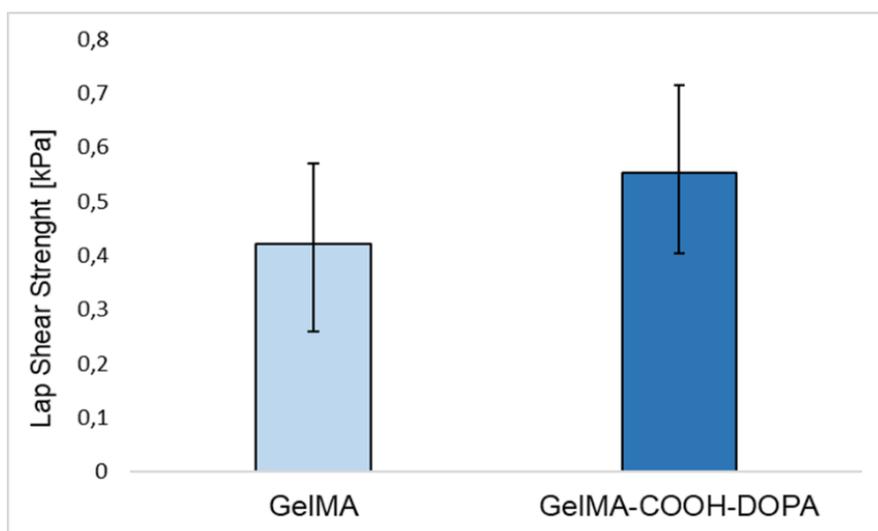


Figura 3.16: Risultati del lap-shear stress in termini di Lap Shear Strength riguardanti campioni di GelMA e GelMA-COOH-DOPA.

### 3.3 Analisi biologiche e funzionali

#### 3.3.1 Prove di mezzo condizionato – Test di vitalità cellulare

Per quantificare l'influenza del mezzo condizionato derivante dagli idrogeli di GelMA e GelMA-COOH-DOPA sulla proliferazione delle cellule HFF1, è stato eseguito un saggio colorimetrico MTT. Questo test si basa sulla capacità delle deidrogenasi metabolicamente

attive presenti nelle cellule vitali di ridurre il sale di tetrazolio MTT a formazano, un prodotto cristallino di colore viola. Il formazano, una volta solubilizzato, viene quantificato spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda di 570-650 nm e la densità ottica misurata è direttamente proporzionale al numero di cellule metabolicamente attive nel campione.

I risultati del saggio MTT, che monitorano la cinetica di proliferazione cellulare delle HFF-1 al giorno 1 e al giorno 5 di coltura in presenza dei mezzi condizionati, sono presentati nella Figura 3.17. Il grafico evidenzia un marcato incremento del segnale dal giorno 1 al giorno 5 in entrambe le condizioni sperimentali. Nello specifico, per le cellule coltivate in mezzo condizionato in GelMA, la densità ottica media passa da circa  $0,08 \pm 0,03$  al giorno 1 a  $0,53 \pm 0,02$  al giorno 5. Analogamente, per le cellule esposte al mezzo condizionato da GelMA-COOH-DOPA, si osserva un aumento da circa  $0,05 \pm 0,02$  al giorno 1 a  $0,50 \pm 0,02$  al giorno 5. Questi dati indicano chiaramente una mantenuta capacità proliferativa delle cellule HFF-1 in presenza di entrambi i mezzi condizionati.

Confrontando i due tipi di mezzo condizionato, al giorno 1 si rileva una tendenza verso una densità ottica leggermente inferiore per le cellule esposte alla GelMA-COOH-DOPA rispetto alla GelMA. Questa minima differenza può essere dovuta anche a piccole differenze nella conta cellulare e di conseguenza nella densità di cellule piastrate. In effetti, al giorno 5, le densità ottiche raggiunte dai due gruppi sono molto simili e, come indicato nel grafico, non si riscontrano differenze statisticamente significative (n.s.) tra cellule coltivate con mezzo condizionato da GelMA e quelle da GelMA-COOH-DOPA. Questo suggerisce che, a lungo termine, la presenza dei gruppi carbossilici e della dopamina nella GelMA-COOH-DOPA non altera le capacità del mezzo condizionato di supportare efficacemente la vitalità e la proliferazione delle cellule HFF-1 rispetto al materiale non modificato.

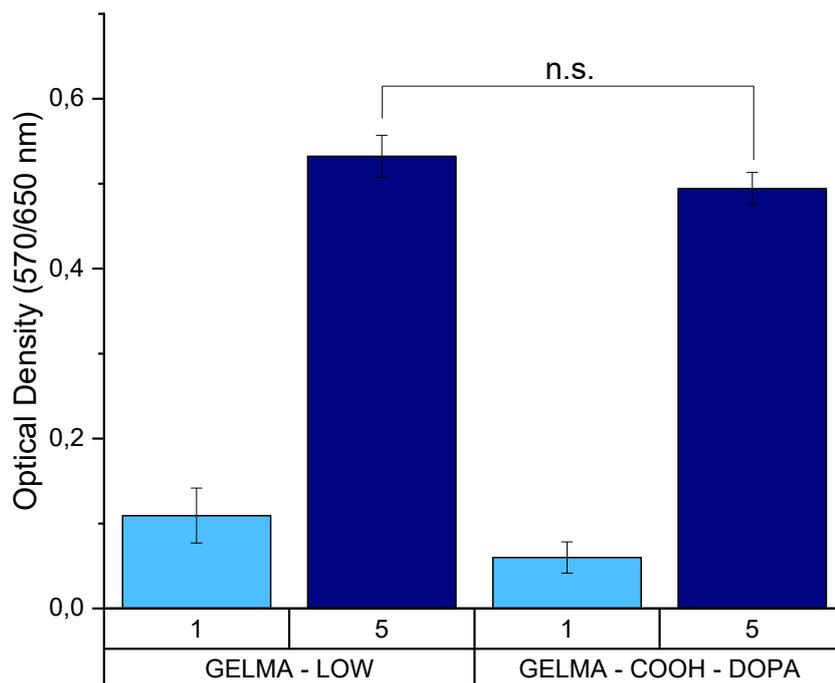


Figura 3.17: Risultati del saggio MTT su cellule HFF1 coltivate in mezzo condizionato da GelMA low e GelMA-COOH-DOPA ai time point di 1 e 5 giorni.

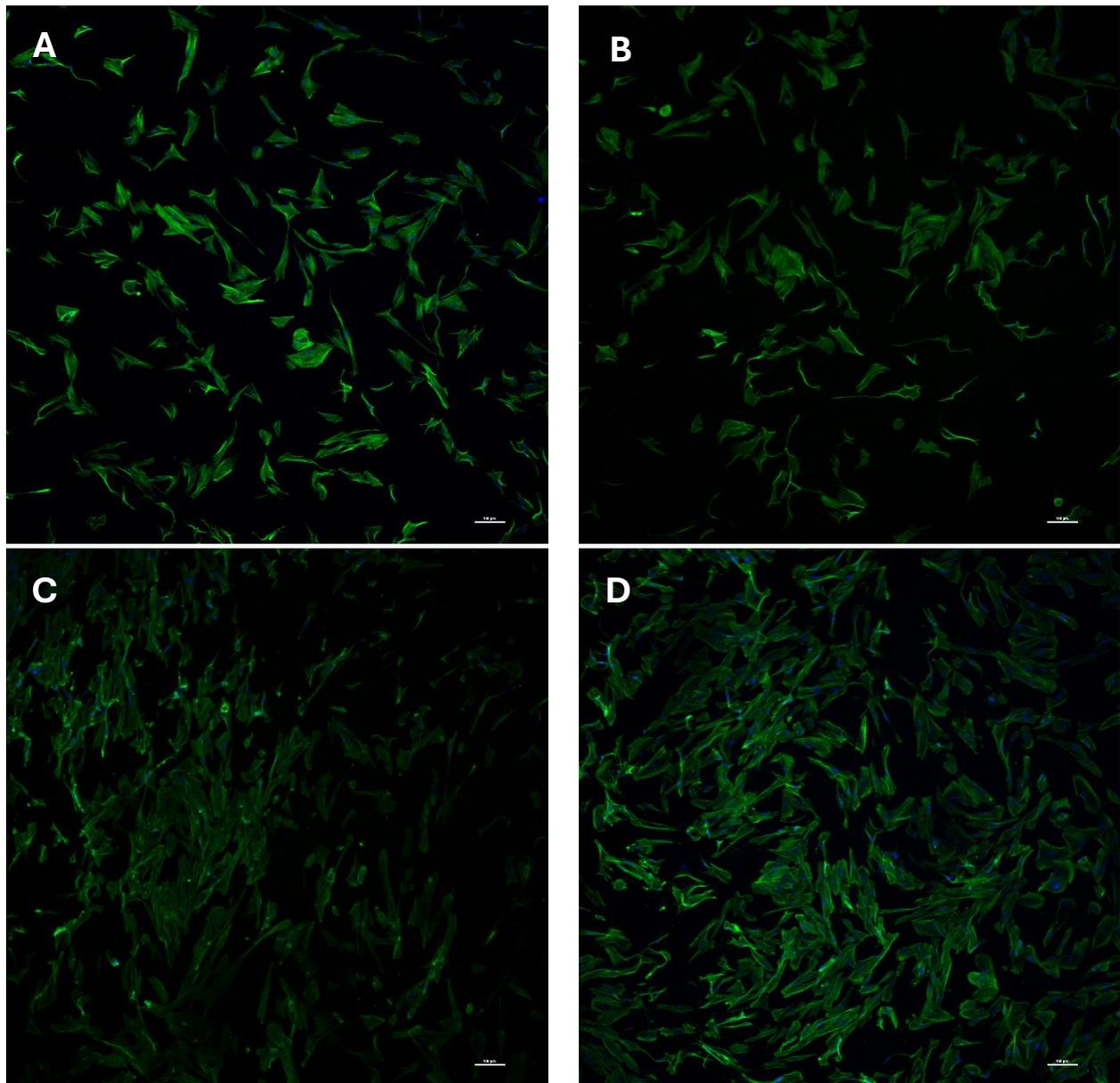
### 3.3.2. Prove di mezzo condizionato – Immunofluorescenza

Ad integrazione dei dati ottenuti sulla vitalità cellulare, è stata condotta un'analisi di immunofluorescenza sulle cellule HFF-1 coltivate in mezzo condizionato da GelMA e GelMA-COOH-DOPA. Questa tecnica ha permesso di visualizzare la morfologia cellulare, l'adesione al substrato e l'organizzazione del citoscheletro. Le cellule sono state colorate con Falloidina coniugata a un fluorocromo (verde brillante), che si lega selettivamente ai filamenti di actina (F-actina) evidenziando il citoscheletro, e con DAPI (blu), un colorante che si lega al DNA e permette la visualizzazione dei nuclei cellulari. Le immagini rappresentative sono mostrate nella Figura 3.18.

Le immagini di immunofluorescenza rivelano che le cellule HFF-1, in entrambe le condizioni di coltura, presentano una morfologia tipica dei fibroblasti, caratterizzata da una forma allungata e fusiforme con una buona estensione sul substrato. La colorazione verde brillante della falloidina conferma un'integrità e un'organizzazione ben definita del citoscheletro in

tutte le cellule, indicando uno stato di buona vitalità. I nuclei, visibili come punti blu, sono integri e distribuiti all'interno del citoplasma, affermando l'assenza di effetti citotossici da parte dei mezzi condizionati.

Le osservazioni qualitative di queste immagini di immunofluorescenza sono in linea con i dati quantitativi del saggio MTT, che non ha rivelato differenze significative nella vitalità e proliferazione a lungo termine tra i due mezzi condizionati, indicando che entrambi i materiali promuovono un ambiente favorevole per le cellule HFF-1.

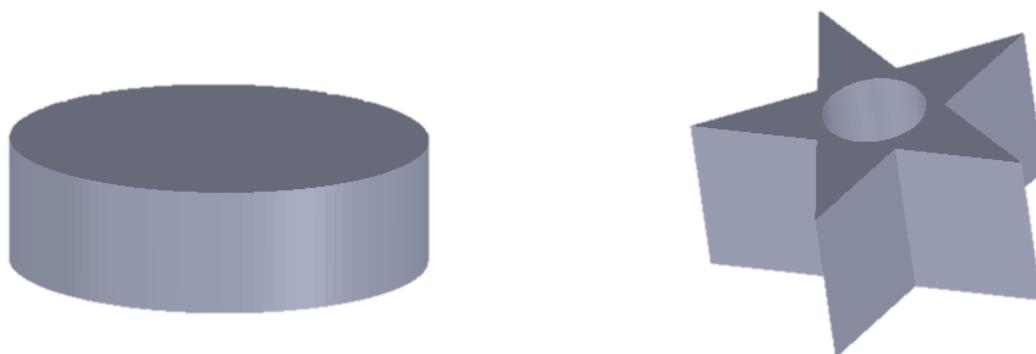


*Figura 3.18: Immagini di immunofluorescenza rappresentative di cellule HFF-1 coltivate in mezzo condizionato. A: Giorno 1, mezzo condizionato di GelMA; B: Giorno 1, mezzo condizionato di GelMA-COOH-DOPA; C: Giorno 3, mezzo condizionato di GelMA; D: Giorno 3, mezzo condizionato di GelMA-COOH-DOPA. Scale bar: 100  $\mu$ m.*

### 3.4 Stampa 3D

Al fine di valutare la stampabilità dei materiali sviluppati, sono stati eseguiti test preliminari di stampa 3D mediante tecnologia DLP, utilizzando la stampante Asiga MAX UVX27. Sono state testate formulazioni a base di GelMA low, utilizzata come riferimento, e di GelMA-COOH-DOPA, la macromolecola oggetto principale di questo lavoro di tesi. In entrambi i casi, le quantità di macromero (GelMA low o GELMA-COOH-DOPA) e fotoiniziatore (LAP) sono state fissate a 20% w/v 5 mg/mL, rispettivamente.

Le prove di stampa sono state eseguite cercando di riprodurre modelli CAD di diversa complessità. In una prima fase, è stata scelta una semplice forma cilindrica come riferimento utile per verificare l'omogeneità di reticolazione e la risoluzione lungo l'asse verticale e l'integrità strutturale delle strutture stampate. Successivamente è stata testata una geometria più complessa, ovvero una stella a cinque punte con un foro interno, al fine di valutare la possibilità di riprodurre, con una buona risoluzione sul piano xy, strutture con dettagli fini. I modelli 3D sono stati realizzati utilizzando un apposito software di progettazione CAD (solidworks) e convertiti in formato STL. Le immagini dei modelli CAD utilizzati sono riportati in Figura 3.18



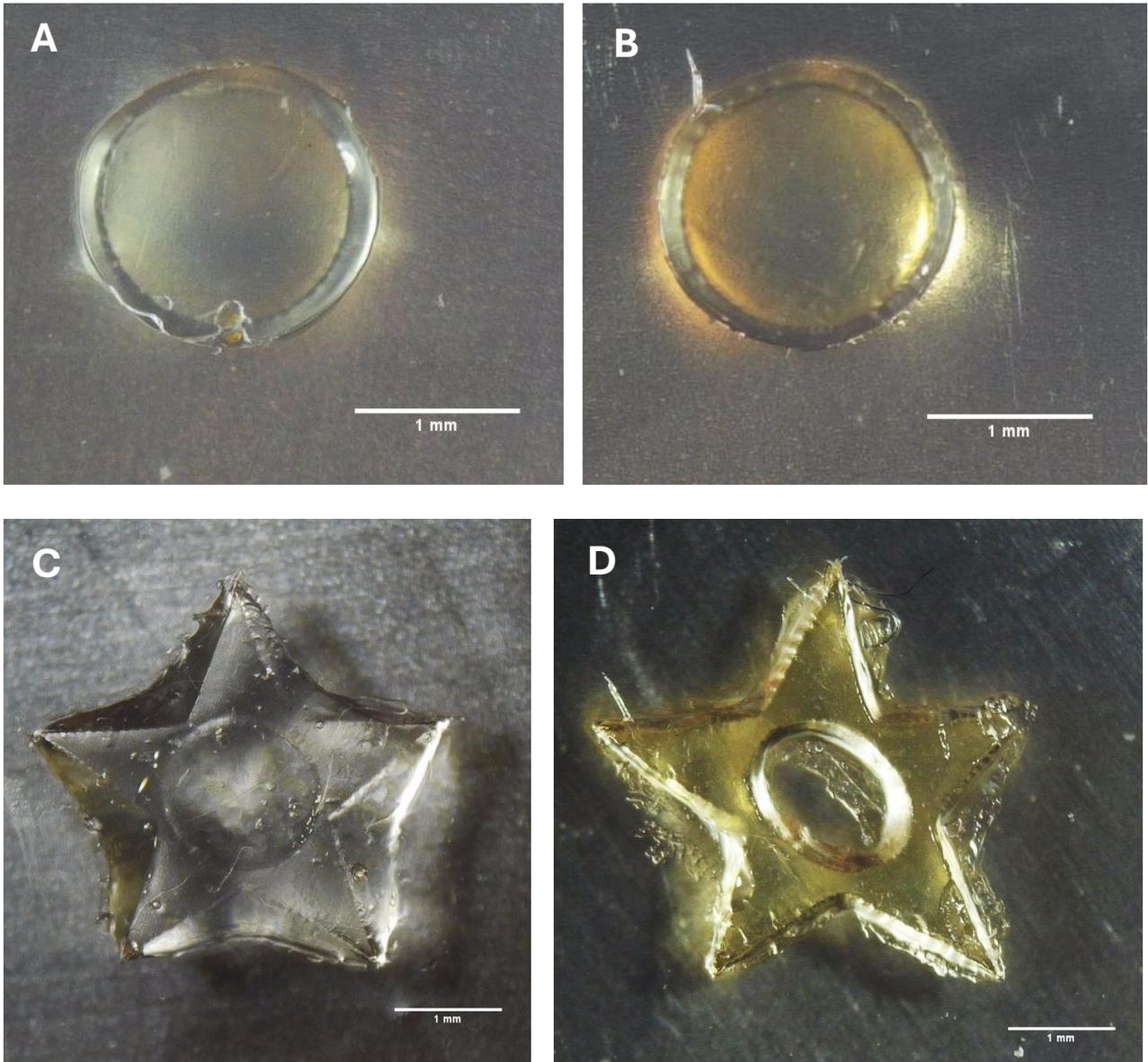
*Figura 3.18: A sinistra, disegno CAD della struttura cilindrica; a destra disegno CAD della struttura a stella con foro centrale. Fonte propria.*

Le stampe sono state realizzate impostando dei parametri di processo opportunamente ottimizzati per ciascuna delle due formulazioni in esame. In particolare, sulla base dei risultati ottenuti nelle prove fotoreologiche presentate nel paragrafo 3.1.4, per la

formulazione di GelMA-COOH-DOPA sono stati adottati tempi di esposizione più lunghi (11,0 s per il primo layer, 9,0 per i successivi) rispetto a quelli scelti per la formulazione a base GelMA (8,0 s per il primo layer, 6,0 s per i successivi).

I risultati delle prove di stampa hanno mostrato che l'utilizzo della formulazione a base di GelMA-COOH-DOPA consente di ottenere strutture stampate maggiormente definite e più fedeli ai modelli CAD (Figura 3.19). La differenza di performance tra le due formulazioni è particolarmente evidente nella stampa della struttura a forma di stella. Nel caso della GelMA, la stampa risulta meno definita: i bordi appaiono sfumati e non è stato possibile ottenere il foro centrale, che invece è ben visibile nella struttura realizzata con GelMA-COOH-DOPA. Questa perdita di definizione è attribuibile all'elevata trasparenza ottica della GelMA nello spettro di irraggiamento. Sebbene una maggiore trasparenza consenta alla luce di penetrare più facilmente nella matrice e innescare rapidamente la fotoreticolazione, essa comporta anche una scarsa localizzazione spaziale di essa. In particolare, l'assenza di assorbanza sufficiente porta a una propagazione non controllata della luce sia in profondità che lateralmente con conseguente overcuring, dimostrata dal fatto che la fotopolimerizzazione avviene anche al di fuori dell'area di esposizione prevista dal modello digitale. Questo fenomeno compromette la fedeltà del processo di stampa, causando contorni meno netti e perdita di dettagli complessi come cavità o geometrie interne [85].

Al contrario, la presenza dei gruppi catecolo nella GelMA-COOH-DOPA migliora significativamente la qualità di stampa. Questi gruppi, grazie alla loro natura aromatica, aumentano l'assorbanza del materiale nella regione UV e agiscono da filtro ottico interno, limitando la penetrazione e diffusione della luce all'interno del gel. Ne risulta una polimerizzazione più confinata al piano di esposizione, con contorni più definiti, ridotta sovraesposizione e migliore risoluzione geometrica complessiva [29].



*Figura 3.19: A: stampa del CAD cilindrico a base di GelMA; B: stampa del CAD cilindrico a base di GelMA-COOH-DOPA; C: stampa del CAD a forma di stella a cinque punte con foro centrale a base di GelMA; D: stampa del CAD a forma di stella a cinque punte con foro centrale a base di GelMA-COOH-DOPA. Scale bar: 1 mm*

# Conclusioni

Il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo lo sviluppo di un idrogelo innovativo che potesse essere utilizzato per applicazioni in medicina rigenerativa e, in particolare, nel Wound Healing. La peculiarità fondamentale dell'idrogelo realizzato consiste nell'aver allo stesso tempo un materiale che fosse biocompatibile e adesivo. Per questo motivo, la scelta del materiale di partenza è ricaduta sulla gelatina, un derivato naturale del collagene che ne mantiene proprietà bioattive, tra cui biocompatibilità, biodegradabilità e capacità di supportare la crescita cellulare. Proprio per queste sue caratteristiche, la gelatina è ampiamente utilizzata in ambito biomedicale e rappresenta una valida alternativa al collagene puro, più costoso e complesso da lavorare.

A partire da questa base, si è proceduto con la sintesi della GelMA, un derivato della gelatina modificato con gruppi metacrilici che la rendono fotoreticolabile. Tuttavia, la GelMA presenta una adesività limitata, soprattutto in ambienti umidi, proprio per questo motivo si è resa la necessità di migliorarne le proprietà adesive ispirandosi alla strategia naturale dei mitili marini, in particolare al ruolo della DOPA nel meccanismo adesivo delle cozze.

È stata quindi eseguita una sintesi a due step, volta a coniugare alla GelMA i gruppi catecolo della DOPA. Il primo step consiste nella succinilazione della GelMA, ossia l'introduzione di un maggior numero di gruppi carbossilici disponibili per legare la dopamina cloridrato nello step successivo. La coniugazione della dopamina è avvenuta mediante chimica delle carbodiimmidi, ottenendo così il nuovo macromero GelMA-COOH-DOPA contenente un'elevata densità di gruppi adesivi.

Dopo la sintesi, il materiale è stato ampiamente caratterizzato. Le analisi spettroscopiche (FT-IR, NMR, UV-VIS) hanno confermato la corretta funzionalizzazione della GelMA nei vari stadi. Le prove di fotoreologia hanno mostrato che il materiale mantiene buone capacità di reticolazione. Anche le prove meccaniche e di swelling hanno dato risultati positivi, dimostrando che l'introduzione della DOPA non compromette eccessivamente la stabilità dell'idrogelo. Dal punto di vista biologico, i test di vitalità cellulare hanno evidenziato

l'assenza di citotossicità, suggerendo una buona compatibilità con l'ambiente cellulare. Infine, le prove di stampa 3D condotte con tecnologia DLP hanno confermato la possibilità di ottenere strutture ben definite e riproducibili, aprendo la strada a future applicazioni su misura per specifiche esigenze cliniche.

I risultati ottenuti in questo lavoro rappresentano un primo passo promettente verso lo sviluppo di idrogeli bioadesivi per applicazioni cliniche, ma sono molti gli aspetti ancora da approfondire.

Un primo punto riguarda lo studio della stabilità a lungo termine dei gruppi catecolici. Poiché i gruppi DOPA sono soggetti a fenomeni ossidativi, sarà fondamentale valutare il comportamento del materiale in condizioni fisiologiche prolungate, sia in termini di adesività che di degradazione chimica e meccanica.

Un altro aspetto importante è l'ottimizzazione della formulazione in funzione dell'applicazione specifica. Potrebbero essere esplorate concentrazioni diverse di GelMA e DOPA, oppure l'introduzione di ulteriori componenti (come agenti antiossidanti, antibatterici o nanoparticelle) per modulare ulteriormente le proprietà meccaniche, adesive o di rilascio di farmaci.

Dal punto di vista biologico, sarà necessario aumentare il testing, soprattutto con l'obiettivo di incorporazione di cellule, utilizzando i gel prodotti come scaffold. Eventuali risultati positivi porteranno a valutare questi materiali in modelli tridimensionali di coltura cellulare o in sistemi ex vivo, così da simulare più da vicino le condizioni reali dei tessuti. In prospettiva, è interessante testare il materiale su modelli animali per verificarne l'efficacia nella rigenerazione tissutale in vivo, la risposta immunitaria e l'integrazione con il tessuto ospite.

Infine, sul piano applicativo, la stampa 3D apre la strada alla realizzazione di patch personalizzate e dispositivi su misura per il paziente. L'integrazione di questa tecnologia con la GelMA-COOH-DOPA potrà portare alla progettazione di soluzioni avanzate per la cura

di ferite croniche, ulcere o lesioni post-chirurgiche, offrendo un'alternativa efficace ai materiali attualmente in uso.

In sintesi, il materiale sviluppato apre a numerose possibilità di approfondimento, con l'obiettivo di renderlo sempre più adatto a un futuro utilizzo clinico, dove innovazione, sicurezza ed efficacia devono procedere di pari passo.

# Bibliografia

- [1] N. A. Peppas and R. Langer, “New challenges in biomaterials,” *Science (80-. )*, vol. 263, no. 5154, pp. 1715–1720, 1994.
- [2] P. Favia, D. Chimica, and U. Bari, “Biomateriali e Nanoscienze AA 2022 / 2023,” 2023.
- [3] E. S. Place, N. D. Evans, and M. M. Stevens, “Complexity in biomaterials for tissue engineering,” *Nat. Mater.*, vol. 8, no. 6, pp. 457–470, 2009.
- [4] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, “Biomaterials science: an introduction to materials in medicine,” 2004.
- [5] S. V Dorozhkin, “Current state of bioceramics,” *J. Ceram. Sci. Technol*, vol. 9, no. 4, pp. 353–370, 2018.
- [6] D. F. Williams, “On the nature of biomaterials,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 5897–5909, 2009.
- [7] “Dai polimeri alla ceramica: Diversi tipi di biomateriali e i loro usi.” [Online]. Available: <https://www.tomorrow.bio/it/post/dai-polimeri-alla-ceramica-diversi-tipi-di-biomateriali-e-i-loro-usi>
- [8] F. J. O’Brien, “Biomaterials & scaffolds for tissue engineering,” *Mater. today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, 2011.
- [9] P. Milani, “Medicina rigenerativa e Nanomateriali,” *Online]. Dispon. su http://www.reading.ac.uk/cellmigration/matrix.htm*.
- [10] S. Sundelacruz and D. L. Kaplan, “Stem cell-and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine,” in *Seminars in cell & developmental biology*, Elsevier, 2009, pp. 646–655.
- [11] M. Dang, L. Saunders, X. Niu, Y. Fan, and P. X. Ma, “Biomimetic delivery of signals for bone tissue engineering,” *Bone Res.*, vol. 6, no. 1, p. 25, 2018.
- [12] I. M. El-Sherbiny and M. H. Yacoub, “Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges,” *Glob. Cardiol. Sci. Pract.*, vol. 2013, no. 3, p. 38, 2013, doi: 10.5339/gcsp.2013.38.
- [13] J. Chi, X. Zhang, C. Chen, C. Shao, Y. Zhao, and Y. Wang, “Antibacterial and angiogenic chitosan microneedle array patch for promoting wound healing,” *Bioact. Mater.*, vol. 5, no. 2, pp. 253–259, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.02.004>.
- [14] K. Ruseva *et al.*, “Antibiofilm poly (carboxybetaine methacrylate) hydrogels for chronic wounds dressings,” *Eur. Polym. J.*, vol. 132, p. 109673, 2020.
- [15] P. K. Gavel, N. Kumar, H. S. Parmar, and A. K. Das, “Evaluation of a Peptide-Based Coassembled Nanofibrous and Thixotropic Hydrogel for Dermal Wound Healing,” *ACS Appl. Bio Mater.*, vol. 3, no. 5, pp. 3326–3336, May 2020, doi: 10.1021/acsabm.0c00252.
- [16] X. Zhang *et al.*, “The fabrication of antibacterial hydrogels for wound healing,” *Eur. Polym. J.*, vol. 146, no. November 2020, p. 110268, 2021, doi:

- 10.1016/j.eurpolymj.2021.110268.
- [17] A. Kumar and H. Kaur, “Sprayed in-situ synthesis of polyvinyl alcohol/chitosan loaded silver nanocomposite hydrogel for improved antibacterial effects,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 145, pp. 950–964, 2020.
- [18] F. De Cicco *et al.*, “In situ forming antibacterial dextran blend hydrogel for wound dressing: SAA technology vs. spray drying,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 101, pp. 1216–1224, 2014.
- [19] F. Ali, I. Khan, J. Chen, K. Akhtar, E. M. Bakhsh, and S. B. Khan, “Emerging Fabrication Strategies of Hydrogels and Its Applications,” *Gels*, vol. 8, no. 4, 2022, doi: 10.3390/gels8040205.
- [20] N. A. Peppas, J. Z. Hilt, A. Khademhosseini, and R. Langer, “Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology,” *Adv. Mater.*, vol. 18, no. 11, pp. 1345–1360, 2006.
- [21] J. A. Hunt, R. Chen, T. van Veen, and N. Bryan, “Hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 33, pp. 5319–5338, 2014.
- [22] J. Singh and P. Nayak, “pH-responsive polymers for drug delivery: Trends and opportunities,” *J. Polym. Sci.*, vol. 61, no. 22, pp. 2828–2850, 2023, doi: <https://doi.org/10.1002/pol.20230403>.
- [23] M. Rinaudo, “Chitin and chitosan: Properties and applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 31, no. 7, pp. 603–632, 2006.
- [24] A. Doderò, L. Pianella, S. Vicini, M. Alloisio, M. Ottonelli, and M. Castellano, “Alginate-based hydrogels prepared via ionic gelation: An experimental design approach to predict the crosslinking degree,” *Eur. Polym. J.*, vol. 118, pp. 586–594, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.06.028>.
- [25] Z. Li and J. and Guan, “Thermosensitive hydrogels for drug delivery,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 8, no. 8, pp. 991–1007, Aug. 2011, doi: 10.1517/17425247.2011.581656.
- [26] K. M. Park, S. Y. Lee, Y. K. Joung, J. S. Na, M. C. Lee, and K. D. Park, “Thermosensitive chitosan–Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration,” *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 6, pp. 1956–1965, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.01.040>.
- [27] K. Varaprasad, G. M. Raghavendra, T. Jayaramudu, M. M. Yallapu, and R. Sadiku, “A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 79, pp. 958–971, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.096>.
- [28] S. Sinha, “14 - Biodegradable superabsorbents: Methods of preparation and application—A review,” in *Fundamental Biomaterials: Polymers*, S. Thomas, P. Balakrishnan, and M. S. Sreekala, Eds., in Woodhead Publishing Series in Biomaterials. , Woodhead Publishing, 2018, pp. 307–322. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102194-1.00014-1>.
- [29] H. Montazerian *et al.*, “Stretchable and bioadhesive gelatin methacryloyl-based

- hydrogels enabled by in situ dopamine polymerization,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 13, no. 34, pp. 40290–40301, 2021.
- [30] S. Gorgieva and V. Kokol, “Collagen-vs. gelatine-based biomaterials and their biocompatibility: review and perspectives,” *Biomater. Appl. nanomedicine*, vol. 2, no. 2011, pp. 17–52, 2011.
- [31] A. K. Miri, H. G. Hosseinabadi, B. Cecen, S. Hassan, and Y. S. Zhang, “Permeability mapping of gelatin methacryloyl hydrogels,” *Acta Biomater.*, vol. 77, pp. 38–47, 2018.
- [32] 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.
- [33] P. E. Ludwig, T. J. Huff, and J. M. Zuniga, “The potential role of bioengineering and three-dimensional printing in curing global corneal blindness,” *J. Tissue Eng.*, vol. 9, p. 2041731418769863, 2018.
- [34] B. J. Klotz, D. Gawlitta, A. J. W. P. Rosenberg, J. Malda, and F. P. W. Melchels, “Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair,” *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 5, pp. 394–407, 2016, doi: 10.1016/j.tibtech.2016.01.002.
- [35] J. W. Nichol, S. T. Koshy, H. Bae, C. M. Hwang, S. Yamanlar, and A. Khademhosseini, “Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 21, pp. 5536–5544, 2010.
- [36] 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, 2017.
- [37] Y. Zhang, J. Lv, J. Zhao, G. Ling, and P. Zhang, “A versatile GelMA composite hydrogel: Designing principles, delivery forms and biomedical applications,” *Eur. Polym. J.*, vol. 197, p. 112370, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112370>.
- [38] L. Xiang and W. Cui, “Biomedical application of photo-crosslinked gelatin hydrogels,” *J. Leather Sci. Eng.*, vol. 3, no. 1, 2021, doi: 10.1186/s42825-020-00043-y.
- [39] N. Celikkin, S. Mastrogiacomo, J. Jaroszewicz, X. F. Walboomers, and W. Swieszkowski, “Gelatin methacrylate scaffold for bone tissue engineering: The influence of polymer concentration,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 106, no. 1, pp. 201–209, 2018.
- [40] N. Monteiro *et al.*, “Photopolymerization of cell-laden gelatin methacryloyl hydrogels using a dental curing light for regenerative dentistry,” *Dent. Mater.*, vol. 34, no. 3, pp. 389–399, 2018.
- [41] S. S. Jensen and H. Terheyden, “Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials,” *Database Abstr. Rev. Eff. Qual. Rev. [Internet]*, 2009.

- [42] J. H. Waite, “Evidence for a repeating 3, 4-dihydroxyphenylalanine-and hydroxyproline-containing decapeptide in the adhesive protein of the mussel, *Mytilus edulis* L.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 258, no. 5, pp. 2911–2915, 1983.
- [43] H. G. Silverman and F. F. Roberto, “Understanding marine mussel adhesion,” *Mar. Biotechnol.*, vol. 9, no. 6, pp. 661–681, 2007, doi: 10.1007/s10126-007-9053-x.
- [44] E. Carrington, “Seasonal variation in the attachment strength of blue mussels: causes and consequences,” *Limnol. Oceanogr.*, vol. 47, no. 6, pp. 1723–1733, 2002.
- [45] J. Monahan and J. J. Wilker, “Specificity of metal ion cross-linking in marine mussel adhesives,” *Chem. Commun.*, no. 14, pp. 1672–1673, 2003.
- [46] 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, 2022, doi: 10.1021/acsabm.1c01087.
- [47] 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, 2022, doi: 10.1039/d2tb02371g.
- [48] S. Pacelli *et al.*, “Fabrication of a Double-Cross-Linked Interpenetrating Polymeric Network (IPN) Hydrogel Surface Modified with Polydopamine to Modulate the Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, no. 30, pp. 24955–24962, 2018, doi: 10.1021/acsami.8b05200.
- [49] K. Yue, G. Trujillo-de Santiago, M. M. Alvarez, A. Tamayol, N. Annabi, and A. Khademhosseini, “Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels,” *Biomaterials*, vol. 73, pp. 254–271, 2015.
- [50] “I processi radicalici,” vol. 2, pp. 1–15.
- [51] S. Filippi, “Prototipazione Rapida,” 2024.
- [52] K. Shinkar and K. Rhode, “Could 3D extrusion bioprinting serve to be a real alternative to organ transplantation in the future?,” *Ann. 3D Print. Med.*, vol. 7, p. 100066, 2022, doi: 10.1016/j.stlm.2022.100066.
- [53] H. Ding, M. Dong, Q. Zheng, and Z. L. Wu, “Digital light processing 3D printing of hydrogels: a minireview,” *Mol. Syst. Des. Eng.*, vol. 7, no. 9, pp. 1017–1029, 2022, doi: 10.1039/d2me00066k.
- [54] J.-C. Wang, M. Ruilova, and S.-J. Hsieh, “A web-based platform for automated vat photopolymerization additive manufacturing process,” *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, vol. 119, 2022, doi: 10.1007/s00170-021-08318-2.
- [55] “<https://euroceram.org/en/eu/bottom-up-process>.”
- [56] “<https://formlabs.com>.” [Online]. Available: <https://formlabs.com/it/blog/confronto-tecnologie-stampa-3d-sla-dlp/?srsltid=AfmBOoot3POpgZhAW4Kf9ONieqe4Kvsz9A9jqR56zRTDbUEFozaGZnDJ>
- [57] “What is the mechanism of Succinylated Gelatin?” [Online]. Available: <https://synapse.patsnap.com/article/what-is-the-mechanism-of-succinylated-gelatin>

- [58] S. K. Mitra and S. Chakraborty, *Microfluidics and Nanofluidics Handbook: Chemistry, Physics, and Life Science Principles*. CRC Press, 2011.
- [59] V. Domenici and C. A. Veracini, *Risonanza Magnetica Nucleare. Principi e Applicazioni*, vol. 1. ETS, 2011.
- [60] T. D. W. Claridge, *High-resolution NMR techniques in organic chemistry*, vol. 27. Elsevier, 2016.
- [61] Q. Uv, “Spettroscopia UV e Visibile,” pp. 18–51, 2018.
- [62] R. D. Corder, S. C. Dudick, J. E. Bara, and S. A. Khan, “Photorheology and Gelation during Polymerization of Coordinated Ionic Liquids,” *ACS Appl. Polym. Mater.*, vol. 2, no. 6, pp. 2397–2405, Jun. 2020, doi: 10.1021/acsapm.0c00343.
- [63] M. S. Ummah, *No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title*, vol. 11, no. 1. 2019. [Online]. Available: [http://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1091/RED2017-Eng-8ene.pdf?sequence=12&isAllowed=y%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.regsciurbeco.2008.06.005%0Ahttps://www.researchgate.net/publication/305320484\\_SISTEM\\_PEM\\_BETUNGAN\\_TERPUSAT\\_STRATEGI\\_MELESTARI](http://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1091/RED2017-Eng-8ene.pdf?sequence=12&isAllowed=y%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.regsciurbeco.2008.06.005%0Ahttps://www.researchgate.net/publication/305320484_SISTEM_PEM_BETUNGAN_TERPUSAT_STRATEGI_MELESTARI)
- [64] G. Ciarleglio, S. Vella, E. Toto, and M. G. Santonicola, “Emulsion-based multi-responsive microspheres for the delivery of lipophilic Ozoile,” *Ceram. Int.*, vol. 49, no. 14, pp. 24517–24524, 2023, doi: 10.1016/j.ceramint.2022.12.095.
- [65] C. Yang *et al.*, “A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel for wound healing,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 82, no. 4, pp. 1297–1305, 2010.
- [66] T. Mosmann, “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays,” *J. Immunol. Methods*, vol. 65, no. 1, pp. 55–63, 1983, doi: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [67] T. L. Riss *et al.*, “Cell viability assays,” *Assay Guid. Man. [Internet]*, 2016.
- [68] J. Kapuscinski, “DAPI: a DNA-specific fluorescent probe,” *Biotech. Histochem.*, vol. 70, no. 5, pp. 220–233, 1995.
- [69] E. Wulf, A. Deboen, F. A. Bautz, H. Faulstich, and T. Wieland, “Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin.,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 76, no. 9, pp. 4498–4502, 1979.
- [70] J. A. Cooper, “Effects of cytochalasin and phalloidin on actin.,” *J. Cell Biol.*, vol. 105, no. 4, pp. 1473–1478, 1987.
- [71] “<https://www.asiga.com/max-x>.” [Online]. Available: <https://www.asiga.com/max-x>
- [72] S. Krishnamoorthy, B. Noorani, and C. xu, “Effects of Encapsulated Cells on the Physical–Mechanical Properties and Microstructure of Gelatin Methacrylate Hydrogels,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, p. 5061, Oct. 2019, doi: 10.3390/ijms20205061.
- [73] K. Da Silva, P. Kumar, S. F. Van Vuuren, V. Pillay, and Y. E. Choonara, “Three-Dimensional Printability of an ECM-Based Gelatin Methacryloyl (GelMA) Biomaterial for Potential Neuroregeneration,” *ACS Omega*, vol. 6, no. 33, pp. 21368–21383, 2021, doi: 10.1021/acsomega.1c01903.
- [74] R. Resmi, S. Unnikrishnan, L. K. Krishnan, and V. Kalliyana Krishnan, “Synthesis

- and characterization of silver nanoparticle incorporated gelatin-hydroxypropyl methacrylate hydrogels for wound dressing applications,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 134, no. 10, 2017, doi: 10.1002/app.44529.
- [75] C. Zhang *et al.*, “Design and evaluation of modified gelatin films to address the aging problem of soft capsule shells,” *Polym. Test.*, vol. 145, p. 108759, 2025, doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2025.108759>.
- [76] 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, 2018.
- [77] W. Lee *et al.*, “Dopamine-Functionalized Gellan Gum Hydrogel as a Candidate Biomaterial for a Retinal Pigment Epithelium Cell Delivery System,” *ACS Appl. Bio Mater.*, vol. 4, no. 2, pp. 1771–1782, Feb. 2021, doi: 10.1021/acsabm.0c01516.
- [78] R. M. Silverstein and G. C. Bassler, “Spectrometric identification of organic compounds,” *J. Chem. Educ.*, vol. 39, no. 11, p. 546, 1962.
- [79] J. Y. Kim, S. B. Ryu, and K. D. Park, “Preparation and characterization of dual-crosslinked gelatin hydrogel via Dopa-Fe<sup>3+</sup> complexation and fenton reaction,” *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 58, pp. 105–112, 2018.
- [80] D. Zhou *et al.*, “Dopamine-modified hyaluronic acid hydrogel adhesives with fast-forming and high tissue adhesion,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 12, no. 16, pp. 18225–18234, 2020.
- [81] S. M. Kang, S. Park, D. Kim, S. Y. Park, R. S. Ruoff, and H. Lee, “Simultaneous reduction and surface functionalization of graphene oxide by mussel-inspired chemistry,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 21, no. 1, pp. 108–112, 2011.
- [82] F. Bode *et al.*, “Hybrid gelation processes in enzymatically gelled gelatin: impact on nanostructure, macroscopic properties and cellular response,” *Soft Matter*, vol. 9, no. 29, pp. 6986–6999, 2013.
- [83] W. Lu, M. Rahimnejad, B. O. Sahadi, and M. C. Bottino, “Dopamine-Conjugated Methacrylated Gelatin Hydrogel—Physical, Mechanical, and Biological Properties,” *Gels*, vol. 11, no. 7, p. 499, 2025.
- [84] T. Kopač, M. Abrami, M. Grassi, A. Ručigaj, and M. Krajnc, “Polysaccharide-based hydrogels crosslink density equation: A rheological and LF-NMR study of polymer-polymer interactions,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 277, p. 118895, 2022.
- [85] Y. Wang, F. Frascella, C. G. Gaglio, C. F. Pirri, Q. Wei, and I. Roppolo, “Vat Photopolymerization 3D Printing of Hydrogels Embedding Metal-Organic Frameworks for Photodynamic Antimicrobial Therapy,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2024, doi: 10.1021/acsami.4c15168.