

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

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

Tesi di Laurea Magistrale

Intrappolamento di microrganismi in idrogeli fotoreticolati per biosensoristica



Relatore

Prof. Marco Sangermano

Correlatore

Prof. Francesca Bosco

Candidato

Paola Vicari

Settembre 2018

Indice

1. Introduzione e scopo del lavoro	1
2. La fotopolimerizzazione	3
2.1 Fotopolimerizzazione per addizione radicalica	3
2.2 Iniziazione fotochimica e fotoiniziatori	4
2.3 Vantaggi della fotopolimerizzazione	5
2.4 Limiti della fotopolimerizzazione	6
3. Idrogeli polimerici: tipologie e applicazioni	7
3.1 Idrogeli polimerici	7
3.2 Classificazione degli idrogeli	7
3.2.1 Idrogeli naturali	8
3.2.2 Idrogeli sintetici	9
3.2.3 Idrogeli compositi	9
3.3 Metodi di sintesi degli idrogeli	9
3.3.1 Reticolazione chimica	9
3.3.2 Reticolazione fisica	11
3.4 Idrogeli fotoreticolati	11
3.4.1 Idrogeli fotoreticolati a base di PEG	12
4. Biosensori e idrogeli per la biosensoristica	15
4.1 Biosensori	15
4.1.1 Sistemi di riconoscimento biologico	16
4.1.1.1 Sistemi biocatalitici	16
4.1.1.2 Sistemi basati sull'affinità con l'analita	17
4.1.1.3 Sistemi biomimetici	17
4.1.2 Tecniche di immobilizzazione	17
4.1.3 Trasmissione dei segnali	18
4.2 Biosensori per il monitoraggio di sostanze tossiche	19
4.2.1 Biosensori per monitorare la presenza di sostanze tossiche, basati sull'uso di microrganismi	19
4.3 Idrogeli per la biosensoristica	21
4.3.1 Idrogeli contenenti enzimi	21
4.3.2 Idrogeli contenenti cellule eucariotiche animali	22
4.3.3 Idrogeli contenenti microrganismi	23
5. Materiali e metodi	25
5.1 Sintesi degli idrogeli	25
5.2 Caratterizzazione chimico-fisica degli idrogeli	26
5.2.1 Fotoreologia e reologia	27
5.2.2 Spettroscopia FTIR-ATR	27
5.2.3 DMTA: analisi termica dinamo-meccanica	27
5.2.4 DSC: calorimetria a scansione differenziale	28
5.2.5 Misura della densità di reticolazione	28
5.2.6 Prove di swelling	28
5.2.7 Prove di %gel	28
5.3 Intrappolamento dei microrganismi negli idrogeli polimerici	28
5.3.1 Condizione di crescita e terreno di coltura	28
5.3.1.1 Valutazione su terreno solido della crescita in presenza dei componenti del polimero e della fotopolimerizzazione	29
5.3.1.2 Valutazione in terreno liquido	30
5.3.2 Intrappolamento dei microrganismi	31
5.3.2.1 Prova di lavaggio degli idrogeli contenenti i microrganismi	31

5.3.2.2	Applicazione degli idrogeli contenenti i microrganismi come sistema biosensoristico sensibile alla presenza di ferro	32
5.3.3	Osservazione degli idrogeli contenenti i microrganismi tramite microscopia ottica	32
5.3.4	Strumentazione utilizzata	33
6.	Risultati e discussione	35
6.1	<i>Fotoreologia e reologia</i>	35
6.1.1	Fotoreologia	35
6.1.2	Reologia in variazione di ampiezza e in variazione di frequenza	38
6.2	<i>Spettroscopia FTIR-ATR</i>	40
6.3	<i>Prove di %gel</i>	41
6.4	<i>Analisi termica dinamo-meccanica DMTA</i>	42
6.4.1	Andamento della Tan delta	42
6.4.2	Moduli G' allo stato vetroso e allo stato gommoso	43
6.5	<i>Calorimetria a scansione differenziale DSC</i>	44
6.6	<i>Prove di swelling</i>	45
6.7	<i>Intrappolamento dei microrganismi negli idrogeli polimerici</i>	46
6.7.1	Valutazione dell'influenza dei componenti del polimero e dell'irraggiamento sulla crescita microbica	46
6.7.1.1	Prove su terreno solido	46
6.7.1.2	Prove in terreno liquido	52
6.7.2	Caratterizzazione degli idrogeli contenenti <i>P. fluorescens</i>	57
6.7.2.1	Fotoreologia degli idrogeli contenenti <i>P. fluorescens</i>	57
6.7.2.2	Analisi DMTA dei campioni contenenti <i>P. fluorescens</i>	59
6.7.2.3	Immagini al microscopio	61
6.7.3	Prove di intrappolamento di <i>P. fluorescens</i>	61
6.7.3.1	Risultati delle prove di lavaggio degli idrogeli contenenti <i>P. fluorescens</i>	62
6.7.4	Prove di applicazione di <i>P. fluorescens</i> immobilizzato in idrogeli	62
6.7.4.1	Determinazioni sul terreno di coltura	63
6.7.4.2	Determinazioni sugli idrogeli	64
6.7.5	Valutazione della risposta alla variazione della concentrazione di ferro in coltura	66
7.	Conclusioni e prospettive	69
8.	Bibliografia	71

1. Introduzione e scopo del lavoro

Nell'ultimo secolo lo sviluppo industriale e tecnologico ha determinato un cambiamento radicale nelle abitudini di vita degli esseri umani, portando a fenomeni come l'aumento della popolazione, il consumismo incontrollato e lo spreco di risorse ambientali ed energetiche. A questo si aggiunge anche il grave fenomeno di dispersione di inquinanti nell'ambiente, sia a causa di processi industriali e agricoli, sia a causa di attività della vita quotidiana. Pesticidi, erbicidi, prodotti petroliferi, composti chimici derivanti da farmaci, acque esauste di processi industriali, ma anche tensioattivi, detergenti, cosmetici, polveri, vernici: tutti questi prodotti sono potenziali inquinanti ambientali, soprattutto se entrano nel processo metabolico di microrganismi e animali, inquinando l'intero ciclo alimentare.¹

Da questo nasce la necessità di monitorare continuamente la presenza di questi composti tossici e inquinanti, nel suolo, nelle acque e nell'aria nel minor tempo possibile, idealmente in tempo reale: i biosensori possono rappresentare una soluzione a queste esigenze.²

Questi dispositivi sono dei sensori dotati di un elemento di riconoscimento che rileva nel sistema analizzato la presenza di uno specifico analita a cui è sensibile; l'elemento di riconoscimento si trova in diretto contatto con un trasduttore, il cui compito è quello di trasformare l'informazione acquisita in un segnale utile.³

Gli elementi biologici di riconoscimento possono essere molteplici, come enzimi, proteine, cellule, microrganismi o tessuti: in particolare i microrganismi sono ottimi candidati per questa funzione, grazie alle loro capacità di adattamento genetico e alla resistenza ad intervalli ampi di pH e temperatura, che li rende idonei a vari sistemi.⁴ I batteri in genere vengono impiegati per il rilevamento di composti tossici o metalli pesanti, sfruttando segnali come la bioluminescenza, proprietà intrinseca di alcuni batteri aventi il gene *lux*,⁵ la fluorescenza,⁶ o i processi metabolici che comportano il consumo di ossigeno e la produzione di CO₂.⁷

Esistono diversi modi per immobilizzare l'elemento biologico al fine di costituire il biosensore, sia fisici che chimici;⁸ tra questi, gli idrogeli rappresentano materiali adatti a tale compito.

Gli idrogeli sono polimeri idrofili reticolati che in un ambiente acquoso trattengono elevate quantità di acqua, rigonfiandosi. Inoltre, sono biocompatibili, e possono derivare da materiali naturali o sintetici. Questi dispositivi trovano già numerose applicazioni, in campo medico, biologico ed elettronico, e negli ultimi decenni hanno avuto un crescente successo anche nella biosensoristica.⁹

Il vantaggio degli idrogeli, oltre a creare una struttura di sostegno per l'elemento biologico, risiede nella capacità di assorbire elevate percentuali d'acqua, permettendo la diffusione delle biomolecole, sia per una efficace interazione tra biosensore e analita, sia per gli eventuali nutrienti e metaboliti, nel caso in cui l'elemento biologico sia costituito da cellule vive.¹⁰

In questo lavoro di tesi si è svolto uno studio preliminare per mettere a punto un biosensore sensibile alla presenza di metalli pesanti in un sistema acquoso, in particolare a ioni di Fe³⁺, tramite l'impiego di un idrogelo a base di polietilenglicole (PEG) con intrappolato *Pseudomonas fluorescens*, un batterio gram-negativo, che in carenza di ferro produce un sideroforo fluorescente, la pioverdina.⁶

Per la prima parte di questo lavoro sperimentale sono state condotte prove di fotoreticolazione con luce visibile di idrogeli, a partire da diverse miscele di pre-polimero di polietilenglicole-dimetacrilato (PEGDMA) e polietilenglicole-metacrilato (PEGMA), fotoiniziatore e acqua. Gli idrogeli sono stati caratterizzati con prove reologiche in tempo reale durante la fotoreticolazione, e i reticoli essiccati sono stati testati in spettroscopia FTIR-ATR, con analisi

termiche dinamo-meccaniche (DMTA), test di calorimetria a scansione differenziale (DSC), prove di *swelling*, prove di %gel e calcolo della densità di reticolazione.

Dopodiché si è valutata la biocompatibilità, nei confronti del batterio *P. fluorescens*, dei singoli componenti impiegati nel sistema di fotoreticolazione, quali la radiazione luminosa, il pre-polimero, il fotoiniziatore, sia in condizioni di irraggiamento che non, e anche la biocompatibilità degli idrogeli polimerici caratterizzati in precedenza, sia lavati che non lavati con un tampone acquoso. Infine, si è proceduto alla reticolazione degli idrogeli in presenza dei microrganismi: in questo caso è stata valutata la cinetica di reticolazione tramite reologia in tempo reale, le proprietà termiche e meccaniche dell'idrogelo tramite DMTA ed è stata testata la biocompatibilità della reazione di reticolazione, nonché l'eventuale rilascio dei microrganismi da parte dell'idrogelo stesso, per verificare se l'intrappolamento con il sistema scelto sia efficace o meno.

Nei primi capitoli di questo elaborato si tratta in generale la fotopolimerizzazione, cioè la tecnica utilizzata in questo lavoro sperimentale per ottenere gli idrogeli polimerici, si discutono i vari tipi di idrogeli polimerici, in particolare quelli fotoreticolati, dopodiché si descrivono i biosensori e le loro applicazioni, con particolare attenzione a quelli basati sull'impiego di microrganismi e di idrogeli polimerici. Successivamente si descrivono i materiali e i metodi utilizzati durante questo lavoro sperimentale e infine si discutono i risultati ottenuti.

2. La fotopolimerizzazione

La fotopolimerizzazione ha iniziato a svilupparsi alla fine degli anni '60 ed ha avuto in breve tempo un successo crescente in diversi campi di applicazione.¹¹

La fotopolimerizzazione è un processo di polimerizzazione attivato da una radiazione di tipo luminoso, come la luce visibile, i raggi UV e IR, oppure ad alta energia, come i raggi γ e i fasci di elettroni.¹²

Il sistema reagente implica la presenza di molecole capaci di assorbire energia dalla radiazione e di dare vita a specie reattive che innescano la polimerizzazione di monomeri o oligomeri. I monomeri/oligomeri polimerizzabili per via fotochimica sono dotati di gruppi funzionali reattivi capaci di polimerizzare per addizione a catena o per condensazione.¹³

Se i reagenti sono monofunzionali la fotopolimerizzazione è volta alla formazione di termoplastici, ovvero costituiti da catene polimeriche lineari o leggermente ramificate, che interagiscono tra loro con forze di legame secondarie; se invece vi sono più gruppi funzionali, questi possono innescare una reticolazione dove le catene polimeriche sono collegate da legami chimici covalenti, per cui il materiale risultante è un termoindurente, che non può essere fuso o solubilizzato.¹³

La fotopolimerizzazione può avvenire attraverso due meccanismi: condensazione o addizione. La fotopolimerizzazione per condensazione implica una crescita a stadi delle catene polimeriche, per successive reazioni di fotocondensazione; la fotopolimerizzazione per addizione prevede, invece, l'eccitazione per via fotochimica di un fotoiniziatore che genera specie reattive capaci di interagire con i monomeri, che polimerizzano per via radicalica o per via ionica: nel primo caso il fotoiniziatore dà vita a radicali liberi che innescano la polimerizzazione per addizione radicalica, nel secondo caso la specie attiva è uno ione.¹⁴

Di seguito si approfondisce la fotopolimerizzazione per addizione radicalica, ovvero il tipo di polimerizzazione adottato in questo lavoro di tesi e che rappresenta la tecnica fotochimica maggiormente impiegata in varie applicazioni commerciali.

2.1 Fotopolimerizzazione per addizione radicalica

La fotopolimerizzazione per addizione radicalica è una tecnica ampiamente diffusa per applicazioni commerciali, come la realizzazione di rivestimenti e vernici,¹⁵ di materiali per l'elettronica¹⁶, nello stampaggio 3D¹⁷ o in campo biomedico per la realizzazione di idrogeli per il rilascio di farmaci¹⁸ e per l'intrappolamento cellulare.¹⁹

Come già detto, in questo caso l'interazione tra la radiazione e il fotoiniziatore determina la formazione di radicali liberi, che attaccano monomeri o oligomeri insaturi sul doppio legame presente nel gruppo funzionale.²⁰ In Figura 2.1 è presentato uno schema del processo, dove PI è il fotoiniziatore, $R\bullet$ il radicale formato e M il monomero.

Nella fase iniziale il fotoiniziatore assorbe la radiazione incidente e genera due radicali, dei quali solitamente uno solo è attivo nella fase di iniziazione della polimerizzazione; il radicale formatosi per via fotochimica attacca un monomero per formare una nuova specie radicalica. In seguito, si ha la propagazione della reazione radicalica, con le catene polimeriche che crescono rapidamente aggiungendo alle terminazioni radicaliche nuovi monomeri. Infine la terminazione può avvenire per accoppiamento di due catene radicaliche, o per disproporzione con spegnimento dei radicali.²¹

Nel caso reale è anche possibile che la catena polimerica radicalica si spenga per estrazione di idrogeno da una seconda catena polimerica, con conseguente trasferimento della specie radicalica a quest'ultima.²⁰

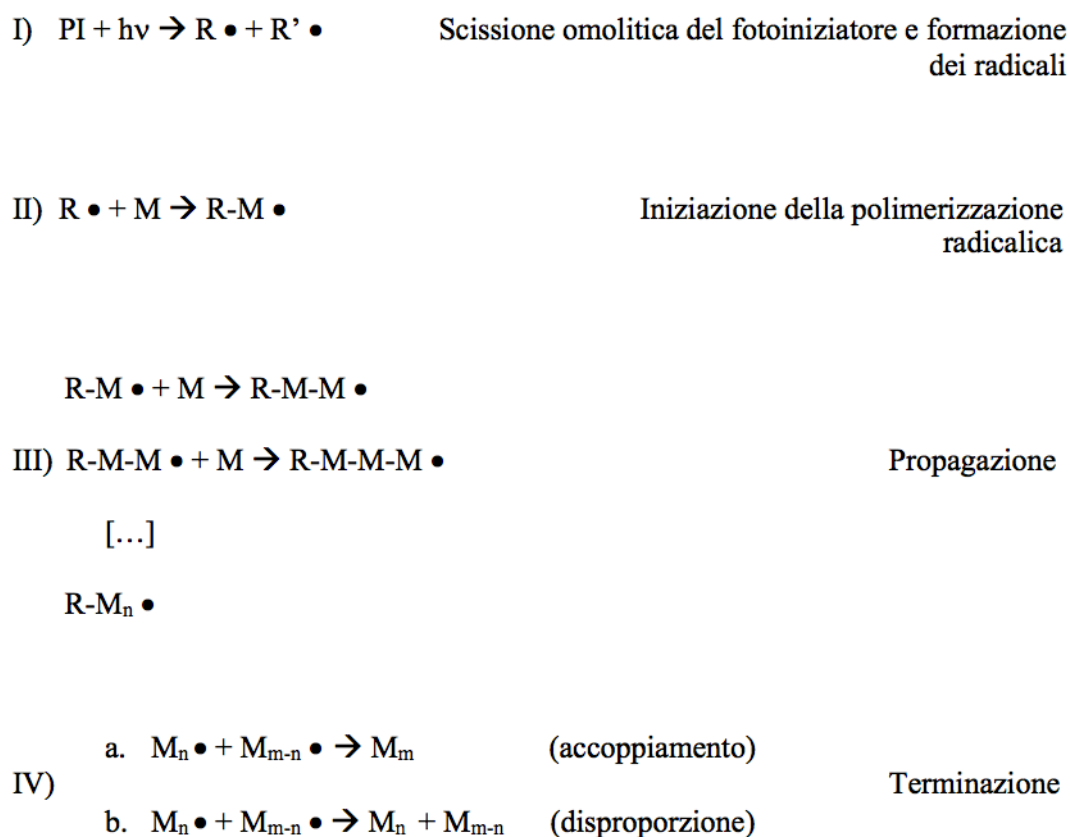


Fig. 2. 1: Schema della fotopolimerizzazione per addizione radicalica

2.2 Iniziazione fotochimica e fotoiniziatori

Con il termine fotoiniziatore si intende un additivo che assorbe la radiazione luminosa e permette l'iniziazione della polimerizzazione quando la resa quantica nella produzione dei radicali è sufficientemente elevata.²⁰

La scelta di tale molecola è di fondamentale importanza per l'ottenimento e l'ottimizzazione del prodotto finale desiderato. Il fotoiniziatore deve essere, infatti, adatto al sistema che deve essere polimerizzato, e.g. nel caso della produzione di idrogeli è necessario che questo sia idrosolubile. È poi necessario che la molecola assorba nell'intervallo di lunghezze d'onda in cui emette la sorgente luminosa utilizzata per il processo: nella maggior parte dei casi applicativi la radiazione utilizzata è quella ultravioletta ma, soprattutto nel campo bio, è spesso preferibile utilizzare luce visibile, in quanto la radiazione è meno energetica dell'UV e non danneggia le cellule viventi. Molti fotoiniziatori presentano poi problematiche legate alla tossicità e quindi non sono adatti ad applicazioni legate al campo biologico.

La vita dello stato eccitato PI^* è molto breve e la specie tende rapidamente (in meno di 10^{-6} s) a diseccitarsi. PI^* può stabilizzarsi per emissioni di luce o calore, tornando allo stato fondamentale PI , può formare radicali e spegnersi con l'ossigeno presente nell'ambiente o con eventuali specie additivate capaci di spegnere radicali, oppure può dare scissione omolitica per formare radicali liberi molto reattivi.²²

Dal punto di vista della reazione chimica, l'assorbimento della radiazione può determinare la formazione di radicali in due modi possibili: in un primo caso una specie chimica assorbe la radiazione, si eccita e si decompone in radicali in modo omolitico (fotoiniziatori di tipo Norrish I), i radicali formati dal fotoiniziatore sono generati per scissione intramolecolare in posizione α ; in un secondo caso, la prima specie chimica eccitata è un fotosensibilizzante che rilascia energia ad una seconda specie chimica, la quale allora dà via alla formazione di radicali per trasferimento di idrogeno intermolecolare (fotoiniziatori di tipo Norrish II). Quale sia la via preferita da un sistema fotoiniziato non è ben chiara e probabilmente si attivano entrambi i meccanismi di iniziazione.²⁰

Il meccanismo intramolecolare è tipico di composti arilchetonici, dove si ha rottura omolitica del legame tra il carbonile C=O e il carbonio in posizione α rispetto ad esso. Nel caso intermolecolare, tipico di chetoni aromatici, il radicale strappa un idrogeno da una molecola donatrice, come un'ammina terziaria.²⁰ I due meccanismi sono schematizzati nella Figura 2.2.

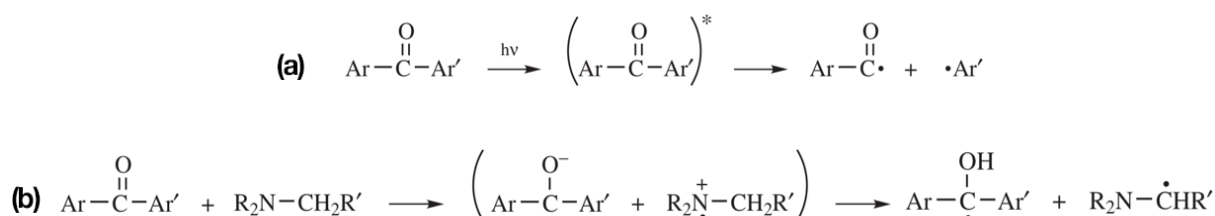
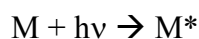


Fig. 2. 2: Scissione omolitica intramolecolare per scissione in α (a) o intermolecolare per trasferimento di idrogeno (b). (Figura parzialmente modificata da [14])

Dei radicali formati dalle reazioni di scissione omolitica, solo un radicale risulta efficace nell'iniziazione della polimerizzazione radicalica: per la scissione intramolecolare il radicale carbonile aromatico, per quella intermolecolare il radicale amminico. Gli altri radicali possono incorrere ad accoppiamenti o possono essere influenti nella fase di terminazione delle catene.²⁰ L'iniziazione avviene frequentemente grazie alla presenza di un fotoiniziatore nel sistema, ma non è l'unica opzione; potrebbe essere il monomero stesso ad eccitarsi e a generare i radicali per via omolitica, come di seguito riportato:



Questo meccanismo è comunque limitato a monomeri sensibili alla radiazione UV, in cui il doppio legame è coniugato con altri gruppi, come stirene, metilmetacrilato, che assorbono radiazioni con lunghezza d'onda tra 300-325 nm.²⁰

2.3 Vantaggi della fotopolimerizzazione

L'impiego di radiazioni luminose o ad alta energia per iniziare la reazione di polimerizzazione permette applicazioni interessanti. Con questa tecnica è possibile confinare le zone che devono

subire reticolazione, come avviene in litografia, o si può monitorare il procedere della reticolazione, semplicemente accendendo o spegnendo la fonte luminosa. Inoltre, un grande vantaggio deriva dal poter condurre una polimerizzazione rapida anche in condizioni ambiente, evitando di raggiungere temperature elevate: ciò comporta un notevole risparmio di tempo ed energia ed estende l'insieme dei materiali utilizzabili anche a quelli che non possono essere processati a temperature elevate, garantendo così una versatilità del processo.²⁰

2.4 Limiti della fotopolimerizzazione

Uno dei maggiori limiti della fotopolimerizzazione è legato alla scarsa capacità di penetrazione della luce in spessori elevati, per cui questa tecnica è ristretta alla realizzazione di oggetti che si sviluppano principalmente in due dimensioni, come film e rivestimenti.²⁰ La stampa 3D in parte risolve questo problema, poiché la formatura avviene strato per strato, ed è possibile sfruttare la localizzazione della reazione per poi ottenere un oggetto tridimensionale.

Un altro limite della fotopolimerizzazione radicalica è l'inibizione dovuta all'ossigeno presente nell'ambiente, perché come già detto l'ossigeno può spegnere i radicali formati dal fotoiniziatore, impedendo un'efficiente iniziazione della reazione. Questo problema può essere superato effettuando la polimerizzazione in atmosfera inerte o in vuoto, oppure additivando il sistema reattivo con molecole più affini all'ossigeno che lo legano a sé prima che inibisca i radicali del fotoiniziatore.²³

Infine un altro limite riguarda i sistemi contenenti acrilati, fotopolimerizzati per addizione radicalica, che dopo polimerizzazione sono soggetti a ritiri volumetrici che vanno dal 5 al 20%, e che determina un notevole limite in determinate applicazioni, ad esempio nei rivestimenti, poiché implica il distacco dal substrato del materiale fotopolimerizzato. Al contrario, sistemi a base di composti epossidici che polimerizzano per apertura di anello, attivata per via cationica, hanno un ritiro volumetrico di solo 1-2% ed inoltre questi sistemi non sono soggetti ad inibizione da parte dell'ossigeno.²⁴

3. Idrogeli polimerici: tipologie ed applicazioni

Gli idrogeli sono reticoli polimerici idrofili, che in un ambiente acquoso si rigonfiano per assorbimento, trattenendo elevate quantità di acqua. La ricerca su questi particolari materiali è in continua evoluzione, e ha dato vita a numerose applicazioni interessanti, in campo medico, biologico ed elettronico. Recentemente hanno anche avuto ampio successo nella biosensoristica, ad esempio per rapide valutazioni chimico-fisiche dei componenti ambientali.⁹

3.1 Idrogeli polimerici

Un idrogelo è un materiale polimerico idrofilo in grado di cambiare notevolmente le sue proprietà chimico-fisiche quando posto in un ambiente acquoso.²⁵ La proprietà macroscopica più caratterizzante di questi materiali è la capacità di rigonfiamento (in inglese *swelling*) in seguito all'assorbimento di un solvente acquoso.²⁶

Le molecole d'acqua penetrano il *network* polimerico e forniscono al materiale la sua struttura rigonfiata: il materiale rigonfiato ha una consistenza gommosa, dovuta all'elevata quantità di acqua: l'idrogelo è dunque costituito dal reticolo polimerico insolubile e dall'acqua da esso trattenuta.

Non appena l'assorbimento ha inizio, le prime molecole di acqua che entrano nel gel polimerico interagiscono con i gruppi ad elevata polarità e idrofilia (*primary attached water*). Dopo l'idratazione del reticolo polare, l'idrogelo comincia a rigonfiare e le porzioni idrofobe del reticolo indeboliscono le interazioni tra loro fino ad annullarle, cosicché l'acqua possa penetrare nel reticolo (*secondary attached water*). Questi due primi meccanismi sono dovuti all'acqua che si lega al reticolo. Infine, quando tutti i gruppi polari, non polari e ionici sono saturi, il volume libero rimanente viene riempito da altra acqua (*free water*).²⁷

La reticolazione, e la sua densità, sono il principale fattore determinante il rigonfiamento e il comportamento meccanico del materiale: il reticolo difatti rappresenta la struttura portante dell'idrogelo, che deve idratarsi senza dissolversi nel solvente; può essere ottenuto con legami idrogeno tra le catene, forze intermolecolari di Van der Waals, forze coulombiane, legami covalenti o *entanglements* e contiene gruppi come carbossili, ammidi o idrossili, che rendono il materiale idrofilo.^{28, 29}

Gli idrogeli possono essere sintetizzati in varie forme, come micro o nanoparticelle, film e rivestimenti,³⁰ a partire sia da materiali naturali che da materiali sintetici. Devono peraltro essere materiali biocompatibili, al fine di evitare il rischio di tossicità per cellule e microrganismi, garantire la permeazione di ossigeno, nutrienti e metaboliti, ed essere in grado di biodegradarsi, soprattutto quando vengono impiegati nell'ingegneria tissutale, dove devono permettere la rigenerazione del nuovo tessuto, e nel rilascio di farmaci, dove la matrice deve decomporsi gradualmente per un rilascio controllato.^{27, 31}

La possibilità di inglobare e permeare una fase acquosa in un reticolo polimerico, la biocompatibilità dei materiali impiegati e la sensibilità agli stimoli dell'ambienti esterni hanno reso gli idrogeli interessanti dispositivi nel campo dei biomateriali, ad esempio per la realizzazione di sistemi per il rilascio di farmaci,²⁸ di impianti tissutali³² o di biosensori.³³

3.2 Classificazione degli idrogeli

Esistono vari modi per classificare gli idrogeli, in base al metodo di preparazione (omopolimeri e copolimeri), se è presente una distribuzione di carica (ionici, non ionici, anfoteri), in base alla

natura del materiale (naturali o sintetici), in base all'ordine strutturale (amorfi, cristallini, semicristallini). Di seguito è presentata una classificazione degli idrogeli in base alla natura del materiale di base.

3.2.1 Idrogeli naturali

Vengono definiti idrogeli naturali sostanze tipo la gomma naturale, gli acidi nucleici, le proteine come la fibrina, i polipeptidi come il collagene e i polisaccaridi come gli alginati, l'acido ialuronico e la cellulosa.

Sono frequentemente impiegati nell'ambito dell'ingegneria tissutale, per l'elevata biocompatibilità: le loro proprietà meccaniche sono paragonabili a quelle dei tessuti, la loro porosità favorisce l'infiltrazione di cellule e nutrienti e la loro complessa composizione molecolare favorisce l'adesione delle cellule e la loro proliferazione.³⁴

Gli idrogeli a base di polisaccaridi sono biomateriali molto interessanti, grazie alla loro diversità strutturale, alla elevata biodegradabilità e alla similitudine con la matrice extracellulare (ECM) dei sistemi biologici.³⁵ Nonostante la grande vastità di polisaccaridi presenti in natura, solo alcuni di loro sono effettivamente impiegati nell'ambito della ricerca biomedica, soprattutto per via delle regolamentazioni nel campo dei biomateriali che ne limitano l'impiego. Tra questi l'acido ialuronico (HA) riveste un ruolo di preminenza: prodotto dalle cellule come un polimero lineare, è un componente della matrice extracellulare che regola l'idratazione e le proprietà elastiche dei tessuti connettivi ed epiteliali; ha un carattere anionico che permette interazioni elettrostatiche con altri componenti, e di conseguenza la possibilità di ritrovare l'acido ialuronico in diverse forme, come idrogelo, liquido viscoelastico, o fibre.³⁶

Questo materiale è applicato nell'ingegneria genetica e tissutale: i suoi idrogeli possono essere impiegati come filler plastici, *scaffolds* per cellule staminali³⁷ e per la rigenerazione di tessuto osseo, cartilagineo³⁸ e nervoso.³⁹

A titolo d'esempio si cita uno studio del 2003, in cui la Prof.ssa Özgenel ha valutato gli effetti dell'acido ialuronico nella riparazione e rigenerazione di nervi periferici di ratti adulti: i nervi trattati con acido ialuronico hanno dimostrato una riduzione delle cicatrici perineurali e la possibilità di rigenerazione.⁴⁰

Nel 2012, Purcell et al. hanno sviluppato un idrogelo iniettabile a base di acido ialuronico per il rilascio di cellule stromali per la stimolazione della chemiotassi (ovvero la migrazione di batteri e cellule in risposta a certe sostanze chimiche presenti nell'ambiente) di cellule del midollo spinale sul miocardio per la cura dell'infarto. I risultati dello studio sono stati soddisfacenti, sia *in vitro* che *in vivo*, nel trattamento di infarti nei topi.⁴¹

Gli idrogeli a base di proteine sono costituiti da proteine derivanti dalla matrice extracellulare. La loro attività biologica li rende ottimi candidati per il rilascio di farmaci e per l'intrappolamento cellulare (impiegato per terapie cellulari⁴² e medicina rigenerativa⁴³). Le proteine tendono naturalmente ad autoassemblarsi per formare un gel reticolato, a seconda delle condizioni esterne di pH e temperatura.⁴⁴

Il collagene è la proteina più abbondante nei mammiferi, tra i biomateriali naturali più usati in applicazioni biomediche.⁴⁵

Per ottenere idrogeli, il collagene viene in genere disciolto in un acido e una volta che la reazione è neutralizzata i monomeri di collagene si assemblano in fibre con l'aumentare della temperatura e formano un idrogelo reticolato fisicamente.⁴⁶

Aumentando eccessivamente la temperatura (oltre i 37 °C), aumenta la velocità di formazione del gel, che determina fibre dal diametro più piccolo e una porosità minore; inoltre uno dei maggiori limiti degli idrogeli a base di collagene sono le scarse proprietà meccaniche, in quanto la reticolazione è di natura fisica e non chimica.⁴⁷

3.2.2 Idrogeli sintetici

Gli idrogeli sintetici hanno trovato moltissime applicazioni in campo scientifico e tecnologico. Il loro maggiore vantaggio è la possibilità di standardizzare e monitorare la sintesi ed ottenere una riproducibilità dei risultati. Molti materiali sintetici usati per la sintesi di idrogeli risultano biocompatibili, permettendo il loro impiego anche in campo medico e biologico.⁹ Il polivinilalcol (PVA)⁴⁸ e il polietilenglicole (PEG)⁴⁹ sono tra i polimeri più usati in questo ambito, principalmente per la realizzazione di *scaffolds* ed impianti tissutali.

Sono anche stati sintetizzati idrogeli ibridi tra materiali sintetici e materiali naturali, attraverso copolimerizzazione o graffaggio, per ottenere funzionalità particolari per specifiche applicazioni.⁵⁰

3.2.3 Idrogeli compositi

Gli idrogeli possono essere caricati per ottenere dei materiali compositi reattivi a specifici stimoli, ad esempio idrogeli fotoattivi, conduttivi o semplicemente con migliori proprietà meccaniche.⁹

Esistono vari esempi di studi condotti per lo sviluppo di sistemi compositi a base di idrogeli e di seguito se ne riportano alcuni.

Nel 2014 Qu et al. hanno realizzato degli idrogeli compositi conduttivi a base di alginato di sodio e grafite. L'alginato di sodio è un polielettrolita anionico che forma facilmente idrogeli tramite Ca^{2+} ; disperdendo omogeneamente una micropolvere di grafite nella miscela reagente ed in seguito all'interazione tra l'alginato e gli ioni di calcio è stato ottenuto l'idrogelo composito, il cui rigonfiamento dipende fortemente dal contenuto di grafite. Il metodo risulta efficace e particolarmente semplice dal punto di vista operativo.⁵¹

In un recente studio sono stati sviluppati idrogeli a base di polietilenglicole diacrilato (PEGDA) caricati con nanoparticelle di un'argilla sintetica (laponite). La nanocarica ha migliorato notevolmente le proprietà meccaniche dell'idrogelo tridimensionale e ha favorito l'adesione di cellule sul polimero.⁵²

Un recentissimo studio condotto da Wang et al. è invece stato svolto per intrappolare nanocristalli di cellulosa funzionalizzati in superficie con molecole di un fotoiniziatore, l'ossido di bis(acil)fosfina BAPO, per ottenere una reticolazione efficace di una matrice a base di PEG attraverso stampaggio 3D. L'idrogelo risultante ha elevate proprietà meccaniche che gli permettono di mantenere la forma data ed inoltre presenta elevato rigonfiamento in acqua.⁵³

3.3 Metodi di sintesi degli idrogeli

Gli idrogeli polimerici possono essere sintetizzati sia per reticolazione fisica che chimica: nel primo caso il reticolo si forma grazie all'interazione tra le catene polimeriche tramite legami secondari o *entanglements*,^{54, 55, 56} nel secondo caso invece esistono veri e propri legami covalenti o ionici tra le diverse catene.^{57, 58, 59}

Di seguito vengono elencati i principali meccanismi dei due tipi di reticolazione.

3.3.1 Reticolazione chimica

La reticolazione chimica determina la creazione di legami tra le catene polimeriche, con conseguente formazione di un idrogelo permanente. La reticolazione chimica può avvenire sia per reazione tra gruppi funzionali attivati appartenenti alle singole catene, sia grazie all'impiego di agenti reticolanti con basso peso molecolare.

Le principali reazioni chimiche coinvolte sono:

- Reazione di condensazione: i poliesteri e le poliammidi, polimeri spesso ottenuti per reazioni di condensazione dei gruppi funzionali del tipo -OH o -NH₂ con acidi carbossilici, possono essere reticolati se le catene sono dotate di gruppi funzionali reattivi su entrambi i lati.⁶⁰
- Addizione di Michael: è una reazione di addizione nucleofila di un carbanione o un nucleofilo (come tioli e ammine) all'insaturazione tra i carboni α e β di un composto carbonilico (come mostrato schematicamente in Figura 3.1);⁶¹ è una reazione molto selettiva sotto condizioni fisiologiche e non coinvolge reagenti e prodotti tossici. Viene principalmente impiegata in campo biomedico per sintesi *in situ* ad esempio tra un tiolo e un vinile.⁶²

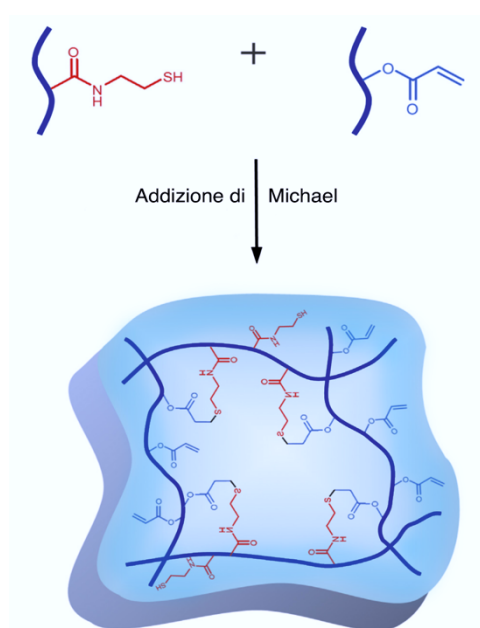


Fig 3. 1: Addizione di Michael per la formazione *in situ* di un idrogelo [61]

- Reazione click: è una reazione catalizzata da Cu(I) tra azoturi e acetileni terminali, simile alle reazioni che avvengono in natura dove a partire da molecole di base si formano molecole molto complesse. È una reazione ampiamente usata in campo biomedico poiché priva di tossicità e molto rapida.⁶³
- Reticolazione assistita da enzimi: gli enzimi consentono la formazione dei legami covalenti tra le catene; gli idrogeli a base di PEG sono tra i più comuni idrogeli prodotti per via enzimatica. Ad esempio, in uno studio del 1997, è stato possibile ottenere un reticolo di PEG tramite l'enzima transglutaminasi, aggiunto ad una soluzione di copolimero di lisina e fenilalanina e di PEG arricchito con gruppi glutaminici.³³
- Fotoreticolazione: i polimeri metacrilati possono essere fotoreticolati in presenza di un fotoiniziatore; questi sistemi sono ideali per realizzare dispositivi iniettabili, in cui la soluzione di precursore è iniettata nel corpo e successivamente irradiata con luce visibile

(o UV, ma non è preferibile poiché aggressiva con le cellule viventi), favorendo la formazione del reticolo (come mostrato in Figura 3.2). Le maggiori limitazioni sono dovute alla possibile tossicità di alcuni fotoiniziatori, alla formazione di radicali durante la reazione e all'esposizione prolungata alla fonte luminosa.⁶⁴

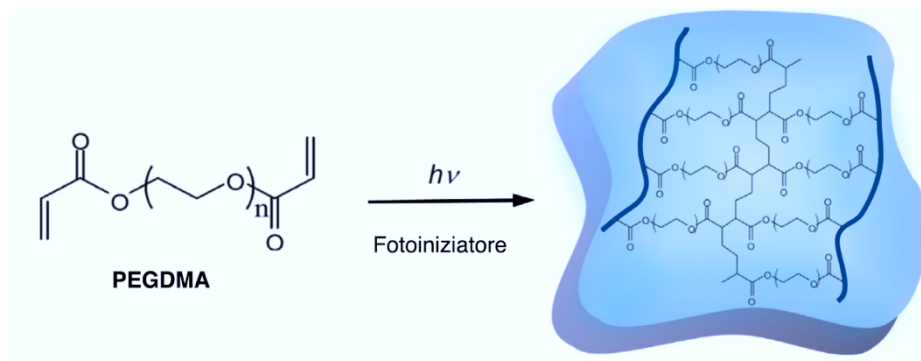


Fig 3. 2: Fotoreticolazione del polietilenglicole-dimetacrilato (PEGDMA) [61]

3.3.2 Reticolazione fisica

La possibilità di realizzare dei reticoli polimerici attraverso i soli legami fisici permette di escludere l'utilizzo di agenti reticolanti, spesso impiegati nella reticolazione chimica, che talvolta possono causare problemi di tossicità.⁶⁵

I possibili meccanismi di interazione fisica sono:

- Interazione coulombiana: qualora siano coinvolti polimeri carichi elettrostaticamente, questi possono interagire grazie alle cariche opposte, come accade con l'alginato, un polisaccaride anionico che viene reticolato inserendo nella sua miscela cationi tipo Ca^{2+} , Mg^{2+} e Ba^{2+} . Le proprietà meccaniche di questi reticoli possono essere controllate variando la concentrazione e il tipo di cationi aggiunti.⁶⁶
- Cristallizzazione: nel caso del polivinilalcol (PVA) il reticolo viene formato attraverso un processo di congelamento e successivo scongelamento di una soluzione acquosa del polimero; in questo modo si forma un gel forte ed altamente elastico.⁶⁷

3.4 Idrogeli fotoreticolati

Tra tutti i sistemi possibili descritti finora, si è scelto di approfondire il caso degli idrogeli ottenuti per fotoreticolazione.

La fotoreticolazione è usata per convertire un liquido di monomero o pre-polimero in un idrogelo grazie ad una polimerizzazione radicalica, in condizioni ambiente o fisiologiche. Come indicato nel capitolo 2, la luce visibile o UV può interagire con composti sensibili alle radiazioni chiamati fotoiniziatori, al fine di formare dei radicali liberi che inizino la polimerizzazione di reticolazione. I vantaggi di questa tecnica risiedono nella possibilità di controllare sia spazialmente che temporalmente l'avanzamento della polimerizzazione, in quanto fortemente dipendente dalla radiazione luminosa, nella rapidità della reazione, che può protrarsi al più per

qualche minuto, e il vantaggio di poter operare in condizioni di temperatura ambiente senza produzione eccessiva di calore.⁶⁸

Come già menzionato, la fotoreticolazione degli idrogeli può essere impiegata in campo medico per iniezioni *in situ*, permettendo di formare strutture complesse che si adattino al meglio ai tessuti, in particolari condizioni di temperatura e pH ed assenza di elementi tossici.

In questi sistemi, i fotoiniziatori hanno un ruolo chiave e devono essere biocompatibili, solubili in acqua e stabili; i più comuni fotoiniziatori impiegati in applicazioni biomediche e biotecnologiche sono composti aromatici carbonilici, tra cui alcuni composti chetonici.

I polimeri fotoreticolabili sono polimeri solubili in acqua che abbiano due o più gruppi funzionali reattivi, come le miscele dei diacrilati e dimetacrilati del PEG.⁶⁹

3.4.1 Idrogeli fotoreticolati a base di PEG

Gli idrogeli a base di polietilenglicole possono essere fotoreticolati qualora contengano dei gruppi funzionali acrilati e metacrilati. Questi materiali sono adatti per realizzare l'intrappolamento di cellule e microrganismi o membrane biomimetiche: la loro chimica e le loro proprietà possono essere variate e controllate attraverso il peso molecolare, la quantità di fotoiniziatore e la densità di reticolazione. Inoltre, è stata più volte valutata la biocompatibilità di questi materiali con differenti tipi di cellule, come cellule pancreatiche di maiali o condrociti, e sono stati ottenuti risultati positivi.⁷⁰

Gli idrogeli di polietilenglicole-dimetacrilato (PEGDMA) vengono in genere formati a partire da sospensioni acquose di pre-polimeri e fotoiniziatore; la polimerizzazione viene innescata da una radiazione luminosa visibile o UV. Le catene di PEGDMA sono dotate di due gruppi metacrilati, ciascuno dei quali può reagire con altri due gruppi di catene vicine e formare, tramite legami covalenti, un reticolo tridimensionale, come già mostrato nella Fig 3.2.⁷⁰

Esistono numerosi studi di caratterizzazione del PEGDMA e delle sue applicazioni e di seguito se ne citano alcuni.

Nel 2011 Killian et al. hanno valutato le proprietà meccaniche e termiche di idrogeli a base di PEGDMA, al variare della concentrazione di monomero, del peso molecolare e del contenuto di acqua nella formulazione di partenza: riducendo la quantità di PEGDMA nell'idrogelo, ne consegue una diminuzione sia della resistenza a trazione che del modulo di Young G' , ed un aumento dei valori di allungamento a rottura. Infine, aumentando il peso molecolare del polimero si osserva un aumento nella temperatura di transizione vetrosa T_g .⁷¹

Nel 2012 Bäckström et al. hanno dimostrato che le proprietà degli idrogeli a base di PEGDMA, reticolati in presenza di un tampone fosfato salino (PBS), possono variare in base al tempo dell'esposizione alla luce irradiante UV: in particolare il tempo ottimale per la formazione del gel è stato determinato tra i 6 e i 10 minuti e che il contenuto d'acqua varia dal 50 al 90%wt.⁷⁰

Nel 2015, invece, Hwang et al. hanno caratterizzato idrogeli di copolimeri a base di PEGDMA e PEGMA (polietilenglicole-metacrilato): il PEGMA monofunzionale non partecipa alla formazione dei ponti tra le catene, ma riduce la densità di reticolazione rispetto ad un sistema di solo PEGDMA. Aumentando la frazione di PEGDMA nella miscela di partenza, si è osservato un aumento del modulo elastico G' e della frazione di gel formato, mentre il rigonfiamento e la resistenza superficiale al graffio diminuiscono, a causa della formazione di un reticolo più compatto.⁷¹

Lo studio svolto Schmocker et al. nel 2015 ha mostrato la possibilità di monitorare un sistema di reticolazione *in situ* di idrogeli a base di PEGDMA. Il sistema reattivo è stato iniettato in una vertebra bovina e successivamente reticolato tramite una sonda dotata di fibra ottica emittente luce UV; la sonda è stata integrata con un collettore di segnale di fluorescenza e spettroscopia Raman per osservare l'avanzamento della polimerizzazione, tramite i segnali generati dall'eccitazione luminosa del sistema. Sono state anche inserite nanofibrille di cellulosa, per

favorire lo scattering della radiazione luminosa e migliorare il processo di reticolazione. Il successo di questo studio permette di poter estendere la fotoreticolazione ad operazioni *in vivo* nel campo medico, con un effettivo controllo sull'avanzamento della polimerizzazione.⁷²

L'aspetto di maggiore interesse di questi materiali risulta nella loro versatilità, potendone variare molti aspetti, dalla composizione chimica, alla quantità e al tipo di fotoiniziatore, al contenuto di acqua. Questo, insieme alla loro dimostrata biocompatibilità, consente di ideare sistemi sempre più su misura per applicazioni specifiche, espandendo l'impiego degli idrogeli a settori nuovi, tra cui la biosensoristica.

4. Biosensori e idrogeli per la biosensoristica

4.1 Biosensori

Un sensore è un dispositivo che riceve e risponde a segnali e stimoli dall'esterno, di natura fisica o chimica; secondo la definizione fornita dalla IUPAC nel 1991, si definisce sensore fisico un "dispositivo che fornisce informazioni su una proprietà fisica del sistema", mentre un sensore chimico un "dispositivo che trasforma un'informazione chimica, che vanno dalla concentrazione di uno specifico componente all'analisi della composizione totale, in un segnale analiticamente utile".⁷³

I biosensori sono particolari sensori dotati di un elemento di riconoscimento biologico e possono appartenere ad entrambe le categorie, poiché possono essere sensibili ad informazioni sia biofisiche sia biochimiche, che poi trasformano in un segnale utile.³

La IUPAC nel 1999 ha definito un biosensore come "un dispositivo integrato recettore-trasduttore, che è capace di fornire selettive informazioni analitiche quantitative o semi-quantitative, usando un elemento di riconoscimento biologico".⁷⁴

Lo studio e l'applicazione dei biosensori interessano molteplici campi di ricerca, quali biologia, fisica, chimica, ingegneria, per cui il concetto stesso di biosensore dipende dal contesto in cui è utilizzato. Dai biologi può essere definito come un dispositivo che rileva cambiamenti di variabili biologiche, come un potenziale elettrico cellulare o la concentrazione di una particolare molecola, per tradurli in segnali elettrici; per i fisici può essere visto come un dispositivo che trasmette informazioni su cambiamenti fisiologici; oppure i chimici lo possono definire un dispositivo in grado di sfruttare reazioni biochimiche per trasmettere informazioni su composti chimici, tramite segnali elettrici, ottici o termici.⁷⁵

In Figura 4.1 è mostrato uno schema generale del meccanismo di un biosensore. Qualsiasi sia il punto di vista adottato o il campo di applicazione, in generale i biosensori sono costituiti da un bioelemento, che riconosce uno specifico analita a cui è sensibile, e che si trova in diretto contatto con un trasduttore, il cui compito è quello di trasformare il riconoscimento biologico in un segnale utilizzabile.⁷⁶

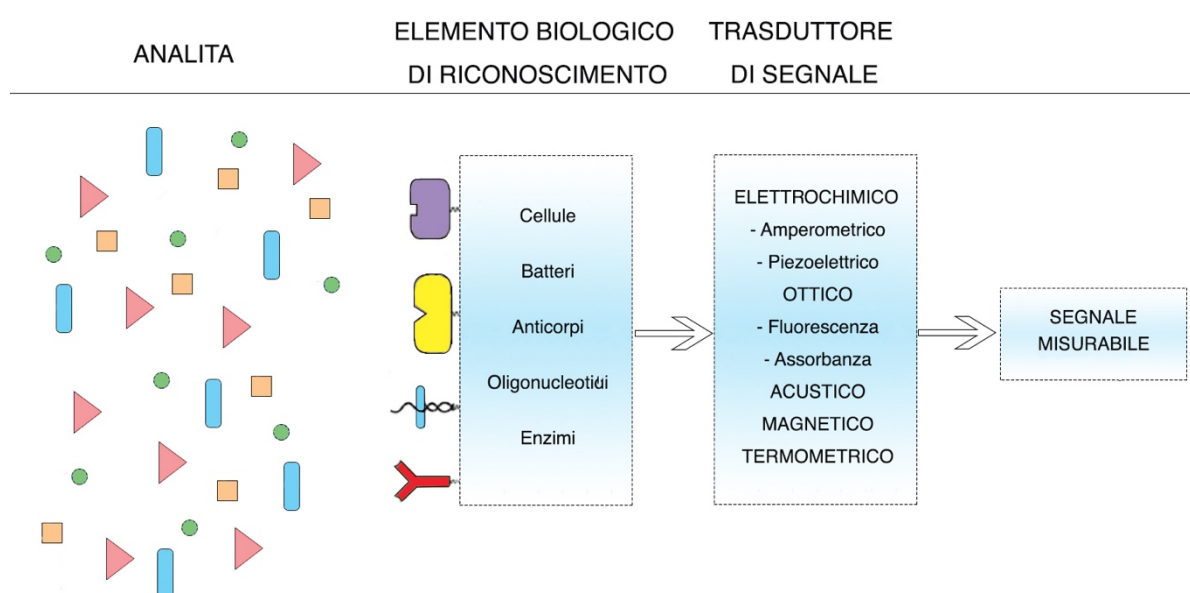


Fig. 4. 1: Schema di un biosensore

Una caratteristica fondamentale dell'elemento biologico è l'essere dotato di specificità e sensibilità nei confronti di un analita, cioè deve riconoscere l'analita in modo specifico ed essere insensibile agli altri componenti del campione in esame.³

Il primo biosensore fu inventato nel 1962 da Clark e Lyons, e consiste in un elettrodo potenziometrico a base di enzimi che misura la concentrazione di glucosio.⁷⁷ L'enzima solubile glucosio-ossidasi (GOx) è stato interposto tra una membrana semipermeabile e una membrana permeabile ai gas posta su un elettrodo ad ossigeno amperometrico (sensore di Clark⁷⁸); il sensore rileva la riduzione della concentrazione dell'ossigeno disciolto, proporzionale alla concentrazione di glucosio nel campione.

Da quel momento numerosi studi sono stati condotti e differenti dispositivi sono stati sviluppati. In medicina, i biosensori hanno notevole importanza nell'analisi del sangue, ad esempio per misurare il livello di glucosio nei diabetici, o per rilevare infezioni tramite la presenza di determinati anticorpi nei campioni di sangue. Esistono diversi modi di classificare i biosensori: in base all'elemento biologico (enzimi, anticorpi, acidi nucleici, microrganismi, cellule), al meccanismo di riconoscimento (biocatalitico, per affinità), alla natura del segnale fornito (elettrico, elettromagnetico, variazione di temperatura o viscosità), o all'applicazione finale.⁷⁹

4.1.1 Sistemi di riconoscimento biologico

A seconda del meccanismo di riconoscimento adottato dal biosensore, possono essere distinti due casi: un meccanismo biocatalitico (che in genere implica l'utilizzo di enzimi) e un meccanismo basato sull'affinità con l'analita (anticorpi, acidi nucleici, recettori).⁷⁴

4.1.1.1 Sistemi biocatalitici

I biosensori che utilizzano uno o più enzimi come elemento biologico di riconoscimento rappresentano la categoria di biosensori maggiormente studiata e già utilizzata per applicazioni commerciali, per via dell'elevata specificità degli enzimi.⁷⁴ Gli enzimi sono proteine, che catalizzano reazioni biochimiche, rimanendo inalterate alla fine della reazione;⁷⁵ vengono usati quando gli analiti sono adatti a modificazioni enzimatiche, e la loro concentrazione è compresa tra 10^{-7} e 10^{-1} M.⁷⁵

Le classi di enzimi più importanti per la biosensoristica sono le ossidoreduttasi, che catalizzano reazioni redox, e le idrolasi, che invece catalizzano reazioni di idrolisi.⁷⁹ L'ossidazione del glucosio da parte della GOx, su cui si basava il primo biosensore inventato, come già menzionato, da Clark L.C.,⁷⁷ è un esempio di biosensore enzimatico, usato già da tempo in dispositivi per il controllo del livello di glucosio nel sangue, sviluppati per soggetti diabetici.⁸⁰ Inoltre, sensori biocatalitici possono essere ottenuti tramite l'impiego di organuli, batteri o tessuti cellulari vegetali e animali, che sono costituiti da un complesso di enzimi e cofattori (molecole a basso peso molecolare non proteiche o ioni metallici, necessari all'attività dell'enzima⁸¹). Questa tipologia di biosensori può essere impiegata per il riconoscimento simultaneo di più analiti,⁸² monitorando le condizioni del sistema da analizzare. In particolare, si possono usare inibitori, attivatori e stabilizzanti per ottimizzare la specificità del biosensore e adattarla alle condizioni di riconoscimento di uno specifico analita.⁸³ Questi dispositivi sono adatti al monitoraggio di sostanze genotossiche, che possono cioè indurre a modificazioni del DNA.⁸⁴ Tra i più popolari biosensori a base di cellule, si fa riferimento a quelli che utilizzano batteri bioluminescenti, contenenti il gene luciferasi (*lux*), tipo *Vibrio fischeri* o altri microrganismi geneticamente modificati per essere adatti alle condizioni del sistema da analizzare,⁵ trattati più avanti in questo capitolo.

4.1.1.2 Sistemi basati sull'affinità con l'analita

Gli anticorpi sono i principali elementi di riconoscimento impiegati in biosensori, basati sull'affinità, per il rilevamento di antigeni con concentrazione da 10^{-10} a 10^{-6} M. In questi sistemi, la sensibilità e la specificità dipendono dall'affinità tra antigene e anticorpo.⁸⁵ In generale questi sensori sono basati sul riconoscimento immunochimico di antigeni da parte di anticorpi immobilizzati su un trasduttore, o viceversa.⁸⁶

Un modo per rilevare la presenza di antigeni è l'utilizzo della microgravimetria con cristalli di quarzo (QCM), di cui si rileva la frequenza di risonanza; quando la massa del cristallo aumenta, ad esempio poiché gli antigeni si sono legati agli anticorpi immobilizzati sul cristallo, la frequenza di risonanza diminuisce e dal cambiamento di frequenza è possibile operare una quantificazione dell'analita.⁸⁷

Sullo stesso concetto di affinità tra sensore e analita sono basati i biosensori per il rilevamento di oligonucleotidi (come il DNA), attraverso l'uso di sonde complementari all'analita target. Sistemi di rilevamento di DNA hanno importanza nel campo della genetica, in ambito medico, nell'analisi forense e nella ricerca. Questi dispositivi consistono nell'intrappolamento di sonde oligonucleotidiche su un substrato; successivamente una soluzione di frammenti di DNA a singola elica è sottoposta all'analisi del biosensore: se esistono porzioni di DNA complementari alle sonde, queste si legano. È un meccanismo altamente selettivo e specifico. In questo modo è possibile rilevare e catalogare singoli frammenti di DNA presenti in un determinato sistema, per eventualmente analizzarne l'espressione genetica.⁸⁸

Un altro caso interessante riguardo l'impiego di aptameri, ovvero sonde oligonucleotidiche che, a differenza delle sonde precedentemente discusse, si ripiegano come le proteine e formano i siti di legame specifici, come avviene per anticorpi e recettori proteici.⁸⁹ Gli aptameri sono capaci di riconoscere con elevata specificità differenti analiti: ad esempio sono usati per riconoscere sostanze come la trombina⁹⁰ o la cocaina.⁹¹

4.1.1.3 Sistemi biomimetici

Oltre a biosensori basati su elementi biologici naturali, sono stati sviluppati degli equivalenti sintetici: i polimeri a stampo molecolare (*molecular imprinted polymers, MIP*) sono sistemi di riconoscimento artificiale che imitano il riconoscimento naturale.⁷⁵ Nei polimeri vengono creati dei siti tramite l'uso di ligandi nella fase di formatura. Il ligando stabilisce delle interazioni con i gruppi funzionali del composto polimerizzabile, dopodiché si attua la polimerizzazione e si rimuove il ligando, cosicché il polimero formato abbia siti di riconoscimento specifico.⁹²

4.1.2 Tecniche di immobilizzazione

Affinché un biosensore sia efficace non basta che sia dotato di specificità e sensibilità. Altri aspetti fondamentali riguardano l'immobilizzazione dell'elemento biologico nel dispositivo senza che questo subisca modificazioni e l'accessibilità dell'elemento di riconoscimento da parte dell'analita.⁹³ L'immobilizzazione permette sia l'immobilizzazione dell'elemento biologico nel materiale di supporto, che la prossimità tra il biomateriale e il trasduttore. Le tecniche di immobilizzazione possono prevedere l'adsorbimento fisico su una superficie solida, la formazione di legami covalenti alla superficie, l'intrappolamento in membrane, polimeri o microcapsule.⁸ Tra le più usate nella realizzazione di biosensori, si citano l'adsorbimento chimico e la formazione di legami covalenti. Altre tecniche di nicchia consistono nell'elettrodeposizione, nella fotopolimerizzazione e nella litografia. L'elettrodeposizione può essere ad esempio impiegata con polimeri conduttivi, che permettono la deposizione di bioelementi su definite aree di un elettrodo.⁹⁴ La fotopolimerizzazione può invece essere

utilizzata per intrappolare i bioelementi in matrici polimeriche termoindurenti.³ Infine, la litografia può essere usata per creare substrati adatti all'adesione di cellule o proteine.⁹⁵ In Figura 4.2 è presentato uno schema che riassume le tecniche di immobilizzazione generalmente impiegate.

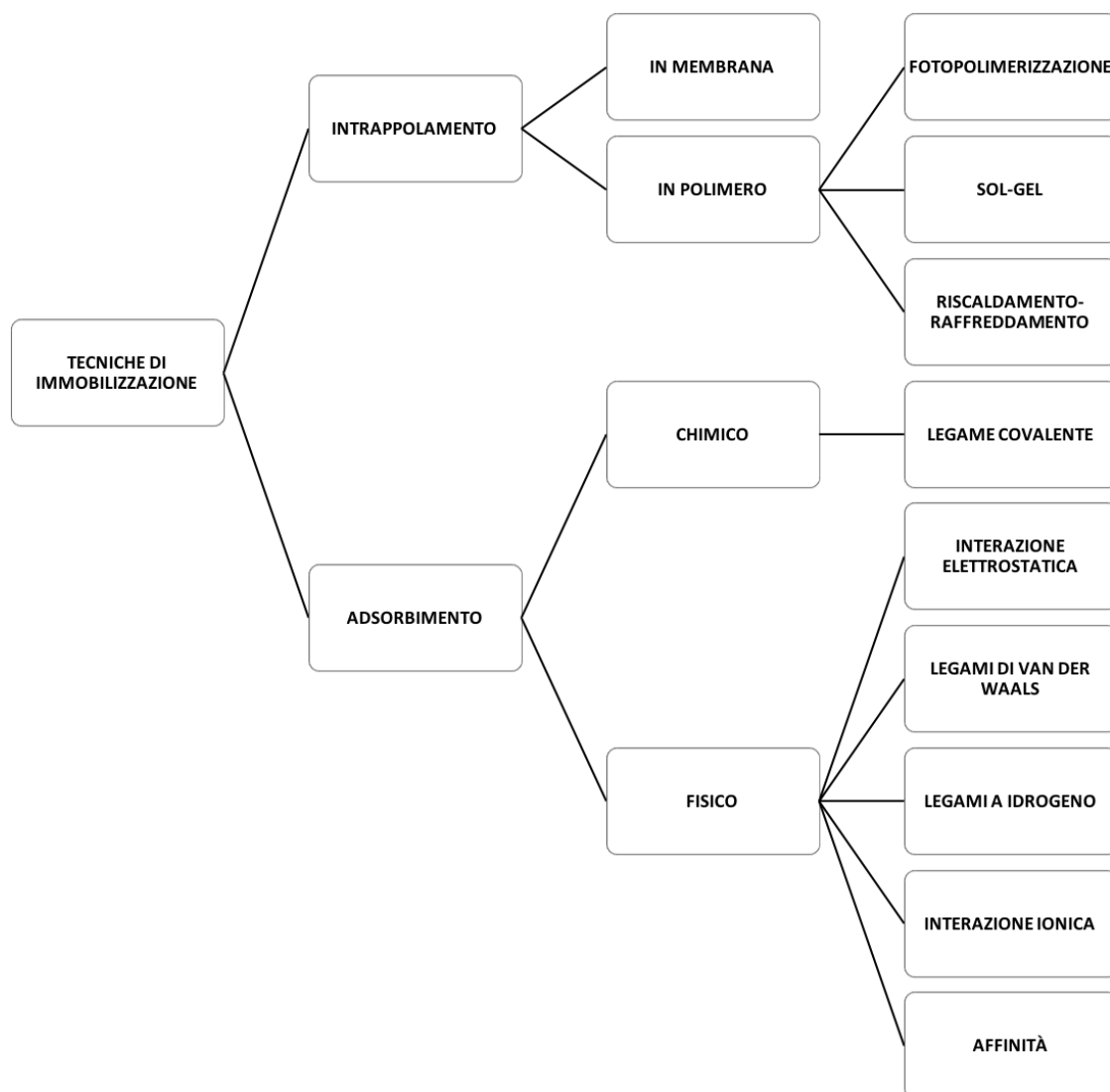


Fig. 4. 2: Schema delle tecniche di immobilizzazione

4.1.3 Trasmissione dei segnali

I segnali prodotti da un biosensore possono essere sia diretti che indiretti. Nel primo caso, il segnale dovuto alla produzione di calore, luce o prodotti chimici è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita; nel caso di un segnale indiretto, spesso l'analita inibisce la produzione di un secondo prodotto chimico, la cui concentrazione è misurata, oppure vengono impiegati dei marcatori molecolari. Inoltre, la funzionalità del biosensore non ha tempo illimitato, ma è legata alla durata dell'elemento biologico che, raggiunto il suo limite di efficacia, smette di fornire segnali apprezzabili.³

I trasduttori più comuni nei biosensori trasmettono segnali elettrici, derivati da reazioni di ossidoriduzione, e possono essere di tipo amperometrico, ad esempio in biosensori enzimatici, per cui le sostanze chimiche vengono ridotte o ossidate sugli elettrodi, e si misura una corrente

proporzionale alla reazione avvenuta,⁹⁶ o di tipo potenziometrico, in cui si misura la differenza del potenziale elettrico tra due elettrodi ionoselettivi (o a membrana) quando la corrente è pari a 0.⁹⁷ Altri tipi di trasduttori utilizzano segnali ottici,⁹⁸⁻¹⁰⁰ acustici,¹⁰¹⁻¹⁰⁴ termici¹⁰⁵ o magnetici.¹⁰⁶

4.2 Biosensori per il monitoraggio di sostanze tossiche

Lo sviluppo tecnologico e il conseguente aumento della popolazione umana ha portato alla crescita esponenziale dell'utilizzo di prodotti chimici industriali, con il conseguente rilascio nell'ambiente dei loro residui e sottoprodotti. I biosensori, in questo contesto, offrono la possibilità di rilevare molteplici sostanze che possono essere dannose per l'uomo e per l'ambiente, bypassando l'utilizzo di tradizionali procedure e strumentazioni nell'analisi di sistemi fisici e biologici.²

In merito all'impatto ambientale, molte operazioni dell'industria agricola e manifatturiera possono portare a contaminazioni di acque, coltivazioni e, nei peggiori dei casi, alla compromissione di flora e fauna.¹⁰⁷

Alcune sostanze considerate pericolose, come i pesticidi, i metalli pesanti e i policlorobifenili (PCB), possono essere rilevate con sistemi biosensoristici. Ad esempio, per rilevare la presenza di pesticidi organofosforici e carbammati, si possono impiegare biosensori enzimatici, che si attivano o vengono inibiti in presenza dei componenti tossici.¹⁰⁸ Per rilevare metalli pesanti, invece, si possono usare sensori a base di cellule batteriche,¹⁰⁹ capaci di interagire con la frazione di ioni metallici presenti e di produrre un segnale misurabile. Questi sistemi sensoristici basati sull'impiego di cellule (batteriche o meno), capaci di fornire un segnale misurabile quando interagiscono con una sostanza target, vengono definiti "*whole-cell biosensors*".

Purtroppo molti altri composti chimici, anche di uso quotidiano, vengono rilasciati nell'ambiente divenendo potenzialmente tossici, come i tensioattivi, gli additivi per materiali plastici, gli steroidi e i farmaci,¹¹⁰ come gli ormoni o gli antibiotici. Quest'ultimo è un fenomeno che preoccupa molto, perché vi è un rilascio di ingenti volumi di queste sostanze nell'ambiente, che possono agire da interferenti endocrini o causare batterio-resistenza, uno dei problemi più gravi della società odierna.¹¹¹

Di seguito saranno trattati, in modo approfondito, i biosensori basati sull'impiego di microrganismi, poiché in questo lavoro di tesi è stato utilizzato il batterio *Pseudomonas fluorescens*, intrappolato in idrogeli a base di PEG, come elemento sensibile al ferro presente in ambienti acquosi.

4.2.1 Biosensori per monitorare la presenza di sostanze tossiche, basati sull'uso di microrganismi

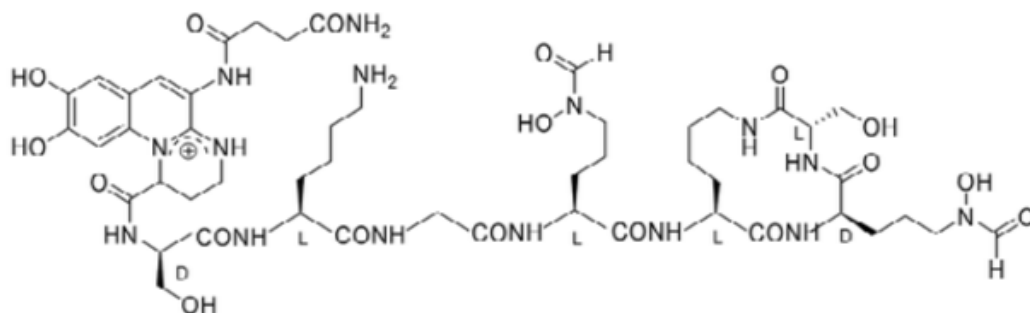
I microrganismi offrono numerosi vantaggi nel campo della biosensoristica; la loro abilità di riconoscere sostanze chimiche, di adattamento genetico e la frequentemente dimostrata resistenza ad intervalli ampi di pH e temperatura, li rende gli elementi biologici ideali in questo settore.⁴

Come detto precedentemente, biosensori a base di cellule batteriche sono spesso usati nel rilevamento rapido di sostanze tossiche, come ad esempio i metalli pesanti.

I batteri bioluminescenti emettono luce attraverso la reazione dell'enzima luciferasi (*lux*), che catalizza l'ossidazione di catene aldeidiche e nel processo emette una luce blu-verde.¹¹² Nei primi studi di rilevamento di tossicità tramite microrganismi bioluminescenti, è stato impiegato il batterio *Vibrio fischeri*, un batterio marino naturalmente bioluminescente. Il sistema sensoristico sfrutta la diminuzione di luminescenza del batterio quando questo entra in contatto con sostanze tossiche, poiché l'inquinante interferisce con il metabolismo del batterio. Questo

Tuttavia, in condizioni ambientali differenti da quelle di provenienza, questi batteri marini possono dare risultati non attendibili o possono non sopravvivere.¹¹⁴ Per tali ragioni, sono stati sviluppati altri sistemi che prevedono l'impiego di batteri geneticamente modificati con il gene *lux*.¹¹⁵ In alcuni questo caso nei batteri ingegnerizzati la luminescenza viene innescata da promotori sensibili alla presenza di composti tossici, per cui i batteri anziché spegnersi (come nel caso di *V.fischeri*), iniziano ad emettere luce.

Un altro biosensore a base di cellule batteriche è stato messo a punto con *Pseudomonas fluorescens*.¹¹⁸ Questo microrganismo, in condizioni di deficienza di ferro, produce la pioverdina, un pigmento idrosolubile fluorescente, di colorazione giallo-verde.⁶ La pioverdina (Figura 4.3) è un sideroforo che, rilasciato nell'ambiente circostante, ha il compito di chelare il ferro (generalmente sotto forma di Fe_2O_3) e di trasferirlo all'interno delle cellule batteriche, che lo riducono a Fe^{2+} .¹¹⁹ La pioverdina è facilmente rintracciabile con test colorimetrici e può essere sfruttata come elemento di riconoscimento per metalli come ferro, rame e zinco, che possono diventare contaminanti tossici per le acque, se presenti in elevate quantità.¹¹⁸ Lo studio condotto ha permesso di valutare la produzione di pioverdina da parte dei batteri in assenza di ioni metallici e questa condizione è stata messa a confronto con casi in cui i batteri potevano accedere a fonti di Fe e Cu: al di sopra di una certa concentrazione degli ioni metallici nella soluzione acquosa ($3.6 \mu\text{M}$ per il Fe^{3+} , $25.0 \mu\text{M}$ per il Cu^{2+}) la produzione di pioverdina è stata inibita. Tramite questo dispositivo è dunque possibile rilevare la presenza di ioni metallici in un ambiente acquoso.



Oltre all'impiego di batteri fluorescenti e bioluminescenti, si può sfruttare l'azione ossidativa di alcuni microrganismi nei confronti di composti organici e inorganici, per calcolare il BOD₅, cioè la domanda di ossigeno biochimico (la quantità di ossigeno utilizzato da microrganismi aerobi per decomporre tramite ossidazione, per 5 giorni a 20 °C¹²⁰). Il processo ossidativo da parte dei microrganismi, determina la formazione di elettroni, che nel passaggio da un anodo ad un catodo generano elettricità, trasformando l'energia chimica della reazione in energia elettrica. Questo dispositivo costituisce un biosensore elettrico noto come *microbial fuel cell* (MFC), che correla il segnale di corrente o potenziale alla concentrazione del substrato e, in questo caso, al consumo di ossigeno. Il primo biosensore basato su MFC conteneva *Clostridium*

butyricum intrappolato in una membrana di nylon che circondava l'anodo, per impiegato per la valutazione di acque di scarico industriali.⁷

Nel tempo sono stati sviluppati altri biosensori di tipo MFC, oltre che per la misura della BOD₅, per il rilevamento di acidi grassi volatili (VFA)¹²¹ o inquinanti come Cu²⁺.¹²²

4.3 Idrogeli per la biosensoristica

Gli idrogeli, opportunamente progettati, possono essere impiegati come matrici di supporto per l'elemento biologico nel biosensore. Come già ampiamente descritto nel capitolo 3, gli idrogeli sono materiali idrofili, ad alto contenuto di acqua, porosi e biocompatibili, che possono rappresentare l'ambiente ideale per le interazioni tra l'elemento biologico e l'analita, soprattutto per applicazioni in ambienti acquosi.¹²³ Questi materiali permettono di creare una struttura di sostegno per l'elemento biologico, capace di controllare la diffusione delle molecole attraverso il reticolo, aspetto fondamentale per l'interazione del biosensore con l'analita e per l'allontanamento di eventuali metaboliti.¹⁰

Gli idrogeli permettono di creare dispositivi per misure "on-line", un vantaggio considerevole nel caso di analisi di inquinanti ambientali, come quelli visti in precedenza. In letteratura vi sono numerosi studi inerenti all'impiego di idrogeli per realizzare biosensori in grado di rilevare composti tossici o biomolecole, e di seguito se ne riportano alcuni con differenti elementi biologici di riconoscimento, quali enzimi, cellule e microrganismi.

4.3.1 Idrogeli contenenti enzimi

Come già detto, gli enzimi sono gli elementi biologici più utilizzati nei biosensori, grazie alla selettività della loro azione catalitica. Il monitoraggio dell'attività enzimatica e dei prodotti forniti da essa offre segnali utili per determinare la concentrazione di determinati analiti che costituiscono il substrato di specifici enzimi.⁷⁵

Un biosensore amperometrico per la determinazione di ammonio (NH₄⁺) è stato ottenuto posizionando su un elettrodo di tipo Clark un idrogelo di PCS (*poly (carbamoyl sulfonate)*) con intrappolati gli enzimi glutammato ossidasi (GXD) e glutammato deidrogenasi (GIDH).¹²⁴ Il funzionamento del sensore sfrutta le reazioni biocatalitiche mostrate in Figura 4.4, in cui l'ossigeno disciolto nell'ambiente viene consumato per sintetizzare ammonio.

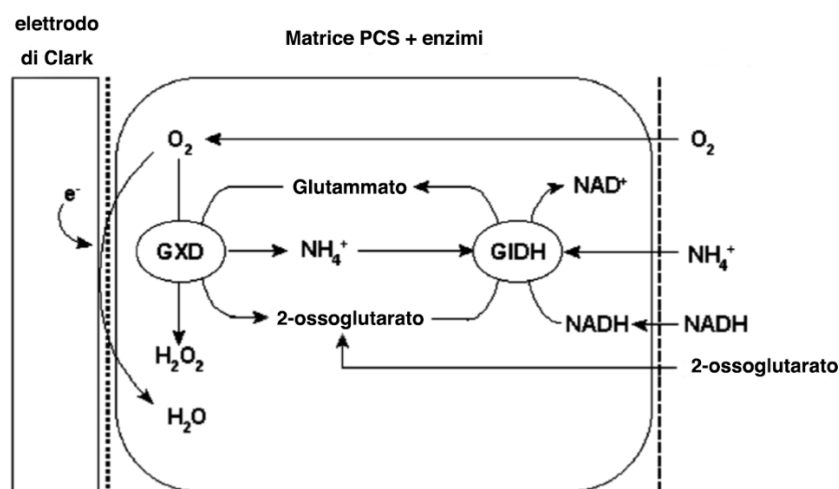


Fig. 4.4: Meccanismo di funzionamento del biosensore a base degli enzimi GXD e Gid, intrappolati in PCS [124]

Il monitoraggio di queste reazioni tramite il livello di ossigeno consumato permette di conoscere la quantità di ammonio presente nel sistema.¹²⁴

In un altro studio, un biosensore a base di PEG e tirosinasi è stato sviluppato per l'individuazione di fenoli, composti tossici impiegati in molti processi industriali.¹²⁵ una soluzione di PEGDA, *quantum dots* (semiconduttori nanometrici), tirosinasi e fotoiniziatore è stata distribuita su un substrato in vetro per formare uno strato uniforme; dopodiché tramite fotolitografia UV è stato creato idrogel con un pattern micrometrico regolare.

Una volta aggiunta una soluzione di fenoli ai micropattern creati, l'azione catalitica della tirosinasi trasforma i fenoli in o-chinoni tramite deidrogenazione in presenza di ossigeno;¹²⁶ gli o-chinoni determinano un'attenuazione della fluorescenza dei *quantum dots*, che può essere apprezzata con spettroscopia fluorimetrica. Dunque monitorando la fluorescenza dei *quantum dots* è possibile valutare la presenza di composti fenolici in una determinata soluzione.¹²⁵

4.3.2 Idrogeli contenenti cellule eucariotiche animali

L'intrappolamento di cellule in idrogeli polimerici trova applicazioni in campi diversi, dalla rigenerazione tissutale alla biosensoristica. Gli idrogeli garantiscono un rapido scambio di nutrienti e metaboliti per cellule e microrganismi, grazie alla struttura porosa e alla fase acquosa, che ne favoriscono il trasporto, diventando ambienti ideali anche per la proliferazione cellulare.¹²⁷ Un ulteriore vantaggio è la somiglianza strutturale del reticolo polimerico alla matrice extracellulare (ECM), che permette applicazioni sia *in vivo* che *in vitro*.¹²⁸ Inoltre, la biocompatibilità del materiale può essere migliorata modificando il reticolo con specifiche molecole di supporto per l'immobilizzazione o per ridurre l'infiammazione dei tessuti nel caso di sensori impiantati.¹²⁹

In uno studio del 2006 è stato sviluppato un sistema biosensoristico sfruttando l'interazione dei linfociti T e B.¹³⁰ Nell'idrogel, a base di polietilenglicole-dimetacrilato PEGDMA, è stato creato un pattern con pozzetti di dimensione micrometrica; dopodiché i pozzetti sono stati funzionalizzati con degli anticorpi, per immobilizzare singole cellule di linfociti T. In seguito, i linfociti T sono stati accoppiati con uno strato di linfociti B, capaci di catturare antigeni: un analita peptidico inserito nel sistema è stato dunque catturato dalle cellule B e trasferito alle cellule T, che hanno registrato l'informazione dell'antigene e l'hanno trasformata in un segnale misurabile. Uno schema del sensore descritto è mostrato nella Figura 4.5.

In un altro studio è stato realizzato un biosensore per rilevare simultaneamente la presenza di ossido nitrico e glutammato.¹³¹ Tra due elettrodi, uno dei quali costituito da un idrogel di polietilenglicole-diglicidil etero (PEGDGE) con gli enzimi perossidasi e glutammato ossidasi intrappolati, è stata posizionata una membrana su cui sono state fatte crescere cellule di glioma C6. Una soluzione di bradichinina e KCl è stata quindi iniettata nella soluzione tampone che circondava le cellule: si sono registrati scambi di corrente tra i due elettrodi, in seguito al rilascio di glutammato e ossido nitrico e ciascun elettrodo ha rilevato l'analita da riconoscere senza interferire con gli altri componenti presenti in soluzione.

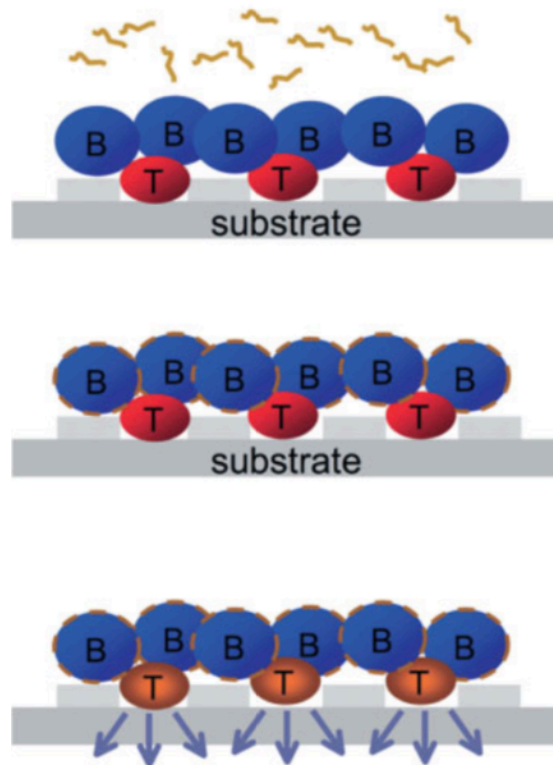


Fig. 4. 5: Schema del biosensore a base di linfociti T e B [130]

4.3.3 Idrogeli contenenti microrganismi

In merito all'impiego di microrganismi, questi possono essere intrappolati sia fisicamente che chimicamente. I metodi di intrappolamento chimico prevedono l'immobilizzazione dei microrganismi tramite legami covalenti con la matrice di supporto, per reazione di gruppi funzionali presenti sulla parete cellulare come ammine, gruppi carbossilici ed epossidici. Questa tecnica può risultare particolarmente aggressiva nei confronti dei microrganismi, portando a danneggiamenti ed eventualmente a riduzione dell'attività microbica.¹³² Tuttavia è un metodo rapido e semplice e viene utilizzato per realizzare biosensori a base di batteri. Le cellule possono essere intrappolate direttamente sul trasduttore di segnale, oppure possono essere collocate in una membrana di supporto a contatto con il trasduttore.¹³³

L'immobilizzazione fisica, invece, si limita ad un intrappolamento che non altera la struttura originale e la funzionalità dei microrganismi. In genere si attua per adsorbimento dei microrganismi sul substrato, un elettrodo in genere, tramite interazioni ioniche, polari o legami a idrogeno.¹³⁴ Oppure si può attuare un intrappolamento in una matrice polimerica, come nel caso degli idrogeli, tramite materiali di origine naturale come l'alginato, il collagene, il chitosano, o di origine sintetica, come PVA e PEG.¹³⁵

Come già detto nel paragrafo che tratta i biosensori a base di microrganismi, è diffuso l'impiego di batteri bioluminescenti come elementi di riconoscimento biologico, soprattutto nell'ambito dei contaminanti tossici.

In uno studio del 2003, sono stati realizzati dei biosensori a base di PVA e di batteri bioluminescenti quali *V. fischeri* e *P. putida* (geneticamente modificato con il gene *lux*) per il monitoraggio di composti fenolici in acque di scarico industriali.¹³⁶ L'immobilizzazione dei batteri è stata ottenuta a partire da sospensioni di cellule batteriche in una soluzione di PVA, tramite un processo di congelamento e scongelamento, tipicamente utilizzato per formare idrogeli di PVA.¹³⁷ Sia gli idrogeli contenenti *V. fischeri* che quelli contenenti *P. putida* sono

stati testati con soluzioni di fenolo e con acque di scarico contenenti composti fenolici. È stata misurata la percentuale di riduzione nella bioluminescenza normalizzata sulla concentrazione dei componenti tossici e si è osservata una immediata diminuzione con l'aumento della presenza di contaminanti fino al raggiungimento di un plateau quando l'elevata concentrazione di fenolo è divenuta tossica per i batteri. Inoltre, è stata osservata una maggiore tolleranza da parte di *P. putida*.¹³⁸ Questo studio ha mostrato che la matrice in PVA ha una trasparenza sufficiente per misurare la bioluminescenza dei batteri intrappolati e la sua riduzione a causa dei contaminanti tossici. Inoltre, l'intrappolamento è risultato efficace e la matrice ha mostrato flessibilità e diffusività compatibili con l'attività batterica e la misura.

In un altro studio, è stato possibile monitorare il BOD₅ attraverso biosensori a base di alginato e batteri del tipo *Enterobacter cloacae*.¹³⁹ Le cellule batteriche sono state intrappolate in sferette di alginato di calcio tramite microincapsulazione. Le sferette di alginato contenenti i batteri sono state sospese in una soluzione salina arricchita con glucosio e tramite un elettrodo di Clark è stata valutata la domanda di ossigeno dei batteri per i processi metabolici.

In conclusione, esistono moltissimi studi in letteratura che hanno permesso di sviluppare biosensori, capaci di sfruttare i meccanismi biochimici presenti in natura al fine di agevolare i processi analitici. Il campo della biosensoristica ha permesso di realizzare dispositivi portatili, per misure in tempo reale sia in campo medico-sanitario, che nelle analisi ambientali di componenti tossici. Infine gli idrogeli polimerici, che vengono già impiegati come matrici di intrappolamento in campo medico e biotecnologico per realizzare impianti tissutali e dispositivi per il rilascio di farmaci,⁶⁵ possono agevolare l'utilizzo di biosensori, trasferendo le tradizionali analisi di laboratorio in dispositivi maneggevoli, i cosiddetti “*lab-on-a-chip*”.¹⁴⁰

5. Materiali e metodi

5.1 Sintesi degli idrogeli

Il sistema scelto consiste in idrogeli a base di un materiale polimerico idrofilo, il polietilenglicole (PEG), formati per fotoreticolazione. Per favorire la fotoreticolazione si è scelto un PEG bifunzionale con gruppi metacrilati, il polietilenglicole dimetracrilato (PEGDMA). Il PEGDMA tramite l'azione di un fotoiniziatore permette la formazione di un reticolo per reazione dei gruppi funzionali terminali, da entrambi i lati della catena polimerica. Inoltre, per variare la dimensione delle maglie del polimero, si è utilizzato il polietilenglicole metacrilato monofunzionale (PEGMA). In questo modo si forma un copolimero in cui il PEGDMA agisce da reticolante tra le catene di PEGMA, che da sole non potrebbero dar vita ad un reticolo, poiché dotate di un gruppo metacrilato terminale da un solo lato della catena (monomero monofunzionale).

In Figura 5.1 sono mostrate le formule chimiche dei due pre-polimeri impiegati.

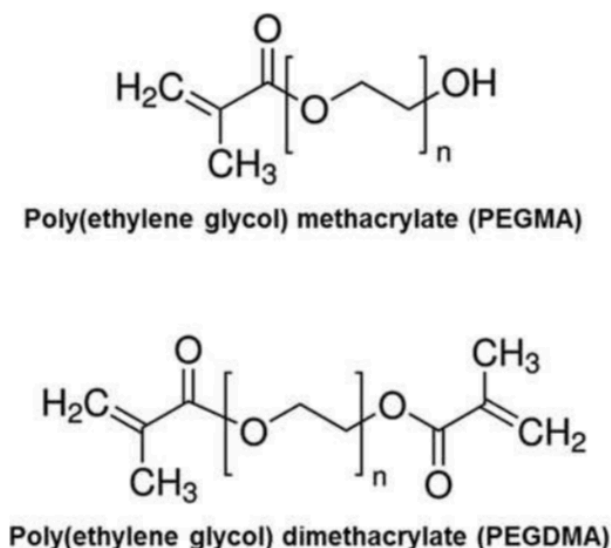


Fig. 5. 1: Formule chimiche brute di PEGMA e PEGDMA [51]

I pre-polimeri di PEGDMA e PEGMA utilizzati, con pesi molecolari M_n rispettivamente di 750 e 500, sono stati forniti da Sigma-Aldrich.

Si sono testati sistemi con diversi rapporti percentuali di PEGDMA e PEGMA, inoltre si è provato a reticolare in presenza di acqua deionizzata: in questo modo si ottiene l'idrogelo simultaneamente alla reazione di reticolazione, con il reticolo polimerico che formandosi ingloba l'acqua, in maniera differente dalle procedure tradizionali, secondo le quali si ottiene il reticolo polimerico di materiale idrofilo e dopo lo si fa rigonfiare nel mezzo acquoso.

Per questo motivo, sono state preparate diverse formulazioni, sia variando i rapporti percentuali tra i pre-polimeri che variando la quantità di acqua nel sistema di partenza. Le diverse condizioni sono riassunte di seguito: in Tabella 5.1 si descrivono i diversi rapporti percentuali tra PEGDMA e PEGMA testati, in Tabella 5.2 le diverse aggiunte di H_2O al sistema di pre-polimero, espresse in $phr = parts\ per\ hundred\ resin$, rispetto al totale di pre-polimero PEGDMA+PEGMA.

Tabella 5. 1: *Differenti formulazioni al variare di PEGDMA e PEGMA*

<i>Formulazioni</i>
100%wt PEGDMA
67%wt PEGDMA/33%wt PEGMA
50%wt PEGDMA/50%wt PEGMA
40%wt PEGDMA/60%wt PEGMA
33%wt PEGDMA/67%wt PEGMA

Tabella 5. 2: *Differenti quantità di acqua nelle formulazioni di partenza*

<i>Quantità di acqua nelle formulazioni</i>
PEGDMA/PEGMA senza H ₂ O
PEGDMA/PEGMA + 50phr H ₂ O
PEGDMA/PEGMA + 100phr H ₂ O
PEGDMA/PEGMA + 150phr H ₂ O

Il fotoiniziatore utilizzato nel sistema è una molecola in grado di innescare una polimerizzazione radicalica quando irradiata da una fonte luminosa visibile; in particolare si è scelto un fotoiniziatore idrosolubile, l'acido bismetoloilfosfinico BAPO-OH, ovvero un BAPO (commercialmente noto come Irgacure 819) funzionalizzato con un gruppo OH, come mostrato in Figura 5.2. Questa molecola è stata sintetizzata nel laboratorio del Prof. Dr. H. Grützmacher dell'ETH di Zurigo.¹⁴²

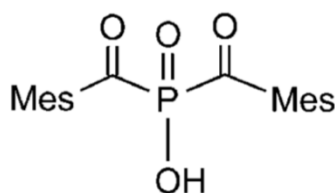


Fig. 5. 2: *BAPO-OH*

(Mes=mesitile) [142]

5.2 Caratterizzazione chimico-fisica degli idrogeli

Per caratterizzare il materiale sono state fatte prove reologiche, analisi FTIR in modalità ATR, analisi termiche dinamo-meccaniche DMTA, calorimetria a scansione differenziale DSC, test di swelling, %gel e, infine, è stata valutata la densità di reticolazione.

5.2.1 Fotoreologia e reologia

I test di fotoreologia sono stati svolti sulle formulazioni descritte precedentemente con un reometro “Anton Paar MCR 302”, in modalità piatto-piatto. Il reometro è stato dotato di lampada dotata di fibra ottica con emissione nel campo del visibile (filtro di cut-off a 400 nm) “Hamamatsu LC8” (15 mW/cm²). Il piatto inferiore consiste di un vetro attraverso il quale passa la luce irradiante, mentre il piatto superiore dal diametro di 25.0 mm applica lo sforzo di taglio al materiale. Il gap tra i due piatti è stato fissato ad 1.0 mm e le prove sono state condotte alla temperatura di 25 °C. La frequenza dello sforzo applicato è stata fissata a 60 rad/s mentre l’ampiezza di tale sforzo è di 0.1%. La sonda luminosa è stata accesa dopo 1 minuto dall’inizio della prova, per permettere al sistema di stabilizzarsi, ed è stato registrato 1 punto al secondo.

Successivamente, sui campioni reticolati con composizione in peso 33%PEGDMA/67%PEGMA, con diversi phr di H₂O nella formulazione iniziale, sono stati fatti dei test di reologia in variazione dell’ampiezza dello sforzo applicato (*amplitude sweep*) ed in variazione della frequenza (*frequency sweep*): in *amplitude sweep* la frequenza è stata impostata a 10 rad/s mentre l’ampiezza è stata fatta variare da 0.01% a 100% registrando 1 punto ogni 10 secondi; in *frequency sweep* è stata fissata un’ampiezza di 0.5% e la frequenza è stata fatta variare da 0.1 a 100 rad/s, registrando 1 punto ogni 10 secondi.

La prova di fotoreologia è stata inoltre utilizzata per caratterizzare gli idrogeli contenenti i microrganismi di *Pseudomonas fluorescens*: idrogeli 100%PEGDMA + 100phr di una sospensione di microrganismi in PBS (tampone fosfato salino) a diverse concentrazioni, e idrogeli 33%PEGDMA/67%PEGMA + 100phr della sospensione di microrganismi.

5.2.2 Spettroscopia FTIR-ATR

I campioni ottenuti tramite fotoreologia sono stati essiccati in vuoto, passando da uno spessore di 1.0 mm a 0.8 mm. Su questi reticoli sono state fatte analisi ATR per analizzare la superficie dei campioni, tramite uno spettrofotometro “FT-IR/ATR Thermo-Scientific™ Nicolet™ Smart iTX- Diamond”.

In questo modo si possono avere indicazioni sul completamento o meno della reticolazione, attraverso l’osservazione del picco del legame C=C, che sparisce nel caso di una completa reticolazione, per via della conversione dei gruppi metacrilati.

5.2.3 DMTA: analisi termica dinamo-meccanica

L’analisi termica dinamo-meccanica dei campioni essiccati con spessore 0.8 mm e larghezza da 3.0 a 4.0 mm è stata svolta con un “TTDMA Triton Technology-Mettler Toledo”.

Le prove sono state condotte in presenza di azoto a partire da -80 °C fino a circa 40 °C, con rampe di temperatura di 3 °C/min, frequenza di 1 Hz e rapporto tra forza statica e dinamica di 1.5.

Sono stati testati i campioni con composizione 33%PEGDMA/67%PEGMA, reticolati con diversi phr di H₂O (da 0 a 150), i campioni con diverse percentuali di PEGDMA/PEGMA reticolati in presenza di 100phr di H₂O e, infine, i campioni ottenuti intrappolando i microrganismi di *P. fluorescens*, con composizione 100%PEGDMA e 33%PEGDMA/67%PEGMA, ciascuno reticolato in presenza di 100phr di una sospensione di microrganismi in PBS con O.D. 40.

5.2.4 DSC: calorimetria a scansione differenziale

Sono state condotte prove DSC su campioni di circa 20.0 mg con composizione 33%PEGDMA/67%PEGMA essiccati, precedentemente reticolati senza H₂O o in presenza di 150phr di H₂O, che rappresentano le due condizioni estreme della reticolazione in presenza di H₂O. La misura è stata svolta impostando una rampa di temperatura da -80°C a 100°C, con aumento di temperatura di 10°C/min, in presenza di azoto. Lo strumento utilizzato è un “TGA/DSC Mettler Toledo”.

5.2.5 Misura della densità di reticolazione

La densità di reticolazione dei diversi campioni è stata misurata tenendo conto del modulo conservativo G' al plateau gommoso. G' è stato ricavato prendendo il suo valore alla temperatura di 30 °C sulle curve ottenute con la DMTA.

La densità di reticolazione ν è stata dunque calcolata secondo l'equazione 5.1,¹⁴³ dove $R=8.314$ J/molK (costante dei gas perfetti) e T è la temperatura in gradi Kelvin:

$$G' = \nu RT \quad (5.1)$$

5.2.6 Prove di *swelling*

Per determinare lo “*swelling*”, i campioni essiccati sono stati immersi in H₂O ed è stato misurato il peso ad intervalli di 15 minuti, fino ad arrivare ad una condizione stazionaria. Ogni misura è stata rapportata al peso iniziale, in modo da ottenere la percentuale di rigonfiamento progressiva, secondo l'equazione 5.2:⁷⁰

$$\frac{w_s - w_d}{w_s} \cdot 100 = \% \text{ swelling} \quad (5.2)$$

5.2.7 Prove di %gel

Per determinare la %gel, ovvero la frazione insolubile dei campioni reticolati, è stata misurata la perdita di peso dei campioni essiccati dopo essere stati lavati in un bagno di CHCl₃ per 24 ore. Si sono testati i campioni con composizione 33%PEGDMA/67%PEGMA reticolati con diversi phr di H₂O (da 0 a 150) e quelli con diverse percentuali di PEGDMA/PEGMA reticolati con 100phr di H₂O. Il %gel è stato calcolato facendo il rapporto tra il peso dei campioni reticolati dopo il bagno in CHCl₃ e il peso al tempo 0.¹⁴³

5.3 Intrappolamento dei microrganismi negli idrogeli polimerici

5.3.1 Condizioni di crescita e terreno di coltura

Le prove biologiche condotte hanno avuto come scopo l'indagine della biocompatibilità del sistema polimerico scelto e della sua efficacia nell'intrappolamento dei microrganismi.

Le prove sono state condotte con il microrganismo *Pseudomonas fluorescens* DSMZ 50090 (ATCC 13525) sia su solido che in liquido. Sono stati utilizzati due terreni differenti: il terreno minimo Meyer 1978 (M78)^{122, 144} e il terreno complesso DSM1.¹⁴⁵

Tutto il materiale impiegato in queste prove è stato sterilizzato in autoclave a 80 °C dai 60 ai 90 minuti e le operazioni sono state condotte in sterilità, sotto una cappa biologica.

Le composizioni dei terreni sono riportate nelle Tabelle 5.3 e 5.4 di seguito:

- M78

Tabella 5. 3: Componenti del terreno M78

Componenti	g/L
K ₂ HPO ₄	6.0
KH ₂ PO ₄	3.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
Acido succinico	4.0
Agar (se terreno solido)	15.0
H ₂ O deionizzata	1000.0 mL

- DSM1

Tabella 5. 4: Componenti del terreno DSM1

Componenti	g/L
Peptone	5.0
Estratto di carne	3.0
Agar (se terreno solido)	15.0
H ₂ O deionizzata	1000.0 mL

5.3.1.1 Valutazione su terreno solido della crescita in presenza dei componenti del polimero e della fotopolimerizzazione

Per le prove condotte su terreno solido sono stati utilizzati terreni: M78 e DSM1. In ogni piastra, contenente 20 mL di terreno agarizzato, sono stati seminati 50 µL di una sospensione di *P. fluorescens*, con valore di densità ottica (definita come l'assorbanza normalizzata sulla lunghezza d'onda) a 620 nm OD₆₂₀ compreso tra 0.8 e 1. I microrganismi sono stati prelevati da una precoltura di 24 ore cresciuta su una piastra di terreno DSM1 a 20 °C.

Sulle piastre inoculate, sono stati appoggiati diversi materiali allo scopo di verificare un'eventuale inibizione nella crescita dei microrganismi:

- dischi di idrogel (100%PEGDMA + 100phr PBS) dal diametro di 25.0 mm e spessore 1.0 mm;
- dischi di carta da filtro con un diametro di 25.0 mm permeati da soluzioni dei componenti dell'idrogel: una di pre-polimero PEGMA al 50%wt e l'altra di BAPO-OH allo 0.1%wt, entrambe in una soluzione di PBS.

Le soluzioni sono state utilizzate sia tal quali che dopo essere state esposte alla luce visibile per 10 minuti, per avere un riscontro sull'influenza delle specie che eventualmente si formano

durante la fotoreticolazione, principalmente i radicali. Gli idrogeli invece, sono stati usati sia tal quali che lavati con PBS, per verificare l'eventuale rilascio di residui di reazione capaci di inibire la crescita.

Sono state testate le seguenti condizioni sperimentali in triplicato:

- 1) *P. fluorescens* non irraggiato con luce visibile (controllo positivo);
- 2) *P. fluorescens* irraggiato con luce visibile;
- 3) *P. fluorescens* + disco di carta con soluzione di PEGMA non irraggiato con luce visibile;
- 4) *P. fluorescens* + disco di carta con soluzione di PEGMA irraggiato con luce visibile;
- 5) *P. fluorescens* + disco di carta con soluzione di BAPO-OH non irraggiato con luce visibile;
- 6) *P. fluorescens* + disco di carta con soluzione di BAPO-OH irraggiato con luce visibile;
- 7) *P. fluorescens* + disco di idrogelo non lavato;
- 8) *P. fluorescens* + disco di idrogelo lavato con PBS su uno shaker orbitale a 100 rpm per 10 minuti;
- 9) *P. fluorescens* + disco di carta con soluzione di lavaggio della condizione 8;
- 10) Disco di idrogelo non lavato (controllo abiotico, una sola ripetizione).

Le piastre sono state incubate a 20 °C ed osservate dopo 24 e 48 ore per verificare l'eventuale presenza di un alone di inibizione di crescita intorno ai dischi di carta o di polimero.

5.3.1.2 Valutazione in terreno liquido

Per le prove in terreno liquido, sono state usate piastre multiwell da 6 pozzetti, nei quali sono stati inseriti 3.0 mL di terreno liquido M78 ed un inoculo standardizzato di *P. fluorescens*, prelevato da una precoltura di 24 ore su una piastra di DSM1 a 20 °C.

Sono state testate 10 condizioni differenti, ciascuna in triplicato, per verificare la biocompatibilità dei singoli componenti del sistema, e come nella prova su terreno solido sono stati messi a confronto i sistemi tal quali e quelli sottoposti alla luce visibile per 10 minuti.

Le condizioni sperimentali sono descritte di seguito:

- 1) *P. fluorescens* non irraggiato con luce visibile (controllo positivo);
- 2) *P. fluorescens* irraggiato con luce visibile (controllo positivo);
- 3) *P. fluorescens* + soluzione di PEGMA (50%wt) in PBS non irraggiato con luce visibile;
- 4) *P. fluorescens* + soluzione di PEGMA (50%wt) in PBS irraggiato con luce visibile;
- 5) *P. fluorescens* + soluzione di BAPO-OH (0.05%wt) in PBS non irraggiato con luce visibile;
- 6) *P. fluorescens* + soluzione di BAPO-OH (0.05%wt) in PBS irraggiato con luce visibile;
- 7) *P. fluorescens* + soluzione di BAPO-OH (0.1%wt) in PBS non irraggiato con luce visibile;
- 8) *P. fluorescens* + soluzione di BAPO-OH (0.1%wt) in PBS irraggiato con luce visibile;
- 9) *P. fluorescens* + soluzione di BAPO-OH (0.5%wt) in PBS non irraggiato con luce visibile;
- 10) *P. fluorescens* + soluzione di BAPO-OH (0.5%wt) in PBS irraggiato con luce visibile.

Le condizioni sono state valutate in tre tempi diversi, al tempo 0, dopo 24 ore e dopo 48 ore. Per ciascun tempo si sono effettuate 30 misure (10 condizioni in triplicato), per cui sono state utilizzate 15 piastre multiwell, ciascuna contenente due condizioni: 5 piastre per le condizioni al tempo 0, 5 per le condizioni dopo 24 ore e 5 per le condizioni a 48 ore.

Le piastre multiwell sono state inserite in un incubatore a 20 °C, in agitazione a 120 rpm.

Per ciascun tempo sono stati prelevati i 3.0 mL dei pozzetti e sono state fatte le misure di ogni condizione: è stata misurata la densità ottica OD₆₂₀ per ottenere indicazioni sulla presenza di

biomassa e dunque monitorare la crescita microbica nel tempo. Successivamente ciascuna sospensione è stata centrifugata a 4000 rpm per 5 minuti, per separare i microrganismi dal surnatante, cioè la fase liquida del sistema; di questo è stata misurata l'OD₄₀₀ per la valutazione della produzione di pioverdina, ovvero il sideroforo prodotto da *P. fluorescens* in un ambiente carente di ferro.

Infine è stato misurato il pH per un riscontro sul consumo dei nutrienti del terreno e dunque della crescita microbica.

5.3.2 Intrappolamento dei microrganismi

Per condurre le prove di intrappolamento dei microrganismi nell'idrogelo polimerico, il microrganismo è stato cresciuto per 24 ore a 20 °C su una piastra di terreno solido DSM1. In seguito la biomassa è stata risospesa ed opportunamente diluita affinché l'OD₆₂₀ fosse compreso tra 0.8 e 1. La sospensione è stata utilizzata come inoculo (10%v/v) di una coltura (200 mL) in terreno liquido M78. La beuta è stata posta in un incubatore a 20 °C in agitazione a 120 rpm; dopo 24 ore il contenuto della beuta è stato centrifugato per 5 minuti a 4000 rpm, in modo da separare la biomassa dal resto del terreno, il surnatante, che è stato eliminato. La biomassa è stata quindi risospesa e lavata in un pari volume di PBS; dopodiché si è nuovamente centrifugato per recuperare la biomassa lavata, che è stata risospesa in PBS per ottenere una soluzione con OD₆₂₀ pari a 40.

Sono stati realizzati degli idrogeli dal diametro di 15.0 mm e spessore di 1.0 mm secondo 4 diverse condizioni:

- 1) 100%PEGDMA + 100phr PBS (controllo abiotico);
- 2) 33%PEGDMA/67%PEGMA + 100phr PBS (controllo abiotico);
- 3) 100%PEGDMA + 100phr della sospensione di *P. fluorescens* con OD₆₂₀ pari a 40;
- 4) 33%PEGDMA/67%PEGMA + 100phr della sospensione di *P. fluorescens* con OD₆₂₀ pari a 40.

In particolare, per le condizioni abiotiche 1 e 2 sono stati fatti due idrogeli, uno per le misure al tempo 0 e uno per le misure dopo 48 ore; per le condizioni 3 e 4 invece tre idrogeli, per i tempi 0, 24 e 48 ore.

Gli idrogeli sono stati inseriti in piastre multiwell da 6 pozzetti, con 3 mL di terreno liquido M78 e le multiwell sono state poste in un incubatore a 20 °C e 120 rpm.

Ai tempi 0, 24 e 48 ore si sono effettuate le misure del pH, della crescita tramite misura dell'OD₆₂₀ e di produzione di pioverdina tramite misura dell'OD₄₀₀ del surnatante.

A 24 e 48 ore sono stati inoltre prelevati 100 µL del terreno di coltura, per seminarli su piastre di DSM1 agarizzate e verificare se ci sia stato rilascio nel terreno liquido di biomassa da parte dell'idrogelo. Nel caso di crescita, laddove possibile, si sono contate le colonie e si sono calcolate le cfu/mL (cfu: *colony forming units*).

5.3.2.1 Prova di lavaggio degli idrogeli contenenti i microrganismi

Gli idrogeli 100%PEGDMA + 100phr della sospensione di *P. fluorescens* con OD₆₂₀ pari a 40, e 33%PEGDMA/67%PEGMA + 100phr della sospensione di *P. fluorescens* con OD₆₂₀ pari a 40, sono stati sottoposti a prove di lavaggio preliminari.

Per ciascun sistema, un idrogelo è stato sottoposto ad un lavaggio in PBS per 10 minuti, un altro idrogelo a 3 lavaggi in PBS ogni 5 minuti. Delle soluzioni di lavaggio, sia indiluite che

con una diluizione di 10^{-1} , sono stati seminati 100 μL su piastre agarizzate di DSM1, successivamente incubate a 20°C per 24 ore.

Delle piastre in cui è avvenuta crescita, laddove possibile si è valutato il numero di colonie, per il calcolo delle cfu/mL.

5.3.2.2 Applicazione degli idrogeli contenenti i microrganismi come sistema biosensoristico sensibile alla presenza di ferro

Le prove di intrappolamento sono state ripetute introducendo delle nuove condizioni.

Sono stati reticolati degli idrogeli con composizione seguente:

- 1) 100%PEGDMA + 100phr PBS (controllo abiotico);
- 2) 33%PEGDMA/67%PEGMA + 100phr PBS (controllo abiotico);
- 3) 100%PEGDMA + 100phr della soluzione di *P. fluorescens* con O.D. 40;
- 4) 33%PEGDMA/67%PEGMA + 100phr della soluzione di *P. fluorescens* con O.D. 40

Gli idrogeli sono stati lavati per 10 minuti in PBS, lavaggio scelto a partire dall'osservazione delle piastre seminate 24 ore prima con le soluzioni di lavaggio.

Ciascuna condizione è stata testata in singolo, sia in assenza che in presenza di ferro. Nel secondo caso il terreno liquido M78 è stato arricchito con una soluzione di cloruro di ferro FeCl_3 in PBS, con una concentrazione di $30\text{ }\mu\text{M}$, pari a 10 volte la concentrazione soglia al di sopra della quale *P. fluorescens* non produce ploverdina.

Questi test sono stati condotti per la verifica della mancata produzione da parte di *P. fluorescens* di ploverdina in presenza di ferro, oltre che dell'eventuale rilascio da parte dell'idrogelo dei microrganismi nel terreno di crescita per tempi oltre le 48 ore.

Delle condizioni 1 e 2 sono stati realizzati 4 idrogeli, uno per ciascun tempo in cui sono state effettuate le misure: 0, 24, 48 e 120 ore. Per le condizioni 3 e 4 sono stati fatti 8 idrogeli, per le misure nei vari tempi, 4 utilizzati in assenza di ferro e 4 in presenza di ferro.

Dei terreni di crescita, sono stati misurati ai tempi 0, 24 48 e 120 ore il pH, la densità ottica OD_{620} per il monitoraggio della crescita microbica e l' OD_{400} del surnatante per il monitoraggio della produzione di ploverdina. Inoltre, sono state seminate su piastra agarizzate di DSM1 sia le soluzioni di lavaggio che delle diluizioni seriali (10^{-1} , 10^{-5} e 10^{-7}) di prelievi dai terreni misurati nei diversi tempi.

Infine, gli idrogeli sono stati misurati in trasmittanza UV-visibile, ai tempi 0, 24, 48 e 120 ore.

Terminati questi test, gli idrogeli prelevati dopo 120 ore sono stati inseriti in nuovi terreni scambiando le condizioni, ovvero quelli che erano stati in un terreno arricchito di ferro sono stati inseriti in un nuovo terreno privo di ferro, mentre gli idrogeli che erano stati in un ambiente privo di ferro sono stati inseriti in un nuovo terreno arricchito di ferro.

5.3.3 Osservazione degli idrogeli polimerici contenenti i microrganismi tramite microscopia ottica

Gli idrogeli testati nelle prove di intrappolamento sono stati osservati al microscopio ottico per verificare la presenza dei microrganismi al loro interno ed eventualmente individuare delle differenze tra i sistemi polimerici differenti, cioè il sistema con il solo PEGDMA ed il sistema costituito al 33% da PEGDMA e al 67% da PEGMA.

5.3.4 Strumentazione utilizzata

Le misure dell'OD sono state condotte con uno spettrofotometro UV-visibile "hp HEWLETT PACKARD 8452A", il pH è stato misurato con un "WTW inoLab pH 730".

Le misure in trasmittanza degli idrogeli sono state svolte con un "VARIAN Cary 5000 UV-vis-NIR spectrophotometer UV0904M011".

Le centrifugazioni delle sospensioni di microrganismi sono state condotte con una centrifuga "Thermoscientific IEC CL30".

6. Risultati e discussione

6.1 Fotoreologia e reologia

Valutare il comportamento reologico di un sistema polimerico permette di comprendere la risposta del materiale a sollecitazioni di deformazione. Un sistema che polimerizza varia il suo stato fisico e di conseguenza le proprietà meccaniche, per cui la risposta reologica cambia all'avanzare della polimerizzazione. Seguire l'andamento delle proprietà meccaniche e reologiche con il procedere della polimerizzazione permette di avere informazioni sulla cinetica della reazione.⁷¹

In questo lavoro di tesi si sono condotte prove reologiche degli idrogeli sia in tempo reale al procedere della reticolazione, sia a reticolazione ultimata, per valutare gli effetti delle variazioni nelle composizioni delle formulazioni di partenza.

6.1.1 Fotoreologia

Le prove di fotoreologia hanno permesso di esaminare in tempo reale la cinetica di reticolazione dei vari sistemi testati, valutando l'andamento del modulo conservativo G' dei sistemi a base di PEGDMA/PEGMA irraggiati con la luce visibile.

Nella Figura 6.1 sono mostrate le curve di G' dei sistemi reticolati aventi diverse composizioni percentuali di PEGDMA/PEGMA con 0.5%wt di BAPO-OH, in presenza di 100phr di H_2O .

I tratti iniziali delle curve sono costituiti dai punti registrati dallo strumento prima dell'accensione della lampada, dunque non sono interessanti per comprendere la cinetica di polimerizzazione dei vari sistemi. Una volta accesa la sonda luminosa, si inizia a vedere una rapida crescita delle curve del modulo G' ; la pendenza di questo tratto è indice della cinetica della reticolazione, che al procedere della stessa rallenta fino al raggiungimento di una condizione stazionaria, in cui il modulo G' raggiunge un plateau.

La curva arancione prodotta dalla reticolazione dell'idrogelo 100%PEGDMA + 100phr H_2O mostra una cinetica più rapida rispetto alle altre composizioni, raggiunge il plateau dopo circa 4 minuti e mostra un valore di G' di $2,0 \cdot 10^6$ Pa.

Aumentando la quantità di monofunzionale nel sistema, e riducendo di conseguenza quella di bifunzionale, si osserva una cinetica più lenta, con il raggiungimento del plateau dopo 7-8 minuti. Il valore di G' al plateau per questi idrogeli, rispetto all'idrogelo costituito da solo bifunzionale, risulta quasi un ordine di grandezza inferiore, con valori da $4,0$ a $6,0 \cdot 10^5$ Pa.

Il rallentamento della cinetica di reticolazione è dovuto alla minore presenza di gruppi funzionali metacrilati reattivi: il PEGMA è monofunzionale, cioè il gruppo funzionale è presente da un solo lato della catena e, come già osservato nel capitolo 2, monomeri ed oligomeri monofunzionali non possono dare un prodotto reticolato, bensì un polimero lineare. Per cui, a parità di volume, sistemi con maggiore quantità di PEGMA hanno minore probabilità di formare un reticolo.

La minore probabilità di reticolazione influisce anche sulle proprietà meccaniche, poiché il reticolo che si forma ha una minore densità rispetto ad un reticolo formato al 100% da PEGDMA e la struttura risulta meno rigida. Questo conferma un risultato atteso, cioè che aumentare la quantità di monofunzionale implica un reticolo meno denso e di conseguenza con maglie più larghe.

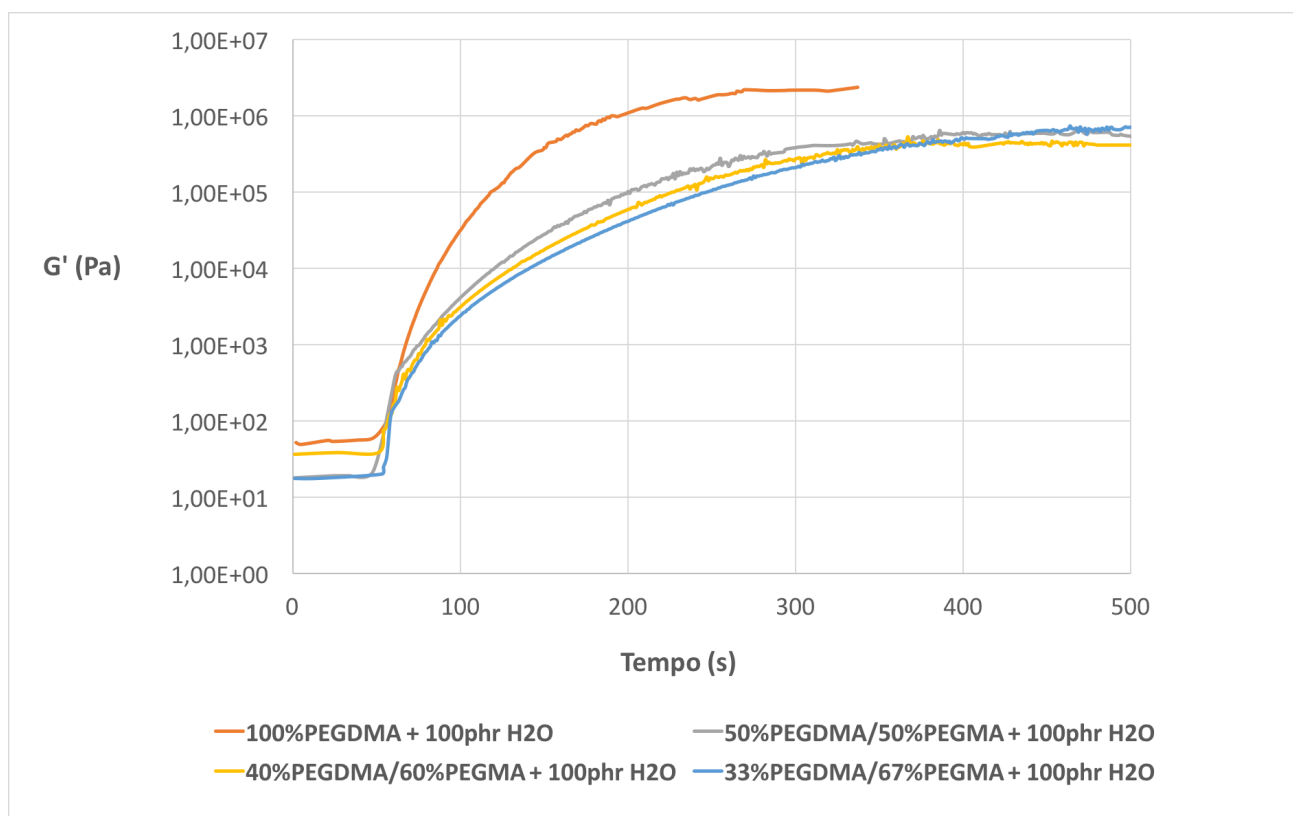


Fig. 6. 1: Curve G' in fotoreologia degli idrogeli con diverse percentuali di PEGDMA/PEGMA

In Figura 6.2 sono mostrate le curve G' in fotoreologia dei sistemi con composizione 33%PEGDMA/67%PEGMA reticolati in presenza di differenti phr di H₂O, da 0 a 150. Come nel caso precedente, i punti iniziali delle curve non sono significativi.

Confrontando le curve in questo secondo caso si osserva che la formulazione reticolata in assenza di H₂O ha una cinetica molto rapida, con una pendenza maggiore alle altre curve, e che G' raggiunge il plateau dopo circa 2 minuti, al valore di $1,8 \cdot 10^6$ Pa.

Reticolare in presenza di H₂O significa che, per pari volumi di formulazione iniziale, i sistemi con maggiore quantità di acqua hanno di conseguenza minore quantità di pre-polimero, per cui il reticolo risulta più debole.⁴⁹ Questo risultato atteso è confermato dalle curve mostrate: l'aumentare dell'idratazione comporta un abbassamento notevole sia della cinetica di reticolazione che del plateau raggiunto da G' , come mostrato nella Tabella 6.1.

Inoltre, sempre tramite uno studio di fotoreologia, si è cercato di ridurre la percentuale di fotoiniziatore presente nel sistema: il BAPO-OH è un acido che potrebbe influenzare negativamente la biocompatibilità del sistema reagente, e i radicali derivanti dalla fotoattivazione potrebbero risultare tossici per il sistema cellulare presente.

A tale scopo, sono stati testati sistemi con composizione 33%PEGDMA/67%PEGMA reticolati con 100phr di H₂O, nei quali è stata variata la percentuale (rispetto al totale di pre-polimero) del fotoiniziatore. Si sono testate le seguenti percentuali di fotoiniziatore: 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5%, 1,0% e 2,0%.

In Figura 6.3 sono mostrate le curve G' prodotte dalle prove fotoreologiche di questo terzo caso. Il tratto di interesse in questo confronto è quello in cui ha inizio la reticolazione: ad eccezione della curva arancione (0,1% di BAPO-OH), gli altri andamenti indicano che l'inizio della reticolazione avviene sempre a circa 45 secondi, mentre il sistema con lo 0,1% di BAPO-OH mostra un ritardo, spostando l'inizio della reticolazione a 70 secondi.

Questa prova ha permesso di stabilire che per il sistema scelto non vi è differenza nella cinetica di reticolazione passando dal 2.0% al solo 0.2% di fotoiniziatore, mentre si osserva un rallentamento quando si utilizza solo lo 0.1%. Per questa ragione si è fissata a 0.2% la quantità di fotoiniziatore per le prove successive.

Inoltre, per completezza, si fa riferimento al già citato studio condotto da Hwang et al. (2014) in cui si mostra che anche variando il rapporto percentuale tra PEGDMA e PEGMA, ciò che influisce sul tempo di inizio della reticolazione è la quantità di fotoiniziatore e non il rapporto percentuale tra bifunzionale e monofunzionale.⁷¹

Tabella 6. 1: Valori di G' al plateau delle curve in fotoreologia al variare della quantità di H_2O

Campioni	G'
33%PEGDMA/67%PEGMA	$1,8 \cdot 10^6$ Pa
33%PEGDMA/67%PEGMA + 50phr H_2O	$1,0 \cdot 10^6$ Pa
33%PEGDMA/67%PEGMA + 100phr H_2O	$6,5 \cdot 10^5$ Pa
33%PEGDMA/67%PEGMA + 150phr H_2O	$1,9 \cdot 10^5$ Pa

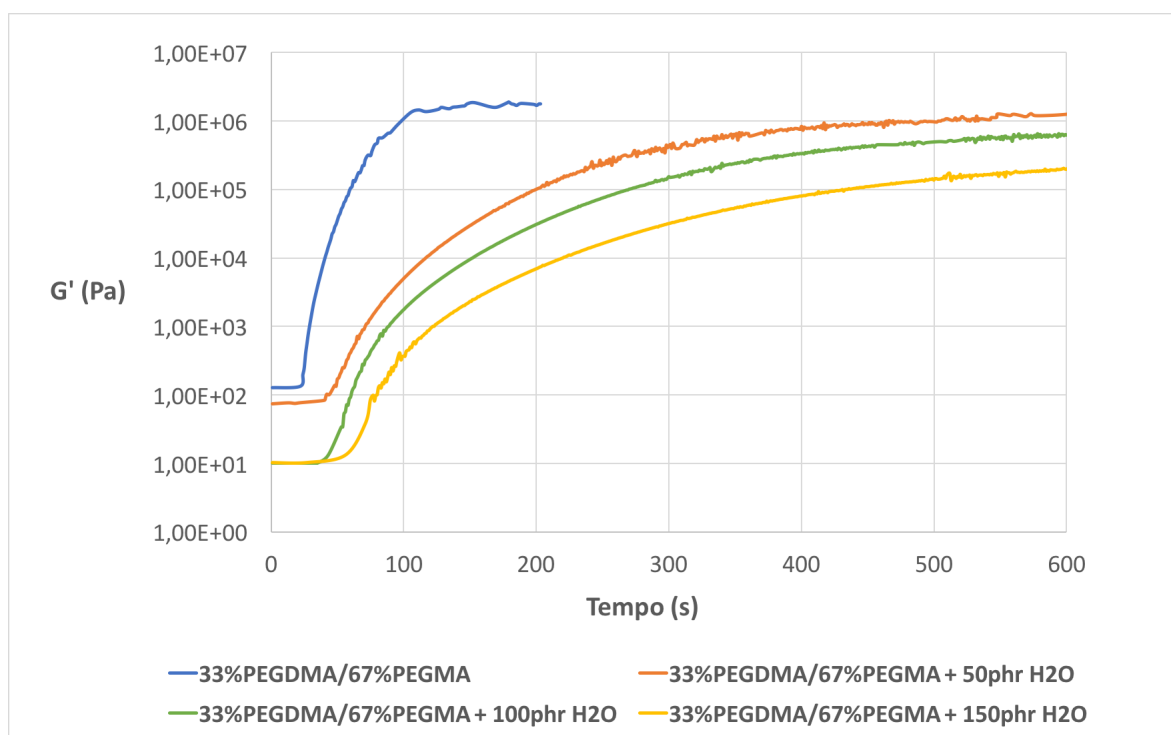


Fig. 6. 2: Curve G' in fotoreologia degli idrogeli con composizione 33%PEGDMA/67%PEGMA reticolati in presenza di diversi phr di H_2O

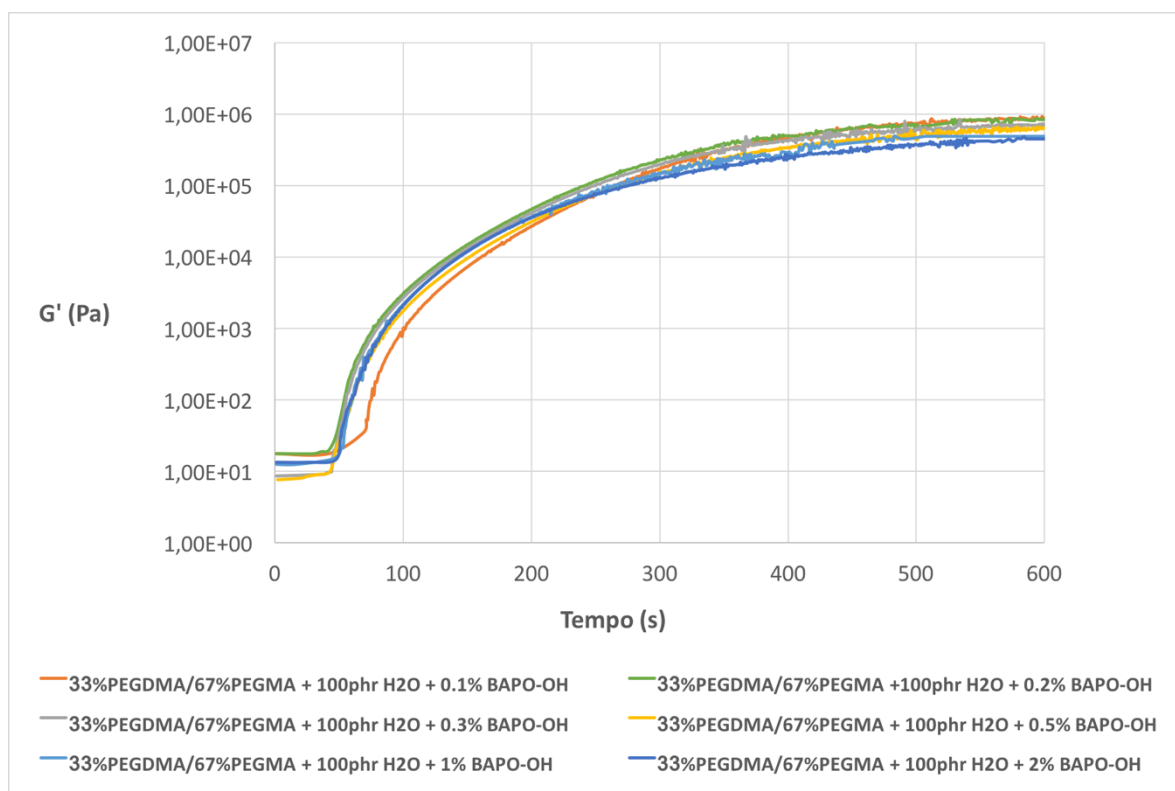


Fig. 6. 3: Curve G' in fotoreologia per gli idrogeli 33%PEGDMA/67%PEGMA al variare della quantità di fotoiniziatore

6.1.2 Reologia in variazione di ampiezza e in variazione di frequenza

Gli idrogeli aventi composizione polimerica 33%PEGDMA/67%PEGMA reticolati in presenza di differenti phr di H₂O sono stati testati al reometro sia in variazione di ampiezza della deformazione, che in variazione di frequenza. Queste prove hanno permesso di ottenere un'indicazione della resistenza del reticolo polimerico a sollecitazioni meccaniche, nonostante la funzione finale degli idrogeli in questo lavoro di tesi non preveda l'applicazione di sforzi elevati.

In Figura 6.4 si riportano le curve G' e G'' ottenute facendo variare la frequenza di sollecitazione. Si osserva che i moduli G' corrispondono a quelli ottenuti al plateau delle prove in fotoreologia, con una diminuzione del modulo all'aumentare della quantità di acqua. Inoltre, tutti i reticoli sono stabili nell'intervallo di sollecitazioni testate.

In Figura 6.5 si riportano invece le curve G' (linea continua) e G'' (linea tratteggiata) della prova reologica in variazione di ampiezza della sollecitazione. Si osserva che tutti i reticoli polimerici sono stabili per ampiezze di deformazione fino al 4%, ampiezza oltre la quale cedono per frattura fragile, come atteso per polimeri termoindurenti.

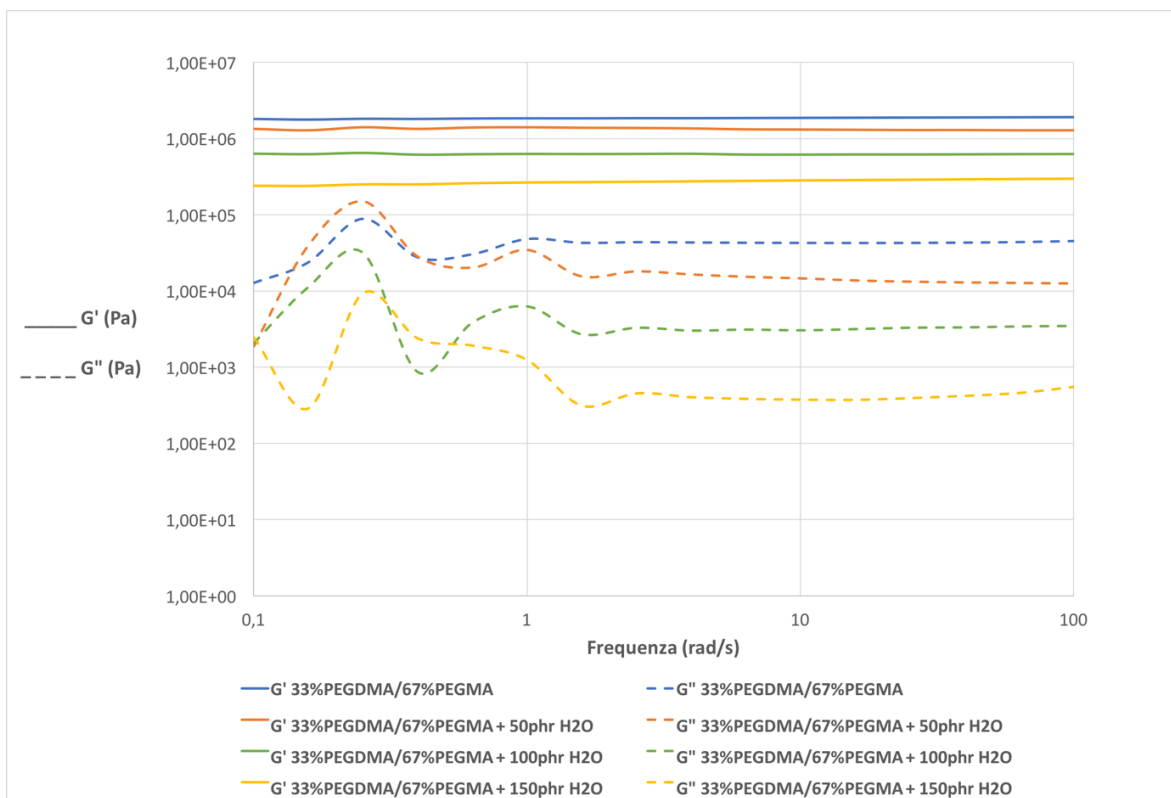


Fig. 6. 4: Reologia in variazione di frequenza della deformazione degli idrogeli 33%PEGDMA/67%PEGMA con diversi phr di H₂O

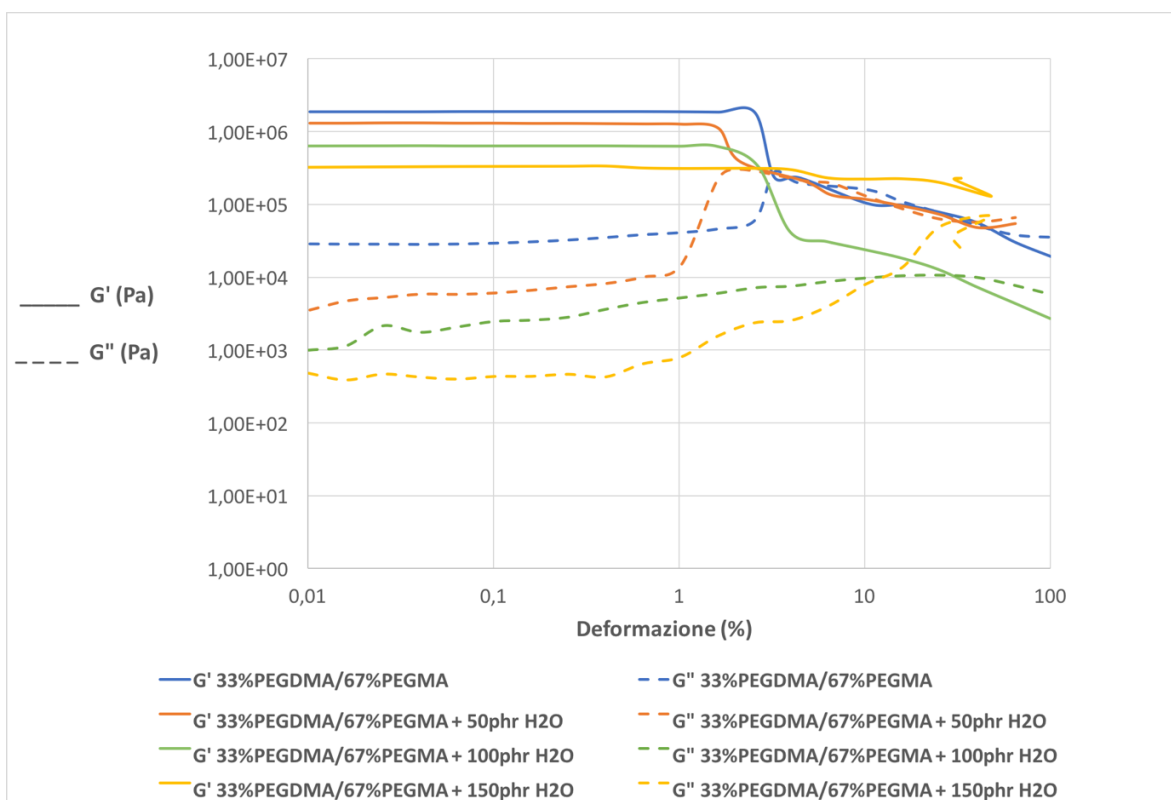


Fig. 6. 5: Reologia in variazione di frequenza della deformazione degli idrogeli 33%PEGDMA/67%PEGMA con diversi phr di H₂O

6.2 Spettroscopia FTIR-ATR

Affinché si possa affermare che la reticolazione sia avvenuta completamente non è sufficiente basarsi solo sulla fotoreologia e sul fatto che i campioni reticolati raggiungono un plateau; è bene dunque verificare se sia avvenuta la conversione del doppio legame C=C contenuto nei gruppi metacrilati.

A questo scopo sono state svolte analisi di spettroscopia in modalità ATR (*attenuated total reflectance*) sulle formulazioni prima della reticolazione e sui campioni ottenuti tramite fotoreologia. L'analisi in modalità ATR permette di analizzare la chimica superficiale dei campioni.

Il campione è posto a contatto con un cristallo di diamante, che ha elevato indice di rifrazione. Il raggio IR passa attraverso questo cristallo e penetra nel campione, per poi essere riflesso in maniera attenuata, a causa dell'assorbimento di radiazione da parte del materiale stesso.¹⁴⁵

Nella Figura 6.6 vengono mostrati gli spettri FTIR-ATR nel caso di idrogeli 33%PEGDMA/67%PEGMA: si confrontano gli spettri dei campioni reticolati con lo spettro della formulazione di partenza (spettro verde).

La curva ATR verde, della formulazione prima della reticolazione, mostra un evidente picco a 1637 cm^{-1} , corrispondente alla vibrazione infrarossa del doppio legame C=C del gruppo metacrilato.

La tabella inserita in figura riporta il valore della conversione del doppio legame, calcolato come rapporto tra le aree dei picchi a 1637 cm^{-1} , misurate sul monomero liquido e al termine del processo di reticolazione e normalizzate rispetto all'area del picco a 1740 cm^{-1} , corrispondente al gruppo carbonilico C=O.

È visibile che il picco caratteristico del legame C=C sparisce negli spettri dei campioni reticolati. I valori misurati indicano per tutti i campioni una conversione prossima al 95%. Questo risultato conferma che una reticolazione completa di idrogeli di PEGDMA/PEGMA può essere ottenuta tramite fotopolimerizzazione radicalica.

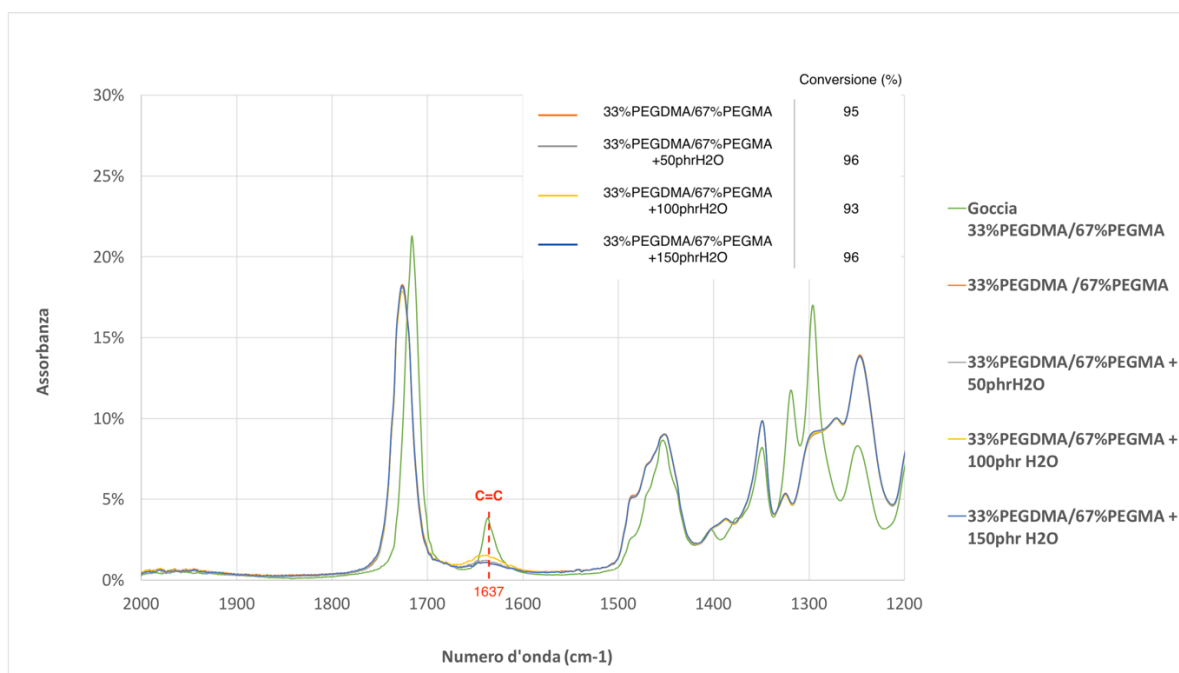


Fig. 6. 6: Curve FTIR-ATR prima e dopo la reticolazione dei campioni 33%PEGDMA/67%PEGDMA, reticolati in presenza di diversi phr di H₂O

In Figura 6.7 viene invece mostrato il confronto tra gli spettri dei campioni reticolati in presenza di 100phr di H₂O con diverse quantità di PEGDMA e PEGMA. Anche in questo si osserva la scomparsa quasi totale del picco del legame C=C, confermata dal calcolo della conversione percentuale, riportata in tabella: per tutti i campioni il valore di conversione è superiore al 93%.

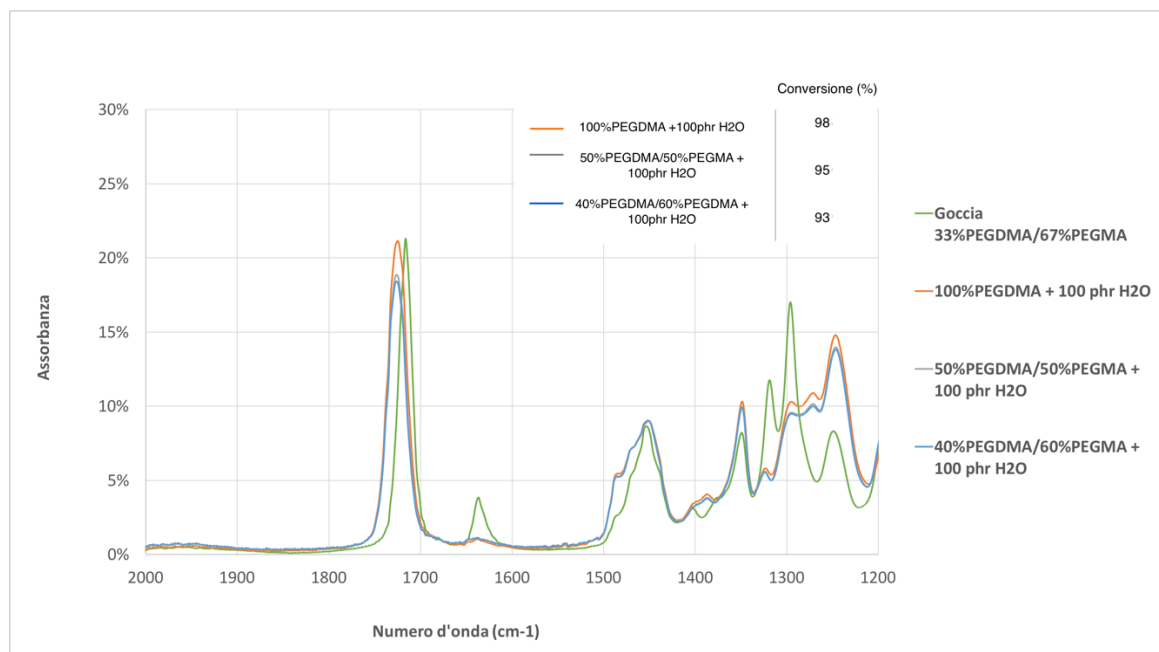


Fig. 6. 7: Curve FTIR-ATR dei campioni con diversa composizione di PEGDMA/PEGMA, reticolati in presenza di 100phr di H₂O

6.3 Prove di %gel

La prova di %gel serve a determinare la frazione insolubile dell'idrogelo e conseguentemente a valutare quanto pre-polimero e fotoiniziatore residui non reagiti rimangano nei campioni.¹⁴³ Questo è un fattore relativamente importante, laddove eventuali residui di fotoiniziatore o frammenti di polimero possano determinare instabilità o ancor più tossicità ed incompatibilità nel caso di contatto con materiale biologico.

In Tabella 6.2 vengono elencati i valori di %gel per gli idrogeli considerati finora: tutti i campioni mostrano una % di gel maggiore del 95%, che rappresenta un risultato positivo, soprattutto per l'applicazione degli idrogeli in questo lavoro di tesi, ovvero l'intrappolamento di microrganismi nella matrice polimerica.

Tabella 6.2: Valori di %gel per i campioni di idrogeli

Campioni	%gel
100%PEGDMA + 100phr H ₂ O	96.98%
50%PEGDMA/50%PEGMA + 100phr H ₂ O	95.30%
40%PEGDMA/60%PEGMA + 100phr H ₂ O	95.10%
33%PEGDMA/67%PEGMA + 100phr H ₂ O	97.23%
33%PEGDMA/67%PEGMA	98.18%
33%PEGDMA/67%PEGMA + 50phr H ₂ O	97.46%
33%PEGDMA/67%PEGMA + 150phr H ₂ O	97.06%

6.4 Analisi termica dinamo-meccanica DMTA

La DMTA (*dynamic-mechanical thermal analysis*) è un'analisi termica che permette di caratterizzare il comportamento viscoelastico di un materiale polimerico. Consiste nell'applicazione di uno stress sinusoidale con un aumento progressivo della temperatura.

Durante la prova si misurano i moduli conservativo e dissipativo del polimero. Il modulo elastico conservativo mostra un plateau nello stato vetroso del polimero, poi in corrispondenza della transizione vetrosa si ha un abbassamento ed infine si assesta nuovamente ad un plateau, più basso, allo stato gommoso.¹⁴⁶

Il rapporto tra il modulo dissipativo e il modulo conservativo è il fattore di smorzamento Tan delta, il cui picco corrisponde alla transizione vetrosa. Con la DMTA dunque, oltre alle proprietà meccaniche del materiale nelle condizioni di temperatura e sollecitazione impostata, si può valutare anche la sua temperatura di transizione vetrosa.¹⁴⁶

6.4.1 Andamento della Tan delta

In Figura 6.8 sono mostrate le curve Tan delta per i campioni essiccati con diverse composizioni di PEGDMA/PEGMA, reticolati in presenza di 100phr di H₂O: gli andamenti di Tan delta evidenziano una sostanziale differenza nella temperatura di transizione vetrosa dei diversi campioni. La curva arancione che fa riferimento al campione costituito al 100% da PEGDMA mostra una T_g pari a -30 °C, mentre all'aumentare della frazione di PEGMA, a discapito della frazione di PEGDMA, la T_g è al di sotto di -40 °C. Sul grafico in figura sono elencate le T_g dei diversi campioni per un confronto più esplicativo. Da questo risultato se ne deduce che l'aumento della frazione di PEGMA nella composizione del reticolo ha un effetto plasticizzante, ampliando l'intervallo di temperatura dello stato gommoso del materiale.

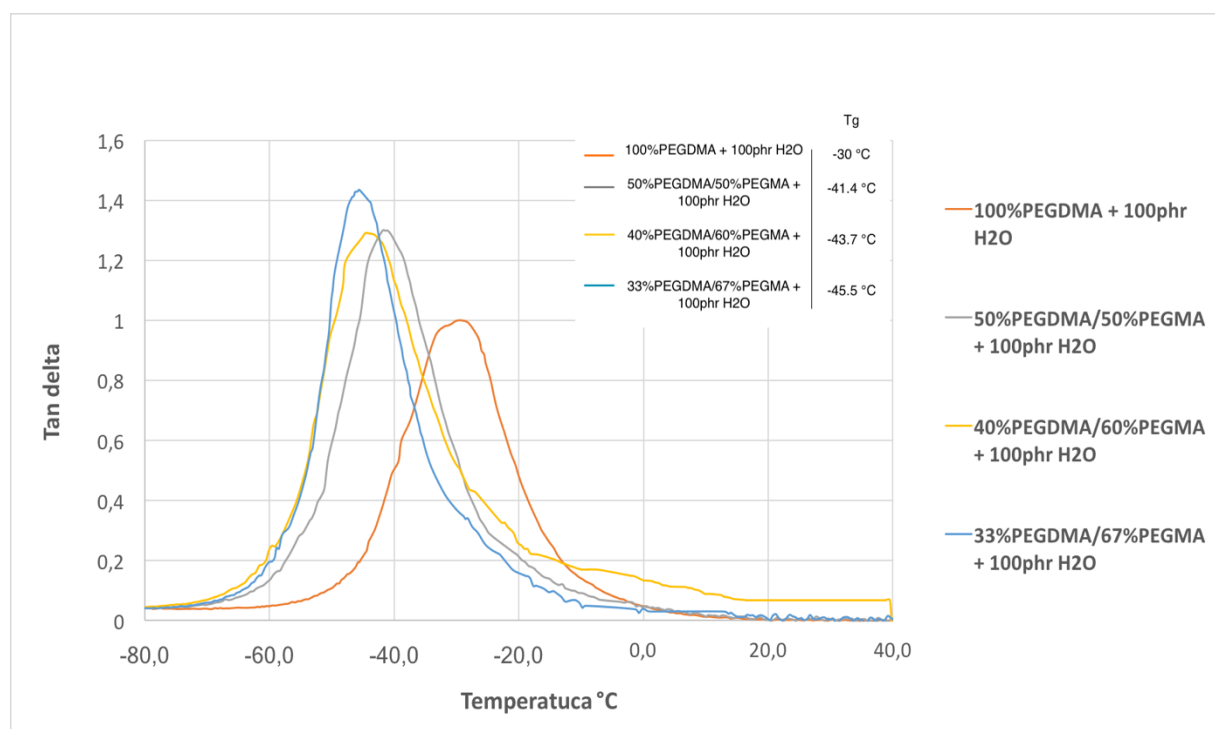


Fig. 6. 8: Andamenti Tan delta dei campioni con diverse composizioni di PEGDMA/PEGMA, reticolati in presenza di 100phr H₂O

Nella Figura 6.9 si riportano invece gli andamenti di Tan delta per i campioni essiccati con composizione 33%PEGDMA/67%PEGMA, reticolati in precedenza con diversi phr di H₂O, da 0 a 150.

In questo secondo caso si osserva che i reticoli formati in presenza di acqua hanno una temperatura di transizione vetrosa nell'intorno di -44 °C, mentre il reticolo ottenuto in assenza di acqua ha una T_g di -41 °C. Questo risultato conferma quanto visto precedentemente in reologia, ovvero che i reticoli formati in assenza di acqua mostrano una struttura più rigida, probabilmente per una maggiore densità di reticolazione del reticolo stesso.

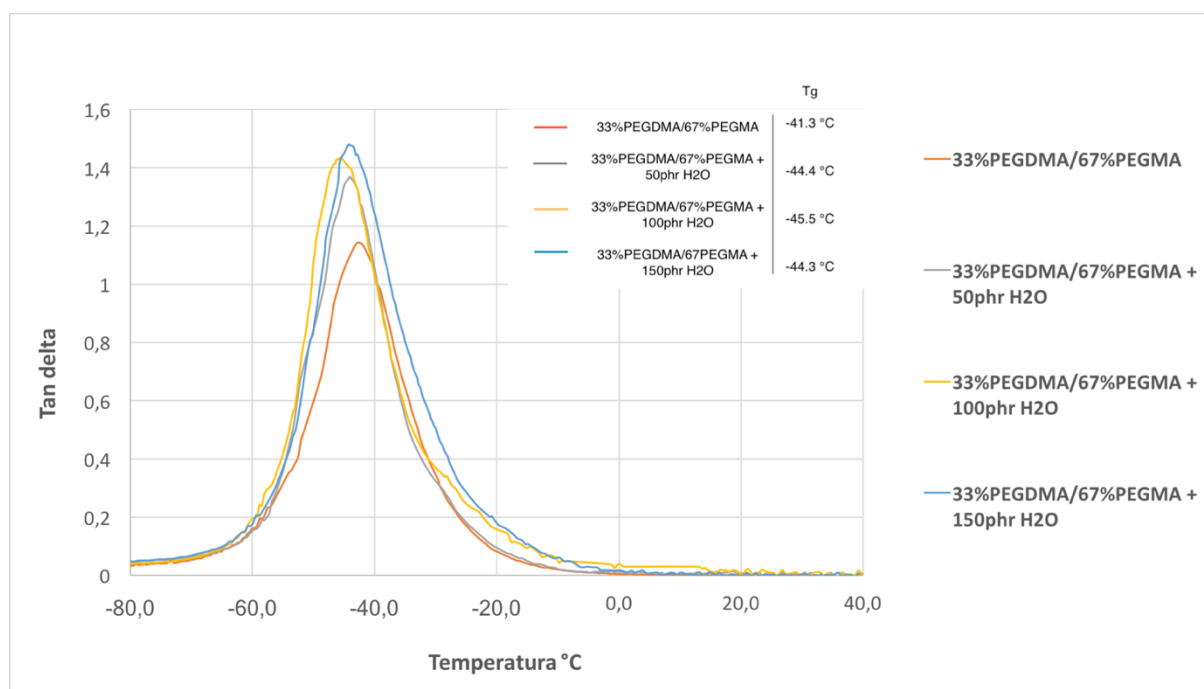


Fig. 6. 9: Andamenti Tan delta dei campioni 33%PEGDMA/67%PEGMA reticolati in presenza di diversi phr di H₂O

6.4.2 Moduli G' allo stato vetroso e allo stato gommoso

Nella Tabella 6.3 vengono elencati i moduli conservativi G' dei diversi campioni, forniti dalle prove DMTA, allo stato vetroso e allo stato gommoso, e la densità di reticolazione ν , espressa in mmol/cm³, calcolata secondo l'equazione 5.1 ($G' = \nu RT$, dove G' è il modulo conservativo a 30 °C, cioè allo stato gommoso).

Per i tutti i sistemi considerati, la transizione vetrosa determina una perdita di tre ordini di grandezza, nel passaggio dallo stato vetroso allo stato gommoso. Si osserva inoltre che sia all'aumentare della frazione di PEGMA che all'aumentare della quantità di acqua nell'idrogel di partenza, il modulo del reticolo allo stato gommoso decresce, risultato che conferma ancora una volta quanto detto precedentemente. Inoltre, dai valori di ν si nota che all'aumentare nel sistema della frazione di PEGMA, a discapito del PEGDMA, la densità di reticolazione si abbassa notevolmente; lo stesso effetto è dovuto all'aumentare della quantità di acqua nella formulazione di partenza. Questa stima matematica della densità di reticolazione permette di confermare quanto detto più volte nella discussione di questi risultati, cioè che il monofunzionale e la presenza di acqua durante il processo di reticolazione abbassano la probabilità di formare legami covalenti tra le catene, generando dei reticoli meno densi e più gommosi.

Tabella 6. 3: Valori di G' per i campioni testati in DMTA, allo stato vetroso e allo stato gommoso, e densità di reticolazione

Campioni	G' al plateau vetroso (Pa)	G' al plateau gommoso (Pa)	ν (mmol/cm ³)
100%PEGDMA + 100phr H ₂ O	$2.15 \cdot 10^9$	$5.56 \cdot 10^6$	2.21
50%PEGDMA/50%PEGMA + 100phr H ₂ O	$2.10 \cdot 10^9$	$3.73 \cdot 10^6$	1.48
40%PEGDMA/60%PEGMA + 100phr H ₂ O	$1.24 \cdot 10^9$	$1.87 \cdot 10^6$	0.74
33%PEGDMA/67%PEGMA + 100phr H ₂ O	$2.32 \cdot 10^9$	$1.76 \cdot 10^6$	0.70
33%PEGDMA/67%PEGMA	$2.30 \cdot 10^9$	$5.50 \cdot 10^6$	2.18
33%PEGDMA/67%PEGMA + 50phr H ₂ O	$2.24 \cdot 10^9$	$2.79 \cdot 10^6$	1.11
33%PEGDMA/67%PEGMA + 150phr H ₂ O	$2.28 \cdot 10^9$	$1.19 \cdot 10^6$	0.47

6.5 Calorimetria a scansione differenziale DSC

La DSC (*Differential scanning calorimetry*) è un'analisi termica in cui si misura la differenza di flusso di calore tra un campione e un riferimento, attraverso delle termocoppie, durante un riscaldamento controllato, al fine di seguire le transizioni del materiale in esame, durante le quali il materiale rilascia o assorbe calore. Con questa prova è possibile osservare le temperature caratteristiche dei materiali polimerici, come la transizione vetrosa, la temperatura di cristallizzazione, la temperatura di fusione delle zone cristalline ed eventuali altre transizioni del primo e secondo ordine.¹⁴⁷

Per avere un riscontro delle temperature caratteristiche dei campioni, in particolare la transizione vetrosa, sono state effettuate due prove in DSC su campioni 33%PEGDMA/67%PEGMA.

In Figura 6.10 sono riportate le due curve ottenute: si osserva che le transizioni vetrose sono simili, in particolare -51.0 °C per il campione che non è stato reticolato in presenza d'acqua (curva arancione), e -52.0 °C per il campione reticolato con 150phr di acqua (curva blu).

Tali temperature differiscono di qualche grado da quelle misurate nella prova di DMTA: è un risultato che ci si aspetta, poiché le transizioni vetrose dei polimeri dipendono fortemente dalle velocità di raffreddamento/riscaldamento, e dalle condizioni generali di sollecitazione.¹⁴⁸

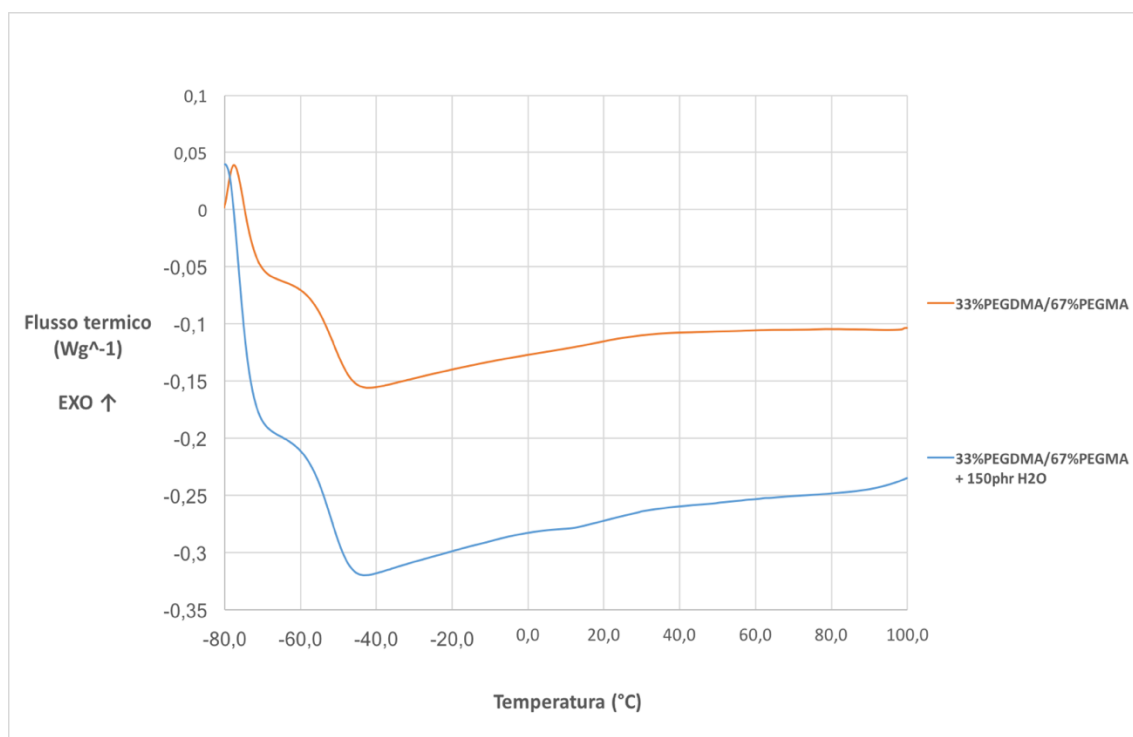


Fig. 6. 10: Curve DSC di due reticoli 33%PEGDMA/67%PEGMA

6.6 Prove di swelling

Le prove di *swelling* permettono di determinare il rigonfiamento dovuto all'assorbimento d'acqua da parte dei campioni.

In Figura 6.11 sono mostrate le curve degli assorbimenti percentuali dei diversi reticoli polimerici. Per tutti i campioni si osserva un rapido aumento iniziale delle curve, poiché il reticolo idrofilo tende ad idratarsi subito. Il rigonfiamento rallenta fino ad una condizione stazionaria, raggiunta per tutti i reticoli già dopo un'ora.

Si osserva inoltre che i reticoli con i minori rigonfiamenti, (circa +50%,) sono quelli costituiti da 100% di PEGDMA, precedentemente reticolato in presenza di 100phr di H_2O (curva azzurra), 50%PEGDMA/50%PEGMA, reticolato con 100phr di H_2O (curva arancione) e 33%PEGDMA/67%PEGMA reticolato in assenza di H_2O , quindi i campioni che contengono le minori quantità di monofunzionale insieme al campione reticolato in assenza di acqua.

Gli altri idrogeli si assestano tra un +60% e un +70% di *swelling*, e il campione che mostra il maggior rigonfiamento è quello costituito da 33%PEGDMA/67%PEGMA reticolato in presenza di 150phr di H_2O (curva blu scuro). Questo risultato può essere giustificato da una minore densità di reticolazione (come mostrato nella Tabella 6.3) che comporta maggiore volume libero da riempire per l'acqua; il reticolo era difatti stato formato in presenza di un'elevata frazione di acqua e di monofunzionale, per cui vi sono meno legami covalenti tra le catene.

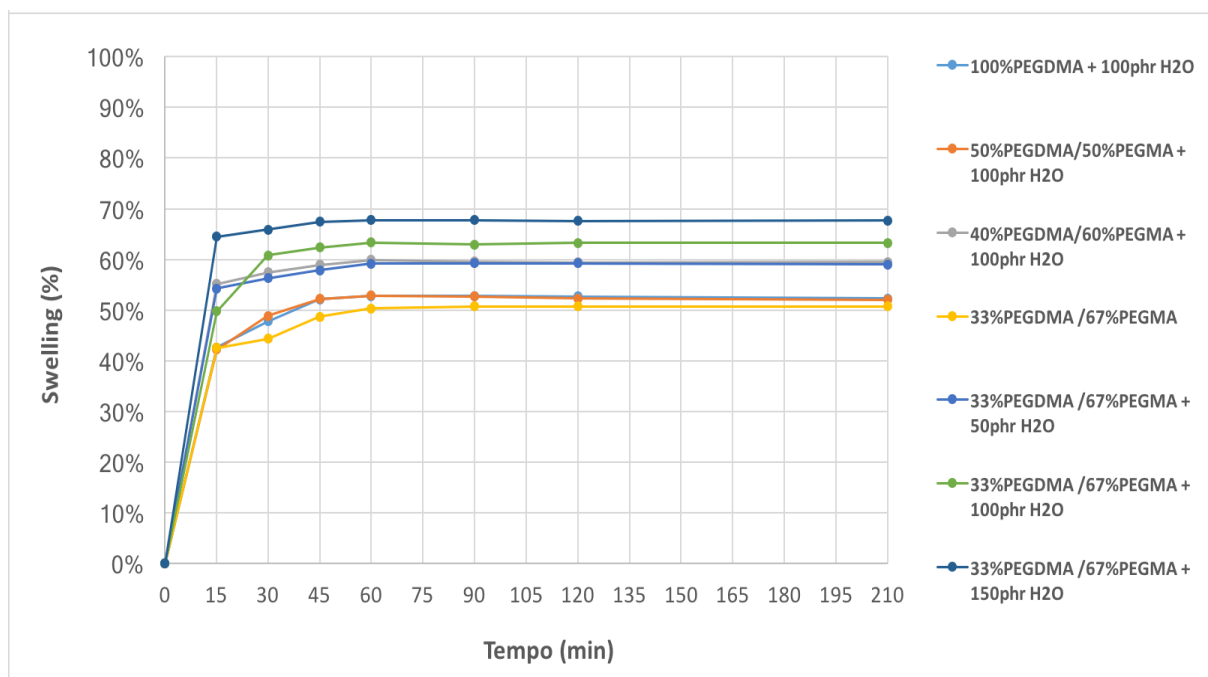


Fig. 6. 11: Curve di swelling (%) degli idrogeli considerati

6.7 Intrappolamento dei microrganismi negli idrogeli polimerici

Fino a questo momento sono state mostrate e discusse le prove condotte per caratterizzare i materiali studiati dal punto di vista chimico, meccanico e termico. Le prove successive riguardano, invece, la biocompatibilità del sistema, sia dei singoli componenti chimici che del sistema di reticolazione completo, nonché la sua efficienza nell'intrappolamento dei microrganismi.

6.7.1 Valutazione dell'influenza dei componenti del polimero e dell'irraggiamento sulla crescita microbica

Le prove di compatibilità tra *P. fluorescens* e i componenti del polimero, nonché l'eventuale influenza dell'irraggiamento sulla crescita, sono state condotte sia su terreni solidi DSM1 e M78, che in terreni liquidi M78.

6.7.1.1 Prove su terreno solido

Le prove su terreno solido hanno permesso di valutare la possibile inibizione nella crescita di *P. fluorescens*, in presenza dei componenti del sistema di fotopolimerizzazione impiegato. Di seguito vengono mostrate le piastre di terreno solido con cui sono state condotte le prove di crescita dei microrganismi.

Nelle Figure 6.12 e 6.13 è confrontata la crescita dei soli microrganismi, rispettivamente sui terreni DSM1 e M78, in assenza di irraggiamento (che rappresenta il controllo positivo della prova) e dopo essere stati irraggiati per 10 minuti. Sono stati utilizzati due terreni diversi, uno complesso (DSM1) e uno minimo (M78), per verificare il comportamento del microrganismo nelle due differenti situazioni di coltura. Il terreno minimo M78, essendo privo di ferro, risulterà fondamentale per la produzione della molecola di pioverdina che si vuole sfruttare come molecola segnale della presenza di metalli. Dalle immagini, non si osserva inibizione della crescita nel caso irraggiato, risultato che ci si aspetta in quanto l'irraggiamento con luce visibile

non è in genere dannoso per i sistemi biologici e, in quanto tale, è preferibile alla luce UV quando si intende fotopolimerizzare dei sistemi a contatto con materiale biologico.²²

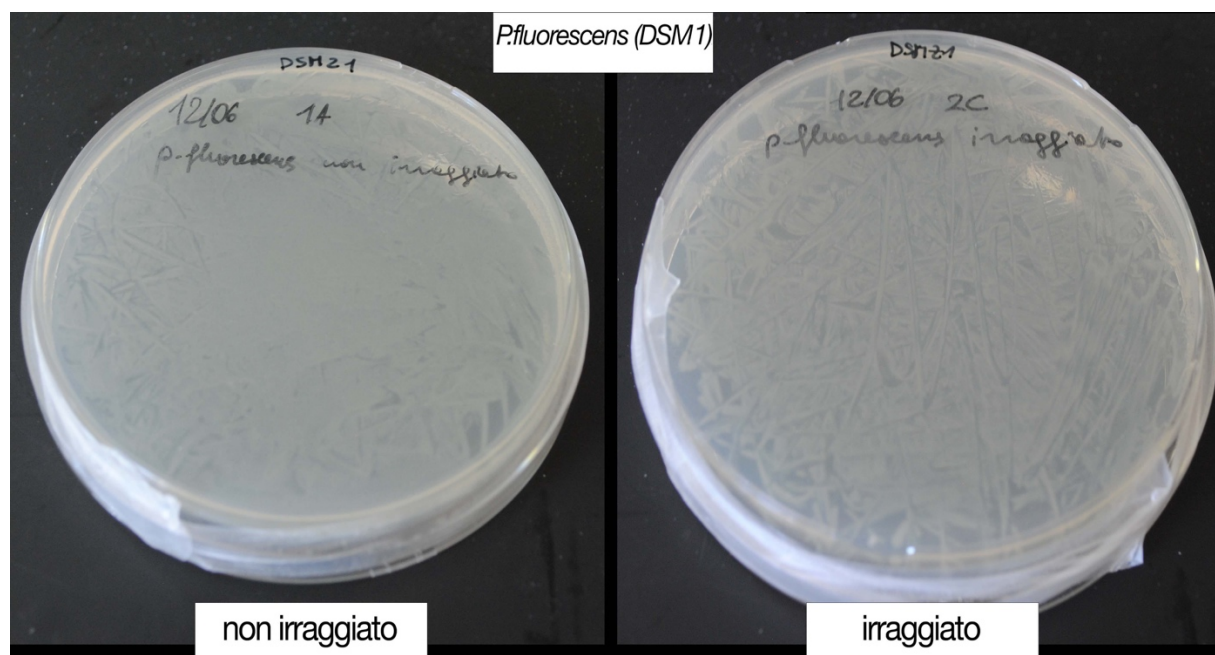


Fig. 6. 12: Crescita di *P. fluorescens* sul terreno DSM1 nei casi non irradiato e irradiato

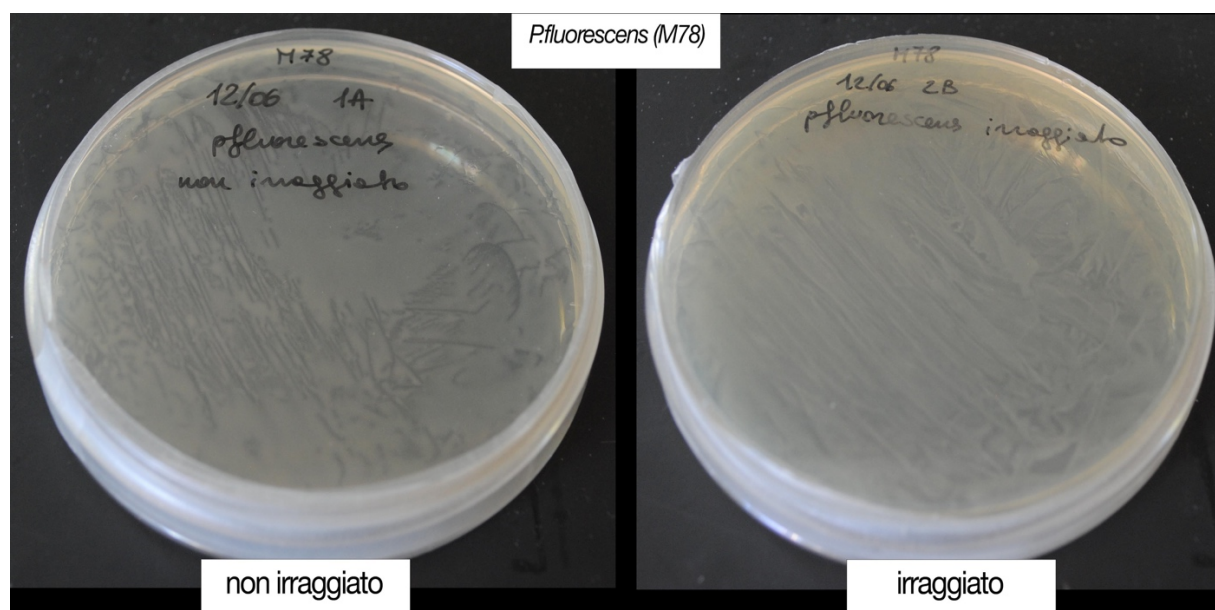


Fig. 6. 13: Crescita di *P. fluorescens* sul terreno M78 nei casi non irradiato e irradiato

Nelle Figure 6.14 e 6.15 sono riportate le immagini relative alle prove in cui *P. fluorescens* è stato messo a contatto con un disco di carta, sul quale è stata depositata la soluzione di pre-polimero di PEGMA, sia tal quale che dopo essere stata irradiata per 10 minuti con luce visibile. Lo scopo della prova è stato duplice: verificare la compatibilità del PEGMA tal quale ed escludere che il PEGMA irradiato generi delle specie che inibiscono la crescita del batterio. L'assenza di un alone di inibizione intorno ai dischi impregnati di PEGMA dimostra che anche in questa prova non vi è inibizione della crescita, dunque il pre-polimero tal quale o irradiato non è tossico per *P. fluorescens*.

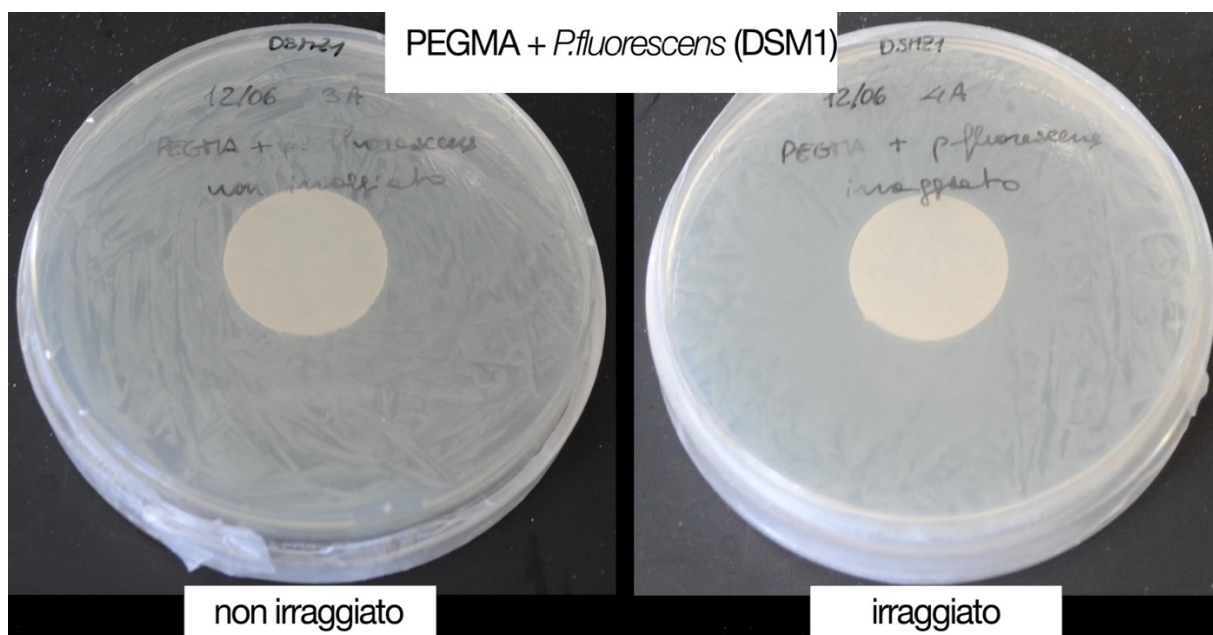


Fig. 6. 14: Crescita di *P. fluorescens* sul terreno DSM1, a contatto con PEGMA non irraggiato e irraggiato

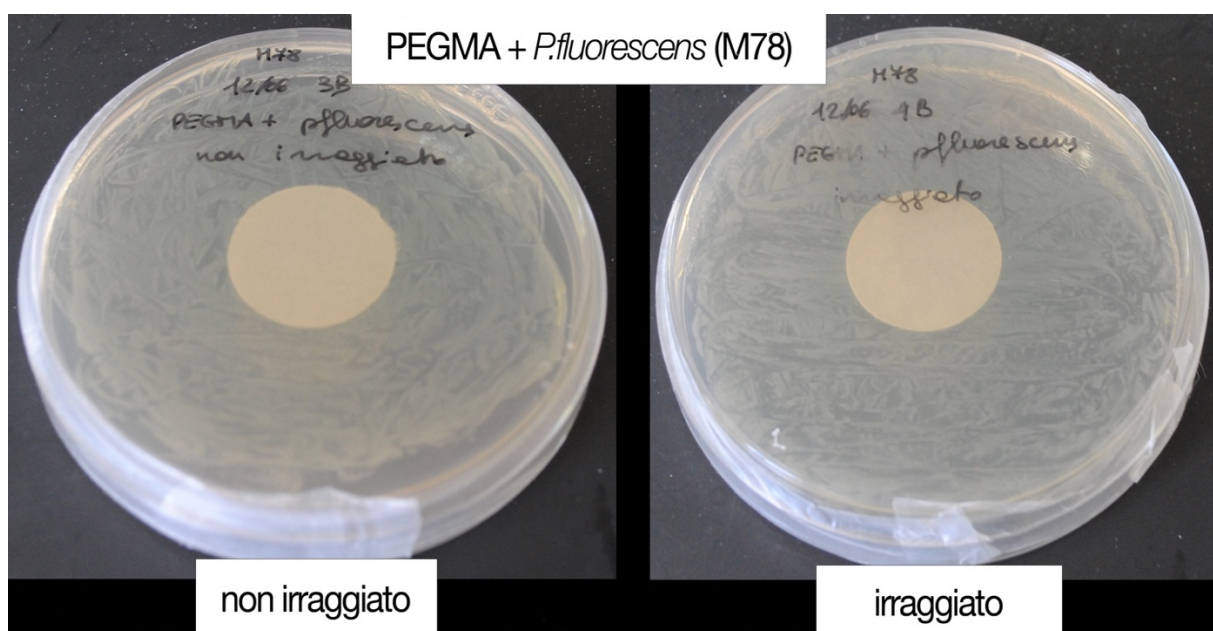


Fig. 6. 15: Crescita di *P. fluorescens* sul terreno M78, a contatto con PEGMA non irraggiato e irraggiato

Le Figure 6.16 e 6.17 mostrano i risultati relativi alla soluzione di fotoiniziatore, sia tal quale che irraggiata. L'attivazione del fotoiniziatore mediante esposizione alla radiazione visibile determina la formazione di radicali. Nonostante ciò, è possibile affermare che anche nel caso del BAPO-OH non si evidenzia inibizione sulla crescita di *P. fluorescens*.

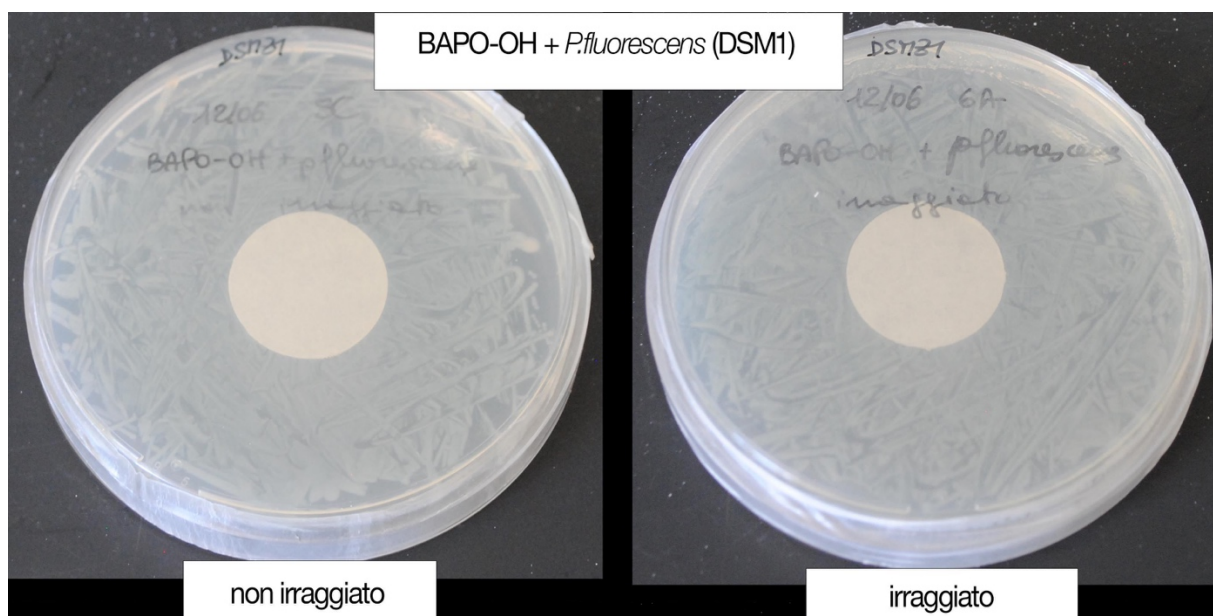


Fig. 6. 16: Crescita di *P. fluorescens* sul terreno DSM1, a contatto con BAPO-OH non irraggiato e irraggiato

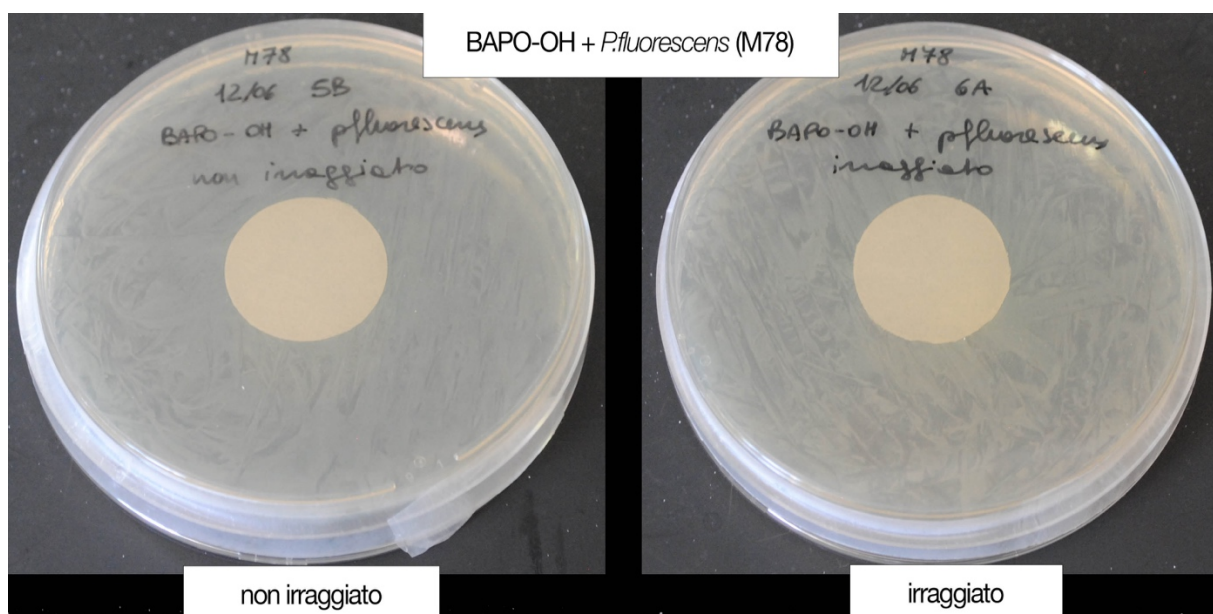


Fig. 6. 17: Crescita di *P. fluorescens* sul terreno M78, a contatto con BAPO-OH non irraggiato e irraggiato

Successivamente è stata valutata la biocompatibilità degli idrogeli a base di PEGDMA e PEGMA. Gli idrogeli, sia tal quali che dopo essere stati lavati, sono stati appoggiati direttamente sulle piastre di terreno agarizzato, sulle quali era stata precedentemente dispersa la sospensione di *P. fluorescens* (Figure 6.18 e 6.19). Inoltre, per completezza, sono stati preparati dei controlli abiotici, appoggiando degli idrogeli su terreni sterili non inoculati (Figura 6.20), per verificare possibili contaminazioni. Infine, la soluzione di lavaggio utilizzata per gli idrogeli è stata depositata su dischi di carta e messa a contatto con i microrganismi, per valutare l'eventuale presenza di residui solubili non polimerizzati che potrebbero inibire la crescita batterica (Figura 6.21).

Nelle Figure 6.18 e 6.19 non si osserva inibizione, sia da parte dell'idrogelo lavato che dell'idrogelo non lavato. In particolare, gli idrogeli lavati sono rigonfiati ulteriormente ed essendo bagnati hanno aderito completamente al terreno; gli idrogeli non lavati, invece, non hanno aderito bene al terreno, per cui sono stati più volte poggiati e rigirati nel tentativo di aumentare l'area di contatto. Questa azione ha determinato un contatto del lato superiore dell'idrogelo con i batteri dispersi sulla superficie dell'agar, per cui si è osservata una crescita anche in questa zona, che ha confermato ulteriormente la biocompatibilità del materiale. Gli idrogeli posizionati sui terreni sterili (Figura 6.20) non hanno determinato crescita microbica, evidenziando che durante la preparazione degli idrogeli non vi è stata contaminazione microbica. Infine, la crescita di *P. fluorescens* non è stata inibita in presenza della soluzione di lavaggio utilizzata per gli idrogeli, come osservabile nella Figura 6.21, pertanto, eventuali residui di reticolazione non compromettono la biocompatibilità del sistema.

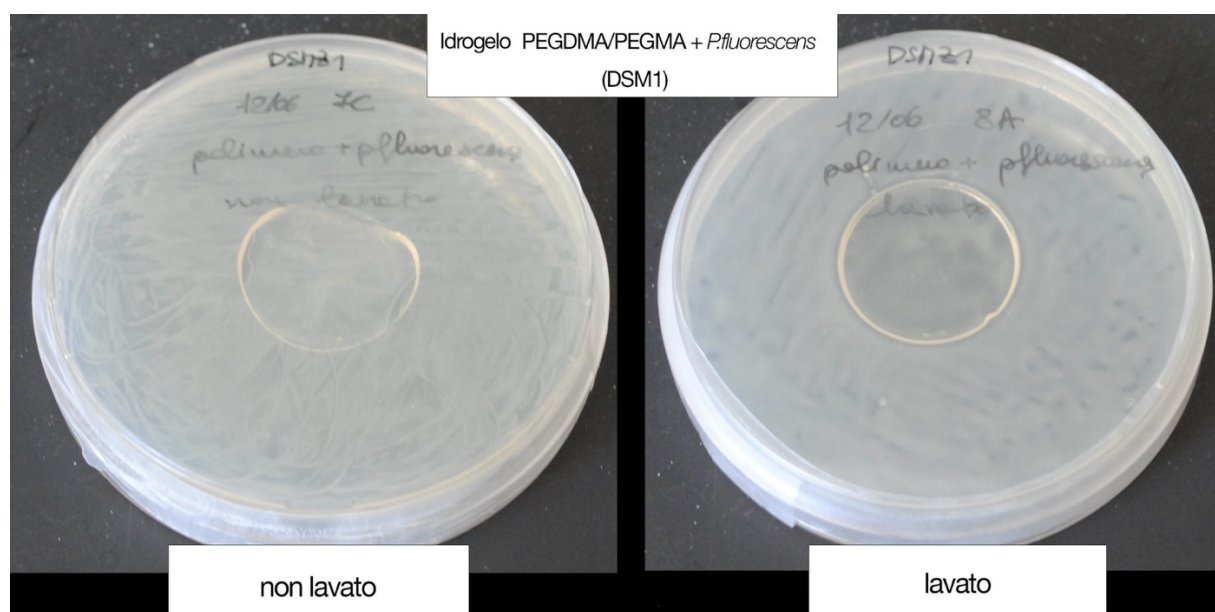


Fig. 6. 18: Crescita di *P. fluorescens* sul terreno DSM1, a contatto con un idrogelo di PEGDMA/PEGMA non lavato e lavato

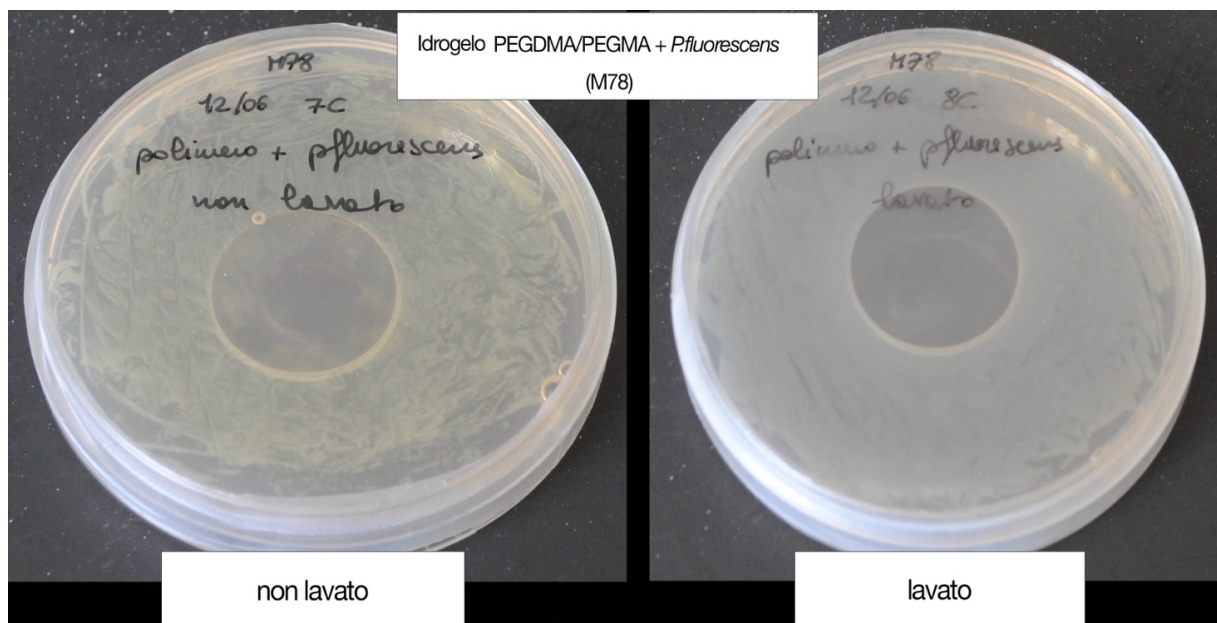


Fig. 6. 19: Crescita di *P. fluorescens* sul terreno M78, a contatto con un idrogelo di PEGDMA/PEGMA non lavato e lavato

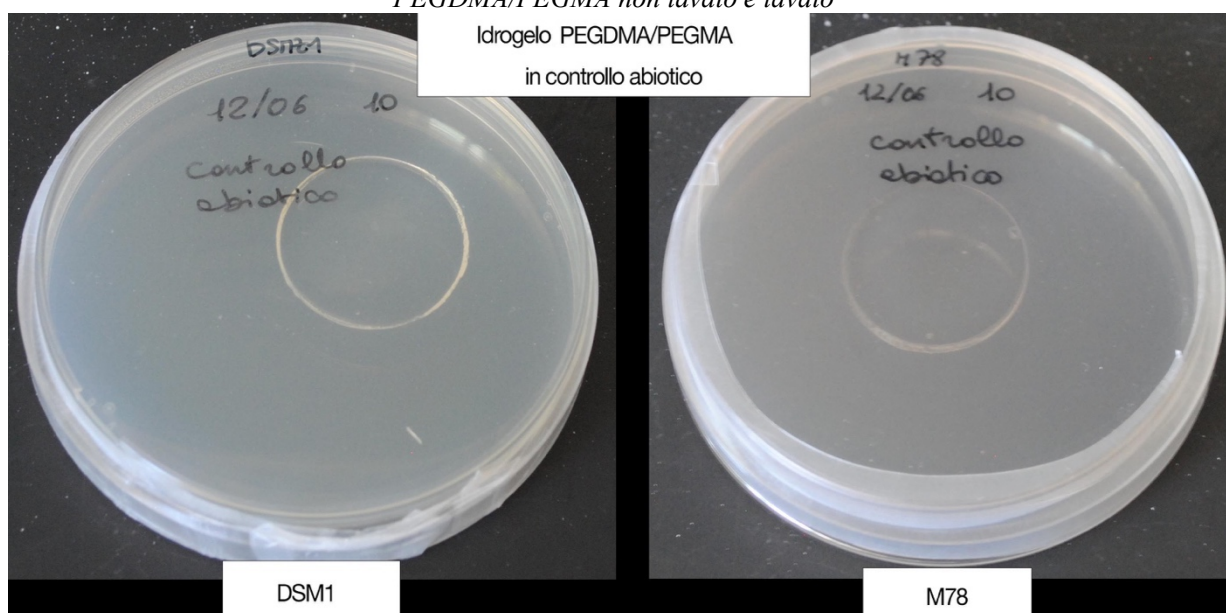


Fig. 6. 20: Controllo abiotico dell'idrogelo di PEGDMA/PEGMA

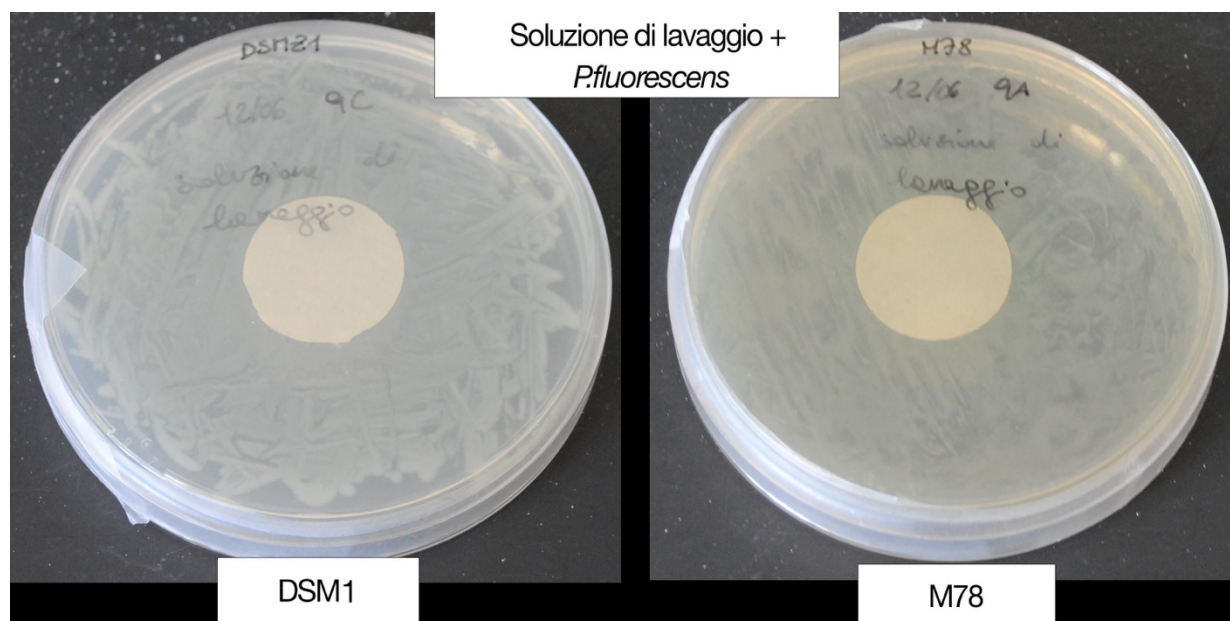


Fig. 6. 21: Crescita di *P. fluorescens* sui terreni DSM1 e M78, a contatto con la soluzione usata per lavare gli idrogeli

6.7.1.2 Prove in terreno liquido

Le prove in terreno liquido sono state condotte al fine di osservare la crescita microbica e la produzione di piovveridina da parte di *P. fluorescens* in presenza dei singoli componenti del polimero e delle condizioni di polimerizzazione (irraggiamento). Questo studio combinato alle prove in solido offre un quadro completo della biocompatibilità del sistema. Per ogni condizione sono state valutate tre repliche. Nei grafici vengono riportati i valori medi con gli errori.

Nella Figura 6.22 sono mostrate le misure di OD e pH effettuate sui terreni di crescita in cui era presente il solo microrganismo, in condizione di irraggiamento e non. Il grafico mostra che già dopo 24 ore è ottenuta una crescita microbica, tramite le misure di OD₆₂₀ e pH (rispettivamente in blu e arancione sul grafico). Inoltre, è stata evidenziata la produzione di piovveridina, tramite la misura dell'OD₄₀₀ del surnatante (in verde sul grafico). Nella Tabella 6.4 vengono riassunti i valori medi delle misure effettuate, con gli errori calcolati tramite deviazione standard.

Tabella 6. 4.: Valori di OD e pH del terreno di crescita di *P. fluorescens*

<i>P. fluorescens</i>	Tempo 0	24 ore non irraggiato	24 ore irraggiato	48 ore non irraggiato	48 ore irraggiato
OD₆₂₀	0.05 ± 0.001	0.79 ± 0.036	0.94 ± 0.191	0.96 ± 0.196	0.87 ± 0.130
OD₄₀₀	0.11 ± 0.003	2.65 ± 0.077	2.72 ± 0.287	3.22 ± 0.036	3.24 ± 0.036
pH	6.91 ± 0.010	7.36 ± 0.035	7.42 ± 0.090	8.15 ± 0.050	8.10 ± 0.055

A 48 ore, l'OD₆₂₀ suggerisce che la crescita abbia raggiunto la condizione stazionaria, mentre, l'aumento di pH indica un ulteriore consumo dei nutrienti nel terreno da parte dei

microrganismi. Infine, la produzione di pioverdina determina valori di OD₄₀₀ al limite della saturazione.

Non si osservano sostanziali differenze negli andamenti delle misure, tra i casi non irraggiati (linee tratteggiate) e i casi irraggiati (linee continue), quindi anche in coltura liquida la crescita dei microrganismi non è influenzata dalla radiazione di luce visibile utilizzata per la polimerizzazione.

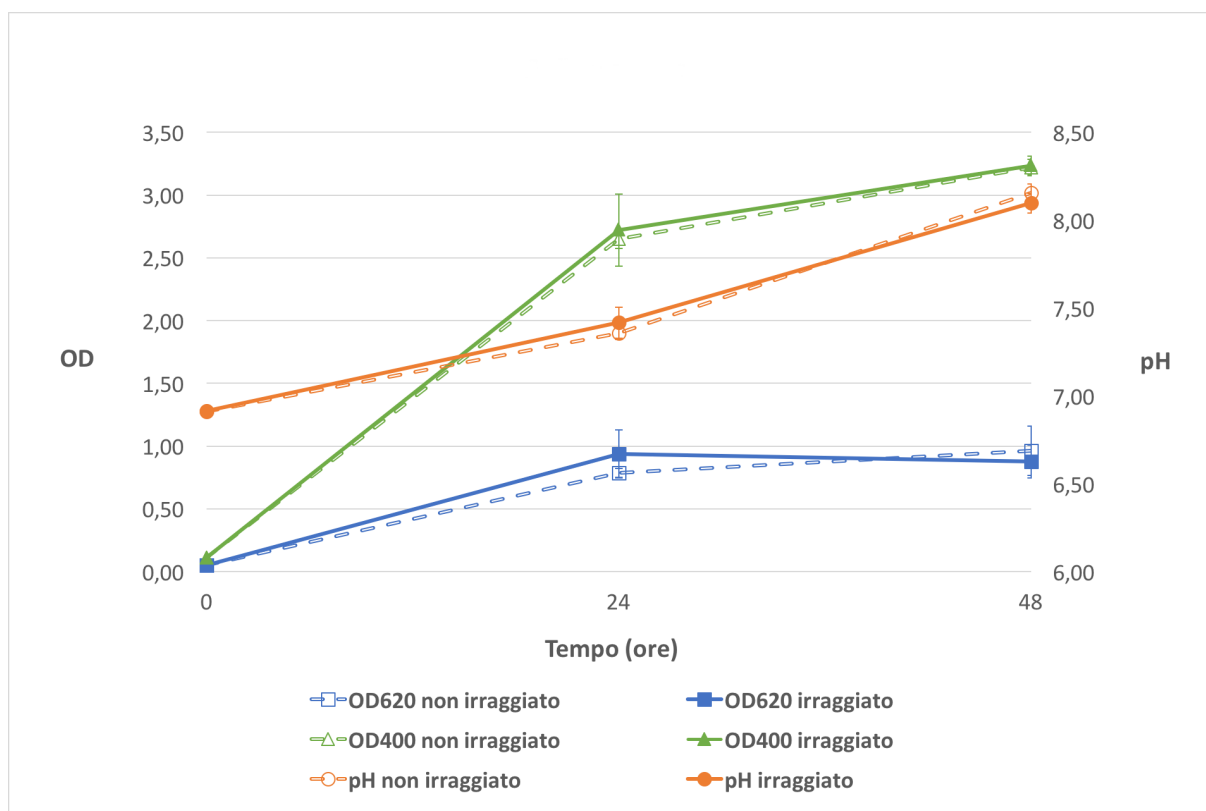


Fig. 6. 22: Misure di OD₆₂₀, OD₄₀₀ e pH del terreno di crescita di *P. fluorescens*, nelle condizioni non irraggiato e irraggiato

La Figura 6.23 mostra, invece, gli andamenti nel caso in cui *P. fluorescens* sia stato messo a contatto con una soluzione di PEGMA, sia tal quale che dopo un irraggiamento di 10 minuti. Anche in questo caso si possono fare le stesse considerazioni del grafico precedente: la presenza del pre-polimero, sia nel caso tal quale che dopo l'irraggiamento, non compromette la crescita microbica né la produzione del sideroforo, risultato che conferma quanto osservato nei test su terreno solido. In Tabella 6.5 vengono riportati i valori medi delle misure effettuate.

Tabella 6. 5: Valori di OD e pH del terreno di crescita di *P. fluorescens* a contatto con PEGMA

<i>P. fluorescens</i> + PEGMA	Tempo 0	24 ore non irraggiato	24 ore irraggiato	48 ore non irraggiato	48 ore irraggiato
OD₆₂₀	0.07 ± 0.001	0.95 ± 0.152	0.76 ± 0.125	0.68 ± 0.048	0.79 ± 0.084
OD₄₀₀	0.16 ± 0.001	2.94 ± 0.207	2.77 ± 0.074	3.12 ± 0.011	3.16 ± 0.085
pH	6.91 ± 0.006	7.50 ± 0.056	7.46 ± 0.010	7.88 ± 0.021	7.92 ± 0.032

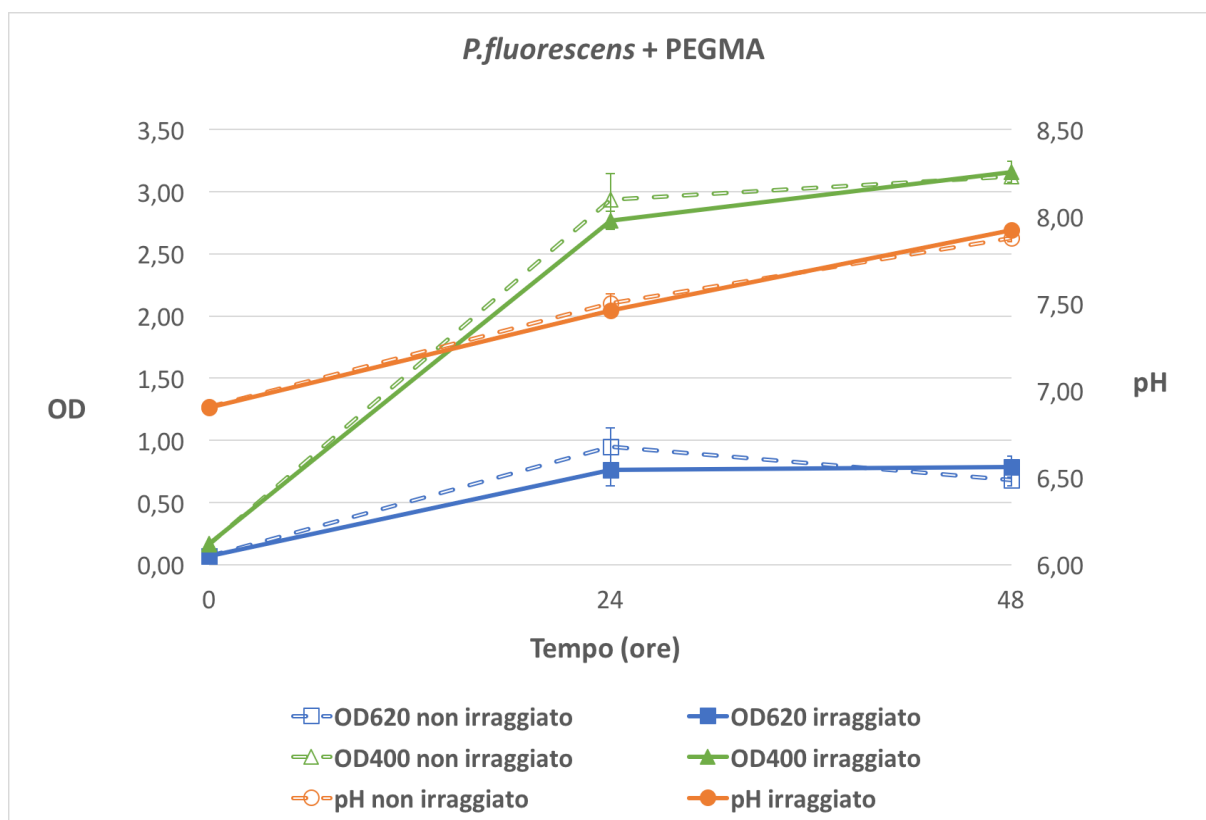


Fig. 6. 23: Misure di OD₆₂₀, OD₄₀₀ e pH del terreno di crescita di *P. fluorescens*, a contatto con PEGMA non irradiato e irradiato

Le Figure 6.24, 6.25, 6.26 mostrano, invece, le misure di OD₆₂₀, OD₄₀₀ e pH condotte sui terreni di crescita in cui *P. fluorescens* è stato posto a contatto con soluzioni di fotoiniziatore a concentrazioni differenti (0.05%, 0.1% e 0.5%), sia che queste siano state usate tal quali che dopo essere state irradiate per 10 minuti. Il fotoiniziatore irradiato produce radicali liberi molto reattivi e questo test serve a verificare se la loro presenza possa compromettere la crescita microbica e/o la produzione di pioverdina.

Le misure di OD₆₂₀ (Figura 6.24) mostrano che dopo 24 ore la crescita microbica è inferiore nei casi in cui il BAPO-OH sia stato irradiato (linee continue), fenomeno probabilmente dovuto alla presenza di radicali nel sistema. Dal grafico è possibile osservare che, dopo 48 ore, si raggiunge la fase stazionaria di crescita in tutte le condizioni valutate. La produzione di pioverdina da parte dei microrganismi segue l'andamento della crescita microbica, con valori leggermente inferiori alle 24 ore per le colture contenenti il fotoiniziatore irradiato, per poi raggiungere valori comparabili in tutte le colture alle 48 ore (Figura 6.25). Infine, il consumo dei nutrienti, indicato dall'aumento del pH (Figura 6.26), non mostra particolari differenze tra i casi di irraggiamento e non irraggiamento.

I test condotti in terreno liquido hanno confermato i risultati precedenti delle prove su terreno solido, ovvero che i componenti del sistema polimerico, e delle fasi di fotoreticolazione non inibiscono la crescita di *P. fluorescens*, se non per un leggero rallentamento in fase di crescita esponenziale nel caso del fotoiniziatore irradiato. Inoltre, anche la produzione di pioverdina non ha subito inibizione, quindi il sistema polimerico e di polimerizzazione risulta compatibile con l'intrappolamento di *P. fluorescens* per lo sviluppo di un biosensore.

Questo risultato permette di procedere alla fase successiva delle prove, ovvero l'intrappolamento di *P. fluorescens* nell'idrogel, per valutare la possibilità di creare un idrogel biosensore a base di PEGDMA/PEGMA.

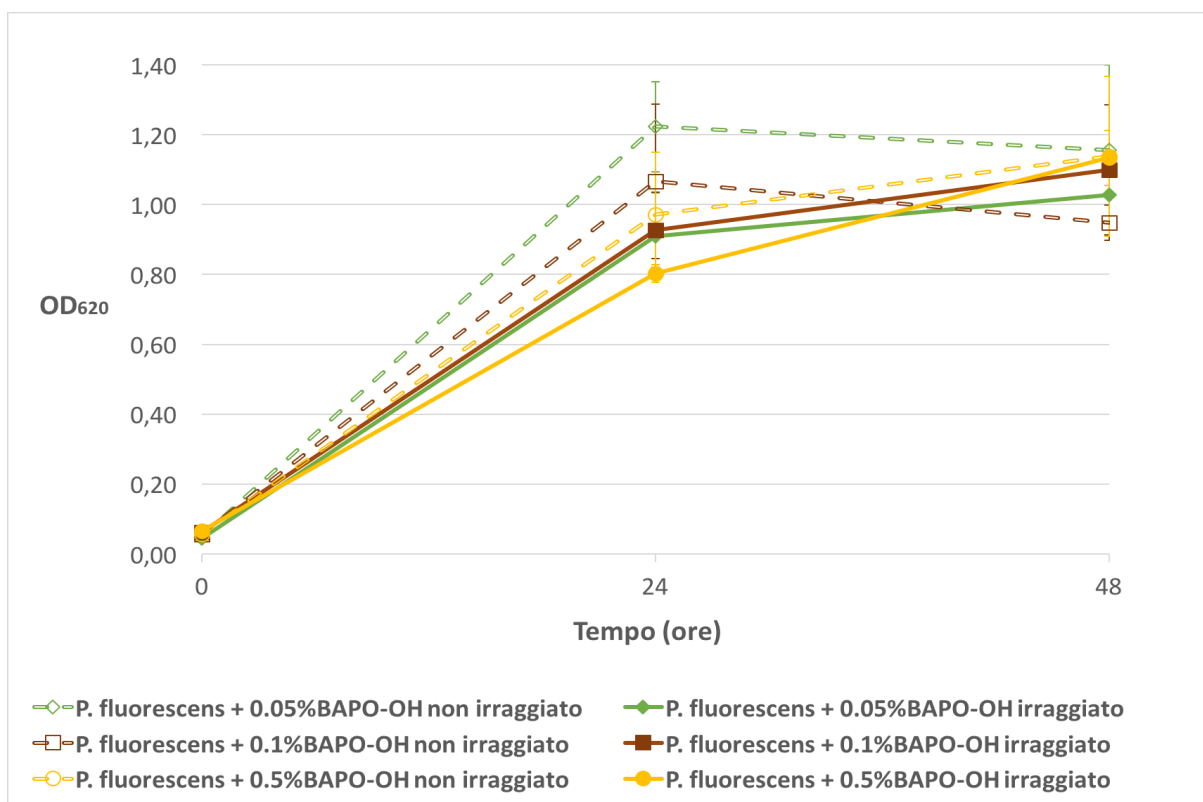


Fig. 6. 24: Misura di OD₆₂₀ del terreno di crescita di *P. fluorescens*, a contatto con BAPO-OH non irraggiato e irraggiato

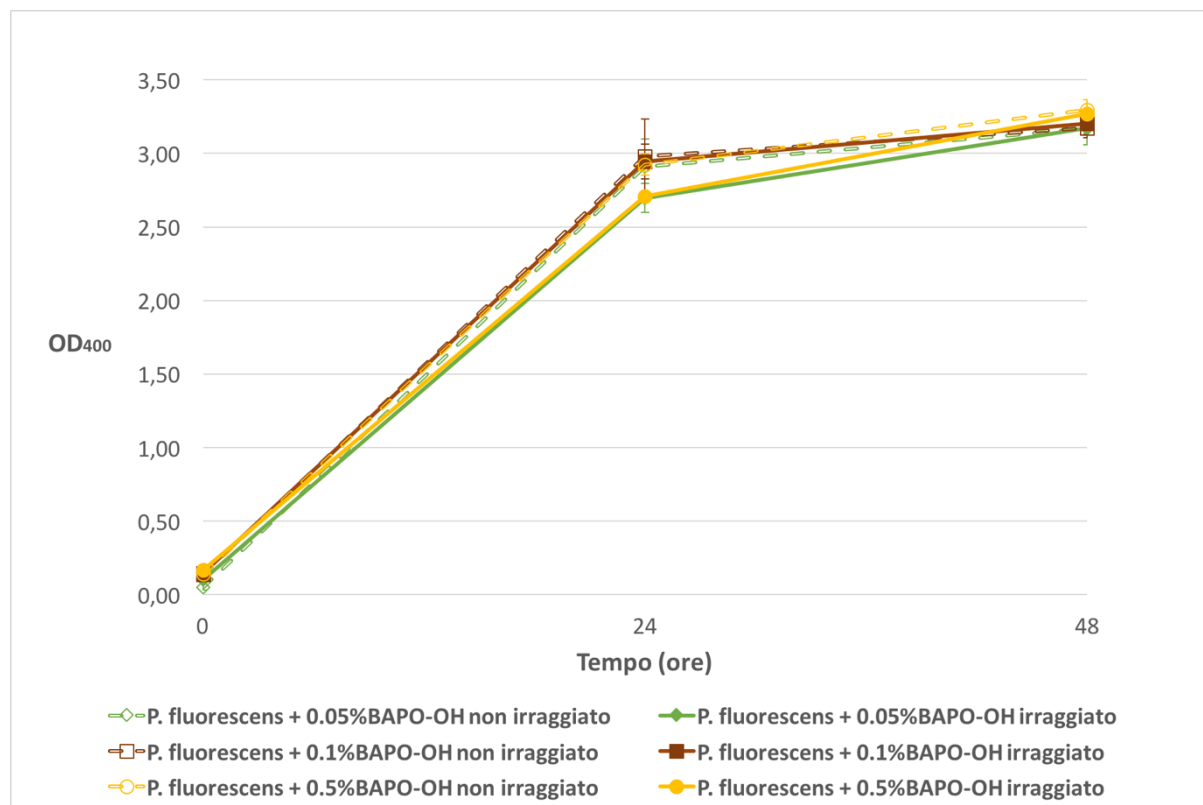


Fig. 6. 25: Misura di OD₄₀₀ del surnatante del terreno di crescita di *P. fluorescens*, a contatto con BAPO-OH non irraggiato e irraggiato

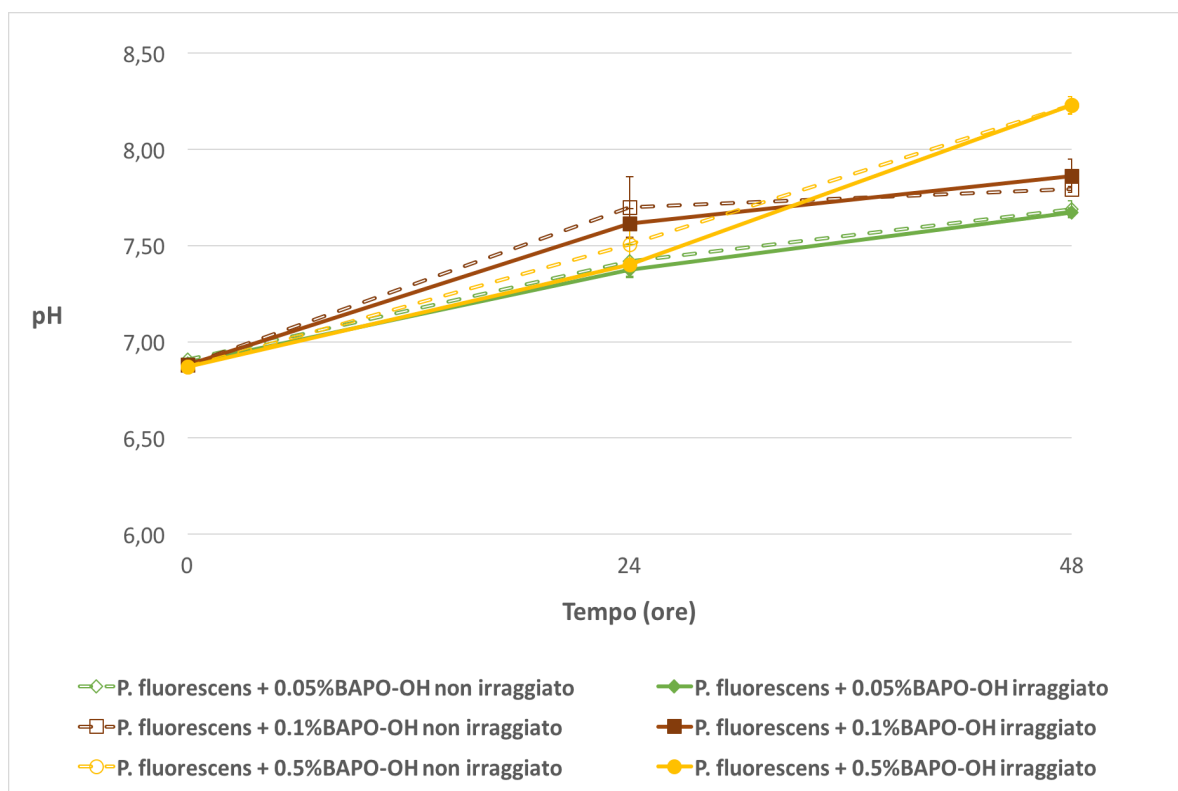


Fig. 6. 26: Misura del pH del terreno di crescita *P. fluorescens*, a contatto con BAPO-OH non irradiato e irradiato

Tabella 6. 6: Valori di OD e pH di *P. fluorescens* a contatto con una soluzione di BAPO-OH 0.05%

BAPO-OH 0.05%	Tempo 0	24 ore non irradiato	24 ore irradiato	48 ore non irradiato	48 ore irradiato
OD₆₂₀	0.05 ± 0.008	1.22 ± 0.129	0.91 ± 0.124	1.16 ± 0.244	1.03 ± 0.081
OD₄₀₀	0.05 ± 0.019	2.91 ± 0.189	2.70 ± 0.100	3.12 ± 0.011	3.17 ± 0.046
pH	6.91 ± 0.006	7.42 ± 0.085	7.37 ± 0.032	7.69 ± 0.043	7.67 ± 0.023

Tabella 6. 7: Valori di OD e pH di *P. fluorescens* a contatto con una soluzione di BAPO-OH 0.1%

BAPO-OH 0.1%	Tempo 0	24 ore non irradiato	24 ore irradiato	48 ore non irradiato	48 ore irradiato
OD₆₂₀	0.06 ± 0.002	1.06 ± 0.221	0.93 ± 0.108	0.95 ± 0.051	1.10 ± 0.186
OD₄₀₀	0.13 ± 0.002	2.98 ± 0.252	2.95 ± 0.118	3.17 ± 0.066	3.20 ± 0.072
pH	6.88 ± 0.001	7.70 ± 0.157	7.61 ± 0.077	7.79 ± 0.015	7.86 ± 0.085

Tabella 6. 8: Valori di OD e pH di *P. fluorescens* con una soluzione di BAPO-OH 0.5%

BAPO-OH 0.5%	Tempo 0	24 ore non irraggiato	24 ore irraggiato	48 ore non irraggiato	48 ore irraggiato
OD₆₂₀	0.06 ± 0.005	0.97 ± 0.178	0.80 ± 0.026	1.14 ± 0.229	1.13 ± 0.078
OD₄₀₀	0.14 ± 0.011	2.92 ± 0.072	2.71 ± 0.027	3.30 ± 0.067	3.27 ± 0.026
pH	6.87 ± 0.001	7.51 ± 0.100	7.40 ± 0.010	8.23 ± 0.044	8.23 ± 0.046

6.7.2 Caratterizzazione degli idrogeli contenenti *P. fluorescens*

Per le prove di intrappolamento di *P. fluorescens* in idrogeli, sono stati scelti due sistemi polimerici differenti, uno costituito al 100% da PEGDMA, l'altro con composizione 33%PEGDMA/67%PEGMA. In questo modo è stato possibile valutare l'intrappolamento in idrogeli caratterizzati da valori di densità di reticolazione rispettivamente di 2.21 e 0.70 mmol/cm³, che rappresentano il valore massimo e il valore minimo tra gli idrogeli testati. Una volta preparati e caratterizzati, gli idrogeli sono stati testati per l'effettivo intrappolamento in coltura in terreno liquido.

6.7.2.1 Fotoreologia degli idrogeli contenenti *P. fluorescens*

Come prova preliminare, si è tentato di fotopolimerizzare sistemi polimerici in presenza di *P. fluorescens*, per valutare l'effettiva fattibilità della polimerizzazione. Sono state utilizzate sospensioni di batteri a diversa concentrazione e corrispondenti a soluzioni con OD₆₂₀ pari a 10, 20 e 40. In apparenza, la fotoreticolazione in presenza dei microrganismi non ha presentato differenze rispetto al solo sistema polimerico. Per valutare meglio le differenze tra i due sistemi, la cinetica di reticolazione degli idrogeli in presenza di microrganismi è stata caratterizzata attraverso prove di fotoreologia.

In Figura 6.27 sono mostrate le curve G' in fotoreologia di idrogeli PEGDMA reticolati in presenza di 100phr di una sospensione di *P. fluorescens*.

Confrontando le curve degli idrogeli contenenti batteri rispetto alla curva dell'idrogelo con solo PEGDMA e PBS (curva viola) si osserva come nel caso di reticolazione in presenza di batteri il tempo di inizio della reazione sia di circa 70 secondi, mentre in assenza dei microrganismi si prolunga oltre i 100 secondi. Questo effetto potrebbe essere dovuto ad una partecipazione dei microrganismi al processo di reticolazione. Il meccanismo di intrappolamento risulterebbe in questo caso più forte ed efficace, ma al contempo più deleterio nei confronti dell'attività microbica.⁴

Queste curve hanno, inoltre, permesso di valutare che gli idrogeli, contenenti un'elevata quantità di microrganismi (OD₆₂₀ pari a 40 della sospensione batterica immobilizzata), non presentano un'eccessiva opacità e, conseguentemente, l'irraggiamento non è stato impedito da fenomeni di dispersione della luce. Grazie a questi risultati, per le prove di intrappolamento successive, si è scelto di utilizzare una sospensione di microrganismi con OD₆₂₀ pari a 40.

Confrontando poi la curva viola con il caso visto durante la caratterizzazione in fotoreologia, dell'idrogelo 100%PEGDMA reticolato in presenza di sola acqua, si osserva che in presenza di PBS la cinetica di reticolazione è più lenta.

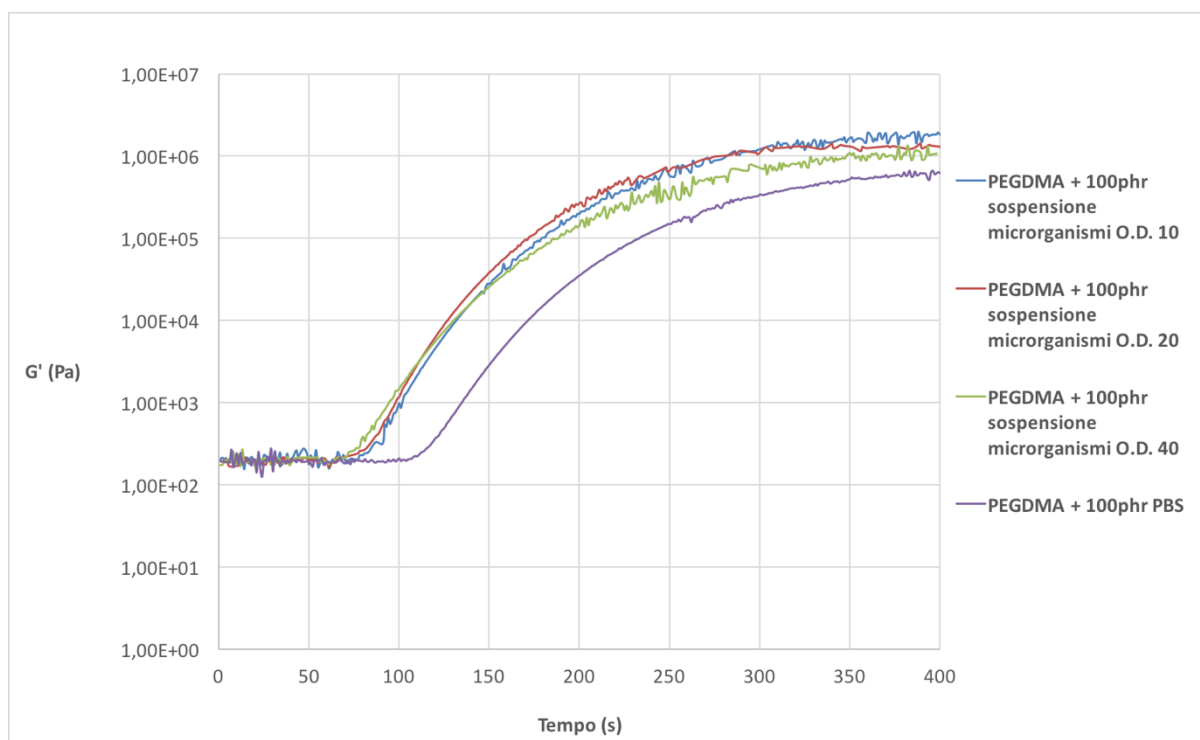


Fig. 6. 27: Fotoreologia degli idrogeli 100%PEGDMA in presenza di microrganismi

Lo stesso studio è stato condotto anche con idrogeli aventi composizione 33%PEGDMA/67%PEGMA e 100phr di sospensione di microrganismi, avente OD₆₂₀ pari a 10 e a 20.

Nella Figura 6.28 sono mostrate le curve reologiche di questo secondo tipo di idrogeli. In questo caso si osserva una cinetica decisamente più lenta rispetto al sistema polimerico 100%PEGDMA (Figura 6.27), con l'inizio della reticolazione dopo oltre 100 secondi, dal momento in cui è stata accesa la lampada, e il raggiungimento del plateau dopo circa 15 minuti. Invece, nel sistema 100%PEGDMA, l'inizio della reticolazione avviene dopo 10 secondi dall'accensione della lampada, e il plateau viene raggiunto dopo 6 minuti. La cinetica più lenta corrisponde a quanto già visto durante la caratterizzazione del materiale, ovvero che tra i sistemi polimerici valutati, quelli contenenti più monofunzionale hanno minore probabilità di formare un reticolo.

Infine, si osserva che i valori di G' al plateau sono paragonabili ai valori ottenuti durante la caratterizzazione degli idrogeli abiotici, cioè reticolati in presenza di sola acqua, dunque la presenza dei microrganismi non determina una significativa variazione delle proprietà meccaniche.

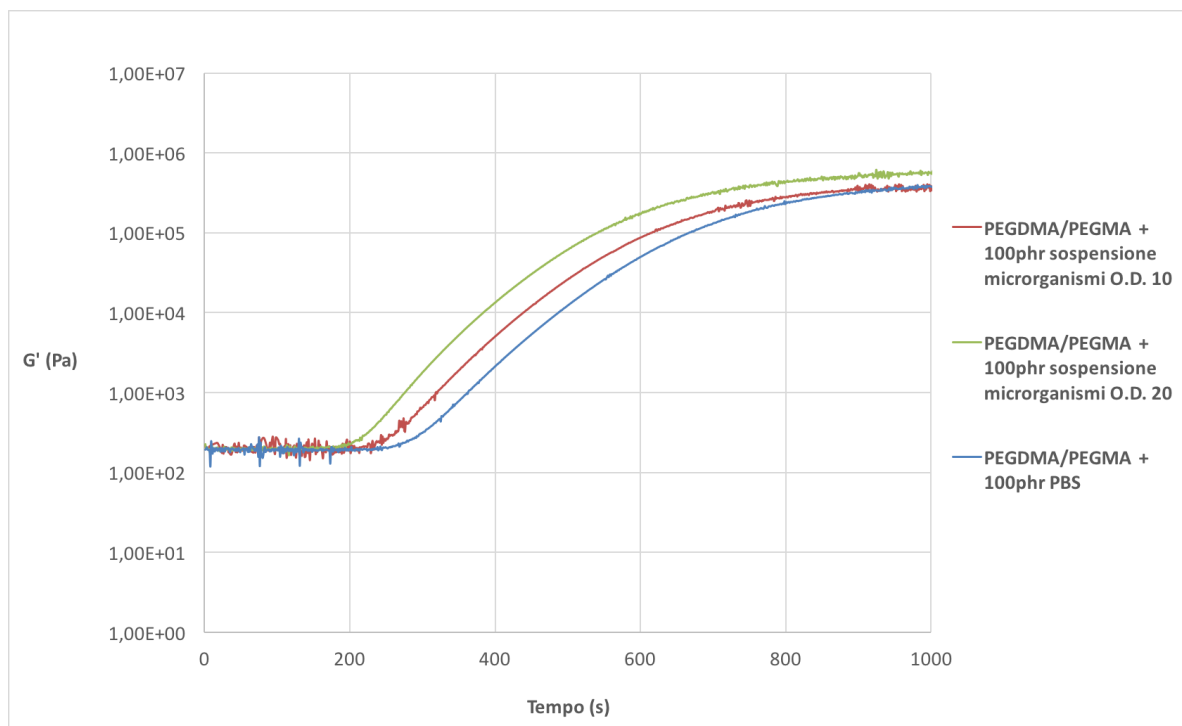


Fig. 6. 28: Fotoreologia degli idrogeli 33%PEGDMA/67%PEGMA in presenza di microrganismi

6.7.2.2 Analisi DMTA dei campioni contenenti *P. fluorescens*

L'analisi DMTA è stata usata anche per caratterizzare i reticoli ottenuti in presenza di *P. fluorescens*. In Figura 6.29 sono mostrati gli andamenti del modulo G' e della Tan delta per il reticolo con composizione 100%PEGDMA, ottenuto in presenza di una sospensione di batteri ($OD_{620}=40$).

Il modulo G' al plateau vetroso è pari a $1.94 \cdot 10^9$ Pa, invece al plateau gommoso vale $1.09 \cdot 10^7$ Pa; la transizione vetrosa in questo reticolo è posizionata intorno a -28.7 °C. I valori ottenuti sono dello stesso ordine di grandezza di quelli misurati sui campioni abiotici (G' vetroso = $2.15 \cdot 10^9$ Pa e G' gommoso = $5.56 \cdot 10^6$ Pa), tuttavia, si nota un leggero incremento rispetto ai valori di G' ottenuti dalle prove di DMTA per il reticolo 100%PEGDMA, reticolato in presenza di sola acqua, mentre la transizione vetrosa avviene nello stesso intervallo. Questo risultato potrebbe confermare l'ipotesi fatta discutendo la prova in fotoreologia, ossia che i microrganismi partecipino al meccanismo di reticolazione, e dunque che avvenga un intrappolamento per reticolazione; oppure potrebbe indicare che i microrganismi possono agire come filler rinforzante della matrice.

In Figura 6.30 sono invece mostrate le curve relative al campione con composizione 33%PEGDMA/67%PEGMA in presenza di microrganismi.

In questo caso, G' allo stato vetroso vale $1.60 \cdot 10^9$ Pa e allo stato gommoso $2.65 \cdot 10^6$ Pa; la transizione vetrosa avviene a circa -46.0 °C. Il reticolo più ampio, ottenuto in presenza di microrganismi, non differisce esageratamente nel comportamento meccanico dal caso abiotico (G vetroso = $2.28 \cdot 10^9$ Pa e G gommoso = $1.19 \cdot 10^6$ Pa) e questo potrebbe voler dire che l'intrappolamento per reticolazione sia meno efficace, rispetto al caso in cui si utilizzi solo bifunzionale, o che l'effetto di rinforzo sia meno evidente su una matrice più lasca.

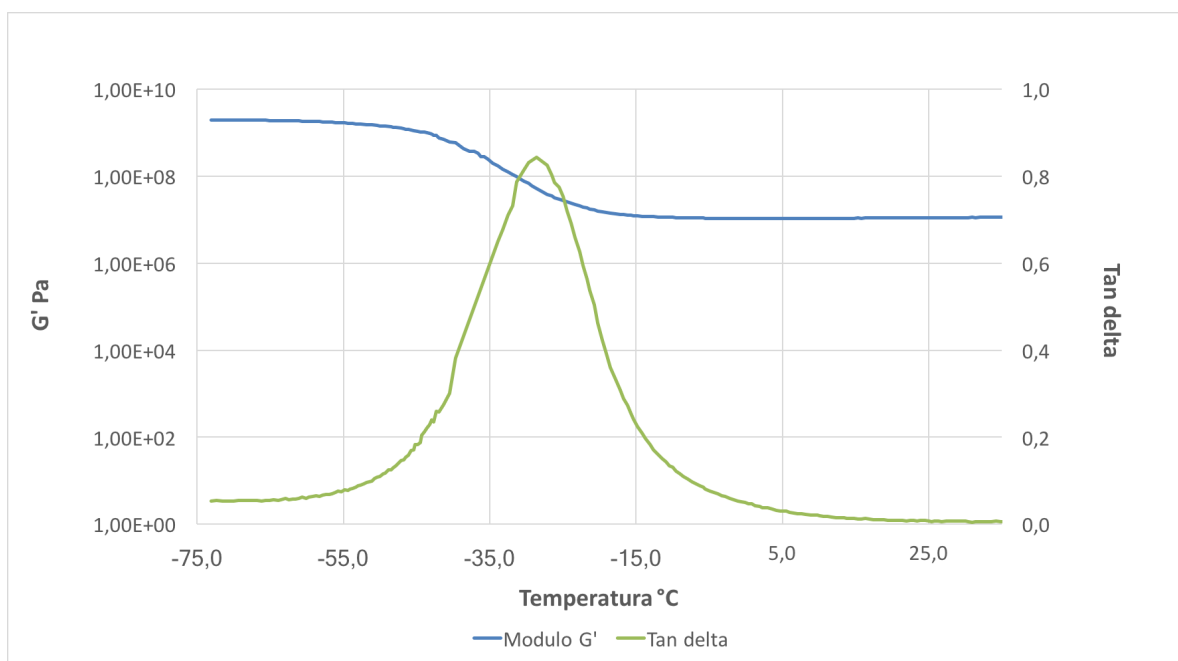


Fig. 6. 29: Andamenti di G' e Tan delta per il campione 100%PEGDMA reticolato in presenza di microrganismi

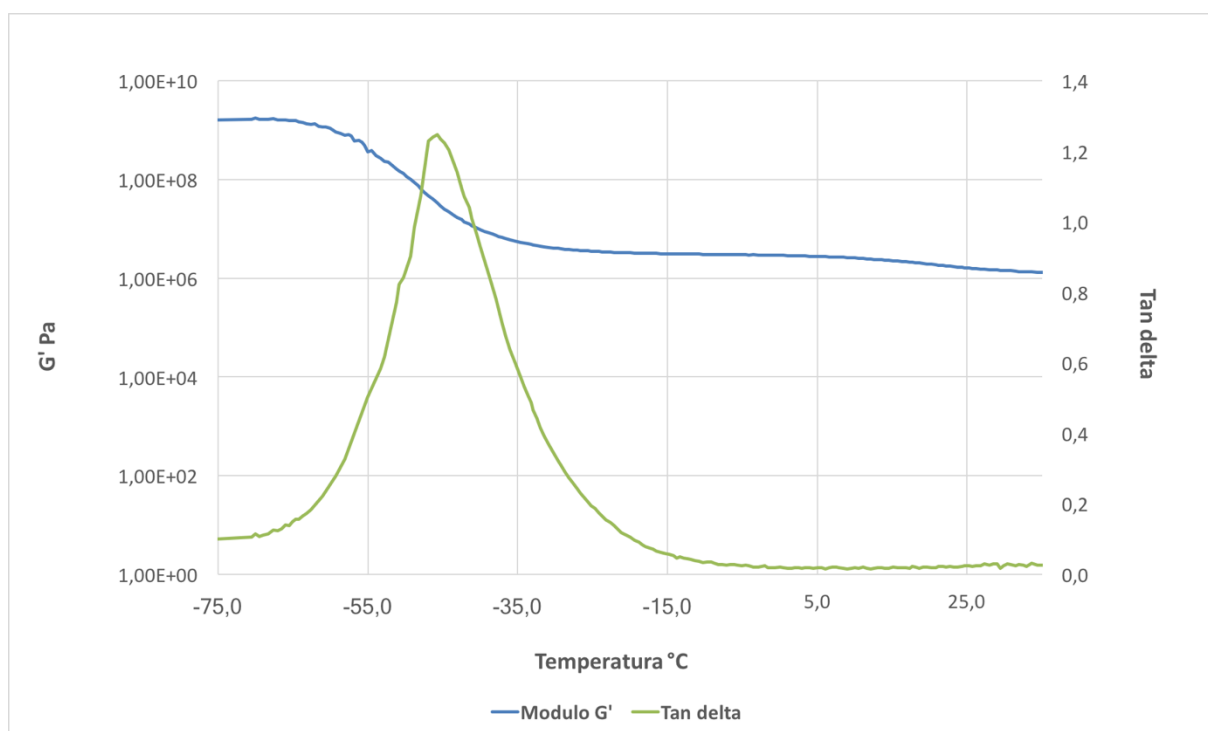


Fig. 6. 30: Andamenti di G' e Tan delta per il campione 33%PEGDMA/67%PEGMA reticolato in presenza di microrganismi

6.7.2.3 Immagini al microscopio

Gli idrogeli reticolati in presenza dei batteri sono stati osservati al microscopio ottico (obiettivo 60x).

L'idrogelo costituito al 100% da PEGDMA, indicato con A nella Figura 6.31, non mostra una struttura definita, ma si può osservare la presenza dei batteri, probabilmente presenti in superficie.

L'idrogelo costituito invece al 33% da PEGDMA e al 67% da PEGMA, indicato con B in Figura 6.31, mostra una configurazione a sacche e non è possibile distinguere i singoli microrganismi, come nell'altro caso.

Le trame dei due reticoli sono estremamente differenti, come già ci si aspettava valutando i risultati delle prove di caratterizzazione. L'idrogelo a maglia più larga osservato al microscopio mostra delle sacche, probabilmente dovute alla presenza della componente liquida nel materiale.

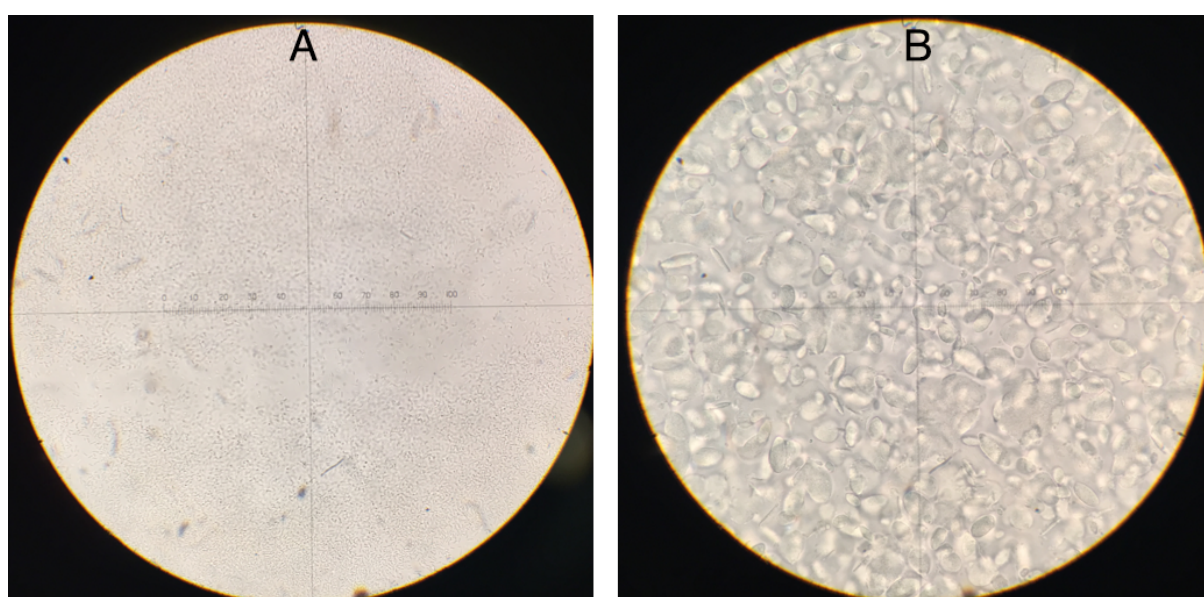


Fig. 6. 31: Immagini al microscopio ottico di un idrogelo 100%PEGDMA (A) e di un idrogelo 33%PEGDMA/67%PEGMA (B), contenenti i microrganismi

6.7.3 Prove di intrappolamento di *P. fluorescens*

Una volta caratterizzati gli idrogeli contenenti i microrganismi, questi sono stati inseriti in terreni di coltura liquidi M78, per valutare l'efficacia della tecnica di intrappolamento. Nella Figura 6.32 sono mostrati i valori di OD e pH dei terreni, al tempo 0, dopo 24 e dopo 48 ore (relativi all'idrogelo 100%PEGDMA a sinistra, e 33%PEGDMA/67%PEGMA a destra). Nello stesso grafico sono riportati i valori relativi al terreno contenente gli idrogeli abiotici utilizzati come controllo. Dai valori di OD₆₂₀ e OD₄₀₀ a 24 ore, relativi al terreno di coltura, è possibile osservare che non si è verificata crescita né produzione di piovverdina al di fuori degli idrogeli, e il pH è rimasto invariato rispetto al valore iniziale, 6.90. Al contrario, le misure effettuate a 48 ore, hanno evidenziato una crescita microbica e la presenza di piovverdina al di fuori dell'idrogelo; si nota altresì che i valori relativi all'idrogelo 33%PEGDMA/67%PEGMA sono più elevati (OD₆₂₀ = 1.09, OD₄₀₀ = 3.29), rispetto all'idrogelo costituito da solo PEGDMA (OD₆₂₀ = 0.65, OD₄₀₀ = 2.28). Questo comportamento è stato confermato dalle conte microbiche effettuate su terreno solido DSM1, nonostante in entrambi i casi il numero di colonie sia risultato superiore a 300 cfu/mL. Sono stati valutati anche i terreni di coltura dei controlli

abiotici, così da verificare eventuali modifiche sul terreno da parte del solo polimero. Come si vede in Figura 6.32, non si notano differenze né di OD né di pH.

Il risultato delle prove di crescita in coltura liquida conferma le informazioni ottenute durante la caratterizzazione degli idrogeli, ovvero che la presenza di monofunzionale riduce la densità di reticolazione e, conseguentemente, si ottengono maglie del reticolo più larghe e un intrappolamento dei microrganismi meno efficace. Da questa prova si può dedurre che, per entrambi i sistemi polimerici, l'intrappolamento non è totalmente efficace. In ogni caso, la sopravvivenza di *P. fluorescens* al processo di fotoreticolazione, la crescita e la produzione di pioverdina in coltura, sono da considerarsi un risultato estremamente positivo.

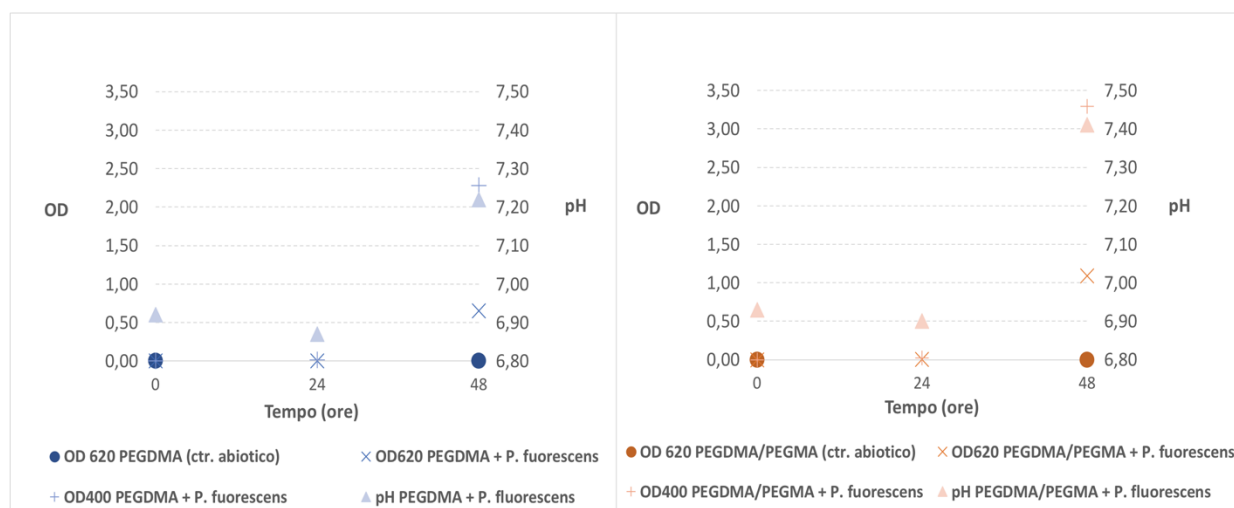


Fig. 6. 32: Misure di OD620, OD400 e pH dei terreni di coltura degli idrogeli contenenti microrganismi

6.7.3.1 Risultati delle prove di lavaggio degli idrogeli contenenti *P. fluorescens*

Considerata la fuoriuscita dei microrganismi nella prova precedente, sono stati condotti diversi lavaggi (un lavaggio da 10 minuti; 3 lavaggi da 5 minuti) al fine di individuare le condizioni ottimali per rimuovere eventuali microrganismi rimasti sulla superficie dell'idrogelo o non efficacemente intrappolati. I lavaggi sono stati effettuati con PBS e la soluzione utilizzata è stata in seguito piastrata su terreno DSM1.

Le piastre inoculate con prelievi dei lavaggi impiegati, non hanno mostrato una crescita significativa dopo 24 ore in nessuno dei casi analizzati. Questo risultato ha permesso di escludere la presenza di microrganismi liberi sulla superficie degli idrogeli, per cui si è scelto di adoperare un lavaggio in PBS (10 minuti) nelle successive prove di intrappolamento.

6.7.4 Prove di applicazione di *P. fluorescens* immobilizzato in idrogeli

Questi test sono stati condotti per due ragioni: innanzitutto per verificare che il batterio *P. fluorescens* anche in condizioni immobilizzate, sia in grado di rispondere alla concentrazione di ferro presente nel terreno di coltura e quindi possa essere utilizzato per lo sviluppo di un biosensore, in secondo luogo, per osservare il comportamento degli idrogeli contenenti i microrganismi per tempi superiori alle 48 ore.

6.7.4.1 Determinazioni sul terreno di coltura

Nella Figura 6.33 si mostrano le misure di OD₆₂₀ e OD₄₀₀ dei terreni di coltura del sistema idrogelo costituito al 100% da PEGDMA: anche in questa prova si osserva crescita batterica a 48 ore, per cui risulta evidente come l'idrogelo rilasci i microrganismi anche dopo essere stato lavato. Probabilmente si verifica una lenta migrazione verso l'esterno, dei microrganismi intrappolati nella parte più interna dell'idrogelo. Inoltre, si osserva che dopo 120 ore di coltura, si ha una diminuzione dei batteri nel terreno liquido, e questo potrebbe essere dovuto ad una mancanza di nutrienti. In particolare, il terreno privo di ferro, a 24 ore ha un valore di OD₆₂₀ pari a 0, a 48 ore 2.35, a 120 ore 1.17; invece per il terreno contenente ferro, l'OD₆₂₀ a 24 ore resta 0, a 48 ore vale 3.21, a 120 ore 1.93. Dai valori riportati è possibile osservare che il terreno contenente il ferro determina una maggiore crescita di microrganismi.

Non vengono mostrate le misure del pH, poiché è stato sperimentalmente verificato che i valori iniziali di pH non sono influenzati dalla presenza di ferro, mentre successivamente seguono un andamento simile a quello già riportato nelle prove precedenti, in cui si è registrata una crescita del microrganismo.

Confrontando le misure dell'OD₄₀₀ del surnatante, si osserva come la produzione di pioverdina sia inibita dalla presenza del ferro nel terreno (andamento in giallo), anche se a 48 e 120 ore il valore è diverso da 0: questo risultato potrebbe non essere dovuto alla presenza di pioverdina, ma ad un errore sperimentale nella separazione del surnatante dai microrganismi.

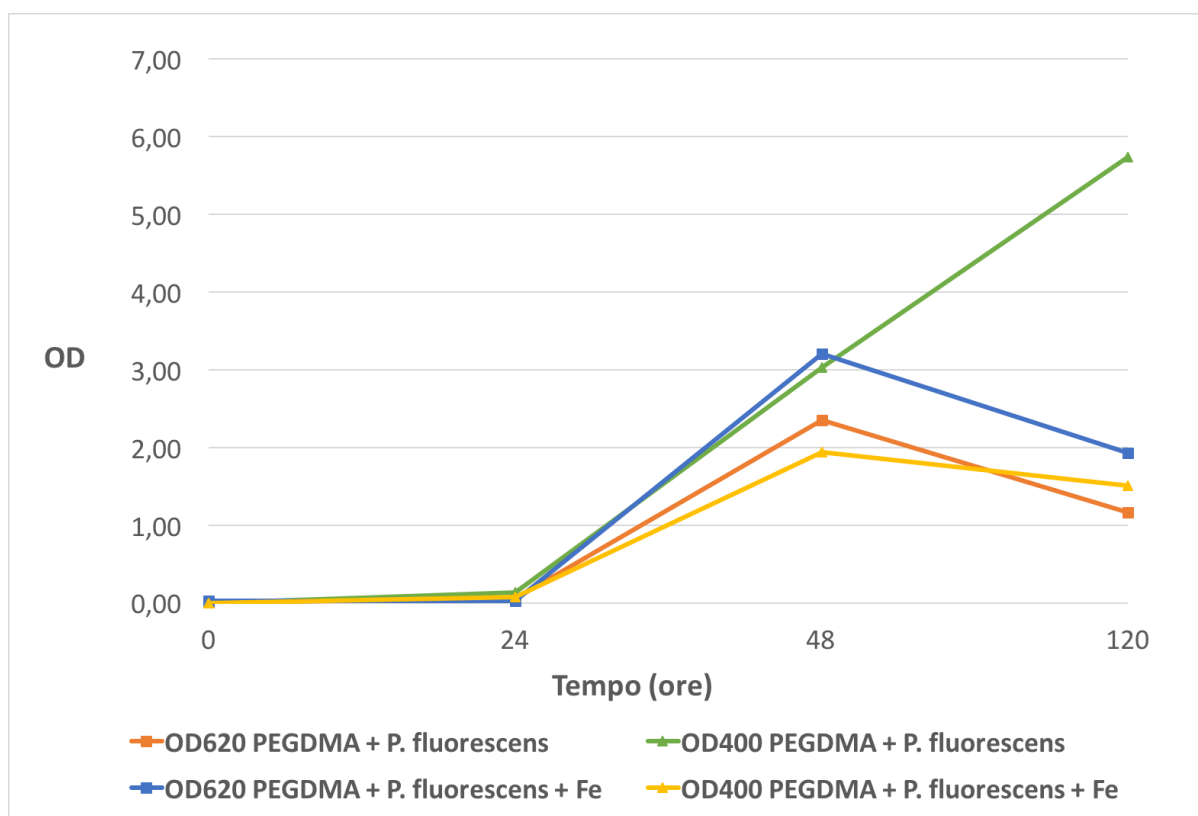


Fig. 6. 33: Misure di OD₆₂₀ e OD₄₀₀ dell'intrappolamento in un idrogelo di PEGDMA per testare il biosensore

Nella Figura 6.34 sono mostrate le misure condotte sui terreni di coltura utilizzati per gli idrogeli con composizione 33%PEGDMA/67%PEGMA: in questo caso, si osserva crescita batterica e produzione di pioverdina nel terreno di coltura già dopo 24 ore, per poi raggiungere un massimo a 48 ore. L'OD₆₂₀, nel caso in cui non sia presente ferro, vale 0.59 dopo 24 ore,

2.00 dopo 48 ore e si abbassa a 0.82 dopo 120 ore; nel caso in cui nel terreno sia presente ferro, alle 24 ore è 0.06, alle 48 ore 3.26 e dopo 120 ore 1.73. Questi valori indicano che anche in questo caso dopo 120 ore si ha una diminuzione della popolazione batterica nel terreno liquido, e che laddove sia presente il ferro la crescita batterica alle 48 ore è maggiore, rispetto al terreno privo di ferro. L'OD₄₀₀, nel caso in cui sia assente il ferro, vale 0.39 dopo 24 ore, 1.98 dopo 48 ore e 2.72 dopo 120 ore; nel caso in cui sia stato aggiunto FeCl₃ al terreno di coltura, l'OD₄₀₀ non suggerisce produzione di pioverdina, come atteso, e i valori nell'intorno di 1.00 a 48 e 120 ore sono nuovamente dovuti ad un'errata preparazione dei campioni.

La crescita batterica e la produzione di pioverdina già dopo 24 ore suggeriscono che il secondo tipo di idrogel rilascia più facilmente i microrganismi intrappolati.

Infine, per verificare l'effettivo rilascio dei microrganismi dall'idrogel nel terreno di coltura, i campioni prelevati ai diversi tempi (24, 48 e 120 ore) sono stati piastrati su terreno solido DSM1, con differenti diluizioni. In nessun caso è stato possibile procedere con la conta delle colonie, a causa dell'elevato numero di batteri presenti. In ogni caso, questo risultato è in accordo con quanto ottenuto con la determinazione della densità ottica, precedentemente riportata, e conferma quindi un rilascio dei microrganismi fin dalle prime ore di coltura.

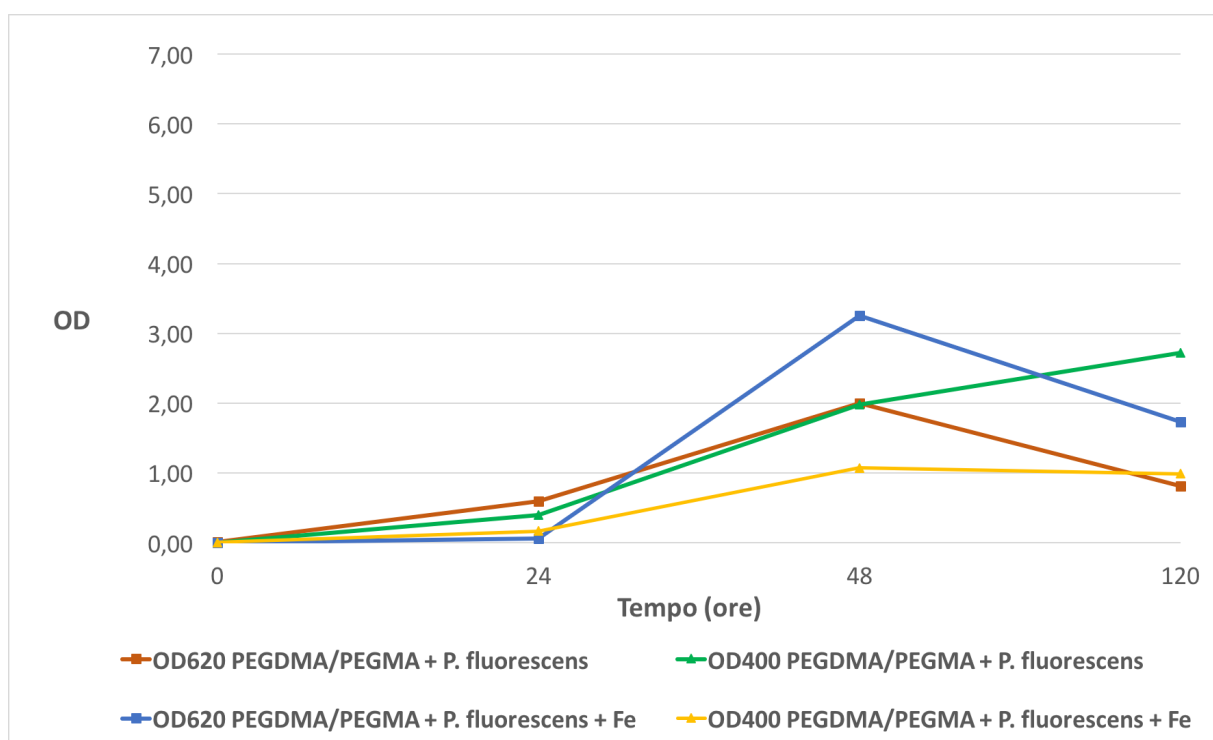


Fig. 6. 34: Misure di OD620 e OD400 dell'intrappolamento in un idrogel di PEGDMA/PEGMA per testare il biosensore

6.7.4.2 Determinazioni sugli idrogeli

Oltre alle misure di OD del terreno di crescita, è stata valutata la trasmittanza degli idrogeli all'UV-visibile, in modo da osservare se vi siano, nel tempo, riduzioni della trasparenza degli idrogeli contenenti i microrganismi: in tal caso si potrebbe affermare che vi sia stata crescita batterica anche all'interno dell'idrogel, con conseguente opacizzazione del materiale. Inoltre, nel caso della presenza di pioverdina all'interno del materiale reticolato si osserverebbe un picco negativo nello spettro di trasmittanza nell'intorno di 400 nm.

Nella Figura 6.35 si riportano gli spettri in trasmittanza ottenuti misurando gli idrogeli a base di PEGDMA contenenti i batteri, estratti sia dai terreni privi di ferro sia da quelli arricchiti di ferro. Si riporta anche lo spettro di un idrogel a base di solo polimero per confronto. Le curve tratteggiate, relative agli idrogeli messi a contatto con una fonte di ferro, mostrano una maggiore trasmittanza rispetto ai corrispondenti casi privi di ferro. Questo fenomeno potrebbe essere giustificato da una maggior tendenza dei microrganismi ad uscire dall'idrogel, attraverso un meccanismo chemiotattico, per raggiungere più facilmente il ferro, per cui la fuoriuscita determina una minore opacizzazione. La differenza tra le curve, tuttavia, può essere dovuta a condizioni diverse, nei differenti tempi, di temperatura, sensibilità dello strumento e anche anisotropia intrinseca degli idrogeli. Inoltre, nonostante gli idrogeli misurati ai diversi tempi dovrebbero essere tutti uguali, trattandosi di una dispersione di microrganismi all'interno del polimero, l'omogeneità può variare leggermente tra un idrogel e l'altro. Questo è particolarmente evidente se si considerano gli spettri acquisiti alle 24 ore, che non sembrano particolarmente concordi al trend degli altri idrogeli.

Infine nella Figura 6.36 sono mostrati gli spettri ottenuti dall'analisi in trasmittanza di idrogeli a base di PEGDMA/PEGMA. In questo caso, è evidente una diminuzione della trasmittanza nel tempo, nonché una differenza tra gli idrogeli messi a contatto con il ferro (linee tratteggiate) e quelli privi di ferro. Infatti, nel caso in cui sia presente ferro nel terreno, si ha probabilmente un effetto di richiamo per i microrganismi verso il terreno liquido, come osservato per l'idrogel 100%PEGDMA. Infine, nelle curve dei tempi T48 e T120, degli idrogeli in assenza di ferro, è osservabile un picco negativo a circa 400 nm, corrispondente all'assorbanza della pioverdina. Anche in questo caso, si registrano delle misure poco concordi: questo è particolarmente evidente se si considerano gli spettri acquisiti alle 24 ore. È probabile che ciò dipenda dalla scarsa omogeneità dei diversi idrogeli preparati, o dalle problematiche strumentali che possono aver inficiato la misura.

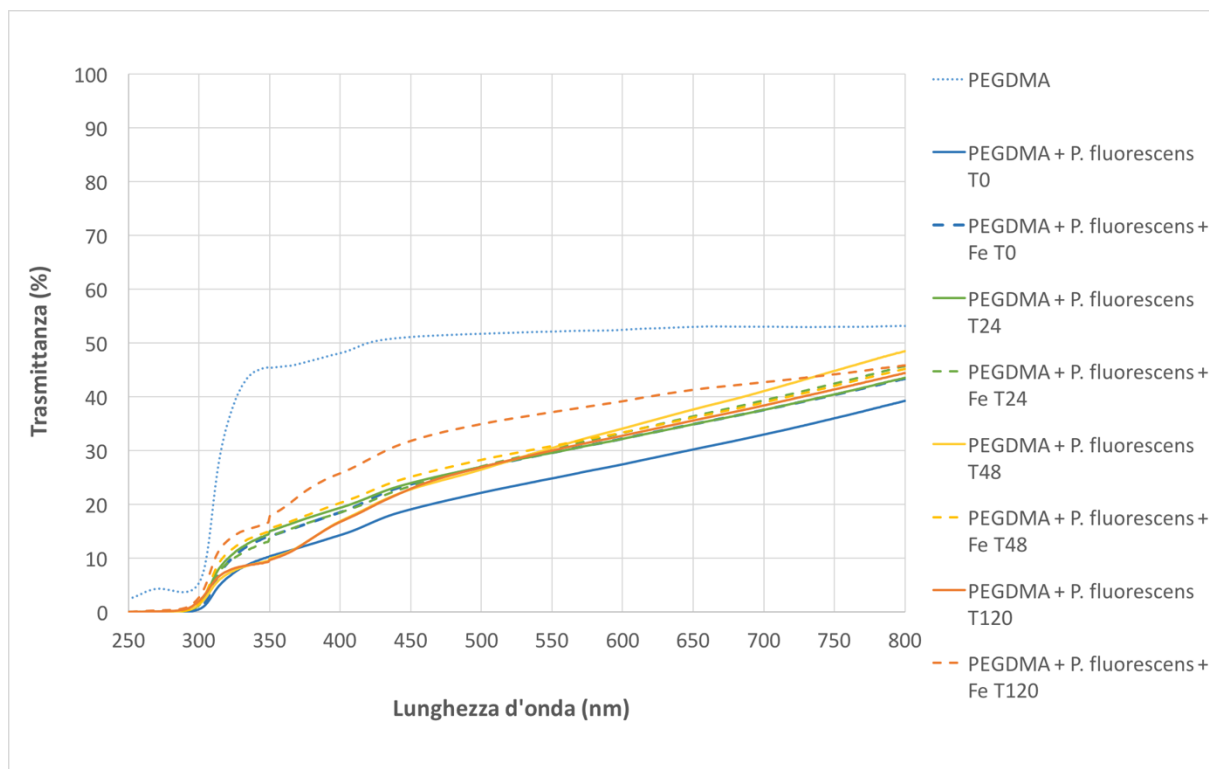


Fig. 6.35: Spettri UV-vis degli idrogeli a base di PEGDMA contenenti i microrganismi

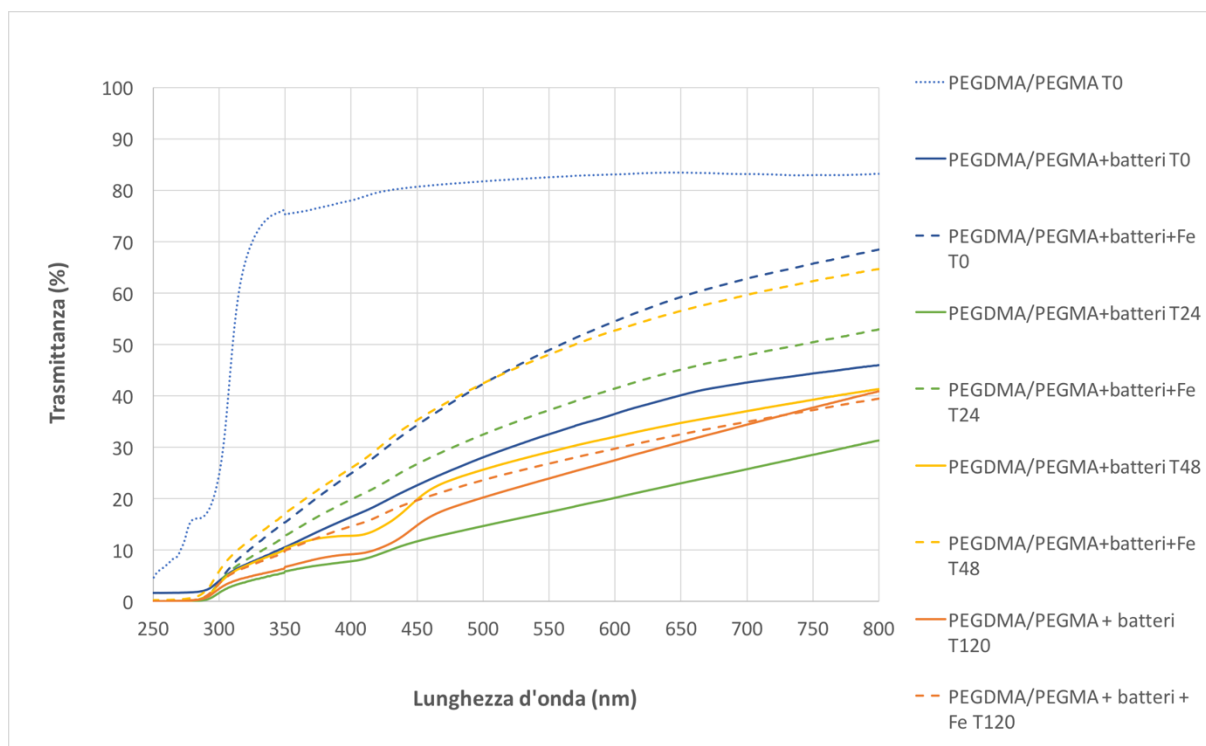


Fig. 6. 36: Spettri UV-vis degli idrogeli a base di PEGDMA/PEGMA contenenti i microrganismi

6.7.5 Valutazione della risposta alla variazione della concentrazione di ferro in coltura

In quest'ultima prova, gli idrogeli che sono stati per 120 ore a contatto con il ferro, e che non hanno mostrato produzione di pioverdina, sono stati inseriti in terreni freschi privi di ferro, mentre gli idrogeli che per 120 ore sono stati in un terreno privo di ferro, con conseguente produzione della pioverdina, sono stati inseriti in terreni freschi arricchiti di ferro. Le foto mostrate nella Figura 6.37 confermano la capacità del sistema di reagire al cambiamento delle condizioni, con l'inversione del comportamento dei batteri in conseguenza dell'inversione delle condizioni. Infatti, la risposta del sistema microbico immobilizzato al cambiamento delle condizioni di coltura (presenza/assenza di ferro nel terreno), determina l'attivazione della produzione di pioverdina in assenza di ferro e lo spegnimento in presenza di ferro. In Figura 6.37, i sistemi A e B corrispondono rispettivamente agli idrogeli 100%PEGDMA e 33%PEGDMA/67%PEGMA, inseriti per 120 ore in un terreno privo di ferro e successivamente posti in presenza di ferro; i sistemi C e D, invece, corrispondono rispettivamente agli idrogeli 100%PEGDMA e 33%PEGDMA/67%PEGMA, posti a contatto con una fonte di ferro per 120 ore, ed in seguito inseriti in un terreno privo di ferro. Dalle foto è possibile osservare che i sistemi A e B che in assenza di ferro hanno prodotto pioverdina, dopo 24 ore in un nuovo terreno arricchito di ferro si sono spenti, invece i sistemi C e D in un terreno senza ferro hanno iniziato a mostrare la produzione di pioverdina.

Quest'ultima prova conferma ulteriormente la possibilità di intrappolare i microrganismi all'interno del polimero, per lo sviluppo di un biosensore a base di *P. fluorescens*, nonostante servano ulteriori sforzi in tal senso, visti i risultati ottenuti dall'intrappolamento non totalmente efficace, sia per l'idrogelo 100%PEGDMA che quello con composizione 33%PEGDMA/67%PEGMA.

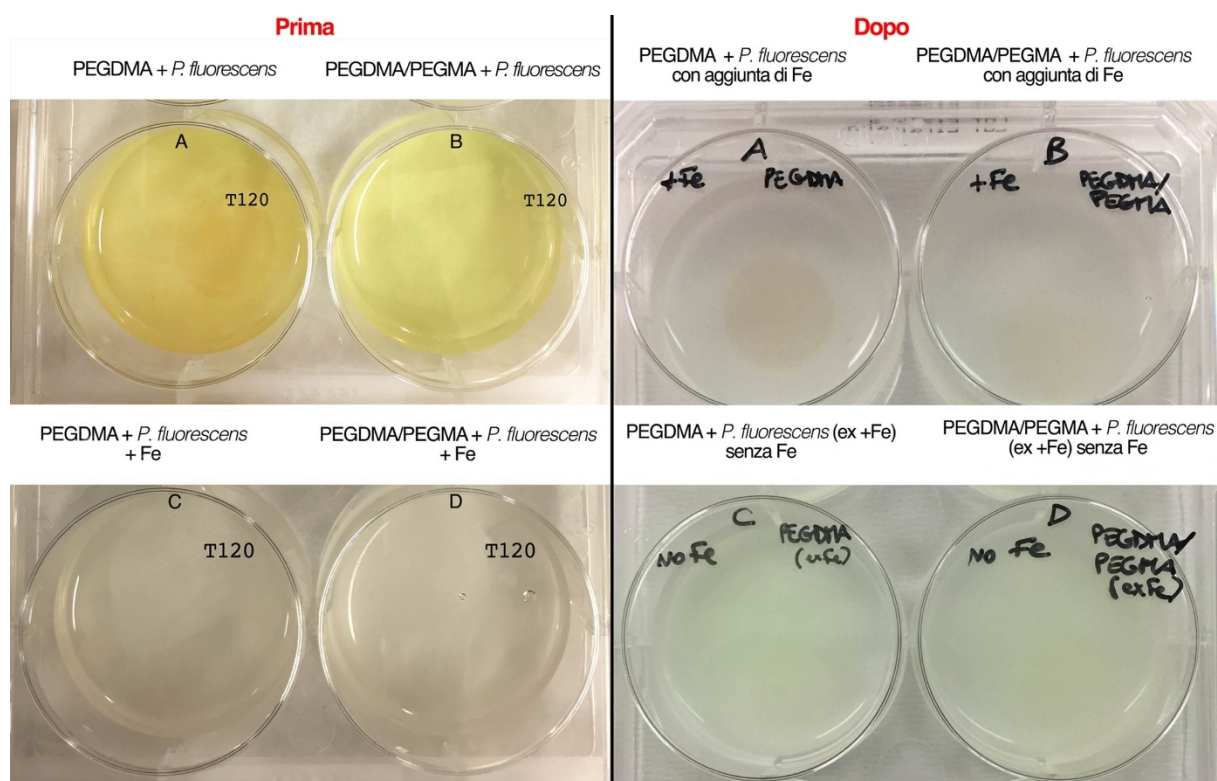


Fig. 6. 37: Foto degli idrogeli nei terreni liquidi, prima e dopo lo scambio delle condizioni

7. Conclusioni e prospettive

Lo studio sperimentale condotto durante questo lavoro di tesi ha fornito risultati interessanti e punti di riflessione per studi futuri; tuttavia è necessario migliorare il sistema testato per arrivare alla messa a punto di un biosensore vero e proprio.

La reticolazione di sistemi aventi tra loro differenti composizioni di bifunzionale (PEGDMA) e monofunzionale (PEGMA) ha permesso di creare reticoli con morfologia, proprietà meccaniche e capacità di rigonfiamento molto diverse. L'avvenuta reticolazione della matrice polimerica *in situ*, cioè in presenza di acqua, ha anche confermato la possibilità di reticolare gli idrogeli nelle fasi successive in presenza della sospensione acquosa di batteri (*P. fluorescens*). La reticolazione in presenza di microrganismi ha inoltre mostrato una cinetica più rapida rispetto alla reticolazione degli idrogeli in assenza di microrganismi, facendo ipotizzare una partecipazione dei batteri stessi nel meccanismo di fotopolimerizzazione.

I test di biocompatibilità hanno mostrato che *Pseudomonas fluorescens* non viene inibito dai componenti del sistema polimerico, né dal meccanismo di reticolazione. I batteri, infatti, hanno mostrato una crescita in tutte le condizioni testate e la produzione di piovverina laddove non è stato inserito il ferro. Questo risultato positivo dimostra che la fotoreticolazione con luce visibile, condotta in una soluzione acquosa con l'impiego del fotoiniziatore idrosolubile BAPO-OH, non è tossica per il batterio *P. fluorescens*, per cui questo può essere intrappolato in matrici a base di PEG fotoreticolate. Tuttavia, il meccanismo di intrappolamento provato in questo studio è risultato non completamente efficace, per entrambi i tipi di idrogeli impiegati (100%PEGDMA, 33%PEGMA/67%PEGMA), poiché i test condotti con gli idrogeli contenenti i microrganismi hanno mostrato crescita batterica al di fuori degli idrogeli stessi, nel terreno di coltura, nonostante sia la crescita che la produzione di piovverina da parte dei batteri sia avvenuta in ritardo, rispetto al caso dei batteri liberi nel terreno. Inoltre, nonostante siano necessarie ulteriori prove, è molto probabile che anche la crescita dei microrganismi intrappolati sia stata rallentata, in relazione alla velocità di diffusione dei nutrienti all'interno della matrice di intrappolamento (*mass transfer* interno).

Infine, è stata confermata l'efficacia di *P. fluorescens* come elemento sensibile: alcuni idrogeli con microrganismi intrappolati sono stati inseriti in terreni contenenti una fonte di ferro e, in questi casi, il batterio non ha prodotto la piovverina. A seguito dell'eliminazione della fonte di ferro, i batteri hanno ricominciato a produrre piovverina, confermando così il funzionamento dell'elemento sensibile seppure intrappolato.

Al fine di trattenere più efficacemente i microrganismi nel reticolo, sarebbe opportuno produrre degli idrogeli con una maggiore densità di reticolazione e, conseguentemente, con una minore dimensione delle maglie, eventualmente utilizzando pre-polimeri con catene più brevi. Inoltre, l'uso di analisi di spettroscopia elettronica, potrebbe aiutare a valutare se vi sia crescita all'interno dell'idrogelo, facendo un confronto tra le immagini acquisite in diversi tempi, permettendo una comprensione più elevata del sistema in uso.

In conclusione, uno studio più approfondito e l'introduzione di opportune modifiche, permetterebbero un'efficace applicazione del sistema indagato per lo sviluppo di un biosensore per l'analisi dei metalli in ambienti acquosi.

8. Bibliografia

1. Mishra A.K. and Mishra S.B., 2016, Biopolymer-Based Hydrogels for Decontamination for Organic Waste, in “*Polymeric Hydrogels as Smart Biomaterials*”, (Kalia S., Ed.). Springer Series on Polymer and Composite Materials, Springer Int. Publ. AG, Switzerland, pp. 171-186.
2. Rodriguez-Mozaz S., López de Alda M.J., Marco M.P. and Barceló D., 2004, Biosensors for environmental monitoring: A global perspective, *Talanta*, **65**, 291-297.
3. Buenger D., Topuz F. and Groll J., 2012, Hydrogels in sensing applications, *Progress in Polymer Science*, **37**, 1678-1719.
4. Lei Y., Chen W. and Muchandani A., 2006, Microbial biosensors, *Analytica Chimica Acta*, **568**, 200-210.
5. Polyak B., Bassis E., Novodvoretz A., Belkin S. and Marks R.S., Bioluminescent whole cell optical fiber sensor to genotoxics: system optimization, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **74**, 18-26.
6. Geldreich E.E., 2006, Pseudomonas, in “*Waterborne Pathogens - Manual of water supply practices*, M48, 2nd ed.”. American Water Works Association, Denver, Colorado, USA.
7. Karube I., Matsunaga T., Mitsuda S. and Suzuki S., 1977, Microbial electrode BOD sensors, *Biotechnology and Bioengineering*, **19**, 1535-1547.
8. Collings A.F. and Caruso F., 1997, Biosensors: recent advances, *Reports on Progress in Physics*, **60**, 1397.
9. Mishra S.B. and Mishra A.K., 2016, Polymeric Hydrogels: A Review of Recent Developments, in “*Polymeric Hydrogels as Smart Biomaterials*”, (Kalia S., Ed.). Springer Series on Polymer and Composite Materials, Springer Int. Publ. AG, Switzerland, pp. 1-17.
10. Venkatesh S., Saha J., Pass S. and Byrne M.E., 2008, Transport and structural analysis for controlled of molecular imprinted hydrogels drug delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **69**, 852-860.
11. Gibson I., Rosen D.W., Brent Stucker, Additive Manufacturing Technologies: Rapid Prototyping to Direct Digital Manufacturing, Springer Science + Business Media, LLC, New York, NY, USA.
12. Reiser A., 1989, *Photoreactive Polymers*. John Wiley & Sons, New York, pp. 1-21.
13. Beaman J.J., Barlow J.W., Bourell D.L., Crawford R.H., Marcus H.L. and McAlea K.P., 1997, *Solid freeform fabrication: a new direction in manufacturing*, Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.
14. Fouassier J.P., Allonas X. and Burget D., 2003, Photopolymerization reactions under visible lights: principle, mechanisms and examples of applications, *Progress in Organic Coatings*, **47**, 16-36.
15. Holman R., 1995, Modern UV inks: a novel shade of green, *European Coating Journal*, **9**, 610-612.

16. Masaki T., Yoshimura A., Iwanaga K. and Tanaka G., 1997, Photosensitive Conductive Paste, *IEMT/IMC Symposium*, 1st, Tokyo, Japan.
17. Pétillon N., Jézéquel J.Y. and André J.C., 1996, Color Stereophotolithography: A Method of 3-D Color Imaging, *Journal of Imaging Science and Technology*, **8**, 42-49.
18. Hubbell J.A., Pathak C.P., Sawhney A.S., Desai N.P. and Hill J.L., 1995, US Patent 5410016.
19. Hertzberg S., Moen E., Vogelsang C. and Østgaard K., 1995, Mixed photo-cross-linked polyvinyl alcohol and calcium-alginate gels for cell entrapment, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **43** (1), 10-17.
20. Odian, 2004, Radical chain polymerization, in “*Principles of Polymerization*”, Chap. 3. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA. pp. 103-118.
21. Jacobs P.F., 1992, *Rapid prototyping & manufacturing, fundamentals of stereolithography*. Society of Manufacturing Engineers, New York, NY, USA.
22. Pappas S.P., 1992, *Radiation Curing: Science and Technology*, Springer Science + Business Media, LLC, New York, NY, USA.
23. Bolgiano N.C. and Sigman W.T., 1983, U.S. Patent 4, 421, 782.
24. Crivello J.V. and Dietliker K., 1998, Photoinitiators for free radical, cationic & anionic photo-polymerisation, in “*Chemistry & Technology of UV & EB formulation for coatings, inks & paints*”. (Bradley G., Ed.) John Wiley & Sons, Chichester & New York, NY, USA.
25. Tanaka T., 1978, Collapse of gels and the critical end point, *Physical Review Letters*, **40**, 820-823.
26. Shibavama M. and Tanaka T., 1993, Phase transition and related phenomena of polymer gels, *Advanced Polymer Science*, **109**, 1-62.
27. Hoffman A.S., 2002, Hydrogels for biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **54**, 3-12.
28. Peppas N.A., Bures P. and Leobandung W., Ichikawa H., 2000. Hydrogels in pharmaceutical formulations, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **50**, 27-46.
29. Kamath K. and Park K., 1993, Biodegradable hydrogels in drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **11**, 59-84.
30. Agarwal S., Greiner A. and Wendorff J.H., 2009, Electrospinning of manmade and biopolymer nanofibers: Progress in techniques, materials and applications, *Advanced Functional Materials*, **19**, 2863-2879.
31. Peppas N.A., Hilt J.Z. and Khadem Hosseini A., 2006, Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology, *Advanced Materials*, **18**, 1345-1360.
32. Wiese K.G., Heinemann D.E.H., Ostermeier D. and Peters J.H., 2001, Biomaterial properties and biocompatibility in cell culture of a novel self-inflating hydrogel tissue expander, *Journal of Biomedical Materials Research*, **54**, 179-188.
33. Sperinde J.J. and Griffith L.G., 1997, Synthesis and characterization of enzymatically-crosslinked-poly (ethylene glycol) hydrogels, *Macromolecules*. **30**, 5255-5264.

34. Chung H.J. and Park T.G., 2007, Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **59**, 249-262.
35. Aminabhavi T.M. and Deshmukh A.S., 2016, Polysaccharide-Based Hydrogels as Biomaterials, in “*Polymeric Hydrogels as Smart Biomaterials*”, (Kalia S., Ed.). Springer Series on Polymer and Composite Materials, Springer Int. Publ. AG, Switzerland, pp. 45-71.
36. Yamada T. and Kawasaki T., 2005, Microbial synthesis of hyaluronan and chitin: new approaches, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **99**, 521-528.
37. Hou S., Tian W., Xu Q., Cui F., Zhang J., Lu Q. and Zhao C., 2006, The enhancement of cell adherence and inducement of neurite outgrowth of dorsal root ganglia co-cultured with hyaluronic acid hydrogels modified with Nogo-66 receptor antagonist in vitro, *Neuroscience*, **137**, 519-529.
38. Girish K.S. and Kemparaju K., 2007, The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview, *Life Sciences*, **80**(21), 1921-1943.
39. Lin C.M., Lin J.W., Chen Y.C., Shen H.H., Wei L., Yeh Y.S., Chiang Y.H., Shih R., Chiu P.L., Hung K.S., Yang L.Y. and Chiu W.T., 2009, Hyaluronic acid inhibits the glial scar formation after brain damage with tissue loss in rats, *Surgical Neurology*, **72**(2), 50-54.
40. Özgenel G.Y., 2003, Effects of hyaluronic acid on peripheral nerve scarring and regenerations in rats, *Microsurgery*, **23**, 575-581.
41. Purcell B.P., Elser J.A., Mu A., Margulies K.B. and Burdick J.A., 2012, Synergistic effects of SDF-1 α chemokine and hyaluronic acid release from degradable hydrogels on directing bone marrow derived cell homing to the myocardium, *Biomaterials*, **33** (31), 7849-7857.
42. Abou Neel E.A., Bozec L., Knowles J.C., Syed O., Mudera V., Day R and Hyun J.K., 2012, Collagen — Emerging collagen based therapies hit the patient, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **65**, 429-456.
43. Ferreira A.M., Gentile P., Chiono V., Ciardelli G., 2012, Collagen for bone tissue regeneration, *Acta Biomaterialia*, **8**, 3191-3200.
44. Alesa Gyles D., Diniz Castro L., Carrera Silva Jr. J.O., Riberio-Costa R.M., 2017, A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations, *European Polymer Journal*, **88**, 373-392.
45. Ricard-Blum S., 2011, The Collagen Family, Cold Spring Harbour Perspectives in Biology, **3**, 1-19.
46. Chattopadhyay S. and Raines R.T., 2014, Review collagen-based biomaterials for wound healing, *Biopolymers*, **101**, 821-833.
47. Rutz A.L. and Shah R.N., 2016, Protein-Based Hydrogels, in “*Polymeric Hydrogels as Smart Biomaterials*”, (Kalia S., Ed.). Springer Series on Polymer and Composite Materials, Springer Int. Publ. AG, Switzerland, pp.73-104.
48. Hassan C.M. and Peppas N.A., 2000, Structure and applications of polyvinyl alcohol hydrogels produced conventional cross-linking or by freeze/thawing method, *Advanced Polymer Science*, **153**, 37-65.
49. Killion J.A., Geever L.M., Devine D.M., Kennedy J.E. and Higginbotham C.L., 2011, Mechanical properties and thermal behaviour of PEGDMA hydrogels for potential bone

- regeneration application, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, **4**, 1219-1227.
50. Zhang X., Yang Y., Yao J., Shao Z. and Chen X., 2014, Strong collagen hydrogels by oxidized dextran modification, *ACS Sustainable Chemical Engineering*, **2**, 1318-1324.
 51. Qu B., Chen C., Qian L., Xiao H. and He B., 2014, Facile preparation of conductive composite hydrogels based on sodium alginate and graphite, *Materials Letters*, **137**, 106-109.
 52. Chang C.W., Van Spreeuwel A., Zhang C. and Varghese S., 2010, PEG/Clay nanocomposite hydrogel: a mechanically robust tissue engineering Scaffold, *Soft Matter*, **6**, 5157–5164.
 53. Wang J., Chiappone A., Roppolo I., Shao F., Fantino E., Lorusso M., Rentsch D., Dietliker K., Pirri C.F. and Grützmacher H., 2018, All-in-One Cellulose Nanocrystals for 3D Printing of Nanocomposite Hydrogels, *Angewandte Chemie Int. Ed.*, **57**, 1-5.
 54. Baroli B., 2006, Photopolymerization in drug delivery, tissue engineering and cell encapsulation: issues and potentialities, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **81**, 491-499.
 55. Kimura M., Fukumoto K. and Watanabe J., 2004, Hydrogen-bonding-driven spontaneous gelation of water-soluble phospholipid polymers in aqueous medium, *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, **15**, 631-644.
 56. Stenekes R.J., Talsma H. and Hennink W.E., 2001, Formation of dextran hydrogels by crystallization, *Biomaterials*, **22**, 1891-1898.
 57. Satish C.S., Satish K.P. and Shivakumar H.G., 2006, Hydrogels as controlled drug delivery systems: synthesis, cross-linking, water and drug transport mechanism, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **68**, 133-140.
 58. Hennink W.E. and Van Nostrum C.F., 2002, Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **54**, 13-36.
 59. Zhang Y., Zhu W. and Ding J., 2005, Preparation of thermosensitive microgels via suspension polymerization using different temperature protocols, *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, **75**, 342-349.
 60. De Nooy A.E.J., Capitani D. and Masci G., 2000, Ionic polysaccharide hydrogels via the Passerini and Ugi multicomponent condensations: synthesis, behavior and solid-state NMR characterization, *Biomacromolecules*, **1**, 259-267.
 61. Mather B.D., Viswanathan K., Miller K.M. and Long T.E., 2006, Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies, *Progress in Polymer Science*, **31**, 487-531.
 62. Zheng Shu X., Liu Y., Palumbo F.S., Luo Y. and Prestwich G.D., 2004, In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering, *Biomaterials*, **25**, 1339-1348.
 63. Moses J.E. and Moorhouse A.D., 2007, The growing applications of click chemistry, *Chemical Society Reviews*, **36**, 1249-1262.
 64. Elisseeff J., Anseth K., Sims D., McIntosh W., Randolph M. and Langer R., 1999, Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 3104-3107.

65. Khan S., Ullah A., Ullah K. And Rehman N., 2016, Insight into hydrogels. *Designed Monomers and Polymers*, **19**(5), 456-478.
66. Lim D.W., Nettles D.L. and Setton L.A., 2007, Rapid crosslinking of elastin-like polypeptides with (hydroxymethyl) phosphines in aqueous solution, *Biomacromolecules*, **8**, 1463-1470.
67. Yokoyama F., Masada I. and Shimamura K., 1986, Morphology and structure of highly elastic poly (vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing and melting, *Colloid and Polymer Science*, **264**, 595-601.
68. Tavakoli J., Jabbari E. and Etrati Khorsoshahi M., 2006, Swelling characterization of anionic acrylic acid hydrogel in an external electric field, *Iranian Polymer Journal*, **15**, 891-900.
69. Nguyen K.T., West J.L., 2002, Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications, *Biomaterials*, **23**, 4307-4314.
70. Bäckström S., Benavente J., Berg R.W., Stibius K., Larsen M.S., Bohr H. and Hélix-Nielsen C., 2012, Tailoring properties of Biocompatible PEGDMA Hydrogels with UV Light, *Materials Sciences and Applications*, **3**, 425-431.
71. Hwang J.W., Noh S.M., Kim B. and Jung H.W., 2015, Gelation and crosslinking characteristics of photopolymerized poly(ethylene glycol) hydrogels, *Wiley Periodicals, Inc. J. Appl. Polym. Sci*, **132**, 41939.
72. Schmocker A., Khoushabi A., Schizas C., Bourban P.-E., Pioletti D.P. and Moser C., 2015, Miniature probe for the delivery and monitoring of a photopolymerizable material, *Journal of Biomedical Optics*, **20** (12), 127001.
73. Hulanicki A., Glab S. and Ingman F., 1991, Chemical sensors definitions and classification, *Pure and Applied Chemistry*, **63**, 1247-1250.
74. Thevenot D.R., Toth K., Durst R.A. and Wilson G.S., 1999, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification - (Technical Report), *Pure and Applied Chemistry*, **71**, 2333-2348.
75. Lowe C.R., 2007, Overview of Biosensor and Bioarray Technologies, in "*Handbook of Biosensors and Biochips*", Chap. 1. John Wiley & Sons.
76. Mohanty S.P. and Kougiannos E., 2006, Biosensors: a tutorial review, *IEEE Potentials*, **278**, 35-40.
77. Clark L.C., Lyons C., 1962, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **102**, 29-45.
78. Severinghaus, J.W. and Astrup P.B., 1986, History of blood gas analysis. IV. Leland Clark's oxygen electrode, *Journal of clinical monitoring*, **2** (2), 125-139.
79. Lowe C.R., 1985, An introduction to the concepts and technology of biosensors, *Biosensors*, **1**, 3-16.
80. Frew J. and Hill H.A.O., 1987, Electrochemical biosensors, *Analytical Chemistry*, **59**, 933-944A.
81. IUPAC, 1997, *Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*, (McNaught A.D. and Wilkinson A.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
82. Scheller F., Schubert F., Pfeiffer D., Hintsche R., Dransfeld I., Renneberg R., Wollenberger U., Reidel K., Pavlova M., Kuhn M., Muller H.G., Tan P.M., Hoffmann

- W. and Moritz W., 1989, Research and development of biosensors. *The Analyst*, **114**, 653-662.
83. Rechnitz G.A. and Ho M.Y., 1990, Biosensors based on cell and tissue material, *Journal of Biotechnology*, **15**, 201-218.
 84. Monk D.J. and Walt D.R., 2004, Optical fiber-based biosensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **379**, 931-945.
 85. Lippa P.B., Sokoll L.J. and Chan D.W., 2001, Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry, *Clinica Chimica Acta*, **314**, 1-26.
 86. Laschi S., Franek M. and Mascini M., 2000, Screen-printed electrochemical immunosensors for PCB detection, *Electroanalysis*, **12**, 1293-1298.
 87. Carrigan S.D., Scott G. and Tabrizian M., 2005, Real-time QCM-D immunoassay through oriented antibody immobilization using cross-linked hydrogel biointerfaces, *Langmuir*, **21**, 5966–5973.
 88. Seong G.H., Zhan W. and Crooks R.M., 2002, Fabrication of microchambers defined by photopolymerized hydrogels and weirs within microfluidic systems: application to DNA hybridization, *Analytical Chemistry*, **74**, 3372-3377.
 89. O’Sullivan C.K., 2002, Aptasensors—the future of biosensing?, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **372**, 44-48.
 90. Lee M. and Walt D.R., 2000, A fiber-optic microarray biosensor using aptamers as receptors, *Analytical Biochemistry*, **282**, 142-146.
 91. Stojanovic M.N., De Prada P. and Landry D.W., 2001, Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine, *Journal of the American Chemical Society*, **123**, 4928-4931.
 92. Ramström O. and Ansell R.J., 1998, Molecular imprinting technology: challenges and prospects for the future, *Chirality*, **10**, 195-209.
 93. Kahn K. and Plaxco K.W., 2010, Principles of biomolecular recognition, in “*Recognition receptors in biosensors*”, (Zourob M., Ed.). Heidelberg, Springer, pp. 3-45.
 94. Gerard M., Chaubey A. and Malhotra B.D., 2002, Application of conducting polymers to biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, **17**, 345-359.
 95. Kane R.S., Takayama S., Ostuni E., Ingber D.E. and Whitesides G.M., 1999, Patterning proteins and cells using soft lithography, *Biomaterials*, **20**, 2363-2376.
 96. Sim K.W., 1991, Bioelectrochemical detection of three alcohols based on a conducting organic salt electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, **6**, 317-323.
 97. Sandifer J.R. and Voycheck J.J., 1999, A review of biosensor and industrial applications of pH-ISFETs and an evaluation of Honeywell’s “DuraFET”, *Microchimica Acta*, **131**, 91-98.
 98. Liley M., 2002, Optical Transducers, in “*Biomolecular Sensors*”, (Gizeli E. and Lowe C.R., Eds). Taylor & Francis, London, pp. 123-175.
 99. Gauglitz G., 2005, Direct optical sensors: principles and selected applications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **381**, 141-155.

100. Brecht A. and Gauglitz G., 1997, Recent developments in optical transducers for chemical or biochemical applications, *Sensors and Actuators B*, **38 - 39**, 1-7.
101. Lin V.S.-Y., Motessharei K., Dancil K.-P. S., Sailor M. J. and Ghadiri M. R., 1997, A porous silicon-based optical interferometric biosensor, *Science*, **278**, 840-843.
102. Gizeli E., 2002, Acoustic Transducers, in “*Biomolecular Sensors*”, (Gizeli E. and Lowe C.R., Eds). Taylor & Francis, London, pp. 176-206.
103. Sauerbrey G., 1959, Use of a quartz vibrator for weighing thin layers on a microbalance, *Zeitschrift fur Physik*, **155**, 206-222.
104. Kanazawa K.K. and Gordon J.G., 1985, The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with a liquid, *Analytica Chimica Acta*, **157**, 99-105.
105. Cooper A., Thermodynamic analysis of biomolecular interactions, 1999, *Current Opinion in Chemical Biology*, **3**, 557-563.
106. Hoh J.H., Hillner P.E. and Hansma P.K., 1994, Measuring the streptavidin-biotin binding force, *Proceedings of the Micrological Society of America*, **52**, 1054-1055.
107. Davis F., Collyer S.D. and Higson S.P.J., 2007, Overview of Modern Analytical Needs, in “*Handbook of Biosensors and Biochips*”, Chap. 2. John Wiley & Sons.
108. Debska J., Kot-Wasik A. and Namiesnik J., 2004, Fate and analysis of pharmaceutical residues in the aquatic environment, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **34**, 51-67.
109. Choi J.W., Kim Y.K., Lee I.H., Min J.H. and Lee W.H., 2001, Optical organophosphorus biosensor consisting of acetylcholinesterase/viologen hetero Langmuir-Blodgett film, *Biosensors and Bioelectronics*, **16**, 937-943.
110. Ramanathan K., Ensor M. and Daunert S., 1997, Bacterial biosensors for monitoring toxic metals, *Trends in Biotechnology*, **15** (12), 500-506.
111. López de Alda M.J., Diaz-Cruz S., Petrovic M. and D. Barceló, 2003, Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment, *Journal of Chromatography A*, **1000**, 503.
112. Woutersen M., Belkin S., Brouwer B., Van Wezel A.P. and Heringa M.B., 2011, Are luminescent bacteria suitable for online detection and monitoring of toxic compounds in drinking water and its sources? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **400**, 915-929.
113. Modern Water, 2012, Microtox Bibliography, Modern Water Inc., New Castle, De, USA.
114. Lajoie C.A., Lin S.-C., Nguyen H. and Kelly C.J., 2002, A toxicity testing protocol using a bioluminescent reporter bacterium from activated sludge, *Journal of Microbiological Methods*, **50**, 273-282.
115. Bar R. and Ulitzur S., 1994, Bacterial toxicity of cyclodextrins: luminous *Escherichia coli* as a model, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **41**, 574-577.
116. Su L., Jia W., Hou C. and Lei Y., 2011, Microbial biosensors: a review, *Biosensors and Bioelectronics*, **26**, 1788-1799.

117. Wong L.S., Lee Y.H. and Surif S., 2013, Whole cell biosensor using *Anabaena torulosa* with optical transduction for environmental toxicity evaluation, *Journal of Sensors*, **2013**, 1-8.
118. Chiadò A., Varani L., Bosco F. and Marmo L., 2013, Opening Study on the Development of a New Biosensor for Metal Toxicity Based on *Pseudomonas fluorescens* Pyoverdine, *Biosensors*, **3**, 385-399.
119. Trapet P., Avoscan L., Klinguer A., Pateyron S., Citerne S., Chervin C., Mazurier S., Lemanceau P., Wendehenne D. and Besson-Bard A., 2016, The *Pseudomonas fluorescens* Siderophore Pyoverdine Weakens *Arabidopsis thaliana* Defense in Favor of Growth in Iron-Deficient Conditions, *Plant Physiology*, **171**, 675-693.
120. Sawyer C.N., McCarty P.L. and Parkin G.F., 2003, *Chemistry for Environmental Engineering and Science* (5th ed.). McGraw-Hill New York, USA.
121. Kaur A., Kim J.R., Michie I., Dinsdale R.M., Guwy A.J. and Premier G.C., 2013, Microbial fuel cell type biosensor for specific volatile fatty acids using acclimated bacterial communities, *Biosensors and Bioelectronics*, **47**, 50-55.
122. Shen Y., Wang M., Chang I.S. and Ng H.Y., 2013, Effect of shear rate on the response of microbial fuel cell toxicity sensor to Cu(II), *Bioresource Technology*, **136**, 707-710.
123. Jen A.C., Wake M.C. and Mikos A.G., 1996, Review: hydrogels for cell immobilization, *Biotechnology and Bioengineering*, **50**, 357-364.
124. Kwan R.C.H., Hon P.Y.T. and Renneberf R., 2005, Amperometric determination of ammonium with benzylamine/poly(carbamoyl) sulfonate hydrogel-based biosensor, *Sensors and Actuators*, **107**, 616-622.
125. Jang E., Park S., Jong Lee H., Murthy P.S. K. and Koh W.G., 2010, Development of phenol detecting biosensor using PEG hydrogels microparticles, 3rd International Nanoelectronics Conference (INEC), 3-8 Jan. 2010, Hong-Kong, China.
126. Khor S.M., Lee Y.H., Ahmad M., Karuppiyah N., Sidek H. and Abdullah J., 2003, Poly(hydroxyl ethyl methacrylate) hydrogel matrix for phenol sensor, *Asian Conference on Sensors*, pp. 207-211.
127. Ding L., Hao C., Xue Y.D. and Ju H.X., 2007, A bio-inspired support of gold nanoparticles-chitosan nanocomposites gel for immobilization and electrochemical study of K562 leukemia cells, *Biomacromolecules*, **8**, 1341-1346.
128. Lee K.Y. and Mooney D.J., 2001, Hydrogels for tissue engineering, *Chemical Reviews*, **101**, 1869-1879.
129. Norton L.W., Koschwanetz H.E., Wisniewski N.A., Klitzman B. and Reichert W.M., 2007, Vascular endothelial growth factor and dexamethasone release from nonfouling sensor coatings affect the foreign body response, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **81**, 858-869.
130. Kim H., Cohen R.E., Hammond P.T. and Irvine D.J., 2006, Live Lymphocyte Arrays for Biosensing, *Advanced Functional Materials*, **16**, 1313-1323.
131. Castillo J., Isik S., Blochl A., Pereira-Rodrigues N., Bedioui F., Csoregi E., Schuhmann W. and Oni J., 2005, Simultaneous detection of the release of glutamate and nitric oxide from adherently growing cells using an array of glutamate and nitric oxide selective electrodes, *Biosensors and Bioelectronics*, **20**, 1559-1565.

132. D'Souza S.F., 2001, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **96**, 225.
133. Matrubutham U. and Sayler G.S., 1998, in: "*Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols*", (Mulchandani A. and Rogers K.R., Eds.). Humana Press, Totowa, NJ, p. 249.
134. D'Souza S.F., 1997, Microbial biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, **16**, 337-353.
135. Arikawa Y., Ikebukuro K. and Karube I., 1998, in: "*Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols*", (Mulchandani A., Rogers K.R., Eds.). Humana Press, Totowa, NJ, p. 225.
136. Philip J.C., Balmand S., Hajto E., Bailey M.J., Wiles S., Whiteley A.S., Lilley A.K., Hajto J. and Dunbar S.A., 2003, Whole cell immobilised biosensors for toxicity assessment of a wastewater treatment plant treating phenolics-containing waste, *Analytica Chimica Acta*, **487**, 61-74.
137. Hickey A.S. and Peppas N.A., 1995, Mesh size and diffusive characteristics of semicrystalline poly(vinylalcohol) membranes prepared by freezing/thawing techniques, *Journal of Membrane Science*, **107**, 229-237.
138. Heipieper H.J., de Waard P., Van der Meer P., Killian J.A., Isken S., de Bont J.A., Eggink G., and de Wolf F.A., 2001, Regiospecific effect of 1-octanol on cis-trans isomerization of unsaturated fatty acids in the solvent-tolerant strain *Pseudomonas putida* S12, *Applied Microbiology and Technology*, **57**, 541-547.
139. Villalobos P., Acevedo C.A., Albornoz F., Sánchez E., Valdés E., Galindo R. and Young M.E., 2010, A BOD disposable reactor with alginate-entrapped bacteria, *Bioprocess and Byosystems Engineering*, **33**, 961-970.
140. Volpatti L. R. and Yetisen A. K., 2014, Commercialization of microfluidic devices, *Trends in Biotechnology*, **32** (7), 347–350.
141. Beil A., Müller G., Käser D., Hattendorf B., Li Z., Krumeich F., Rosenthal A., Rana V.K., Schönberg H., Benko Z. and Grützmacher H., 2018, Bismesitoylphosphinic Acid (BAPO-OH): A Ligand for Copper Complexes and Four-Electron Photoreductant for the Preparation of Copper Nanomaterials, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018, **57**, 7697–7702, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
142. Chiappone A., Jeremias S., Bongiovanni R. and Schönhoff M., 2013, NMR Study of Photo-crosslinked Solid Polymer Electrolytes: The Influence of Monofunctional Oligoethers, *Journal of Polymer Science, part B: Polymer Physics*, **51**, 1571–1580.
143. Meyer J.M. and Abdallah M.A., 1978, The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physicochemical properties, *Journal of General Microbiology*, **107**, 319–328.
144. Chiadò A., 2013, Evaluation of new biorecognition elements for environmental monitoring, Ph.D. Thesis, Politecnico di Torino, Torino.
145. Lindenberg C., Cornel J., Schöll J. and Mazzotti M., 2012, ATR-FTIR Spectroscopy, in "*Industrial Crystallization Process Monitoring and Control*", First Ed. (Chianese A. and Kramer J.M., Eds), Chap. 9. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

146. Nikolaidis A., Labuza T.P., 1996, Use of Dynamic Mechanical Thermal Analysis (DMTA): Glass transition of a cracker and its tough, *Journal of Thermal Analysis*, **47**, 1315-1328.
147. Crompton T.R., 2013, Differential scanning calorimetry, in “*Thermal Methods of Polymer Analysis*”, Chap. 7. Smithers Rapra Technology Ltd, Shawbury, UK.
148. Moynihan C., Easteal A.J., Wilder J. and Tucker J., 1974, Dependence of the glass transition temperature on heating and cooling rate, *The Journal of Physical Chemistry*, **78** (26), 2673-2677.