

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

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

Tesi di Laurea Magistrale

Idrogeli fotopolimerizzabili derivanti da fonti bio contenenti vetri bioattivi



**Politecnico
di Torino**

Relatori

Prof. Marco Sangermano
Prof.ssa Marta Miola
Prof.ssa Enrica Verné

Candidato

Alice Benedetto Mas

Ottobre 2021

Indice

Introduzione	1
1. Idrogeli: proprietà e parametri caratteristici	2
1.1. Classificazione degli idrogeli	3
1.1.1. Classificazione degli idrogeli in base alla natura dei costituenti	4
1.1.1.1. Idrogeli naturali.....	5
1.1.1.1.1. Gelatina	5
1.1.1.1.2. Cellulosa.....	7
1.1.2. Classificazione degli idrogeli in base al tipo di legame	9
1.1.2.1. Idrogeli fisici.....	9
1.1.2.2. Idrogeli chimici.....	10
1.2. Fotopolimerizzazione	12
1.3. Applicazioni biomediche.....	14
2. Vetri bioattivi.....	15
2.1. Sintesi dei vetri bioattivi.....	16
2.1.1. Fusione	16
2.1.2. Metodo sol-gel.....	17
2.1.2.1. Metodo di Stöber.....	19
2.2. Ruolo degli ioni nelle applicazioni biomediche	19
3. Materiali e metodi	23
3.1. Metacrilazione del polimero	23
3.1.1. Sintesi della gelatina metacrilata (GelMA).....	23
3.1.2. Sintesi della cellulosa metacrilata (M-CMC).....	25
3.2. Sintesi dei vetri bioattivi.....	30
3.2.1. Biovetro S4.....	30
3.2.2. Biovetro S4BCu	32
3.3. Sintesi degli idrogeli.....	34
3.3.1. Idrogeli a base di GelMA	34
3.3.2. Idrogeli a base di M-CMC	36
3.4. Caratterizzazione	37
3.4.1. Spettroscopia IR a trasformata di Fourier (FTIR).....	37

3.4.2.	Microscopio elettronico a scansione ad emissione di campo e spettroscopia in dispersione di energia (FESEM- EDS)	38
3.4.3.	Fotoreologia	38
3.4.4.	Grado di rigonfiamento	39
3.4.5.	Calorimetria a scansione differenziale (DSC).....	39
3.4.6.	Analisi termogravimetrica (TGA).....	40
3.4.7.	Microscopio elettronico a scansione (SEM)	41
3.4.8.	Prova di compressione	42
3.4.9.	Effetto degli idrogeli sul pH di una soluzione buffer.....	43
3.4.10.	Spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS).....	44
4.	Risultati e discussione.....	45
4.1.	Funzionalizzazione del polimero.....	45
4.1.1.	Gelatina e GelMA	45
4.1.2.	Cellulosa carbossimetilata e M-CMC	46
4.2.	Analisi FTIR dei vetri bioattivi	48
4.3.	Analisi morfologica e composizionale dei vetri bioattivi (FESEM-EDS)	49
4.4.	Fotoreticolazione degli idrogeli.....	51
4.4.1.	Idrogeli a base di GelMA	51
4.4.2.	Idrogeli a base di M-CMC	52
4.5.	Grado di rigonfiamento	53
4.5.1.	Idrogeli a base di GelMA	53
4.5.2.	Idrogeli a base di M-CMC	56
4.6.	DSC	60
4.6.1.	Idrogeli a base di GelMA	60
4.6.2.	Idrogeli a base di M-CMC	62
4.7.	TGA	63
4.7.1.	Idrogeli a base di GelMA	63
4.7.2.	Idrogeli a base di M-CMC	67
4.8.	SEM.....	71
4.8.1.	Idrogeli a base di GelMA	71
4.8.2.	Idrogeli a base di M-CMC	77
4.9.	Prova di compressione.....	83
4.9.1.	Idrogeli a base di GelMA	83
4.9.2.	Idrogeli a base di M-CMC	85

4.10.	Effetto degli idrogeli sul pH di una soluzione buffer	88
4.11.	Rilascio degli ioni Cu^{2+} e B^{3+}	89
5.	Conclusioni e prospettive future	92
6.	Bibliografia	94

Introduzione

Per questo lavoro di Tesi sono stati realizzati degli idrogeli naturali nei quali si sono dispersi vetri bioattivi nella forma di particelle sferiche. I polimeri di partenza per la sintesi dei due gruppi di idrogeli preparati sono la gelatina (Gel) e la cellulosa carbossimetilata (CMC). In entrambi i casi si è innanzitutto proceduto alla metacrilazione del polimero, per fornire ad esso i gruppi funzionali fotosensibili necessari per la fotoreticolazione. Si sono quindi ottenute la gelatina metacrilata (GelMA) e la cellulosa metacrilata (M-CMC). Successivamente si sono sintetizzati due tipi di biovetro: il vetro S4 “di controllo” a base di SiO_2 , CaO e P_2O_5 ed il vetro S4BCu dopato con B^{3+} e Cu^{2+} . I vetri bioattivi sono poi stati dispersi in una soluzione acquosa del polimero funzionalizzato contenente un fotoiniziatore idrosolubile e le soluzioni così ottenute sono state fotopolimerizzate. In questo modo si sono ottenuti 7 idrogeli a base di GelMA: uno di GelMA pura, tre arricchiti con biovetro S4 rispettivamente al 5%wt, 10%wt e 15%wt (con riferimento al peso della resina) e altri tre arricchiti con le stesse concentrazioni di S4BCu. Analogamente sono stati preparati 7 idrogeli a base di M-CMC, per un totale di 14 tipologie di campione.

Per tutti gli idrogeli realizzati si sono studiate la cinetica di fotoreticolazione, il grado di rigonfiamento e le proprietà termiche, morfologiche e meccaniche. Dato che gli idrogeli sono in grado di rigonfiarsi incorporando il liquido in cui sono immersi ed i biovetri in essi dispersi possono scambiare ioni con la soluzione con cui si trovano a contatto, si è misurata la variazione del pH di una soluzione acida in seguito all’immersione degli idrogeli a base di GelMA. Si è inoltre valutato il rilascio di ioni rame e boro da parte degli idrogeli GelMA/S4BCu.

Gli idrogeli biocompatibili sintetizzati per questo lavoro di Tesi potrebbero rivelarsi interessanti per applicazioni cutanee, per la cura di ferite (grazie al rilascio di ioni terapeutici e alla compensazione della naturale acidificazione del sito da trattare) e per il trattamento di patologie dermatologiche specifiche come la psoriasi (a cui è associata una locale diminuzione del pH cutaneo).

Nel primo capitolo di questa Tesi verranno trattati gli idrogeli, di cui verranno elencate le proprietà, le classificazioni (con particolare attenzione ai due idrogeli naturali oggetto della Tesi) e verrà discussa la loro applicabilità nel campo biomedico. Il secondo capitolo è dedicato ai vetri bioattivi, di cui si approfondiranno proprietà e metodi di sintesi; verrà inoltre messo in evidenza il ruolo degli ioni presenti nei biovetri S4 ed S4BCu nelle applicazioni terapeutiche. Nel terzo capitolo verranno descritte le procedure sperimentali seguite per la preparazione gli idrogeli e le tecniche di caratterizzazione impiegate, i cui risultati verranno esposti e discussi nel capitolo successivo. Il quinto ed ultimo capitolo è dedicato a conclusioni e sviluppi futuri degli idrogeli oggetto della Tesi.

1. Idrogeli: proprietà e parametri caratteristici

Un idrogelo è un network polimerico 3D di natura idrofilica in grado di rigonfiare quando immerso in acqua o in fluidi biologici¹. Il rigonfiamento degli idrogeli è un processo reversibile che può essere regolato da stimoli esterni quali radiazioni elettromagnetiche, o dalla temperatura, dal pH e dalla forza ionica della soluzione acquosa in cui il polimero è immerso².

Alla base del rigonfiamento degli idrogeli vi sono meccanismi di capillarità e osmosi, a cui si contrappone la resistenza all'espansione esercitata dal polimero reticolato³. Quando un idrogelo secco viene immerso in una soluzione acquosa, si verifica innanzitutto l'idratazione dei gruppi più idrofilici e polari, affini all'acqua⁴. Inglobata la *primary bound water*, il reticolo rigonfia ed espone i gruppi idrofobici, i quali interagiscono con la *secondary bound water*. Una volta saturati sia i siti di interazione polari che quelli idrofobici, il sistema è ancora in grado di incorporare acqua: gli spazi esistenti tra le catene polimeriche ed il volume di pori e vuoti presenti nell'idrogelo vengono infatti riempiti dalla *free water*. L'acqua totale presente nell'idrogelo è quindi data dalla somma dei contributi dovuti alla *bound* e alla *free water*.

La capacità di rigonfiamento degli idrogeli è legata alla presenza di gruppi idrofilici (ad esempio -OH, -CONH, -CONH₂, -SO₃H) e dipende da fattori come la struttura del reticolo, la composizione chimica, il grado di reticolazione, il tipo e la concentrazione del solvente e la presenza di stimoli specifici⁵. In particolare, con elevato peso molecolare medio del polimero e basse densità di reticolazione si possono ottenere idrogeli capaci di aumentare notevolmente il loro volume incorporando la soluzione in cui sono immersi. La struttura chimica del polimero determina invece il rapporto tra le specie idrofiliche e idrofobiche; un idrogelo ricco di gruppi idrofilici è tipicamente caratterizzato da un grado di rigonfiamento elevato.

Tra i parametri caratterizzanti, il grado di rigonfiamento è di fondamentale importanza poiché determina alcune delle principali proprietà degli idrogeli⁶. La capacità di rigonfiamento, insieme alla natura chimica del polimero e alla morfologia del network, regola infatti il comportamento diffusivo, il trasporto interno e le proprietà meccaniche del materiale. In termini quantitativi, è possibile definire il coefficiente di rigonfiamento del volume Q secondo la Formula 1.1:

$$Q = \frac{V_{\text{rigonfiato}}}{V_{\text{secco}}} \quad (1.1)$$

Dove $V_{\text{rigonfiato}}$ è il volume dell'idrogelo dopo l'incorporazione della soluzione acquosa, mentre V_{secco} è il volume iniziale dell'idrogelo secco.

Un altro importante parametro caratterizzante un idrogelo è \overline{M}_C , pari al peso molecolare medio tra due nodi adiacenti. In particolare, per $Q > 10$, vale la Formula 1.2:

$$Q = \beta \overline{M}_C^{3/5} \quad (1.2)$$

dove β è una costante legata al volume specifico del polimero, al volume molare dell'acqua ed al parametro di Flory per l'interazione polimero-solvente.

Infine, l'idrogelo è caratterizzato dalla dimensione teorica della maglia ξ , ricavabile dalla Formula 1.3 e rappresentata in Figura 1.1⁴:

$$\xi = Q^{1/3} (\overline{r_0^2})^{1/2} \quad (1.3)$$

Dove $(\overline{r_0^2})^{1/2}$ è distanza quadratica media tra due nodi adiacenti.

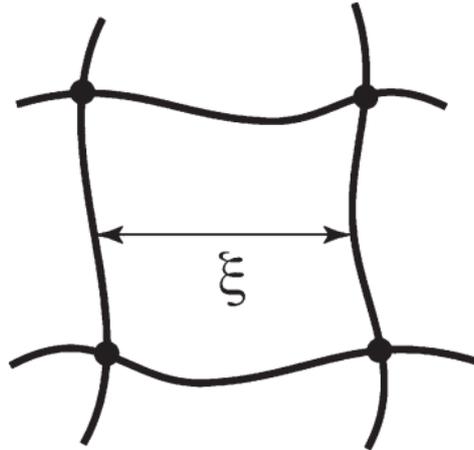


Figura 1.1 Dimensione teorica della maglia dell'idrogelo, indicata con ξ

Scoperti da Wichterle e Lim nel 1960, gli idrogeli vennero inizialmente utilizzati come lenti a contatto, per poi trovare successivamente impiego come sistemi per il rilascio controllato di agenti biologicamente attivi. Una sempre più profonda conoscenza della chimica dei polimeri e dei processi biologici ha poi consentito di ampliare l'applicazione degli idrogeli al campo biomedico, biosensoristico, farmaceutico, alimentare e dell'ingegneria tissutale (come verrà descritto in modo più dettagliato di seguito).

1.1. Classificazione degli idrogeli

Come mostrato in Figura 1.2, la classificazione degli idrogeli è piuttosto articolata: diverse classi sono individuate in base alle proprietà fisiche, al metodo di preparazione, all'origine, alla carica ionica, alla velocità di degradazione, alla sensibilità agli stimoli e alla natura della reticolazione degli idrogeli⁷.

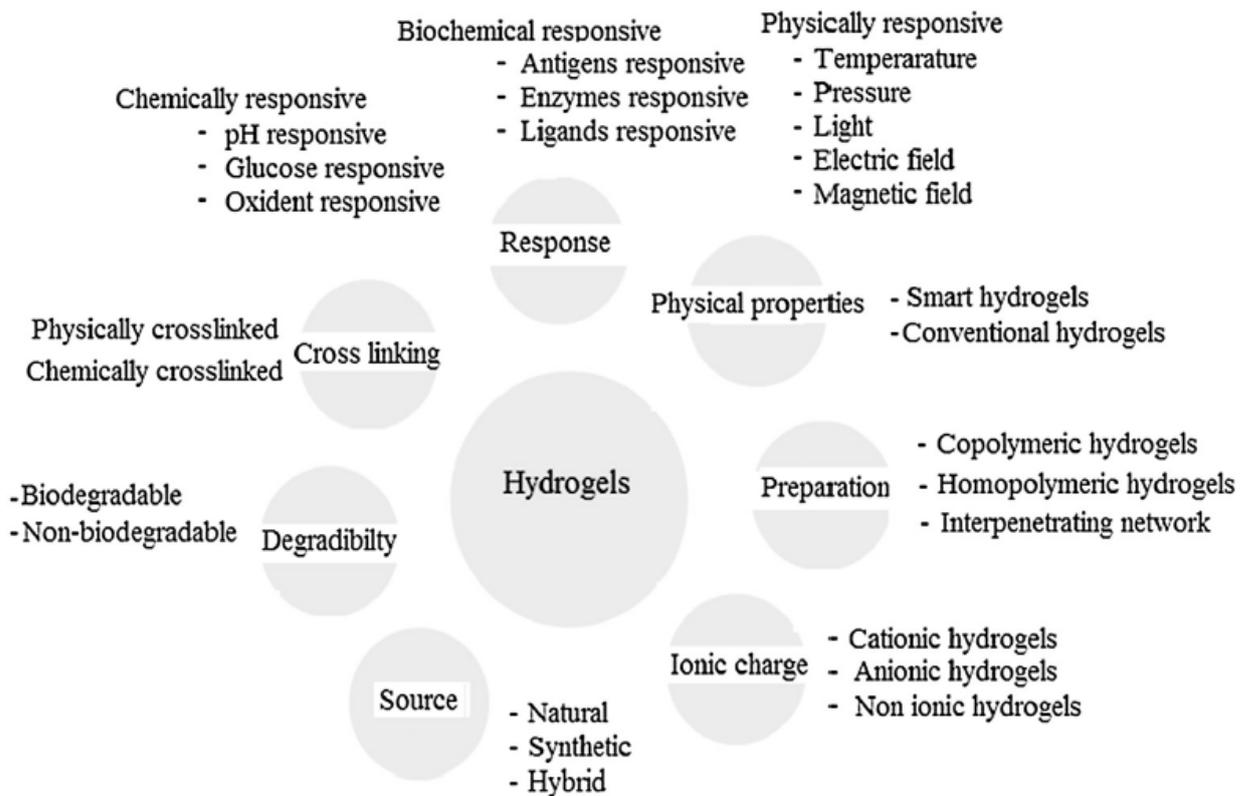


Figura 1.2 Classificazione degli idrogeli

1.1.1. Classificazione degli idrogeli in base alla natura dei costituenti

Una prima classificazione degli idrogeli è basata sull'origine del polimero che li costituisce: si parla infatti di idrogeli naturali o sintetici².

A differenza degli idrogeli naturali (che successivamente verranno trattati in modo più approfondito), gli idrogeli sintetici sono composti da polimeri non esistenti in natura, quali poliidrossimetilmetacrilato (pHEMA), polivinil alcol (PVA) e glicole polietilenico (PEG). Gli idrogeli costituiti da polimeri sintetici presentano proprietà migliori rispetto agli idrogeli naturali, soprattutto per quanto riguarda la resistenza all'abrasione e le proprietà meccaniche, quindi la durabilità⁸. Gli idrogeli sintetici sono caratterizzati da un elevato grado di purezza, oltre ad avere struttura e funzionalità ben definite. Questi sistemi risultano inoltre stabili in diverse condizioni di pH, temperatura e pressione. Infine, la possibilità di ingegnerizzare gli idrogeli sintetici consente di controllare le proprietà finali del gel quali la porosità e la permeabilità, permettendo quindi di ottimizzare le caratteristiche del sistema sulla base della sua applicazione finale.

Una terza classe di idrogeli è costituita dalla combinazione di polimeri naturali e sintetici: si tratta degli idrogeli ibridi, i quali possono essere ingegnerizzati per regolare proprietà come la biodegradazione, la solubilità, la cristallinità e l'attività biologica.

1.1.1.1. Idrogeli naturali

Sono considerati idrogeli naturali quelli composti da polimeri esistenti in natura. Tra i polimeri naturali da cui si producono idrogeli, una posizione di rilievo è occupata dalle proteine (come il collagene e la gelatina) e dai polisaccaridi (come la cellulosa, il chitosano e l'amido)⁹. I gel derivanti da polimeri naturali sono atossici, stabili chimicamente e termicamente oltre che abbondantemente disponibili in natura. Rispetto agli idrogeli sintetici, gli idrogeli naturali presentano biodegradabilità e biocompatibilità superiore: le caratteristiche elencate rendono questa classe di materiali interessante per l'applicazione in ambito farmaceutico, biomedico, ambientale ed agricolo.

Di seguito verranno descritte in modo più dettagliato la gelatina e la cellulosa, polimeri naturali alla base degli idrogeli oggetto della Tesi.

1.1.1.1.1. Gelatina

La gelatina è una proteina ottenuta dalla dissoluzione termica (a pH acido o basico) e dalla parziale idrolisi del collagene di pelle, ossa e tendini animali¹⁰. In base alla fonte di collagene e alla tecnica di preparazione, la gelatina può presentare proprietà fisiche e strutture chimiche diverse. Infatti, la natura e la quantità del collagene variano significativamente tra un tessuto all'altro e tra le diverse specie animali. A causa di questa eterogeneità, le tecniche di preparazione sono differenti a seconda della materia prima di partenza e dei reagenti chimici utilizzati.

La gelatina impiegata per la sintesi degli idrogeli oggetto della Tesi è stata ricavata dalla pelle dei pesci d'acqua dolce. Il processo che porta all'ottenimento della gelatina prevede innanzitutto il lavaggio della pelle del pesce con acqua fredda al fine di rimuovere le impurità, seguito dal taglio del materiale in parti di piccola taglia. Si procede quindi al trattamento con una soluzione basica diluita e al lavaggio in acqua, per poi neutralizzare il sistema con soluzioni acide diluite¹¹. La pelle neutralizzata viene poi trattata con acido citrico e nuovamente neutralizzata con un lavaggio in acqua fredda. In seguito, si procede all'immersione della pelle in acqua a 55°C, per solubilizzare il collagene parzialmente degradato. Per rimuovere le impurità, la soluzione contenente la gelatina solubilizzata viene dapprima filtrata e poi deionizzata. Nel passaggio successivo, il solvente viene fatto evaporare fino a quando il sistema raggiunge una concentrazione compresa tra il 15% ed il 45%. A questo punto, la soluzione viene sottoposta ad ulteriore filtrazione in modo da rimuovere eventuali impurità residue, quindi sterilizzata a temperature intorno ai 135°C per 8-12 ore. Infine, la soluzione raffreddata viene essiccata e miscelata per ottenere la polvere di gelatina.

Ciò che si ottiene dalla rottura della struttura a tripla elica del collagene non è una singola entità chimica, bensì una miscela di frazioni composte da amminoacidi (legati da legami peptidici) che formano polimeri con massa molecolare che varia da 15000 a 400000 Da. La descrizione della composizione chimica della gelatina è stata fornita da Ward, Eastoe, Neuman e Tristram, che per il loro studio si sono avvalsi di numerose tecniche analitiche. La loro ricerca ha portato ad affermare che la gelatina è costituita da 18 amminoacidi, legati tra loro in una sequenza parzialmente ordinata. A seconda del processo produttivo della gelatina, l'amminoacido predominante è l'alanina (processo acido) o la glicina (processo basico), che costituiscono da un terzo fino alla metà degli amminoacidi residui⁹. Lo studio evidenzia inoltre che la gelatina

ottenuta dai pesci contiene notevoli quantità di serina e treonina rispetto a quella ricavata dai mammiferi terrestri. La struttura base della gelatina è riportata in Figura 1.3¹².

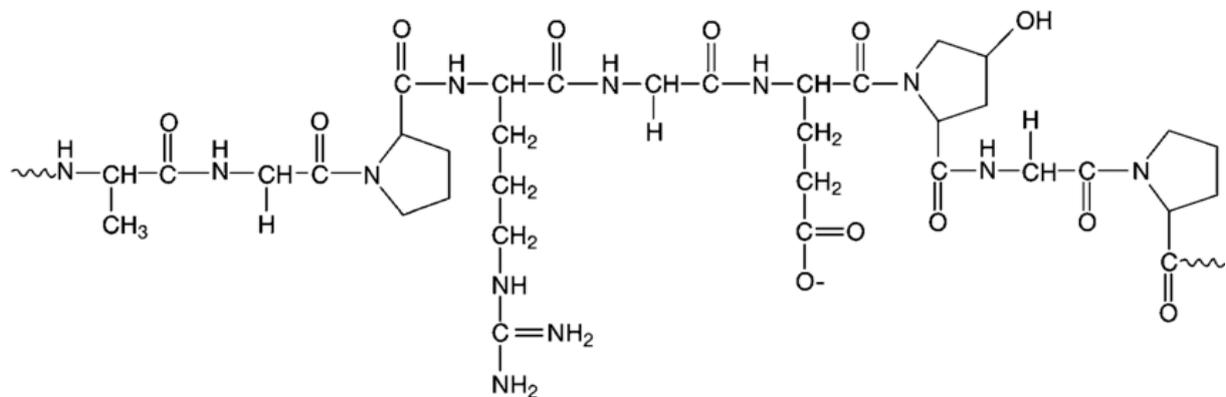


Figura 1.3 Struttura base della gelatina

La produzione mondiale di gelatina è di circa 400.000 tonnellate annue. A livello europeo, circa l'80% della gelatina è ricavata dalla cotenna di maiale. Oltre il 60% della gelatina prodotta trova impiego nel settore alimentare, in qualità di: formatore di gel nei dolci gelificati e confetture, agente montante nei marshmallow o nei torroni, colloide protettivo per confetture e gelati, legante nei formaggi e latticini, agente chiarificante nella birra, nel vino e nella frutta, formatore di film protettivi per la frutta e per le carni e addensante nelle bevande in polvere e zuppe. Ma non solo: la gelatina edibile viene utilizzata nei processi di incapsulamento di pigmenti, fragranze e vitamine, come emulsionante nelle salse e nei prodotti di pasticceria, in qualità di stabilizzante negli yogurt e nei dessert e infine per legare i condimenti alle carni. Circa il 30% della gelatina prodotta trova invece applicazione nel campo farmaceutico (incapsulamento di farmaci, legante per la produzione di compresse). La frazione residua di gelatina globalmente prodotta viene invece impiegata in altri settori, come quello fotografico, dove ricopre un ruolo protettivo per i sali d'argento.

Oltre agli utilizzi più tradizionali, la gelatina è un materiale interessante e promettente per le applicazioni nell'ingegneria tissutale, grazie alla possibilità di formare idrogeli biocompatibili. Nella sua struttura, la gelatina contiene inoltre motivi peptidici come l'arginina-glicina-acido aspartico (RGD, che promuove l'adesione e la crescita di diversi tipi cellulari) e le metalloproteasi della matrice (MMP, utili per il rimodellamento cellulare e per l'aumento delle proprietà fisiche e chimiche degli idrogeli)¹³. Sempre in campo biomedico, questa proteina viene anche utilizzata per la preparazione di biomateriali iniettabili per la ricostruzione ossea e per il rilascio di fattori di crescita al fine di promuovere la vascolarizzazione dei tessuti.

Limitazioni applicative sono legate alla scarsa conducibilità elettrica degli idrogeli a base di GelMA, che impedisce la regolazione del comportamento delle cellule mediante stimolazione elettrica, e alle proprietà meccaniche non eccellenti a causa dell'elevato contenuto di acqua. Tuttavia, regolando parametri come la concentrazione di GelMA e dell'iniziatore, il tempo di reticolazione/fotoreticolazione, la temperatura/dose di radiazione UV e le condizioni

geometriche del sistema, è possibile ottimizzare le proprietà meccaniche degli idrogeli in base alla specifica applicazione a cui sono destinati.

1.1.1.1.2. Cellulosa

La cellulosa è il biopolimero naturale rinnovabile più abbondante sulla Terra ed è presente in numerose specie viventi quali piante, animali e alcuni batteri^{14,15}. La fonte di cellulosa più sfruttata a livello commerciale è il legno, ma questo biopolimero è presente in grande quantità in fibre vegetali come il cotone, il lino e la juta; esistono inoltre forme di cellulosa prodotte da batteri, alghe e animali marini. La cellulosa trova applicazione in un'ampia varietà di campi, quali quello farmaceutico, agricolo, biomedico e industriale: questo biopolimero presenta infatti eccellenti proprietà, quali la biodegradabilità, l'idrofilicità e la biocompatibilità, oltre ad una buona resistenza meccanica.

La struttura della cellulosa è caratterizzata dalla presenza di due unità anidroglicosidiche (AGU) unite dal legame 1,4- β -glucosidico: un atomo di ossigeno lega covalentemente il C1 di un anello di glucosio ed il C4 dell'anello adiacente. Come mostrato in Figura 1.4, ogni AGU presenta tre gruppi idrossilici in grado di formare legami idrogeno, che consentono la formazione dei domini cristallini alla base delle proprietà fisiche della cellulosa¹.

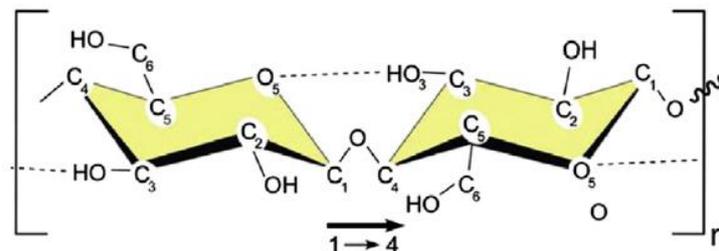
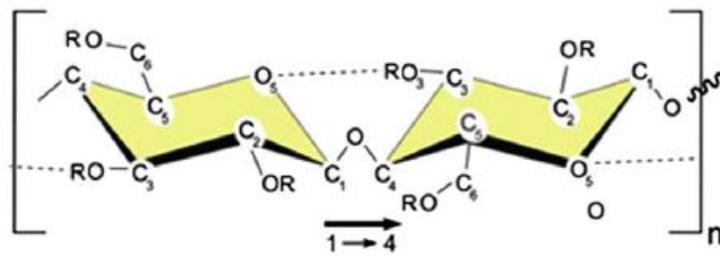


Figura 1.4 Struttura della cellulosa (i legami idrogeno sono tratteggiati)

Grazie ai legami intramolecolari e intermolecolari, le catene di cellulosa si dispongono in modo parallelo, organizzandosi in microfibrille. Tra le microfibrille si individuano domini cristallini, in cui le catene sono ordinate, e regioni amorfe disordinate. Come conseguenza della sua struttura chimica, la cellulosa presenta elevata cristallinità e rigidità ed è poco solubile in acqua e solventi organici¹⁶. Per aumentarne la solubilità in acqua, la cellulosa può essere modificata chimicamente con processi di eterificazione o esterificazione: controllando il grado di sostituzione è quindi possibile ottenere soluzioni acquose con la solubilità e la viscosità desiderate.

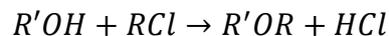
La struttura di alcuni possibili derivati ottenibili dalla cellulosa è riportata in Figura 1.5¹.



Cellulose derivative	R
methyl cellulose	- CH ₃
ethyl cellulose	-CH ₂ CH ₃
hydroxypropyl cellulose	-CH ₂ (CH ₂) ₂ OH
hydroxypropylmethyl cellulose	-CH ₃ or -CH ₂ CH(OH)CH ₃
hydroxyethyl cellulose	-CH ₂ CH ₂ OH
ethylhydroxyethyl cellulose	-C ₂ H ₅ or -CH ₂ CH ₂ OH
carboxymethyl cellulose	-CH ₂ COOH
cellulose sulfate	-SO ₄ H ₂
cellulose phosphate	-PO ₃ H ₂ , -PO ₃ H; -PO ₂ H ₂

Figura 1.5 Struttura di alcuni derivati della cellulosa

Il processo di eterificazione prevede la sostituzione dei gruppi -OH con radicali organici come gruppi metilici, etilici o altri più complessi, secondo la reazione:



Dove l'alcol R'OH è uno dei tre gruppi idrossilici presenti nell'AGU, mentre R è il gruppo che sostituisce l'idrogeno del gruppo idrossilico¹⁷. In base al gruppo introdotto e al grado di sostituzione è possibile ottenere prodotti con diversa solubilità.

Un altro processo frequentemente usato per ottenere derivati della cellulosa è l'esterificazione dei gruppi idrossilici per mezzo di acidi come l'acido acetico, nitrico e solforico. L'esterificazione della cellulosa venne scoperta nel 1846 da Schönbein che utilizzò una miscela di acido solforico e acido nitrico sul cotone per produrre la nitrocellulosa, un composto esplosivo e infiammabile dove tutti i gruppi -OH sono sostituiti da gruppi esteri nitrati; soltanto a partire dalla fine del XIX secolo si sono realizzati nitrati di cellulosa con un grado di sostituzione controllato.

La possibilità di preparare esteri di cellulosa con sostituenti organici ha poi portato all'ottenimento di derivati meno infiammabili e dalle ottime potenzialità applicative.

Per quanto riguarda le applicazioni, il maggior impiego della cellulosa è nell'industria della carta e del packaging¹⁸. Volumi inferiori di questo materiale vengono invece destinati alla conversione in derivati come il cellophane ed il rayon. Sono inoltre oggetto di ricerca i processi che consentono la conversione della cellulosa in biocombustibili, come l'etanolo cellulosico, per la produzione di combustibile da fonte rinnovabile. I derivati della cellulosa come metilcellulosa (MC), idrossipropilcellulosa (HPC), etilcellulosa (EC), idrossietilcellulosa

(HEC) e carbossimetilcellulosa sodica (NaCMC) possono invece essere utilizzati per produrre idrogeli.

Di grande interesse sono anche la nanocellulosa ed i suoi compositi, che trovano impiego, oltre che nell'industria cartaria, anche in campo farmaceutico e cosmetico. L'utilizzo dei nanocompositi a base di cellulosa è inoltre diffuso nel settore delle costruzioni (come compositi strutturali), dell'elettronica (in qualità di membrane per dispositivi elettroacustici) e dell'automobile. Compositi della nanocellulosa sono infine impiegati con successo come membrane nell'ultrafiltrazione, nelle celle a combustibile e come scambiatori ionici.

1.1.2. Classificazione degli idrogeli in base al tipo di legame

Come accennato precedentemente, in base al tipo di interazioni esistenti tra le catene che costituiscono il network tridimensionale, gli idrogeli si suddividono in due grandi famiglie: idrogeli fisici (Figura 1.6a) e chimici (Figura 1.6b)⁶. Un'ulteriore possibilità prevede la coesistenza, nel reticolo, di legami covalenti ed interazioni non covalenti: questi sistemi sono classificati come idrogeli ibridi.

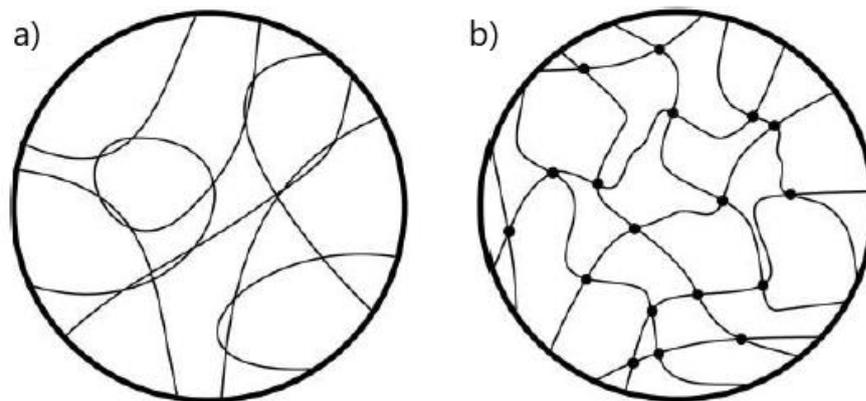


Figura 1.6 a) Idrogelo fisico b) Idrogelo chimico

1.1.2.1. Idrogeli fisici

Gli idrogeli fisici sono il risultato di fenomeni di autoassemblaggio delle molecole, mediati da interazioni non covalenti quali legami ionici, legami idrogeno e forze di Van der Waals. Recentemente gli idrogeli realizzati mediante legami fisici senza l'utilizzo di agenti di reticolazione hanno destato un interesse crescente. Gli agenti reticolanti possono infatti compromettere l'integrità delle sostanze intrappolate all'interno degli idrogeli (come microrganismi, cellule, proteine o enzimi) ed avere effetti tossici: a causa di queste problematiche risulta talvolta necessario ricorrere alla rimozione dell'agente reticolante prima di procedere all'applicazione dell'idrogelo¹⁹.

Di seguito vengono descritti i principali meccanismi che possono condurre alla formazione di un reticolo fisico:

- Interazioni ioniche: le catene polimeriche interagiscono a livello dei gruppi ionici presenti nella catena di base²⁰. È questo il caso dell'acido alginico (un polisaccaride presente nelle pareti cellulari), in cui i gruppi carbossilici presenti lungo la catena sono in grado di legare metalli multivalenti M^{n+} portando alla formazione di idrogeli con un reticolo di tipo ionico. L'idrogelo più diffuso appartenente a questa categoria è l'alginato di calcio, che trova larga applicazione in campo biomedico.
- Cristallizzazione: attraverso i processi di congelamento e scongelamento si ottiene un gel particolarmente forte ed elastico²¹. Nel caso del polivinilalcol (PVA), il reticolo viene formato applicando cicli di congelamento e scongelamento alla soluzione acquosa del polimero. Le proprietà finali del gel dipendono dal peso molecolare del PVA, dalla concentrazione di PVA nella soluzione acquosa, dal tempo di congelamento e dal numero di cicli di processo effettuati.
- Legami idrogeno: forze secondarie intra ed intermolecolari (che ad esempio si formano quando i gruppi degli acidi carbossilici vengono protonati) sono in grado di costruire un reticolo stabile in condizioni ambientali²². Il grado di rigonfiamento degli idrogeli fisici che si basano su queste interazioni dipende dal pH della soluzione acquosa da cui vengono prodotti. Un esempio appartenente a questa categoria è il legame idrogeno che si forma tra il gruppo carbossilico dell'acido poliacrilico e l'ossigeno del polietilenglicole.
- Graffaggi anfifilici e copolimeri a blocchi: si sfruttano le capacità di autoassemblaggio dei copolimeri a blocchi per formare idrogeli o micelle polimeriche, come conseguenza della capacità delle parti idrofobiche del polimero di organizzarsi in modo autonomo. I copolimeri graffati possono essere costituiti da uno scheletro idrofilico a cui sono attaccate unità idrofobiche o da catene idrofobiche contenenti graffaggi idrosolubili.

1.1.2.2. Idrogeli chimici

A differenza degli idrogeli fisici, gli idrogeli chimici hanno una struttura che si fonda su forti legami covalenti. I legami che costituiscono il network si originano in seguito a reazioni chimiche, che portano alla formazione di idrogeli permanenti e resistenti. Esistono diverse tecniche per produrre un idrogelo chimico, ad esempio²³:

- Reticolazione con aldeidi: polimeri idrofilici con gruppi -OH, come il polivinil alcol, possono essere reticolati con la glutaraldeide²⁴. Quest'ultima infatti è poco costosa, altamente reattiva e molto solubile in ambiente acquoso. Queste caratteristiche permettono che venga utilizzata come agente reticolante per la sintesi di idrogeli chimici. Per consentire la reticolazione è necessario controllare le condizioni di reazione, in particolare sono richiesti un basso pH, elevate temperature e l'aggiunta di

etanolo.

- Reazioni di addizione: agenti reticolanti multifunzionali possono reagire con i gruppi funzionali di polimeri idrofilici mediante reazioni di addizione.
- Reazioni di condensazione: i poliesteri e le poliammidi possono essere sintetizzati mediante le reazioni di condensazione tra i gruppi ossidrilici o amminici con acidi carbossilici o loro derivati. L'aggiunta di N-idrossisuccinimide consente un miglior controllo sulla densità di reticolazione degli idrogeli prodotti e la limitazione dei prodotti secondari.
- Radiazioni ad alta energia: fasci di elettroni ad alta energia o raggi γ possono essere utilizzati per polimerizzare sostanze insature.
- Polimerizzazione radicalica: gli idrogeli chimici possono essere ottenuti mediante la polimerizzazione radicalica di gruppi reattivi appositamente aggiunti a polimeri idrofilici. Questo metodo prevede l'utilizzo di polimeri idrofilici naturali, sintetici o semisintetici. Servendosi di enzimi in qualità di catalizzatori, si introducono gruppi metacrilici in mono- e disaccaridi, che possono quindi essere impiegati per sintetizzare gli idrogeli. Il meccanismo radicalico è alla base della fotopolimerizzazione utilizzata per realizzare gli idrogeli oggetto della Tesi, come verrà approfondito in seguito.
- Reazione enzimatica: avviene grazie alla presenza di un enzima, che opera in condizioni di pH e temperatura controllate e in ambiente acquoso. Questa reazione è caratterizzata da un'elevata specificità nell'accoppiamento tra l'enzima ed il substrato, che consente di minimizzare problematiche e tossicità che potrebbero derivare da reazioni secondarie. Tra gli enzimi maggiormente usati si contano la perossidasi, la transglutaminasi, la tirosinasi e la transferasi. In particolare, la perossidasi è in grado di catalizzare l'accoppiamento ossidativo dei fenoli in presenza di un ossidante come il perossido di idrogeno. Regolando la quantità di perossido di idrogeno, che ha la funzione di generare i radicali fenolici, è possibile controllare le proprietà finali dell'idrogelo. Infatti, al crescere del quantitativo di H_2O_2 , aumenta il numero di radicali fenile e quindi il numero di legami fenolo-fenolo che si formano: aumentando quindi il grado di reticolazione, l'idrogelo risulterà caratterizzato da un grado di rigonfiamento all'equilibrio inferiore²⁵.
- *Click chemistry*: prevede la formazione di molecole complesse a partire da precursori più semplici attraverso legami mediati da eteroatomi²⁶. Introdotta da Sharpless nel 2001, la reazione è caratterizzata da elevata efficienza e stereospecificità, mentre i prodotti di scarto sono inoffensivi e facilmente rimovibili. Le condizioni di reazione non presentano particolari criticità: i materiali ed i reagenti necessari sono facilmente reperibili, la reazione può avvenire in assenza di solvente (in alcuni casi si utilizza acqua) e la separazione dei prodotti è semplice. Tra le reazioni che formano il legame tra il carbonio e l'eteroatomo si contano la cicloadizione di specie insature (Diels-Adler compresa), la sostituzione nucleofila, la reazione non aldolica al carbonile e l'addizione al legame multiplo carbonio-carbonio (compresa l'addizione di Michael).

1.2. Fotopolimerizzazione

La fotopolimerizzazione è un processo rispettoso dell'ambiente che consente l'efficiente reticolazione di resine polimeriche contenenti gruppi fotoreticolabili²⁷. Con questo metodo è possibile ottenere idrogeli tridimensionali di diverse geometrie. A differenza della reticolazione termica, questo processo non prevede l'emissione di composti organici volatili (VOC) e non richiede calore, oltre a essere meno energivoro e ad avere un'elevata velocità di reticolazione. Per questi motivi, le resine a base di biopolimeri reticolabili con radiazioni UV sono di grande interesse tecnologico.

Grazie alla fotoreticolazione, polimeri modificati con gruppi funzionali appositi (metacrilati ad esempio) vanno incontro ad una polimerizzazione radicalica quando esposti ad una radiazione in presenza di un fotoiniziatore. Questa reazione, che provoca la trasformazione di fase di un liquido in un solido, può anche avvenire in condizioni fisiologiche (particolarmente interessante per la reticolazione in vivo di polimeri iniettabili).

Una formulazione fotopolimerizzabile è in genere costituita da:

- Un fotoiniziatore avente una banda di assorbimento sovrapposta alla banda di emissione della sorgente luminosa. Il fotoiniziatore deve essere solubile nel monomero (o oligomero o prepolimero) e non deve compromettere le proprietà finali del sistema reticolato. L'assorbimento di energia da parte del fotoiniziatore consente il passaggio della molecola dallo stato fondamentale a quello eccitato;
- Un diluente reattivo che partecipa alla reazione di polimerizzazione e consente di controllare la viscosità della formulazione;
- Un oligomero, in genere un monomero multifunzionale in grado di reticolare;
- Additivi aggiunti per conferire proprietà specifiche al polimero (ad esempio pigmenti o stabilizzatori).

In base al meccanismo di reazione, la fotopolimerizzazione per addizione può essere radicalica o ionica (che a sua volta può essere cationica o anionica).

Per la reticolazione degli idrogeli oggetto di questa Tesi si è utilizzata la fotopolimerizzazione per addizione radicalica. In base al tipo di reazione che sviluppa le specie radicaliche, si distinguono due classi di fotoiniziatori:

- Fotoiniziatori di tipo Norrish I: dalla fotolisi dei legami carbonio-carbonio in posizione alfa ad un gruppo carbonilico si generano due radicali primari, come mostrato in Figura 1.7²⁸⁻³⁰. In seguito alla scissione omolitica intermolecolare sul carbonio α (definita α -cleavage), i radicali formati sono in grado di iniziare la reazione di polimerizzazione a catena.

Appartengono a questa tipologia di fotoiniziatori i composti carbonilici aromatici che presentano sostituenti adatti all'assorbimento della luce come i benzil-chetali, gli α -amminochetoni e gli ossidi di acilfosfina³¹. Studi specifici hanno constatato che alcuni fotoiniziatori, come Irgacure 2959, non presentano effetti citotossici³².

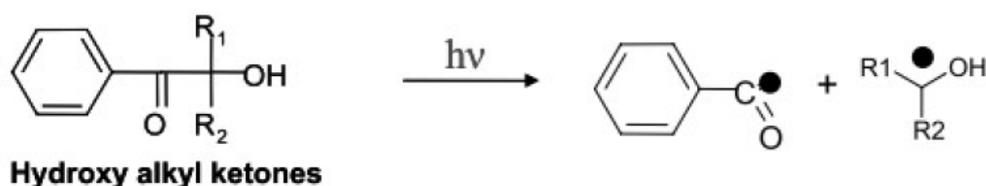


Figura 1.7 Formazione dei radicali in un fotoiniziatore di tipo Norrish I

- Fotoiniziatori di tipo Norrish II: la generazione di radicali è frutto dell'interazione tra la molecola di iniziatore, allo stato di tripletto, e una molecola in grado di comportarsi da donatore di idrogeno (coiniziatore). L'iniziatore assorbe la luce e passa ad uno stato eccitato: il biradicale ottenuto è in grado di estrarre idrogeno dalla molecola donatrice, diventando così un radicale (che tenderà presto a dimerizzare) e formando a sua volta un radicale sulla molecola donatrice, da cui inizierà la polimerizzazione vera e propria. Il processo è schematizzato in Figura 1.8³⁰. Le ammine terziarie alifatiche (come la imetiletanolammina o la trietanolanmina) sono state a lungo impiegate come coiniziatori, mentre oggi si utilizzano prevalentemente ammine aromatiche, più efficienti e meno volatili rispetto a quelle alifatiche³³. Ne sono esempi il canforochinone e i benzonfenoni³⁴.

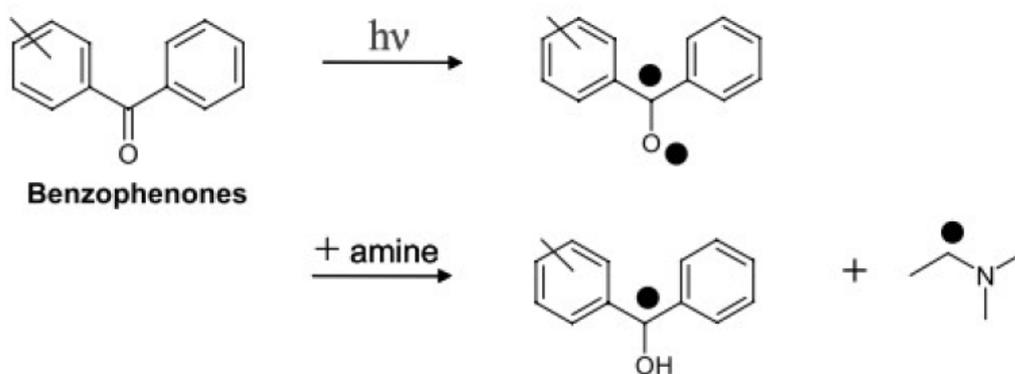


Figura 1.8 Formazione dei radicali in un fotoiniziatore di tipo Norrish II

Per questo lavoro di Tesi è stato impiegato il BAPO-OH, fotoiniziatore che assorbe nel campo del visibile, ottenuto dal trattamento del fotoiniziatore commerciale BAPO (reso idrosolubile grazie all'aggiunta di gruppi -OH). La struttura del BAPO-OH è riportata in Figura 1.8³⁵.

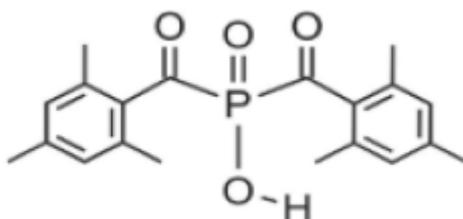


Figura 1.9 Struttura del fotoiniziatore BAPO-OH

1.3. Applicazioni biomediche

Grazie alle caratteristiche precedentemente elencate, gli idrogeli costituiti da polimeri naturali trovano applicazione in ambito biomedico, ambientale (ad esempio in qualità di adsorbenti per il trattamento di fanghi e acque reflue) ed agricolo (per il rilascio di prodotti agrochimici e come riserve di acqua)⁹. In particolare, nell'ambito biomedico gli idrogeli vengono utilizzati come lenti a contatto, ma anche nel rilascio controllato di farmaci e nell'ingegneria dei tessuti. Per queste applicazioni risulta di notevole importanza la possibilità di preparare idrogeli sensibili alle variazioni di pH³⁶, temperatura³⁷, concentrazione di glucosio³⁸, luce³⁹ e pressione⁴⁰.

Attualmente gli idrogeli stanno destando interesse crescente come matrici per l'ingegneria tissutale, che si impiega per la generazione e sostituzione *in vivo* del tessuto danneggiato in sostituzione al trapianto (complicato, considerando le difficoltà nel reperire organi e tessuti sani di donatori compatibili). Alcuni idrogeli presentano infatti proprietà simili a quelli della matrice extracellulare e sono in grado di favorire la rigenerazione dei tessuti e la proliferazione cellulare. Nello specifico, gli idrogeli preparati per queste applicazioni devono presentare pori di dimensione sufficiente per ospitare cellule viventi oppure devono degradare in modo controllato rilasciando fattori di crescita. Un altro requisito fondamentale è che il prodotto finale sia puro e privo di residui non reagiti o tossici.

Tra i principali vantaggi offerti dall'utilizzo degli idrogeli in campo biomedico vi sono l'ottima capacità di trasporto dei nutrienti alle cellule e la possibilità di apportare modifiche chimiche al polimero per legare in modo ottimale le cellule, favorendo così l'adesione e la crescita di queste ultime all'interno della matrice dell'idrogelo. Questi sistemi possono inoltre essere iniettati *in vivo* in forma liquida, per poi gelificare alla temperatura corporea una volta inoculati. In alternativa, è possibile preparare idrogeli nella forma di micro o nanoparticelle (*nanogels*). Sussistono tuttavia alcune problematiche che ad oggi limitano l'utilizzo degli idrogeli: queste sono principalmente legate alla scarsa resistenza meccanica e difficile maneggiabilità di questi sistemi, a cui si aggiungono le difficoltà legate alla sterilizzazione.

2. Vetri bioattivi

I vetri bioattivi sono materiali ceramici amorfi particolarmente interessanti per l'applicazione nel campo dell'ingegneria tissutale, grazie alla loro degradazione controllata e alla capacità di stimolare la formazione di nuovo tessuto⁴¹. A partire dal 1969, questi sistemi furono oggetto degli studi di Larry Hench, il quale mise a punto 45S5 Bioglass®. Questo vetro bioattivo, di composizione 45%mol SiO₂ - 24.5%mol Na₂O - 24.5%mol CaO - 6%mol P₂O₅, si è rivelato in grado di creare un legame all'interfaccia con il tessuto osseo in condizioni fisiologiche, portando alla formazione di uno strato di idrossiapatite (chimicamente simile alla fase minerale dell'osso). Nei successivi studi, modificando il sistema originale studiato da Hench, sono stati prodotti diversi tipi di vetri (e vetroceramici) con composizioni ottimizzate per specifiche applicazioni cliniche (non solo rivolte al tessuto osseo, ma anche per i tessuti molli)⁴².

Tra le principali proprietà di un materiale bioattivo vi sono la capacità di legarsi ai tessuti viventi e stimolare una risposta da parte dell'organismo attraverso il rilascio di ioni. La grande versatilità composizionale offerta dai sistemi vetrosi consente inoltre di scegliere gli ioni con cui dopare il biovetro: in base al tipo di ione rilasciato dal vetro e alla sua concentrazione è possibile ottenere sistemi con diverse proprietà. Ad esempio, la capacità di stimolare l'osteogenesi è correlata al rilascio degli ioni Si⁴⁺ e Ca²⁺, in grado di stimolare la differenziazione e la proliferazione degli osteoblasti e regolare l'omeostasi dell'osso. Inoltre, i biovetri contenenti più del 25%mol di CaO in combinazione con P₂O₅ hanno trovato maggior impiego a livello commerciale, grazie alla maggior mineralizzazione associata a queste composizioni. Modulando la concentrazione degli ioni formatori e modificatori dei biovetri, è inoltre possibile controllare le proprietà degli stessi, in particolare la cinetica di degradazione, la reattività superficiale e la risposta biologica.

I principali requisiti che i vetri devono soddisfare per essere impiegati come biomateriali sono⁴³:

- Biocompatibilità, atossicità e capacità di promuovere la proliferazione cellulare, favorendo l'adesione delle cellule;
- Le fasi cristalline che si formano in seguito al trattamento termico dei biovetri per la produzione di scaffold non devono avere effetti citotossici o inibire la bioattività del sistema;
- A contatto con la soluzione fisiologica simulata si deve osservare la formazione di uno strato di idrossiapatite;
- Le proprietà meccaniche del biovetro devono essere simili a quelle del tessuto sostituito e tali da sopportare gli sforzi a cui è sottoposto durante le attività ordinarie del paziente;
- Per le applicazioni ortopediche è necessario il controllo della porosità per ottenere una struttura tridimensionale che favorisca la proliferazione cellulare, la vascolarizzazione e la diffusione dei nutrienti;
- Per estenderne le applicazioni a livello commerciale, è necessario minimizzare i costi del biomateriale.

Nell'ottica di ottimizzare l'interazione tra il biomateriale e l'organismo, sono poi state messe a

punto nanoparticelle di vetro bioattivo: aumentando la superficie disponibile per il contatto, questi sistemi presentano una maggiore reattività ed i processi rigenerativi risultano accelerati. Il metodo più utilizzato per la sintesi di nanoparticelle a base di silice contenenti ioni modificatori è il metodo di Stöber. Questo metodo (parzialmente modificato) è stato utilizzato per la sintesi di entrambi i vetri aggiunti agli idrogeli oggetto della Tesi (Cap 2.1.2.1).

2.1. Sintesi dei vetri bioattivi

Il controllo sul processo di sintesi dei vetri è importante per la regolazione della composizione e delle proprietà morfologiche del prodotto. Oltre al metodo tradizionale di fusione, i biovetri vengono frequentemente sintetizzati con il metodo sol-gel.

2.1.1. Fusione

La tecnica tradizionale per la sintesi del vetro prevede la fusione di una miscela stechiometrica di precursori inorganici (tipicamente ossidi e carbonati ad elevata purezza, macinati fino ad ottenere delle polveri) che vengono fusi ad alte temperature (oltre 6 ore a 1500°C). Una volta ottenuta una massa fluida omogenea, si passa all'affinazione (discesa lenta a 1200°C in 12 ore, in cui si eliminano eventuali gas residui), seguita dai passaggi di formatura e ricottura (riscaldamento a $T \approx T_g$ (temperatura di transizione vetrosa) per eliminare le tensioni residue). Determinante per l'ottenimento del vetro è la velocità di raffreddamento della massa fluida, che deve essere maggiore rispetto alla sua velocità di cristallizzazione per impedire la formazione di fasi cristalline ed ottenere un network completamente amorfo. Il vetro ottenuto per raffreddamento da fuso che è destinato ad applicazioni ortopediche ha in genere un contenuto di silice inferiore al 60%mol, per consentire il legame tra il biomateriale e l'osso.

Qualora anziché un vetro si voglia sintetizzare un vetroceramico, è necessario aggiungere due ulteriori passaggi al procedimento⁴⁴. Il primo step prevede il riscaldamento del materiale a $T > T_g$ per un tempo sufficiente a consentire la formazione di nuclei nel vetro. Successivamente il sistema viene portato a temperature vicine al punto di rammollimento e si assiste alla crescita di cristalli attorno ai nuclei. Un generico diagramma temperatura vs tempo del processo che porta all'ottenimento di un vetroceramico a partire dalla fusione di precursori è riportato in Figura 2.1⁴⁴.

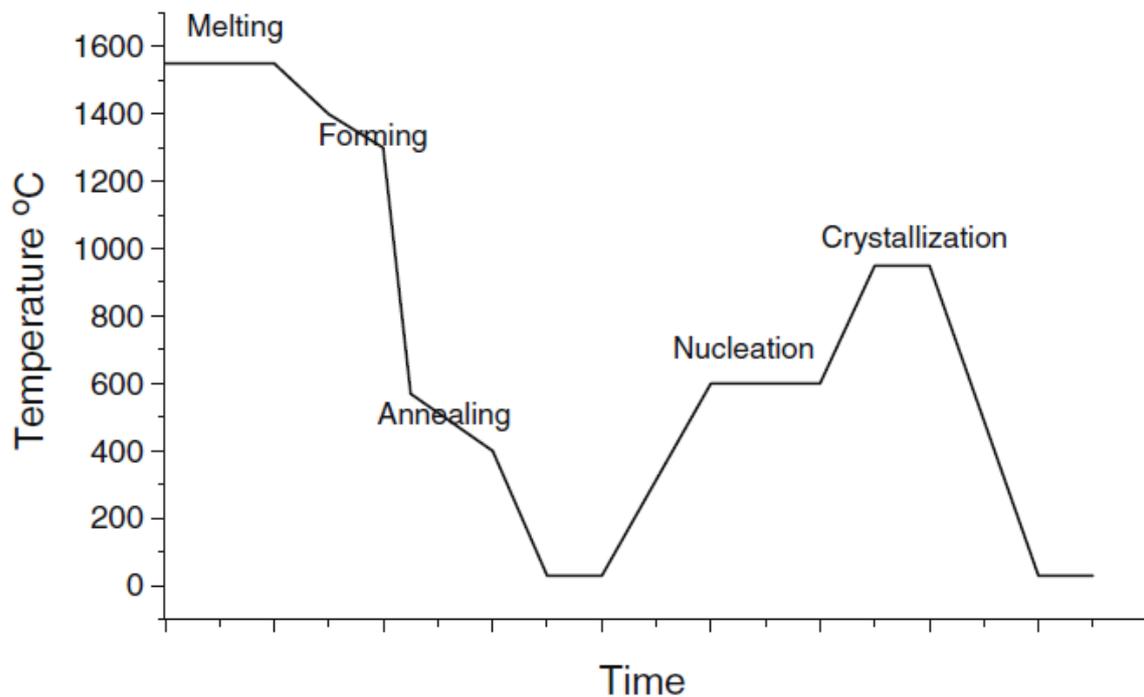


Figura 2.1 Diagramma temperatura vs tempo del processo che porta all'ottenimento di un vetroceramico

2.1.2. Metodo sol-gel

Utilizzato per la prima volta alla fine degli anni Ottanta da Li, il metodo sol-gel permette di produrre vetri che presentano bioattività *in vitro* per composizioni contenenti fino al 90%mol di SiO_2 .

Questo metodo consente la sintesi di vetri bioattivi con composizione analoga a quella ottenibile con le tecniche tradizionali, mantenendo però bassa la temperatura operativa⁴⁵. Il processo, che prevede le reazioni di idrolisi e condensazione di precursori (alcossidi o sali di metalli), è infatti condotto alla temperatura e alla pressione ambientali.

La tecnica sol-gel consente di ottenere, con l'aiuto di un surfattante, un *gel* (sistema bifasico costituito da una componente solida ed una liquida) a partire da un *sol* (dispersione di particelle colloidali in un liquido). Nello specifico, i passaggi caratteristici sono⁴⁶:

- Miscela dei precursori;
- Idrolisi dei precursori in acqua deionizzata: si formano silanoli $\text{Si}(\text{OH})_4$ che, interagendo tra loro, condensano formando legami Si-O-Si ed originano il network di silice;
- Gelazione: la viscosità del sistema aumenta;
- Invecchiamento: consente la diminuzione della porosità e conferisce al sistema migliori proprietà meccaniche;

- Essiccamento a 150-180°C per 3-6 ore;
- Calcinazione per stabilizzare il sistema, a 600-700°C per 2-5 ore.

La temperatura e la durata dei diversi step possono essere regolate per ottimizzare le proprietà dei biovetri in base alla specifica applicazione finale. Fondamentale è la scelta del catalizzatore: mentre la catalisi acida consente la sintesi di un sistema interconnesso tridimensionale, conducendo la reazione in ambiente basico si ottengono vetri in forma particellare⁴⁷.

A livello chimico, con la reazione di idrolisi il gruppo -OR viene sostituito da -OH in seguito all'attacco nucleofilo degli OH⁻ su Si⁴⁺ (come mostrato in Figura 2.2⁴⁶). In seguito, i precursori reagiscono con altri precursori idrolizzati o non: nei due casi, la condensazione produce rispettivamente acqua e alcol. In seguito alla formazione dei legami Si-O-Si, la condensazione procede e conduce alla formazione del network tridimensionale.

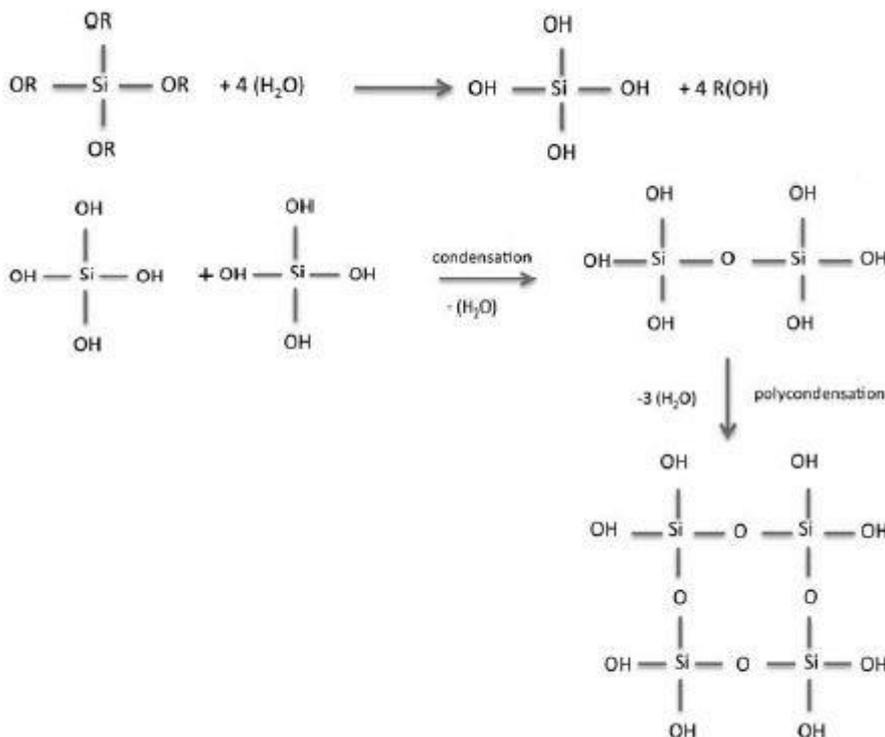


Figura 2.2 Reazioni coinvolte nella sintesi di un vetro a base silice con il metodo sol-gel

Controllando il processo di sintesi, con questo metodo è possibile ottenere strutture spugnose a porosità controllata simili a quelle dell'osso trabecolare. Inoltre, a parità di composizione, i vetri preparati con la tecnica sol-gel presentano volume dei pori e area superficiale due ordini di grandezza superiori rispetto a quelli sintetizzati per raffreddamento da fuso: queste caratteristiche conferiscono elevata reattività al biomateriale e la degradazione del sistema con formazione di idrossiapatite risulta più rapida.

Per la sintesi di nanoparticelle di vetro bioattivo si utilizzano tecniche sol-gel basate sul metodo di Stöber. Questo metodo consente di ottenere nanoparticelle sferiche in due passaggi: innanzitutto i precursori subiscono idrolisi in condizione acide, poi vengono condensate in una soluzione basica.

2.1.2.1. Metodo di Stöber

Il metodo di Stöber consente la sintesi di microsferi (o nanosferi) monodisperse di silice. Questo processo prevede l'impiego di ammoniaca o di una soluzione di idrossido di ammonio (quest'ultimo è stato il reagente utilizzato nel procedimento sperimentale seguito) come catalizzatore per la formazione di particelle sferiche. A partire dalla miscelazione di alcol (puro o una miscela), idrossido di ammonio e acqua, aggiungendo un alcossilano e mantenendo il sistema in agitazione (in un bagno ad ultrasuoni o servendosi di un agitatore magnetico) si assiste alla progressiva opacizzazione della sospensione, dapprima limpida. Ultimata l'aggiunta dei reagenti si innesca la reazione di idrolisi, che conduce alla formazione di acido silicico senza alterare visibilmente il sistema. Dopo pochi minuti ha inizio la condensazione, accompagnata dalla graduale opacizzazione del sistema, fino ad ottenere una sospensione di colore bianco. Di seguito si procede ad una centrifugazione per separare le particelle vetrose, che vengono poi lavate con metanolo, essiccate (a circa 60°C) ed infine calcinate ad alta temperatura.

Per sintetizzare vetri più complessi, è possibile aggiungere alla soluzione in agitazione i precursori degli altri ioni: questo passaggio può però comportare l'alterazione della carica superficiale delle particelle di silice, provocando aggregazione ed irregolarità nella forma e nelle dimensioni dei vetri. Per ovviare a queste problematiche, si possono adottare alcuni accorgimenti legati ad esempio alla quantità di precursore introdotto (il rapporto Ca/Si non deve essere superiore a 2) e alle tempistiche dell'aggiunta. Un'altra possibilità è procedere alla sintesi partendo dalla preparazione di due soluzioni distinte (ad esempio una a base di etanolo e TEOS, l'altra a base di acqua, etanolo e NH_4OH)⁴⁸⁻⁵⁰.

I biovetri realizzati per questo lavoro di Tesi sono stati sintetizzati con il metodo di Stöber modificato. I precursori utilizzati sono ortosilicato tetraetile (TEOS) per il silicio, trietilfosfato (TEP) per il fosforo, nitrato di calcio tetraidrato per il calcio, nitrato di rame triidrato per il rame e acido bórico per il boro.

2.2. Ruolo degli ioni nelle applicazioni biomediche

Modificando la composizione del vetro, è possibile inserire ioni aventi un effetto terapeutico per la specifica applicazione di interesse. A partire dalla composizione messa a punto da Hench ($\text{SiO}_2 - \text{Na}_2\text{O} - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$) si è studiato il comportamento di sistemi additivati con elementi come boro, rame, stronzio, zinco, argento e magnesio. Questi ioni si sono infatti rivelati partecipanti nell'attività metabolica dell'osso e sono in grado di favorire l'angiogenesi, la crescita e la mineralizzazione del tessuto osseo. Gli ioni metallici agiscono inoltre da cofattori enzimatici: queste proprietà rendono i vetri bioattivi dopati particolarmente interessanti per l'impiego come agenti terapeutici nel campo dell'ingegneria dei tessuti.

Il Si^{4+} , oltre ad essere tradizionalmente lo ione formatore del vetro, è un elemento essenziale per i processi metabolici associati alla formazione e calcificazione del tessuto osseo⁵¹. Analisi *in vitro* hanno evidenziato la capacità di questo ione di inibire la formazione degli osteoclasti ed il riassorbimento osseo, secondo meccanismi inter- e intracellulari⁵². Il silicio è inoltre in grado di indurre la precipitazione di idrossiapatite e di influenzare il processo di rinnovamento del collagene. Infine, l'acido ortosilicico $\text{Si}(\text{OH})_4$ si è rivelato in grado di stimolare la formazione di collagene di tipo I negli osteoblasti umani e la differenziazione osteoblastica; studi *in vitro* hanno inoltre dimostrato che la combinazione di $\text{Si}(\text{OH})_4$ con fattori di crescita concentrati promuove in modo efficiente la rigenerazione tissutale⁵³.

Soprattutto nei biovetri per applicazioni ortopediche è frequente la presenza di calcio e fosforo: questi sono infatti i costituenti dell'idrossiapatite e giocano un ruolo importante nella generazione e nel riassorbimento osseo.

Nello specifico, il calcio favorisce la proliferazione degli osteoblasti e la mineralizzazione della matrice extracellulare, oltre ad attivare i recettori del calcio degli osteoblasti e stimolare la produzione dei fattori di crescita. È emerso che effetti di questo tipo si riscontrano per concentrazioni basse e medie di Ca^{2+} , mentre concentrazioni superiori a 10mM sono risultate citotossiche⁵⁴.

Essendo il pentossido di fosforo (P_2O_5) formatore del vetro, così come l'ossido di silicio (SiO_2) e il triossido di boro (B_2O_3), è possibile diminuire la percentuale di SiO_2 (composto estraneo all'organismo) e sostituirla con gli altri formatori. In particolare, sono stati messi a punto vetroceramici fosfati (Bioverit® III) il cui network è costituito da unità a base fosfato. I vetri fosfati sono costituiti da tetraedri di PO_4 in cui, come mostrato in Figura 2.3, ogni atomo di P è legato con un legame singolo a tre ossigeni pontanti e con un legame doppio ad un quarto atomo di O⁵⁵.

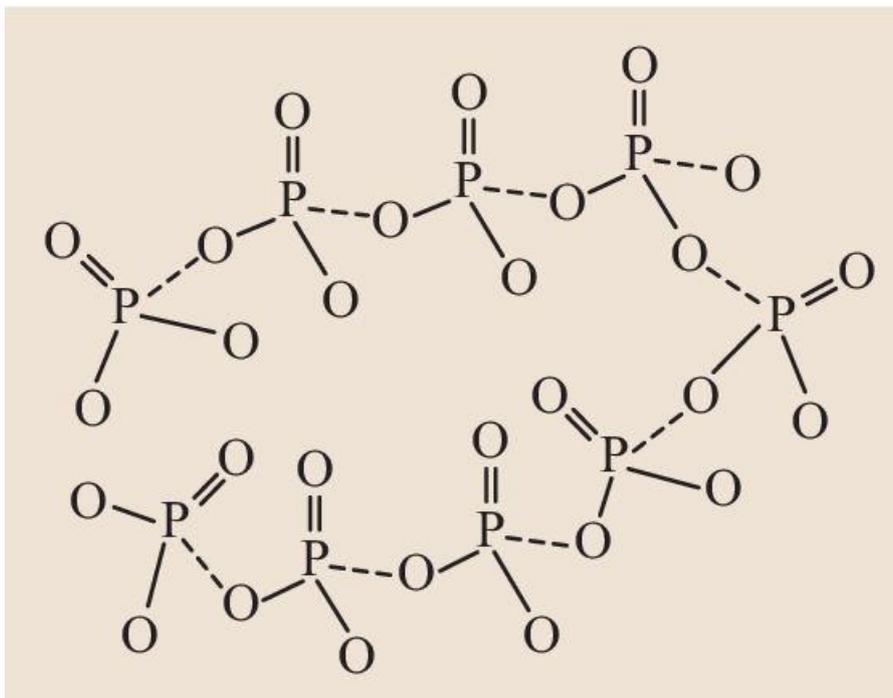


Figura 2.3 Struttura di un vetro fosfato

I vetri e vetroceramici fosfati offrono possibilità di sviluppo in varie direzioni: aggiungendo Al_2O_3 si ottengono vetroceramici bioattivi stabili a lungo termine, mentre l'aggiunta di Na_2O consente di ottenere vetri e vetroceramici biorisorbibili. Una problematica importante nei biomateriali come Bioverit® III è l'ottenimento di un sistema dalle buone proprietà meccaniche ma che sia allo stesso tempo biocompatibile e bioattivo⁵⁶. Per rispondere a questa esigenza sono stati studiati sistemi compositi, in cui l'aggiunta di una seconda fase consente il miglioramento delle proprietà meccaniche del materiale. Ad esempio, la zirconia parzialmente stabilizzata con ittrio (Y-PSZ), biocompatibile e chimicamente compatibile con il vetroceramico, grazie al suo effetto tenacizzante è stata aggiunta con successo a sistemi del tipo Bioverit®.

Uno dei due tipi di biovetro sintetizzati per questa Tesi è stato arricchito con B_2O_3 e CuO , mentre il vetro di controllo è un sistema SiO_2 - CaO - P_2O_5 .

Il boro è un elemento presente in traccia nell'organismo, quindi i suoi effetti si possono osservare solamente quando la concentrazione dello ione cade all'interno di un certo intervallo. In particolare, dagli studi di Brown è emerso che l'aggiunta di B_2O_3 in un biovetro 45S5 in quantità superiore ad un terzo del contenuto di silice comporta l'inibizione della proliferazione cellulare⁵⁷. Gli studi di Wu sui vetri bioattivi mesoporosi hanno inoltre evidenziato come, rilasciando B^{3+} in modo controllato, gli scaffold vetrosi contenenti boro siano capaci di stimolare l'espressione genica (Col I e Runx2) e la proliferazione degli osteoblasti⁵⁸.

Il boro gioca un ruolo importante nella stimolazione della riparazione delle ferite e delle ossa in vivo. Alla parziale sostituzione della silice con B_2O_3 nel biovetro sono inoltre correlati l'aumento della bioattività del sistema e la riduzione delle tempistiche richieste per la formazione di idrossiapatite^{59,60}. Sfruttando la bioattività ed il rapido rilascio ionico dei vetri borati, è possibile utilizzare con successo tali biomateriali nella riparazione dei tessuti molli, grazie al loro potere antibatterico ed alla capacità di stimolare il rilascio di fattori di crescita vascolari. Questi materiali rappresentano un ottimo substrato per l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare *in vivo*, oltre a favorire l'angiogenesi e la rivascolarizzazione dei tessuti⁶¹.

Come il boro, anche il rame è un elemento presente in traccia nell'organismo. Il rame, oltre a partecipare all'attività di alcuni enzimi indispensabili per il normale funzionamento dell'organismo, ha la capacità di stimolare l'espressione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF)⁶²⁻⁶⁵. Gli studi sull'effetto di questo ione ne hanno infatti evidenziato la capacità di incrementare l'angiogenesi *in vivo* e di stimolare la proliferazione delle cellule endoteliali.

Molti materiali per applicazione biomedica sono dopati con il rame per sfruttare la capacità di questo ione di partecipare alla deposizione del collagene, alle attività cellulari ed alla proliferazione degli osteoblasti, oltre alle sue proprietà antibatteriche ed angiogeniche^{66,67}. Il meccanismo alla base del potere battericida del rame non è ancora stato compreso nel dettaglio, ma si suppone che sia legato alla taglia dello ione, che risulta sufficientemente piccola da riuscire a distruggere la membrana cellulare dei batteri ed impedire il funzionamento degli enzimi⁶⁸.

Oltre alla comparsa dell'effetto antinfiammatorio, l'aggiunta di rame nel vetro per applicazioni biomediche comporta l'aumento della durabilità chimica e delle proprietà meccaniche del materiale. È stato inoltre osservato che la bioattività dei vetri dopati con Cu^{2+} dipende dalla

concentrazione dello ione. Biomateriali molto ricchi di rame sono infatti in grado di inibire la formazione di apatite e, quando immersi in soluzione fisiologica, l'aumento del pH della soluzione è minore rispetto a quello misurato nel caso di sistemi meno dopati⁶⁹.

3. Materiali e metodi

In questo capitolo verranno innanzitutto descritti i procedimenti operativi seguiti per la realizzazione degli idrogeli. Nell'ordine, verranno approfonditi i processi di funzionalizzazione dei polimeri (sia gelatina che cellulosa carbossimetilata), la sintesi dei biovetri (sia S4 che S4BCu) ed infine la preparazione degli idrogeli. Per questo lavoro di Tesi, per ogni accoppiamento polimero/biovetro sono stati realizzati idrogeli con diverso contenuto di ceramico; complessivamente le composizioni preparate sono 14.

Nella seconda parte di questo capitolo verranno illustrate le strumentazioni e le tecniche impiegate per le analisi realizzate sugli idrogeli. I risultati ottenuti saranno riportati nel capitolo successivo.

3.1. Metacrilazione del polimero

3.1.1. Sintesi della gelatina metacrilata (GelMA)

Per la sintesi degli idrogeli a base di gelatina (Gel) è innanzitutto necessario procedere alla metacrilazione del sistema, per fornire a Gel i gruppi funzionali fotosensibili che consentiranno la fotoreticolazione. Il processo prevede la reazione dei gruppi ossidrilici ed amminici della gelatina con l'anidride metacrilica, come riportato schematicamente in Figura 3.1: i motivi peptidici presenti nella struttura (utili per le applicazioni biomediche, come accennato nel Paragrafo 1.1.1.1.1) vengano mantenuti anche dopo la metacrilazione⁷⁰.

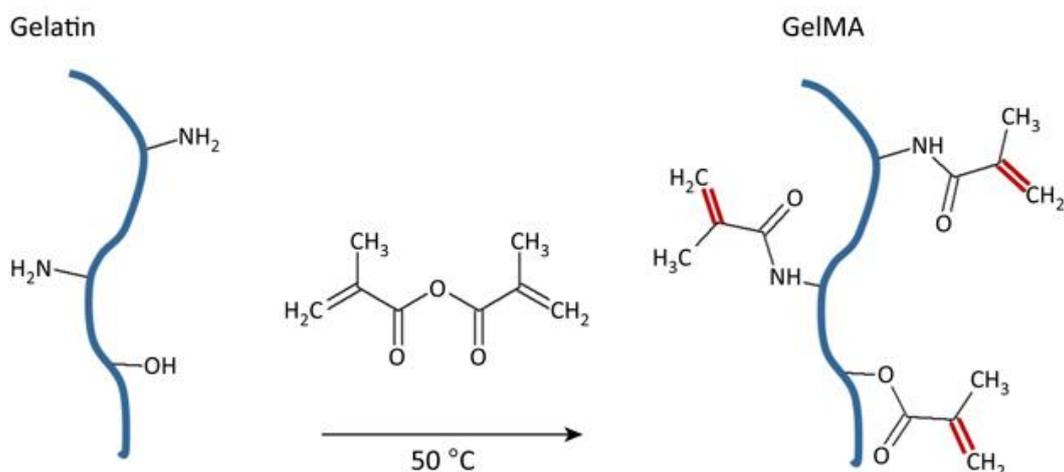


Figura 3.1 Schema della metacrilazione della gelatina

Per funzionalizzare il polimero si è proceduto alla solubilizzazione di 10 g di gelatina di pesce in 200 ml di acqua distillata. Come mostrato in Figura 3.2, il processo è stato condotto in un

pallone immerso in un bagno di acqua mantenuto a 50°C da una piastra riscaldante controllata da una termocoppia; un'ancoretta magnetica ha assicurato la miscelazione del sistema. La solubilizzazione è avvenuta in meno di un'ora.

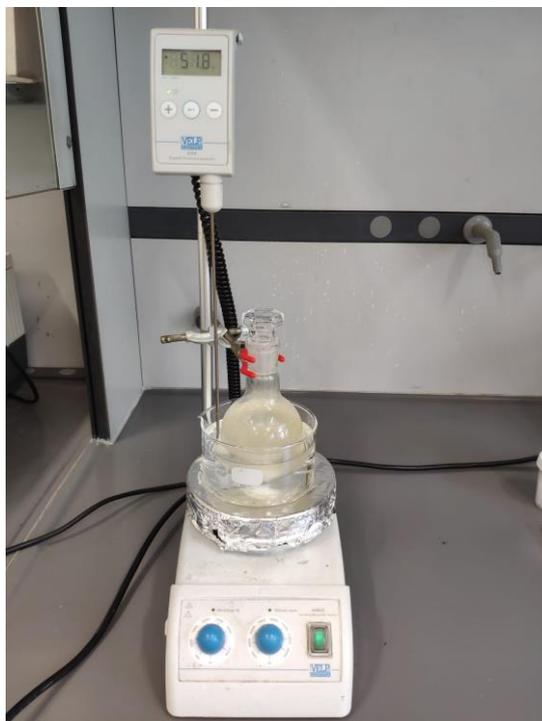


Figura 3.2 Solubilizzazione della gelatina

Una volta sciolta la gelatina, alla soluzione sotto agitazione a 50°C si sono aggiunti 7,25 ml di anidride metacrilica (MA) goccia a goccia (servendosi di una pipetta graduata con porcellino) e 5 grani di NaOH. La reazione ha durata pari a tre ore, durante le quali la soluzione è stata mantenuta a pH 8 mediante periodiche aggiunte di grani di NaOH nel pallone, per contrastare la tendenza all'acidificazione dovuta alla formazione dell'acido metacrilico.

Terminata la reazione, la soluzione così ottenuta è stata introdotta in membrane per dialisi (il cui peso molecolare cut-off è 14000 Da) che sono state lasciate immerse in acqua distillata per tre giorni, con agitazione molto lenta e sostituendo l'acqua quotidianamente (Figura 3.3a). Infine, la soluzione è stata versata in piastre di Petri, che sono poi state lasciate sotto cappa ad essiccare.

Terminato il processo, la GelMA è stata staccata dalle piastre grattando vigorosamente con una spatola: si sono quindi ottenute scaglie di gelatina funzionalizzata (in Figura 3.3b) da cui partire per la preparazione degli idrogeli.

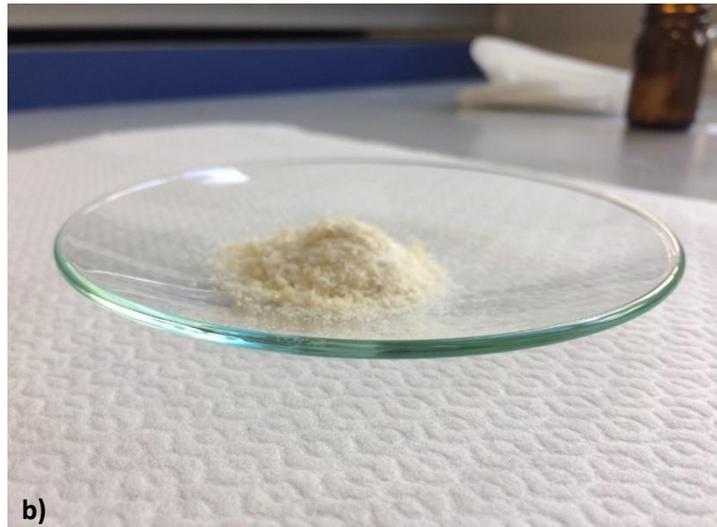


Figura 3.3 a) Dialisi della soluzione di gelatina metacrilata b) Gelatina metacrilata

3.1.2. Sintesi della cellulosa metacrilata (M-CMC)

La produzione di idrogeli fotopolimerizzabili a base di carbossimetilcellulosa (CMC) richiede la presenza di gruppi funzionali sensibili alla luce UV; affinché avvenga la fotoreticolazione, la CMC deve quindi essere funzionalizzata. La reazione è schematizzata in Figura 3.4⁷¹.

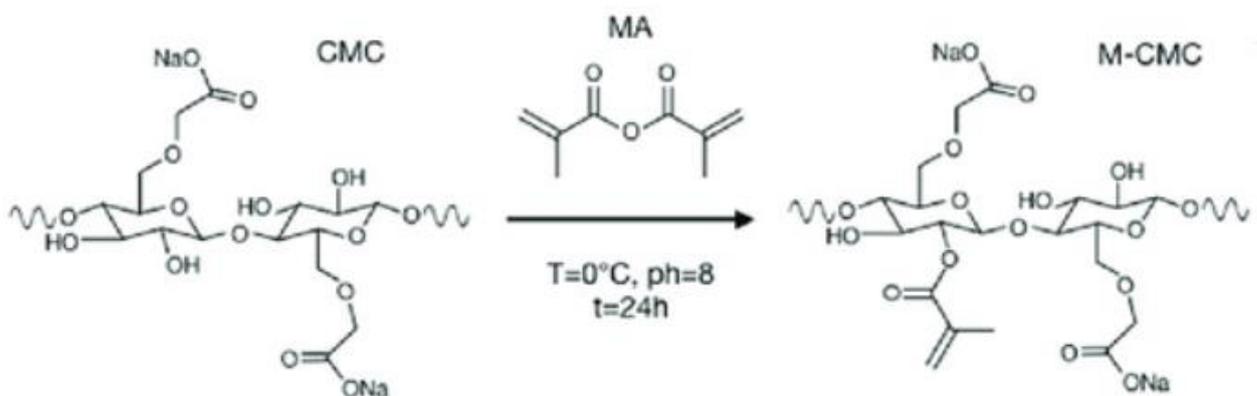


Figura 3.4 Schema della metacrilazione della CMC

Per la sintesi della carbossimetilcellulosa metacrilata (M-CMC) si è innanzitutto proceduto alla solubilizzazione della CMC. Un pallone contenente 400 ml di H₂O distillata è stato fissato con un morsetto in modo da rimanere sospeso all'interno di un bagno d'acqua, facendo sì che l'acqua contenuta nel pallone risultasse interamente immersa nel bagno (Figura 3.5). Quest'ultimo è stato mantenuto a 50°C da una piastra riscaldante controllata da una termocoppia immersa nel bagno stesso. Mentre l'agitazione del sistema è assicurata da un'ancoretta magnetica, si è proceduto ad aggiungere lentamente 8 g di CMC nel pallone. Si sono infine aggiunti nel pallone 6 pellet di NaOH per favorire la solubilizzazione della CMC.

Questo sistema è stato quindi mantenuto in agitazione ed in temperatura fino alla completa solubilizzazione della cellulosa, che è avvenuta in circa due ore.



Figura 3.5 Solubilizzazione della CMC

Una volta solubilizzata la cellulosa e riportato il sistema, sempre sotto agitazione, a temperatura ambiente, il pallone è stato messo in un bagno con ghiaccio (Figura 3.6). Raffreddata la soluzione, si sono aggiunti nel pallone 16 ml di anidride metacrilica (MA) goccia a goccia, servendosi di una pipetta graduata con porcellino. Dal momento in cui l'aggiunta della MA è ultimata, per le 24 ore successive il sistema è mantenuto a 0°C, con periodiche aggiunte di una soluzione 3 M di NaOH per controllare il pH della soluzione, che deve essere pari a 8. Il processo prevede infatti la formazione di acido metacrilico ed il conseguente abbassamento del pH, che se non venisse bilanciato condurrebbe al blocco della reazione.



Figura 3.6 Metacrilazione della CMC, condotta a 0°C

Terminata la reazione si è proceduto alla precipitazione in etanolo della cellulosa. Come rappresentato in Figura 3.7, versando a filo la soluzione presente nel pallone in un becher contenente 400 ml di EtOH, si è osservata la formazione istantanea di filamenti di colore bianco, che sono rimasti sospesi nella parte medio-alta del becher. Sul fondo si sono invece accumulati residui di MA non reagita e l'acido metacrilico prodotto nella reazione di funzionalizzazione. I fiocchi di M-CMC così ottenuti sono poi stati nuovamente solubilizzati in acqua distillata.

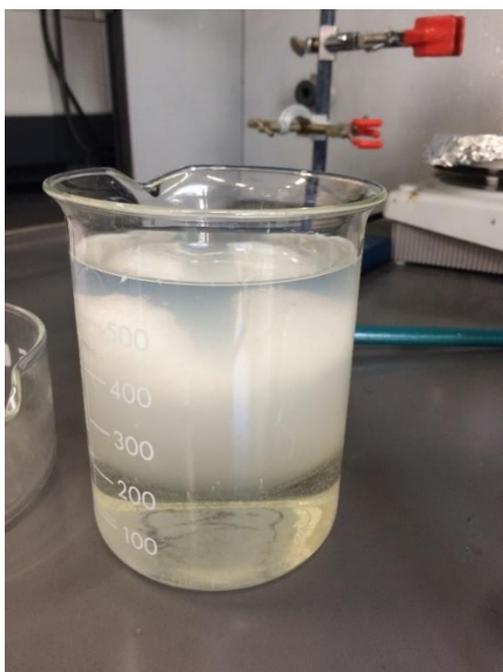


Figura 3.7 M-CMC precipitata in etanolo

La soluzione prodotta è poi stata introdotta in membrane per dialisi. I sistemi così formati sono rimasti immersi in acqua distillata per 3 giorni, con un ricambio d'acqua quotidiano. Nello specifico, dopo alcuni casi di lacerazione delle membrane, è stato talvolta necessario modificare la procedura ed interrompere la dialisi al secondo giorno per prevenire la rottura delle membrane, visibilmente sottoposte ad una pressione troppo elevata. La Figura 3.8 rappresenta una membrana contenente la soluzione di M-CMC al termine della dialisi.



Figura 3.8 Membrana contenente la soluzione di M-CMC al termine della dialisi

Dopo la dialisi, la soluzione di M-CMC è pronta per essere liofilizzata. La liofilizzazione è stata realizzata sulla soluzione precedentemente congelata, utilizzando il liofilizzatore 5PASCAL modello LIO5P DIGITAL riportato in Figura 3.9a. La Figura 3.9b rappresenta il prodotto finale liofilizzato.

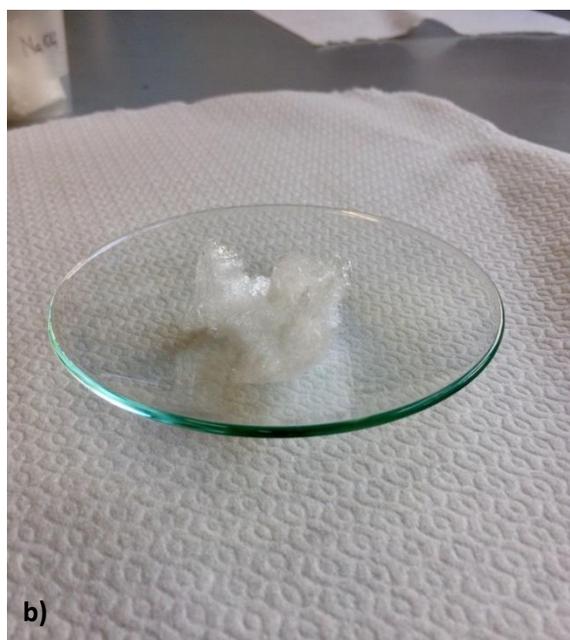


Figura 3.9 a) Liofilizzatore *b)* M-CMC liofilizzata

3.2. Sintesi dei vetri bioattivi

Per questo lavoro di Tesi sono stati preparati due tipi di vetro, seguendo il metodo di Stöber modificato. La composizione dei due biovetri è riportata in Tabella 3.1: mentre il vetro S4 è “di controllo”, il vetro S4BCu è dopato con ioni rame e boro (che, come spiegato nel paragrafo 2.2, risultano interessanti nelle applicazioni biomediche).

VETRO	COMPOSIZIONE %wt				
	SiO₂	P₂O₅	CaO	CuO	B₂O₃
S4	77	9	14	-	-
S4BCu	62	9	9	5	15

Tabella 3.1 Composizione dei vetri bioattivi

3.2.1. Biovetro S4

Per la sintesi del biovetro S4 si è innanzitutto proceduto alla preparazione di due soluzioni, di seguito identificate come soluzione I e soluzione II.

Soluzione I:

- 46 ml H₂O bidistillata;
- 30 ml EtOH;
- 17 ml NH₄OH (al 28-30%).

Soluzione II:

- 93 ml EtOH;
- 11,2 ml TEOS.

Una volta preparata la soluzione II, questa è stata mantenuta in agitazione per 30 minuti grazie ad un'ancoretta magnetica prima di procedere all'aggiunta della soluzione I nella soluzione II. Il sistema così ottenuto è stato miscelato per ulteriori 30 minuti. In pochi minuti, la sospensione si opacizza e diventa di colore bianco (indice della formazione delle nanoparticelle di silice), come mostrato in Figura 3.10a.

Successivamente si è proceduto alla centrifugazione della sospensione a 7000 rpm per 5 minuti per rimuovere i solventi utilizzati: il sistema ottenuto è raffigurato in Figura 3.10b.

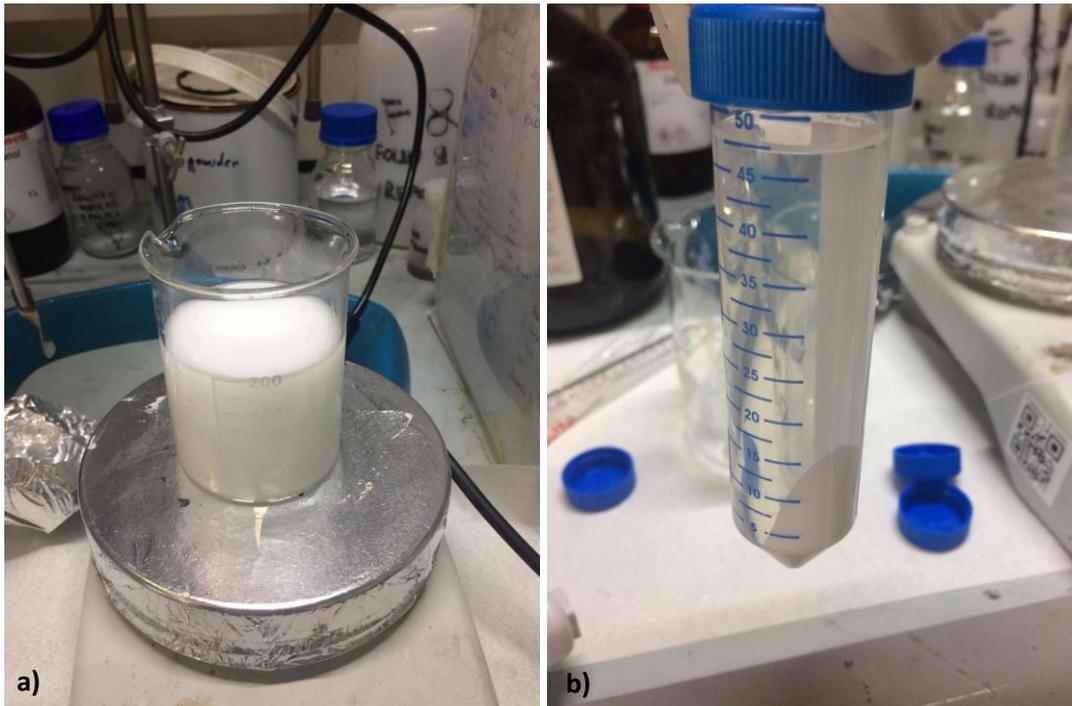


Figura 3.10 a) Soluzione prima della centrifugazione *b)* Soluzione dopo la centrifugazione, con vetri depositati sul fondo della cuvetta

Una volta rimosso l'eccesso di solvente utilizzando una pipetta, le nanoparticelle di SiO_2 ottenute sono state trasferite in un becher (insieme a poca acqua bidistillata, necessaria per evitare un'eccessiva perdita di materiale nel trasferimento dalle provette di centrifugazione al becher). Si è quindi proceduto all'aggiunta di 0,84 ml di TEP (precursore del fosforo) ed il sistema è stato mantenuto in agitazione sullo stirrer per 3 ore. Successivamente si sono aggiunti nel becher 2,31 g di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (precursore del calcio) ed il tutto è stato miscelato nuovamente per 90 minuti.

A questo punto il sistema è stato sottoposto a centrifugazione a 7000 rpm per 5 minuti. Una volta eliminato l'eccesso di solvente con una pipetta, le polveri sono state trattate in stufa a 60°C per 48 ore. In questo frangente le polveri sono state mantenute all'interno della cuvetta di centrifugazione: una volta rimosso il tappo, la cuvetta è stata coperta con un foglio di alluminio su cui sono stati praticati piccoli fori, in modo da evitare la contaminazione del campione permettendo però l'allontanamento dell'acqua residua dallo stesso (Figura 3.11).



Figura 3.11 Sistema predisposto per il trattamento in stufa

Ultimato l'essiccamento si è infine proceduto al trasferimento delle polveri in un contenitore in quarzo ed al trattamento termico di calcinazione a 700°C per 2 ore, con rampa di temperatura di 5°C/min (sia per il riscaldamento che per il raffreddamento) per rimuovere tutti i composti organici. Il prodotto ottenuto è riportato in Figura 3.12.



Figura 3.12 Biovetro S4

3.2.2. Biovetro S4BCu

Per la sintesi del biovetro S4BCu, la parte iniziale del procedimento è del tutto analoga a quella seguita per la sintesi del vetro S4. Si è quindi proceduto all'aggiunta della soluzione I nella soluzione II ed alla miscelazione del sistema per 30 minuti, seguita dalla centrifugazione a 7000 rpm per 5 minuti.

Una volta rimosso il liquido in eccesso ed ottenute le polveri di SiO_2 , si sono aggiunti al sistema 1,04 ml di TEP e si è miscelato il tutto per 3 ore sullo stirrer magnetico. Si sono poi introdotti nel becher 1,85 g di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; dopo che il sistema è stato mantenuto in agitazione per 90 minuti, si sono aggiunti 0,74 g di $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e si è proceduto alla miscelazione per ulteriori 30 minuti, per consentire l'ingresso del Cu nel network vetroso. La dispersione assume il caratteristico colore blu. Il sistema prima e dopo la centrifugazione è riportato in Figura 3.13a-b.

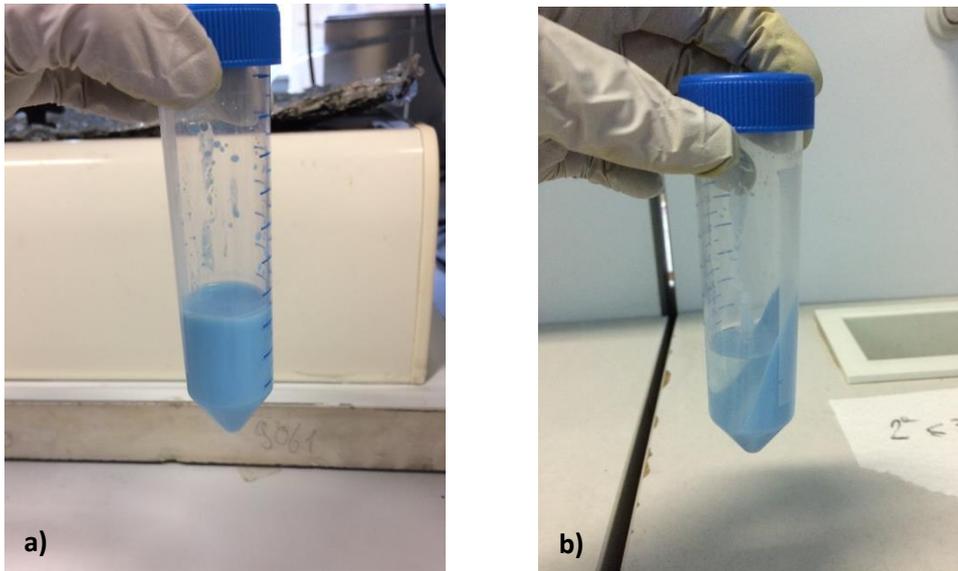


Figura 3.13 a) Sospensione prima della centrifugazione b) Sospensione centrifugata

Infine, si sono addizionati al sistema 1,30 g di H_3BO_3 (precursore del boro) e si è miscelato tutto per 30 minuti, prima di procedere alla centrifugazione della sospensione a 7000 rpm per 5 minuti. Eliminato il liquido in eccesso, le polveri all'interno della cuvetta hanno subito un primo trattamento a 60°C per 48 ore. Una volta essiccate, le polveri sono state trasferite in un crogiolo in quarzo e sottoposte ad un trattamento termico di calcinazione a 700°C per 2 ore, con rampa di temperatura di $5^\circ\text{C}/\text{min}$ sia per il riscaldamento che per il raffreddamento. Le polveri ottenute sono raffigurate in Figura 3.14.



Figura 3.14 Biovetro S4BCu

3.3. Sintesi degli idrogeli

3.3.1. Idrogeli a base di GelMA

Per la sintesi degli idrogeli a base di gelatina metacrilata si è innanzitutto proceduto alla realizzazione di una soluzione acquosa al 20%wt di GelMA, su una piastra a 50°C con agitazione assicurata da un'ancoretta magnetica. Per la sintesi degli idrogeli compositi si sono poi dispersi i biovetri (nelle quantità riportate in Tabella 3.2) nella soluzione, riportando il sistema a temperatura ambiente. Per ogni campione si è infine addizionato il fotoiniziatore BAPO-OH al 2%wt rispetto al peso della GelMA.

In seguito, con una pipetta si è disposta la dispersione (soluzione nel caso del sistema privo di biovetro) in uno stampo rettangolare di spessore 2 mm: si è quindi proceduto all'irraggiamento di intensità 114 mW/cm² per 90 secondi con una lampada UV.

Si noti che nei nomi assegnati ai campioni, la percentuale di biovetro è calcolata facendo riferimento al peso del polimero in soluzione (non al peso della soluzione intera). Ad esempio in GelMA/5% S4 il biovetro è allo 0,82%wt rispetto alla soluzione ma al $(0,08/16,47) \cdot 100 = 5\%$ wt rispetto a GelMA.

CAMPIONE	COMPOSIZIONE				
	H ₂ O [%wt]	GelMA [%wt]	Phi [%wt]	S4 [%wt]	S4BCu [%wt]
GelMA	83,06	16,61	0,33	-	-
GelMA 5% S4	82,37	16,47	0,33	0,82	-
GelMA 10% S4	81,70	16,34	0,33	1,63	-
GelMA 15% S4	81,04	16,21	0,32	2,43	-
GelMA 5% S4BCu	82,37	16,47	0,33	-	0,82
GelMA 10% S4BCu	81,70	16,34	0,33	-	1,63
GelMA 15% S4BCu	81,04	16,21	0,32	-	2,43

Tabella 3.2 Composizione degli idrogeli a base di GelMA

Nel caso dei sistemi GelMA/S4BCu, appena terminato l'irraggiamento con la fibra UV gli idrogeli assumono un colore bruno a livello della superficie esposta alla fibra (in Figura 3.15 è raffigurata la dispersione GelMA/5% S4BCu prima (a) e subito dopo (b) la fotoreticolazione). La formazione di questa pelle scura durante l'irraggiamento ostacola la penetrazione della radiazione negli strati più profondi della soluzione da reticolare e limita la profondità degli idrogeli ottenibili. Si ipotizza che questo comportamento sia dovuto alla temporanea alterazione dello stato di ossidazione del rame presente nel biovetro S4BCu (CuO infatti è di colore nero): il fenomeno risulta infatti tanto più evidente quanto più è elevata la concentrazione di biovetro nell'idrogelo. Terminata la fotoreticolazione, in pochi istanti il colore dell'idrogelo si stabilizza sul verde (Figura 3.15c).

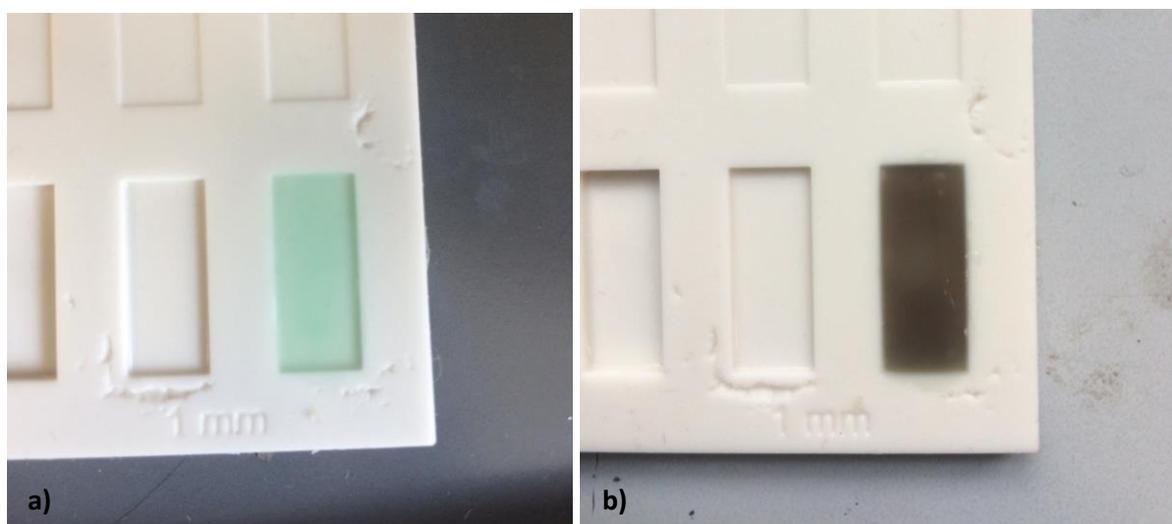




Figura 3.15 Idrogeli GelMA/5% S4: a) prima dell'irraggiamento b) subito dopo l'irraggiamento c) 10 minuti dopo la fotoreticolazione

3.3.2. Idrogeli a base di M-CMC

Per la sintesi degli idrogeli a base di cellulosa metacrilata si è proceduto in modo analogo a quanto fatto nel caso dei sistemi a base di GelMA, partendo però da una soluzione acquosa al 2%wt di M-CMC. Le composizioni dei campioni sono riportate in Tabella 3.3. Una volta aggiunto il biovetro ed il fotoiniziatore (al 2%wt rispetto al peso della M-CMC) si è proceduto alla reticolazione del sistema mediante irraggiamento con lampada UV all'intensità di 114 mW/cm² per 300 secondi.

CAMPIONE	COMPOSIZIONE				
	H ₂ O [%wt]	M-CMC [%wt]	Phi [%wt]	S4 [%wt]	S4BCu [%wt]
M-CMC	98,00	1,96	0,04	-	-
M-CMC 5% S4	97,90	1,96	0,04	0,10	-
M-CMC 10% S4	97,81	1,96	0,04	0,20	-
M-CMC 15% S4	97,71	1,95	0,04	0,29	-
M-CMC 5% S4BCu	97,90	1,96	0,04	-	0,10
M-CMC 10% S4BCu	97,81	1,96	0,04	-	0,20
M-CMC 15% S4BCu	97,71	1,95	0,04	-	0,29

Tabella 3.3 Composizione degli idrogeli a base di M-CMC

Come nel caso degli idrogeli GelMA/S4BCu, anche nei sistemi a base di M-CMC l'alterazione dello stato di ossidazione del rame presente nel biovetro S4BCu provoca la temporanea variazione cromatica dell'idrogelo. Questa volta il colore dell'idrogelo appena fotoreticolato è rosso scuro, ma in pochi istanti diventa progressivamente più chiaro fino a stabilizzarsi sul verde tenue (molto più chiaro rispetto a quello dei sistemi GelMA/S4BCu: si noti infatti in Tabella 3.1 e 3.2 che la concentrazione di biovetro negli idrogeli a base di cellulosa è molto

minore). In Figura 3.16 sono rappresentati gli idrogeli M-CMC/5% S4BCu: il primo a destra è quello reticolato per ultimo, spostandosi verso sinistra si trovano gli idrogeli reticolati precedentemente, che diventano progressivamente più chiari al passare del tempo.



Figura 3.16 Idrogeli M-CMC/5% S4BCu a diversi tempi trascorsi dal termine dell'irraggiamento. L'idrogelo più a destra è appena stato irraggiato, mentre l'ultimo a sinistra è stato reticolato oltre 10 minuti prima dello scatto della foto.

3.4. Caratterizzazione

Per verificare la corretta funzionalizzazione del polimero si è innanzitutto eseguita l'analisi spettroscopica FTIR, mentre la fotoreologia è stata impiegata per indagare la fotoreticolazione degli idrogeli. Una volta realizzati gli idrogeli si è proceduto alla loro caratterizzazione, individuandone il grado di rigonfiamento, le proprietà termiche (DSC, TGA), morfologiche (SEM) e meccaniche (prova di compressione).

3.4.1. Spettroscopia IR a trasformata di Fourier (FTIR)

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR) è una tecnica impiegata per ottenere lo spettro infrarosso di emissione o assorbimento di un campione solido, liquido o gassoso. In particolare, la spettroscopia in assorbimento consente di valutare l'entità della radiazione assorbita dal campione alle diverse lunghezze d'onda. L'analisi spettroscopica è stata realizzata sulla gelatina e sulla cellulosa prima e dopo la metacrilazione, per verificare la corretta funzionalizzazione, oltre che sui due tipi di biovetro. Per l'analisi si è impiegato lo spettrometro Nicolet iS50 FT-IR di Thermo-Scientific, riportato in Figura 3.17. I dati sono stati raccolti in modalità trasmissione ed analizzati con l'ausilio del software Omnic.



Figura 3.17 Strumentazione utilizzata per l'analisi FTIR

3.4.2. Microscopio elettronico a scansione ad emissione di campo e spettroscopia in dispersione di energia (FESEM- EDS)

Per l'analisi della morfologia dei biovetri si è utilizzato un microscopio elettronico a scansione ad emissione di campo (FESEM) SUPRATM 40, Zeiss. Si è inoltre risaliti alla composizione dei campioni di biovetro grazie all'analisi EDS (Energy Dispersive X-ray Spectrometry).

Per le analisi al FESEM-EDS è stata preparata una soluzione acquosa contenente le particelle vetrose. Successivamente una goccia di soluzione è stata posizionata su retini di rame con carbon tape (SPI Supplies Lacey Carbon Coated 200 Mesh Copper Grids) e lasciata essiccare a temperatura ambiente.

3.4.3. Fotoreologia

I test di fotoreologia sono stati realizzati con il reometro Anton Paar MCR 302 in configurazione piatto-piatto. Come mostrato in Fig. 3.18, per ogni composizione esaminata la dispersione pronta per la reticolazione è stata posizionata sulla base in vetro, sotto cui è posizionata la fibra UV (intensità 100 mW/cm^2) attivata manualmente 30 secondi dopo l'inizio di ogni prova. Una prova preliminare di amplitude sweep (a frequenza e temperatura costante) ha consentito di individuare la regione di viscoelasticità lineare, in cui il valore di G' è costante. Sulla base del risultato ottenuto, per tutte le successive analisi si è imposto uno strain amplitude pari all'1%, mentre il gap tra i piatti del reometro è stato fissato a $300 \mu\text{m}$. Le prove sono state interrotte una volta raggiunto il valore a plateau di G' , quindi dopo 250 s dall'inizio della prova per gli idrogeli a base di GelMA e dopo 325 s per i sistemi a base M-CMC.



Figura 3.18 a) Reometro utilizzato per le misurazioni; b) Posizionamento della dispersione sulla base del fotoreometro; c) Campione ottenuto al termine della prova

3.4.4. Grado di rigonfiamento

Per valutare la capacità degli idrogeli di incorporare acqua si è determinato il grado di rigonfiamento percentuale (SD%) degli idrogeli; questo è stato ottenuto, per l' i -esimo time step, secondo la Formula 3.1:

$$SD_i\% = \frac{m_i - m_0}{m_0} * 100 \quad (3.1)$$

Dove m_i è la massa dell'idrogelo all' i -esimo time step, mentre m_0 è la massa iniziale dell'idrogelo secco.

Una volta pesati gli idrogeli secchi, questi sono stati immersi in acqua distillata a 37°C. Nelle 24 ore successive si è poi proceduto, a diversi time step intermedi, alla pesata degli idrogeli. Per ogni composizione esaminata, la prova è stata realizzata in triplicato.

3.4.5. Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

La calorimetria a scansione differenziale è un metodo di analisi termica che misura, in funzione della temperatura del campione, la differenza tra i flussi termici nella sostanza e in un riferimento mentre entrambi sono sottoposti ad un programma controllato di temperatura. Lo strumento utilizzato (DSC 1 STARE System, Mettler Toledo) è rappresentato in Figura 3.19. La prova, in atmosfera di azoto, è stata condotta sull'idrogelo secco (massa compresa tra 4 e 8 mg) posto in un crogiolo di alluminio, sul cui coperchio è stato praticato un foro.

Per gli idrogeli a base GelMA si è imposto un programma di temperatura che prevede una rampa di 10°C/min fino a 200°C, seguita da una a -10°C/min fino a 25°C per minimizzare l'influenza sulla prova della storia termica del materiale. Dopo uno step di stabilizzazione per 5 minuti a 25°C, il campione viene portato a 300°C con una rampa di 10°C/min: la curva DSC

riferita a quest'ultimo passaggio è quella utilizzata nell'analisi del campione, in particolare per la determinazione della temperatura di transizione vetrosa (T_g).

Gli idrogeli a base di M-CMC sono invece stati portati a 125°C (10°C/min) e poi a -10°C con una rampa di -10°C/min. Stabilizzato il campione per 5 minuti a -10°C, il sistema è stato portato a 180°C con una rampa di 10°C/min.

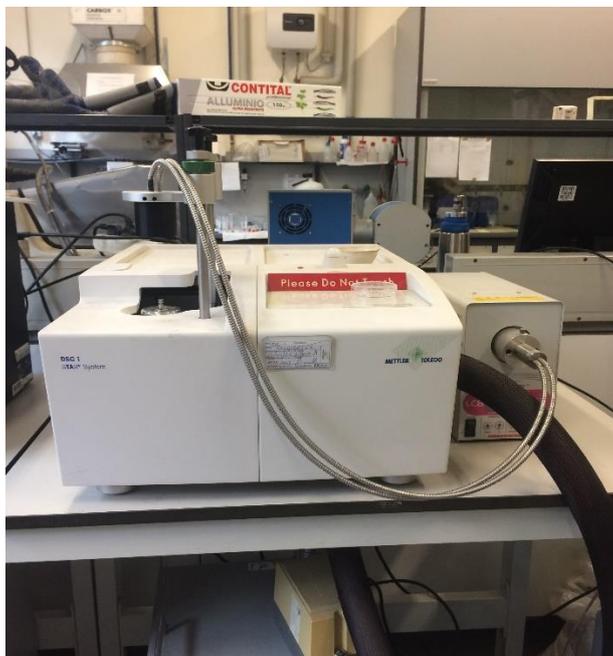


Figura 3.19 DSC 1 STARe System (Mettler Toledo) utilizzata per l'analisi DSC

3.4.6. Analisi termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica prevede la misura del peso di una sostanza mentre essa è soggetta al riscaldamento con crescita controllata della temperatura. Il riscaldamento dei polimeri provoca modificazioni chimiche con scissione dei legami, portando in genere alla formazione di prodotti volatili.

La prova è stata condotta su un campione di massa compresa tra 4 e 8 mg, contenuto in un crogiolo di allumina. Ogni campione è stato portato a 700°C in atmosfera inerte (N_2). L'analisi è stata realizzata con TGA Mettler Toledo (USA) in Figura 3.20 e i risultati ottenuti sono stati analizzati con il software STARe Evaluation.



Figura 3.20 Strumentazione utilizzata per l'analisi termogravimetrica

3.4.7. Microscopio elettronico a scansione (SEM)

La morfologia degli idrogeli è stata indagata con l'analisi al microscopio elettronico a scansione, imponendo un potenziale di 15 kV. Gli idrogeli da analizzare sono stati innanzitutto immersi in acqua distillata a 37°C per 24 ore, in modo da assicurare un buon rigonfiamento e permettere l'ottimale visualizzazione dei pori. Successivamente i campioni sono stati liofilizzati e spezzati in modo da ottenere una superficie di frattura fragile (per compiere questa operazione, nel caso degli idrogeli a base di M-CMC si è utilizzato azoto liquido). Una volta fissati i campioni sugli appositi supporti utilizzando un nastro conduttivo, questi sono stati resi conduttivi grazie all'applicazione, per sputtering, di un sottile strato di rivestimento di platino.

Il microscopio utilizzato (Jeol JMC-6000PLUS) è rappresentato in Figura 3.21.



Figura 3.21 Microscopio elettronico a scansione utilizzato per l'analisi degli idrogeli

3.4.8. Prova di compressione

La prova di compressione è stata realizzata con MTS QTest™/10 Elite controller (in Figura 3.22a), utilizzando il software TestWorks 4 (MTS Systems Corporation, Eden Prairie, Minnesota, USA). Per gli idrogeli a base di GelMA si è utilizzata la cella di carico da 500 N, mentre per quelli a base di M-CMC si è impiegata la cella da 50 N. In entrambi i casi la velocità di abbassamento della traversa è stata posta pari a 5mm/min ed i test sono stati interrotti al momento della rottura del provino.

I provini per il test di compressione sono stati realizzati reticolando le dispersioni di vetro nel polimero (per le diverse composizioni prese in esame) in uno stampo cilindrico di diametro 9,5 mm ed altezza 9,6 mm, come riportato a titolo di esempio in Figura 3.22b.

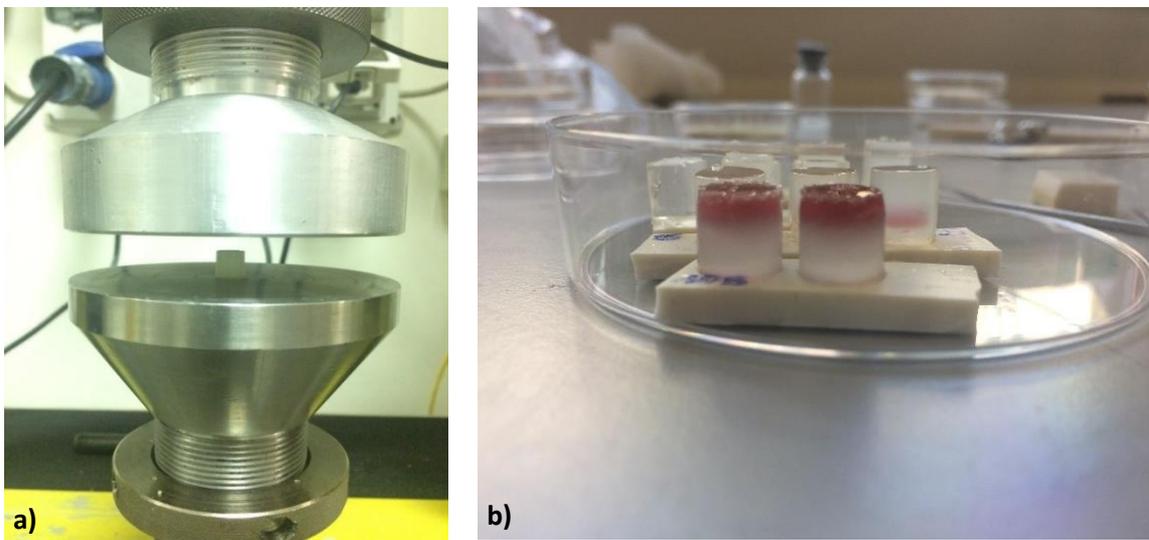


Figura 3.22 a) Disposizione dell'idrogelo sui piatti per la prova di compressione b) Provini (appena fotoreticolati) per il test di compressione su idrogeli M-CMC/15% S4BCu

Nel caso degli idrogeli GelMA/S4BCu si sono incontrate delle difficoltà nella realizzazione dei provini: a causa della presenza del biovetro di colore verde è infatti risultato problematico ottenere dei campioni di altezza superiore ai 3 mm. Analogamente a quanto già osservato durante la fotoreticolazione degli idrogeli nello stampo rettangolare, anche in questo caso si osserva la formazione di una pelle scura in corrispondenza della superficie esposta al raggio UV, che ostacola la penetrazione del fascio negli strati più profondi del materiale. La fotoreticolazione avviene quindi soltanto negli strati di dispersione più vicini alla superficie esposta alla radiazione UV e l'altezza dei provini ottenibili diminuisce al crescere della concentrazione del biovetro S4BCu disperso. In particolare, nel sistema GelMA/15% S4BCu i provini che si ottengono hanno uno spessore compreso tra 2 e 3 mm.

Una volta ottenuta la curva forza vs spostamento della traversa, fornita dal software, si è ricavata la curva sforzo vs deformazione. Si sono calcolati lo sforzo (Formula 3.2) e la deformazione (Formula 3.3):

$$\text{Sforzo } \sigma \text{ (MPa)} = \frac{\text{Forza (N)}}{\text{Sezione del provino (mm}^2\text{)}} \quad (3.2)$$

$$\text{Deformazione (\%)} = \frac{\text{Spostamento della traversa (mm)}}{\text{Altezza iniziale del provino (mm)}} \quad (3.3)$$

Dove la sezione del provino è sempre pari a $\pi\left(\frac{9,5}{2}\right)^2 = 70,7 \text{ mm}^2$, mentre l'altezza iniziale del provino è pari a 9,6 mm in tutti i casi ad eccezione dei sistemi GelMA/S4BCu. A causa della difficoltà nella realizzazione dei provini di altezza standard di GelMA/S4BCu, per questi idrogeli l'altezza dei provini è stata misurata per ogni singolo provino prima di iniziare la prova.

Una volta ricavata la curva sforzo vs deformazione è possibile procedere al calcolo del modulo elastico (Formula 3.4). Dal momento che le curve a compressione dei campioni considerati non presentano un primo tratto rettilineo ma una curva con concavità verso l'alto, si è calcolato il modulo elastico secante. Per il calcolo del modulo secante si sono considerate le coordinate $(\sigma_\varepsilon, \varepsilon)$ dell'origine (0,0) e del punto corrispondente alla deformazione del 10% $(\sigma_{0,1}, 0,1)$ per poi procedere al calcolo della pendenza della retta secante (pari al modulo elastico) con la formula:

$$\text{Modulo elastico } E \text{ (kPa)} = \frac{y_1 - y_0}{x_1 - x_0} * 1000 = \frac{\sigma_{0,1}}{0,1} * 1000 \quad (3.4)$$

Il modulo elastico è stato espresso in kPa poiché, per i provini considerati, il valore di E è molto basso rispetto ai materiali più comuni.

3.4.9. Effetto degli idrogeli sul pH di una soluzione buffer

Per la valutazione dell'effetto degli idrogeli a base di GelMA sul pH di una soluzione acida a 37°C si è innanzitutto preparata la soluzione buffer 0,1 M a pH $5,00 \pm 0,05$. Poiché il pH nel corpo può diventare acido in determinate condizioni (come l'infiammazione e la proliferazione batterica o durante la guarigione dei tessuti) ed è noto che le condizioni acide prolungano l'infiammazione e ritardano la guarigione, gli studi di immersione a pH acido sono importanti per verificare il comportamento degli idrogeli in queste condizioni.

Per preparare la soluzione acida, a 800 ml di acqua bidistillata si sono aggiunti 5,524 g di acetato di sodio e 1,961 g di acido acetico. Dopo l'eventuale aggiunta di HCl o NaOH per ottenere un pH pari a $5,00 \pm 0,05$, si è addizionata acqua bidistillata fino ad ottenere un litro soluzione.

Le prove sono state realizzate immergendo, per ogni composizione, 360 mg di idrogelo secco in 5 ml della soluzione acida preparata; si sono utilizzati campioni cilindrici, realizzati negli stessi stampi utilizzati per preparare i provini per la prova a compressione. La prova è stata condotta a 37°C ed il pH è stato misurato con il pHmetro edge® Misuratore pH/ORP - HI2002 (HANNA instruments) dopo 3 ore, 1 giorno e 3 giorni dall'immersione degli idrogeli.

3.4.10. Spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS)

Le analisi ICP-MS sono state realizzate sulle soluzioni in cui si sono immersi gli idrogeli GelMA/S4BCu, per valutare la capacità degli idrogeli di rilasciare gli ioni boro e rame presenti nel biovetro.

Come nel caso della misurazione del pH, 360 mg di idrogelo secco sono stati immersi in 5 ml della soluzione acida a 37°C; le analisi sono state realizzate sulle soluzioni dopo 3 ore, 1 giorno, 3 giorni e 7 giorni dall'inizio della prova.

La tecnica ICP-MS combina l'utilizzo di un plasma ad altissime temperature e di uno spettrometro di massa. Nello specifico, il flusso di argon da cui viene prodotto il plasma funge da carrier del campione (introdotto in forma nebulizzata); la fase liquida della soluzione da analizzare evapora, mentre i solidi presenti vengono vaporizzati ed atomizzati. In seguito, gli atomi prodotti perdono un elettrone: gli ioni positivi così ottenuti vengono separati in base al rapporto massa/carica grazie allo spettrometro di massa ed arrivano al rivelatore. La tecnica è in grado di individuare ioni presenti fino alla concentrazione di circa una parte per miliardo.

4. Risultati e discussione

4.1. Funzionalizzazione del polimero

Dal momento che l'analisi FTIR consente di risalire al tipo di legami presenti nel materiale in esame, è possibile sfruttare questa tecnica per verificare la corretta metacrilazione dei polimeri (funzionalizzati seguendo i procedimenti spiegati nel capitolo 3.1) osservando la comparsa dei picchi relativi ai legami del gruppo metacrilico.

4.1.1. Gelatina e GelMA

Lo spettro FTIR della gelatina (riportato in Fig.4.1) è caratterizzato dalla presenza di tre regioni, rispettivamente corrispondenti alle vibrazioni dei legami delle ammidi primarie ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$), secondarie ($1565\text{--}1520\text{ cm}^{-1}$) e terziarie ($1240\text{--}670\text{ cm}^{-1}$)^{72,73}.

In particolare, il picco a 1632 cm^{-1} è attribuito allo stretching del legame C=O dell'ammido primaria, mentre il picco a 1520 cm^{-1} è associato alle vibrazioni del gruppo N-H dell'ammido secondaria. A 1238 cm^{-1} si evidenzia invece il picco corrispondente allo stretching del legame C-N ed al bending del gruppo N-H dell'ammido terziaria. Infine, a 2937 cm^{-1} è presente il picco associato allo stretching del gruppo C-H, mentre il largo picco che si estende tra 3000 e 3500 cm^{-1} è associato allo stretching di -OH.

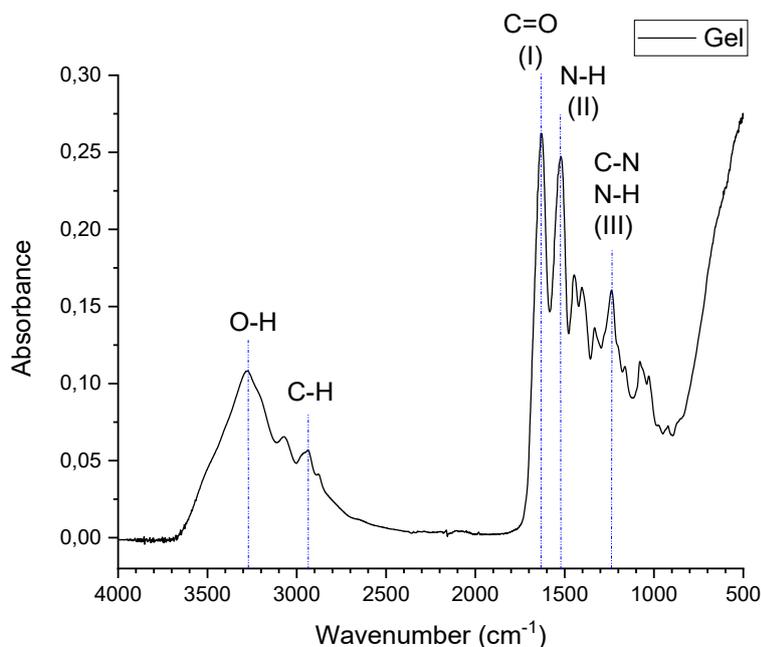


Figura 4.1 Analisi FTIR della gelatina (Gel)

In Figura 4.2, dal confronto tra lo spettro della gelatina (Gel) e quello della gelatina metacrilata (GelMA) si osserva come in quest'ultimo, in aggiunta ai picchi caratteristici della gelatina, sia presente un ulteriore picco a 837 cm^{-1} attribuibile al bending del gruppo C=C-H. La vibrazione del gruppo estere $-(\text{C}=\text{O})\text{O}$ dovrebbe comportare la comparsa di un picco a 1700 cm^{-1} , che in questo caso non è visibile poiché sovrapposto al picco associato allo stretching del C=O dell'ammide primaria.

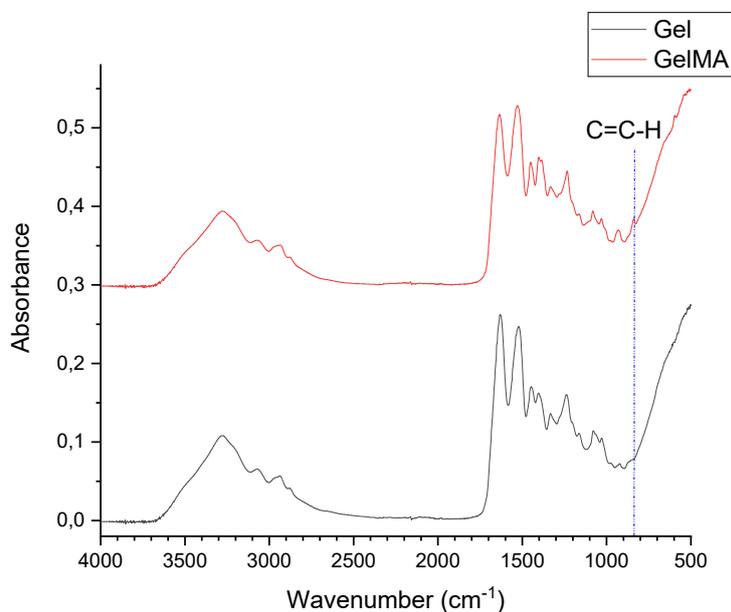


Figura 4.2 Analisi FTIR: confronto tra gli spettri del Gel e GelMA

4.1.2. Cellulosa carbossimetilata e M-CMC

Dall'analisi FTIR della cellulosa carbossimetilata (CMC), riportata in Fig.4.3, si evidenziano i picchi associati alle vibrazioni di stretching asimmetrico (a 1590 cm^{-1}) e simmetrico (due picchi ravvicinati a minore intensità a 1411 e 1321 cm^{-1}) del carbossilato $-\text{COO}^-$. L'intenso picco a 1020 cm^{-1} è invece dovuto allo stretching del gruppo $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$. Il picco a 2880 cm^{-1} è relativo allo stretching del gruppo C-H, mentre il picco più ampio che si estende tra 3000 e 3700 cm^{-1} è associato allo stretching del gruppo $-\text{OH}$.

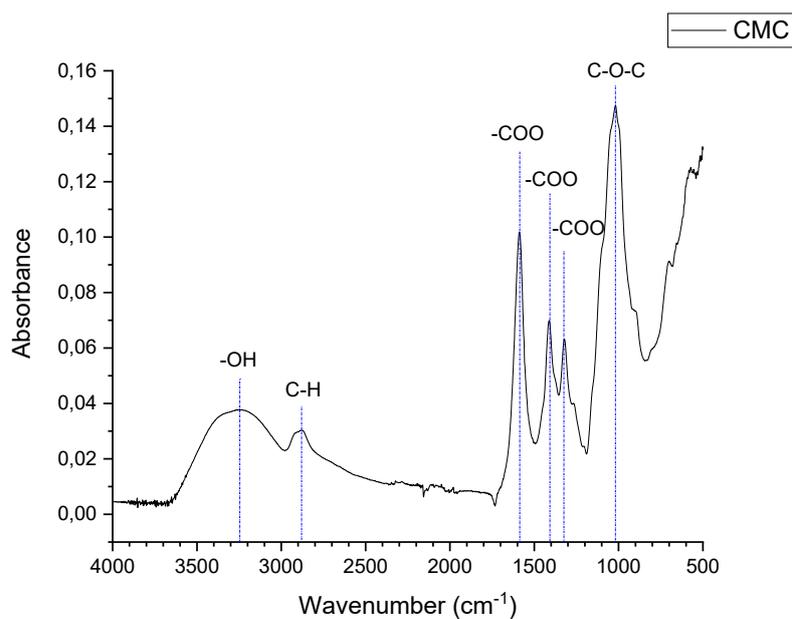


Figura 4.3 Analisi FTIR della cellulosa carbossimetilata (CMC)

L'analisi FTIR della M-CMC liofilizzata consente, dal confronto con lo spettro della CMC, di verificare la corretta metacrilazione del sistema. Analogamente a quanto osservato nel caso della GelMA, lo spettro di M-CMC in Fig. 4.4 mostra, in aggiunta ai picchi caratteristici della CMC, un picco a 800 cm^{-1} associato al bending del gruppo C=C-H ed un ulteriore picco a 1700 cm^{-1} dovuto alla vibrazione del gruppo estere $-(\text{C}=\text{O})\text{O}$.

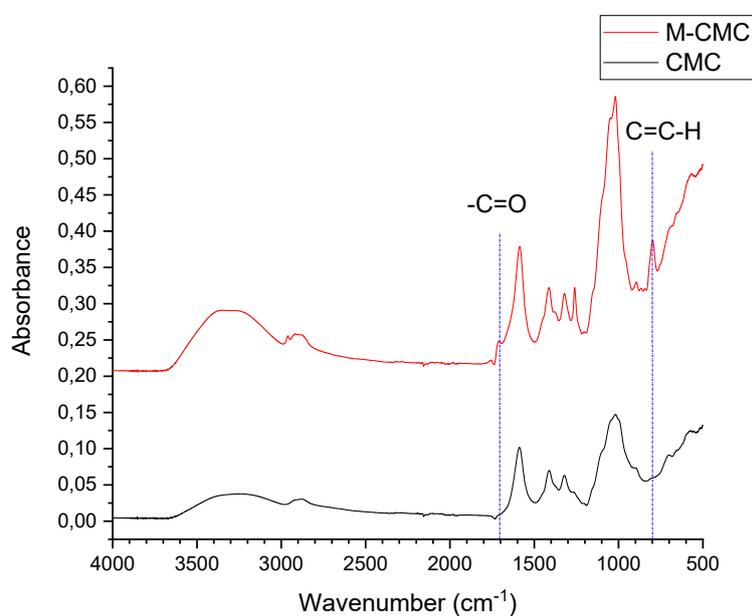


Figura 4.4 Analisi FTIR: confronto tra gli spettri della CMC e M-CMC

4.2. Analisi FTIR dei vetri bioattivi

Lo spettro FTIR del biovetro S4 è riportato in Fig.4.5. Il picco con più alta intensità si trova a 1042 cm^{-1} ed è associato allo stretching simmetrico del legame Si-O-Si, mentre la spalla a 1200 cm^{-1} è attribuita allo stretching asimmetrico del gruppo Si-O-Si⁷⁴. La spalla a circa 960 cm^{-1} (poco visibile poiché parzialmente sovrapposta al picco centrato a 1050 cm^{-1}) è associata alla vibrazione del legame Si-O-Ca⁷⁵. Il picco a 800 cm^{-1} corrisponde invece al bending del legame Si-O, mentre la spalla presente a circa 590 cm^{-1} è attribuita alla vibrazione asimmetrica di PO_4^{3-} .

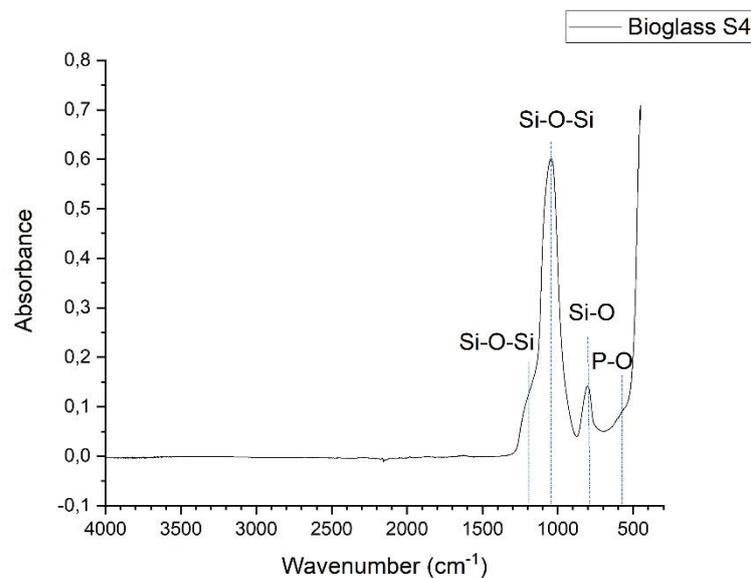


Figura 4.5 Analisi FTIR del biovetro S4

Dal confronto tra lo spettro del vetro S4BCu con quello del vetro S4 (in Fig. 4.6) si osserva la presenza, in aggiunta a tutti i picchi individuati nello spettro del vetro “di controllo”, di tre ulteriori picchi legati alla partecipazione del boro- nella sua forma trigonale e tetraedrica- al network vetroso^{61,76}. Il picco a 1379 cm^{-1} è associato alla vibrazione di stretching del legame B-O delle unità trigonali BO_3 , mentre la spalla a circa 910 cm^{-1} è dovuta allo stretching del B-O delle unità tetraedriche BO_4 ; infine il picco poco intenso a 670 cm^{-1} è dovuto al bending dei borati.

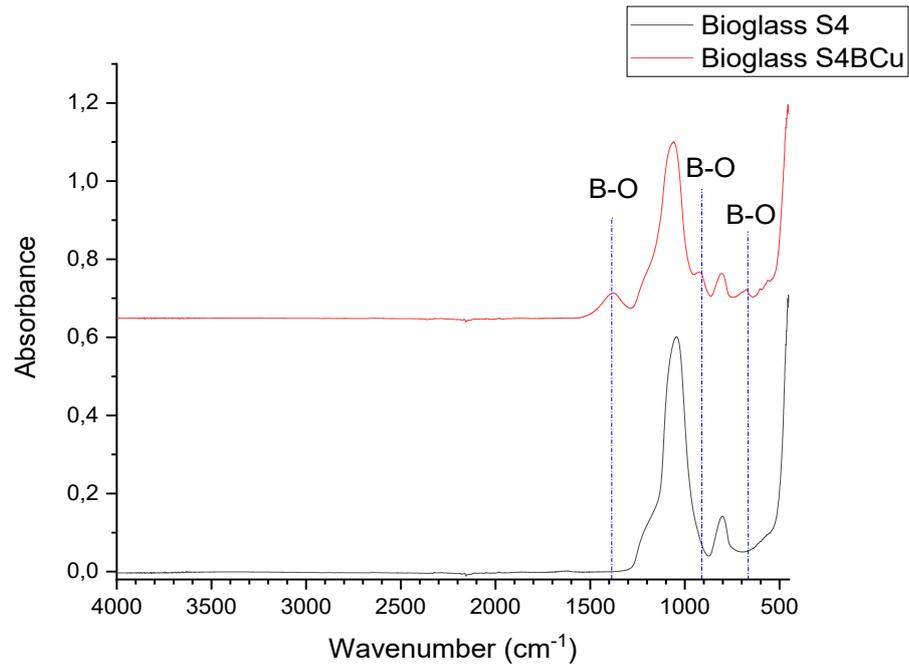


Figura 4.6 Analisi FTIR: confronto tra i biovetri S4 e S4BCu

4.3. Analisi morfologica e composizionale dei vetri bioattivi (FESEM-EDS)

L'analisi al FESEM sul biovetro S4 ha consentito di osservare come le particelle vetrose sintetizzate seguendo il metodo di Stöber modificato presentino una forma perfettamente sferica, come si osserva in Figura 4.7a. Utilizzando lo strumento di analisi dell'immagine fornito dal software si è inoltre determinato il diametro di alcune delle particelle vetrose, che è risultato compreso tra 350 e 500 nm.

Lo spettro in Figura 4.7b, ottenuto dall'analisi EDS, mostra invece come il vetro S4 di controllo sia costituito da SiO_2 , CaO e P_2O_5 .

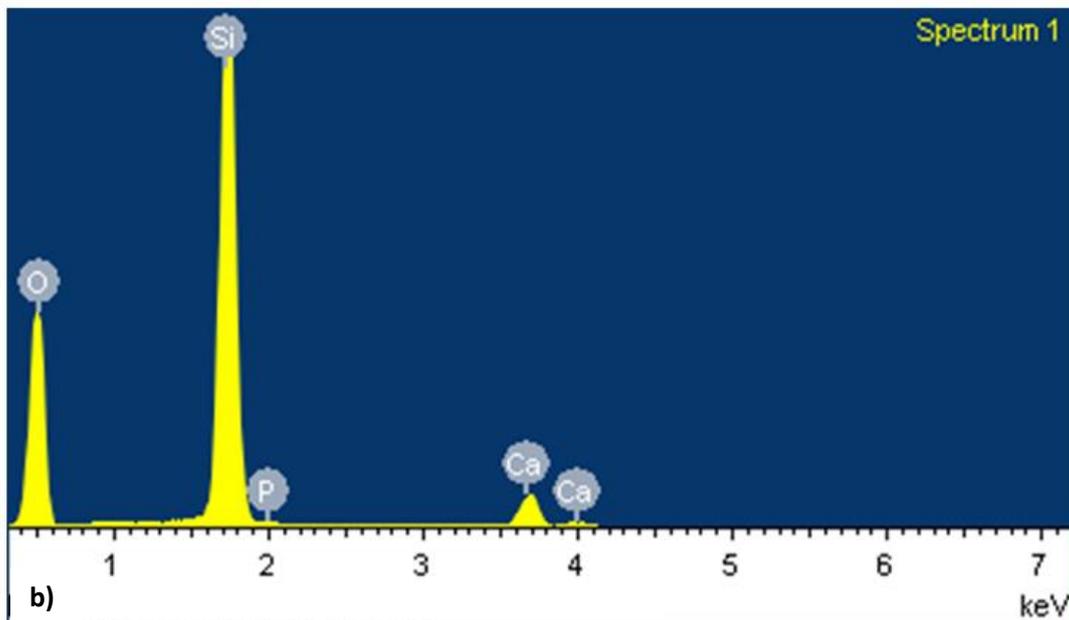
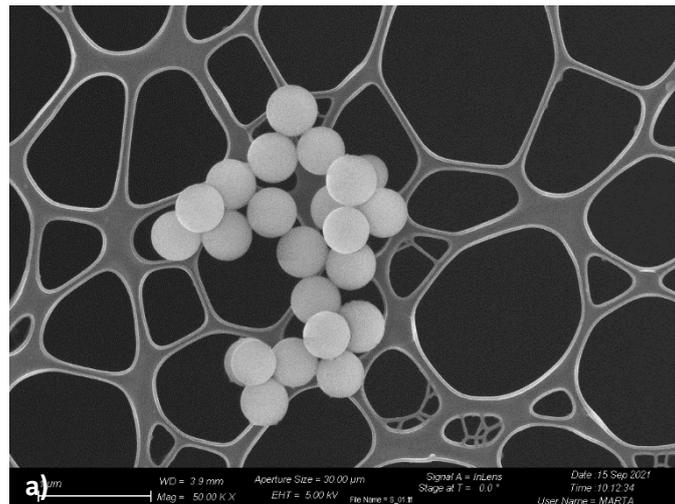


Figura 4.7 a) Immagine al FESEM dei biovetri S4 b) Analisi EDS dei biovetri S4

Analogamente a quanto osservato per i biovetri S4, anche i vetri dopati presentano forma sferica, come si osserva in Figura 4.8a. Le polveri hanno diametro stimato tra 340 e 500 nm.

L'analisi EDS sul biovetro S4BCu (Figura 4.8b) mostra, in aggiunta ai picchi individuati nello spettro di S4, i picchi relativi al rame e al boro, aggiunti come elementi dopanti nel biovetro. Si osserva inoltre l'esistenza del picco indicativo della presenza del carbonio, probabilmente dovuta alla contaminazione del campione o al carbon tape sottostante.

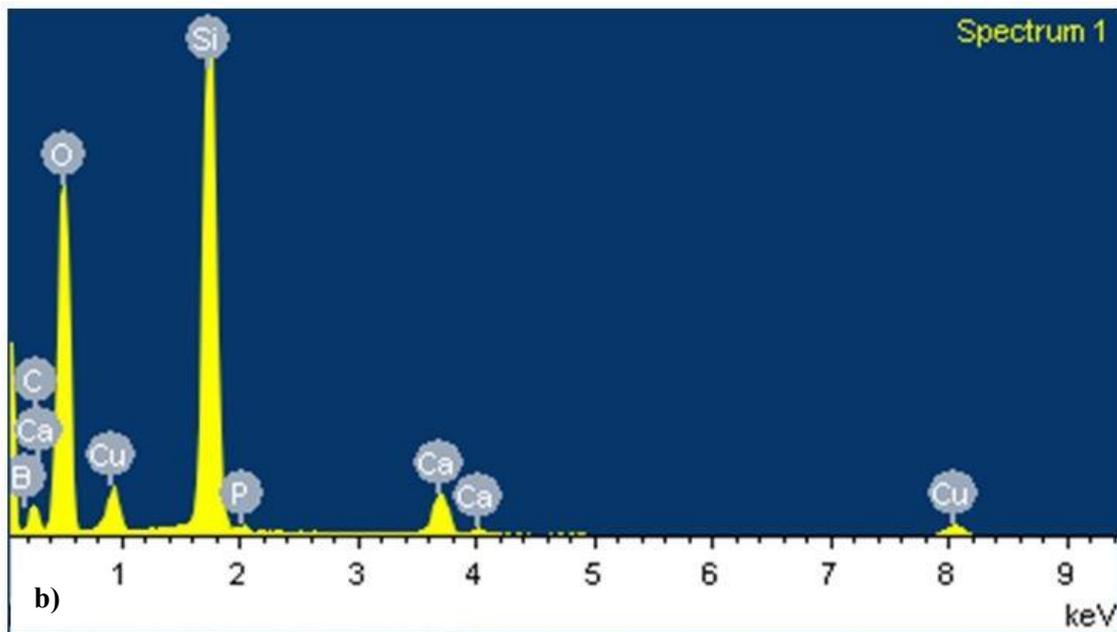
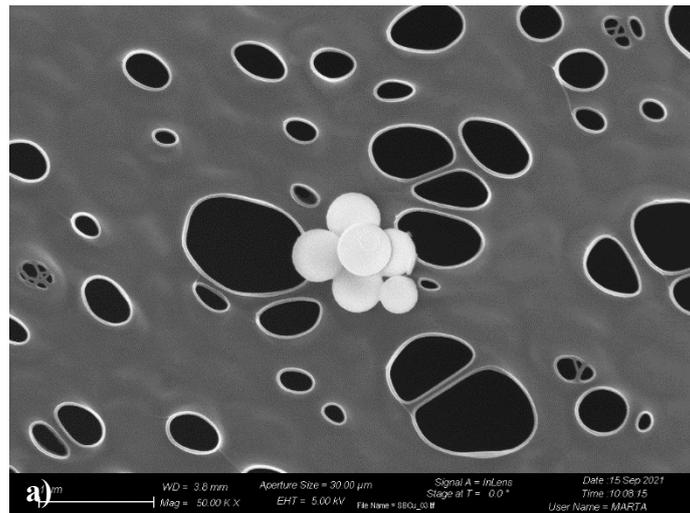


Figura 4.8 a) Immagine al FESEM dei biovetri S4BCu b) Analisi EDS dei biovetri S4BCu

4.4. Fotoreticolazione degli idrogeli

4.4.1. Idrogeli a base di GelMA

In seguito all'aggiunta del fotoiniziatore (BAPO-OH al 2%wt rispetto al peso della GelMA), le sospensioni GelMA/biovetro sono state analizzate con un fotoreometro rotazionale a piatti

paralleli (gap 300 μm , strain amplitude 1%). La lampada UV, che irradia il campione con intensità 100 mW/cm^2 , è stata attivata 30 secondi dopo l'inizio della prova.

Dall'analisi delle curve in Figura 4.9 si osserva come la ripida crescita del modulo elastico (G') si inneschi prima nei sistemi contenenti il vetro S4. Al contrario, l'aggiunta di S4BCu a GelMA comporta un ritardo nell'aumento di G' : l'entità del ritardo cresce all'aumentare della concentrazione del biovetro verde. Il valore di plateau per i compositi con il 10%wt ed il 15%wt di S4BCu è infatti raggiunto dopo circa 150 secondi dall'inizio della prova, mentre per le altre composizioni la crescita di G' rallenta notevolmente dopo soli 100 secondi.

Per quanto riguarda il valore a plateau del modulo elastico, non si riscontrano importanti differenze tra i compositi contenenti S4 ed S4BCu. Tuttavia tra i compositi GelMA/S4BCu il modulo elastico diminuisce al crescere della concentrazione di biovetro.

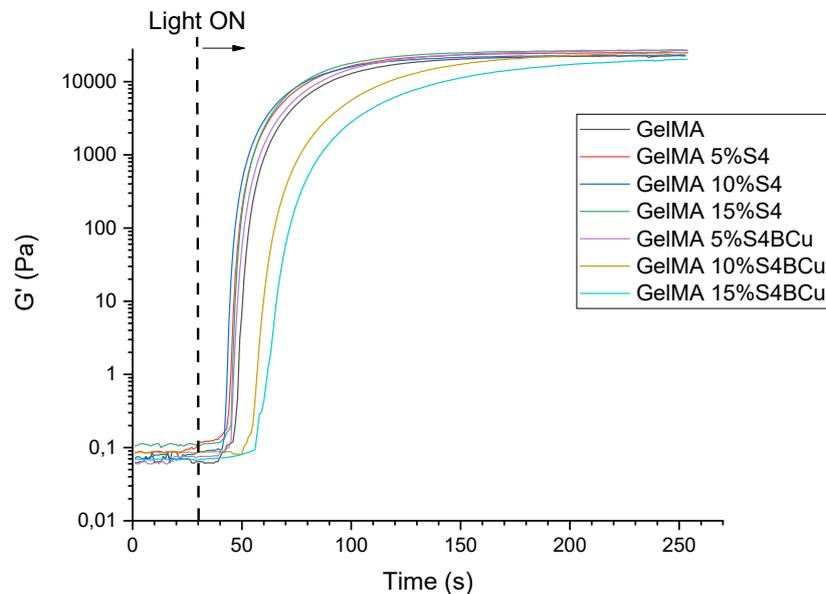


Figura 4.9 Fotoreologia delle soluzioni a base di GelMA con accensione della lampada 30 secondi dopo l'inizio della prova

4.4.2. Idrogeli a base di M-CMC

Anche nel caso dei compositi con matrice di M-CMC, le misurazioni effettuate con il fotoreometro sono state condotte accendendo la lampada dopo 30 secondi dall'inizio della prova; in questo caso la durata della prova è stata estesa a 320 secondi (Fig. 4.10). In tutti i compositi esaminati, il modulo elastico raggiunge il plateau dopo circa 90 secondi dall'inizio della prova. Dal grafico si osserva che l'aggiunta del biovetro S4 comporta un aumento del valore di G' rispetto all'idrogelo di sola M-CMC; il modulo è tanto maggiore al crescere della concentrazione di S4 presente nel composito. Al contrario, l'aggiunta di S4BCu sortisce l'effetto opposto: nei compositi M-CMC/S4BCu si riscontra infatti la diminuzione del modulo elastico al crescere della percentuale di vetro aggiunta nella dispersione. In modo del tutto coerente con questa osservazione, il plateau di M-CMC si assesta sul valore 763 Pa, compreso tra quello del composito con 5% S4BCu (443 Pa) e quello con 5% S4 (843 Pa). Si evidenzia inoltre che il valore di G' raggiunto da M-CMC con il 15% di vetro S4 è un ordine di grandezza

superiore rispetto al campione contenente la stessa percentuale di S4BCu. Inoltre, nei compositi M-CMC/S4BCu la crescita del modulo elastico si manifesta con un ritardo (crescente all'aumentare della percentuale di biovetro) rispetto alla sola M-CMC.

È quindi possibile ipotizzare che la presenza dei vetri S4BCu ostacoli la reticolazione del polimero: gli ioni Ca^{2+} del biovetro possono infatti interagire con gli anioni carbossilati, riducendo la mobilità delle catene di M-CMC e quindi la loro disponibilità per formare il reticolo chimico⁷¹. Inoltre la colorazione verde delle dispersioni M-CMC/S4BCu potrebbe parzialmente schermare il fascio UV: si consideri infatti che la soluzione di pura M-CMC è trasparente.

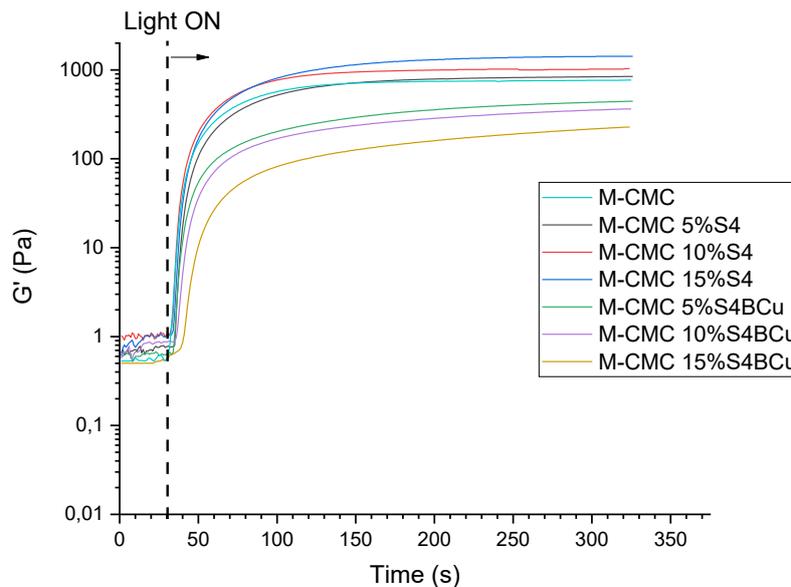


Figura 4.10 Fotoreologia delle soluzioni a base di M-CMC con accensione della lampada 30 secondi dopo l'inizio della prova

4.5. Grado di rigonfiamento

4.5.1. Idrogeli a base di GelMA

Osservando l'andamento del grado di swelling degli idrogeli in Figura 4.11 e 4.12, si osserva come l'aggiunta del biovetro comporti la diminuzione del rigonfiamento del sistema dopo 24 ore rispetto al caso della GelMA pura, che assorbe oltre il 500% del suo peso iniziale quando immersa in acqua distillata a 37°C. L'entità della diminuzione del grado di rigonfiamento è più importante se si considerano sistemi compositi contenenti il biovetro S4.

Nel caso degli idrogeli GelMA/S4, confrontando la pendenza del tratto iniziale delle curve in Fig.4.11 si osserva come l'aggiunta di biovetro comporti una diminuzione della velocità di rigonfiamento. I sistemi con il 10% e 15%wt di vetro presentano una velocità di swelling simile,

ma il composito con il 10%wt di S4 si assesta su un valore a plateau inferiore. Per tutte le composizioni il valore a plateau è raggiunto dopo circa tre ore dall'inizio della prova. Si osserva inoltre che in questi compositi è sufficiente aggiungere il 5% di biovetro S4 alla GelMA per ridurre il grado di rigonfiamento del 45% rispetto al valore raggiunto dalla sola GelMA. Il sistema GelMA/10% S4 presenta il minimo grado di swelling tra le composizioni prese in esame, mentre GelMA/5% S4 è il composito che rigonfia di più.

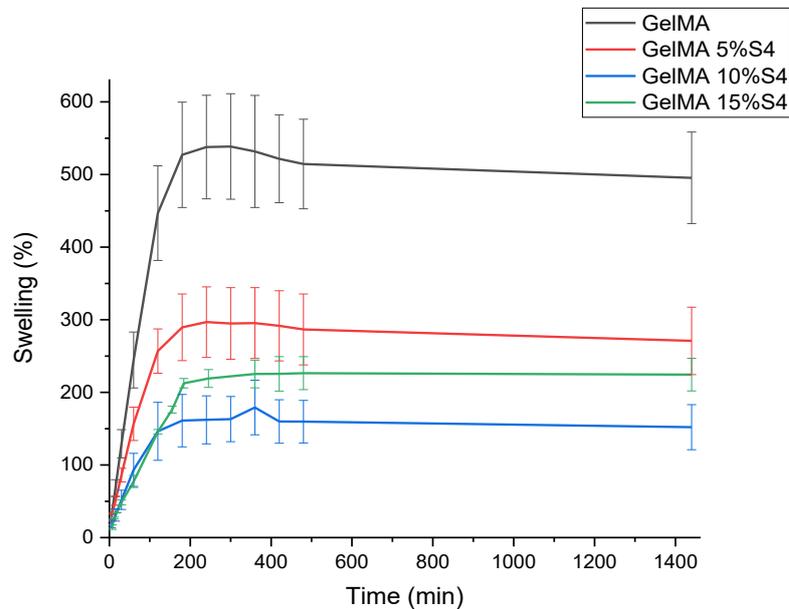


Figura 4.11 Andamento del grado di rigonfiamento degli idrogeli a base di GelMA con biovetro S4 in acqua distillata a 37°C

Considerando i sistemi GelMA/S4BCu si osserva invece un aumento della velocità di rigonfiamento dell'idrogelo nel caso dell'aggiunta del 15%wt di biovetro rispetto al caso della sola GelMA; in Figura 4.12 la pendenza della curva verde nel tratto iniziale è infatti maggiore rispetto a quella della curva nera. Tra i sistemi compositi, la velocità di swelling aumenta al crescere del quantitativo di biovetro S4BCu. Anche in questo caso, l'aggiunta del 5% di biovetro S4BCu alla GelMA comporta la diminuzione del grado di swelling del 45% rispetto al sistema privo di vetro. Il sistema GelMA/10% S4BCu forma l'idrogelo con la maggiore capacità di rigonfiamento tra le composizioni esaminate. A differenza di GelMA/15% S4BCu che raggiunge il massimo rigonfiamento dopo circa 2 ore, gli altri sistemi considerati raggiungono il plateau dopo circa 3 ore dall'inizio della prova.

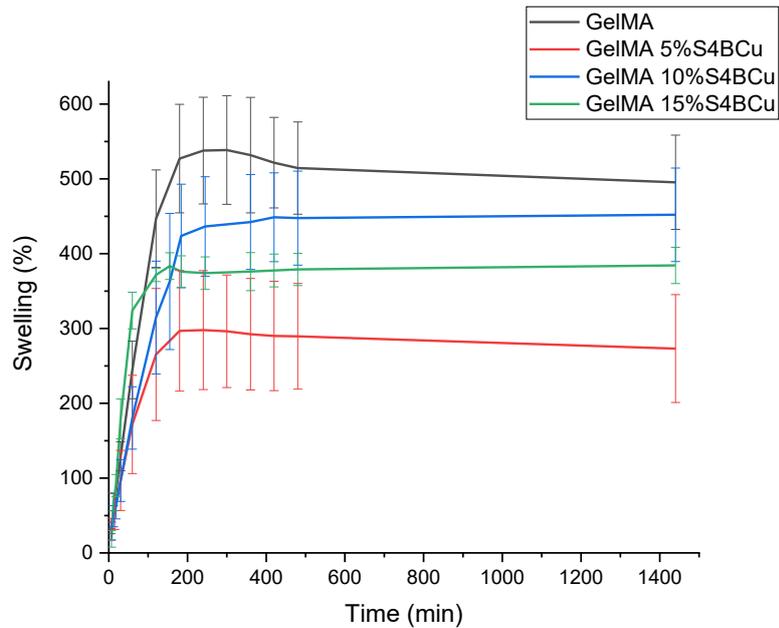


Figura 4.12 Andamento del grado di rigonfiamento degli idrogeli a base di GelMA con biovetro S4BCu in acqua distillata a 37°C

Il grafico in Figura 4.13a evidenzia l'effetto dell'aggiunta dei due diversi tipi di biovetro sul rigonfiamento degli idrogeli dopo 24 ore in acqua distillata. In particolare, si osserva che per basse percentuali di biovetro (5%wt) i composti contenenti S4 ed S4BCu presentano grado di rigonfiamento simile. Al contrario, i sistemi con il 10%wt di biovetro mostrano importanti differenze: GelMA/10% S4BCu presenta un grado di swelling quasi triplo rispetto al sistema GelMA/10% S4. Il trend è confermato per i composti con il 15%wt di biovetro, ma la differenza nel comportamento dei due sistemi risulta attenuata rispetto al caso precedente (il composto con S4BCu ha un rigonfiamento 1,7 volte maggiore rispetto a quello con il vetro S4). In Figura 4.13b-c è possibile osservare la variazione dimensionale degli idrogeli contenenti il 15%wt di biovetro (S4 in b), S4BCu in c)) prima e dopo il rigonfiamento.

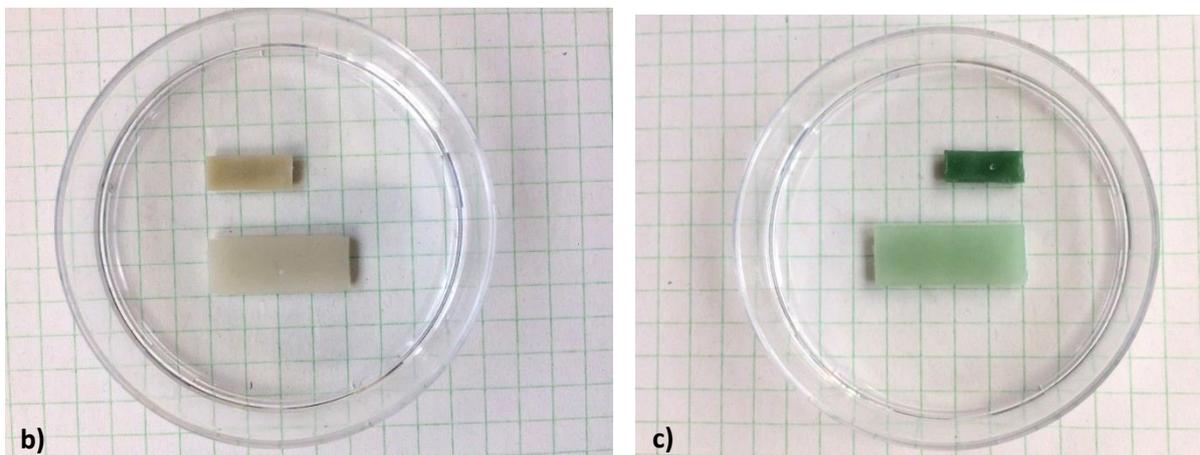
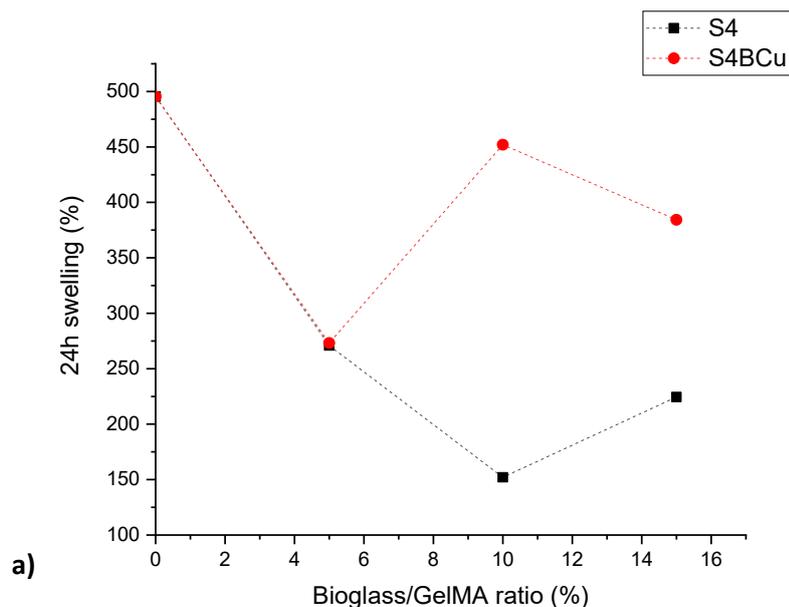


Figura 4.13 a) Confronto tra i valori a plateau del grado di rigonfiamento dei compositi contenenti S4 (in nero) e S4BCu (in rosso) nelle diverse composizioni esaminate; Confronto tra idrogelo secco (sopra) e rigonfiato (sotto) di *b)* GelMA/15%S4 *c)* GelMA/15%S4BCu

4.5.2. Idrogeli a base di M-CMC

In Figura 4.14a sono riportate le curve relative al rigonfiamento in acqua distillata a 37°C degli idrogeli M-CMC/S4. L'ingrandimento del tratto iniziale della curva è riportato in Fig.4.14b: si evidenzia come, nei primi minuti, la velocità di rigonfiamento diminuisca al crescere della concentrazione di biovetro S4 aggiunto all'idrogelo a base di cellulosa. In tutte le composizioni esaminate, gli idrogeli inglobano acqua molto rapidamente: già nei primi 10 minuti si riscontra un grado di rigonfiamento prossimo al valore di plateau raggiunto dopo 24 ore.

Osservando il tratto finale delle curve in Figura 4.14a si osserva un'importante diminuzione del grado di rigonfiamento degli idrogeli contenenti biovetro rispetto a quelli di pura cellulosa.

Dopo 24 ore dall'inizio della prova, gli idrogeli di M-CMC presentano infatti un grado di rigonfiamento molto elevato, pari al 5980% del peso iniziale; si evidenzia inoltre come questo valore sia un ordine di grandezza superiore rispetto allo swelling degree della GelMA pura. Tra gli idrogeli contenenti biovetro, M-CMC/10% S4 è il sistema che presenta grado di rigonfiamento massimo (pari al 4758% rispetto al peso iniziale dell'idrogelo), mentre i sistemi contenenti 5%wt e 15%wt S4 presentano un comportamento simile e raggiungono un valore di plateau minore (rispettivamente 3094% e 3334%).

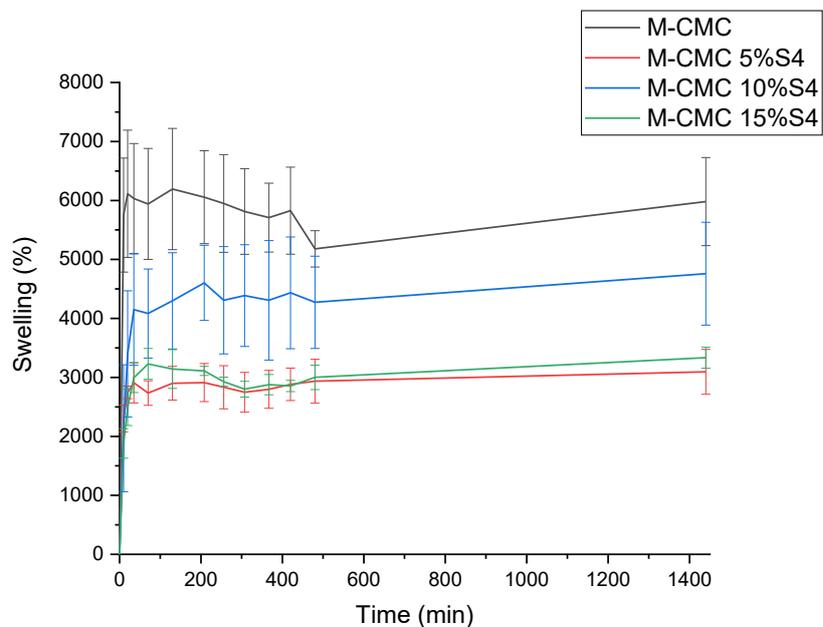


Figura 4.14 a) Andamento del grado di rigonfiamento degli idrogeli M-CMC/S4 in acqua distillata a 37°C

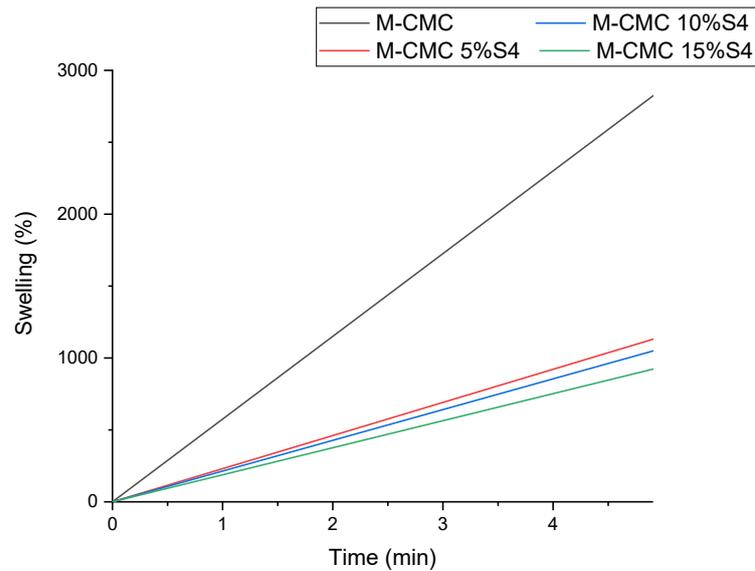


Figura 4.14 b) Ingrandimento del tratto iniziale delle curve relative al rigonfiamento degli idrogeli M-CMC/S4 in acqua distillata a 37°C

In Figura 4.15a sono riportate le curve relative al rigonfiamento in acqua distillata a 37°C degli idrogeli M-CMC/S4BCu. Osservando l'andamento delle curve nei primi minuti (riportato in Fig.4.15b) si riscontra, analogamente al caso precedente, la diminuzione della velocità di rigonfiamento al crescere della concentrazione di biovetro dispersa nell'idrogelo. Anche nei sistemi contenenti S4BCu si osserva il raggiungimento di elevati valori di swelling (simili a quelli raggiunti dopo 24 ore) già dopo i primi 10 minuti di immersione degli idrogeli in acqua.

Si evidenzia inoltre come l'idrogelo M-CMC/15% S4BCu raggiunga un grado di rigonfiamento pari al 4375%, superiore rispetto ai sistemi con concentrazione di biovetro inferiore. Gli idrogeli contenenti 5%wt e 10%wt di S4BCu presentano invece un comportamento simile tra loro e incorporano acqua fino a raggiungere, dopo 24 ore, rispettivamente il 3681% ed il 3531% del peso iniziale.

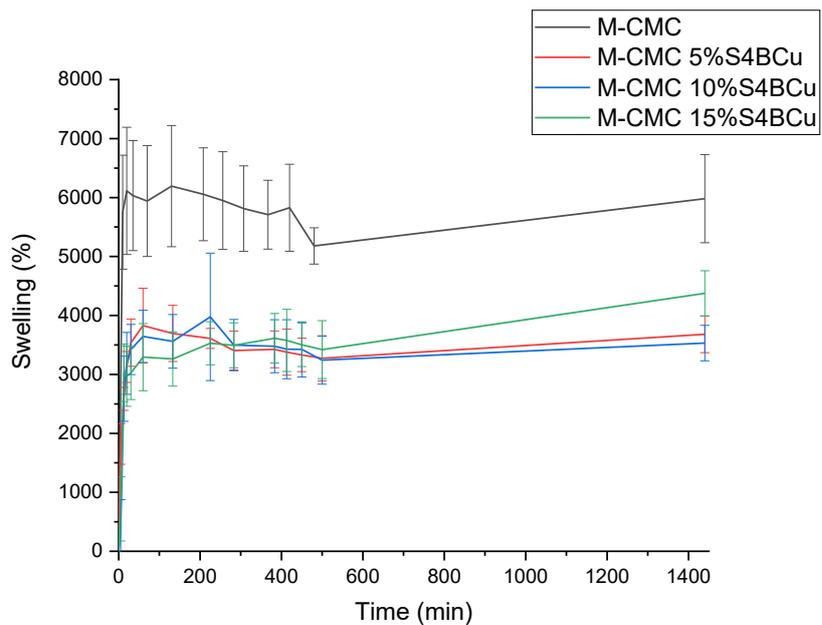


Figura 4.15 a) Andamento del grado di rigonfiamento degli idrogeli M-CMC/S4BCu in acqua distillata a 37°C

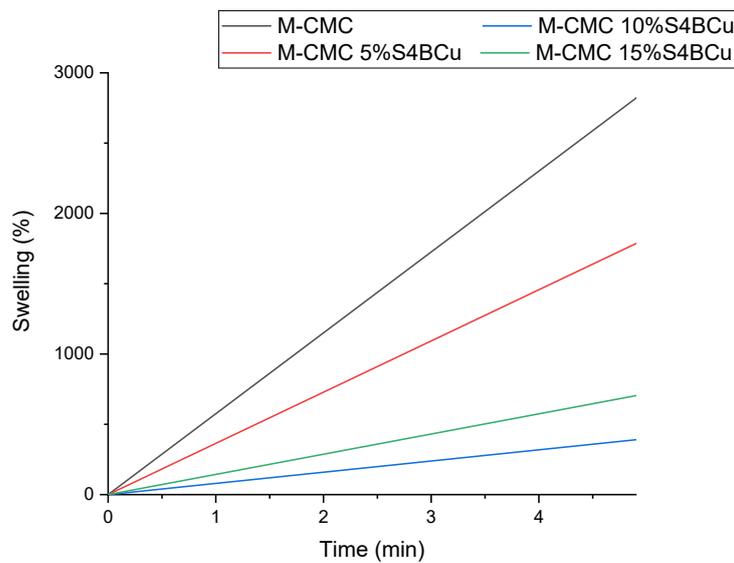


Figura 4.15 b) Ingrandimento del tratto iniziale delle curve relative al rigonfiamento degli idrogeli M-CMC/S4BCu in acqua distillata a 37°C

Il grafico in Figura 4.16 mette a confronto il grado di rigonfiamento degli idrogeli contenenti i due tipi di biovetro. In particolare si evidenzia come, a parità di percentuale di biovetro, i sistemi contenenti S4BCu mostrino un rigonfiamento medio superiore, ad eccezione degli idrogeli contenenti il 10% di biovetro.

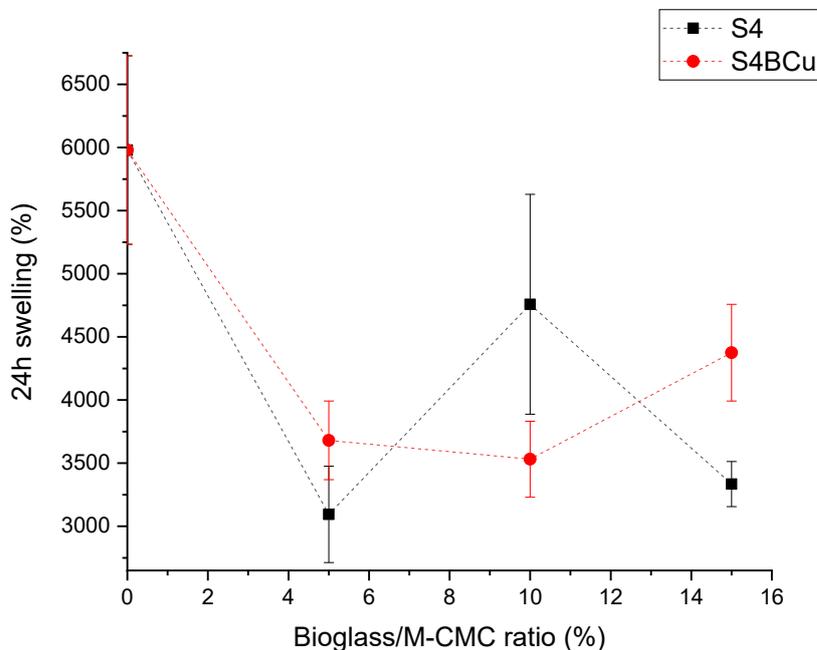


Figura 4.16 Confronto tra i valori a plateau del grado di rigonfiamento degli idrogeli contenenti S4 (in nero) e S4BCu (in rosso) nelle diverse composizioni esaminate

4.6. DSC

4.6.1. Idrogeli a base di GelMA

La calorimetria differenziale a scansione (DSC) consente di monitorare i processi esotermici ed endotermici che interessano gli idrogeli a base di GelMA quando riscaldati in atmosfera inerte (N_2). In Figura 4.17 è riportato il tratto di maggior interesse ingegneristico delle curve: il punto di flesso della DSC corrisponde infatti alla temperatura di transizione vetrosa (T_g) del materiale. Il punto di flesso delle diverse curve, indicato con un quadrato del rispettivo colore, è stato stimato con l'aiuto del software STARE Evaluation: i valori individuati per le diverse composizioni degli idrogeli a base di GelMA sono riportate in Tabella 4.1.

In particolare, nei sistemi GelMA/S4 si evidenzia come l'aggiunta del biovetro comporti l'aumento della T_g del composito rispetto alla sola GelMA. Tra questi sistemi, l'aumento della temperatura di transizione vetrosa è massimo quando la percentuale di S4 aggiunta è pari al 5%: in questo caso la T_g sale a $170,9^\circ C$, contro i $161,0^\circ C$ dell'idrogelo privo di biovetro.

Per quanto riguarda i compositi GelMA/S4BCu, si evidenzia che nei sistemi con minor percentuale di biovetro (5% e 10%) la temperatura di transizione vetrosa risulta rispettivamente 7°C e 14°C superiore rispetto al sistema privo di vetro. Al contrario, nel composito GelMA/15% S4BCu la temperatura di transizione vetrosa individuata è minore rispetto alla pura GelMA e pari a 156,0°C: tra tutti i compositi esaminati, questo è quello che assume un comportamento gommoso alla temperatura più bassa.

L'aggiunta di basse percentuali della fase vetrosa termicamente stabile comporta quindi l'aumento della T_g degli idrogeli rispetto al caso della GelMA pura. Fa eccezione l'idrogelo arricchito con il 15%wt di S4BCu, in cui (come spiegato nel Capitolo 3.3.1) l'assorbimento della radiazione UV da parte del biovetro ostacola l'irraggiamento e limita la densità di reticolazione dell'idrogelo.

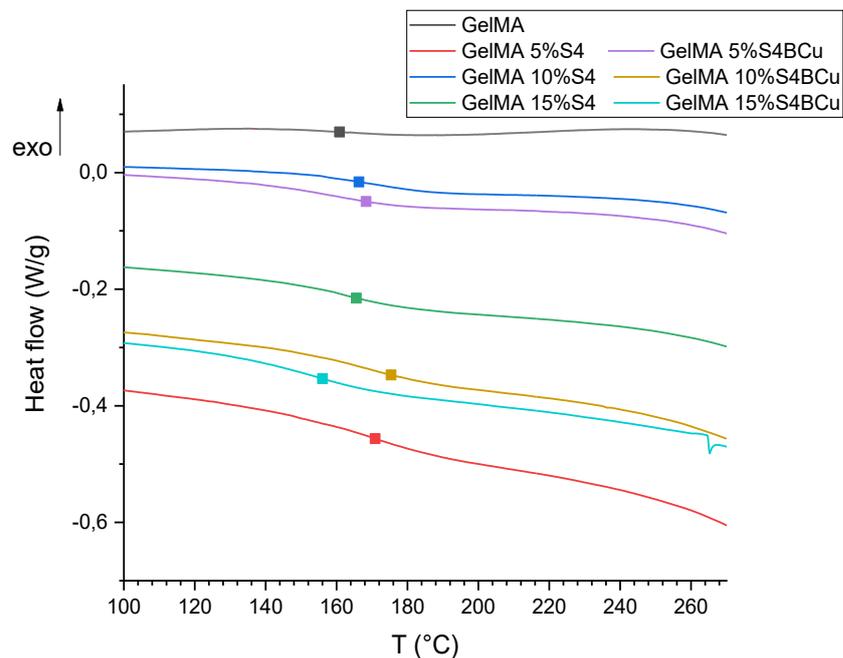


Figura 4.17 Calorimetria differenziale a scansione dei campioni a base GelMA

Composizione idrogelo	T_g [°C]
GelMA	161,0
GelMA 5% S4	170,9
GelMA 10% S4	166,3
GelMA 15% S4	165,6
GelMA 5% S4BCu	168,4
GelMA 10% S4BCu	175,4
GelMA 15% S4BCu	156,0

Tabella 4.1 Temperatura di transizione vetrosa degli idrogeli a base di GelMA

4.6.2. Idrogeli a base di M-CMC

In Figura 4.18 sono riportate le curve ottenute dalla calorimetria differenziale a scansione realizzata sugli idrogeli a base di cellulosa. I valori della T_g , ricavati individuando il punto di flesso delle curve, sono riportati in Tabella 4.2 ed indicati sulle curve con un quadrato del rispettivo colore.

Per gli idrogeli M-CMC/S4 si riscontra un aumento della temperatura di transizione vetrosa al crescere della concentrazione di biovetro. In particolare, l'idrogelo M-CMC/15% S4 assume un comportamento gommoso alla massima temperatura (pari a 126,3°C): grazie all'aggiunta della fase vetrosa inerte, la T_g aumenta di quasi 5°C rispetto al sistema privo di biovetro (121,9°C).

Analogamente, anche negli idrogeli M-CMC/S4BCu si riscontra un aumento della temperatura di transizione vetrosa al crescere della percentuale di biovetro: in questo caso M-CMC/15% S4BCu assume un comportamento gommoso ad una temperatura che è superiore di oltre 4°C rispetto alla T_g della M-CMC pura.

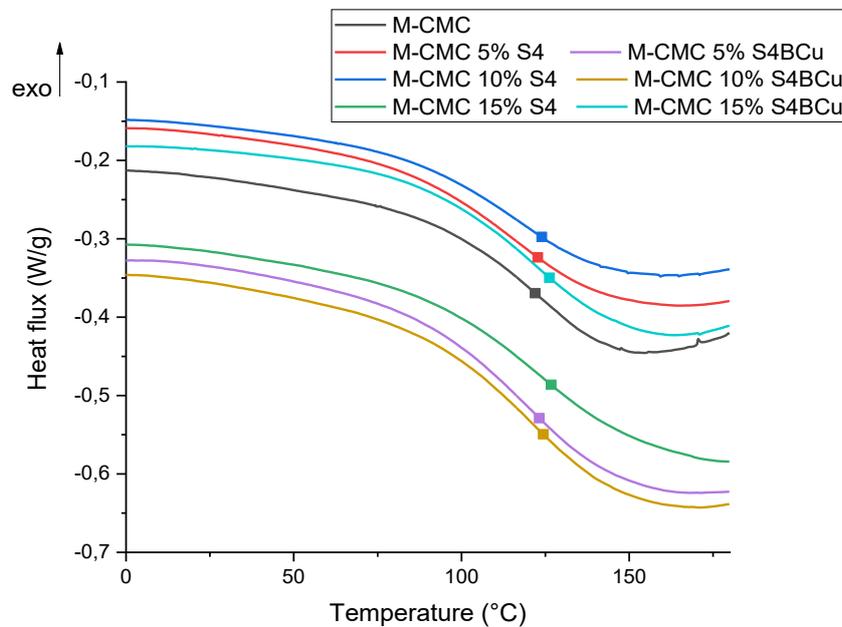


Figura 4.18 Calorimetria differenziale a scansione dei campioni a base M-CMC

Composizione idrogelo	T _g [°C]
M-CMC	121,9
M-CMC 5% S4	122,8
M-CMC 10% S4	123,9
M-CMC 15% S4	126,7
M-CMC 5% S4BCu	123,1
M-CMC 10% S4BCu	124,3
M-CMC 15% S4BCu	126,3

Tabella 4.2 Temperatura di transizione vetrosa individuata con analisi DSC sugli idrogeli a base di M-CMC

4.7. TGA

4.7.1. Idrogeli a base di GelMA

L'analisi termogravimetrica (TGA) realizzata sugli idrogeli secchi consente di indagare l'effetto dell'aggiunta dei biovetri sulla degradazione termica dei compositi, portati a 700°C in atmosfera inerte (N₂).

Facendo riferimento alle curve relative ai compositi GelMA/S4 in Figura 4.19, si osserva che in corrispondenza di temperature basse (circa 100°C) tutti i sistemi presentano un comportamento simile: in tutti i casi si riscontra infatti una perdita che va dal 2% al 3% in peso, dovuta principalmente all'allontanamento dell'acqua presente nel sistema. In questo primo tratto fino a 160°C circa, il composito GelMA/15%S4 e GelMA pura sono i sistemi in cui la perdita in peso si manifesta più lentamente; gli idrogeli con meno vetro (10% e 5% rispettivamente) hanno invece comportamento molto simile tra loro, descritto da una curva che scende più rapidamente. Il punto di onset, ossia la temperatura a cui l'idrogelo ha perso il 5% del peso iniziale, si ha a 147°C nel GelMA e nel GelMA/15%S4, a 130°C nel GelMA/5%S4 e a 132°C nel GelMA/10%S4.

La DTG (derivata prima della curva TGA, in Fig.4.20) evidenzia la presenza di un picco poco intenso a temperature inferiori a 250°C, indicativo di un primo step di degradazione. Risulta però di maggior interesse l'intenso picco di degradazione collocato in corrispondenza della temperatura a cui la velocità di degradazione è massima (punto di flesso della curva TGA). Analizzando le informazioni fornite dalla DTG si osserva come l'aggiunta di più del 10% di biovetro S4 consenta di "ritardare" la degradazione termica dell'idrogelo, spostandola verso temperature più alte. Questo trend non vale per la curva riferita a GelMA/5%S4, il cui picco di degradazione (a 312°C) si verifica a temperatura leggermente più bassa rispetto alla GelMA pura (314°C).

Infine, nella TGA si osserva la presenza di un residuo al termine della degradazione termica di tutti gli idrogeli. Ad eccezione del composito GelMA/5%S4, gli altri sistemi presentano una quantità di residuo crescente all'aumentare della concentrazione di biovetro. Si consideri infatti che il vetro, in fase di sintesi, è già stato sottoposto ad un trattamento termico di 2 ore a 700°C: l'analisi termogravimetrica non dovrebbe quindi comportare ulteriori perdite in massa da parte del biovetro.

A tal proposito, si potrebbe ipotizzare che il residuo complessivo è dato dalla somma del contributo della GelMA residua a 700°C più l'intera massa iniziale del vetro, termicamente stabile. Confrontando però i valori di residuo nei diversi casi, si osserva come questo nei composti più ricchi di biovetro sia minore del previsto. Se per la sola GelMA a 700°C rimane il 30,8% del peso iniziale del campione, per il composito GelMA/15%S4 (che, considerando il campione secco di partenza, ha una composizione 87% GelMA e 13% S4) ci si aspetterebbe di avere un contributo pari a $(0,87 \cdot 0,308) \cdot 100 = 27\%$ dato dalla GelMA più il 13% di S4 invariato, per un totale di $(27+13) = 40\%$ di residuo. Le misure sperimentali mostrano però che a 700°C il residuo di GelMA/15%S4 è solo il 34,9% del peso iniziale del provino. Lo stesso vale nel caso di GelMA/10%S4 (90,9% GelMA + 9,1% S4), in cui il residuo teorico (37%) è maggiore di quello sperimentale (33,4%).

Ritenendo valida la stabilità termica dei biovetri e considerando una buona dispersione del biovetro all'interno della formulazione fotoreticolabile, è dunque possibile ipotizzare che la presenza del biovetro abbia un effetto sulla reticolazione della componente polimerica dell'idrogelo tale da favorire la formazione di composti volatili ad alta temperatura, diminuendo la frazione residua associata alla matrice. Si consideri inoltre che la gelatina di partenza è di origine animale e presenta una certa variabilità nella sua struttura chimica: questa eterogeneità si ripercuote sul differente comportamento nella degradazione termica del materiale, legato alla diversa tendenza delle varie strutture a formare char incombusto.

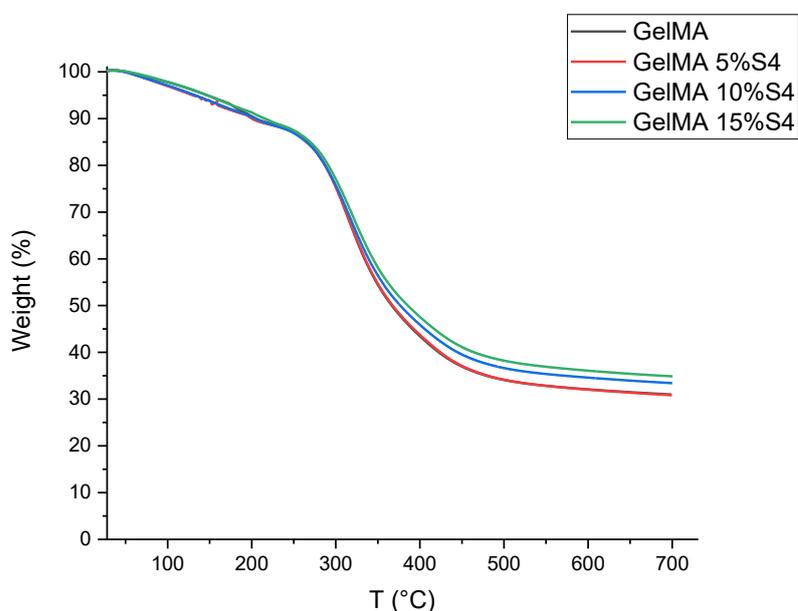


Figura 4.19 Termogramma (TGA) dei sistemi GelMA/S4

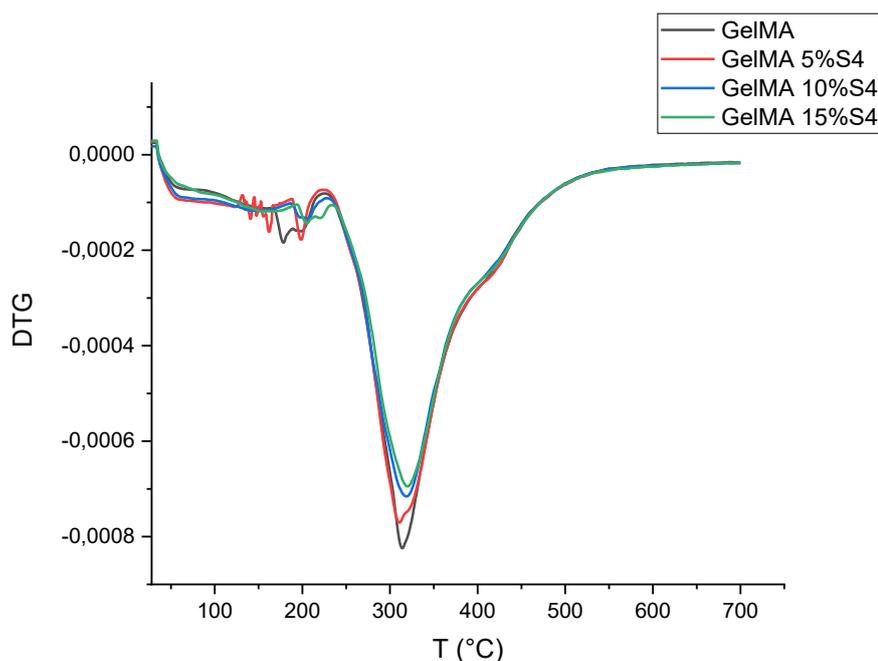


Figura 4.20 Curva DTG: derivata prima della curva TGA dei sistemi a base GelMA/S4

L'analisi TGA compiuta sui compositi GelMA/S4BCu mostra, analogamente al caso precedentemente studiato, una perdita in peso che va dal 2% al 3,5% in peso a temperature nell'intorno dei 100°C, a causa dell'allontanamento dell'acqua presente nel sistema. In Figura 4.21, nel tratto delle curve fino a 170°C non si individua un trend correlabile alla progressiva aggiunta di biovetro alla GelMA: i campioni che perdono peso più rapidamente sono infatti quelli con 5%wt e 15%wt di S4BCu, mentre la curva relativa a GelMA/10% S4BCu scende più lentamente. In questo tratto, GelMA ha una perdita in peso percentuale inferiore rispetto ai sistemi arricchiti con biovetro. Si evidenzia inoltre come l'aggiunta di S4BCu provochi la diminuzione della temperatura di onset, a cui l'idrogel ha perso il 5% del suo peso iniziale. L'inizio della degradazione, che per GelMA si ha a 147°C, si verifica infatti a 123°C in GelMA/5%S4BCu, a 139°C per GelMA/10%S4BCu e a 121°C GelMA/15%S4BCu.

Le curve DTG di questi idrogeli (in Figura 4.22) presentano un primo picco di bassa intensità a temperature crescenti con la percentuale di S4BCu presente, ad eccezione di GelMA/15% S4BCu in cui il picco non si presenta. Focalizzandosi invece sul più intenso picco di degradazione, si osserva come la massima velocità di degradazione si sposti verso temperature più alte con l'aggiunta di S4BCu. In particolare, mentre nella sola GelMA il picco si riscontra a 314°C, nei compositi GelMA/5% S4BCu e GelMA/10% S4BCu le temperature risultano rispettivamente pari a 319°C e 320°C. Nel sistema GelMA/15% S4BCu la massima velocità di degradazione si individua a 317°C.

Facendo infine riferimento al residuo presente a 700°C nella TGA, si osserva come anche in questo caso i valori registrati per i compositi siano inferiori rispetto alle aspettative teoriche. In particolare si evidenzia come il composito GelMA/5%S4BCu presenti un residuo del 29,5%, inferiore rispetto alla sola GelMA. Tra i compositi più ricchi di biovetro il residuo aumenta al

crescere della concentrazione di S4BCu, ma anche in questo caso l'analisi sperimentale dimostra che considerare separatamente il residuo della GelMA e quello del biovetro non è un approccio corretto.

Analogamente a quanto osservato per S4, oltre a tenere conto della disomogeneità strutturale della gelatina, è possibile ipotizzare che il crosslinking della matrice del composito risenta della presenza di S4BCu, che favorisce la formazione di composti volatili ad alta temperatura diminuendo la frazione residua associata alla componente polimerica.

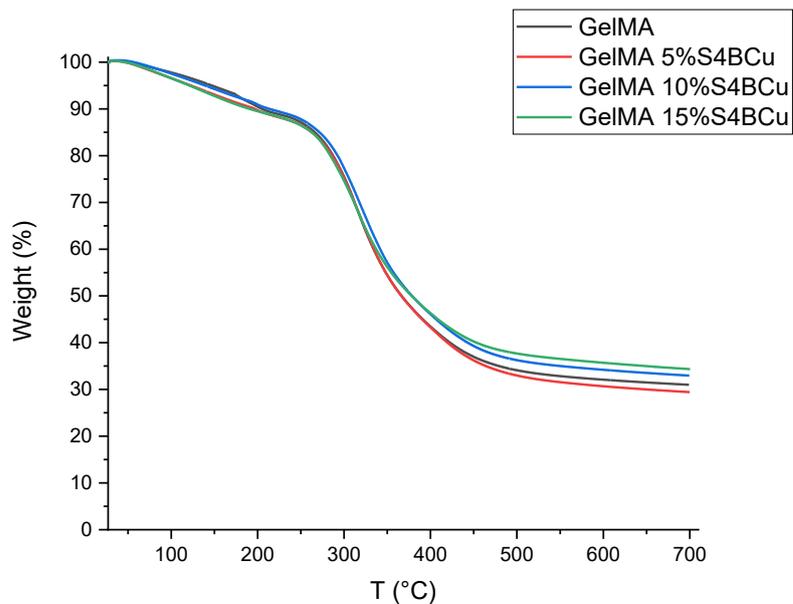


Figura 4.21 Termogramma (TGA) dei sistemi GelMA/S4BCu

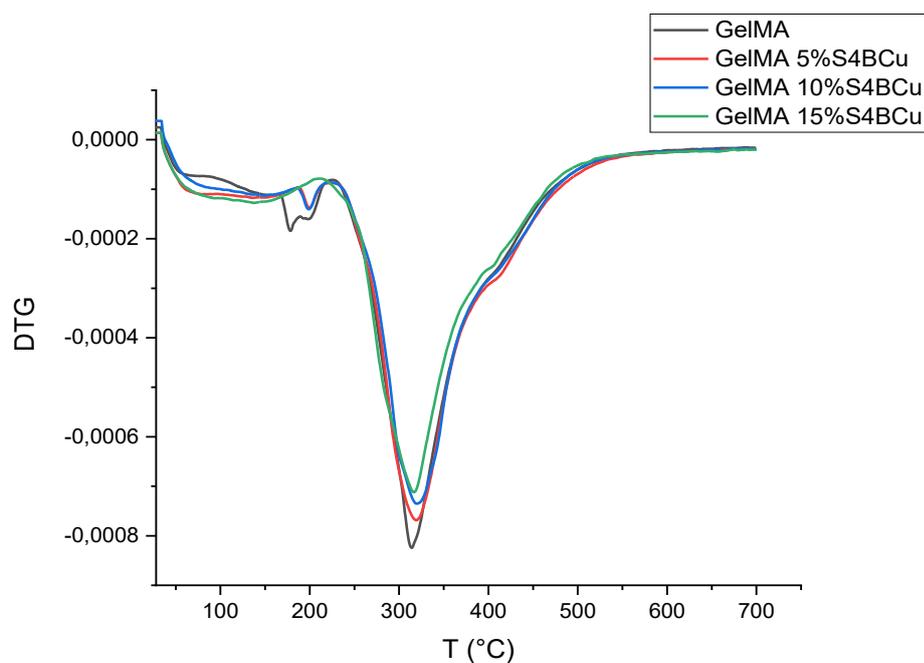


Figura 4.22 Curva DTG: derivata prima della curva TGA dei sistemi a base GelMA/S4BCu

In Figura 4.23 sono infine riassunte le principali informazioni ricavate dall'analisi termogravimetrica. In particolare si osserva che a parità di concentrazione di biovetro aggiunta a GelMA, l'aggiunta di S4BCu comporta la formazione di una minor quantità di residuo rispetto a S4. Dalle analisi effettuate è inoltre emerso come l'aggiunta del biovetro provochi la diminuzione della temperatura di onset rispetto al caso della GelMA pura. Considerando che i biovetri si comportano come discontinuità submicrometriche (o micrometriche, in base al grado di dispersione delle particelle vetrose) all'interno della matrice polimerica, è possibile ipotizzare che agiscano come siti preferenziali di innesco della degradazione. L'aggiunta della fase vetrosa termicamente stabile comporta, nella maggior parte dei casi, l'aumento della temperatura a cui la velocità di degradazione è massima. Come già osservato nell'analisi DSC, l'idrogelato con il 15%wt di S4BCu presenta un comportamento anomalo rispetto agli altri sistemi GelMA/S4BCu a causa della sua minore densità di reticolazione: l'energia termica necessaria per degradare la struttura è più bassa, poiché è minore il numero di legami covalenti che devono essere rotti.

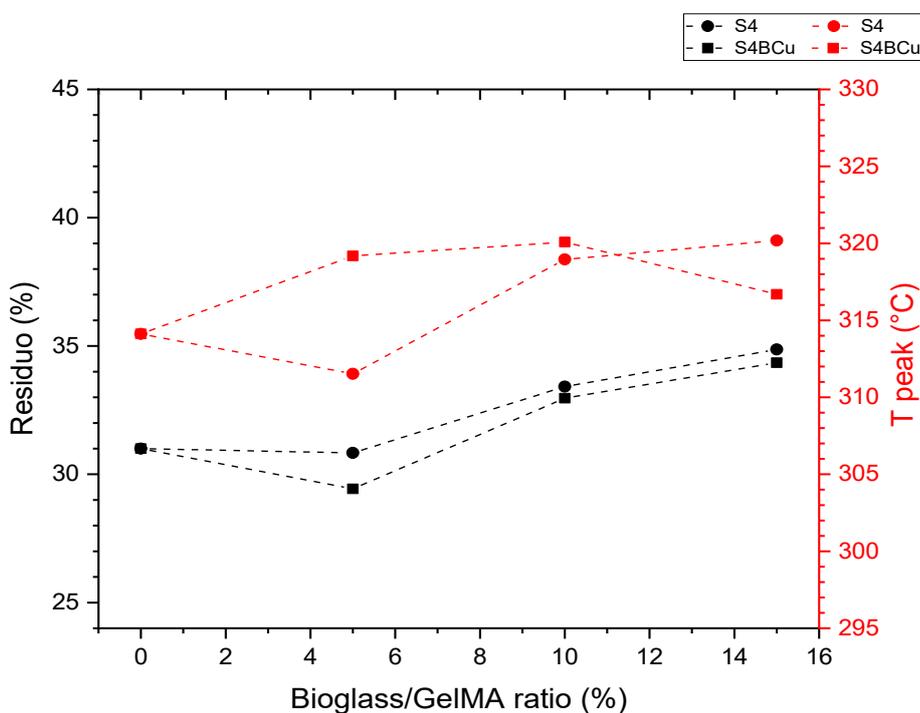


Figura 4.23 Andamento del residuo (curve nere) e della temperatura del picco di decomposizione (curve rosse) per le diverse composizioni dei sistemi GelMA/S4 (pallini) e GelMA/S4BCu (quadrati)

4.7.2. Idrogeli a base di M-CMC

In Figura 4.24 è riportato l'andamento della massa dei sistemi M-CMC/S4 (in percentuale, rispetto alla massa iniziale degli idrogeli secchi) in funzione della temperatura, ottenuto dall'analisi termogravimetrica (TGA). Osservando le curve, in tutti i casi si riscontra una perdita che va dal 2% al 3% in peso in corrispondenza di temperature basse (circa 100°C), principalmente a dovuta all'allontanamento dell'acqua residua presente nell'idrogelato. In questo primo tratto tutte le composizioni hanno comportamento simile. Il punto di onset si ha a 118,2°C nell'idrogelato privo di biovetro, mentre nei sistemi contenenti

il 5% ed il 10% di S4 si ha rispettivamente a 123,3°C e 128,8°C. La tendenza si inverte per il sistema più ricco di S4, che inizia a degradare a 116,4°C, prima ancora dell'idrogelo privo di biovetro.

Le derivate prime delle curve ottenute dall'analisi termogravimetrica sono riportate in Figura 4.25. Per tutte le composizioni si individuano due step di degradazione: il primo step si verifica a circa 255°C per tutti i sistemi esaminati ed è evidenziato dal primo picco delle curve DTG, di scarsa intensità. Il secondo picco, più intenso, è centrato sulla temperatura a cui avviene lo step principale di degradazione. La massima velocità di degradazione degli idrogeli di M-CMC pura si individua a 299,3°C, mentre aggiungendo il 5% di biovetro S4 la temperatura di degradazione aumenta fino a 305,2°C. Aumentando la percentuale di biovetro il picco si sposta verso temperature più basse, rispettivamente pari a 297,7°C per M-CMC/10% S4 e 293,7°C per M-CMC/15% S4: in generale si riscontra quindi la diminuzione della temperatura di massima velocità di degradazione al crescere della concentrazione di biovetro S4 presente nell'idrogelo.

Dalla curva TGA è infine possibile ricavare informazioni relative alla massa residua del campione a 700°C. In particolare, si osserva come i sistemi contenenti biovetro presentino un residuo maggiore rispetto all'idrogelo di pura M-CMC (che a 700°C ha una massa pari al 37,5% di quella iniziale). Questa osservazione è in linea con le aspettative teoriche: il vetro in fase di sintesi è già stato sottoposto ad un trattamento termico di 2 ore a 700°C, quindi non dovrebbe degradare perdendo massa. Coerentemente, l'idrogelo con residuo massimo è quello più ricco di biovetro (M-CMC/15% S4 ha una massa residua del 41,9%), mentre i sistemi contenenti il 5% ed il 10% in peso di biovetro presentano un residuo tra loro simile e pari a circa il 39% della massa iniziale.

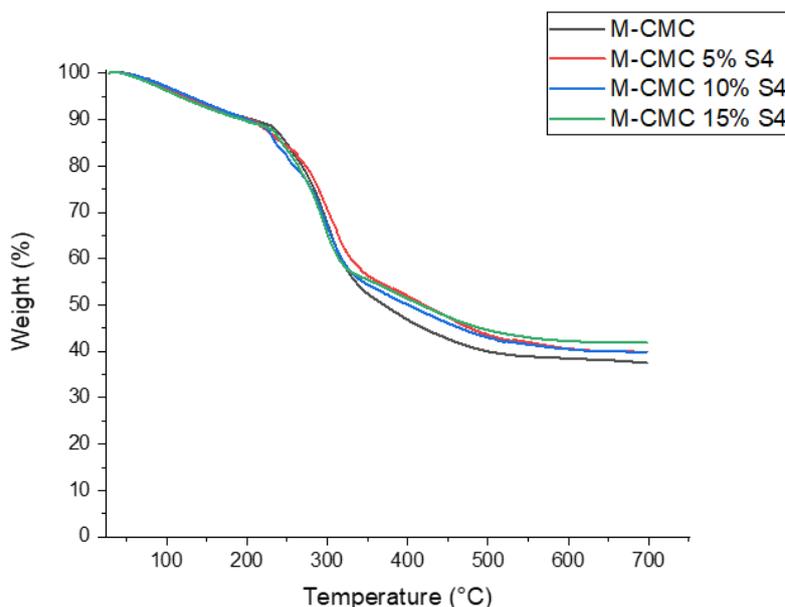


Figura 4.24 Termogramma (TGA) dei sistemi M-CMC/S4

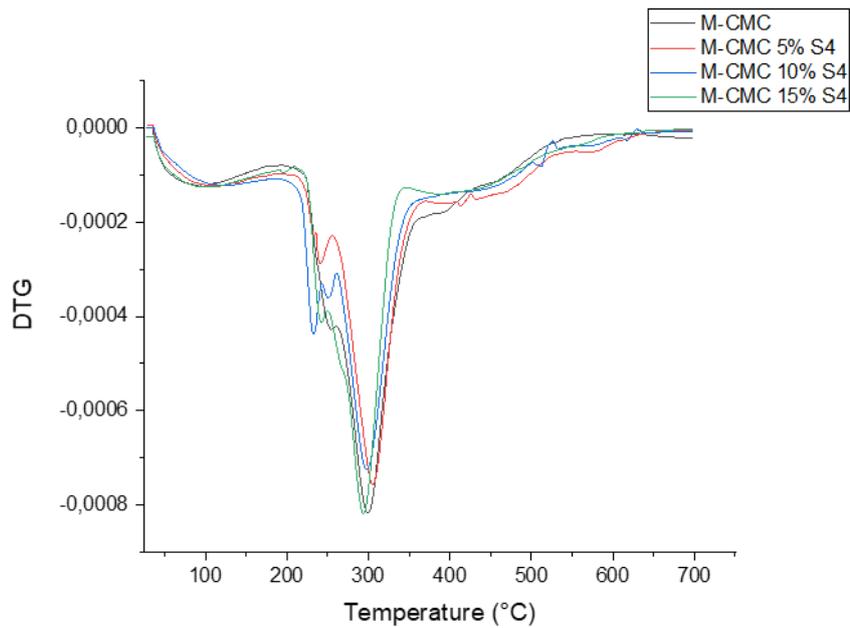


Figura 4.25 Curve DTG degli idrogeli M-CMC/S4

In Figura 4.26 sono riportate le curve ottenute dalle analisi termogravimetriche realizzate sui campioni M-CMC/S4BCu. Analogamente a quanto osservato negli idrogeli contenenti vetro S4, anche in questo caso si osserva una prima diminuzione della massa degli idrogeli a basse temperature, dovuta all'allontanamento dell'acqua residua. Si osserva inoltre che l'aggiunta del 5%wt di biovetro S4BCu non comporta una notevole variazione della temperatura di onset (si passa da 118,2°C per M-CMC pura a 118,7°C per M-CMC/5% S4BCu). Tra tutti gli idrogeli esaminati, il primo ad iniziare la degradazione è M-CMC/10% S4BCu, a 114,1°C. Aumentando ulteriormente la concentrazione di S4BCu fino al 15%wt, la temperatura di onset cresce fino a 128,9°C.

La DTG in Figura 4.27 evidenzia come al crescere della concentrazione di biovetro S4BCu aumenti la temperatura di degradazione. La massima velocità di degradazione si riscontra infatti a 294,3°C per M-CMC/5% S4BCu, a 294,7°C per M-CMC/10% S4BCu e a 295,8°C per M-CMC/15% S4BCu.

Si riscontra infine che la massa residua a 700°C aumenta al crescere della percentuale di biovetro dispersa nell'idrogelo. In particolare, mentre la M-CMC pura presenta un residuo del 37,5% rispetto alla massa iniziale, per M-CMC/5% S4BCu il valore ammonta al 37,7%. La massa termicamente stabile per M-CMC/10% S4BCu è il 39,8% della massa iniziale del provino, mentre nell'idrogelo più ricco di biovetro il residuo a 700°C è massimo e pari al 45,8%.

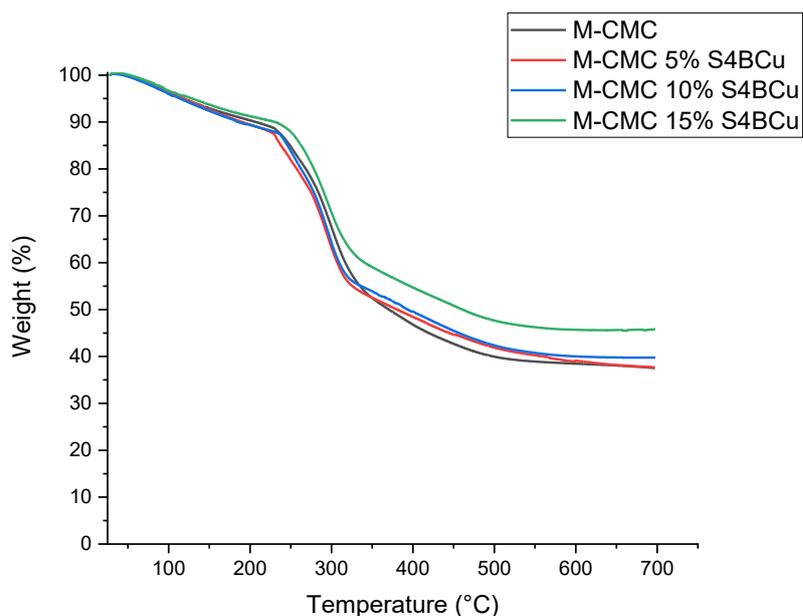


Figura 4.26 Termogramma (TGA) dei sistemi M-CMC/S4BCu

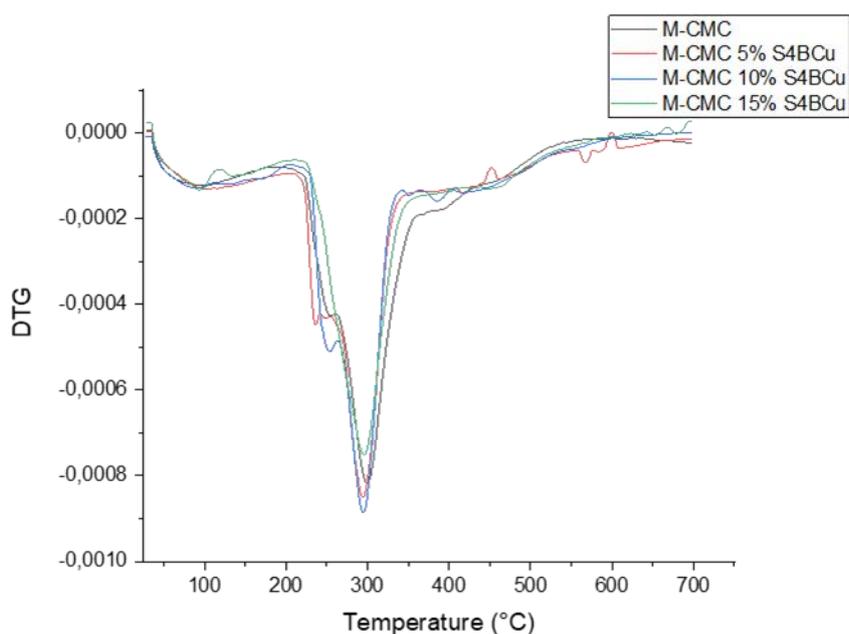


Figura 4.27 Curva DTG: derivata prima della curva TGA dei sistemi a base M-CMC/S4BCu

In Figura 4.28 è riportato un riassunto delle principali informazioni ricavate dall'analisi termogravimetrica realizzata sugli idrogeli a base di M-CMC. In particolare si evidenzia come l'aggiunta dei diversi tipi di biovetro influenzi la temperatura a cui la velocità di degradazione è massima. Si osserva che la temperatura corrispondente al picco della DTG diminuisce al crescere della percentuale di biovetro S4, nonostante la fase aggiunta sia termicamente stabile. È possibile ipotizzare che questo comportamento sia dovuto all'azione degli ioni Ca^{2+} presenti nel biovetro: cationi bivalenti come Ca^{2+} sono infatti in grado di instaurare interazioni ioniche

con gli anioni carbossilati delle catene di M-CMC. Queste interazioni limitano il numero di COO⁻ disponibili per formare legami covalenti, provocando quindi la diminuzione del grado di reticolazione degli idrogeli (e di conseguenza della temperatura del picco di degradazione). È possibile ipotizzare che un meccanismo analogo si verifichi anche nei sistemi M-CMC/S4BCu: gli idrogeli contenenti questo biovetro presentano infatti il picco di degradazione a temperature minori rispetto al sistema di pura M-CMC. Tuttavia, in questo caso l'aggiunta di alte concentrazioni di biovetro non provoca la diminuzione della T_{picco} , che aumenta in modo poco significativo al crescere della percentuale della fase vetrosa termicamente stabile.

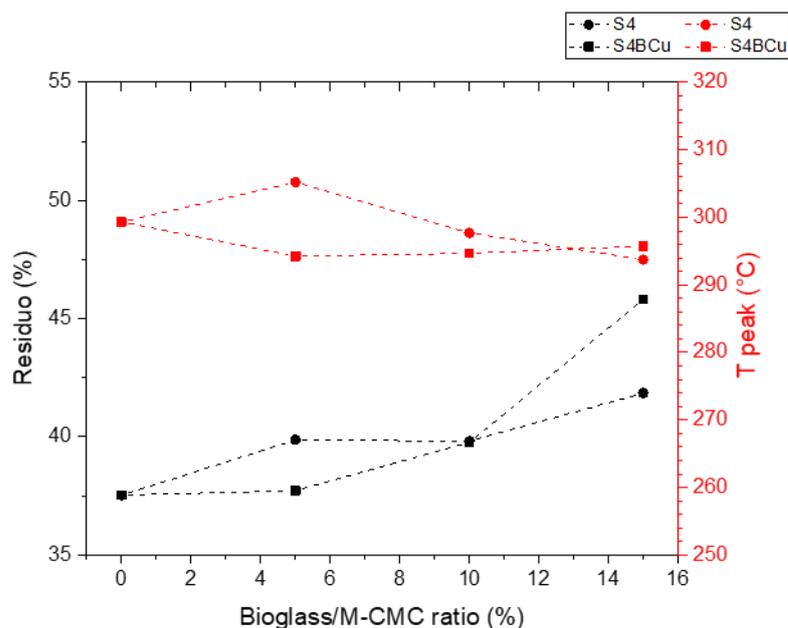


Figura 4.28 Andamento del residuo (curve nere) e della temperatura del picco di decomposizione (curve rosse) per le diverse composizioni dei sistemi M-CMC/S4 (pallini) e M-CMC/S4BCu (quadrati)

4.8. SEM

4.8.1. Idrogeli a base di GelMA

L'analisi al SEM dei sistemi a base di GelMA è stata realizzata sulla sezione dell'idrogelo liofilizzato che, prima di procedere alla metallizzazione del campione, è stata fratturata in modo fragile. Le immagini ottenute dall'analisi del campione di GelMA privo di biovetro sono riportate in Fig.4.29a-c. In particolare, le Figure 4.29a e 4.29b evidenziano l'elevata porosità dell'idrogelo, legata alla sua capacità di rigonfiamento (alla base di molte applicazioni di questo materiale). I pori, di forma approssimativamente sferica, presentano dimensioni eterogenee, ma sono distribuiti in modo uniforme su tutta la sezione del campione. Si osserva che spostandosi dal cuore verso gli estremi della sezione dell'idrogelo la dimensione dei pori diminuisce: le superfici laterali dell'idrogelo sono infatti le zone da cui l'acqua si allontana più velocemente, mentre al momento del congelamento il cuore del campione è ancora ben rigonfiato (quindi i

pori, occupati dall'acqua prima della liofilizzazione, rimangono più grandi). Questa osservazione sarà valida anche per tutti gli idrogeli a base di gelatina contenenti i biovetri. In Figura 4.29c, l'ingrandimento a 1000x permette di valutare localmente la taglia dei pori (superiore ai 20 μm) e lo spessore della parete tra i pori (8 μm).

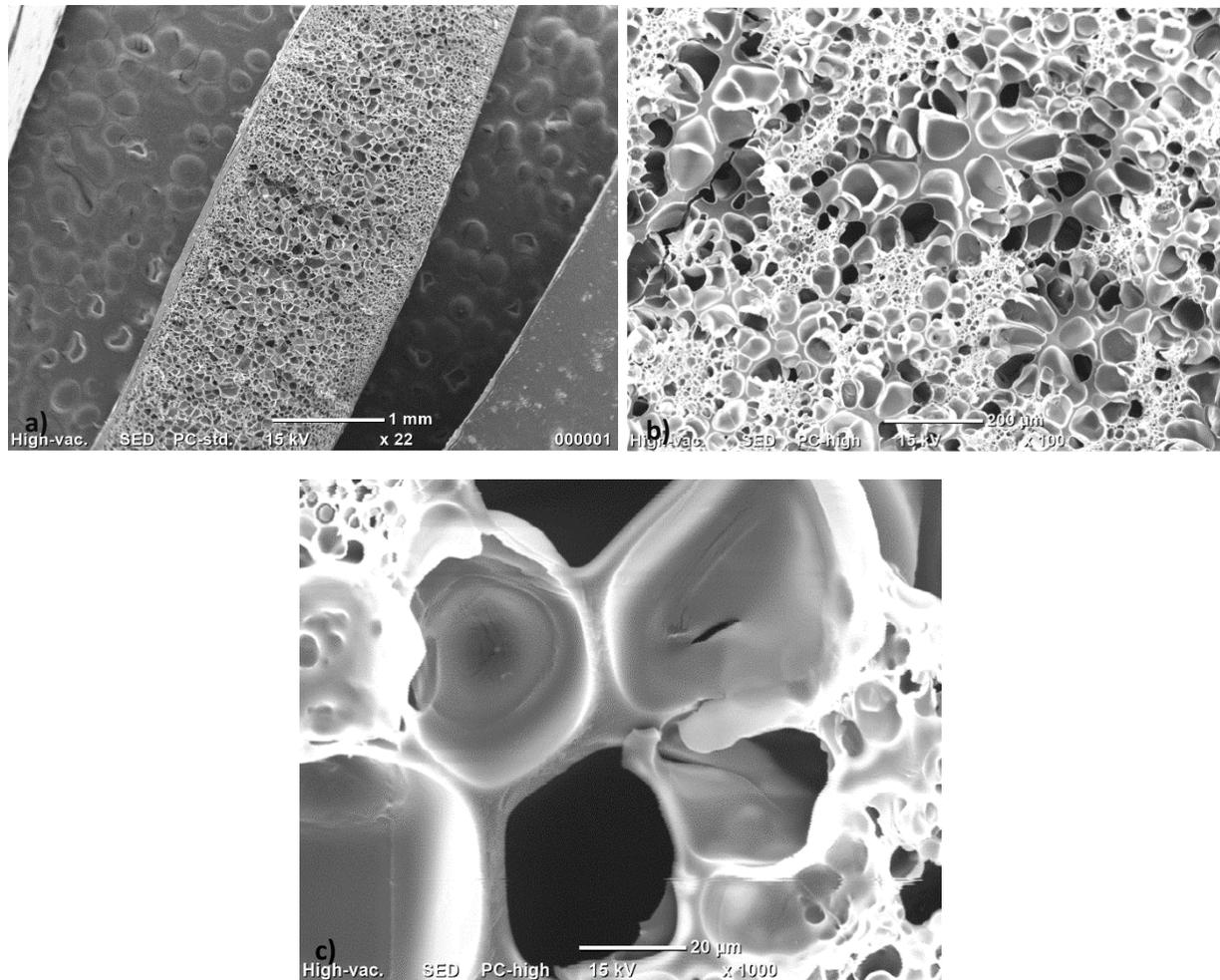


Figura 4.29 Immagini al SEM degli idrogeli di GelMA ad ingrandimenti:
a) 22x b) 100x c) 1000x

Le analisi al SEM degli idrogeli a base di gelatina arricchiti con biovetri sono riportate nelle Figure 4.30-4.35. A parità di concentrazione di biovetro aggiunta, non si evidenziano differenze tra i sistemi contenenti S4 e S4BCu.

Le Figure 4.30 e 4.31 sono relative all'analisi sugli idrogeli contenenti il 5% di biovetro (S4 per le Fig. 4.30 a), b) e c), S4BCu per le Fig. 4.31 a) e b)). Dal confronto tra la Figura 4.30a (e 4.31a) e quelle precedenti relative agli idrogeli di gelatina pura si osserva come il biovetro, seppur presente in bassa concentrazione, sia disposto sia sulla superficie interna dei pori che sulle pareti che separano pori adiacenti (ingrandito in Figura 4.30b). Anche in questo caso la dimensione delle porosità è eterogenea. Si osserva inoltre che i biovetri sono ben distribuiti in tutta la matrice, anche se la dispersione non è ottimale: come evidenziato in Figura 4.30c, le sfere di vetro formano agglomerati di dimensioni superiori a 3 μm . Affermazioni del tutto analoghe valgono per l'idrogelo contenente il 5%wt di S4BCu, che non presenta infatti significative differenze rispetto al corrispettivo con il vetro non dopato. In questo caso è stato possibile arrivare ad alti ingrandimenti mantenendo una buona qualità dell'immagine: una volta

catturata la foto in Figura 4.31b, è stato utilizzato lo strumento di analisi dell'immagine implementato dal software per determinare la taglia della particella di vetro isolata sulla destra, che è risultata pari a 451 nm. Le Figure 4.30c e 4.31b evidenziano inoltre come sia le nanoparticelle vetrose “di controllo” che quelle dopate abbiano una forma perfettamente sferica.

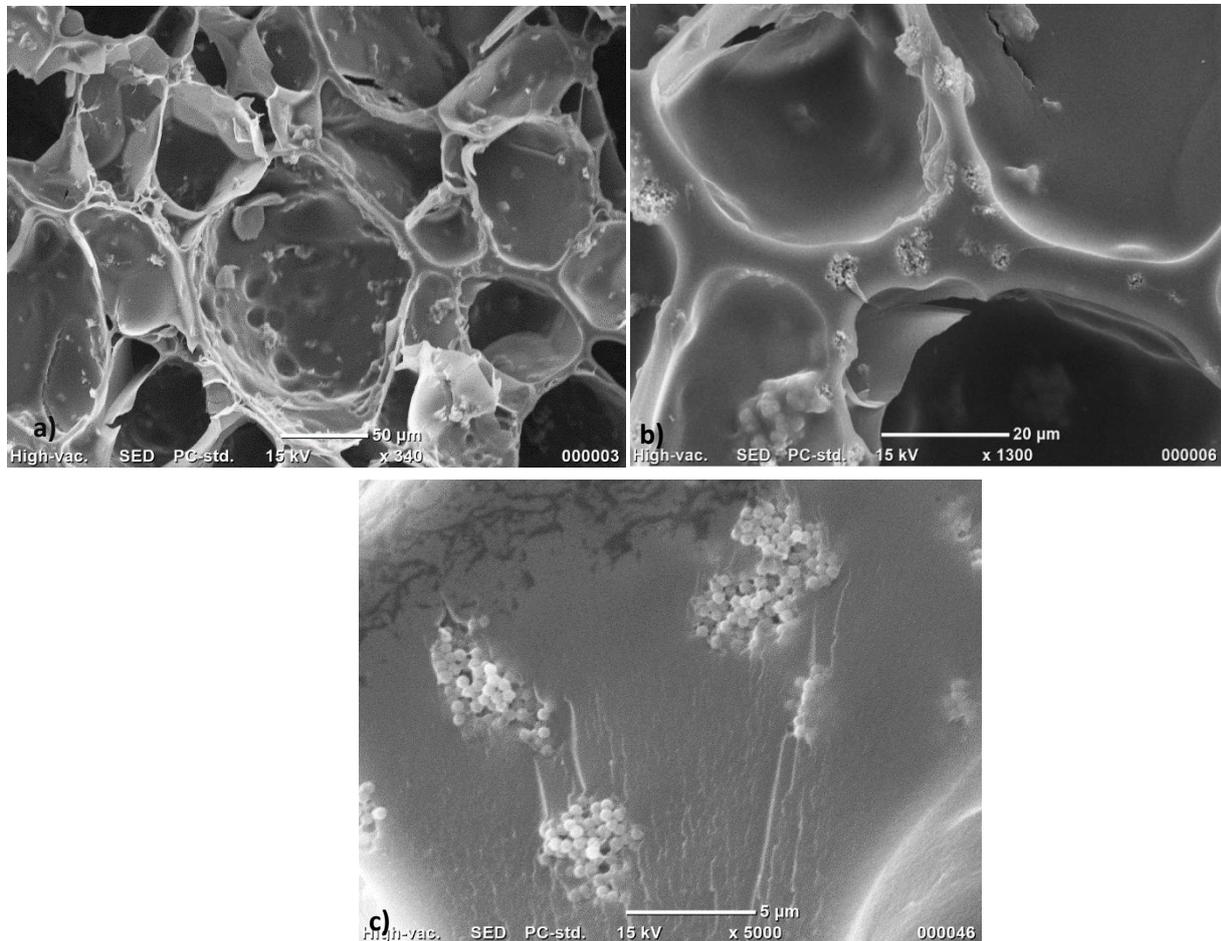


Figura 4.30 Immagini al SEM degli idrogeli GelMA/5% S4 ad ingrandimenti: *a)* 340x *b)* 1300x *c)* 5000x

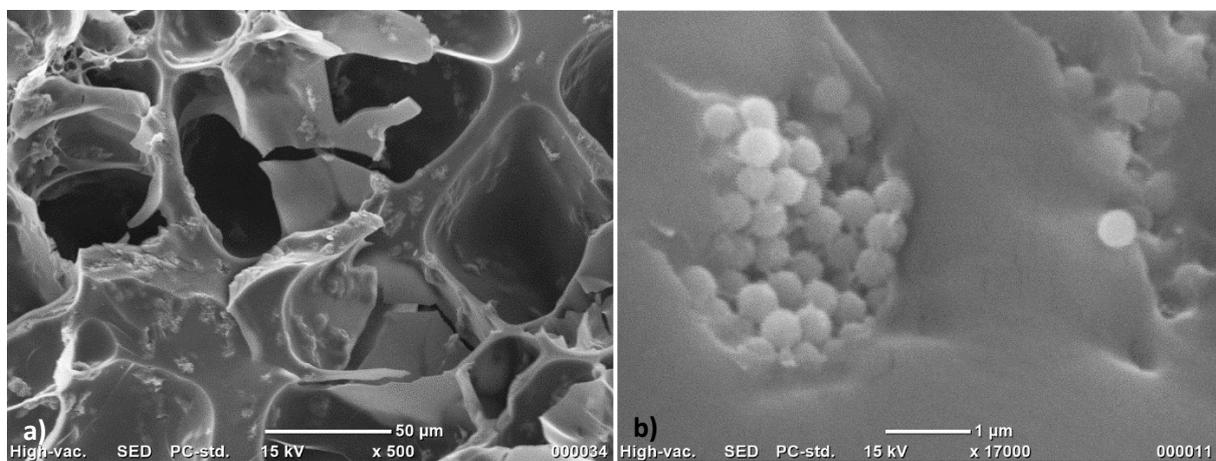


Figura 4.31 Immagini al SEM degli idrogeli GelMA/5% S4BCu ad ingrandimenti: *a)* 500x *b)* 17000x

Anche nel caso degli idrogeli arricchiti con il 10%wt di biovetro S4 o S4BCu, la distribuzione dimensionale delle porosità risulta piuttosto ampia (come visibile in Figura 4.32a per GelMA/S4 e 4.33a per S4BCu). A più alti ingrandimenti (340x nelle Figure 4.32b e 4.33b) è possibile individuare chiaramente i biovetri: questi risultano ben distribuiti nella matrice polimerica, sia sulla superficie dei pori che sulle pareti di separazione tra i diversi pori, condizione ottimale per l'applicazione di questi sistemi. All'ingrandimento 3400x (in Figura 4.32c e 4.33c) si distinguono le particelle di biovetro di forma sferica che risultano però aggregate a formare grappoli di dimensioni che vanno dai 2 μm ai 10 μm .

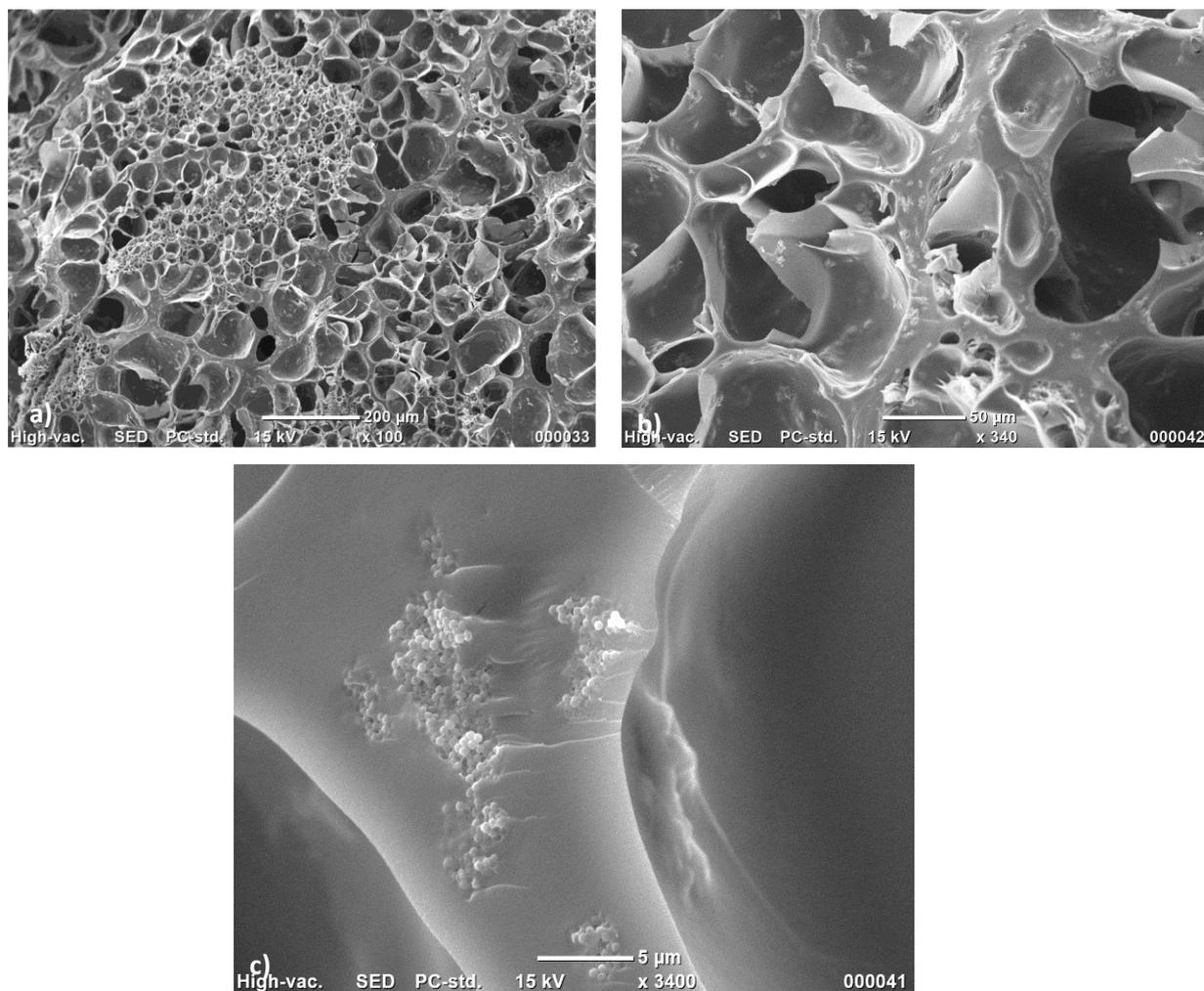


Figura 4.32 Immagini al SEM degli idrogeli GelMA/10% S4 ad ingrandimenti: *a)* 100x *b)* 340x *c)* 3400x

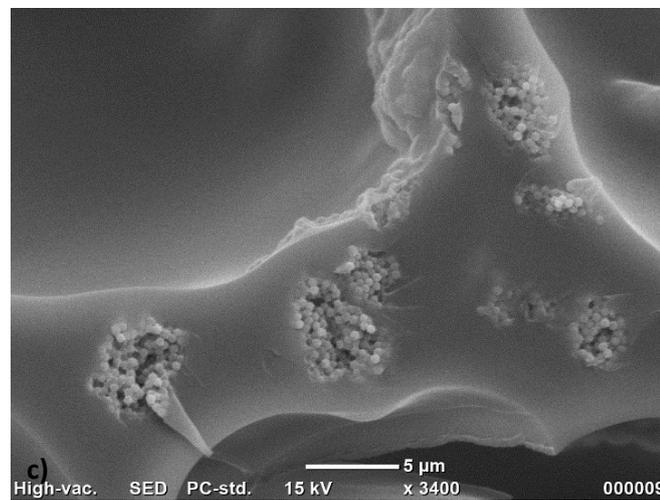
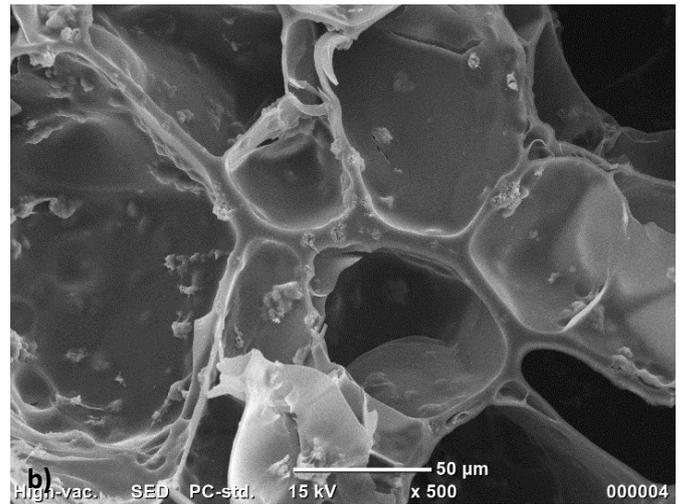
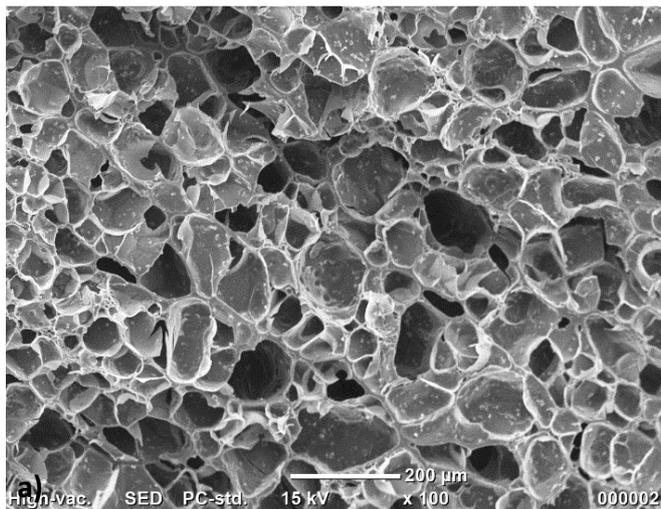


Figura 4.33 Immagini al SEM degli idrogeli GelMA/10% S4BCu ad ingrandimenti: *a)* 100x *b)* 500x *c)* 3400x

Infine, le immagini ottenute dall'analisi al SEM sugli idrogeli più ricchi di biovetro sono riportate nelle Figure 4.34 e 4.35. In questo caso sono sufficienti bassi ingrandimenti per visualizzare in modo chiaro la presenza dei biovetri, la cui distribuzione nella struttura porosa del polimero è ottimale. Gli ingrandimenti a 1000x e 2000x (Fig. 4.34b-c e 4.35b-c) consentono di evidenziare la presenza dei biovetri in modo omogeneo su tutta la matrice, anche in questo caso sia nelle pareti tra i pori che sulla superficie dei pori stessi. Le pareti che separano pori adiacenti in GelMA/15% S4BCu appaiono meno ricche di biovetro poiché, nella zona analizzata, queste risultano decisamente più sottili rispetto a quelle di GelMA/15% S4. Infine ad elevati ingrandimenti (10000x in Figura 4.34d e 4.35d) è possibile osservare le singole particelle sferiche, di diametro stimato tra i 450 e i 510 nm, che costituiscono agglomerati di dimensioni comprese tra 2 e 6 μm .

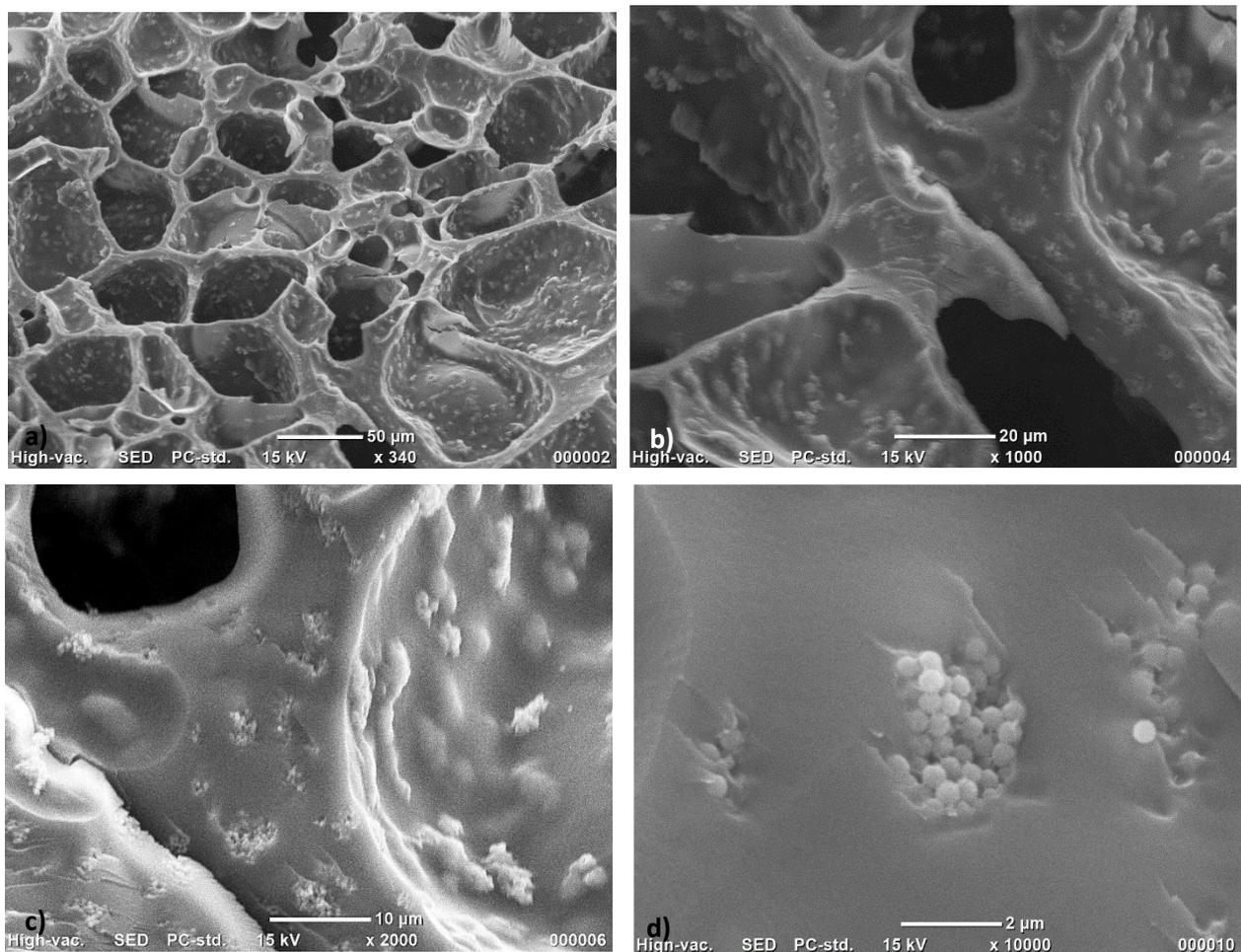


Figura 4.34 Immagini al SEM degli idrogeli GelMA/15 S4 ad ingrandimenti: *a)* 340x *b)* 1000x *c)* 2000x *d)* 10000x

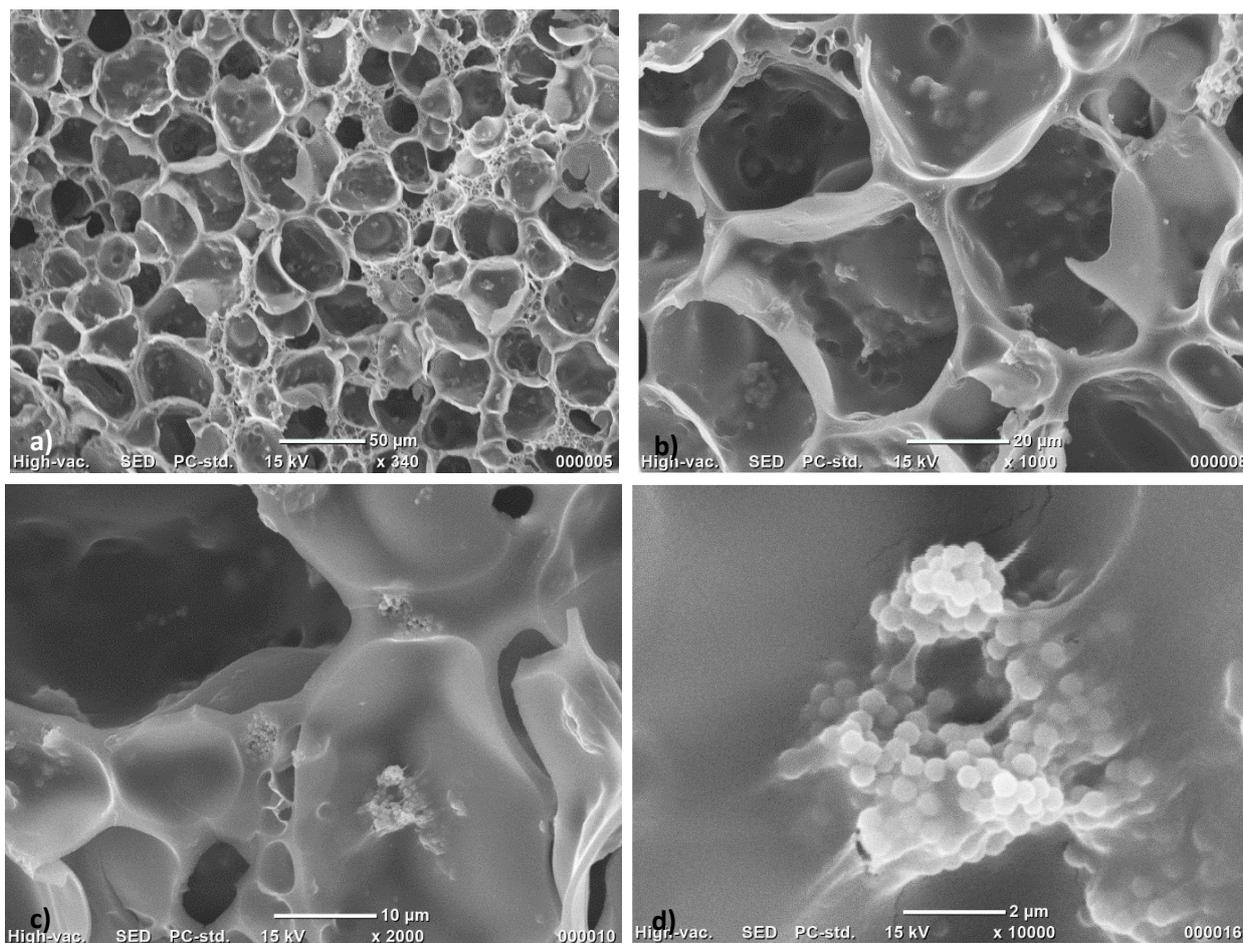


Figura 4.35 Immagini al SEM degli idrogeli GelMA/15 S4BCu ad ingrandimenti:
a) 340x b) 1000x c) 2000x d) 10000x

4.8.2. Idrogeli a base di M-CMC

L'analisi al SEM sui sistemi a base di M-CMC è stata realizzata sulla sezione dei provini che, una volta liofilizzati, sono stati rotti in modo fragile (servendosi di azoto liquido) e metallizzati con Pt.

Già ad occhio nudo, la morfologia degli idrogeli a base di cellulosa risulta decisamente diversa rispetto a quella osservata per la gelatina. Come evidenziato in Figura 4.36a, anziché una struttura porosa interconnessa, si individuano una serie di sottili fogli ricchi di increspature, tenuti insieme da alcune aree di contatto tra fogli adiacenti. In Figura 4.36b è possibile osservare la morfologia di un singolo foglio, che appare molto rugoso. Queste caratteristiche sono alla base della struttura degli idrogeli di cellulosa, che risulta infatti aperta e soffice. Ad ingrandimenti superiori, lo strumento di analisi fornito dal software ha consentito la valutazione dello spessore del singolo foglio in Figura 4.36c, che è risultato pari a 1,26 µm.

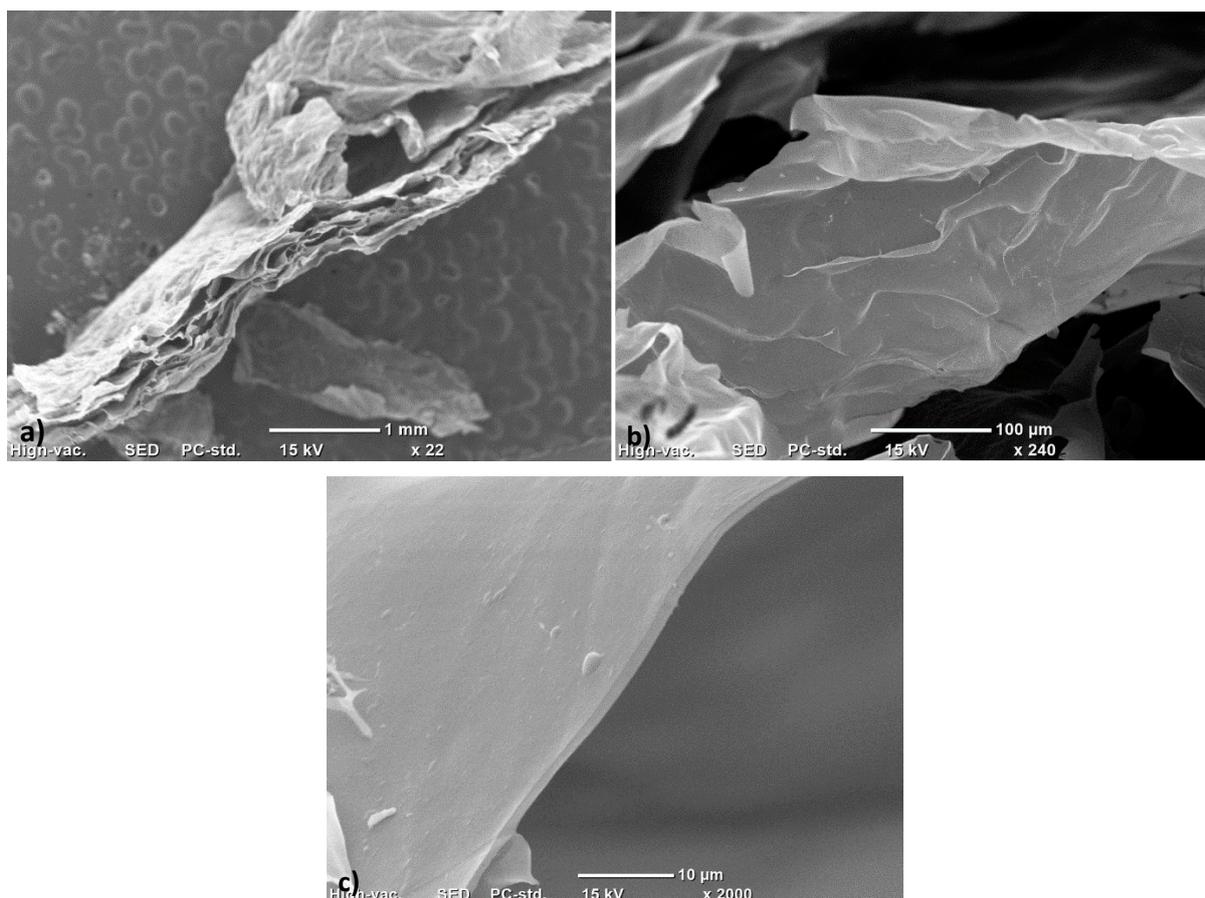


Figura 4.36 Immagini al SEM degli idrogeli di M-CMC ad ingrandimenti:
a) 22x b) 240x c) 2000x

Le analisi realizzate sugli idrogeli arricchiti con il biovetro mostrano come la morfologia non sia influenzata dal tipo di biovetro aggiunto (S4 o S4BCu).

Le Figure 4.37 e 4.38 sono relative all'analisi sugli idrogeli contenenti il 5% di biovetro (S4 per le Fig.4.37 a), b) e c), S4BCu per le Fig.4.38 a), b) e c)). Le Figure 4.37a e 4.38a consentono di osservare la struttura ricca di vuoti, costituita da fogli sottili, irregolari e rugosi. Una morfologia di questo tipo è ottimale per l'applicazione di interesse, poiché massimizza la superficie di contatto tra l'idrogelo ed il liquido in cui è immerso, consentendo quindi il contatto intimo tra i biovetri distribuiti sulla matrice polimerica e la soluzione. Le immagini ottenute ad ingrandimenti superiori (Fig. 4.37b-c e 4.38b-c) evidenziano come i biovetri siano ben distribuiti su tutta la superficie della matrice polimerica. In particolare, quanto appena affermato risulta evidente in Figura 4.37c e 4.38c, dove oltre all'ottima distribuzione è possibile osservare la coesistenza di agglomerati di grosse dimensioni (circa 20 μm) e di zone in cui i biovetri sono ben dispersi, al punto che si individuano singole particelle sferiche.

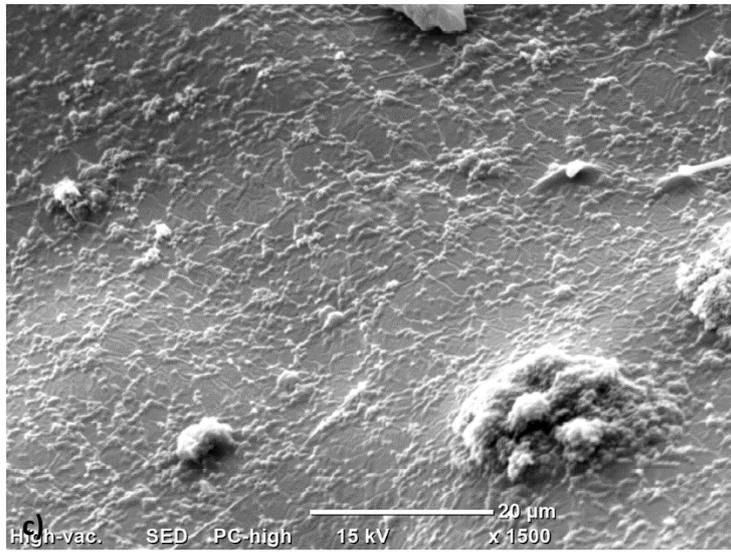
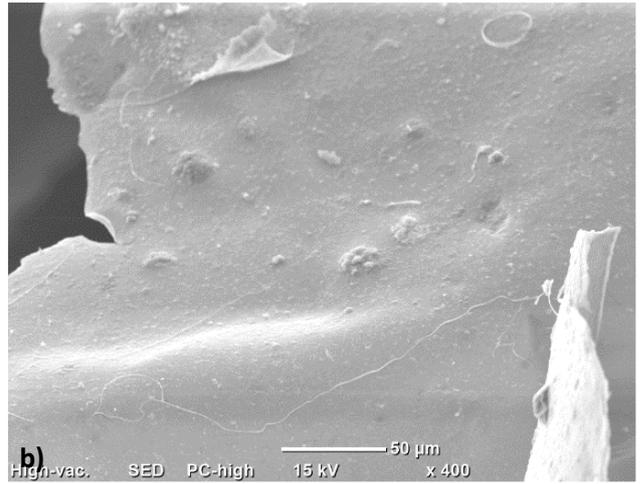
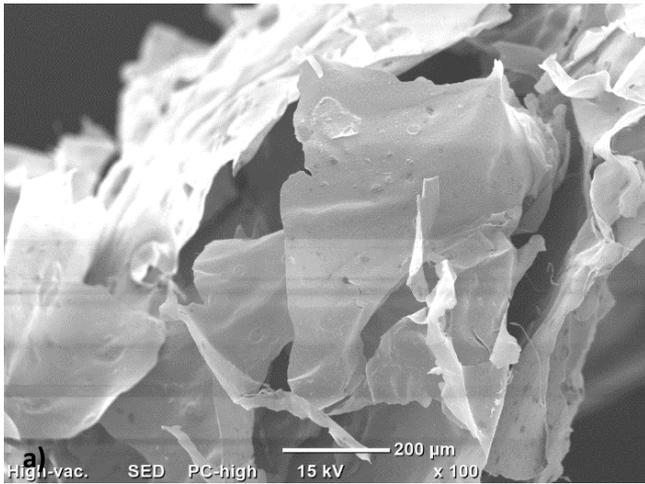
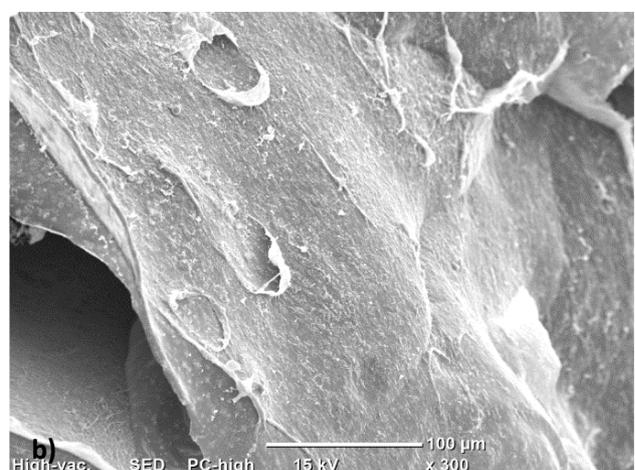
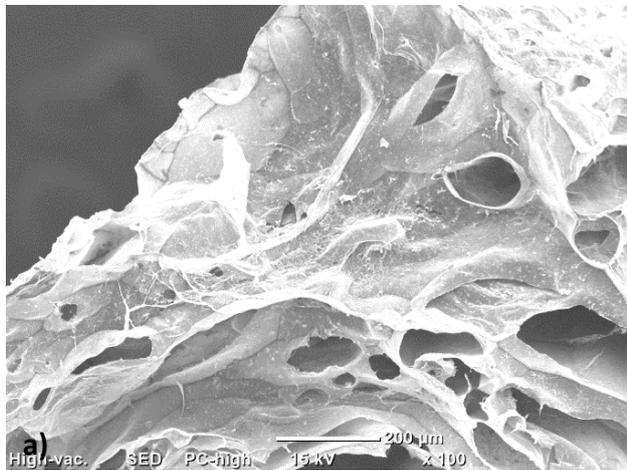


Figura 4.37 Immagini al SEM degli idrogeli M-CMC/5% S4 ad ingrandimenti:
a) 100x b) 450x c) 1500x



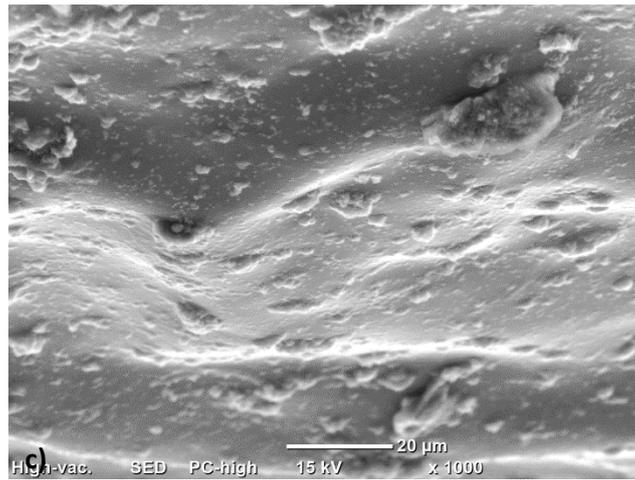
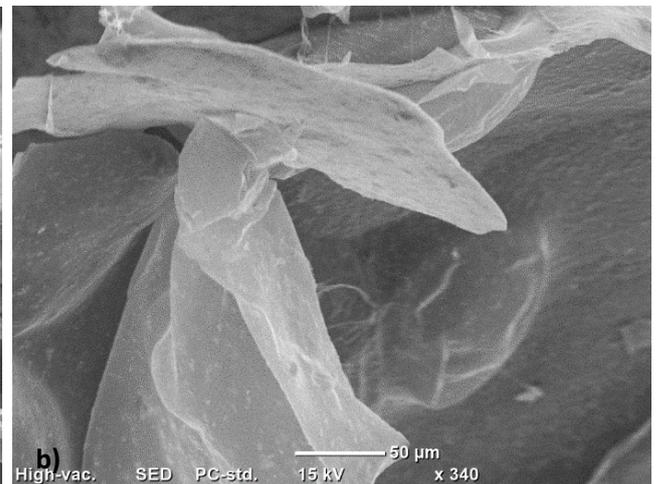
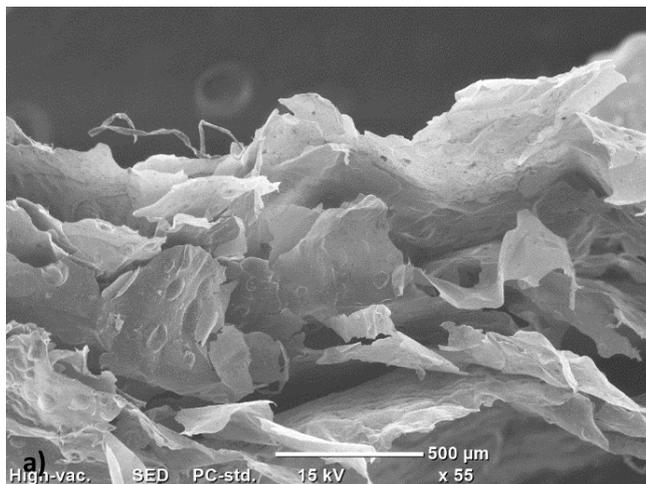


Figura 4.38 Immagini al SEM degli idrogeli M-CMC/5% S4BCu ad ingrandimenti:
a) 100x b) 300x c) 1000x

Nelle Figure 4.39 e 4.40 sono riportate le immagini relative rispettivamente ai sistemi M-CMC/10% S4 e M-CMC/10% S4BCu. Le Figure 4.39a e 4.40a evidenziano la struttura a fogli tipica di questi idrogeli, mentre ad ingrandimenti superiori (Figure 4.39b e 4.40b) è possibile riconoscere i biovetri ben distribuiti su tutta la matrice. In particolare, in Fig. 4.40b si individua la presenza del vetro anche sulla sottile sezione dei fogli di cellulosa, oltre che sulle loro superfici laterali. Infine, ad alti ingrandimenti (Figura 4.39c) si osserva come, anche in questo caso, vi siano particelle vetrose ben disperse oltre ad agglomerati di dimensione variabile (anche superiore ai 5 μm).



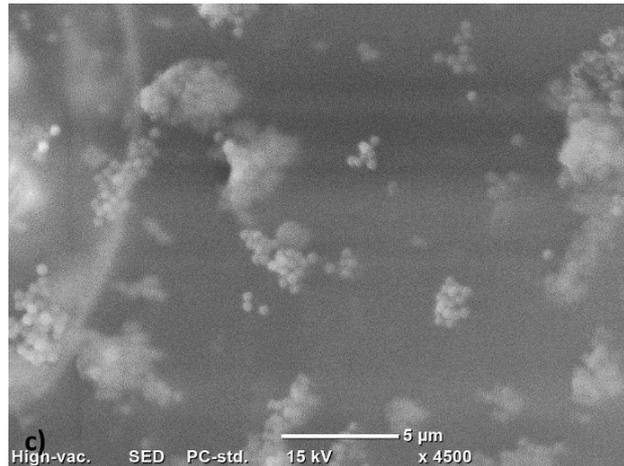


Figura 4.39 Immagini al SEM degli idrogeli M-CMC/10% S4 ad ingrandimenti:
a) 55x b) 340x c) 4500x

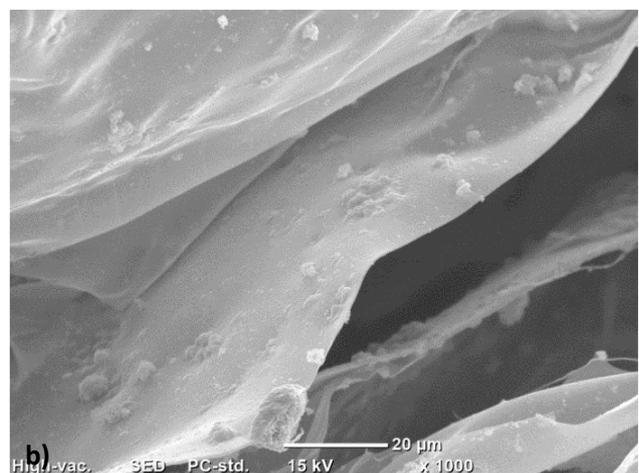
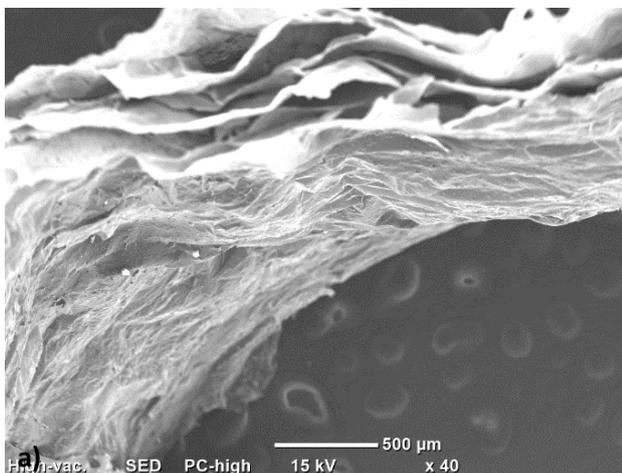


Figura 4.40 Immagini al SEM degli idrogeli M-CMC/10% S4BCu ad ingrandimenti:
a) 40x b) 1000x

Le Figure 4.41 e 4.42 sono state ottenute dall'analisi al SEM degli idrogeli M-CMC con il 15%wt di biovetro, la cui struttura a fogli è catturata in Figura 4.41a e 4.42a. A bassi ingrandimenti si evidenzia la struttura aperta degli idrogeli: nelle Fig. 4.41b e 4.42b si osserva inoltre la buona distribuzione dei biovetri sulle pareti dei fogli polimerici. Ad ingrandimenti superiori (Fig. 4.41c e 4.42c) si individuano aggregati di particelle di biovetro di dimensioni variabili. Infine, utilizzando gli strumenti forniti dal software sull'immagine ottenuta con ingrandimento 15000x (Fig. 4.41d), si è stimato il diametro di alcune particelle di biovetro S4, che è risultato essere compreso tra 450 e 510 μm (come già osservato nei sistemi GelMA/15% S4).

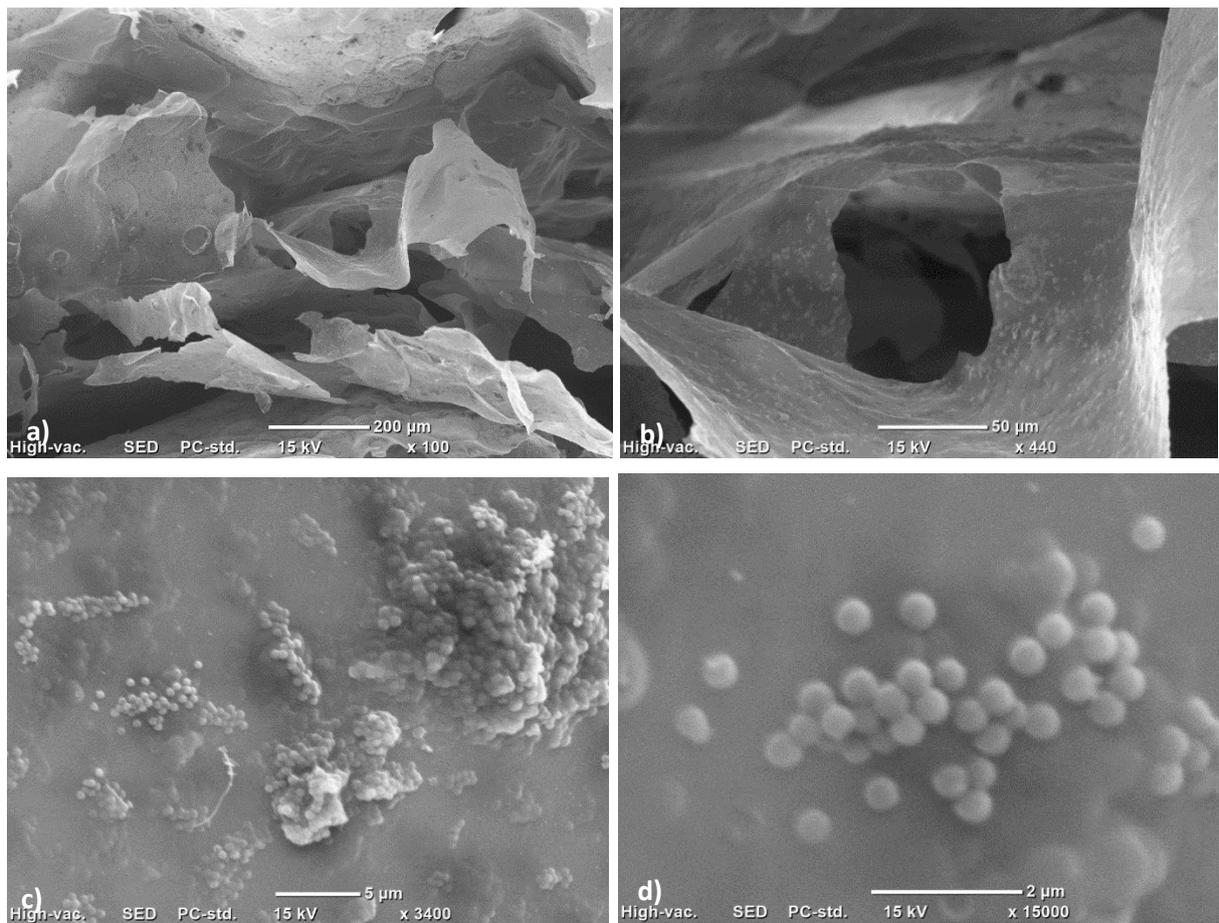
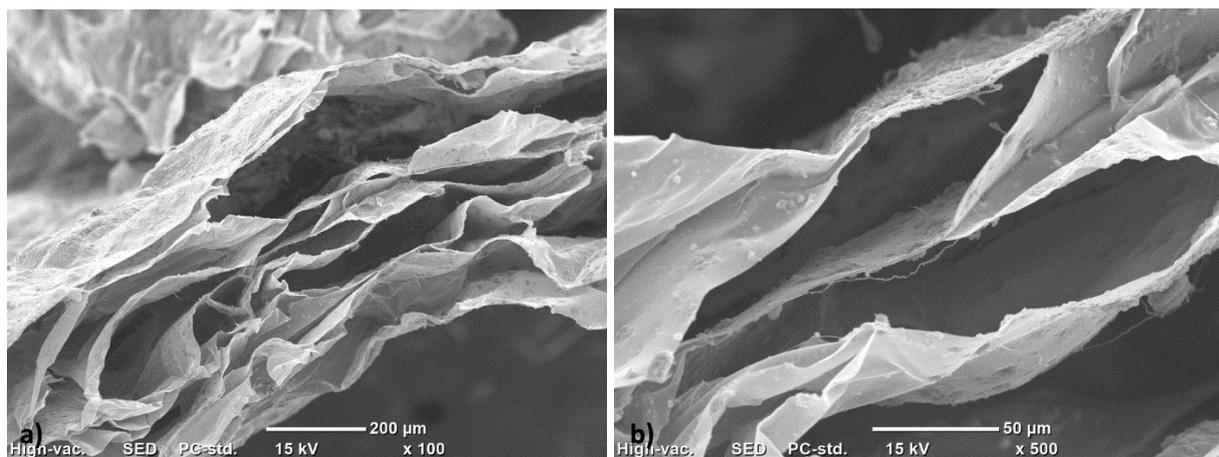


Figura 4.41 Immagini al SEM degli idrogeli M-CMC/15% S4 ad ingrandimenti:
a) 100x b) 440x c) 3400x d) 15000x



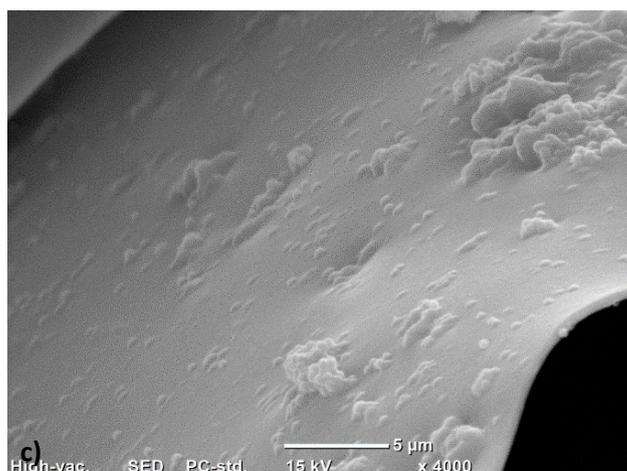


Figura 4.42 Immagini al SEM degli idrogeli M-CMC/15% S4BCu ad ingrandimenti:
a) 100x b) 500x c) 4000x

4.9. Prova di compressione

4.9.1. Idrogeli a base di GelMA

Le curve ottenute dalle prove a compressione degli idrogeli a base di GelMA contenenti vetro S4 sono riportate in Figura 4.43. Nonostante il biovetro sia molto più rigido e resistente rispetto alla matrice polimerica, si osserva che soltanto il sistema GelMA/5% S4 presenta un carico di rottura (0,14 MPa) superiore rispetto alla sola GelMA (0,12 MPa). Negli idrogeli più ricchi di S4 si riscontra invece la diminuzione del carico di rottura rispetto alla GelMA pura; lo sforzo a rottura è minimo nel caso di GelMA/15% S4.

La deformazione a rottura risulta invece minima nel caso di GelMA/10% S4 (altezza del provino ridotta del 41,1% rispetto al valore iniziale) e massima per GelMA/15% S4 (altezza ridotta del 47%).

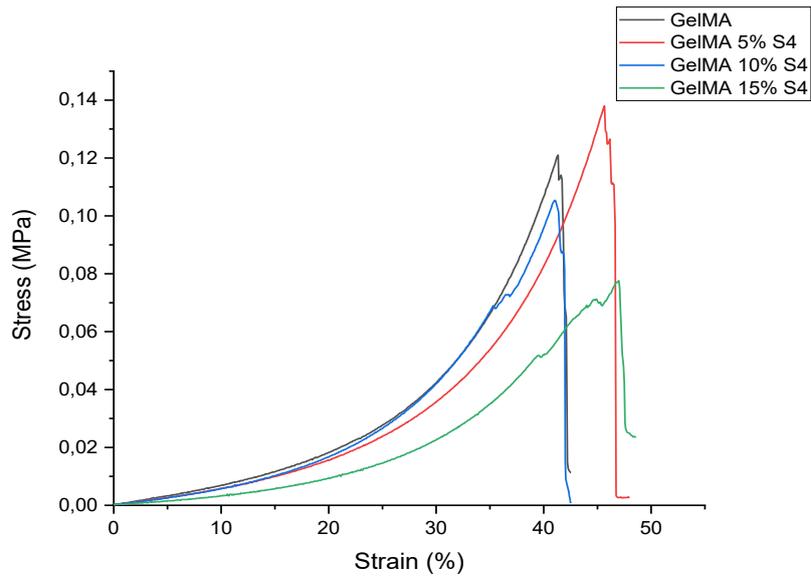


Figura 4.43 Curva sforzo vs deformazione ottenuta dalla prova a compressione sugli idrogeli GelMA/S4

In Figura 4.44 sono riportate le curve ottenute dalla compressione dei provini di GelMA/S4BCu. In questo caso tutti i sistemi contenenti biovetro presentano un carico di rottura superiore rispetto ai provini di sola GelMA. In particolare, il carico di rottura risulta massimo nell'idrogelo GelMA/10% S4BCu (pari a 0,2 MPa), per poi diminuire nel sistema più ricco di biovetro (0,18 MPa).

Osservando il grafico si evidenzia l'aumento della deformazione a rottura al crescere della concentrazione di biovetro: mentre l'idrogelo di GelMA si rompe con una deformazione del 41,3% rispetto all'altezza iniziale del provino, l'idrogelo più ricco di biovetro arriva a rottura quando l'altezza del provino è ridotta del 70,8%.

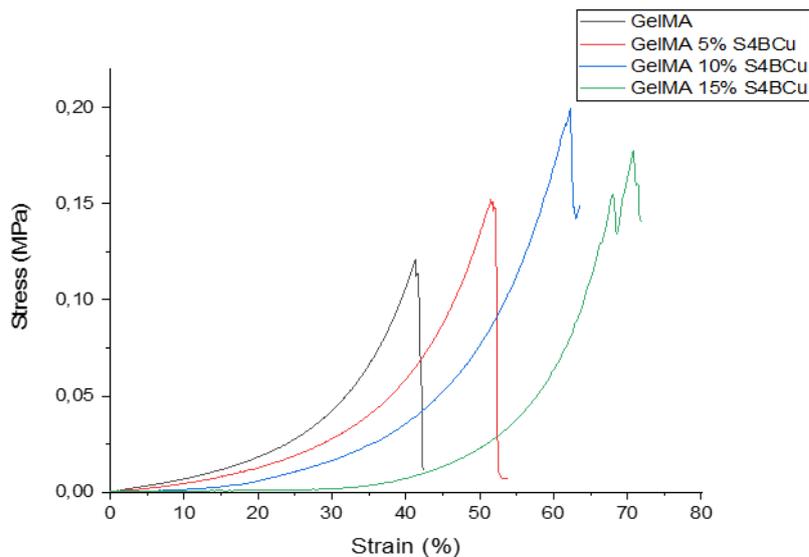


Figura 4.44 Curva sforzo vs deformazione ottenuta dalla prova a compressione sugli idrogeli GelMA/S4BCu

In Tabella 4.3 sono riportati i valori del modulo elastico secante e dello sforzo a rottura individuati per gli idrogeli a base di GelMA. Si evidenzia innanzitutto come l'aggiunta del biovetro comporti una diminuzione del valore del modulo elastico.

In particolare nei sistemi GelMA/S4, il modulo diminuisce al crescere della concentrazione del biovetro; l'idrogelo GelMA/15% S4 presenta un modulo che è inferiore alla metà del modulo dell'idrogelo privo di biovetro.

La stessa osservazione vale anche per gli idrogeli contenente vetro S4BCu, ma in questo caso la diminuzione del modulo al crescere della concentrazione di biovetro è ancora più importante: il modulo elastico del sistema più ricco di biovetro è oltre 10 volte inferiore a quello della GelMA pura.

Questi comportamenti possono essere giustificati se si considera che entrambi i biovetri contengono Ca^{2+} , in grado di interagire ionicamente con i gruppi carbossilici nelle catene di GelMA^{77,78}. Inoltre, i gruppi Si-OH⁻ presenti sulla superficie dei biovetri attraggono i gruppi amminici carichi positivamente. Di conseguenza, dal momento che alcuni dei gruppi reattivi della GelMA risultano impegnati nelle interazioni elettrostatiche, il numero di legami che si possono formare nel processo di fotoreticolazione è minore. L'idrogelo, che presenterà una minor densità di reticolazione, avrà quindi minori proprietà meccaniche. La drastica diminuzione del modulo elastico nell'idrogelo GelMA/15%S4BCu è inoltre dovuta all'effetto del biovetro dopato, che ostacola la penetrazione del fascio UV nella dispersione da reticolare comportando un'ulteriore diminuzione della densità di reticolazione del sistema.

Composizione idrogelo	Modulo elastico (kPa)	Sforzo a rottura (kPa)
GelMA	69,2	121,0
GelMA 5% S4	58,4	138,0
GelMA 10% S4	57,3	105,3
GelMA 15% S4	32,5	77,6
GelMA 5% S4BCu	44,9	150,9
GelMA 10% S4BCu	12,7	199,3
GelMA 15% S4BCu	5,6	155,2

Tabella 4.3 Valori del modulo elastico secante e dello sforzo a rottura ottenuti dalla prova a compressione sugli idrogeli a base di GelMA

4.9.2. Idrogeli a base di M-CMC

Dalla prova a compressione degli idrogeli a base di cellulosa con biovetro S4 si sono ottenute le curve in Figura 4.45. Osservando l'andamento delle curve si osserva in particolare come, per tutte le composizioni considerate, sia sufficiente uno sforzo molto basso (inferiore a 0,01 MPa) per deformare i provini fino al 40%. Il valore del carico di rottura a compressione nel caso del sistema M-CMC/5% S4 (0,17 MPa) è maggiore rispetto a quello della M-CMC pura (0,16 MPa); tuttavia, come nel caso degli idrogeli a base GelMA, l'effetto di rinforzo del vetro non si palesa nelle altre composizioni considerate. Infatti, aggiungendo il 10% di biovetro S4 alla

M-CMC, il carico a rottura diventa un quinto (0,03 MPa) del valore iniziale mentre nella composizione M-CMC/15%S4 il carico aumenta leggermente ed è poco inferiore a 0,06 MPa.

La deformazione a rottura nei sistemi M-CMC/S4 è minima nel caso di M-CMC/10% S4 (l'altezza del provino viene ridotta del 51,6% rispetto al valore iniziale) e massima nel caso di M-CMC/15% S4 (altezza ridotta del 60,5%).

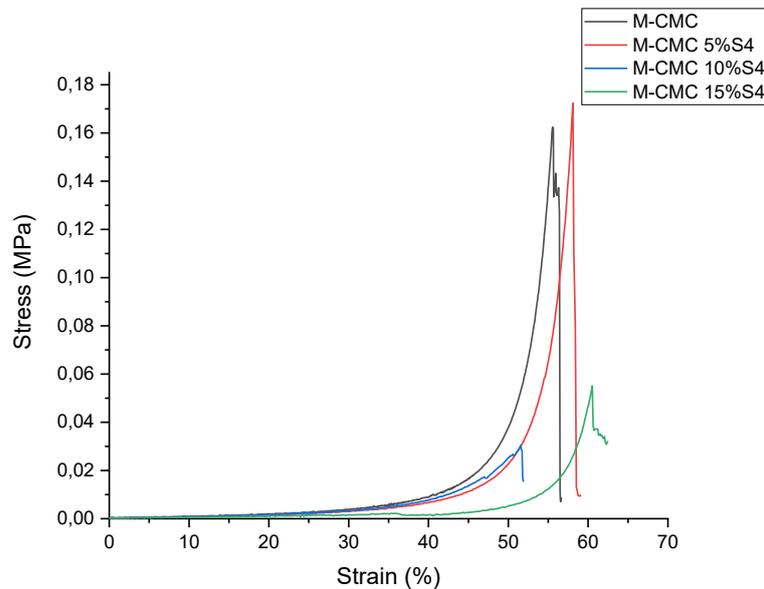


Figura 4.45 Curva sforzo vs deformazione ottenuta dalla prova a compressione sugli idrogeli M-CMC/S4

Le curve ricavate dal test di compressione sugli idrogeli a base di M-CMC contenenti vetro S4BCu, in Figura 4.46, evidenziano come siano sufficienti sforzi minimi per deformare i provini, analogamente al caso precedente. Si osserva inoltre come, tra i sistemi contenenti biovetro S4BCu, il carico di rottura diminuisca al crescere della concentrazione del biovetro, passando da 0,25 MPa nel caso di M-CMC/5% S4BCu a 0,075 MPa per M-CMC/15% S4BCu.

Per quanto riguarda la deformazione a rottura, questa risulta massima per i provini M-CMC/10% S4BCu (altezza del provino ridotta del 60,2% rispetto al valore iniziale) mentre il provino più ricco di biovetro presenta una deformazione a rottura pari al 30,9%, quasi la metà rispetto alle altre composizioni analizzate.

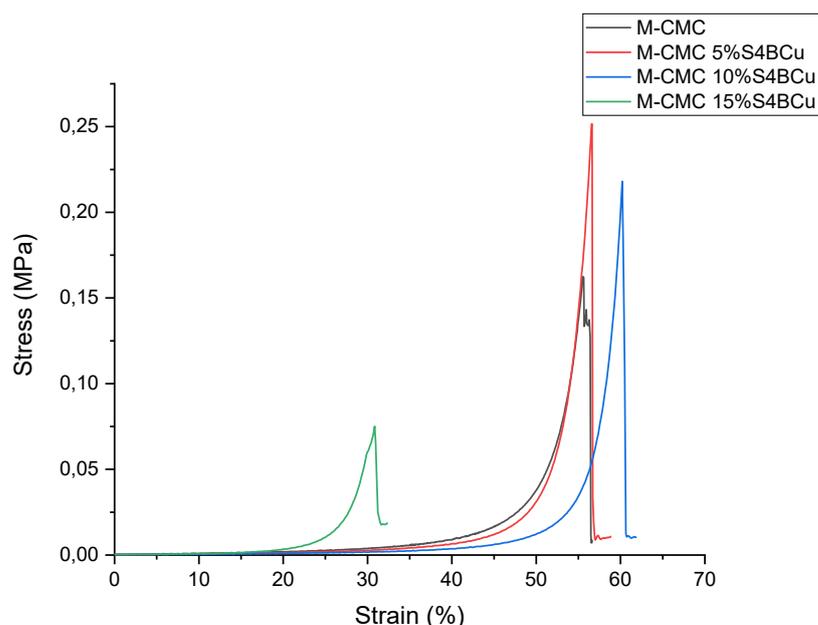


Figura 4.46 Curva sforzo vs deformazione ottenuta dalla prova a compressione sugli idrogeli M-CMC/S4BCu

In Tabella 4.4 sono riportati lo sforzo a rottura ed il valore del modulo elastico secante calcolato per le diverse composizioni degli idrogeli a base di cellulosa. In particolare, si evidenzia come l'aggiunta di biovetro comporti la diminuzione del modulo elastico rispetto al caso della sola M-CMC.

Nel caso degli idrogeli M-CMC/S4, il modulo è massimo quando la percentuale del biovetro è pari al 10%wt, per poi diminuire quando la concentrazione di S4 è maggiore. Nei sistemi M-CMC/S4BCu, al contrario, il modulo è minimo in presenza del 10%wt di biovetro mentre è massimo in M-CMC/15% S4BCu.

Si osserva inoltre che sia nei sistemi contenenti S4 che in quelli contenenti S4BCu l'andamento del modulo secante è opposto rispetto a quello della deformazione a rottura: i provini più rigidi (rispettivamente M-CMC/10% S4 e M-CMC/15% S4BCu) si deformano di meno prima di rompersi.

Composizione idrogelo	Modulo elastico (kPa)	Sforzo a rottura (kPa)
M-CMC	8,5	162,4
M-CMC 5% S4	7,0	172,3
M-CMC 10% S4	7,9	30,4
M-CMC 15% S4	5,7	55,1
M-CMC 5% S4BCu	7,1	251,5
M-CMC 10% S4BCu	5,6	218
M-CMC 15% S4BCu	8,0	75,1

Tabella 4.4 Valori del modulo elastico secante e dello sforzo a rottura ottenuti dalla prova a compressione sugli idrogeli a base di M-CMC

4.10. Effetto degli idrogeli sul pH di una soluzione buffer

In Figura 4.47 è riportato l'andamento nel tempo del pH della soluzione (a pH iniziale $4,97 \pm 0,01$) in cui sono stati immersi gli idrogeli GelMA/S4 a 37°C . Dopo tre ore dall'inizio della prova, l'idrogelo GelMA/15% S4 consente l'aumento del pH della soluzione di circa mezzo punto; negli idrogeli con concentrazione di vetro minore, la velocità di crescita del pH (data dalla pendenza del tratto iniziale delle curve) è più bassa. A 24 ore dall'immersione, il pH della soluzione risulta meno acido al crescere della concentrazione del biovetro presente nell'idrogelo: questa tendenza è confermata nelle misurazioni dopo tre giorni dall'inizio della prova. I valori medi di pH misurati in corrispondenza dell'ultimo time step risultano infatti pari a 5,53 per GelMA/5% S4, 5,59 (GelMA/10% S4) e 5,61 per l'idrogelo più ricco di biovetro.

Oltre al biovetro, anche la matrice di GelMA pura contribuisce, seppur in minima parte, all'aumento del pH della soluzione. Analizzando il comportamento dell'idrogelo privo di biovetro, si riscontra infatti anche in questo caso un aumento del pH dopo tre ore (da 4,97 a 5,15); nei time step successivi non si rileva un'ulteriore crescita significativa.

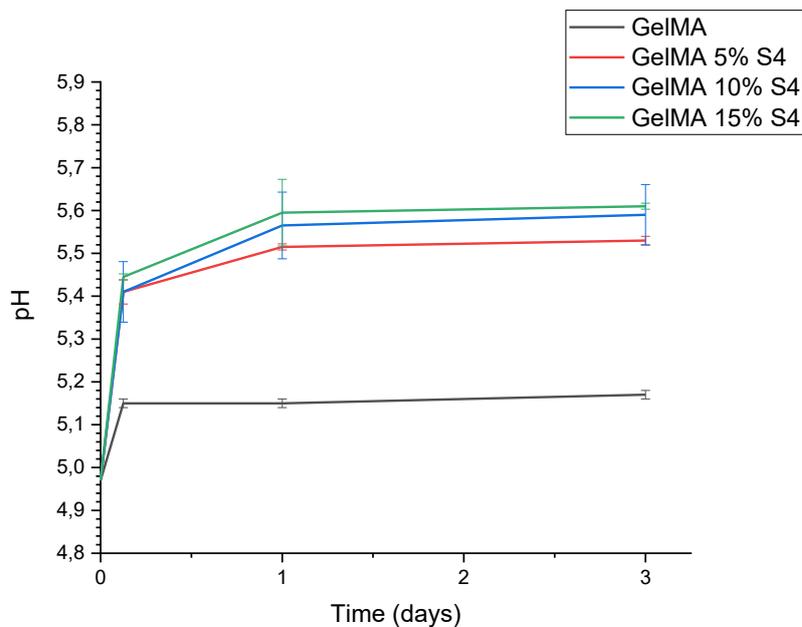


Figura 4.47 Andamento del pH della soluzione (a pH iniziale $4,97 \pm 0,01$) in cui sono stati immersi gli idrogeli GelMA/S4BCu

L'andamento del pH della soluzione acida in cui sono stati immersi gli idrogeli GelMA/S4BCu è riportato in Figura 4.48. Dopo solo tre ore di immersione, tutti gli idrogeli esaminati provocano un importante aumento del pH della soluzione rispetto ai sistemi di GelMA pura. La velocità di crescita del pH è minima nel caso dell'idrogelo con il 5%wt di biovetro, mentre quelli con il 10%wt ed il 15%wt di S4BCu hanno comportamento identico nel tratto iniziale e consentono l'aumento del pH di oltre 0,6 unità (il valore medio del pH passa da 4,97 della soluzione iniziale a 5,64).

Dopo un giorno, la velocità di crescita del pH diminuisce notevolmente e si osserva come il pH

della soluzione risulti più elevato al crescere della concentrazione di biovetro disperso nell'idrogelo.

Questa tendenza è confermata dalla misurazione dopo 3 giorni, quando i valori medi dei pH delle soluzioni risultano rispettivamente pari a 5,54 (per GelMA/5% S4BCu), 5,73 (GelMA/10% S4BCu) e 5,77 (per il sistema più ricco di biovetro).

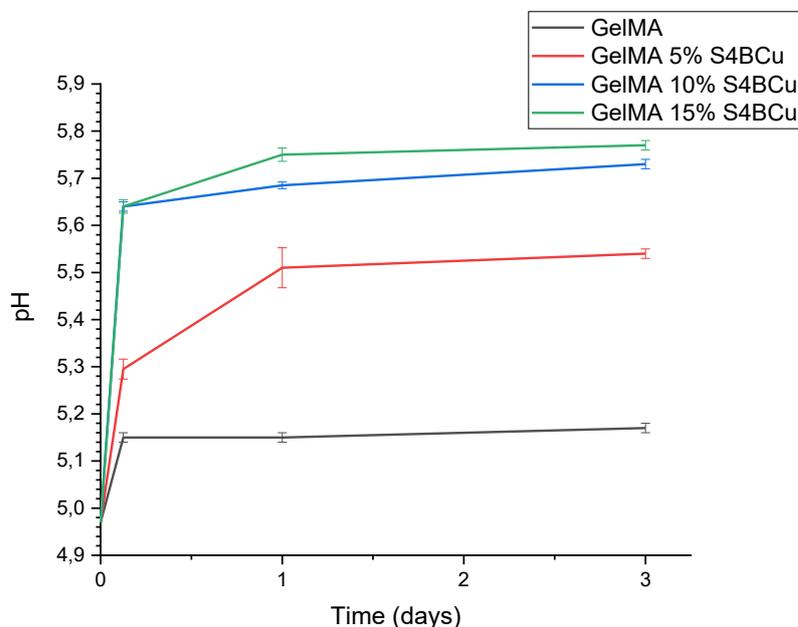


Figura 4.48 Andamento del pH della soluzione (a pH iniziale $4,97 \pm 0,01$) in cui sono stati immersi gli idrogeli GelMA/S4BCu

Il meccanismo alla base dell'aumento del pH di una soluzione a contatto con i biovetri è lo scambio degli ioni modificatori del vetro con gli idrogenioni (H^+/H_3O^+) presenti in soluzione: questo comporta la diminuzione della concentrazione di H^+ nel liquido e quindi l'aumento del pH⁷⁹. Tra i due tipi di biovetri, S4BCu si è rivelato più efficace nell'aumentare il pH della soluzione buffer. Dal momento che la concentrazione degli ioni modificatori ($[Ca^{2+}]$ per S4, $[Ca^{2+}] + [Cu^{2+}]$ per S4BCu) nei due biovetri è la stessa, si può ipotizzare che la maggiore reattività di S4BCu sia dovuta alla elevata mobilità di Cu^{2+} , che presenta infatti un raggio ionico inferiore rispetto a Ca^{2+} .

4.11. Rilascio degli ioni Cu^{2+} e B^{3+}

L'analisi ICP-MS ha consentito di analizzare la concentrazione degli ioni Cu^{2+} e B^{3+} nella soluzione in cui si sono immersi gli idrogeli GelMA/S4BCu per 7 giorni.

Le curve di tendenza relative alla concentrazione dello ione rame sono riportate in Figura 4.49. Per tutti gli idrogeli esaminati, si riscontra che la velocità di rilascio ionico (dato dalla pendenza della linea di tendenza) è massima nelle prime 24 ore dall'inizio della prova; questo dato è coerente con i dati ottenuti dalla misurazione del pH della soluzione. Si evidenzia che soltanto

la curva relativa a GelMA/5% S4BCu presenta un andamento crescente nel tempo: in accordo con le aspettative teoriche, il biovetro presente negli idrogeli rilascia progressivamente gli ioni introdotti nel network vetroso. Nei sistemi più ricchi di S4BCu si riscontra invece la diminuzione della concentrazione di Cu^{2+} una volta superate le 24 ore dall'immersione degli idrogeli. Mentre nel caso di GelMA/15% S4BCu la concentrazione del rame in soluzione riprende a crescere nel tratto finale della curva, il rilascio ionico di GelMA/10% S4BCu è massimo dopo un giorno dall'immersione e diminuisce progressivamente nei time step successivi. Andamenti di questo tipo possono essere dovuti a fenomeni di precipitazione dello ione Cu^{2+} (si consideri che la prova è stata condotta in condizione statiche, quindi è possibile che si siano originate zone stagnanti ad alta concentrazione di ioni).

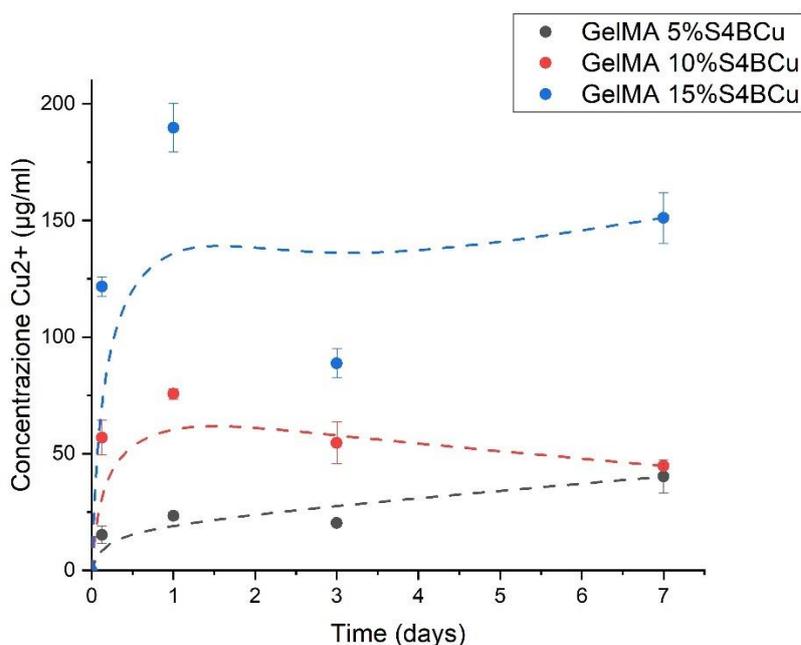


Figura 4.49 Concentrazione dello ione Cu^{2+} nella soluzione buffer in cui sono stati immersi gli idrogeli GelMA/S4BCu

L'andamento della concentrazione degli ioni B^{3+} in soluzione è riportato in Figura 4.50. Anche in questo caso la velocità di rilascio ionico è massima nelle ore che seguono l'immersione degli idrogeli nella soluzione. In accordo con le aspettative, la concentrazione di B^{3+} in soluzione aumenta al crescere della percentuale di S4BCu disperso nella GelMA. Anche in questo caso, le curve relative agli idrogeli contenenti il 10%wt ed il 15%wt di biovetro non presentano un andamento crescente nel tratto finale (tra i 3 e 7 giorni dall'inizio della prova). È ragionevole ipotizzare che gli ioni in soluzione siano stati interessati da fenomeni di precipitazione. Si consideri inoltre che, considerando il metodo utilizzato, eventuali errori accidentali dell'utente (soprattutto in fase di diluizione) possono aver inciso sui risultati ottenuti. Si osserva infine che la concentrazione degli ioni B^{3+} in soluzione è un ordine di grandezza superiore rispetto a quella di Cu^{2+} : nella composizione di S4BCu, la frazione in massa del boro (15%wt) è infatti tripla rispetto a quella del rame (5%wt).

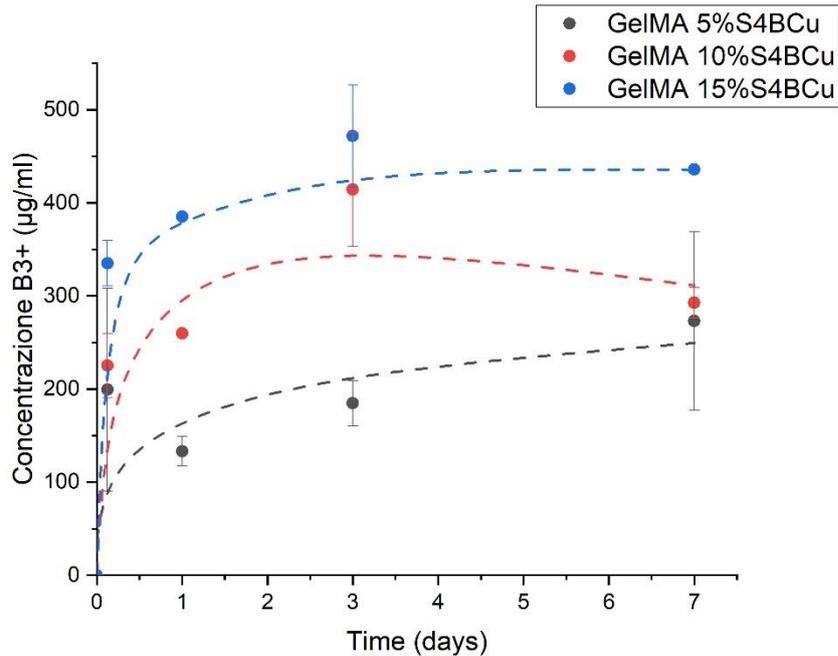


Figura 4.50 Concentrazione dello ione B^{3+} nella soluzione buffer in cui sono stati immersi gli idrogeli GelMA/S4BCu

In letteratura, analisi sul rilascio ionico di sistemi vetrosi contenenti rame hanno fornito concentrazioni di Cu^{2+} in soluzione simili a quelle ottenute dall'immersione degli idrogeli arricchiti con il 5%wt ed il 10%wt di S4BCu. In queste concentrazioni, non è stato riscontrato alcun effetto citotossico dello ione sulla vitalità cellulare⁸⁰. È stato inoltre provato che soluzioni con concentrazione di Cu^{2+} simile a quella ottenuta per gli idrogeli contenenti fino al 10%wt di biovetro presentano proprietà antibatteriche ed angiogeniche, oltre alla capacità di stimolare la crescita ossea. Nel caso di GelMA/15% S4BCu, la concentrazione di Cu^{2+} in soluzione supera i 100 µg/ml già nelle ore successive all'immersione. Secondo la letteratura, a queste concentrazioni lo ione rame forma specie ossigenate reattive in grado di agire come molecole segnale che provocano l'apoptosi cellulare, l'inattivazione di enzimi e la distruzione delle membrane^{66,81}.

Studi *in vitro* sul rilascio ionico di vetri contenenti boro hanno invece dimostrato che una concentrazione di ioni borati superiore a 0,65 mM provoca l'inibizione della proliferazione cellulare⁸². Inoltre, concentrazioni di BO_3^{3-} superiori a 2.5 mM comportano la diminuzione della densità cellulare di più del 50%^{57,83}. Per confronto con la letteratura, la quantità di ioni borati rilasciata dagli idrogeli GelMA/S4BCu risulta quindi eccessiva e presenta un effetto citotossico sull'organismo. Nelle condizioni di prova, per tutti gli idrogeli esaminati la concentrazione degli ioni borati in soluzione è superiore a 3 mM dopo solo tre ore dall'immersione dei sistemi in soluzione; sarebbe però opportuno effettuare delle prove *in vitro* per valutare l'effettivo comportamento degli idrogeli.

5. Conclusioni e prospettive future

In questo lavoro di Tesi sono stati funzionalizzati con successo due tipologie di polimeri naturali: gelatina e cellulosa per renderli fotoreticolabili. Successivamente, alle soluzioni acquose dei due polimeri sono state aggiunte diverse concentrazioni di biovetro. Una volta aggiunto il fotoiniziatore idrosolubile alle formulazioni, si è proceduto alla fotoreticolazione delle soluzioni. Si sono poi studiati il grado di rigonfiamento, la cinetica di fotoreticolazione e le proprietà termiche, morfologiche e meccaniche dei diversi idrogeli così ottenuti. Si sono infine valutati la capacità di aumentare il pH di una soluzione acida (che simula l'infiammazione) ed il rilascio ionico degli idrogeli.

Le analisi DSC e TGA hanno evidenziato che l'aggiunta del vetro è in grado di modificare le proprietà termiche degli idrogeli, ma le temperature caratteristiche (T_g , temperatura di onset e di degradazione) dei sistemi contenenti la fase termicamente stabile non sempre risultano più elevate rispetto a quelle degli idrogeli privi di vetro. È inoltre interessante osservare come, contrariamente alle aspettative, il modulo elastico a compressione degli idrogeli diminuisce quando la percentuale di biovetro aumenta. Pur avendo ottime proprietà termiche e meccaniche, le particelle vetrose disperse nel polimero possono ostacolare il processo di fotoreticolazione, allontanando fisicamente i gruppi reattivi delle catene polimeriche e creando piccole zone d'ombra rispetto al fascio UV, che viene in parte assorbito. Gli ioni presenti nei biovetri (Ca^{2+} in particolare) possono inoltre interagire con gli anioni carbossilati della GelMA e della M-CMC, abbassandone il grado di reticolazione.

L'aggiunta dei biovetri provoca inoltre la diminuzione del grado di rigonfiamento sia degli idrogeli di GelMA sia di quelli di M-CMC. L'analisi al SEM delle strutture rigonfiate ha mostrato la presenza di elevate aree superficiali su cui i biovetri risultano ben distribuiti. Questa condizione è ottimale per l'applicazione di interesse, dal momento che consente il contatto intimo tra il liquido da trattare (che entra nei pori e nei vuoti dell'idrogelo durante il rigonfiamento) ed i biovetri. Gli scambi ionici che si verificano all'interfaccia tra la soluzione ed il biovetro presente sulla superficie della matrice polimerica permettono quindi il passaggio degli ioni terapeutici in soluzione e l'ingresso degli idrogenioni nel network vetroso (con conseguente aumento del pH del liquido).

L'aumento del pH della soluzione è rapido, pur non raggiungendo i valori necessari per favorire la vitalità e la proliferazione cellulare riportati in letteratura. Studi *in vivo* hanno infatti dimostrato come il pH ottimale per favorire la chiusura delle ferite sia pari a 7,5, mentre pH acidi rallentano il processo di chiusura e la riepitelizzazione delle stesse⁸⁴.

Per analogia con precedenti studi *in vitro* realizzati su biovetri contenenti rame, considerando il rilascio ionico degli idrogeli GelMA/5% S4BCu e GelMA/10% S4BCu è ragionevole supporre che questi presentino proprietà antibatteriche ed angiogeniche. Alla concentrazione di Cu^{2+} nella soluzione in cui è stato immerso l'idrogelo più ricco di biovetro non è invece correlato alcun effetto terapeutico.

Per quanto riguarda il rilascio di ioni borati, il confronto con la letteratura porta ad affermare che, per tutte le percentuali di S4BCu disperse nella GelMA, la concentrazione di boro rilasciata in soluzione è troppo elevata e potrebbe presentare un effetto citotossico sull'organismo.

Ulteriori studi sugli idrogeli preparati in questo lavoro di Tesi potrebbero prevedere l'analisi dell'effetto dei sistemi a base di M-CMC sul pH della soluzione acida e del loro rilascio ionico. Dal momento che questi idrogeli presentano grado di rigonfiamento oltre un ordine di

grandezza superiore rispetto ai sistemi a base di GelMA, il volume di soluzione incorporato nel gel (e quindi a stretto contatto con i biovetri) è maggiore: è quindi lecito aspettarsi che gli scambi di ioni tra il vetro e la soluzione siano più efficaci. Inoltre, per ottimizzarne ulteriormente le prestazioni, gli idrogeli a base di M-CMC possono essere realizzati con concentrazioni di biovetro dopato superiori al 15%wt (a differenza dei campioni di GelMA/S4BCu, in cui il problema del *depth curing* ostacola la fotoreticolazione di dispersioni contenenti più del 15%wt di S4BCu).

Per migliorare le proprietà meccaniche degli idrogeli senza comprometterne il grado di rigonfiamento, si potrebbe ricorrere al raffreddamento della dispersione prima di procedere alla fotoreticolazione. Secondo lo studio di Zheng, questa procedura consentirebbe l'avvicinamento delle catene di GelMA e dei loro gruppi funzionali, aumentandone la disponibilità nella formazione dei legami chimici costituenti il network polimerico⁷⁷.

Il meccanismo alla base dell'aumento del pH della soluzione a contatto con i biovetri è lo scambio degli ioni modificatori del vetro con gli idrogenioni presenti in soluzione. Per favorire gli scambi ionici è quindi necessario massimizzare la mobilità dei cationi (tipicamente di metalli alcalini e alcalino-terrosi) presenti nel network vetroso; inoltre, maggiore è la concentrazione di ioni disponibili per lo scambio, maggiore risulterà l'aumento del pH della soluzione. I cationi monovalenti presentano mobilità superiore rispetto a quelli divalenti: sostituendo (almeno parzialmente) il Ca^{2+} presente nei biovetri con un modificatore monovalente come Na^+ sarebbe quindi possibile incrementare la reattività del vetro⁸⁵. Dal momento che alcuni studi relativi al trattamento della psoriasi hanno dimostrato come Rb^+ sia in grado di inibire la risposta infiammatoria, l'introduzione di questo ione in qualità di dopante nel biovetro (in aggiunta a B^{3+} e Cu^{2+}) potrebbe aumentare l'efficacia terapeutica del sistema⁸⁶.

6. Bibliografia

1. Ciolacu, D. E. & Suflet, D. M. *Cellulose-Based Hydrogels for Medical/Pharmaceutical Applications. Biomass as Renewable Raw Material to Obtain Bioproducts of High-Tech Value* (Elsevier B.V., 2018). doi:10.1016/B978-0-444-63774-1.00011-9.
2. Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W. & Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 27–46 (2000).
3. Buwalda, S. J. *et al.* Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *J. Control. Release* **190**, 254–273 (2014).
4. Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 18–23 (2012).
5. Laftah, W. A., Hashim, S. & Ibrahim, A. N. Polymer hydrogels: A review. *Polym. - Plast. Technol. Eng.* **50**, 1475–1486 (2011).
6. Oyen, M. L. Mechanical characterisation of hydrogel materials. *Int. Mater. Rev.* **59**, 44–59 (2014).
7. Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z. & Akil, H. M. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Mater. Sci. Eng. C* **57**, 414–433 (2015).
8. Stolarzewicz, I., Białecka-Florjańczyk, E., Majewska, E. & Krzyczkowska, J. Immobilization of yeast on polymeric supports. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **25**, 135–144 (2011).
9. Karoyo, A. H. & Wilson, L. D. A review on the design and hydration properties of natural polymer-based hydrogels. *Materials (Basel)*. **14**, 1–36 (2021).
10. Djagny, K. B., Wang, Z. & Xu, S. Gelatin: A valuable protein for food and pharmaceutical industries: Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **41**, 481–492 (2001).
11. Sultana, S., Ali, M. E. & Ahamad, M. N. U. *Gelatine, collagen, and single cell proteins as a natural and newly emerging food ingredients. Preparation and Processing of Religious and Cultural Foods* (Elsevier Ltd., 2018). doi:10.1016/B978-0-08-101892-7.00011-0.
12. Kommareddy, S., Shenoy, D. & Amiji, M. Gelatin Nanoparticles and Their Biofunctionalization. in *Nanotechnologies for the Life Sciences, Vol. 1 Biofunctionalization of Nanomaterials* (2007). doi:10.1002/9783527610419.ntls0011.
13. Xiao, S. *et al.* Gelatin Methacrylate (GelMA)-Based Hydrogels for Cell Transplantation: an Effective Strategy for Tissue Engineering. *Stem Cell Rev. Reports* **15**, 664–679 (2019).
14. Abdul Khalil, H. P. S. *et al.* Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. *Carbohydr. Polym.* **99**, 649–665 (2014).
15. Navarra, M. A. *et al.* Synthesis and characterization of cellulose-based hydrogels to be used as gel electrolytes. *Membranes (Basel)*. **5**, 810–823 (2015).
16. Klemm, D., Philipp, B. & Mischnick, P. *Comprehensive Cellulose Chemistry. Vols 1 & 2. Angew. Chemie-International Ed.* **38**, 1824 (1999).
17. Kamel, S., Ali, N., Jahangir, K., Shah, S. M. & El-Gendy, A. A. Pharmaceutical significance of cellulose: A review. *Express Polym. Lett.* **2**, 758–778 (2008).

18. Sharma, A., Thakur, M., Bhattacharya, M., Mandal, T. & Goswami, S. Commercial application of cellulose nano-composites – A review. *Biotechnol. Reports* **21**, e00316 (2019).
19. Maitra, J. & Shukla, V. K. Cross-linking in Hydrogels - A Review. *Am. J. Polym. Sci.* **4**, 25–31 (2014).
20. Bruchet, M. & Melman, A. Fabrication of patterned calcium cross-linked alginate hydrogel films and coatings through reductive cation exchange. *Carbohydr. Polym.* **131**, 57–64 (2015).
21. Yokoyama, F., Masada, I., Shimamura, K., Ikawa, T. & Monobe, K. Morphology and structure of highly elastic poly(vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting. *Colloid Polym. Sci.* **264**, 595–601 (1986).
22. Hennink, W. E. & van Nostrum, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 13–36 (2002).
23. Akhtar, M. F., Hanif, M. & Ranjha, N. M. Methods of synthesis of hydrogels ... A review. *Saudi Pharm. J.* **24**, 554–559 (2016).
24. Zu, Y. *et al.* Preparation and characterization of chitosan-polyvinyl alcohol blend hydrogels for the controlled release of nano-insulin. *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 82–87 (2012).
25. Lee, F., Bae, K. H. & Kurisawa, M. Injectable hydrogel systems crosslinked by horseradish peroxidase. *Biomed. Mater.* **11**, 14101 (2015).
26. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**, 2004–2021 (2001).
27. Noè, C., Tonda-Turo, C., Chiappone, A., Sangermano, M. & Hakkarainen, M. Light processable starch hydrogels. *Polymers (Basel)*. **12**, 1359 (2020).
28. Person, M. D., Kash, P. W. & Butler, L. J. A new class of Norrish type I processes: .alpha.-bond cleavage upon $1(n,\pi^*(C=O))$ excitation in the acid halides. *J. Phys. Chem.* **96**, 2021–2023 (1992).
29. Heydarnezhad, H., Pourabbas, B. & Tayefi, M. Conducting Electroactive Polymers via Photopolymerization: A Review on Synthesis and Applications. *Polym. Plast. Technol. Eng.* **57**, (2017).
30. Fouassier, J.P.; Rabek, J. F. *Radiation curing in polymer science and technology*. (Elsevier Applied Science, 1993).
31. Heydarnezhad, H. R., Pourabbas, B. & Tayefi, M. Conducting Electroactive Polymers via Photopolymerization: A Review on Synthesis and Applications. *Polym. Plast. Technol. Eng.* **57**, 1093–1109 (2018).
32. Bryant, S. J., Nuttelman, C. R. & Anseth, K. S. Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **11**, 439–457 (2000).
33. Zapka, W. *Handbook of Industrial Inkjet Printing: A Full System Approach. Handbook of Industrial Inkjet Printing: A Full System Approach* (2017). doi:10.1002/9783527687169.
34. Fouassier, J. P., Allonas, X., Lalevée, J. & Dietlin, C. Photoinitiators for Free Radical

- Polymerization Reactions. in *Photochemistry and Photophysics of Polymer Materials* 351–419 (John Wiley & Sons, Ltd, 2010).
doi:<https://doi.org/10.1002/9780470594179.ch10>.
35. Müller, G. *et al.* Simple One-Pot Syntheses of Water-Soluble Bis(acyl)phosphane Oxide Photoinitiators and Their Application in Surfactant-Free Emulsion Polymerization. *Macromol. rapid Commun.* **36**, 553–557 (2015).
 36. Falamarzian, M. & Varshosaz, J. The effect of structural changes on swelling kinetics of polybasic/hydrophobic pH-sensitive hydrogels. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **24**, 667–669 (1998).
 37. Ron, E. S. & Bromberg, L. E. Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **31**, 197–221 (1998).
 38. Casolaro, M. & Barbucci, R. An insulin-releasing system responsive to glucose: thermodynamic evaluation of permeability properties. *Int. J. Artif. Organs* **14**, 732–738 (1991).
 39. Mamada, A., Tanaka, T., Kungwachakun, D. & Irie, M. Photoinduced phase transition of gels. *Macromolecules* **23**, 1517–1519 (1990).
 40. Zhong, X., Wang, Y.-X. & Wang, S.-C. Pressure dependence of the volume phase-transition of temperature-sensitive gels. *Chem. Eng. Sci.* **51**, 3235–3239 (1996).
 41. Pajares-Chamorro, N. & Chatzistavrou, X. Bioactive Glass Nanoparticles for Tissue Regeneration. *ACS Omega* **5**, 12716–12726 (2020).
 42. Baino, F., Hamzehlou, S. & Kargozar, S. Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going? *J. Funct. Biomater.* **9**, (2018).
 43. Kaur, G. *et al.* A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **102**, 254–274 (2014).
 44. El-Meliegy, E. & van Noort, R. Glasses and Glass Ceramics for Medical Applications, Springer New York Dordrecht Heidelberg London, (2012).
 45. Vichery, C. & Nedelec, J. M. Bioactive glass nanoparticles: From synthesis to materials design for biomedical applications. *Materials (Basel)*. **9**, (2016).
 46. Kaur, G., Pickrell, G., Sriranganathan, N., Kumar, V. & Homa, D. Review and the state of the art: Sol–gel and melt quenched bioactive glasses for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **104**, 1248–1275 (2016).
 47. Zheng, K. & Boccaccini, A. R. Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **249**, 363–373 (2017).
 48. El-Rashidy, A. A. *et al.* Preparation and in vitro characterization of silver-doped bioactive glass nanoparticles fabricated using a sol-gel process and modified Stöber method. *J. Non. Cryst. Solids* **483**, 26–36 (2018).
 49. Kozon, D. *et al.* Synthesis of Monodispersed Ag-Doped Bioactive Glass Nanoparticles via Surface Modification. *Mater. (Basel, Switzerland)* **9**, (2016).
 50. Lukowiak, A., Lao, J., Lacroix, J. & Marie Nedelec, J. Bioactive glass nanoparticles obtained through sol–gel chemistry. *Chem. Commun.* **49**, 6620–6622 (2013).
 51. Uribe, P. *et al.* Soluble silica stimulates osteogenic differentiation and gap junction communication in human dental follicle cells. *Sci. Rep.* **10**, 9923 (2020).

52. Mladenović, Ž. *et al.* Soluble silica inhibits osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Acta Biomater.* **10**, 406–418 (2014).
53. Bonazza, V. *et al.* In vitro treatment with concentrated growth factors (CGF) and sodium orthosilicate positively affects cell renewal in three different human cell lines. *Cell Biol. Int.* **42**, 353–364 (2018).
54. Maeno, S. *et al.* The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials* **26**, 4847–4855 (2005).
55. Muñoz, F., Rocherullé, J., Ahmed, I. & Hu, L. Phosphate Glasses. in *Springer Handbook of Glass* (eds. Musgraves, J. D., Hu, J. & Calvez, L.) 553–594 (Springer International Publishing, 2019). doi:10.1007/978-3-319-93728-1_16.
56. Fernandez, C., Verné, E., Vogel, J. & Carl, G. Optimisation of the synthesis of glass-ceramic matrix biocomposites by the ‘response surface methodology’. *J. Eur. Ceram. Soc.* **23**, 1031–1038 (2003).
57. Brown, R. F. *et al.* Effect of borate glass composition on its conversion to hydroxyapatite and on the proliferation of MC3T3-E1 cells. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **88A**, 392–400 (2009).
58. Wu, C. *et al.* Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds. *Biomaterials* **32**, 7068–7078 (2011).
59. Prasad, S. *et al.* Effect of boron oxide addition on structural, thermal, in vitro bioactivity and antibacterial properties of bioactive glasses in the base S53P4 composition. *J. Non. Cryst. Solids* **498**, 204–215 (2018).
60. Wray, P. Cotton Candy that Heals? Borate Glass Nanofibers Look Promising. *Am. Ceram. Soc. Bull.* **90**, 25–29 (2011).
61. Furlan, R. G. *et al.* Preparation and characterization of boron-based bioglass by sol–gel process. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **88**, 181–191 (2018).
62. Arredondo, M. & Núñez, M. T. Iron and copper metabolism. *Mol. Aspects Med.* **26**, 313–327 (2005).
63. Finney, L., Vogt, S., Fukai, T. & Glesne, D. Copper and angiogenesis: unravelling a relationship key to cancer progression. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **36**, 88–94 (2009).
64. Gérard, C., Bordeleau, L.-J., Barralet, J. & Doillon, C. J. The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper. *Biomaterials* **31**, 824–831 (2009).
65. Hu, G. Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. *J. Cell. Biochem.* **69**, 326–335 (1998).
66. Varmette, E. A., Nowalk, J. R., Flick, L. M. & Hall, M. M. Abrogation of the inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophages by Zn- and Cu-doped bioactive sol-gel glasses. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **90A**, 317–325 (2009).
67. Erol, M., Özyv uran, A., Marasi, M. & Kügükbayrak, S. In Vitro Evaluation of Sr and Cu Doped Bioactive Glasses. *Adv. Sci. Lett.* **19**, 3333–3337 (2013).
68. Palza, H. *et al.* Designing antimicrobial bioactive glass materials with embedded metal

- ions synthesized by the sol-gel method. *Mater. Sci. Eng. C* **33**, 3795–3801 (2013).
69. Srivastava, A. & Pyare, R. Characterization of CuO substituted 45S5 Bioactive Glasses and Glass - ceramics. *Int. J. Sci. & Technol. Res.* **1**, 28–41 (2012).
 70. Klotz, B. J., Gawlitta, D., Rosenberg, A. J. W. P., Malda, J. & Melchels, F. P. W. Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. *Trends Biotechnol.* **34**, 394–407 (2016).
 71. Melilli, G. *et al.* DLP 3D printing meets lignocellulosic biopolymers: Carboxymethyl cellulose inks for 3D biocompatible hydrogels. *Polymers (Basel)*. **12**, 1–11 (2020).
 72. Cebi, N., Durak, M. Z., Toker, O. S., Sagdic, O. & Arici, M. An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins. *Food Chem.* **190**, 1109–1115 (2016).
 73. Arabi, N., Zamanian, A., Rashvand, S. N. & Ghorbani, F. The Tunable Porous Structure of Gelatin–Bioglass Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications: Physicochemical, Mechanical, and In Vitro Properties. *Macromol. Mater. Eng.* **303**, 1–12 (2018).
 74. Mozafari, M., Moztarzadeh, F. & Tahriri, M. Investigation of the physico-chemical reactivity of a mesoporous bioactive SiO₂-CaO-P₂O₅ glass in simulated body fluid. *J. Non. Cryst. Solids* **356**, 1470–1478 (2010).
 75. Xia, W. & Chang, J. Preparation and characterization of nano-bioactive-glasses (NBG) by a quick alkali-mediated sol-gel method. *Mater. Lett.* **61**, 3251–3253 (2007).
 76. Ouis, M., Abdelghany, A. & Elbatal, H. Corrosion mechanism and bioactivity of borate glasses analogue to Hench's bioglass. *Process. Appl. Ceram.* **6**, 141–149 (2012).
 77. Zheng, J. *et al.* Sequentially-crosslinked biomimetic bioactive glass/gelatin methacryloyl composites hydrogels for bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **89**, 119–127 (2018).
 78. Xing, Q. *et al.* Increasing mechanical strength of gelatin hydrogels by divalent metal ion removal. *Sci. Rep.* **4**, 1–10 (2014).
 79. Jones, J. R., Sepulveda, P. & Hench, L. L. Dose-dependent behavior of bioactive glass dissolution. *J. Biomed. Mater. Res.* **58**, 720–726 (2001).
 80. Wu, C. *et al.* Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity. *Biomaterials* **34**, 422–433 (2013).
 81. Erol, M. M. *et al.* Copper-releasing, boron-containing bioactive glass-based scaffolds coated with alginate for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* **8**, 792–801 (2012).
 82. Fu, H. *et al.* In vitro evaluation of borate-based bioactive glass scaffolds prepared by a polymer foam replication method. *Mater. Sci. Eng. C* **29**, 2275–2281 (2009).
 83. Fu, Q. *et al.* Silicate, borosilicate, and borate bioactive glass scaffolds with controllable degradation rate for bone tissue engineering applications. II. In vitro and in vivo biological evaluation. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **95**, 172–179 (2010).
 84. Kruse, C. R. *et al.* The effect of pH on cell viability, cell migration, cell proliferation, wound closure, and wound reepithelialization: In vitro and in vivo study. *Wound Repair Regen.* **25**, 260–269 (2017).
 85. Shelby, J. E. *Introduction to Glass Science and Technology*. (The Royal Society of

Chemistry, 2005). doi:10.1039/9781847551160.

86. He, X. *et al.* Amelioration of imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in mice by DSW therapy inspired hydrogel. *Bioact. Mater.* **6**, 299–311 (2021).