



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**HYDROGEL A BASE DI ALCOOL POLIVINILICO PER
APPLICAZIONI BIOMEDICHE**

Relatrice: Prof.ssa Silvia Todros

Laureanda: Sofia Garutti

ANNO ACCADEMICO 2023 – 2024

Data di laurea 12 marzo 2024

INDICE

Introduzione.....	3
1. Hydrogel.....	5
1.1 Proprietà e comportamento.....	5
1.2 Classificazione.....	6
2. Alcool polivinilico, composizione chimica e caratteristiche chimico-fisiche.....	8
2.1 Parametri fondamentali nei processi di fabbricazione del PVA.....	9
2.2 Proprietà fisiche e meccaniche del PVA.....	10
2.3 Applicazioni e principali utilizzi.....	11
3. Hydrogel a base di PVA.....	14
3.1 Caratteristiche chimico-fisiche.....	14
3.2 Processo di preparazione degli hydrogel a base di PVA.....	17
3.3 Caratteristiche meccaniche.....	19
3.4 Applicazioni biomediche.....	33
3.4.1 Hydrogel a base di PVA utilizzati nella cura di ferite cutanee.....	34
3.4.2 Hydrogel a base di PVA come cartilagine artificiale.....	37
3.4.3 Hydrogel a base di PVA nella produzione di stent.....	39
3.4.4 Hydrogel a base di PVA nella produzione di lenti a contatto morbide.....	41
3.4.5 Hydrogel a base di PVA come vettore nel rilascio controllato di farmaci.....	42
4. Conclusioni.....	46
Bibliografia.....	48

INTRODUZIONE

Il presente studio ha lo scopo di esaminare il comportamento meccanico degli hydrogel a base di alcool polivinilico (PVA).

Un hydrogel è un gel la cui fase liquida è composta da acqua, è soggetto a meccanismi di deformazione viscoelastica tempo dipendenti e la cui rigidità costituisce un parametro di fondamentale importanza. È stato evidenziato che l'utilizzo di questo materiale come scaffold, ha un impatto significativo sulle attività e sulle funzioni delle cellule.

Il PVA è un polimero sintetico semicristallino biodegradabile utilizzato nel campo delle biotecnologie per la rigenerazione dei tessuti, la medicazione delle ferite e i sistemi di somministrazione di farmaci, perché possiede proprietà di biodegradabilità, biocompatibilità, non tossicità e basso costo di produzione.

Verranno anche esaminati i parametri fondamentali nei processi di fabbricazione del PVA, le sue proprietà fisiche e meccaniche ed i suoi principali utilizzi.

Il trattamento più utilizzato per produrre hydrogel a base di PVA consiste nei cicli di congelamento e scongelamento (*Freeze-Thawing Cycles FTCs*) di cui esamineremo in dettaglio i passaggi fondamentali. Purtroppo, gli hydrogel di PVA preparati con il consueto metodo FT mostrano una struttura isotropa sia a livello microstrutturale che in termini di proprietà meccaniche che sono talvolta insoddisfacenti nelle applicazioni biomediche.

Uno dei principali limiti del PVA è la scarsa capacità di degradarsi in ambiente biologico, per questo motivo Stocco et al. [17] hanno proposto l'ossidazione chimica del PVA mediante KMnO_4 in acido perclorico come una nuova strategia per ottenere scaffold a base di PVA, che portano a miglioramenti nelle proprietà biologiche, specie nell'ambito dell'ingegneria tissutale.

Nonostante i brillanti risultati ottenuti da Stocco et al. [17], l'ossidazione del PVA tramite permanganato di potassio, sembra causare una perdita di viscosità del polimero, che è strettamente correlata alla degradazione del materiale per la diminuzione del suo peso molecolare medio.

Barbon et al. [18] hanno quindi proposto di effettuare una ossidazione controllata del PVA tramite alogeni come bromo (Br_2), cloro (Cl_2) e iodio (I_2), che risultano essere meno aggressivi e garantiscono una minore degradazione della dimensione molecolare del polimero.

Verranno infine esaminate innumerevoli applicazioni biomediche degli hydrogel in PVA che spaziano negli ambiti più disparati, tra cui, la rigenerazione tissutale, la produzione delle lenti a contatto morbide e stent, per arrivare alla somministrazione di farmaci.

1. GLI HYDROGEL

1.1 Proprietà e comportamento

Un hydrogel è un gel la cui fase liquida è composta da acqua: esso è soggetto a meccanismi di deformazione viscoelastica tempo dipendenti.

Sono materiali polimerici costituiti da una rete tridimensionale di macromolecole idrofile legate tra loro mediante reticolazioni chimiche o fisiche e possono essere chimicamente stabili oppure degradarsi e infine dissolversi.

Questi materiali possono assorbire dal 10–20% fino a migliaia di volte il loro peso da asciutti [1] e questo processo, che prende il nome di *swelling*, comporta un notevole aumento di volume, dato dall'assorbimento di un solvente compatibile (come l'acqua nel caso degli hydrogel).

Gli hydrogel sono stati ampiamente applicati nel campo biomedico, spaziando dagli studi sui meccanismi fisiologici e patologici, alla rigenerazione dei tessuti [2], vista la loro somiglianza con i tessuti biologici sia dal punto di vista chimico che meccanico.

Generalmente, le proprietà degli scaffold di hydrogel sono determinate dalla composizione e dalla concentrazione del materiale, dai metodi di reticolazione e dalla densità oltre che dai metodi di fabbricazione.

La rigidità degli hydrogel costituisce un parametro di fondamentale importanza, in quanto è stato evidenziato che l'utilizzo di questo materiale come scaffold, simulando la matrice stromale, ha un impatto significativo sulle attività e sulle funzioni delle cellule. Tale influenza si manifesta a diversi livelli, compresi la morfologia cellulare, la proliferazione, la migrazione e la differenziazione [2].

Affinché la rigidità degli scaffold sia in linea con le necessità dell'applicazione pratica biomedica, sono stati ideati diversi approcci per modulare questa caratteristica. Tra i metodi più diffusamente impiegati, il drogaggio delle nanoparticelle e la reticolazione chimica emergono come le strategie principali. Tuttavia, la rigidità non è l'unica proprietà che influisce sullo sviluppo cellulare. Infatti, anche la dimensione dei pori della matrice e la viscoelasticità potrebbero essere coinvolte in questo processo [2].

La presenza di una struttura porosa con pori di dimensioni varie rappresenta un'altra importante caratteristica fisica degli scaffold in hydrogel. Tale struttura porosa, per la sua variabilità, può influenzare molteplici attività fisiologiche, determinandone il successo o il fallimento. Ad esempio, pori con dimensioni comprese tra 1 e 30 μm potrebbero consentire alle cellule tumorali di superare l'effetto di confinamento della matrice tumorale primaria e migrare verso posizioni distanti [2].

Le proprietà viscoelastiche svolgono un ruolo cruciale nella regolazione delle interazioni cellulari con la matrice circostante, influenzando la diffusione cellulare, la proliferazione e la differenziazione. Diversi fattori, tra cui composizione e concentrazione del precursore, flessibilità

della catena, densità e metodo di reticolazione, possono influire sul controllo della viscoelasticità dell'hydrogel [2].

Un ulteriore fattore che influenza l'attività cellulare è rappresentato dall'architettura dell'hydrogel, la quale è determinata sia dalla composizione stessa che dall'approccio di fabbricazione dello scaffold. Nel caso degli scaffold sintetici, il diametro delle fibre può variare da nanofibre a microfibre, influenzato dalle proprietà intrinseche del biomateriale o dal processo di fabbricazione dove l'allineamento delle fibre può essere regolato con precisione nell'intervallo da 0° a 180° [3].

È noto, inoltre, che diversi diametri e allineamenti delle fibre possono indurre risposte immunitarie differenziate in diversi tipi di cellule.

1.2 Classificazione

Gli hydrogel vengono definiti come gel "reversibili" o "fisici" quando la formazione della loro rete è principalmente guidata da intrecci molecolari e/o forze secondarie, come le forze ioniche, i legami H o le forze idrofobiche. Questi gel possono essere dissolti mediante la modifica delle condizioni ambientali, come il pH, la forza ionica della soluzione o la temperatura [3].

Nei cosiddetti hydrogel "permanenti" o "chimici", invece, la formazione della rete avviene attraverso legami covalenti che connettono diverse catene macromolecolari, sia che siano reticolati in stato secco oppure in soluzione. Questi gel possono essere carichi oppure no, a seconda dei gruppi funzionali presenti nella loro struttura. In particolare, quelli carichi tendono a manifestare variazioni di rigonfiamento in risposta alle variazioni del pH, ed inoltre, possono subire cambiamenti di forma quando esposti a un campo elettrico [3].

Gli hydrogel possono anche essere classificati in naturali e sintetici. I primi si distinguono per la loro elevata biocompatibilità e biodegradabilità, ma presentano limitazioni nelle proprietà meccaniche, come rigidità e deformabilità, che ne limitano le applicazioni. D'altra parte, gli hydrogel sintetici tendono a mostrare proprietà meccaniche superiori, resistendo meglio a carichi significativi, nonostante la loro biocompatibilità e bioattività inferiori [2].

2. ALCOOL POLIVINILICO, COMPOSIZIONE CHIMICA E CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

Il PVA è un polimero sintetico semicristallino biocompatibile che è stato utilizzato nel campo delle biotecnologie come la rigenerazione dei tessuti, la medicazione delle ferite e i sistemi di somministrazione di farmaci.

Negli ultimi anni, i materiali per le medicazioni a base di PVA hanno ricevuto notevole attenzione grazie alle loro eccellenti proprietà quali biocompatibilità, non tossicità e basso costo [4]. Inoltre, dato che è solubile in acqua viene spesso usato come materiale alternativo ai più comuni materiali polari e perciò il PVA è anche conosciuto come “polimero verde”.

Il PVA è rappresentato dalla formula chimica $(C_2H_4O)_n$ mentre la struttura chimica è mostrata nella Figura 1.

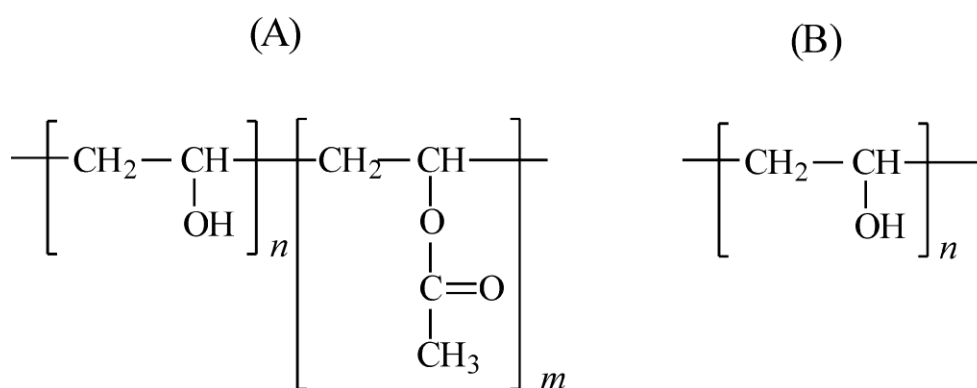


Figura 1. Formula strutturale per il PVA: (A) parzialmente idrolizzato e (B) completamente idrolizzato [6].

A seconda del grado di idrolisi, può avere pesi molecolari diversi e il PVA si può trovare parzialmente idrolizzato (80.0–98.5%), con un elevato grado di idrolizzazione (>98.5%) o completamente idrolizzato (100.0%) [4].

Le dimensioni ridotte dei gruppi ossidrillici pendenti permettono di ottenere una forma cristallina.

Il PVA può essere miscelato con altri materiali organici e inorganici e può essere utilizzato per la somministrazione di farmaci e la guarigione delle ferite, dato che crea quell’ambiente umido necessario alla ferita per rimarginarsi ed inoltre migliora le proprietà fisiche della medicazione [4].

Inoltre, l’aggiunta di PVA ad un hydrogel conferisce a quest’ultimo flessibilità al punto che nel processo di degradazione si verifica rottura delle catene di polisaccaridi e di conseguenza la densità di reticolazione diminuisce che comporta una resistenza alla trazione inferiore [9].

2.1 Parametri fondamentali nei processi di fabbricazione del PVA

Il PVA è un polimero sintetico utilizzato dall'inizio degli anni '30 in un'ampia gamma di applicazioni industriali, commerciali, mediche e alimentari, tra cui resine, lacche, fili chirurgici e applicazioni a contatto con gli alimenti.

Le proprietà chimiche e fisiche generali del PVA sono riassunte nella Tabella 1 [6].

N. CAS	9002-89-5	USP/NF [29]
Peso molecolare	30000-200000	[27]
Formula strutturale	$(-\text{CH}_2\text{CHOH}-)_n - (-\text{CH}_2\text{CHOCOCH}_3-)_m$	[28]
Formula empirica	$(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n (\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2)_m$	[28]
Aspetto fisico	Polvere granulare inodore, di colore da bianco a crema	[27]
Solubilità	Insolubile in idrocarburi alifatici e aromatici, esteri, chetoni e oli; solubile in acqua	[27]

Tabella 1. Identità chimica generale e proprietà fisiche del PVA [6] identificato dalla sigla commerciale CAS 9002-89-5

La sintesi di PVA è composta da più fasi (Figura 2), dove la prima consiste nella polimerizzazione radicalica del monomero acetato di vinile (VAc) che genera polivinilacetato idrofobo (PVAc). La seconda fase, detta saponificazione, è caratterizzata dall'idrolisi alcalina del PVAc in emulsioni a base di acqua o in soluzione (ad esempio metanolo o acetato di etile come solvente).

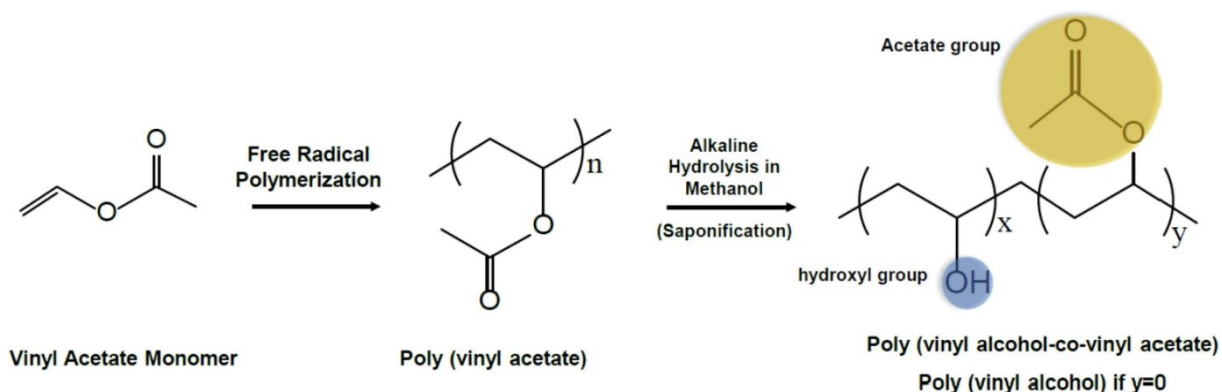


Figura 2. Illustrazione schematica della sintesi del PVA e della struttura chimica [12]

La forma in emulsione viene incorporata con alcuni additivi e utilizzata come colla per legno, mentre la forma in soluzione di metanolo viene generalmente utilizzata per la sintesi del PVA nell'industria.

Il sottoprodotto della saponificazione è l'acetato di sodio che viene rimosso mediante processi di lavaggio [12].

Il grado di sostituzione dell'acetato con l'alcool, indicato come grado di idrolisi, determina in gran parte le proprietà del PVA infatti, per esempio, l'idrolisi parziale restituisce copolimeri di alcool vinilico e acetato di vinile che hanno una minore tendenza alla cristallizzazione a causa dei gruppi acetato voluminosi [12].

2.2 Proprietà fisiche e meccaniche del PVA

Il PVA ha proprietà meccaniche controllabili, ha un basso tasso di usura e coefficiente di attrito, ed inoltre può essere modificato chimicamente per alterarne le caratteristiche fisiche [7].

Le proprietà fisiche del PVA, tra cui densità, cristallinità, formazione del film, solubilità in acqua, volume molare e grado di polimerizzazione, dipendono dal grado di idrolisi, dalla precipitazione dei cristalli, dalla massa molecolare e dall'umidità. Il PVA può avere diversi gradi di rigidità a seconda della percentuale di polimero in acqua e della densità di reticolazione, e come sopra specificato, permette il passaggio dell'ossigeno in caso di elevata umidità. Per modificare fisicamente il PVA bisogna attuare un processo di cristallizzazione, il quale è dovuto alla formazione di legami idrogeno tra le sue catene [14].

Alcune caratteristiche fisiche del PVA puro sono elencate nella Tabella 2.

Proprietà	Range
Densità	1.19 g/cm ³
T _g	400 K
Punto di fusione	400 K
Indice di rifrazione	1.47 a 630 nm
Punto d'infiammabilità	352.59 K

Tabella 2. Proprietà meccaniche del PVA [13]

Tuttavia, gli impianti solidi in PVA non hanno avuto successo nella riparazione dei difetti osteocondrali del ginocchio, come si evince dall'articolo di Chen et al. [7]. Infatti, nei modelli animali, questi hanno portato all'incapsulamento fibroso e all'allentamento degli impianti. Chen et al. [7] hanno proposto due approcci per contrastare questi problemi: il primo consiste nell'uso di una base metallica porosa in titanio (pTi), fissata a un disco di PVA, consentendo l'integrazione ossea, mentre il secondo comporta l'uso di una base cilindrica solida di PVA con un alto contenuto di polimeri, che viene mantenuto in posizione attraverso la compressione articolare.

Tuttavia, non è stato stabilito l'effetto della rigidità del PVA o della presenza/assenza di una base metallica porosa sulla meccanica del contatto congiunto. Chen et al. [7] avevano precedentemente sviluppato un modello dinamico in grado di applicare carichi fisiologici multidirezionali imitando

l'andatura sulle ginocchia di un cadavere umano e la combinazione di questo modello con sensori di stress da contatto. Questo modello ha permesso di quantificare l'effetto dei difetti focali e dei dispositivi destinati a sostituire tali difetti sulla meccanica di contatto dell'articolazione del ginocchio.

2.3 Applicazioni e principali utilizzi

Il PVA è stato considerato anche un potenziale materiale da imballaggio biodegradabile grazie alla sua eccellente capacità di formare film e la sua termoplasticità. Purtroppo, ha scarse proprietà di barriera al vapore acqueo, bassa resistenza meccanica e altrettanto bassa resistenza all'acqua rispetto ai materiali di imballaggio convenzionali. Inoltre, il PVA non dispone di caratteristiche desiderabili per i materiali utilizzati nell'ambito dell'imballaggio alimentare, come le proprietà antimicrobiche e di barriera ai raggi UV [5].

Negli Stati Uniti, il PVA è principalmente impiegato nelle industrie tessili per il processo di imbozzimatura e finissaggio. Trova applicazione anche nella produzione di tessuti idrosolubili utilizzati per la realizzazione di indumenti protettivi biodegradabili, sacchi per biancheria ospedaliera, stracci, spugne, lenzuola, coperture e prodotti per l'igiene fisiologica [6].

Oltre all'uso tessile, il PVA è ampiamente impiegato nella produzione di articoli di carta e come agente di collatura e rivestimento. Contribuisce alla rigidità nella formazione di tubi, nella chiusura di cartoni e nella laminazione degli stessi. Inoltre, funge da addensante in vernici al lattice, colla bianca domestica e altre miscele adesive, come etichette e sigilli rimovibili, nonché in cementi a base di gesso utilizzati per le piastrelle di ceramica.

La sua insolubilità nei solventi organici e la sua regolabile solubilità in soluzioni acquose lo rendono versatile in base alla necessità [6].

Come è stato brevemente accennato sopra, il PVA gode di proprietà come solubilità e biodegradabilità che lo rendono un materiale a bassissimo impatto ambientale. Infatti, sono stati identificati diversi microrganismi onnipresenti negli ambienti artificiali e naturali, come sistemi settici, discariche, compost e suolo, che sono in grado di degradare il PVA attraverso processi enzimatici [6].

Uno degli ambiti dove il PVA viene maggiormente studiato e utilizzato è quello della medicina date le sue proprietà di biocompatibilità e atossicità (Tabella 3).

Specie	Dose somministrata LD50 (mg/kg)
Ratto	>20000
Ratto	21500
Topo	147000
Topo	>4000
Cane	20000

Tabella 3. LD orale acuta ₅₀ di PVA [6]

Per le proprietà sopra elencate, il PVA viene largamente utilizzato in diverse applicazioni mediche, tra cui cerotti transdermici, la preparazione di gelatine che si asciugano rapidamente quando applicate sulla pelle, nelle soluzioni oftalmiche come le lacrime sintetiche date le sue proprietà di dispersione e rivestimento e nelle formulazioni di compresse a rilascio controllato di farmaci orali.

Per questi motivi sopra elencati, il PVA è incluso nella Guida agli ingredienti inattivi della FDA per preparazioni oftalmiche e compresse orali [6] ed ha ottenuto la conformità europea (CE).

Questo materiale viene utilizzato anche nella fabbricazione di lenti a contatto morbide, nel rivestimento di cuori artificiali e di vasi sanguigni e nella sostituzione di cartilagine articolare.

Per le sue proprietà chimiche e fisiche il PVA è uno dei materiali più ampiamente studiati nella produzione di medicazioni per ferite a base di hydrogel [4].

Una medicazione ideale per la ferita dovrebbe presentare le seguenti caratteristiche: in primo luogo, la medicazione deve essere biodegradabile, biocompatibile e non immunogenica. In secondo luogo, deve fornire un ambiente umido, con protezione batterica per favorire la guarigione delle ferite ed in terzo luogo, dovrebbe essere in grado di assorbire l'essudato in eccesso, consentire la permeazione del gas nel tessuto della ferita e promuovere la proliferazione dei componenti della matrice extracellulare, l'angiogenesi e la secrezione di fattori di crescita. Infine, è desiderabile che la medicazione venga applicata facilmente, senza adesione alla superficie della ferita e rimossa senza nuove lesioni [4].

Tuttavia, il PVA ha una bioattività inerte e da solo non è sufficiente per l'uso nelle medicazioni delle ferite, a causa della sua mancata capacità di assorbimento dell'essudato, della bassa elasticità e per l'incapacità di rilasciare il farmaco. Pertanto, i materiali compositi a base di PVA e la loro miscela con sostanze bioattive presentano proprietà di medicazione e interazioni cellulari superiori, per accelerare la guarigione delle ferite [4].

3. HYDROGEL A BASE DI PVA

Gli hydrogel compositi a base di PVA sono eccellenti materiali per la medicazione di ferite.

I polimeri naturali e sintetici utilizzati con il PVA ne hanno migliorato significativamente le proprietà chimico-fisiche, la capacità di assorbimento dell'acqua, la permeabilità al vapore acqueo, la permeabilità ai farmaci e l'attività di guarigione delle ferite [4].

3.1 Caratteristiche chimico-fisiche

Nel processo di preparazione degli hydrogel a base di PVA, è essenziale porre attenzione a diversi parametri che incidono sulla struttura e sulle proprietà del polimero, influenzando di conseguenza le sue possibili applicazioni.

La variazione della lunghezza del polimero iniziale e del grado di idrolisi, sia in condizioni alcaline che acide, permette di ottenere prodotti con differenti pesi molecolari (compresi tra 20000 e 400000), solubilità, flessibilità, resistenza alla trazione e adesività.

Per caratterizzare il PVA vengono misurate varie proprietà, quali: pH, viscosità, perdita in peso all'essiccazione, punto di fusione e indice di rifrazione. Queste proprietà variano in base al peso molecolare e alla percentuale di idrolisi per il grado di PVA [6].

Per esempio, è stato riscontrato che i polimeri con peso molecolare inferiore, tendono a formare hydrogel con proprietà di rigonfiamento più elevate, ma le proprietà meccaniche diminuiranno leggermente [9]. Mentre un aumento del peso molecolare, come si evince dallo studio di Hassan et al. [10], produce cristalli di spessore lamellare e dimensioni maggiori, dovuto ad una crescita della lunghezza della catena del PVA.

Tuttavia, l'effetto menzionato è vincolato dal volume disponibile e dalla mobilità dei polimeri ad alto peso molecolare. Infatti emerge chiaramente da questa ricerca, che i gel di PVA sottoposti a un processo di congelamento-scongelo con un peso molecolare intermedio e a un numero più elevato di cicli, dimostrano una maggiore stabilità alla temperatura di 37 °C nel corso di un periodo di sei mesi, dimostrando così la loro adeguatezza per trattamenti a lungo termine nelle applicazioni biomediche.

Il grado di idrolisi per ogni grado di PVA ne influenza le proprietà intrinseche come si evince dallo studio di Squillance et al. [11] il cui scopo è stabilire le regole di progettazione che influenzano le proprietà superficiali di matrici polimeriche complesse di piccole molecole. In questo studio sono state fatte modifiche nella chimica della matrice del PVAc idrofobico e non polare; infatti, cambiando il grado di idrolisi (DH), il comportamento degli additivi può subire modifiche in termini di compatibilità e attività superficiale.

Sqillance et al. [11] hanno riscontrato che per il PVAc a basso DH, l'aggiunta di sorbitolo aumenta leggermente la temperatura di transizione vetrosa T_g , ovvero la temperatura alla quale si verifica il picco massimo nella derivata prima del flusso di calore rispetto alla temperatura.

Questo aumento della T_g è riconducibile ad uno stato di compatibilità relativa, chiamato anche antiplastificante, in cui entrambi i componenti sono amorfi, rendendo possibile la coesistenza di domini misti. Tuttavia, a DH più elevati, la T_g associata al polimero diminuisce di 3,6 °C quindi il passaggio allo stato gommoso avverrà per temperature leggermente più basse [11].

Inoltre, giocano un ruolo fondamentale nei processi di produzione del PVA fattori come:

- concentrazione
- numero di cicli di congelamento-scongelo
- uso di solventi

Diverse ricerche hanno evidenziato che soluzioni a concentrazioni più elevate favoriscono la formazione di PVA maggiormente cristallizzato e caratterizzato da una maggiore rigidità, implicando una resistenza alla trazione superiore. In generale, concentrazioni pari o inferiori al 5% sono raramente sufficienti per generare hydrogel, mentre concentrazioni inferiori al 10% in peso conducono a hydrogel con limitate proprietà meccaniche. Tipicamente in letteratura viene utilizzata la concentrazione minima del 10% in peso. Si osserva un miglioramento significativo e costante delle proprietà meccaniche e della stabilità al rigonfiamento con concentrazioni più elevate di PVA. Questo fenomeno è attribuito sia al maggiore quantitativo di PVA nel gel che all'aumento della cristallizzazione, come evidenziato nella Figura 3b. Le soluzioni concentrate di PVA generano cristalliti di dimensioni maggiori e una maggiore cristallinità, ma comportano anche un ridotto assorbimento di acqua e una dimensione dei pori più ampia, come si può osservare nella Figura 3c. È importante notare che, parallelamente all'aumento della concentrazione, si verifica una diminuzione della porosità. Tuttavia, la concentrazione di PVA non può superare il 30–40% in peso (a seconda del peso molecolare), poiché ciò produrrebbe una soluzione estremamente viscosa e gelatinosa, difficile da lavorare [12].

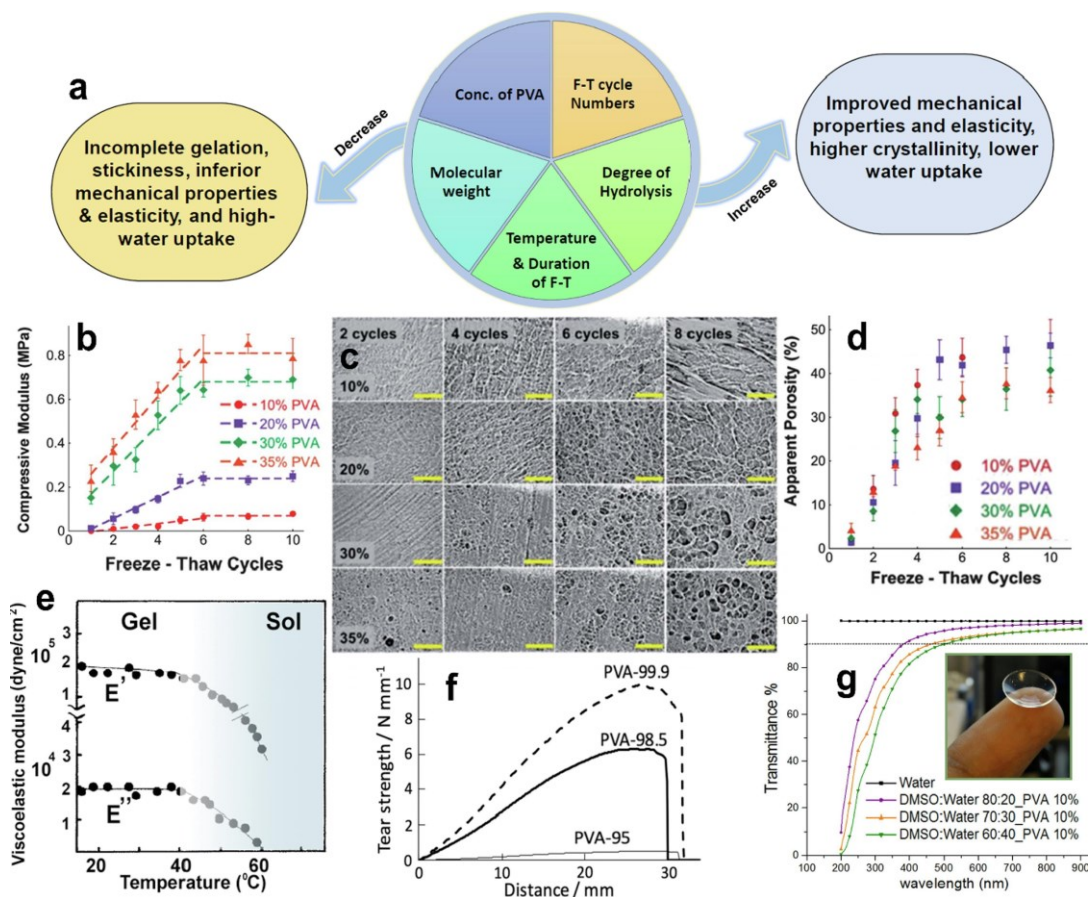


Figura 3. Ottimizzazione delle proprietà fisiche e meccaniche degli idrogel FT PVA. (a) Effetto dei parametri di gelificazione sulle proprietà finali dell'idrogel FT PVA. (b) Modulo di compressione degli idrogel con diverse concentrazioni (10, 20, 30 e 35% in peso) in funzione dei cicli FT. (c) Micrografie SEM degli idrogel corrispondenti (barre della scala = 80 μm). (d) La porosità apparente degli idrogel FT PVA nello stato idratato mostra che il rimodellamento strutturale avviene aumentando il numero di cicli FT e la concentrazione di PVA. (e) Il modulo viscoelastico degli idrogel in funzione della temperatura mostra l'inizio della transizione da gel a sol a ca. 45 $^{\circ}\text{C}$. (f) La resistenza allo strappo dei gel mostra che il grado di idrolisi del PVA ha un grande impatto sulla resistenza del gel e nel complesso, si può concludere che per preparare un idrogel a base di PVA ad alta resistenza è necessario utilizzare PVA completamente idrolizzato. (g) Spettri di trasmissione UV-vis dei gel FT PVA preparati in diversi rapporti DMSO: acqua. I gel assorbono efficacemente la luce nella gamma UV, pur avendo un'elevata trasmittanza nella regione visibile [12].

Per quanto riguarda il numero di cicli di congelamento-scongelo, maggiore è questo numero, maggiore è la quantità di catene di PVA spinte verso regioni ricche di polimeri e quindi coinvolte nella separazione di fase, cristallizzazione e gelificazione. Ciò si riflette in un miglioramento delle proprietà meccaniche, dell'elasticità, della resistenza all'acqua e della stabilità dell'idrogel, come mostrato nella Figura 3b. Inoltre, come evidenziato nelle Figure 3c e 3d, un aumento dei cicli comporta un incremento della dimensione dei pori. È importante notare che in alcune condizioni specifiche, come un elevato peso molecolare e una concentrazione di PVA significativa, la gelificazione può verificarsi anche dopo un solo ciclo. Tuttavia, in questa fase iniziale, la rete non è

completamente sviluppata, rendendo i gel suscettibili a una significativa perdita di peso quando esposti all'acqua. Inoltre, con un basso numero di cicli di congelamento-scongelo, i gel mostrano una notevole capacità adesiva, che diminuisce man mano che il numero di cicli aumenta [12].

È anche molto importante notare che la temperatura alla quale i gel vengono conservati/utilizzati/applicati non deve superare i 60 °C, poiché ciò potrebbe causare la fusione della fase cristallina, la rottura dei legami idrogeno e, infine, la transizione gel-sol (Figura 3e). Nonostante questa transizione possa limitare le possibili applicazioni, è stato dimostrato che i gel mantengono una stabilità strutturale sufficiente in condizioni fisiologiche (pH 7,4 e temperatura di circa 37 °C) [12].

Analizzando la resistenza allo strappo del gel, come mostrato nella Figura 3f, diventa evidente che il DH del PVA può avere un impatto significativo sulle proprietà degli hydrogel risultanti. Infatti, per ottenere un hydrogel di PVA con una elevata resistenza, è indispensabile impiegare PVA completamente idrolizzato [12].

Per quanto concerne l'impiego di solventi organici, il dimetilsolfossido di zolfo (DMSO) offre un'eccellente trasparenza insieme a una resistenza alla trazione apprezzabile e un elevato contenuto d'acqua (Figura 3g).

In fine, la forza del gel e la capacità di rigonfiamento, parametri generalmente valutati in letteratura come indicatori chiave delle proprietà dell'hydrogel, sono inversamente correlate. Le giunzioni di gelificazione nella struttura determinano la forza del gel, con un aumento della densità di reticolazione associato a una minore disponibilità di spazio per l'assorbimento dell'acqua [12].

3.2 Processo di preparazione degli hydrogel a base di PVA

La formazione di una reticolazione attraverso l'esposizione a radiazioni, ad esempio tramite l'utilizzo di raggi gamma in una soluzione acquosa contenente polimeri idrofili, consente la creazione simultanea di un hydrogel insieme alla sua sterilizzazione. Gli studiosi Rosiak et al. [21] hanno impiegato sia polimeri naturali, come gelatina o agar, che polimeri sintetici, come il polivinilpirrolidone (PVP) o il PVA, sottoposti a reticolazione mediante radiazioni gamma per produrre hydrogel sterili destinati al trattamento delle ferite. Attualmente, questi hydrogel vengono prodotti e commercializzati come dispositivi medici per la cura delle ferite con i marchi "Kikgel" e "Aqua-gel" [21] [3].

Recentemente, Cook et al. [22], hanno riportato un metodo alternativo per sintetizzare hydrogel da polimeri idrosolubili già pronti in soluzioni acquose mediante trattamento termico o irradiazione con microonde. Con questo metodo le soluzioni acquose di specifici polimeri idrosolubili tra cui il PVA, acido poliacrilico (PAA), poli(metil vinil etere-alt-anidride maleica) (PMVEMA) e

poli(acrilammide) (PAAM) (Tabella 4) vengono miscelati insieme, a temperatura ambiente e il processo di reticolazione viene ottenuto mediante trattamento termico ad alta pressione tramite autoclave o radiazione a microonde.

Sia i metodi di reticolazione mediante radiazione che quelli termici sono economici, sicuri, non richiedono una fase di purificazione e producono hydrogel sterili se viene utilizzata un'adeguata combinazione di polimeri idrofili [3].

Reattivi polimerici	Temperatura [°C]	Prodotto [%]	Grado di rigonfiamento dell'equilibrio in acqua deionizzata [g g ⁻¹]
PVA e PAA	150	20	939
PVA e PMVEMA	100	83	569
PAA e PAAM	135	12	1146

Tabella 4. Esempi di combinazioni polimeriche che hanno prodotto hydrogel in seguito all'irradiazione con microonde. Soluzioni acquose (1 mol dm⁻³ di unità ripetute per tutti i polimeri eccetto PAAM) dei due polimeri sono state miscelate e irradiate con microonde alla temperatura specificata per 20 minuti [22].

Il trattamento più comunemente utilizzato per produrre hydrogel a base di PVA consiste nei cicli di congelamento e scongelamento (*Freeze-Thawing Cycles FTCs*).

Questo processo descritto nella Figura 4 inizia con l'utilizzo di una soluzione a base di PVA sottoposta a una fase di congelamento in cui si verifica l'intrappolamento delle catene di PVA tra i cristalli di ghiaccio, derivante dalla separazione di fase. Durante il processo di scongelamento, si assiste alla formazione di una rete gelatinosa in concomitanza con i cristalli di ghiaccio, i quali si trasformano nei pori dell'hydrogel.

Tale sequenza di congelamento e scongelamento viene ripetuta per diversi cicli, il cui numero può variare da 3 a 9. L'aumento del numero di cicli comporta un incremento delle catene incorporate nei cristalli di PVA, conferendo maggiore resistenza al gel e amplificandone il grado di cristallizzazione [12].

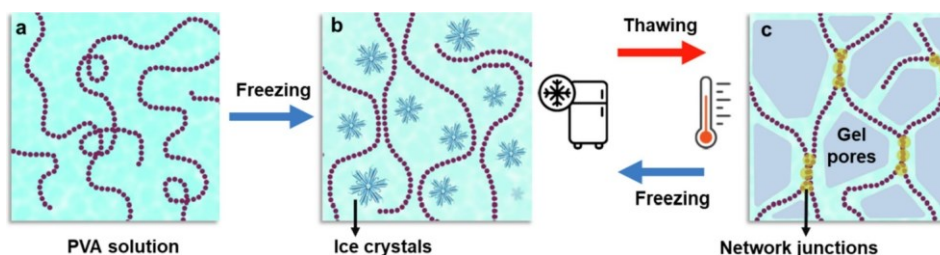


Figura 4. Illustrazione schematica della preparazione di hydrogel PVA mediante metodo FT [12].

La produzione dell'hydrogel di PVA mediante il metodo FT richiede la completa dissoluzione del PVA. Tuttavia, quanto maggiore è il grado di idrolisi e il peso molecolare, tanto più complicato diventa il processo di dissoluzione. Questa complessità è attribuita alla presenza di legami idrogeno, sia intermolecolari che intramolecolari, e all'elevato grado di cristallizzazione del materiale. Di conseguenza, la dissoluzione del PVA viene eseguita in acqua calda (con temperatura superiore a 80°C) o addirittura bollente per un periodo prolungato, utilizzando un agitatore meccanico (e non magnetico perché potrebbe non essere adatto per soluzioni altamente viscosi) [12].

All'aumentare della concentrazione di PVA, in genere superiore al 15% in peso, il processo di dissoluzione diventa ulteriormente complesso a causa dell'incremento della viscosità. Ciò provoca l'agglomerazione di polveri o granuli, formando grumi che possono essere evitati mediante l'aggiunta graduale di PVA all'acqua. È importante notare che, a causa della limitata fluidità, le soluzioni altamente concentrate di PVA, superiore al 30-40% in peso, potrebbero presentare difficoltà nel processo di lavorazione e stampa [12].

In una tipica preparazione di hydrogel tramite cicli di FT, una soluzione omogenea di PVA viene versata in uno stampo e congelata a -20 °C. Il campione viene mantenuto congelato per alcune ore e poi scongelato a temperatura ambiente eseguendo questo processo ciclicamente generalmente dalle 3 alle 9 volte, per garantire l'ottenimento di un gel forte e stabile.

A seconda della durata del ciclo (che può variare di molto come anche la temperatura), il processo FT può richiedere diversi giorni e quindi lo stampo deve essere sigillato per prevenire la perdita di acqua e il restringimento del gel nel tempo [12].

La conservazione prolungata di soluzioni concentrate, generalmente oltre il 15% in peso, può generare gel deboli che non soddisfano i requisiti di molte applicazioni. Questo fenomeno è attribuibile alla propensione del PVA a cristallizzare in soluzione, soprattutto a elevati gradi di idrolisi e concentrazioni. Infatti, la conservazione a lungo termine della soluzione a temperatura ambiente può causare la formazione di filamenti visibili e una leggera torbidità, segnali di cristallizzazione e inizio della gelificazione. Di conseguenza, è consigliabile incubare la soluzione a temperature elevate (>60°C) per alcune ore dopo un periodo prolungato di conservazione, al fine di eliminare le regioni cristalline deboli e ripristinare l'uniformità della soluzione prima di qualsiasi utilizzo [12].

3.3 Caratteristiche meccaniche

Data la sua natura semicristallina, il PVA può dar luogo alla formazione di cristalliti quando la sua soluzione acquosa è congelata a basse temperature. Dopo lo scongelamento, si sviluppano legami

idrogeno tra le catene di PVA e i cristalliti risultanti fungono da robusti legami incrociati, connettendo le diverse catene in una rete di hydrogel [15].

L'aumento del numero di cicli di FT comporta la formazione di un maggior numero di cristalliti di PVA e legami idrogeno, migliorando così le proprietà meccaniche dell'hydrogel di PVA. Gli hydrogel preparati con il consueto metodo FT mostrano caratteristiche di isotropia sia a livello microstrutturale che in termini di proprietà meccaniche. Le proprietà meccaniche risultano simili a quelle dei tessuti molli, per esempio la resistenza alla trazione è generalmente inferiore a 1 Mpa [15].

Chen et al. [15] hanno adottato la tecnica del congelamento-scongelo direzionale (DFT) per la preparazione di hydrogel anisotropi di PVA con una struttura porosa significativamente anisotropa e con proprietà meccaniche migliorate. Gli autori sono riusciti a creare un hydrogel ibrido PVA/poli(acido acrilico) (PVA/PAA) mediante l'immersione di un hydrogel di PVA in una soluzione acquosa di PAA, seguita dalla trafilatura a freddo dei gel PVA/PAA in vari ceppi prendendo spunto dallo studio di Liu et al. [26]. I gel PVA/PAA trafilati a freddo hanno mostrato strutture anisotrope, ma cosa più importante, la loro resistenza alla trazione e il loro modulo potevano raggiungere valori di 100 MPa, nonostante il contenuto di acqua fosse solo circa il 40% [15].

Liu et al. [26] hanno per prima cosa misurato le proprietà meccaniche di trazione dell'hydrogel PVA/PAA senza trattamento di trafilatura a freddo (preparato con il 14% in peso di PVA) con diversi periodi di immersione (Figura 5a e 5b). La resistenza alla trazione (σ_b), il modulo elastico (E) e l'allungamento (ϵ_b) aumentano rapidamente nelle prime ore e poi rimangono quasi costanti fino a 24 ore. In queste prove meccaniche le tempistiche di immersione saranno sempre della durata di 48 ore (hydrogel PVA/PAA-48) [26].

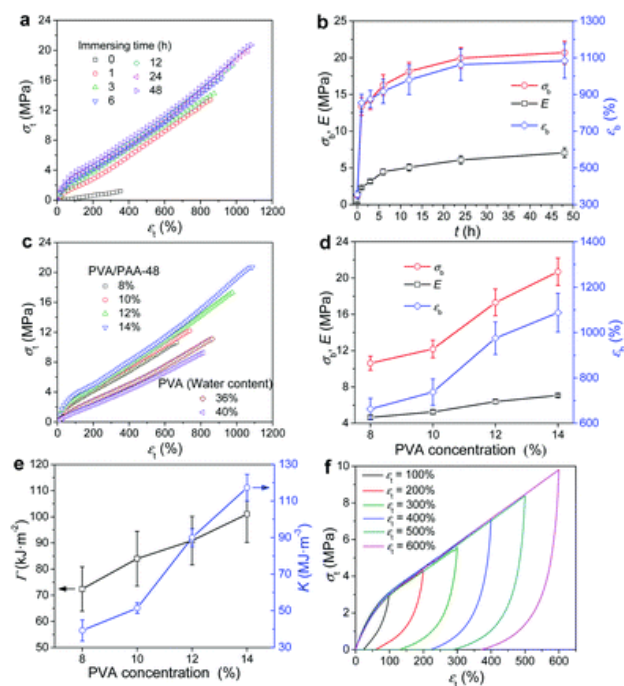


Figura 5. (a) Curve tipiche di tensione-deformazione a trazione ($\sigma_t - \varepsilon_t$) degli hydrogel PVA/PAA preparati con diversi periodi di immersione. Dove la concentrazione di PVA (C_{PVA}) è pari al 14% in peso (b) Le resistenze a trazione (σ_b), i moduli elastici (E) e gli allungamenti (ε_b) in funzione del tempo di immersione degli stessi campioni di (a). (c) Curve tipiche di trazione $\sigma_t - \varepsilon_t$ di hydrogel PVA/PAA-48 preparati con diverse concentrazioni di PVA e hydrogel di PVA puro con un contenuto di acqua del 36 e 40% in peso. (d) σ_b , E e ε_b di hydrogel PVA/PAA-48 preparati con diverse concentrazioni di PVA. (e) Energia di frattura (Γ) e tenacità (K) di hydrogel PVA/PAA-48 preparati con diverse concentrazioni di PVA. (f) Curve tipiche di carico-scarico a trazione di hydrogel PVA/PAA-48 a diverse deformazioni di trazione massime (ε_{max}). $C_{PVA} = 10\%$ in peso. Ogni ciclo di carico-scarico è stato eseguito con un campione originale. σ_t è indicato come sollecitazione nominale [26].

La Figura 5c mostra le curve tensione-deformazione a trazione ($\sigma_t - \varepsilon_t$) degli hydrogel PVA/PAA-48 preparati con diverse concentrazioni di PVA (C_{PVA}), insieme a quelli di hydrogel PVA puro con un contenuto di acqua del 36 e 40% in peso. Mentre, i valori corrispondenti di σ_b , E e ε_b per l'hydrogel PVA/PAA-48 sono riassunti nella Figura 5d. Si osserva che questi parametri aumentano all'aumentare di C_{PVA} [26].

Rispetto agli hydrogel PVA puri, gli hydrogel PVA/PAA-48 con identico contenuto di acqua (compreso tra il 35.9 e il 40.2% in peso), presentano valori di σ_b ed E molto più alti. Per esempio, l'hydrogel PVA puro con un contenuto di acqua del 36% in peso ha σ_b ed E di circa 11.1 MPa e 1.9 MPa, rispettivamente. Mentre, gli hydrogel PVA/PAA-48 preparati con il 14% in peso di PVA, σ_b ed E sono rispettivamente circa 20.7 e 7.1 MPa, che rappresentano approssimativamente il doppio e il quadruplo di quelli del corrispondente hydrogel PVA puro [26].

La Figura 5e evidenzia che anche l'energia di frattura (Γ) e la tenacità (K) degli hydrogel PVA/PAA-48 aumentano all'aumentare di C_{PVA} raggiungendo rispettivamente 101 kJ m⁻² e 117 MJ m⁻³ con una C_{PVA} del 14% in peso [26].

Infine, per comprendere il meccanismo di dissipazione dell'energia degli hydrogel PVA/PAA vengono eseguiti test di trazione ciclici. Dalla Figura 5f si osserva che il rapporto di isteresi (hr) aumenta con l'aumentare delle deformazioni massime di trazione (ε_{max}), raggiungendo quasi il 90% quando ε_{max} è del 600%. Rispetto agli hydrogel sintetizzati con metodo FT, gli hydrogel PVA/PAA mostrano un'isteresi più significativa, suggerendo un meccanismo di dissipazione dell'energia più efficace grazie alla più facile rottura del legame H tra le catene PVA e PAA [26].

Al fine di potenziare ulteriormente le proprietà meccaniche degli hydrogel PVA/PAA Liu et al. [26] hanno applicato al gel un trattamento di trafilatura a freddo. Durante questo trattamento il contenuto di acqua degli hydrogel PVA/PAA trafilati a freddo rimane praticamente costante.

La trafilatura a freddo ha portato a miglioramenti significativi in σ_b ed E per gli hydrogel PVA/PAA-48 preparati con diversi C_{PVA} anche ad un rapporto di trafilatura a freddo (n) pari al 100% (Figure 6a e 6b). I valori di σ_b ed E sono compresi tra 25 MPa e 50MPa e 6 MPa e 24 MPa, rispettivamente [26].

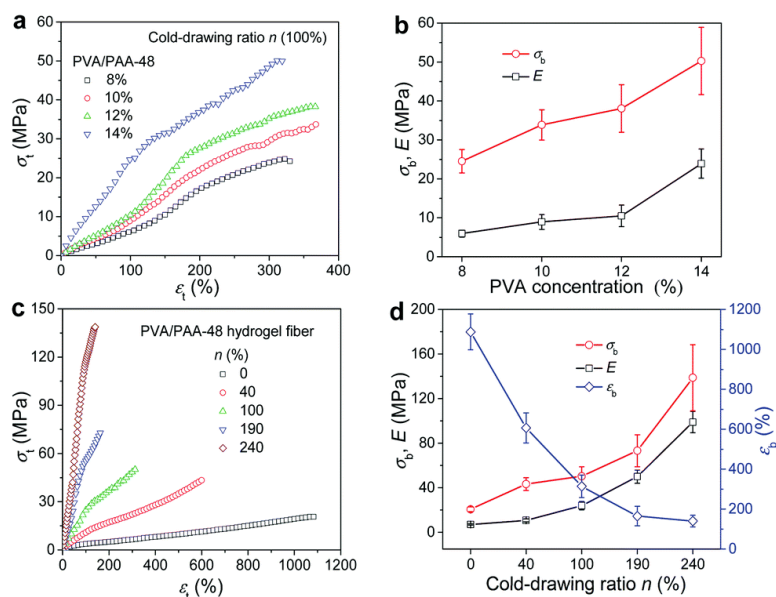


Figura 6. (a) Curve di trazione $\sigma_t - \epsilon_t$ degli hydrogel PVA / PAA-48 trafilati a freddo preparati con diverse concentrazioni di PVA con n del 100%. (b) σ_b ed E degli stessi campioni di (a). (c) Curve di trazione $\sigma_t - \epsilon_t$ degli hydrogel PVA / PAA-48 trafilati a freddo con n diverso. $C_{PVA} = 14\%$ in peso (d) σ_b , E e ϵ_b degli stessi campioni di (c) [26].

Gli hydrogel PVA/PAA-48 preparati con il 14% in peso di PVA e sottoposti a trafilatura a freddo a diversi valori di n , hanno evidenziato una diminuzione di ϵ_b ed un aumento di σ_b ed E all'aumentare di n (Figure 6c e 6d). In particolare, i valori di σ_b ed E degli hydrogel PVA/PAA-48 trafilati a freddo con n del 240% sono estremamente elevati, raggiungendo rispettivamente 140 MPa e 100 MPa. Il che suggerisce la formazione di più legami H durante il processo di trafilatura a freddo [26].

Indubbiamente, sia il congelamento direzionale che la trafilatura si dimostrano metodi efficaci per orientare le catene di PVA lungo la direzione di congelamento o di trafilatura, determinando così la formazione di microstrutture anisotrope nel gel [15].

In aggiunta, sia i cicli FT che lo stiramento ciclico risultano efficaci nel potenziare le proprietà meccaniche degli hydrogel, poiché favoriscono la creazione di ulteriori legami idrogeno tra le catene di PVA allineate [15].

Diversi tipi di hydrogel con elevate proprietà meccaniche e tenacità sono stati sviluppati principalmente sfruttando legami idrogeno cooperativi, questo perché si osserva un notevole

potenziamento della forza dei legami idrogeno, dato dall'effetto sinergico o dalla cooperazione di questi legami tra loro [15].

Chen et al. [15] hanno introdotto un approccio innovativo basato sul congelamento-scongelo con trafilatura per la preparazione di hydrogel PVA anisotropi con elevate proprietà meccaniche. Questa metodologia a due fasi conferisce una microstruttura anisotropa insieme a prestazioni meccaniche migliorate.

Come illustrato nella Figura 7, inizialmente viene creato un hydrogel di PVA morbido e duttile mediante un metodo FT convenzionale, successivamente, i campioni a forma di manubrio vengono tagliati, sottoposti a una determinata deformazione e a cicli di congelamento e scongelamento ripetuti [15].

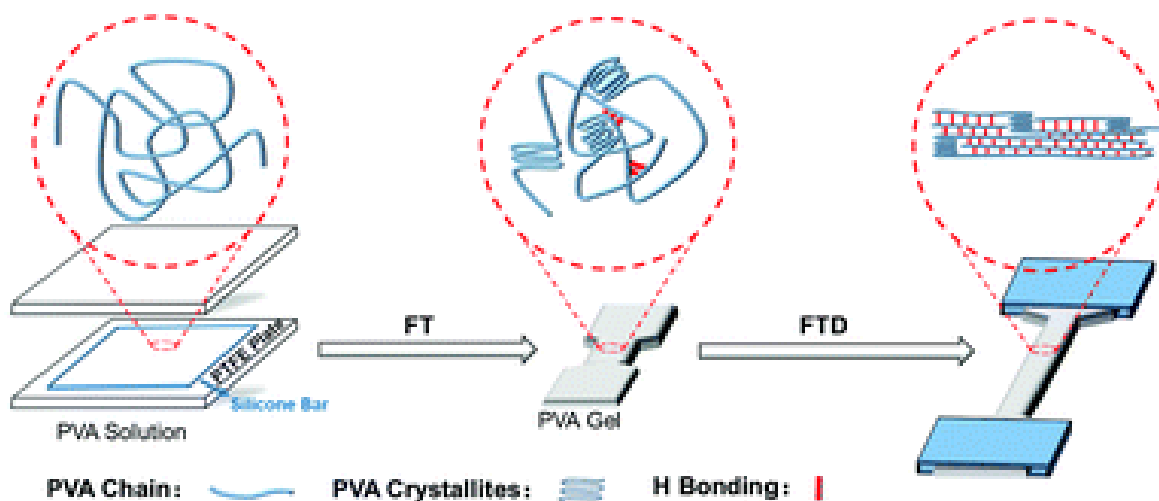


Figura 7. Presentazione schematica del processo di preparazione dell'hydrogel e del meccanismo di formazione proposto dell'hydrogel [15].

Attraverso la regolazione del rapporto di trafilatura, al numero di cicli e al contenuto di PVA, sono stati ottenuti hydrogel anisotropi con notevoli miglioramenti nelle proprietà meccaniche [15].

Infatti, le morfologie degli hydrogel di PVA liofilizzati sono state caratterizzate mediante SEM (Figura 8) e quello che è stato riscontrato è che gli hydrogel di PVA preparati con il metodo FT normale (definiti hydrogel N_x -PVA, dove "N" si riferisce al FT normale e "x" si riferisce al numero di cicli FT) mostrano strutture porose isotrope con una distribuzione casuale di pori microdimensionati, mentre i campioni di hydrogel ulteriormente trattati con il metodo FT sotto trafilatura (FTD) (definiti come idrogel $N_x D_y$ -PVA, dove "D" si riferisce a FT sotto trafilatura, "x" si riferisce al numero di cicli FT normali e "y" si riferisce al numero di cicli FTD) mostrano evidenti microstrutture anisotrope [15].

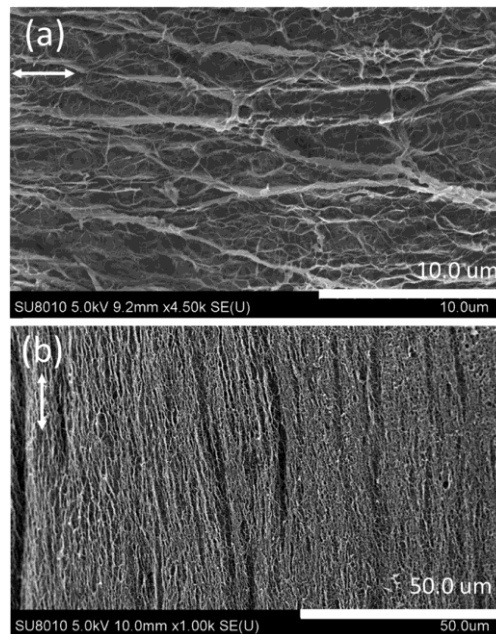


Figura 8. Micrografie SEM di campioni di hydrogel $N_2 D_1$ -PVA dalla direzione parallela. Le barre della scala sono $10\ \mu\text{m}$ (a) e $50\ \mu\text{m}$ (b). Le frecce indicano la direzione del disegno. Sono state riscontrate strutture porose orientate con pareti dei pori allineate lungo la direzione parallela alla direzione di trafilatura, simili a quelle trovate negli hydrogel PVA realizzati con il metodo di congelamento direzionale [15].

Le proprietà meccaniche degli hydrogel di PVA preparati con il metodo FTD sono state misurate mediante prove di trazione. In primo luogo, normali hydrogel N_2 -PVA con un contenuto solido del 12% in peso sono stati preparati con due cicli FT, e poi sono stati ulteriormente congelati-scongelati per cicli diversi con un rapporto di stiro fisso (R) del 100% o senza stiro. La Figura 8b mostra le tipiche curve sforzo-deformazione a trazione ($\sigma_t - \varepsilon_t$) degli hydrogel $N_2 D_y$ -PVA (\parallel) (cioè tagliato nella direzione parallela). Per confronto, sono state misurate anche le proprietà meccaniche di trazione degli hydrogel N_x -PVA preparati con il normale metodo FT (Figura 9a). L'hydrogel N_2 -PVA mostra un allungamento a rottura del 590% e uno sforzo di trazione a frattura (σ_b) di 0.67 MPa. Dopo un ciclo di FTD, le proprietà meccaniche dell'hydrogel nella direzione parallela alla direzione di trafilatura $N_2 D_1$ -PVA (\parallel) sono notevolmente migliorate, mostrando un σ_b di 2,42 MPa, circa 3.6 volte quello dell' N_2 -hydrogel PVA. Con l'ulteriore aumento del numero di cicli FTD, il σ_b aumenta e può raggiungere circa 3 MPa dopo 3 cicli FTD. Nel frattempo, per gli hydrogel N_x -PVA, le loro proprietà meccaniche vengono gradualmente migliorate con l'aumento del numero di cicli, ma il miglioramento è molto meno significativo di quello dell'hydrogel $N_x D_y$ -PVA [15].

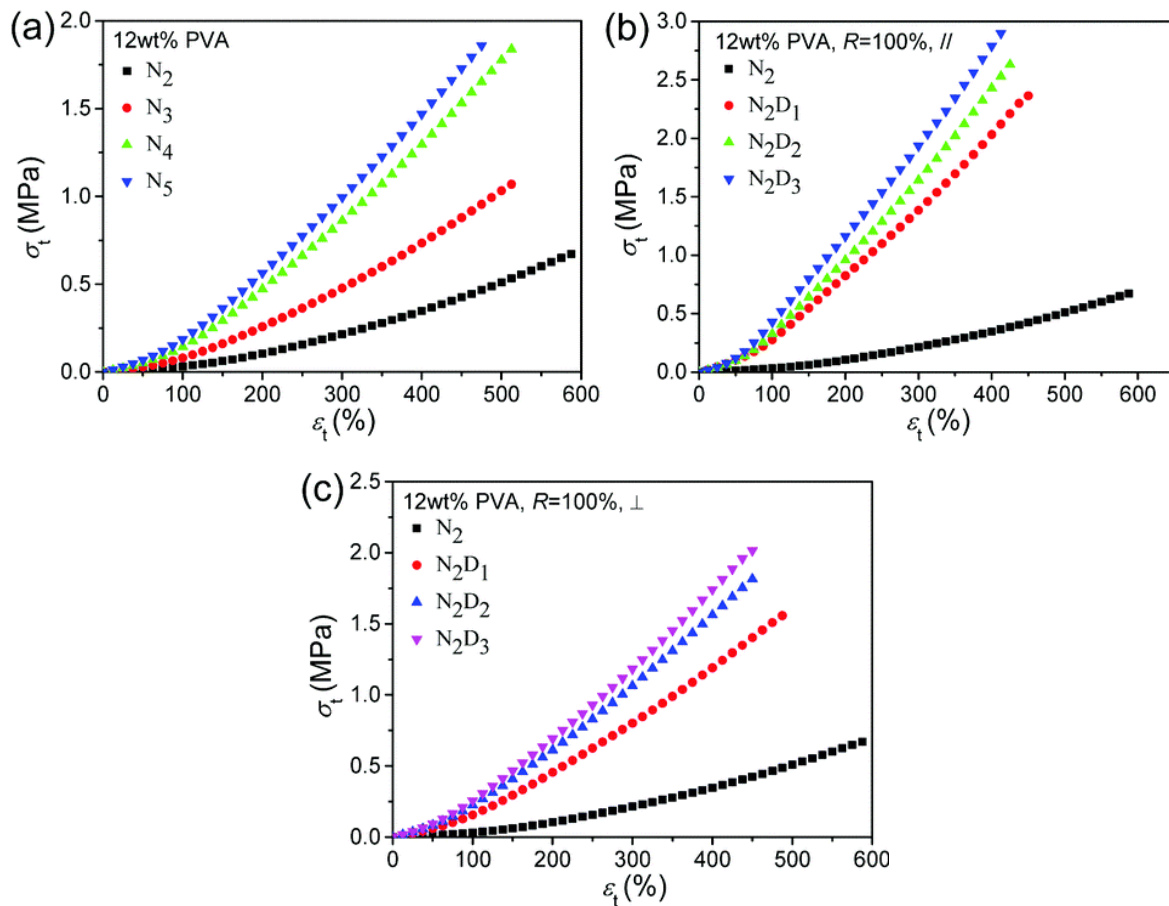


Figura 9. Curve sforzo-deformazione a trazione ($\sigma_t - \varepsilon_t$) degli hydrogel N_x -PVA (a) e degli hydrogel $N_x D_y$ -PVA nelle direzioni parallela (b) e perpendicolare (c) [15]

È interessante notare che gli hydrogel PVA trattati con il metodo FTD presentano anche proprietà meccaniche anisotrope, cioè ci sono evidenti differenze nelle proprietà meccaniche tra le direzioni parallele (Figura 9b) e perpendicolari (Figura 9c) alla direzione di trafilatura [15].

Uno dei principali limiti nell'utilizzo del PVA sotto forma di hydrogel reticolato però, risulta essere la scarsa capacità di degradarsi in ambiente biologico.

Kawai et al. [16] hanno condotto un'analisi dettagliata degli stadi e dei metodi di degradazione microbica del PVA, evidenziando come l'ossidazione parziale del PVA con permanganato di potassio ($KMnO_4$) costituisca un efficace procedimento per la produzione di impalcature con una cinetica di biodegradazione ottimizzata. Stocco et al. [17] hanno proposto l'ossidazione chimica del PVA mediante $KMnO_4$ in acido perclorico come una nuova strategia per ottenere impalcature a base di PVA caratterizzate da miglioramenti nelle proprietà biologiche, con particolare rilevanza per le applicazioni nell'ambito dell'ingegneria tissutale.

Tramite l'ossidazione, i gruppi funzionali (carbonili) vengono introdotti nello scheletro del PVA, i quali riducono la probabilità di formazione di legami idrogeno intermolecolari e conferiscono al polimero diverse proprietà, come minore cristallinità, velocità di dissoluzione più rapida e minore viscosità in ambienti acquosi [17].

Dallo studio di Stocco et al. [17] è stato riscontrato che sostituendo l'1% o il 2% di gruppi ossidrilici con gruppi carbonilici nel polimero, la cinetica di rigonfiamento e la capacità di assorbimento delle proteine dell'hydrogel di PVA sono aumentate insieme al grado di ossidazione. Ma un grado di ossidazione maggiore del 2% non è più idoneo per ottenere scaffold, dato che le soluzioni polimeriche non reticolano più.

Nel medesimo studio è stato analizzato il comportamento meccanico degli hydrogel di PVA tramite prove di trazione uniassiale e analisi DSC.

I diagrammi sforzo-deformazione sono illustrati nella Figura 10A, mentre le caratteristiche meccaniche sono riassunte nella Tabella 5.

La risposta meccanica è stata chiaramente influenzata dal trattamento di ossidazione. Si osserva che il PVA mostra una maggiore resistenza e rigidità rispetto alle sue controparti chimicamente ossidate, grazie all'implicazione di gruppi idrossilici disponibili nei legami idrogeno intra e intermolecolari [17].

La meccanica dell'hydrogel può essere modificata alterando il numero di gruppi/catene reticolabili, perciò, nella pianificazione di una strategia rigenerativa di ingegneria tissutale bisogna tener conto di questi fattori [17].

Parallelamente è stata effettuata la calorimetria differenziale a scansione (DSC), la quale ci permette di determinare il calore specifico a pressione costante: i termogrammi sono mostrati nella Figura 9B, mentre i risultati sono riepilogati nella Tabella 6 [17].

La fusione del PVA è rappresentata da un picco netto, la cui intensità diminuisce all'aumentare del grado di ossidazione (Figura 10B), ma l'ossidazione sembra influenzare sia la temperatura di fusione del PVA che il grado di cristallinità, che diminuiscono all'aumentare del contenuto di carbonile (Tabella 6) [17].

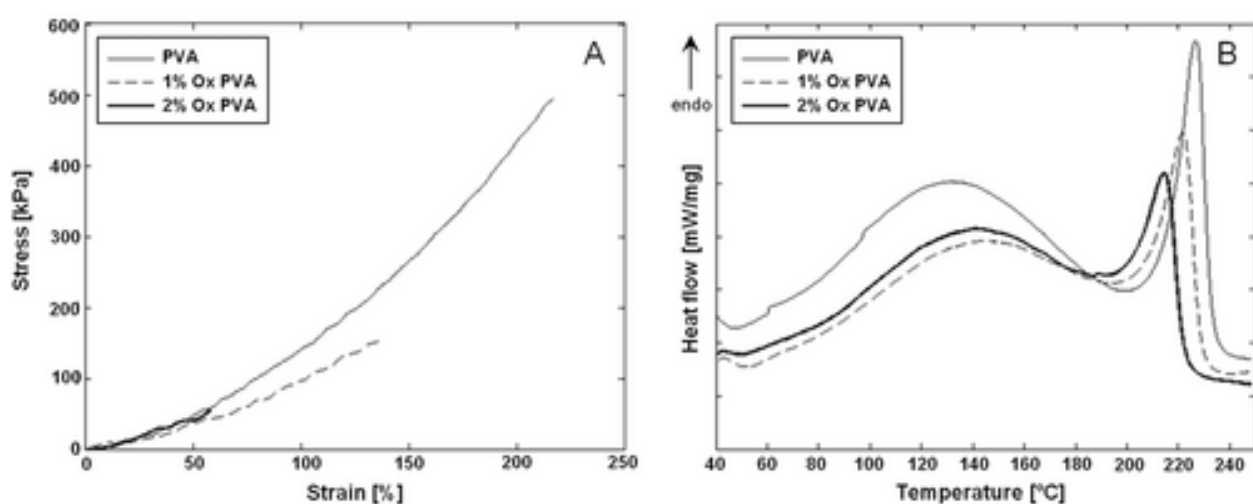


Figura 10. (A) Curve sforzo-deformazione delle prove di trazione uniassiale eseguite su PVA e PVA ossidato; (B) Termogrammi DSC di campioni di PVA e PVA ossidato; [17]

	Modulo secante (kPa)	Sforzo a rottura (kPa)	Deformazione a rottura (%)
PVA	52.0 ± 13.4	330.0 ± 116.6	192 ± 23
1% Ox PVA	42.9 ± 16.5	152.8 ± 25.8	162 ± 18
2% Ox PVA	21.5 ± 9.2	68.0 ± 18.3	78 ± 15

Tabella 5. Proprietà meccaniche dei gel PVA [17]

Dalla Tabella 5 si evince che in seguito all'ossidazione chimica, le proprietà meccaniche del PVA sono state modulate, come dimostrato dalla riduzione progressiva del modulo secante, dello sforzo a rottura e della deformazione a rottura per il PVA ossidato all'1% e al 2% [17].

	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	X_c (%)
PVA	226.8	43.1	31.1
1% Ox PVA	221.8	34.0	24.5
2% Ox PVA	214.6	25.0	18.0

Tabella 6. Proprietà termiche dei gel PVA [17]

Dalla Tabella 6 si evince invece che T_m e ΔH_m (rispettivamente la temperatura di fusione e l'entalpia) sono diminuiti leggermente insieme al grado di ossidazione, i quali indicano una graduale perdita di cristallinità, come mostrato dai valori calcolati di X_c (ovvero il grado di cristallinità) [17].

In particolare, l'analisi ha rivelato che il PVA puro manifesta una maggiore cristallinità rispetto alle sue controparti ossidate. Pertanto ci si aspetta che il PVA puro resista alla degradazione per un periodo più lungo, poiché le regioni cristalline sono intrinsecamente più resistenti all'attacco idrolitico rispetto alle regioni amorfe. Lo studio delle proprietà termiche indica che il tasso di biodegradazione è più elevato per le varianti contenenti l'1% e il 2% di PVA ossidato [17].

Stocco et al. [17] hanno illustrato la notevole flessibilità nel comportamento meccanico dei polimeri PVA ossidati. Tuttavia questo non costituisce l'unico motivo del loro ampio impiego nelle applicazioni di ingegneria tissutale. Nello stesso studio, attraverso test di rigonfiamento che esamineremo a breve, viene dimostrata la loro capacità di trasportare proteine, mantenendo allo stesso tempo biocompatibilità e biodegradabilità.

Quando una rete biopolimerica entra in contatto con una soluzione acquosa o un fluido biologico, si avvia un processo di rigonfiamento innescato dalla compatibilità termodinamica tra le catene

polimeriche e l'acqua. In questa interazione, la rete inizia a gonfiarsi, ma tale aumento di volume è bilanciato da una forza generata dalle reticolazioni presenti nella struttura della rete stessa. L'equilibrio del processo di rigonfiamento si raggiunge quando queste due forze diventano equivalenti [17].

Stocco et al. [17] hanno confrontato il comportamento degli scaffold in PVA dopo 288 ore di incubazione in soluzione PBS (ovvero una soluzione tampone salina con fosfato) con il comportamento degli scaffold in PVA ossidato all' 1% e al 2% nelle medesime condizioni.

Dal grafico in Figura 11A si evince che entrambi gli hydrogel PVA ossidati all'1% e al 2% hanno mostrato un rapporto di rigonfiamento rapido del 60% e del 110%, rispettivamente, entro 24 ore. Successivamente, i rapporti di rigonfiamento hanno decelerato fino a raggiungere un equilibrio con un aumento di massa di circa il 70% (PVA ossidato all'1%) e il 40% (PVA ossidato al 2%) dopo circa 288 ore, rimanendo poi stabili nel corso dell'esperimento [17].

Al contrario, gli hydrogel di PVA hanno mostrato rapporti di rigonfiamento diversi, aumentando in massa di circa il 20% entro 24 ore; il gonfiore è continuato, anche se a un ritmo più lento, fino al raggiungimento dell'equilibrio dopo circa 288 ore [17].

Alla fine dell'esperimento è risultato che gli scaffold ossidati sostenevano il rilascio di proteine meglio del PVA non ossidato. Inoltre, dalla Figura 11B si evince che la quantità di BSA rilasciata a 144 ore può essere considerata come la massima assorbita dagli hydrogel, poiché la cinetica di rilascio ha raggiunto una fase di plateau. Detto ciò, la capacità di carico relativa degli scaffold in PVA ossidato all'1% e in PVA ossidato al 2% era rispettivamente 2.6 e 5.6 volte superiore alla capacità di adsorbimento del PVA puro.

Per quanto riguarda la capacità di rilascio, è stato dimostrato quindi che la capacità di carico aumenta linearmente insieme al grado di ossidazione [17].

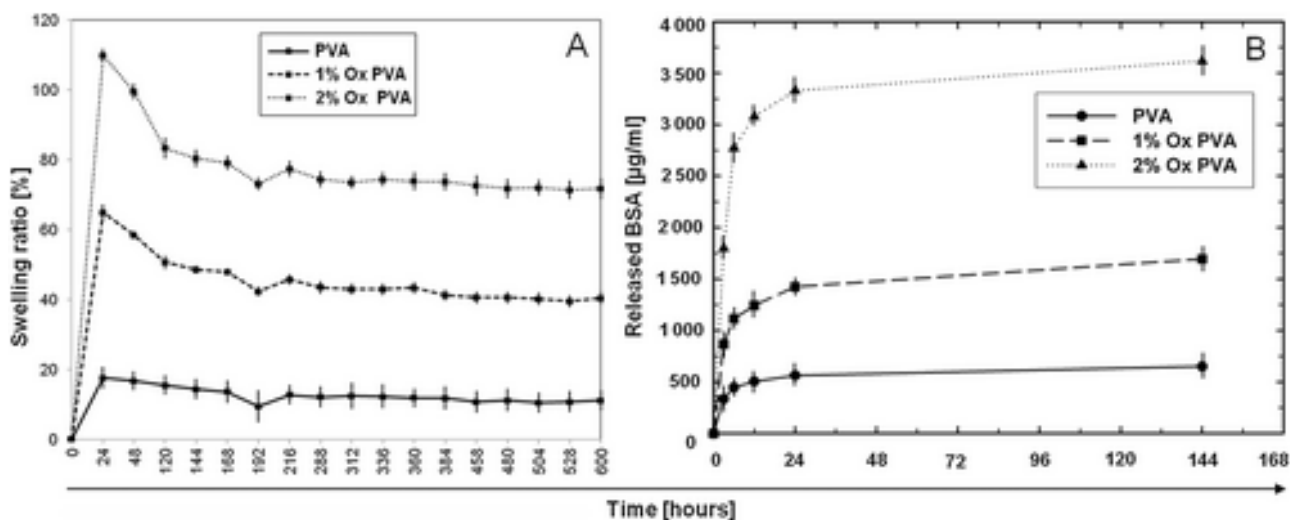


Figura 11. (A) Rapporto di rigonfiamento in funzione del tempo per PVA reticolato, hydrogel di PVA ossidato all'1% e al 2% in PBS a 37 ° C: entro 24 ore, tutti i campioni hanno mostrato il rapporto di rigonfiamento massimo; l'equilibrio è stato raggiunto dopo circa 288 ore in soluzione [17].

(B) Profili di rilascio BSA di PVA e scaffold PVA ossidati; il rilascio di proteine era maggiore per il 2% di Ox PVA e per l'1% di Ox PVA rispetto al PVA puro [17].

Nonostante i brillanti risultati ottenuti da Stocco et al. [17], l'ossidazione del PVA tramite permanganato di potassio sembra causare una perdita di viscosità del polimero, che è strettamente correlata alla degradazione del materiale per la diminuzione del suo peso molecolare medio [18].

A supporto di questo risultato, in letteratura è riportato che l'ossidazione con KMnO_4 in ambiente acido potrebbe potenzialmente causare la scissione del legame CC degli 1,2-dioli [19], i quali sono presenti nella catena del PVA.

La diminuzione della viscosità della soluzione di PVA dopo il trattamento con questo agente ossidante può derivare dalla scissione della catena principale in unità testa a testa con conseguente alterazione delle dimensioni molecolari del polimero [18].

Quindi Barbon et al. [18] hanno proposto di effettuare una ossidazione controllata del PVA tramite alogeni come bromo (Br_2), cloro (Cl_2) e iodio (I_2), i quali risultano essere meno aggressivi e di conseguenza garantirebbero una minore degradazione della dimensione molecolare del polimero.

In questa ricerca Barbon et al. [18] hanno fabbricato scaffold compositi combinando il polimero con matrici extracellulari bioattive, ovvero: fogli decellularizzati, omogeneizzati e liofilizzati di cartilagine articolare, Wharton's Jelly (tessuto connettivo gelatinoso contenuto nel cordone ombelicale e abbondante nelle cellule staminali mesenchimali) e intestino tenue sono stati reticolati al PVA, ottenendo supporti bioibridi che hanno sostenuto l'adesione e la proliferazione cellulare. Parallelamente, hanno proposto per la prima volta un metodo standardizzato per eseguire l'ossidazione chimica del PVA mediante KMnO_4 in ambiente acido, al fine di ottenere scaffold con cinetica di rigonfiamento e capacità di adsorbimento e rilascio di proteine migliorate rispetto al PVA puro, nonché con proprietà di biodegradazione regolabili che aumentano insieme al grado di ossidazione.

Nonostante OxPVA_ KMnO_4 fosse un materiale promettente utilizzato come scaffold bioassorbibile per applicazioni TE, è stata riscontrata una viscosità inferiore rispetto al PVA non ossidato: tale riduzione è stata attribuita ad alterazioni nel peso molecolare del polimero. Per comprendere questo fenomeno, è importante ricordare che il PVA commerciale è derivato dall'idrolisi del polivinilacetato (PVAc), ottenuto attraverso la polimerizzazione radicalica del monomero vinil acetato (VAc). È da notare che il controllo della stereo-selettività in tale processo non è agevole, portando all'incorporazione casuale di monomeri testa a testa anziché la prevalente inserzione testa a coda nella catena polimerica [18].

Questo implica che, dopo l'idrolisi con la rimozione del gruppo acetato, il PVA contiene alcuni gruppi 1,2-dioli che potrebbero essere facilmente scissi durante il processo di ossidazione con KMnO_4 , determinando una diminuzione del peso molecolare del polimero.

Questa ipotesi, avanzata da Barbon et al. [18], è stata confermata dalla produzione di ione IO_3^- dopo la reazione della soluzione PVA con NaIO_4 . Tale reazione ha causato la scissione selettiva del legame singolo CC che trasporta i gruppi idrossilici, consentendo agli studiosi di quantificare il contenuto di 1,2-diolo nel polimero. Ciò ha portato a una stima di diminuzione del peso molecolare medio del PVA da 154000 Da a circa 2400 Da [18].

Gli alogeni Br_2 , Cl_2 e I_2 possiedono un potenziale di ossidoriduzione standard che è sufficiente per ossidare i gruppi alcolici secondari della catena polimerica PVA in gruppi chetonici.

Barbon et al. [18] hanno standardizzato un metodo per produrre e studiare nuovi hydrogel di PVA parzialmente ossidati con gli alogeni sopra elencati, nella prospettiva di utilizzarli come scaffold sintetici per la rigenerazione tissutale.

L'analisi effettuata da Barbon et al. [18] ha rivelato che Br_2 e I_2 hanno causato la minore perdita di viscosità del PVA, risultando essere ossidanti più blandi di Cl_2 e KMnO_4 e probabilmente meno inclini alla scissione carbonio-carbonio degli 1,2-dioli, assicurando una minore alterazione di peso molecolare del PVA.

Comparando i potenziali di ossidoriduzione dei tre alogeni, emerge che I_2 è l'ossidante meno aggressivo, tuttavia l'ossidazione con I_2 richiede temperature più elevate (circa $70\text{ }^\circ\text{C}$) per prevenire la formazione di complessi I_2/PVA , che causerebbero un'agglutinazione prolungata del polimero. Al contrario, sia Br_2 che Cl_2 non formano complessi agglutinanti con PVA a temperature più basse e manifestano effetti distinti sulla viscosità della soluzione polimerica dopo l'ossidazione. In particolare, il Cl_2 , essendo un agente ossidante più forte, induce una diminuzione della viscosità del PVA simile a quella osservata nell'ossidazione mediata da KMnO_4 [18].

Barbon et al. [18] hanno in seguito eseguito la marcatura del PVA utilizzando DNPH e PABA al fine di renderlo visibile attraverso un rivelatore spettrofotometrico. L'analisi cromatografica su gel (Figura 12) ha successivamente confermato i risultati ottenuti dalle misurazioni della viscosità. Questa analisi ha rivelato che il bromo (Br_2) si comporta come l'ossidante più selettivo, consentendo di ottenere PVA parzialmente ossidato che mantiene una distribuzione dei pesi molecolari simile a quello del PVA puro.

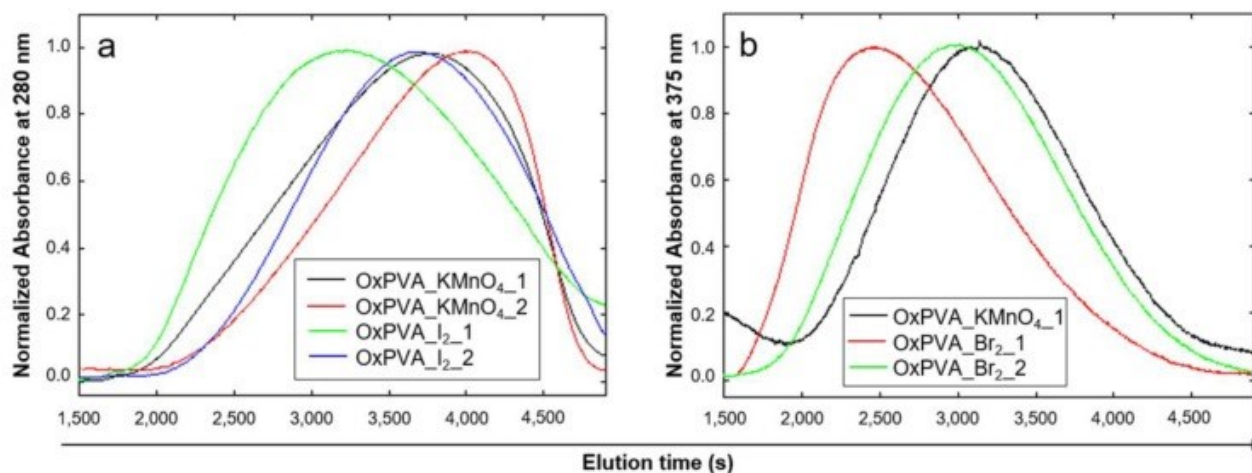


Figura 12. HPGPC di PVA ossidato. Dopo la marcatura con PABA (a) o DNPH (b), i profili di eluizione del PVA ossidato sono stati ottenuti mediante cromatografia su una colonna Superose 6TM. I profili delle bande sono stati normalizzati per facilitare il confronto [18].

Con l'obiettivo di impiegare nuovi hydrogel di PVA ossidato come strutture di supporto impiantabili per la rigenerazione dei tessuti, Barbon et al. [18] hanno condotto uno studio sulle influenze del processo di ossidazione sul comportamento meccanico dei polimeri. A tal fine, è stata eseguita un'analisi di trazione unidirezionale dalla quale è emerso un comportamento di irrigidimento non lineare, sia nel caso del PVA non trattato che in quello ossidato, all'interno dell'intervallo di deformazione specificato per questo studio. È importante notare che questo intervallo supera notevolmente quello fisiologico che qualsiasi biomateriale potrebbe incontrare in vivo.

Tuttavia, i risultati sperimentali hanno indicato che, nonostante l'ampio intervallo di deformazione applicato, i materiali non hanno manifestato cedimenti o deformazioni permanenti. In particolare, durante la fase di scarico, è stato osservato il completo recupero della lunghezza iniziale (Figura 13). Questa peculiarità assume rilevanza quando è cruciale garantire un adeguato margine di sicurezza per la resistenza del materiale [18].

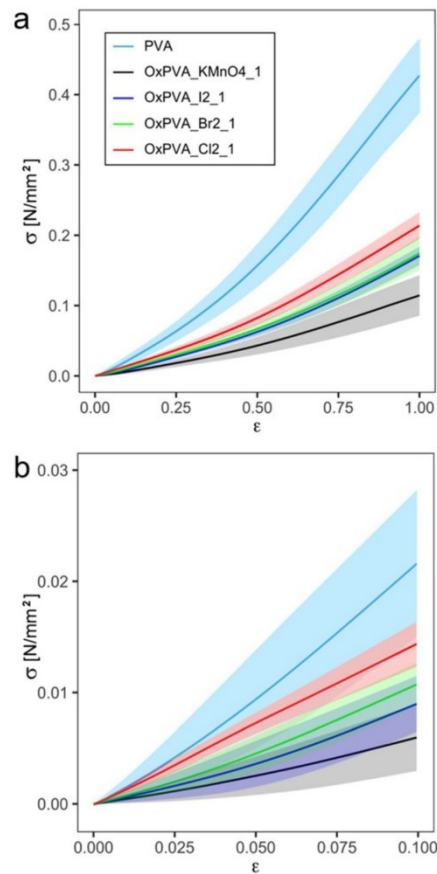


Figura 13. Risultati delle prove di trazione uniassiale di PVA e PVA ossidato, riportati in termini di sollecitazione nominale σ [N/mm²] rispetto alla deformazione nominale ϵ , sull'intervallo complessivo del test (a) e in un intervallo di deformazioni più piccolo (tra 0 e 10% di deformazione) (b) [18].

Come evidenziato dai dati del modulo elastico secante riportati nella Tabella 7, è emerso che il PVA nella sua forma pura mostra una maggiore rigidità rispetto al PVA ossidato. In particolare, l'ossidazione con KMnO₄ ha prodotto la diminuzione più significativa della rigidità, mentre l'ossidazione con Cl₂ ha avuto un impatto meno pronunciato sulle caratteristiche meccaniche del PVA. Le ossidazioni con I₂ e Br₂ hanno generato effetti molto simili in termini di modifica delle proprietà meccaniche, sebbene OxPVA_Br2_1 (linea verde della figura 13) sia risultato leggermente più rigido di OxPVA_I2_1 (linea blu della figura 13) [18].

Tuttavia, a causa della variabilità nei risultati sperimentali, si è osservata una differenza significativa tra gli scaffold di PVA ossidato, in particolare OxPVA_Cl2_1 (linea rossa figura 13) rispetto a OxPVA_KMnO4_1 (linea nera figura 13) e OxPVA_I2_1 con una deformazione del 10%, e OxPVA_KMnO4_1 rispetto a OxPVA_Br2_1 e OxPVA_Cl2_1, nonché OxPVA_Cl2_1 rispetto a OxPVA_I2_1 con una deformazione del 20% [18].

Polimero	10% di tensione applicata	20% di tensione applicata
PVA	217 ± 66	244 ± 53
OxPVA_KMnO ₄ _1	60 ± 30	70 ± 23
OxPVA_Br ₂ _1	108 ± 19	119 ± 16
OxPVA_Cl ₂ _1	144 ± 20	146 ± 19
OxPVA_I ₂ _1	90 ± 25	105 ± 12

Tabella 7. Questa tabella rappresenta il modulo elastico secante (E_s) per i polimeri elencati con la relativa deviazione standard associata. E_s viene calcolato come la pendenza della linea tracciata dall'origine del diagramma sforzo-deformazione e che interseca la curva media al 10% e al 20% di deformazione [18].

Infine, Barbon et al. [18] hanno testato la compatibilità cellulare e tissutale del PVA parzialmente ossidato, utilizzando sia modelli in vitro che in vivo. Questi test hanno esaminato le interazioni del polimero con le cellule fibroblastiche fetali umane e il tessuto sottocutaneo dei topi. I risultati del test di citotossicità in vitro hanno indicato che i fibroblasti coltivati in terreni ossidati trattati con PVA mantenevano la vitalità cellulare in modo simile alle colture non trattate e alle colture in terreni condizionati con PVA noto per essere atossico [18].

Gli esperimenti sugli animali hanno corroborato il test di coltura cellulare in vitro, dimostrando che tutti i tipi di hydrogel di PVA ossidato mantenevano un'elevata biocompatibilità e una bassa immunogenicità rispetto al PVA puro, che era stato segnalato come atossico e biocompatibile [18].

Nel complesso, questo studio sull'ossidazione del PVA mediata da alogeni, ha evidenziato che Br₂ e I₂ possono effettivamente modificare il polimero garantendo una migliore conservazione della distribuzione del peso molecolare rispetto a KMnO₄, con Br₂ che produce il miglior risultato [18].

Gli studi condotti da Barbon et al. [18] hanno concluso che, in confronto a KMnO₄, l'uso di alogeni come Br₂ può generare scaffold ossidati con una maggiore rigidità meccanica, suggerendo che potrebbero essere preferiti per la ricostruzione di tessuti che richiedono una maggiore resistenza meccanica. Inoltre, la distribuzione del peso molecolare del PVA ossidato attraverso l'utilizzo di alogeni, può garantire una struttura di rete più uniforme del polimero, influenzando così la cinetica di rilascio di proteine o farmaci assorbiti dallo scaffold [18].

3.4 Applicazioni biomediche

Gli hydrogel a base di PVA stanno attirando notevole attenzione nelle applicazioni biomediche, tra cui impianti, impalcature tissutali, medicazioni e rilascio di farmaci, grazie alle loro caratteristiche come l'alto contenuto di acqua, la biocompatibilità, la biodegradabilità, l'elevata permeabilità e le proprietà chimico-fisiche regolabili.

3.4.1 Hydrogel a base di PVA utilizzati nella cura di ferite cutanee

Le infezioni batteriche costituiscono una seria minaccia per le ferite cutanee, soprattutto nel caso delle ferite diabetiche che presentano difficoltà di guarigione. È noto che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) generate da ferite o infezioni batteriche possono compromettere ulteriormente il processo di guarigione; infatti, gli eccessivi ROS accumulati nella ferita possono non solo indurre forti reazioni infiammatorie per rendere le ferite vulnerabili, ma anche inibire le funzioni delle cellule staminali endogene e dei macrofagi per ostacolare la rigenerazione dei tessuti della ferita oltre a limitare notevolmente l'angiogenesi e portare a disfunzione endoteliale [23].

Oltre ai ROS generati dalla ferita stessa, i ROS derivanti dall'infezione batterica possono indurre danni significativi ai vasi sanguigni e alle cellule endoteliali, con conseguente formazione di ferite croniche. L'infezione batterica, in particolare nelle ferite diabetiche, può causare un'ossigenazione insufficiente e una carenza di nutrienti, aggravando la patologia. Il microambiente con iperglicemia nelle ferite diabetiche facilita l'infezione microbica, inducendo angiogenesi e disfunzione dei macrofagi, ritardando ulteriormente la guarigione. Di conseguenza, la clearance efficace dei microbi e la modulazione del microambiente della ferita sono cruciali nel trattamento delle ferite diabetiche difficili da guarire [23].

Zhao et al. [23] hanno sviluppato un hydrogel innovativo basato su PVA reticolato tramite un linker sensibile ai ROS. Questo hydrogel è progettato per eliminare i ROS, facilitando così la chiusura delle ferite mediante la riduzione dei livelli di ROS e la promozione della regolazione dei macrofagi con fenotipo M2 intorno alla ferita.

È essenziale evidenziare che l'hydrogel nella ferita ha la capacità di rilasciare agenti terapeutici, tra cui la mupirocina (un antibiotico) per l'eradicazione batterica e il fattore stimolante per la proliferazione delle colonie di granulociti-macrofagi (GM-CSF) che promuovono la rigenerazione tissutale, accelerando così la guarigione della ferita in risposta ai ROS endogeni presenti nel microambiente della ferita. Questo particolare hydrogel, caricato con farmaci, mostra potenziale nell'applicazione per il trattamento di diverse tipologie di ferite, inclusi i casi di ferite diabetiche difficili da guarire con infezione batterica, infatti, all'interno del microambiente della ferita, tale hydrogel è stato in grado di eliminare i ROS nelle ferite per promuoverne la guarigione riducendo le citochine pro-infiammatorie, aumentando la regolazione dei macrofagi del fenotipo M2 e promuovendo l'angiogenesi e la produzione di collagene [23].

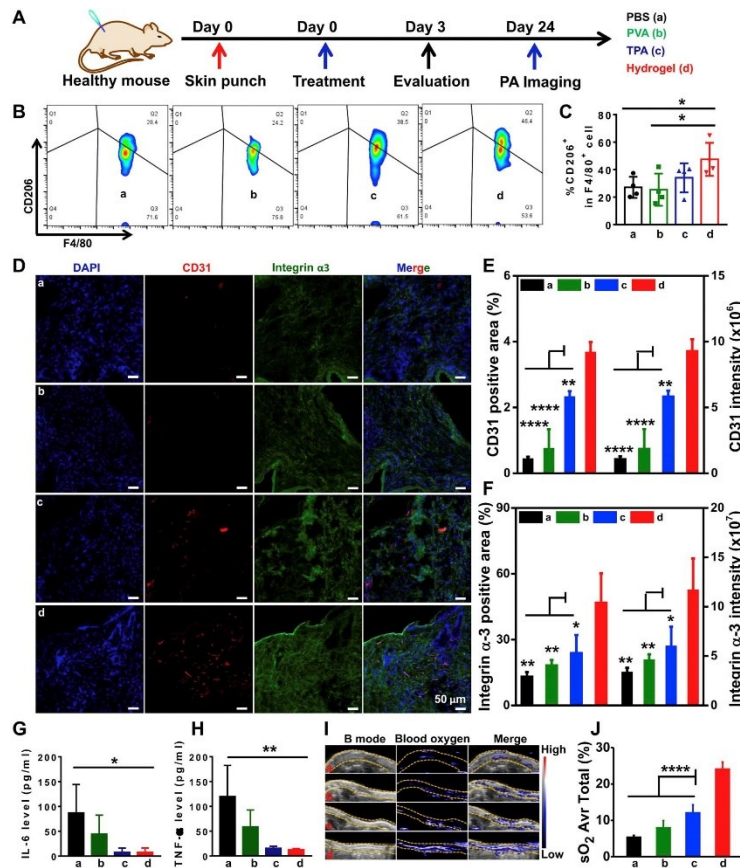


Figura 14. Cambiamenti nel microambiente della ferita indotti dall'hydrogel sensibile ai ROS. (A) Illustrazione schematica della valutazione dei cambiamenti del microambiente della ferita. (B&C) Dati rappresentativi della citometria a flusso (B) e risultati statistici (C) per determinare i cambiamenti dei macrofagi del fenotipo M2 nelle ferite. Le cellule F4/80⁺ CD206⁺ sono state definite come macrofagi del fenotipo M2. (D-F) Immagini rappresentative di immunofluorescenza (D) e dati statistici (E&F) di sezioni a doppia colorazione CD31 e integrina $\alpha 3$ di diversi gruppi al giorno 3. (G&H) IL-6 (G) e TNF- α (H) produzione intorno alla ferita in tutti i gruppi al giorno 3. (I&J) Immagini fotoacustiche rappresentative (I) e quantificazione (J) della saturazione di ossiemoglobina nel tessuto della ferita neonatale al giorno 24 [23].

In questo studio, Zhao et al. [23] hanno effettuato dei test su topi sani (Figura 14) e topi diabetici ed è stato riscontrato che tale hydrogel, in grado di eliminare i ROS da solo, potrebbe ridurre l'infiammazione, diminuire la secrezione di varie citochine pro-infiammatorie, aumentare la percentuale di macrofagi del fenotipo M2 e innescare la produzione di nuovi vasi sanguigni e collagene attorno alla ferita, in modo da favorire la guarigione in entrambi i soggetti.

Inoltre, è noto che le ferite sono spesso accompagnate da infezioni batteriche, pertanto, questo lavoro fornisce un hydrogel (in grado di eliminare i ROS) caricato con diversi contenuti terapeutici, per un'efficace rigenerazione delle ferite in varie condizioni complesse, particolarmente promettente per il trattamento di ferite difficili da guarire come le ferite diabetiche infette. Infatti, l'hydrogel caricato con l'antibiotico mupirocina e la citochina GM-CSF potrebbe rilasciare quelle molecole terapeutiche in risposta ai ROS endogeni della ferita. Inoltre, eliminerebbe l'infezione da Sau

(stafilococco aureo) nella ferita e accelererebbe ulteriormente la rigenerazione della ferita, sia nei topi normali che nei topi diabetici con infezione da Sau (Figura 15 e 16) [23].

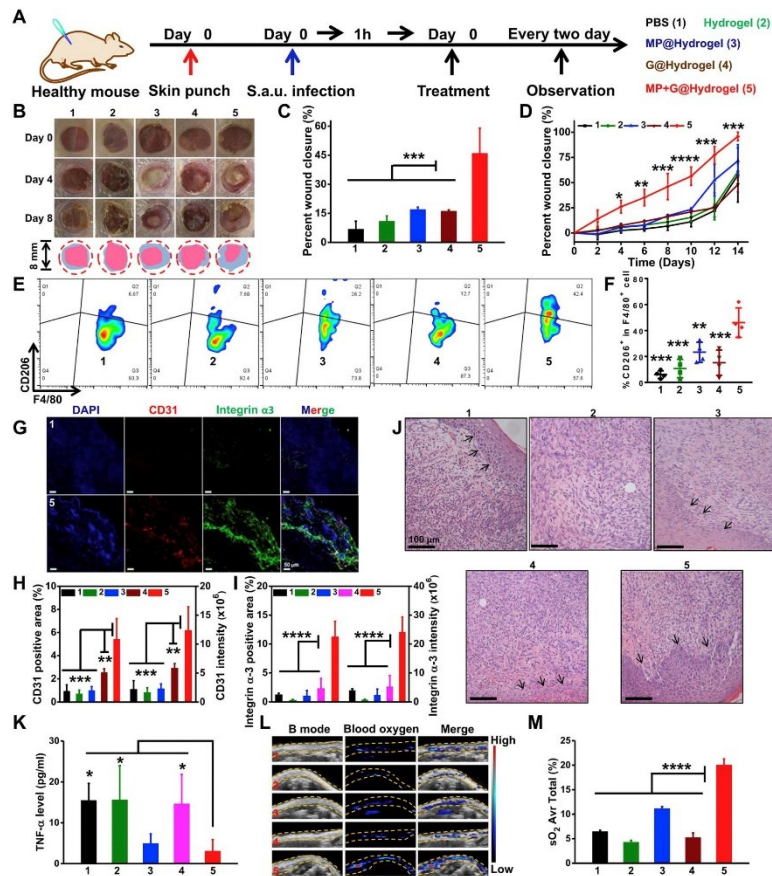


Figura 15. Guarigione delle ferite *in vivo* per topi affetti da infezione da Sau. (A) Schema che mostra il processo delle ferite trattate con varie formulazioni di hydrogel. (B) Immagini rappresentative delle ferite sotto infezione da Sau ai giorni 0, 4 e 8 dopo la ferita. Il confine della ferita al giorno 0 e al giorno 8 dopo la ferita è sovrapposto all'immagine. (C) Quantificazione della chiusura della ferita in topi sani sottoposti a infezione al giorno 8 dopo la ferita per tutti i gruppi. (D) Quantificazione del processo di guarigione della ferita in caso di infezione per tutti i gruppi. (E&F) Risultati rappresentativi della citometria a flusso (E) e dati statistici (F) per i cambiamenti dei macrofagi del fenotipo M2 nelle ferite infette al giorno 3. (G–I) Dati rappresentativi dell'immunofluorescenza (G) e risultati statistici di CD31 (H) e sezioni colorate con integrina $\alpha 3$ (I) al giorno 3. (J) Colorazione H&E delle sezioni della ferita in tutti i gruppi al giorno 3. Lo spessore del tessuto rigenerante mostra la guarigione della ferita. La nota delle frecce nere indicava i tessuti neonati. (K) Le concentrazioni di TNF- α attorno alle ferite in tutti i gruppi al giorno 3. (L&M) Immagini fotoacustiche rappresentative (L) e dati di quantificazione (M) dell'emoglobina ossigenata di diversi gruppi al giorno 24 [23].

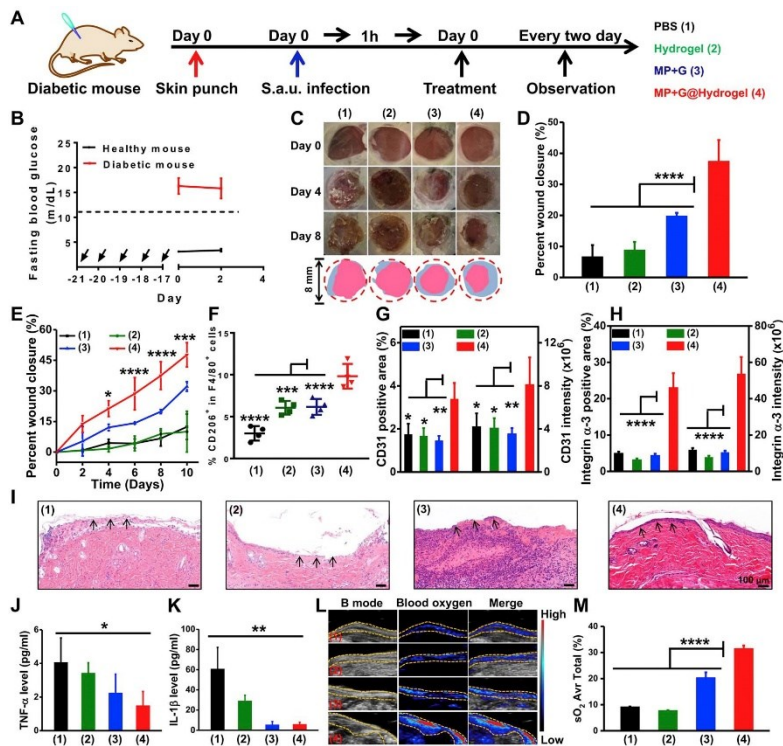


Figura 16. Guarigione delle ferite *in vivo* nei topi diabetici affetti da infezione da Sau. (A) Schema che mostra il processo di trattamento delle ferite diabetiche infette con varie formulazioni di hydrogel. (B) Livelli di glucosio nel sangue a digiuno per confermare il modello diabetico. (C) Dati rappresentativi delle ferite diabetiche sotto infezione da Sau ai giorni 0, 4 e 8 dopo la ferita. Il confine della ferita al giorno 0 e al giorno 8 dopo la ferita è sovrapposto all'immagine in basso. (D) Quantificazione della chiusura della ferita nei topi diabetici infetti al giorno 8 dopo la ferita per tutti i gruppi. (E) Percentuali di guarigione della ferita entro 10 giorni dopo la ferita in caso di infezione per tutti i gruppi. (F) I dati statistici per i cambiamenti del macrofago del fenotipo M2 nella ferita diabetica infetta al giorno 3. (G&H) I risultati statistici di CD31 (G) e dell'integrina $\alpha 3$ (H) nelle fette colorate con immunofluorescenza al giorno 3. (I) Colorazione H&E delle ferite in tutti i gruppi al giorno 3. La nota delle frecce nere indicava i tessuti neonati. (J&K) Le concentrazioni di TNF- α (J) e IL-1 β (K) attorno alle ferite in tutti i gruppi al giorno 3. (L&M) Immagini fotoacustiche rappresentative (L) e quantificazione (M) della saturazione di ossiemoglobina da diversi gruppi a giorno 24 [23].

3.4.2 Hydrogel a base di PVA come cartilagine artificiale

Sempre nell'ambito della rigenerazione tissutale, un altro utilizzo degli hydrogel a base di PVA prodotti con metodo FT consiste nella produzione di cartilagine artificiale.

I danni legati alla cartilagine come l'artrosi iniziano da lesioni fisiche e malattie degenerative delle articolazioni. A causa del basso flusso sanguigno e della scarsa vascolarizzazione, il trattamento e la guarigione di tali lesioni sono difficili e richiedono la sostituzione dell'articolazione con un biomateriale che sia biocompatibile, resistente all'usura, in grado di assorbire gli urti, che abbia un basso coefficiente d'attrito e che sia flessibile e ben lubrificato. Per questo motivo la scelta di questo biomateriale è ovviamente ricaduta sugli hydrogel a base di PVA [12].

Un impianto di due anni di hydrogel a base di PVA con metodo FT come menisco artificiale nei conigli ha dimostrato che i gel rimangono intatti senza degradazione, frattura o perdita di proprietà (Figura 17) [12].

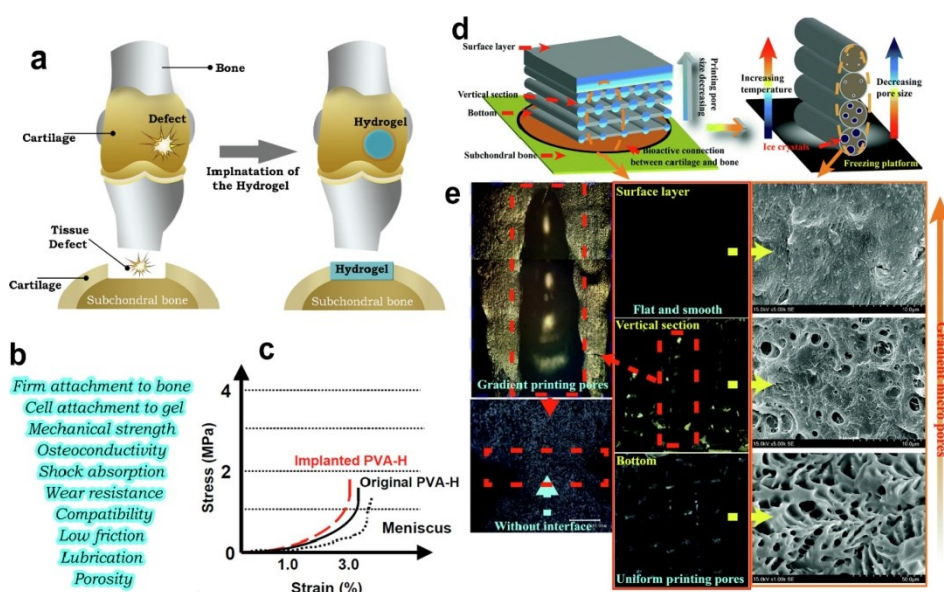


Figura 17. hydrogel FT PVA come cartilagine artificiale. (a) Rappresentazione schematica della sostituzione della parte danneggiata con hydrogel PVA. (b) Il requisito per l'impianto di un hydrogel. (c) Curve di compressione-deformazione del menisco artificiale FT PVA prima e dopo l'impianto e confronto con il menisco naturale umano. (d) Progettazione di cartilagine artificiale a base di PVA con una struttura porosa a gradiente. L'aumento della temperatura nella fase di congelamento diminuisce la porosità. (e) Fotografia digitale e micrografie SEM delle cartilagini a base di PVA, che mostrano la porosità gradiente [12].

Nonostante le similitudini con le cartilagini, gli hydrogel FT PVA mostrano carenze nelle loro proprietà meccaniche e presentano lacune nell'ambito dell'osteoconduttività, dell'assorbimento proteico e dell'adesione cellulare. Tuttavia, queste problematiche possono essere affrontate mediante l'aggiunta di (n)HAp, ossia l'idrossiapatite. Questo composto è in grado di stabilire legami robusti sia con l'osso sia con le proteine costituenti dell'osso, come l'osteopontina, la quale riveste un ruolo fondamentale nella differenziazione e nella biomineralizzazione degli osteoblasti [12].

Gli studi hanno evidenziato una migliore capacità osteoconduttiva negli hydrogel composti PVA/HAp, poiché in vitro hanno mostrato mineralizzazione in un fluido corporeo simulato, formando depositi di idrossil-carbonato-apatite simili a tessuto osseo. Inoltre, l'impianto di tali gel nelle ginocchia dei conigli per 3 mesi, ha dimostrato un forte legame con i tessuti circostanti, contribuendo efficacemente alla riparazione dei difetti della cartilagine articolare. È stato osservato anche un incremento del tessuto simile all'osso e della proliferazione dei condrociti attorno al gel, con l'ulteriore beneficio dell'assenza di degenerazione della cartilagine [12].

Nonostante approfonditi studi, resta tuttavia una sfida la limitata migrazione e adesione delle cellule, ascrivibile all'inerzia e alla mancanza di controllo sulla porosità del PVA. Tale condizione potrebbe comportare un livello insufficiente di calcificazione e un allentamento o distacco dall'osso sottostante, compromettendo l'integrazione del dispositivo con i tessuti circostanti e riducendone la compatibilità [12].

3.4.3 Hydrogel a base di PVA nella produzione di stent

Gli hydrogel FT PVA offrono ampie possibilità di progettazione di stent di vario tipo, grazie alla loro elasticità e biocompatibilità. Questi includono stent biliari endoscopici, stent cardiovascolari e persino stent per valvole cardiache artificiali. Per queste ultime, si è condotta una modellazione dettagliata dei lembi valvolari basata sulle valvole naturali. Attualmente, le valvole aortiche protesiche di origine suina o bovina rappresentano la scelta più comune, ma spesso presentano problemi di calcificazione o guasto meccanico, limitando la loro durata a circa 15 anni. D'altra parte, le valvole meccaniche possono durare per tutta la vita, ma richiedono l'assunzione a vita di anticoagulanti. Tuttavia, regolando i parametri dei FT, è stato possibile ottenere proprietà meccaniche delle valvole basate su PVA in grado di eguagliare quelle della radice aortica suina sotto pressione fisiologica [12].

Attraverso tecniche di stampaggio a iniezione, sono stati prodotti con successo stent per valvole cardiache artificiali con la forma e la geometria desiderate (Figura 18a). In particolare, un'altra metodologia di stampaggio a iniezione ha permesso di realizzare valvole cardiache capaci di essere temporaneamente compresse in una sfera, agevolando così il loro inserimento attraverso un'incisione a forma di buco della serratura nella cavità toracica, durante interventi di sostituzione valvolare tramite chirurgia a torace chiuso (Figura 18b). Questa capacità di compressione temporanea consente alla valvola di espandersi in modo sincrono con l'aorta durante la sistole, quando la valvola è aperta [12].

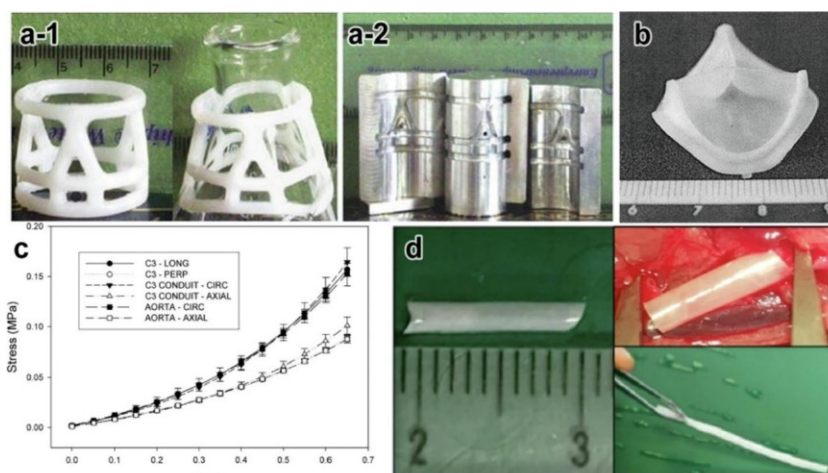


Figura 18. Hydrogel a base PVA per stent e vasi artificiali. (a) Preparazione di stent per valvole cardiache artificiali con forma e geometria desiderabili. (1) La forma dello stent espandibile della valvola cardiaca in stato normale e deformato. (2) Lo stampo a iniezione in quattro parti. (b) Una valvola cardiaca fabbricata con hydrogel PVA che integra in un'unica parte i 3 lembi, lo stent e l'anello di sutura. (c) Confronto delle curve di trazione per il condotto PVA con l'aorta suina. I condotti sono stati preparati mediante ciclo 1F-T, seguito da stretching al 75% e infine altri 3 cicli FT (d) Tubo in PVA con lunghezza di 1 cm e manipolazione degli innesti per la sostituzione vascolare a livello dell'aorta addominale è stato facile e senza collasso del lume [12].

Nel tentativo di sviluppare condotti vascolari per interventi di bypass coronarico, gli hydrogel FT PVA sono stati modellati per assumere la forma di condotti vascolari. Questi condotti sono stati progettati con precisione per rispecchiare le proprietà di trazione dell'aorta suina sia nella direzione circonferenziale che in quella assiale (Figura 18c). È importante notare che i tessuti aortici, costituiti principalmente da elastina e collagene, mostrano una resistenza meccanica non lineare anisotropa, con un modulo elastico maggiore nella direzione circonferenziale rispetto a quella assiale. Per ottenere una simile risposta anisotropa, i gel sono stati sottoposti a uno stiramento del 75% della loro deformazione iniziale dopo il primo ciclo di FT, quando hanno acquisito sufficiente integrità [12].

Nonostante gli sforzi protratti nel tempo, i materiali sintetici per la sostituzione e l'innesto dei vasi, rimangono limitati. Di conseguenza, gli interventi chirurgici continuano a dipendere dall'utilizzo della vena safena del paziente, che purtroppo presenta un alto tasso di fallimento. Tale fallimento, sia per gli innesti protesici che per quelli autologhi, è principalmente dovuto a una scarsa endotelizzazione, che può portare a trombosi, calcificazione, iperplasia intimale (proliferazione anomala di cellule) e aterosclerosi [12].

Gli hydrogel a base di PVA, grazie alle loro caratteristiche, mostrano un notevole potenziale come innesti vascolari. Ad esempio, Atlan et al. [25] hanno prodotto protesi aortiche per ratti utilizzando un hydrogel composto da PVA miscelato con gelatina, con uno spessore di 400 μm e un diametro di 1.4 mm. Per la gelificazione, è stato applicato un singolo ciclo di FT insieme all'uso di un reticolante chimico (trimetafosfato di sodio), garantendo la forza necessaria per l'applicazione del vaso e la tenuta della sutura (Figura 18d). Tuttavia, il tasso di fallimento dell'innesto dopo due mesi è stato del 50%, attribuibile a un cambiamento nelle proprietà meccaniche, mettendo in evidenza le sfide degli hydrogel di PVA prodotti mediante FT in termini di stabilità longitudinale per questa specifica applicazione [12].

La causa comune di fallimento può essere attribuita alla scarsa endotelizzazione ed emocompatibilità degli hydrogel a base di PVA. Si è riscontrato che l'aggiunta di gelatina risulta particolarmente efficace nel contrastare tali problemi rispetto al chitosano o all'amido [12].

3.4.4 Hydrogel a base di PVA nella produzione di lenti a contatto morbide

Tra le sue molte applicazioni, il PVA è molto utilizzato in ambito ottico nella produzione di lenti a contatto morbide trasparenti grazie alla sua facile lavorabilità, alla sua natura idrofila e alla sua buona capacità di formare membrane [19]. Recentemente, lo studio sulla foto ed elettroluminescenza nei polimeri biodegradabili sta aumentando ampiamente a causa delle loro ampie applicazioni nei diodi emettitori di luce, apparecchi optoelettronici ed elettronici, celle fotovoltaiche, biocatalizzatori, biosensori e membrane per la raccolta della luce [19].

Inoltre, il PVA offre elevata rigidità dielettrica, buona capacità di immagazzinamento della carica e proprietà elettriche e ottiche dipendenti dal drogante. Le numerose applicazioni esistenti e potenziali del PVA in vari settori hanno stimolato lo studio completo del PVA da parte di ricercatori di tutto il mondo. Diverse metodologie sono state impiegate per modificare le proprietà strutturali, ottiche, elettriche e termomeccaniche del PVA. Questi metodi includono salinizzazione, elettrofilatura, ossidazione elettrochimica, colata di soluzioni, precipitazione per immersione e il metodo sol-gel [19].

I gel trasparenti di PVA, comunemente usati nella produzione di queste lenti, possono essere ottenuti tramite variazioni nei parametri di gelificazione durante i cicli FT. Per esempio, l'uso di un adeguato co-solvente come il glicerolo o il DMSO, oppure l'applicazione di almeno 30 cicli di FT a una temperatura di 0 °C, ha prodotto gel di PVA altamente trasparenti.

È stato determinato che il contenuto ottimale di DMSO per una trasparenza ottimale è del 60-80% in peso. La trasparenza dei gel non è stata influenzata dalla rimozione del DMSO tramite dialisi dopo la formazione del gel. Questi gel mostrano eccellenti proprietà autoportanti, flessibilità, rigidità, biocompatibilità e, soprattutto, capacità di blocco dei raggi UV (Figura 19a e 19c). La loro flessibilità e resistenza consentono anche la suturazione dei gel (Figura 19d).

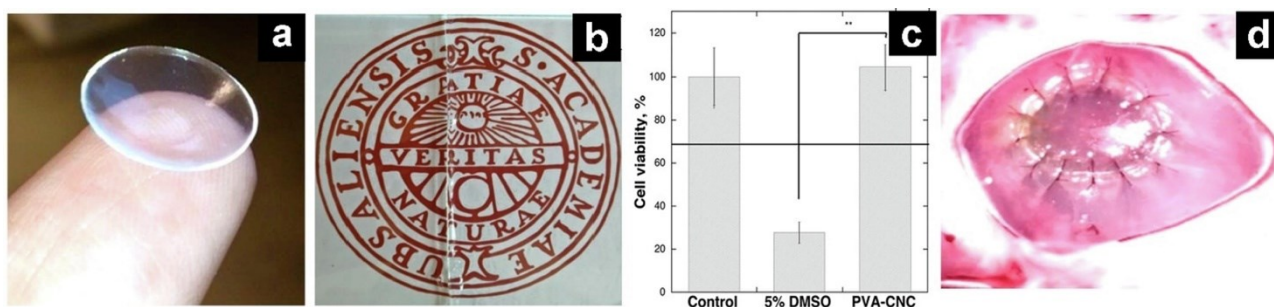


Figura 19. Applicazione dei gel PVA trasparenti a base FT per lenti a contatto. (a) Autoportante (b) trasparenza, (c) biocompatibilità e (d) impianto ex vivo dei gel mediante sutura sulla cornea suina. CNC sta per whiskers di nanocellulosa carbossilata dove la sua aggiunta ai gel ha migliorato le proprietà meccaniche, pur mantenendo l'elevata trasparenza ottica [12].

I gel FT PVA caricati con HAp, grafite e idrossietilcellulosa sono stati sfruttati anche per l'applicazione di cornea artificiale. È stato dimostrato che questi additivi migliorano l'adesione cellulare. I gel compositi erano circondati da un gel PVA trasparente come nucleo [12].

Le lenti commerciali sono per lo più basate su poli(idrossi-etil-metacrilato) (pHEMA) e hydrogel di silicone e hanno un contenuto di acqua compreso tra il 30 e l'80%. Comfort, sicurezza, elevata chiarezza ottica, proprietà meccaniche adeguate, elevata permeabilità all'ossigeno e contenuto di acqua, sono parametri importanti per le lenti a contatto e devono essere controllati con precisione. Le proprietà dei gel a base di FT PVA possono essere facilmente regolate modificando i parametri di gelificazione, presentando così prospettive promettenti per lo sviluppo di lenti a contatto di prossima generazione. Tuttavia, sono ancora necessari sforzi particolari per migliorare ulteriormente la trasparenza del gel e mantenerne la stabilità nel tempo, in particolare in termini di rigonfiamento [12].

3.4.5 Hydrogel a base di PVA come vettore nel rilascio controllato di farmaci

Il rilascio controllato di farmaci è una strategia praticabile specificatamente per l'applicazione della medicazione delle ferite. Il processo di FT consente il caricamento efficace di composti terapeutici sensibili e degradabili negli hydrogel di PVA per un rilascio lento e prolungato [12].

Nella cura del cancro, la chemioterapia è il trattamento più frequentemente utilizzato mirato all'eliminazione delle cellule a crescita rapida, a rallentare la progressione della malattia e la formazione di metastasi. Tuttavia, i farmaci chemioterapici non solo bersagliano le cellule tumorali ma attaccano anche quelle sane, presentando una sfida significativa per una diagnosi accurata e l'efficacia del trattamento. Di conseguenza, approcci mirati alla somministrazione locale di farmaci chemioterapici, attraverso un processo di incapsulamento del farmaco con reattività controllata a stimoli bio-correlati, concentrazione sostenuta nel sito tumorale ed elevata efficacia terapeutica con minimi effetti collaterali, risultano cruciali nel trattamento di questa malattia [24].

Gli hydrogel sensibili agli stimoli, che consentono una somministrazione selettiva di farmaci per una terapia altamente efficace, sono oggetto di studio grazie alla loro capacità di rispondere a stimoli esterni come ultrasuoni, pH, temperatura, luce, enzimi e specie reattive dell'ossigeno.

Wu et al. [24], ispirandosi all'ambiente acido del tumore, hanno sviluppato hydrogel polimerici basati su legami covalenti reversibili sensibili al pH o interazioni supramolecolari per creare sistemi intelligenti per il rilascio di farmaci antitumorali.

Sebbene i polimeri naturali siano preferibili nelle applicazioni biomediche, la loro debole resistenza meccanica ne limita lo sviluppo. I polimeri sintetici biocompatibili risultano più desiderabili, possedendo proprietà meccaniche migliorate, struttura controllata ed eccellente reattività agli stimoli.

Il polietilene immide (PEI), un polimero polielettrolitico idrosolubile con ammine primarie, secondarie e terziarie, è stato esplorato come potenziale vettore per la somministrazione bioterapeutica. I gruppi amminici altamente reattivi sono suscettibili di ricevere protoni in base al pH ambientale e possono essere facilmente modificati con gruppi funzionali. Inoltre, la modifica ridurrebbe il numero di gruppi amminici sulla spina dorsale, minimizzando la citotossicità del PEI ramificato e conferendogli una natura biocompatibile [24].

Il PEI ramificato funzionalizzato con acido fenilboronico (PBA-PEI) è stato generato attraverso una semplice strategia di sintesi. La formazione e la rottura della rete di hydrogel sono state concepite basandosi su legami estere borato sensibili al pH, formatisi dall'interazione reversibile tra acido borico e dioli. Di conseguenza, Wu et al. [24] hanno scelto il PVA biocompatibile, ricco di gruppi dioli.

L'hydrogel supramolecolare con eccellente iniettabilità è stato ottenuto mediante la semplice miscelazione di PBA-PEI e PVA. La resistenza meccanica è stata ulteriormente migliorata attraverso cicli di FT, le proprietà fisico-chimiche dell'hydrogel in condizioni di pH fisiologico, acido e basico sono state caratterizzate sistematicamente, i legami covalenti dinamici dei gel sono stati confermati dal reometro e infine, Wu et al. [24] hanno condotto un'indagine sull'efficacia della somministrazione dei farmaci e sulla citotossicità dei trasportatori (Figura 20).

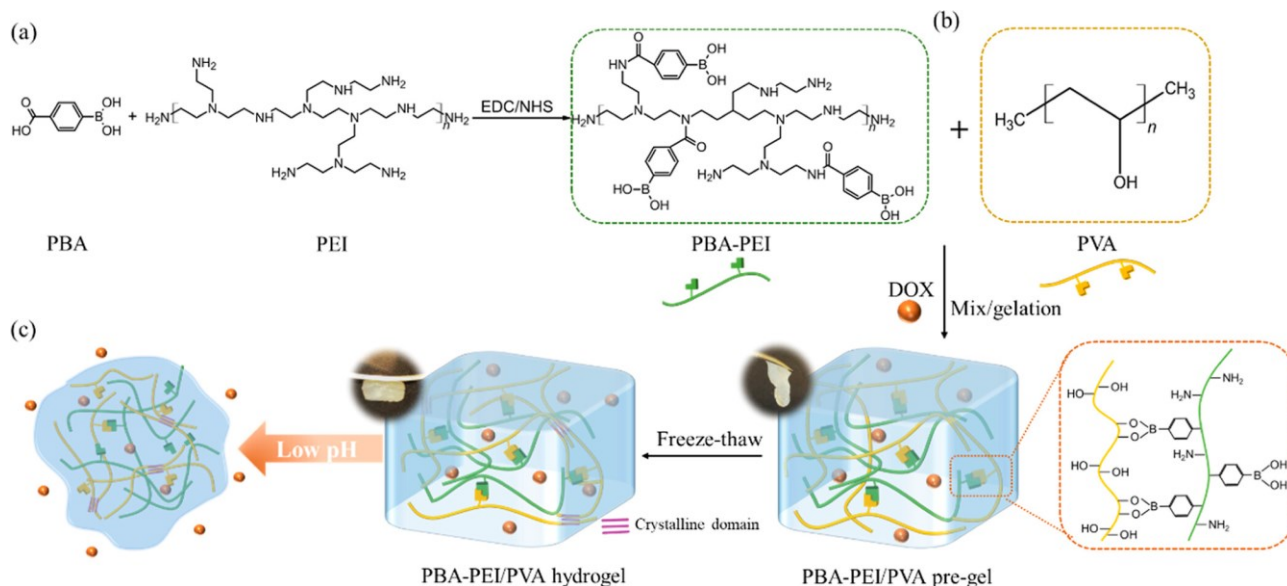


Figura 20. Illustrazione schematica di (a) sintesi di PBA-PEI, (b) preparazione dell'hydrogel PBA-PEI/PVA e (c) processo di caricamento e rilascio del farmaco [24].

Sono state acquisite delle immagini al microscopio per osservare il rigonfiamento e il restringimento dell'hydrogel. L'analisi delle micrografie a diversi valori di pH ha mostrato una diminuzione significativa delle dimensioni dei pori all'aumentare del pH, coerentemente con i risultati relativi al rigonfiamento dell'idrogel (Figura 21a, 21b e 21c) [24].

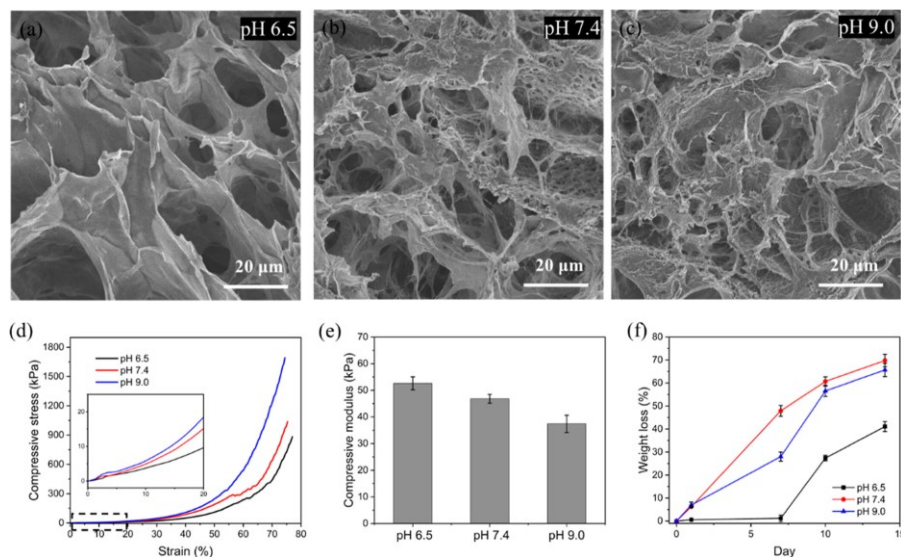


Figura 21. (a-c) Immagini SEM dell'idrogel immerso in una soluzione tampone con valori di pH di 6.4, 7.5 e 9.0. (d) sollecitazione di compressione e (e) modulo di compressione del gel conservato in condizioni diverse. (f) Degradazione dell'idrogel conservato in diverse soluzioni [24].

Wu et al. [24] hanno condotto un'analisi dei dati che evidenzia un miglioramento delle proprietà meccaniche, sono stati misurati lo stress di compressione e il modulo di compressione, all'aumentare del pH, in linea con il comportamento di rigonfiamento dell'hydrogel. Lo stress di compressione dell'hydrogel al 70% di deformazione è stato osservato essere 461.87, 636.57 e 1231.91 kPa a pH 6.5, 7.4 e 9.0, rispettivamente (Figura 21d). I moduli di compressione sono aumentati da 37.39 a 52.61 kPa nel range di pH da 6.5 a 9.0, come evidenziato nella Figura 21e.

La stabilità a lungo termine dell'hydrogel è stata valutata dagli studiosi tramite monitoraggio della perdita di peso del gel conservato in condizioni diverse per un periodo di 2 settimane. Come riportato nella Figura 20f, è stata osservata una significativa diminuzione del peso dei gel nelle soluzioni neutre e basiche dopo 1 settimana, con circa il 70% del loro peso iniziale perso entro 2 settimane. Questa perdita di peso è attribuibile alla degradazione dell'hydrogel PVA nel tempo [24]. Complessivamente, gli hydrogel supramolecolari appena trattati si sono dimostrati vantaggiosi per la loro preparazione agevole, bassa tossicità, notevole reattività al pH del microambiente tumorale ed efficacia significativa nella somministrazione dei farmaci, suggerendo un grande potenziale nel trattamento del cancro [24].

4. CONCLUSIONI

Come si è visto, l'utilizzo di hydrogel a base di alcool polivinilico permette di ottenere biomateriali con proprietà desiderabili, come biocompatibilità, biodegradabilità, non-tossicità, e adatti a molte applicazioni in ambito biomedico [6]. Il PVA presenta notevoli caratteristiche fisiche, tra cui viscosità, capacità di formare pellicole, potere emulsionante, forza adesiva, resistenza alla trazione e flessibilità. Inoltre, manifesta una notevole resistenza all'acqua, all'olio, al grasso e ai solventi [16].

Per questo motivo, gli hydrogel a base di PVA trovano applicazione negli ambiti più disparati che variano dalle medicazioni, alla rigenerazione tissutale, alla produzione di stent cardiaci e lenti a contatto morbide, per arrivare alla somministrazione di farmaci.

In sintesi, questi biomateriali mostrano applicazioni molto promettenti in vari ambiti biomedici anche se ci sono ancora degli ostacoli da superare per poter arrivare a un loro uso più comune.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Hoffman Allan S., Hydrogels for biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 64, Supplement, 18-23. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.010, 2012
- [2] Cao H., Duan L., Zhang Y., Cao J., Zhang K., Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity, *Signal Transduct Target Ther.* 2021 Dec 16;6(1):426. doi: 10.1038/s41392-021-00830-x. PMID: 34916490; PMCID: PMC8674418.
- [3] Enrica Caló, Vitaliy V. Khutoryanskiy, Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products, *European Polymer Journal*, Volume 65, 2015, Pages 252-267, ISSN 0014-3057
- [4] Jin SG. Production and Application of Biomaterials Based on Polyvinyl alcohol (PVA) as Wound Dressing. *Chem Asian J.* 2022 Nov 2;17(21):e202200595. doi: 10.1002/asia.202200595. Epub 2022 Sep 19. PMID: 36066570.
- [5] Son Van Nguyen, Bong-Kee Lee, PVA/CNC/TiO₂ nanocomposite for food-packaging: Improved mechanical, UV/water vapor barrier, and antimicrobial properties, *Carbohydrate Polymers*, Volume 298, 2022, 120064, ISSN 0144-8617.
- [6] C.C DeMerlis, D.R Schoneker, Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA), *Food and Chemical Toxicology*, Volume 41, Issue 3, 2003, Pages 319-326, ISSN 0278-6915
- [7] Chen T, Brial C, McCarthy M, Warren RF, Maher SA. Synthetic PVA Osteochondral Implants for the Knee Joint: Mechanical Characteristics During Simulated Gait. *Am J Sports Med.* 2021 Sep;49(11):2933-2941. doi: 10.1177/03635465211028566. Epub 2021 Aug 4. PMID: 34347534; PMCID: PMC9092221.
- [8] Elbadawy A. Kamoun, El-Refaie S. Kenawy, Xin Chen, A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings, *Journal of Advanced Research*, Volume 8, Issue 3, 2017, Pages 217-233, ISSN 2090-1232
- [9] Chen Y, Huang W, Chen Y, Wu M, Jia R, You L. Influence of Molecular Weight of Polysaccharides from *Laminaria japonica* to LJP-Based Hydrogels: Anti-Inflammatory Activity in the Wound Healing Process. *Molecules.* 2022 Oct 15;27(20):6915. doi: 10.3390/molecules27206915. PMID: 36296508; PMCID: PMC9607980.
- [10] C. M. Hassan and N. A. Peppas. Structure and morphology of freeze/thawed pva hydrogels. *Macromolecules*, 33(7):2472–2479, 2000.
- [11] Squillace O, Fong R, Shepherd O, Hind J, Tellam J, Steinke NJ, Thompson RL. Influence of PVAc/PVA Hydrolysis on Additive Surface Activity. *Polymers (Basel).* 2020 Jan 14;12(1):205. doi: 10.3390/polym12010205. PMID: 31947559; PMCID: PMC7023474.

- [12] Hossein Adelnia, Reza Ensandoost, Shehzahdi Shebbrin Moonshi, Jaber Nasrollah Gavvani, Emad Izadi Vasafi, Hang Thu Ta, Freeze/thawed polyvinyl alcohol hydrogels: Present, past and future, *European Polymer Journal*, Volume 164, 2022, 110974, ISSN 0014-3057
- [13] Singh R., Gautam S., Sharma B., Jain P., Chauhan KD., Chapter 2 - Biopolymers and their classifications, Editor(s): Thomas S., Gopi S., Amalraj A., *Biopolymers and their Industrial Applications*, Elsevier, 2021, 21-44
- [14] Aslam M., Kalyar MA., Raza ZA., Polyvinyl alcohol: A review of research status and use of polyvinyl alcohol based nanocomposites, *Polym Eng Sci*, 2018, 58: 2119-2132.
- [15] Y. Chen , C. Jiao , X. Peng , T. Liu , Y. Shi , M. Liang , H. Wang, Biomimetic anisotropic poly(vinyl alcohol) hydrogels with significantly enhanced mechanical properties by freezing–thawing under drawing, *J.Mater. Chimica. B* , 7 (20) (2019) , pp. 3243 - 3249
- [16] Kawai F, Hu X. Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009 Aug;84(2):227-37. doi: 10.1007/s00253-009-2113-6. Epub 2009 Jul 10. PMID: 19590867.
- [17] Stocco E, Barbon S, Grandi F, Gamba PG, Borgio L, Del Gaudio C, Dalzoppo D, Lora S, Rajendran S, Porzionato A, Macchi V, Rambaldo A, De Caro R, Parnigotto PP, Grandi C. Partially oxidized polyvinyl alcohol as a promising material for tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017 Jul;11(7):2060-2070. doi: 10.1002/term.2101. Epub 2015 Oct 29. PMID: 26511206.
- [18] Barbon S, Stocco E, Dalzoppo D, Todros S, Canale A, Boscolo-Berto R, Pavan P, Macchi V, Grandi C, De Caro R, Porzionato A. Halogen-Mediated Partial Oxidation of Polyvinyl Alcohol for Tissue Engineering Purposes. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan 25;21(3):801. doi: 10.3390/ijms21030801. PMID: 31991838; PMCID: PMC7038068.
- [19] Charradi, Khaled & Daoudi, Mahmoud & Chemek, Mourad & Zakarya, Ahmed & Alzahrani, Abdullah & Siai, Amira & Chtourou, Radhouane & Keshk, Sherif. (2022). Synthesis, Characterization and Optical Properties of Oxidized Poly Vinyl Alcohol. *ChemistrySelect*. 7. 10.1002/slct.202103273.
- [20] Sukalyan Dash, Sabita Patel, Bijay K. Mishra, Oxidation by permanganate: synthetic and mechanistic aspects, *Tetrahedron*, Volume 65, Issue 4, 2009, Pages 707-739, ISSN 0040-4020, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.10.038>.
- [21] Rosiak J, Ruciska-Rybus A, Pekala W. US Patent 4,871,490; 1989.
- [22] J.P. Cook, G.W. Goodall, O.V. Khutoryanskaya, V.V. Khutoryanskiy, Microwave-Assisted Hydrogel Synthesis: A New Method for Crosslinking Polymers in Aqueous Solutions, *Macromol Rapid Commun*, 33 (2012), pp. 332-336, <https://doi.org/10.1002/marc.201100742>

- [23] He Zhao, Jie Huang, Yan Li, Xinjing Lv, Huiting Zhou, Hairong Wang, Yunyun Xu, Chao Wang, Jian Wang, Zhuang Liu, ROS-scavenging hydrogel to promote healing of bacteria infected diabetic wounds, *Biomaterials*, Volume 258, 2020, 120286, ISSN 0142-9612
- [24] Wu Yun, Li Yunxiao, Han Ruiting, Long Zhu, Si Pengxiang, Zhang Dan, Dual-Cross-Linked PEI/PVA Hydrogel for pH-Responsive Drug Delivery, *Biomacromolecules*, 2023, doi: 10.1021/acs.biomac.3c00824
- [25] Atlan M, Simon-Yarza T, Ino JM, Hunsinger V, Corté L, Ou P, Aid-Launais R, Chaouat M, Letourneur D., Design, characterization and in vivo performance of synthetic 2 mm-diameter vessel grafts made of PVA-gelatin blends., *Sci Rep.* 2018 May 9;8(1):7417. doi: 10.1038/s41598-018-25703-2. PMID: 29743525; PMCID: PMC5943294.
- [26] Tianqi Liu, Chen Jiao, Xin Peng, Ya-Nan Chen, Yuanyuan Chen, Changcheng He, Ruigang Liu, Huiliang Wang, Super-strong and tough poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) hydrogels reinforced by hydrogen bonding, *J.Mater. Chimica. B*, 2018
- [27] Manuale degli eccipienti farmaceutici, 1994, seconda ed. A. Wade, PJ Weller (a cura di), pp. 383–384. Associazione farmaceutica americana, Washington, DC.
- [28] Giappone Farm. fa riferimento a Directory giapponese degli eccipienti farmaceutici, 1996. Monografia sull'alcool polivinilico, p.355.
- [29] Farmacopea degli Stati Uniti e al Formulario nazionale della Convenzione farmacopea statunitense, Rockville, MD.