UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Corso di Laurea triennale in Ingegneria Biomedica

CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA MEDIANTE ELETTROSCOPIA ELETTRONICA DI IDROGEL COMPATIBILI PER APPLICAZIONI IN INGEGNERIA FORENSE

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION BY SCANNING ELECTRONIC ELECTROSCOPY OF COMPATIBLE HYDROGELS FOR APPLICATIONS IN FORENSIC ENGINEERING

Relatore: Prof. Alida Mazzoli

Correlatore: Prof. Francesca Luzi

Tesi di Laurea di: Francesca Bonadies

A.A 2025/2026

INDICE

Capitolo 1 – Introduzione 1

Capitolo 2 – Materiali e metodi

- 2.1 La gelatna
- 2.2 La gomma xantana
- 2.3 L'alginato
- 2.4 PVA
- 2.5 Preparazione delle matrici
- 2.6 Stampa 3D
- 2.7 SEM (microscopia eletronica a scansione)

Capitolo 3 – Risultat e discussioni

- 3.1 Materiali biologici
- 3.2 Materiali sintetci
- 3.3 Analisi con il SEM

Capitolo 4 – Conclusioni

Bibliografa

Capitolo 1- Introduzione

Le impronte digitali e il DNA rappresentano due tra le font più rilevant nelle indagini forensi, poiché tramite queste è possibile ricondurre una traccia ad un individuo. Da oltre vent'anni è risaputo che quest due strument di evidenza possono coesiste re sulla stessa superfcie ed essere recuperat dallo stesso reperto: ciò viene defnito dal termine dual recovery, ovvero recupero simultaneo dell'impronta e del materiale genetco. Tale aspeto è di fondamentale importanza nell'ambito della criminologia, poiché in questo modo si è in grado di raddoppiare il valore probatorio di un singolo reperto [1].

Andando ad analizzare le varie tecniche di recupero delle impronte viene reso evidente come esse necessariamente entrino in confito con il DNA presente, degradandolo o allontanandolo dalla superfcie. Allo stesso tempo, le procedure più aggressive di pre lievo del materiale genetco, come ad esempio lo swabbing o l'utlizzo di nastri fortemente adesivi, possono alterare o distruggere il detaglio delle creste papillari [3]. Per superare queste interferenze delle citate metodologie, negli ultmi anni si è cercato un compromesso rivolgendo una partcolare atenzio ne verso support adesivi a bassa aggressività, come i gelatn lifers, che preservano la leggibilità dell'impronta, permetendo nello stesso momento il prelievo del materiale cellulare [1].

L'obietvo di questo lavoro è combinare gli idrogeli e le tecniche di stampa tridimensionale con le applicazioni di natura forense. L'idea di fondo consiste nello sviluppare una matrice polimerica a base di gelatna, nella quale incapsulare in situ colorant fuorescent, così da otenere un supporto in grado di assolvere simultaneamente a due funzioni: la visualizzazione delle impronte latent e il rilevamento, con il successivo recupero, del DNA. Per l'osservazione del materiale cellulare contenente acidi si fa riferimento all'impiego di sonde fuorescent specifche, già validate in ambito forense per la visualizzazione in situ del touch del DNA su impronte e superfci, senza che ciò comprometa le successive fasi di estrazione e amplifcazione [1,2]

Oltre alla gelatna c'è bisogno di approfondire altri materiali polimerici d'interesse, in partcolare la gomma xantana, l'agarosio e l'alginato. Il materiale ideale dovrebbe risultare trasparente, fessibile e leggermente adesivo, per garantre un prelievo efcace dalle superfci, oltre a dover essere compatbile con il DNA. Inoltre, nel lavoro viene impiegato l'utlizzo della gelatna alimentar e che, dal punto di vista chimico, è costtuita da collagene denaturato e quindi sostanzialmente analoga a quella dei support commerciali, ma risulta molto più economica, facilmente reperibile e priva di colorant. Questa scelta presenta un duplice vantag gio: da un lato contene i cost della sperimentazione, rendendo agevole l'otmizzazione iteratva delle formulazioni; dall'altra riduce il rischio di introdurre inibitori indesiderat, a benefcio della compatbilità con le successive analisi del DNA.

Tenendo conto di quanto premesso, il presente lavoro sperimentale si artcola atorno ad alcuni obietvi principali: la preparazione e l'otmizzazione di matrici a base di gelatna e degli altri biopolimeri selezionat; l'incapsulamento in situ di sonde fuorescent al loro interno; la valutazione della loro processabilità mediante stampa 3D a estrusione, con partcolare riferimento alla tecnologia ad estrusione pneumatca e, infne, la caraterizzazione reologica dei sistemi otenut,

indispensabile sia per garantre la stampabilità sia per comprenderne il comportamento in presenza di DNA.

Bisogna, inoltre, tenere in considerazione che tra i polimeri alternatvi per la realizzazione di eletrolit polimerici fgura anche l'agarosio, un polisaccaride lineare derivato dalle alghe rosse , capace di formare gel termoreversibili atraverso un meccanismo di gelifcazione basato sulla transizione da conformazione a gomitolo statstco a doppia elica, con successiva aggregazione in fasci stabilizzat da legami a idrogeno [8]. Grazie alla sua nat ura idrofla e al basso fondo ionico, l'agarosio favorisce in teoria l'incorporazione di sali e la dissociazione ionica, risultando inoltre biocompatbile e privo di interferenze con il DNA [7]. Tutavia, la necessità di operare a temperature elevate per mantenerlo allo stato fuido e la fragilità meccanica del gel risultante ne limitano l'applicabilità pratca.

Capitolo 2 - Materiali e metodi

In questo capitolo vengono descrit i materiali polimerici utlizzat, approfondendo la strutura chimica e i meccanismi di gelifcazione e degradazione. Inoltre, saranno esaminate le procedure seguite per la preparazione delle matrici, per la loro stampa tridimensionale e per la caraterizzazione reologica.

2.1 La gelatna

La gelatna costtuisce il materiale centrale di questo lavoro.

Dal punto di vista chimico essa è un biopolimero proteico otenuto dalla idrolisi parziale del collagene, la principale proteina struturale dei tessut connetvi animali, estrato in genere da pelle e ossa [4].

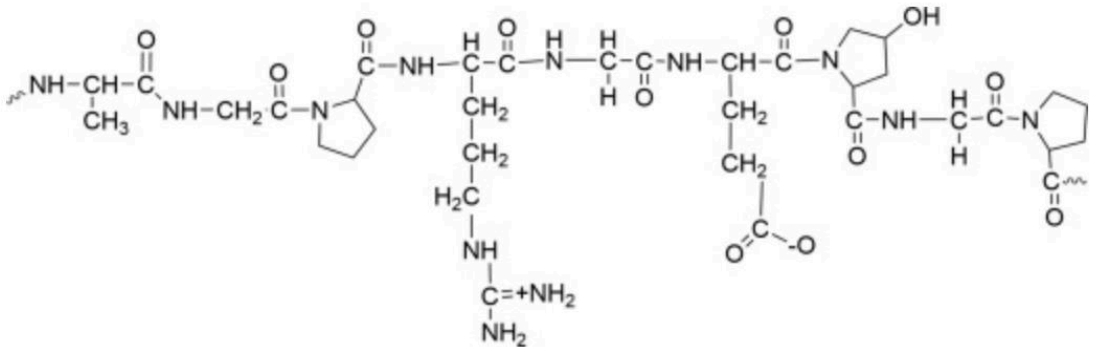


Fig.1: strutura chimica della gelatna

Sono disponibili due tpi di gelatna, a seconda della procedura di pretratamento e sono commercialmente conosciute come gelatna di tpo A (punto isoletrico a pH ~ 8 -9) e gelatna di tpo B (punto isoeletrico a pH ~ 4-5) otenute rispetvamente in condizioni di pretratamento acido e alcalino. Le applicazioni industriali richiedono uno o l'altro tpo di gelatna, a seconda del grado di retcolazione del collagene nella materia prima. A causa della labilità acida della retcolazione in collageni immaturi, come nelle pelli di pesce, un tratamento acido ragionevolmente lieve è sufciente a efetuare la solubilizzazione del collagene.

La qualità della gelatna destnata a specifche applicazioni è stretamente legata alle sue proprietà reologiche. Oltre alle carateristche fsico -chimiche di base, quali composizione, solubilità, trasparenza, colore, odore e sapore, i parametri maggiormente utlizzat per valutarne la qualità commerciale sono la resistenza del gel e la sua stabilità termica, espressa atraverso le temperature di gelifcazione e di fusione.

La resistenza del gel viene generalmente determinata mediante il test Bloom, un metodo standardizzato che prevede la preparazione di una soluzione di gelatna al 6,67%, lasciata maturare per 17 ore a 10°C. Il risultato otenuto viene espresso come valore B loom, parametro di riferimento per confrontare la capacità gelifcante delle diverse gelatne.

Le proprietà gelifcant e la stabilità termica dipendono principalmente da due fatori: la composizione aminoacidica, che varia in funzione della specie di origine e la distribuzione del peso molecolare, infuenzata sopratuto dalle condizioni di lavorazione. In partcolare, la presenza di prolina e idrossiprolina riveste un ruolo fondamentale nella formazione e nella stabilità della strutura a tripla elica del collagene. L'idrossiprolina, grazie alla capacità del suo gruppo ossidrilico di formare legami a idrogeno, contribuisce in modo signifcatvo alla stabilizzazione della strutura collagenica. Inoltre, la sequenza aminoacidica Gly-Pro-HyR è considerata uno dei principali fatori responsabili della stabilità termica del collagene.

Dal punto di vista struturale, la gelatna è costtuita da una miscela di polipeptdi derivat prevalentemente dal collagene di tpo l, comprendente catene a, component ß e y, oltre a forme a più elevato peso molecolare e framment derivant dalla degrad azione proteica.

Condizioni di estrazione partcolarmente drastche, come valori estremi di pH, temperature elevate o tempi di tratamento prolungat, tendono a ridurre la presenza delle component ß e y e ad aumentare la formazione di framment a basso peso molecolare. Se bbene tali condizioni vengano spesso adotate a livello industriale per incrementare la resa produtva, esse possono infuenzare negatvamente le proprietà funzionali della gelatna [4].

Nel contesto forense è di prioritaria importanza la compatbilità con il DNA ed è per questo che si predilige la gelatna trasparente e priva di colorant, che non introduce gli inibitori della PCR riscontrat nelle variant colorate [2].

Risulta, inoltre, importante da analizzare che la gelatna può andare incontro a fenomeni di degradazione quando viene sotoposta a temperature elevate per periodi prolungat. Tale processo comporta modifcazioni della sua strutura molecolare, evidenziate dalla diminuzione delle frazioni proteiche ad alto peso molecolare e dalla formazione di framment più piccoli.

Gli studi hanno mostrato che la degradazione è associata sia alla rotura dei legami peptdici , che uniscono gli amminoacidi lungo la catena proteica, sia alla scissione dei legami di-

retcolazione present tra le molecole. In partcolare, sono stat osservat la rotura di retcoli come la pentesidina e la piridilina e un aumento dei gruppi terminali liberi, indicatvo dell'idrolisi delle catene polipeptdiche.

Nel complesso, la degradazione termica della gelatna determina una progressiva perdita dell'integrità struturale della proteina, con conseguente alterazione delle sue proprietà funzionali e tecnologiche [5].

Per quanto riguarda la preparazione di matrici a base di gelatna, queste sono preparate tramite una combinazione di processi, tra cui la polimerizzazione, il retcolamento e l'idrolisi. Durante la preparazione degli idrogel, vari materiali inorganici (come argille, zeolit, metalli, ossidi metallici), a base di carbonio o polimerici possono essere integrat nella strutura della gelatna, per preparare GH composit con migliorament nelle proprietà. Diverse tecniche di polimerizzazione includono la polimerizzazione a soluzione, la polimerizzazione a radicali liberi, la polimerizzazione in sospensione,

etc.... .Regolare i metodi di sintesi e diversi fatori durante la preparazione può modifcare le carateristche fsicochimiche delle GH. Ad esempio, la porosità, il modulo elastco, la capacità di gonfore e il tasso di degrado sono tut collegat alla concentrazione di gelatna impiegata. Le carateristche di degrado e rigonfamento delle GH sono infuenzate da parametri di retcolazione come il tpo di retcolante chimico, la sua quanttà, la durata dell'esposizione. Quindi, la versatle funzionalizzazione della gelatna ofre prospetve di retcolazione semplice ed efcace, oltre alla capacità di combinarsi con altri materiali, così da formare materiali ibridi con carateristche termomeccaniche, fsico -chimiche e biologiche migliorate [10].

La gelatna utlizzata per la preparazione delle matrici è una gelatna in polvere prodota da FunCakes:



Fig.2: prodoto commerciale usato in fase di sperimentazione

2.2- la gomma xantana

La gomma xantana è un eteropolisaccaride extracellulare prodoto per fermentazione dal baterio Xanthomonas campestris. Possiede una strutura primaria composta da unità pentasaccaridiche ripetute, formate da due unità glucosica, due unita mannosiche e un unita di acido glucuronico, nel rapporto molare 2,8:2,0:2,0. La sua catena principale è composta da unità B-d-glucosio collegate nelle posizioni 1 e 4. Le catene laterali trisaccarigiche contengono un'unità d-glucuronica tra due unità d-mannosi collegate nella posizione O-3 di ogni altro residuo di glucosio nella catena principale. Circa metà della d-mannosio terminale contene un residuo di acido piruvico collegato tramite gruppo cheto alle posizioni 4 e 6, con una distribuzione sconosciuta. L'unità d-Mannosio collegata alla catena principale contene un gruppo acetle in posizione O -6. Si trata di un polimero ad altssimo peso molecolare, dell'ordine dei milioni di dalton, fortemente idroflo e facilmente solubile sia in acqua calda che in acqua fredda [6].

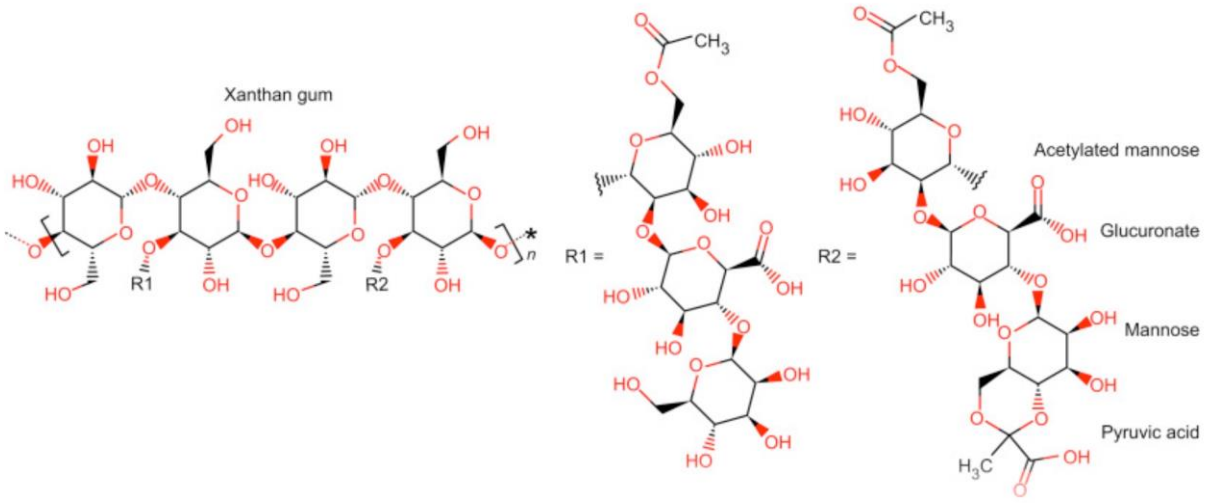


Fig.3: strutura chimica della gomma di xantana

La gomma xantana è un polisaccaride caraterizzato da un'elevata viscosità in soluzione acquosa, infuenzata in modo signifcatvo dalla temperatura di dissoluzione. A temperature moderate, le soluzioni di xantano presentano una viscosità elevata, poiché la temperatura condiziona la conformazione delle molecole e la formazione di struture ordinate. In partcolare, lo xantano può assumere una conformazione a elica oppure a bobina casuale, a seconda delle condizioni di dissoluzione.

Una delle proprietà più rilevant della gomma xantana è la sua capacità di interagire con altri polisaccaridi, in partcolare con i galatomannani come la gomma di guar e la gomma di carruba. La combinazione di quest compost con lo xantano determina un efeto sinergico, che si traduce in un signifcatvo aumento della viscosità delle soluzioni.

Dal punto di vista della sicurezza, numerosi studi hanno dimostrato che la gomma xantana non è tossica, non presenta efet irritant, né sensibilizzant e non interferisce con la crescita cellulare.

Le proprietà reologiche della gomma xantana, unite alla sua elevata stabilità termica e alla compatbilità con numerosi ingredient, ne favoriscono l'impiego in diversi setori industriali.

Nell'industria alimentare viene utlizzata principalmente come addensante, stabilizzante ed emulsionante.

Per formare matrici a base di gomma xantana le catene polisaccaridiche vengono idratate, così che possano assorbire acqua, espandendosi di volume. Le numerose interazioni intermolecolari andranno a defnire una strutura retcolata, capace di tratenere elevat e quanttà di acqua. Tale organizzazione produce una matrice idrogelifcata, caraterizzata da elevata viscosità e stabilità, le cui proprietà dipendono dalla concentrazione del polimero, dalla temperatura, dal pH e dalla presenza di Sali nel mezzo [6].

La gomma di xantano utlizzata per la preparazione delle matrici è prodota da Foodies ed è costtuita al 100% da gomma di xantano e commercializzata come ingrediente alimentare:

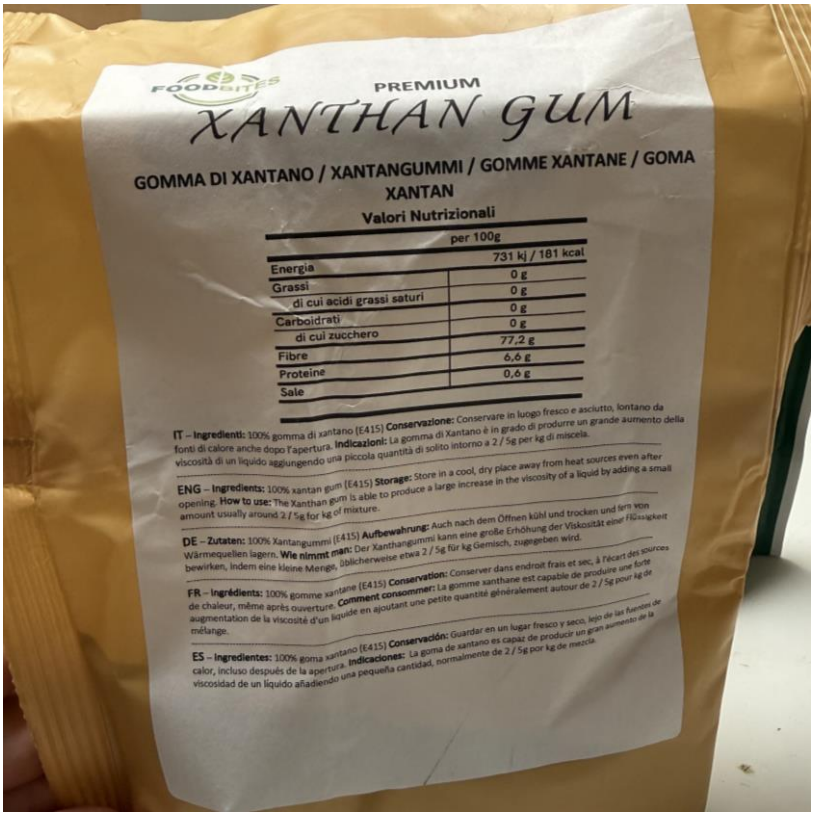


Fig.4: prodoto commerciale usato in fase di sperimentazione

2.3-l'alginato

L'alginato è un polisaccaride anionico lineare estrato dalle alghe brune, costtuito da due tpi di residui yronici legat da legami (1 ->4): l'acido a-L-guluronico, (blocchi G) e l'acido B-D-mannuronica (blocchi M), distribuit lungo la catena in sequenze emopolimeriche ed eterere imeriche [9].

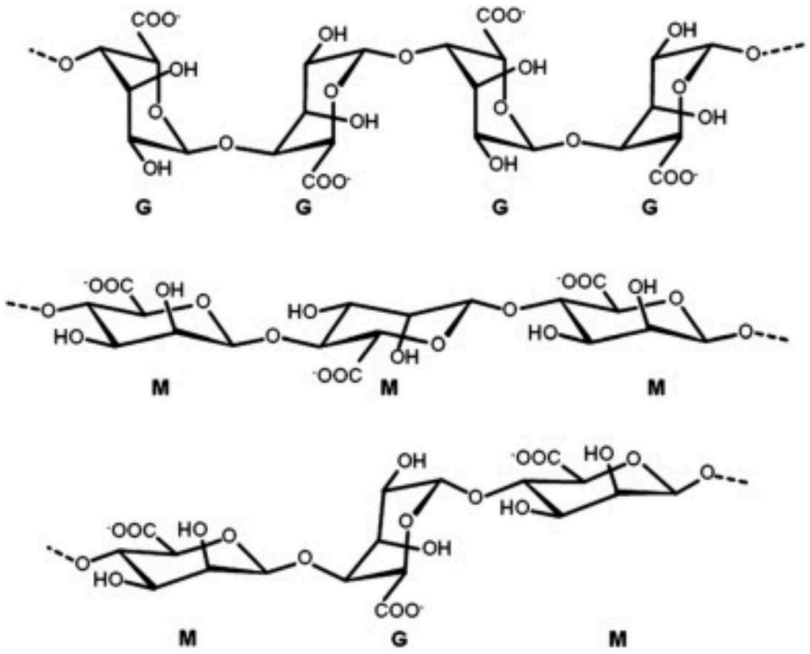


Fig.5: strutura chimica della gelatna

Una varietà di gel molli e idrogel può essere formata tramite retcolazione ionica con catoni divalent come Ca2+ e Mg2+, dove i gruppi funzionali carbossilat dei residui gliuronat si coordinano con Ca2+ per formare il ben documentato modello "egg-box". Gli idrogel di alginato retcolat ionicamente racchiudono grandi molecole con gelifcazione rapida e non pericolosa, il che rende l'alginato partcolarmente versatle per l'incapsulamento di molecole anche di grandi dimensioni [9].

Le matrici di alginato sono preparate, disperdendo il sale sodico dell'acido alginico in acqua e lasciando in agitazione, anche per tempi prolungat, afnché avvenga la completa dissoluzione. Separatamente si predispone una soluzione di cloruro di calcio, che viene poi combinata con l'alginato, per innescare la retcolazione ionica [9].

L'alginato utlizzato per le preparazioni di matrici è alginato di sodio, prodoto da SaporePuro:



Fig.6: prodoto commerciale usato in fase di sperimentazione

2.4- PVA

Il polivinilalcol (PVA) rappresenta una delle piataforme polimeriche più impiegate nell'ambito dell'ingegneria biomedica per la realizzazione di idrogel, grazie alla sua marcata idroflicità, all'eccellente biocompatbilità e alla bassa citotossicità. La strutura molecolare del PVA è caraterizzata da numerosi gruppi ossidrilici (-OH) distribuit lungo la catena polimerica, i quali costtuiscono sit reatvi disponibili per diverse strategie di modifcazione chimica, quali il blending con altri polimeri, la copolimerizzazione a innesto (graf copolymerizaton) e la formazione di

nanocomposit. Queste strategie consentono di incorporare in modo efcace polimeri funzionali, molecole bioatve e nanomateriali all'interno della matrice di PVA, permetendo di superare alcune limitazioni intrinseche del materiale e di conferirgli funzionalità su misura per applicazioni biomedicali avanzate.

In base alla confgurazione della rete polimerica, gli idrogel a base di PVA possono essere classifcat in quatro categorie principali: a rete singola (single -network), a doppia rete (double-network), a rete interpenetrante (interpenetratng -network) e a rete multpla (mult -network). Tali variazioni architeturali infuenzano in modo signifcatvo la resistenza meccanica, la capacità di rigonfamento (swelling) e le prestazioni funzionali complessive degli idrogel nelle applicazioni biomediche.

Un ruolo determinante nella defnizione delle proprietà biomeccaniche e biologiche degli idrogel di PVA è svolto dal metodo di retcolazione (crosslinking) adotato, poiché regola le interazioni tra le catene polimeriche. Il PVA può formare ret fsicament e retcolate atraverso fenomeni di impaccamento e cristallizzazione delle catene (ad esempio mediante cicli di congelamento/scongelamento), oppure ret chimicamente retcolate, in cui vengono introdot legami covalent che conferiscono maggiore stabilità struturale alla rete tridimensionale [15].

Il PVA utlizzato per le miscele è acido poli(vinilico) prodoto dall'azienda Sigma -Aldrich:

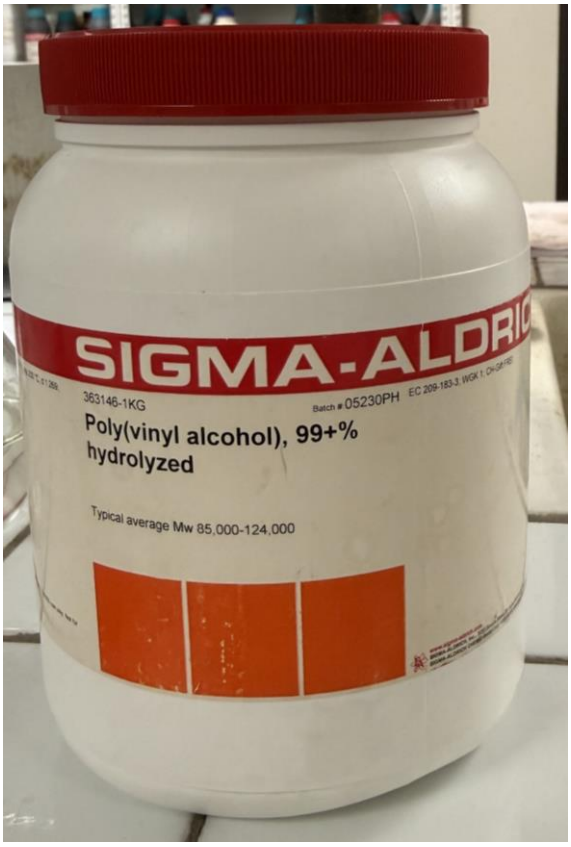


Fig.7: prodoto commerciale usato in fase di sperimentazione

2.5-preparazione delle matrici

Le miscele preparate sono:

-per l'alginato

Formulazione 1	Alginato 2,5% W/V in H2O
Formulazione 2	Alginato 2,5% W/V in H2O: Etanolo = 10% (rapporto 9:1 acqua:etanolo)
Retcolazione	CaCl2 80 mM, rapporto 4:1 (per entrambe le formulazioni)

Formulazione 1	Alginato 2,5% W/V + PEG 2% W/V in H2O
Formulazione 2	Alginato 2,5% W/V + PEG 2% W/V in H2O: Etanolo = 10%
Retcolazione	CaCl2, rapporto 4:1 [alginato: calcio] (per entrambe le formulazioni)

-per la gomma xantana:

Formulazione 1	Gomma xantana 3% W/V + PEG 2% W/V in H2O
Formulazione 2	Gomma xantana 3% W/V + PEG 2% W/V in H2O: Etanolo = 10%

Formulazione 1	Gomma xantana 2,5% W/V + PEG 2% W/V + Alginato 1% W/V in H2O
Formulazione 2	Gomma xantana 2,5% W/V + PEG 2% W/V + Alginato 1% W/V in H2O: Etanolo = 10%

-per la gelatna:

Formulazione 1	Gelatna 3% W/V + PEG 2% W/V in H2O
Formulazione 2	Gelatna 3% W/V + PEG 2% W/V in H2O: Etanolo = 10%

-per il PVA:

Prova	**Composizione**	**Condizioni in stufa**	**pH**	**Esito**
1	PVA 15% w/v (disciolto a 140 °C) + CA 1% w/v pre-solubilizzato in soluzione a parte, poi aggiunto al PVA	105 °C per 10 min	n.d.	Retcolazione insufciente: il materiale si è disciolto tra le mani dopo rafreddamento in frigo
2	PVA 15% w/v + CA 1% w/v aggiunto diretamente al PVA (senza pre - solubilizzazione)	105 °C per 10 min	4–5	Retcolazione completa; buona stabilità struturale. Formulazione scelta come riferimento
3	PVA 15% w/v + CA 3% w/w aggiunto diretamente al PVA	140 °C per 15 min	n.d.	Composto raggrinzito all'uscita dalla stufa, probabilmente per eccessiva temperatura

4	PVA 15% w/v in 15 ml H2O (su tot. 20 ml) + PEG 2% + EtOH 5 ml (aggiunto goccia a goccia) + CA 1% w/w	105 °C per 10 min	5–6	Etanolo ben incorporato nel composto; retcolazione avvenuta
5	PVA 15% w/v in 13 ml H2O + PEG 2% + EtOH 7 ml + CA 1% w/w	105 °C per 10 min	5–6	Elevata quanttà di etanolo non completamente disciolta/incorporata nel composto

Legenda: CA = acido citrico; PEG = polietlenglicole; EtOH = etanolo; n.d. = non determinato.

2.6- stampa 3D

La tecnica di stampa più difusa per la fabbricazione di matrici idrogel è la stampa per estrusione (extrusion-based 3D printng o bioprintng), in cui il materiale viene fato fuire atraverso un ugello soto l'azione di una pressione pneumatca o di uno spostamento meccanico (a vite o a pistone), per poi essere depositato strato su strato secondo un percorso defnito digitalmente. Il successo del processo dipende dall'equilibrio tra due esigenze opposte: da un lato il materiale deve fuire facilmente atraverso l'ugello durante l'estrusione, dall'altro deve mantenere rapidamente la propria forma una volta depositato, per garantre la fedeltà s truturale della costruzione tridimensionale . Per questo motvo il comportamento shear -thinning (pseudoplastco) è la proprietà reologica più ricercata in un materiale stampabile: un idrogel ad alta viscosità a riposo, che riduce drastcamente la viscosità soto l'azione dello sforzo di taglio applica to durante l'estrusione, può essere spinto atraverso l'ugello con forze contenute, per poi recuperare rapidamente la propria consistenza non appena lo sforzo cessa, fssando lo strato appena depositato [12].

I principali studi sulla stampa estrusiva identfcano quatro parametri operatvi che condizionano in modo determinante la qualità del manufato fnale: il diametro dell'ugello, l'altezza dello strato, la velocità di stampa (movimento della testna) e la ve locità di estrusione (fusso del materiale) . La pressione di estrusione gioca un ruolo altretanto rilevante: variazioni anche modeste della pressione pneumatca applicata possono produrre diferenze sostanziali nel diametro del flamento estruso, fno al 30% tra condizioni di stampa diverse. Analoga mente, la velocità di estrusione infuisce in modo non lineare sulla lunghezza del flamento depositato, con variazioni fno a trenta volte superiori a parità di pressione pneumatca applicata [13].

Lo strumento impiegato è la stampante BIO X6 (CELLINK), una piataforma di bio stampa a estrusione dotata di sei teste di stampa modulari, che possono operare indiferentemente secondo i principi di estrusione meccanica, a goccia o pneumatca e che consentono, grazie a una doppia regolazione indipendente della pressione, anche stampe coassiali e in miscela. La testa pneumatca è provvista di funzione di riscaldamento (fno a circa 85 C): questa carateristca è partcolarmente preziosa per i nostri materiali termoreversibili, poiché permete di mantenere fuidi nella cartuccia polimeri come la gelatna e l'agarosio durante l'estrusione, lasciandoli poi gelifcare per rafreddamento sul piano di stampa. La macchina integra, inoltre, la tecnologia Clean Chamber, con fltri HEPA e sterilizzazione UV-C, che assicura un ambiente di lavoro controllato e riduce il rischio di contaminazione, aspeto non trascurabile quando si intende preservare l'integrità del DNA [14].

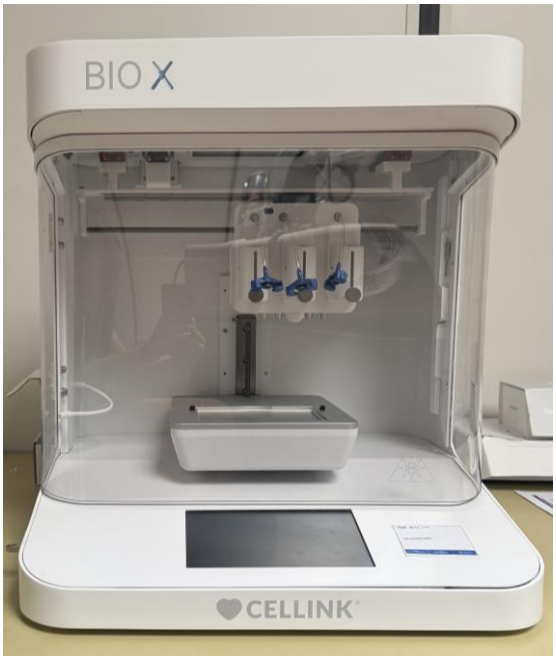


Fig. 8: stampante BIO X6 utlizzata in fase di sperimentazione

Infll density 20.00%, speed 10 mm/s

2.7-SEM (microscopia eletronica a scansione)

La microscopia eletronica a scansione (SEM) è una tecnica di grande efcacia per l'analisi morfologica della superfcie di un materiale. Nel SEM, un fascio di eletroni, accelerato con tensioni fno a 30 kV, viene focalizzato sul campione in esame. L'int erazione tra il fascio eletronico e il campione genera diversi segnali, i quali vengono raccolt da apposit rivelatori e successivamente elaborat per ricostruire un'immagine della superfcie analizzata.

Quando il campione viene irradiato dal fascio eletronico, si possono verifcare due tpi principali di interazione. Il primo, defnito "scatering elastco", avviene per interazione con il nucleo atomico o con gli eletroni degli strat più esterni avent energia simile a quella degli eletroni incident. Gli eletroni che vengono difusi elastcamente con un angolo superiore a 90° prendono il nome di eletroni retrodifusi (backscatered electrons , BSE); i segnali BSE forniscono informazioni sia sulla composizione chimica sia sulla topografa del campione. Il secondo tpo di interazione, deto "scatering anelastco", si verifca quando gli eletroni incident interagiscono con gli eletroni e gli atomi del campione, trasferendo loro parte signifcatva della propria energia. Tale trasferimento provoca l'eccitazione degli eletroni del campione e la conseguente generazione di eletroni secondari, caraterizzat da energie inferiori a 50 eV. Gli SE rappresentano il segnale maggiormente utlizzato nella microscopia SEM: poiché possiedono bassa energia, riescono a fuoriuscire solamente da una regione di pochi nanometri in prossimità della superfcie del campione, fornendo così informazioni topografche accurate e ad alta risoluzione.

Lo strumento SEM è dotato di un cannone eletronico in grado di accelerare gli eletroni con energie comprese tra 0,1 e 30 keV. Un sistema di lent eletromagnetche e diaframmi permete di focalizzare e demagnifcare il fascio fno alle dimensioni della s orgente eletronica (circa 50 µm nel caso di un flamento di tungsteno), prima che il fascio raggiunga il campione con le dimensioni richieste (1 –100 nm). L'intera analisi viene condota in condizioni di alto vuoto, al fne di evitare fenomeni di scatering indesiderato degli eletroni c on le molecole dell'aria.

La SEM costtuisce uno strumento estremamente versatle per la caraterizzazione struturale di materiali di origine biologica (bio-based). Quest materiali sono generalmente costtuit da lunghe catene di unità ripetute formate da element a basso numero atomico, quali carbonio, idrogeno, azoto e ossigeno. Poiché tali element leggeri interagiscono in modo limitato con il fascio eletronic o accelerato, ne risulta un contrasto dell'immagine piutosto scarso; per questo motvo, è generalmente necessario ricoprire o colorare il campione polimerico prima dell'analisi. Nella maggior parte dei casi, i campioni polimerici vengono sotopost a meta llizzazione per sputering con oro (sputer -coatng), al fne di otenere immagini SEM di qualità otmale.

La microanalisi, abbinata al SEM, permete di determinare la composizione elementare del campione. Il fascio eletronico incidente provoca l'emissione di raggi X carateristc i da parte degli atomi del materiale, la cui energia è specifca per ciascun elemento chimico. Il rilevatore raccoglie quest segnali e li converte in uno spetro, in cui ogni picco identfca un elemento presente nel campione, mentre l'area sotesa fornisce una stma semi -quanttatva della sua concentrazione. Questa tecnica risulta utle per verifcare la presenza di specifci element o compost nel materiale.



Fig. 9: Camera di analisi del microscopio a scansione

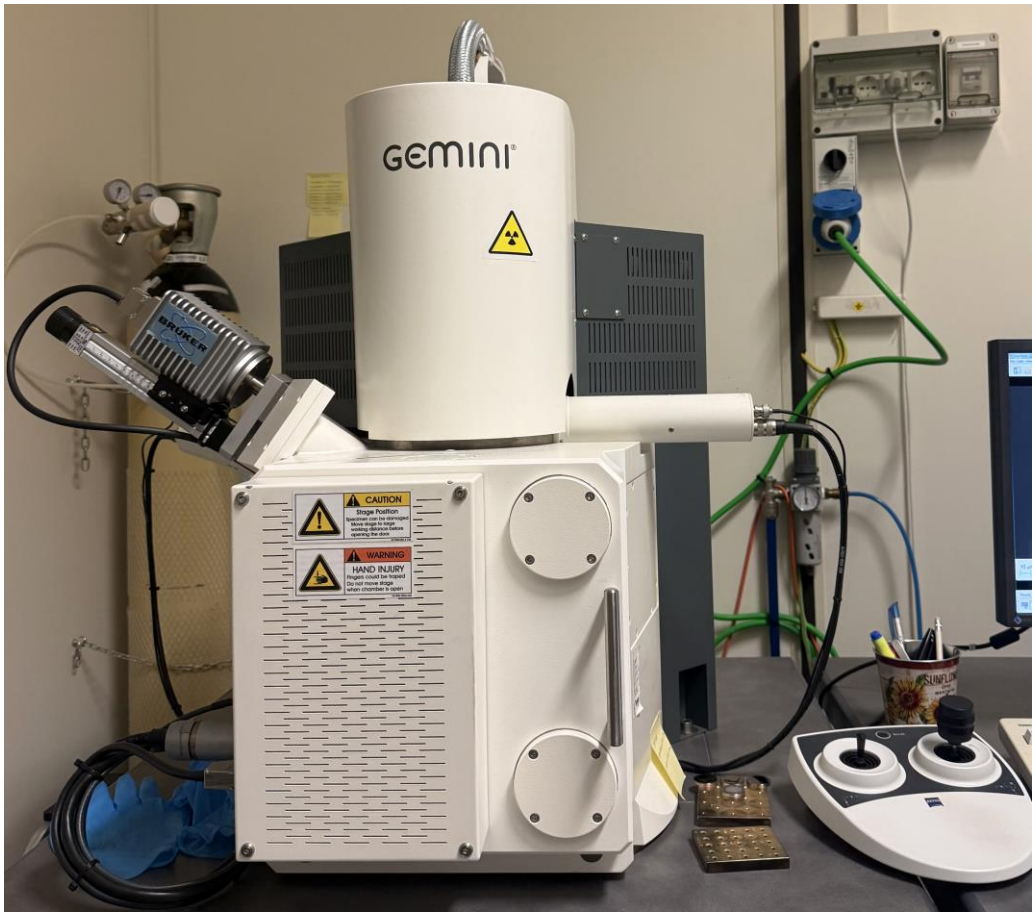


Fig. 10: Microscopio eletronico a scansione (SEM) ZEISS Gemini

Capitolo 3-Risultati e discussioni

3.1-materiali biologici

La prima coppia di formulazioni testate ha previsto l'impiego del solo alginato di sodio, alla concentrazione di 2,5% w/v, solubilizzato rispettivamente in acqua distillata e in una miscela acqua:etanolo in rapporto 9:1 (corrispondente al 10% v/v di etanolo). Il polimero è stato disperso sotto agitazione magnetica costante fino a completa solubilizzazione, ottenendo in entrambi i casi una soluzione omogenea e priva di grumi, successivamente entrambi sono stati reticolati. La reticolazione è avvenuta tramite cloruro di calcio, con un rapporto 4:1 [alginato:clorurodicalcio]. L'introduzione dell'etanolo nella seconda formulazione è servita affinché potessero essere inseriti dei coloranti all'interno della soluzione, proprio al fine di riuscire a catturare le impronte.



Alginato senza etanolo



Alginato con etanolo

A queste due formulazioni di base sono state affiancate le corrispondenti varianti addizionate di PEG al 2% w/v, sempre a partire da alginato 2,5% w/v, sia in acqua sia nella miscela acqua:etanolo 9:1. In questo caso, dopo la solubilizzazione dell'alginato, il PEG è stato aggiunto alla soluzione e omogeneizzato sotto agitazione prima del bagno in $CaCl_2$. il PEG agisce infatti da plasticizzante e rispetto alle formulazioni prive di PEG, ci si attende una struttura interna più morbida ed elastica.

Un secondo gruppo di formulazioni ha previsto l'impiego della gelatina, in sostituzione dell'alginato, alla concentrazione di 3% w/v, sempre in combinazione con PEG al 2% w/v e testata sia in acqua sia nella miscela acqua:etanolo 9:1. A differenza delle formulazioni precedenti, la gelatina è stata solubilizzata a 60 °C, temperatura necessaria per superare la transizione sol-gel del materiale e ottenere una soluzione omogenea prima dell'aggiunta del PEG.

Il terzo gruppo di formulazioni ha riguardato l'impiego della gomma xantana, alla concentrazione di 3% w/v, sempre in combinazione con PEG al 2% w/v, testata sia in acqua sia nella miscela

acqua:etanolo 9:1. La gomma xantana è stata dispersa lentamente sotto agitazione, per evitare la formazione di grumi, fino a completa idratazione, prima dell'aggiunta del PEG.

Le ultime due formulazioni testate hanno previsto la realizzazione di una miscela ternaria composta da gomma xantana 2,5% w/v, PEG 2% w/v e alginato 1% w/v, in acqua e nella miscela acqua:etanolo 9:1. La gomma xantana e l'alginato sono stati co-solubilizzati sotto agitazione fino a ottenere una soluzione omogenea, alla quale è stato successivamente aggiunto il PEG.

Successivamente si è proceduto alla preparazione di idrogel a base di alginato funzionalizzat con colorant fuorescent, con l'obietvo di valutarne l'applicabilità nella rilevazione di impronte digitali latent. Sono state testate tre diverse formulazi oni, otenute addizionando alla matrice di alginato diferent combinazioni e quanttà di reagent colorant:

-Formulazione 1: alginato + 1 ml di DFO + 1 µl di Diamond Dye;

-Formulazione 2: alginato + 1 ml di DFO + 1µl di Diamond Dye;

-Formulazione 3: alginato + 0,5 ml di DFO + 0,5 ml di Acridine Orange (AO).

In tute e tre le formulazioni è stato necessario l'impiego di etanolo come co -solvente, poiché i reagent utlizzat (DFO, Diamond Dye e Acridine Orange) sono scarsamente solubili in ambiente acquoso e richiedono un solvente organico per la loro completa solubilizzazione e per garantre una correta dispersione all'interno della matrice polimerica.

Il DFO (1,8-diazafuoren -9-one) è un reagente sensibile agli amminoacidi, chimicamente analogo alla ninidrina, ampiamente utlizzato in ambito forense per lo sviluppo di impronte digitali latent su superfci porose , grazie alle sue proprietà fuorocromiche , partcolarmente utle su superfci multcolori dove lo sfondo potrebbe interferire con la successiva fotografa. Il DFO reagisce con la componente amminoacidica presente nei residui di sudore lasciat dall'impronta, dando origine a un derivato fuorescen te stabile; l'eccitazione a circa 470 nm produce un'emissione fuorescente intorno a 570 nme il metodo risulta rilevabile sia soto luce diurna sia soto luce UV o LED. Rispeto alla tradizionale ninidrina, il DFO ofre generalmente una sensibilità di rilevazione superiore [17].

Il Diamond Dye è un colorante fuorescente per acidi nucleici, sviluppato come alternatva sicura e non cancerogena al bromuro di etdio, comunemente impiegato per la colorazione di DNA nei gel di eletroforesi. Nell'ambito della rilevazione forense, quest o colorante si lega seletvamente al DNA (touch DNA) eventualmente presente nei residui cellulari depositat insieme all'impronta digitale, rendendo possibile la visualizzazione delle impronte anche su superfci non assorbent tramite osservazione in fuo rescenza. Il suo impiego consente quindi, in linea di principio, di unire in un unico passaggio l'analisi datloscopica e quella genetca della traccia [18].

L’ Acridine Orange (AO) è un colorante fuorescente catonico, storicamente impiegato in citologia e biologia molecolare per la colorazione di acidi nucleici (con diferente fuorescenza per DNA e RNA), e successivamente adotato anche in ambito forense co me reagente per l'intensifcazione della

fuorescenza di impronte digitali, in partcolare in combinazione con tecniche di sviluppo su superfci non porose (ad esempio dopo fuming con cianoacrilato) o per la rilevazione di tracce ematche latent [19].

Le tre formulazioni precedentemente descrite sono state successivamente processate secondo due diverse modalità di fabbricazione, al fne di otenere struture tridimensionali idonee alla successiva analisi.

Una prima parte di ciascuna formulazione è stata impiegata come materiale per la stampa tramite estrusione, utlizzando la stampante BIOX6. Le matrici così stampate sono state successivamente immerse in un bagno di cloruro di calcio per un tempo di retcol azione di circa 15 minut, necessario a garantre una gelifcazione completa e omogenea della strutura. Al termine del processo di stampa e retcolazione si sono otenut dei costrut tridimensionali con geometria a cuscineto (pad), risultato della deposizione strato su strato del materiale secondo il patern di stampa impostato.

Parallelamente, una seconda parte delle medesime formulazioni è stata invece colata manualmente, tramite siringa, all'interno di piastre Petri, e sotoposta anch'essa a retcolazione per immersione nel bagno di cloruro di calcio. Questo secondo approccio ha permesso di otenere delle matrici che riproducono, in linea di massima, la forma della piastra utlizzata come stampo; le dimensioni fnali risultano tutavia leggermente ridote rispeto al diametro originale della Petri, per efeto della parziale contrazione della matrice polimerica durante il processo di retcolazione, dovuta all'assorbimento degli ioni calcio e alla conseguente riorganizzazione della rete polimerica.

3.2-materiali sintetici

Parallelamente alle formulazioni a base di biopolimeri naturali, è stata condotta una serie di prove sperimentali finalizzate alla messa a punto di un idrogel sintetico a base di alcol polivinilico (PVA), reticolato chimicamente mediante acido citrico (CA), con l'obiettivo di individuare la composizione e le condizioni di processo ottimali per ottenere una matrice stabile, adatta ai successivi sviluppi del lavoro di tesi.

Nella prima prova è stata preparata una soluzione di PVA al 15% w/v, disciolto in acqua a 140 °C soto agitazione fno a completa solubilizzazione del polimero. Parallelamente, l'acido citrico (1% w/v) è stato disciolto separatamente in soluzione acquosa e successivamente aggiunto alla soluzione di PVA. La miscela così otenuta è stata posta in stufa a 105 °C per 10 minut, al fne di promuovere la reazione di retcolazione tra i gruppi ossidrilici del PVA e i gruppi carbossilici dell'acido citrico, tramite formazione di legami esterei.

Al termine del tratamento termico, il campione è stato lasciato rafreddare e successivamente riposto in frigorifero. Tutavia, il risultato otenuto non è stato soddisfacente: il materiale si presentava privo di consistenza struturale, disciogliendosi l eteralmente tra le mani durante la manipolazione. Tale esito è verosimilmente atribuibile a una retcolazione incompleta o

insufciente, forse dovuta alla pre -solubilizzazione dell'acido citrico in soluzione separata, che potrebbe averne ridoto la reatvità o la concentrazione efetva a contato con le catene di PVA.

Sulla base dell'esito negatvo della prima prova, è stata condota una seconda formulazione, questa volta aggiungendo l'acido citrico (1% w/v) diretamente alla soluzione di PVA, senza previa solubilizzazione separata. Anche in questo caso il campione è stato posto in stufa a 105 °C per 10 minut.

A diferenza della prova precedente, il campione è stato lasciato rafreddare a temperatura ambiente, senza essere riposto in frigorifero. Questa seconda formulazione ha fornito un risultato netamente migliore: la retcolazione è avvenuta in maniera compl eta, con formazione di una matrice struturalmente stabile e coesa. Il pH del campione, misurato al termine del processo, è risultato compreso tra 4 e 5, coerentemente con la natura acida dell'agente retcolante impiegato. Questo risultato ha permesso di individuare, nell'aggiunta direta dell'acido citrico alla soluzione di PVA, una condizione preferenziale rispeto alla pre-solubilizzazione separata.

Al fne di valutare l'efeto della concentrazione dell'agente retcolante sul grado di retcolazione otenuto, è stata condota una terza prova, aumentando la percentuale di acido citrico al 3% w/w, aggiunto diretamente alla soluzione di PVA al 15% w/v. In questo caso, il tratamento termico è stato condoto a una temperatura più elevata, pari a 140 °C, per una durata di 15 minut.

Il risultato otenuto, tutavia, non è risultato otmale: una volta estrato dalla stufa, il composto ha mostrato una marcata tendenza al raggrinzimento superfciale. Tale comportamento è verosimilmente riconducibile all'eccessiva temperatura di tratamen to, che può aver causato una perdita troppo rapida e non omogenea di acqua dalla matrice, con conseguente collasso parziale della strutura del gel durante l'essiccazione.

Poiché per le fnalità applicatve del lavoro di tesi, relatve alla rilevazione di impronte digitali mediante colorant solubili in etanolo, si è provato a introdurre quest'ultmo all'interno del composto.

Nella prima soluzione, il PVA è stato disciolto al 15% w/v calcolato sul volume totale di 20 ml, utlizzando 15 ml di acqua distllata come base per la solubilizzazione a 140 °C. Alla soluzione così otenuta è stato quindi aggiunto PEG al 2%, e infne 5 ml di etanolo, versato con partcolare cautela, goccia a goccia, per evitare la formazione di agglomerat e garantrne la completa incorporazione all'interno del composto, accorgimento rivelatosi necessario, poiché un'aggiunta troppo rapida dell'etanolo tende a causare la separazione di fase e la mancata omogeneizzazione con la matrice polimerica.

Nella seconda soluzione, il PVA è stato disciolto sempre al 15% w/v, questa volta a partre da 13 ml di acqua, anch'essa a 140 °C; anche in questo caso è stato successivamente aggiunto PEG al 2%, seguito da una quanttà maggiore di etanolo, pari a 7 ml. In questa seconda formulazione, tutavia,

è risultata evidente la difcoltà nel disciogliere completamente l'elevato quanttatvo di etanolo introdoto, che non è stato incorporato in modo omogeneo all'interno del composto.

A entrambe le soluzioni è stato successivamente aggiunto acido citrico all'1% w/w, per la retcolazione in stufa a 105 °C per 10 minut, replicando le condizioni individuate come otmali nella seconda prova. Il pH di quest due campioni, misurato al termi ne del processo, è risultato compreso tra 5 e 6.

Complessivamente, tra tute le formulazioni testate, il risultato migliore è stato otenuto con la seconda prova, ovvero PVA al 15% w/v e acido citrico all'1% w/w, aggiunto diretamente alla soluzione senza pre-solubilizzazione, con tratamento termico in stufa a 105 °C per 10 minut. Tale formulazione ha garantto una retcolazione completa e una buona stabilità struturale del materiale, motvo per cui è stata scelta come base di partenza per la prosecuzion e del lavoro sperimentale, anche in vista della successiva incorporazione dell'etanolo necessaria per la fase applicatva relatva alla rilevazione delle impronte digitali.

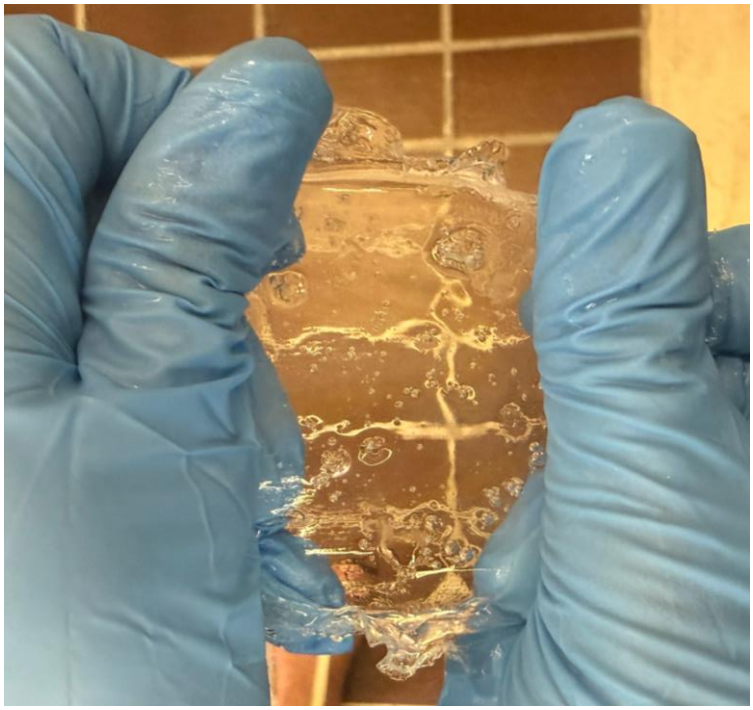


Fig. 11: PVA al 15% w/v, 1% CA risultato dopo averlo reidratato in acqua 10 minut

A partre dalla formulazione di PVA retcolato con acido citrico individuata come migliore nelle prove precedent (PVA 15% w/v + AC 1% w/w), sono state preparate tre ulteriori soluzioni, addizionate dei medesimi colorant fuorescent già impiegat nelle f ormulazioni a base di materiali biologici (DFO, Diamond Dye e Acridine Orange), con l'obietvo di valutare l'applicabilità della matrice sintetca di PVA alla rilevazione di impronte digitali latent.

-Soluzione 1: PVA 15% w/v + acido citrico 1% w/w, preparata a partre da 9 ml di H_2O, addizionata di 0,5 ml di DFO (concentrazione $5{,}20\times10^{-3}$ M) e di 0,5 ml di Acridine Orange (AO).

-Soluzione 2: PVA 15% w/v + acido citrico 1% w/w, preparata a partre da 9 ml di H2O addizionata di 1 ml di DFO e di 1 µl di Midori Green.
Soluzione 3: PVA 15% w/v + acido citrico 1% w/w, preparata a partre da 9 ml di H_2O, addizionata di 1 ml di DFO e di 1 µl di Diamond Dye (DD).

3.3-analisi con il sem

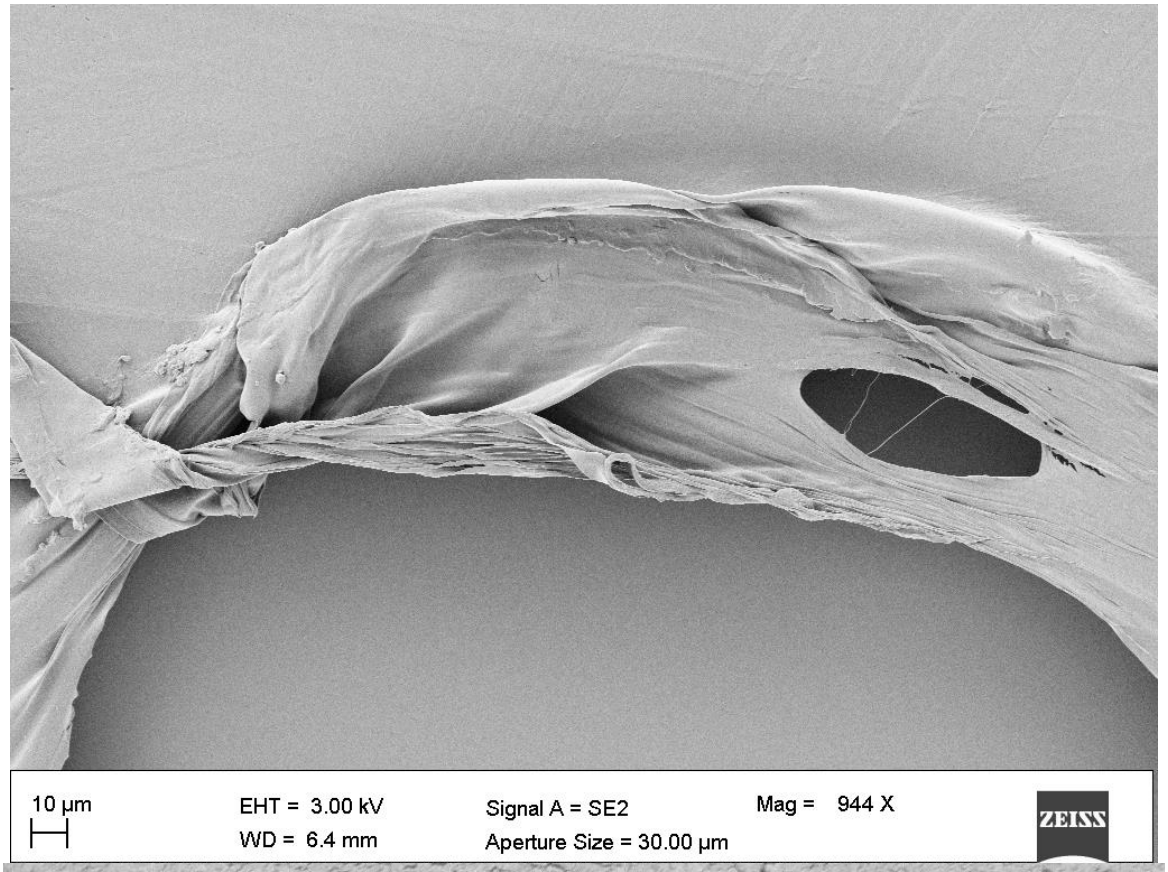
Al fine di caratterizzare la morfologia superficiale dei diversi materiali sviluppati nel corso del presente lavoro, i campioni sono stati sottoposti ad analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM).
Nello specifico, sono state analizzate quattro tipologie di campioni, rappresentative delle diverse composizioni testate nel corso della sperimentazione:
-PVA: flm di alcol polivinilico retcolato con acido citrico a 105 °C, corrispondente alla formulazione sintetca individuata come otmale nelle prove descrite nel capitolo relatvo ai materiali sintetci;
-COL SA: strato superiore di un costruto a strutura "sandwich", stampato utlizzando una miscela di alginato addizionata a dei colorant fuorescent per la rilevazione delle impronte digitali;
-NO COL SA: strato più profondo del medesimo costruto sandwich, avente la stessa composizione dello strato superiore, ma privo di colorant;
-COL: scafold stampato in strato singolo (non a strutura sandwich), con la medesima composizione del campione COL SA, utlizzato come confronto per valutare l'efeto della confgurazione multstrato sulla morfologia del materiale.

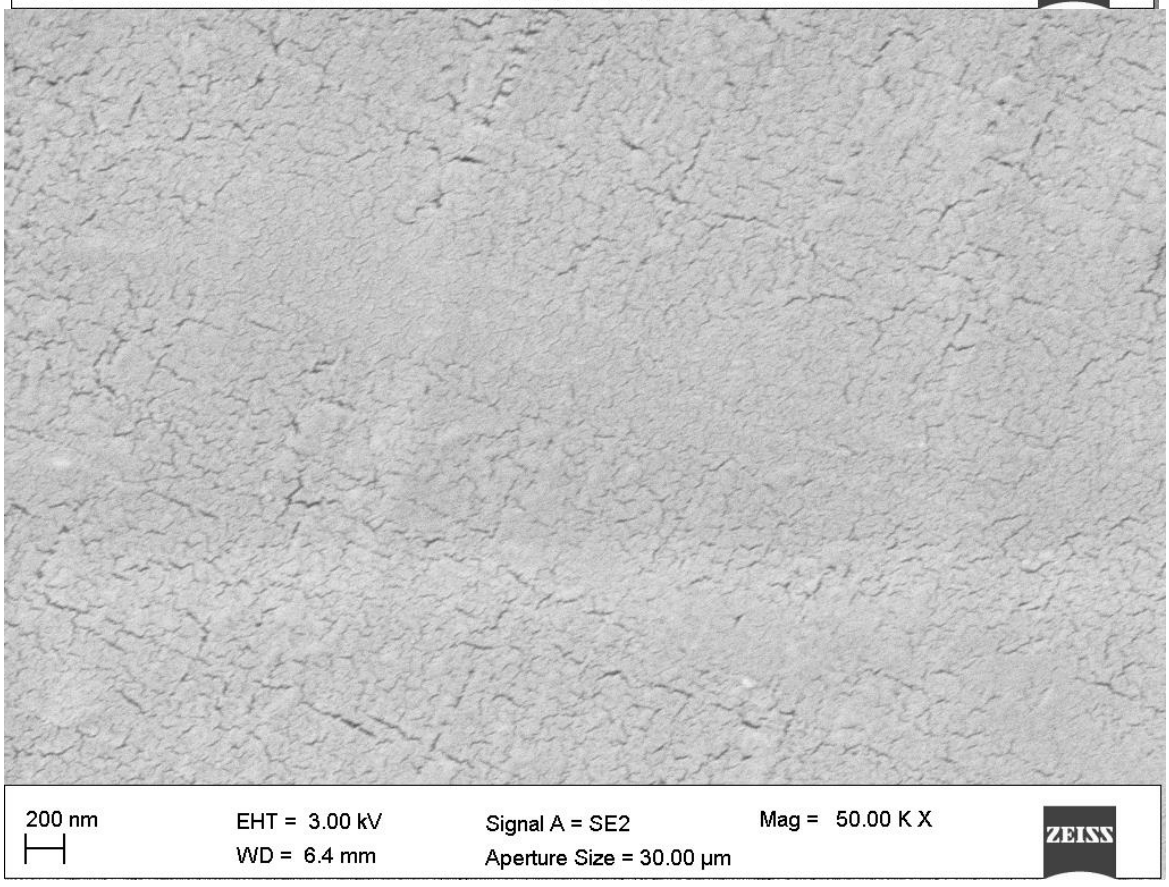
Ciascun campione è stato preventivamente essiccato e, trattandosi di materiali polimerici a bassa conducibilità elettrica, sottoposto a metallizzazione per sputtering con un sottile strato conduttivo di oro, al fine di migliorare il contrasto e la qualità dell'immagine durante l'osservazione, come descritto nel paragrafo dedicato alla metodica SEM.

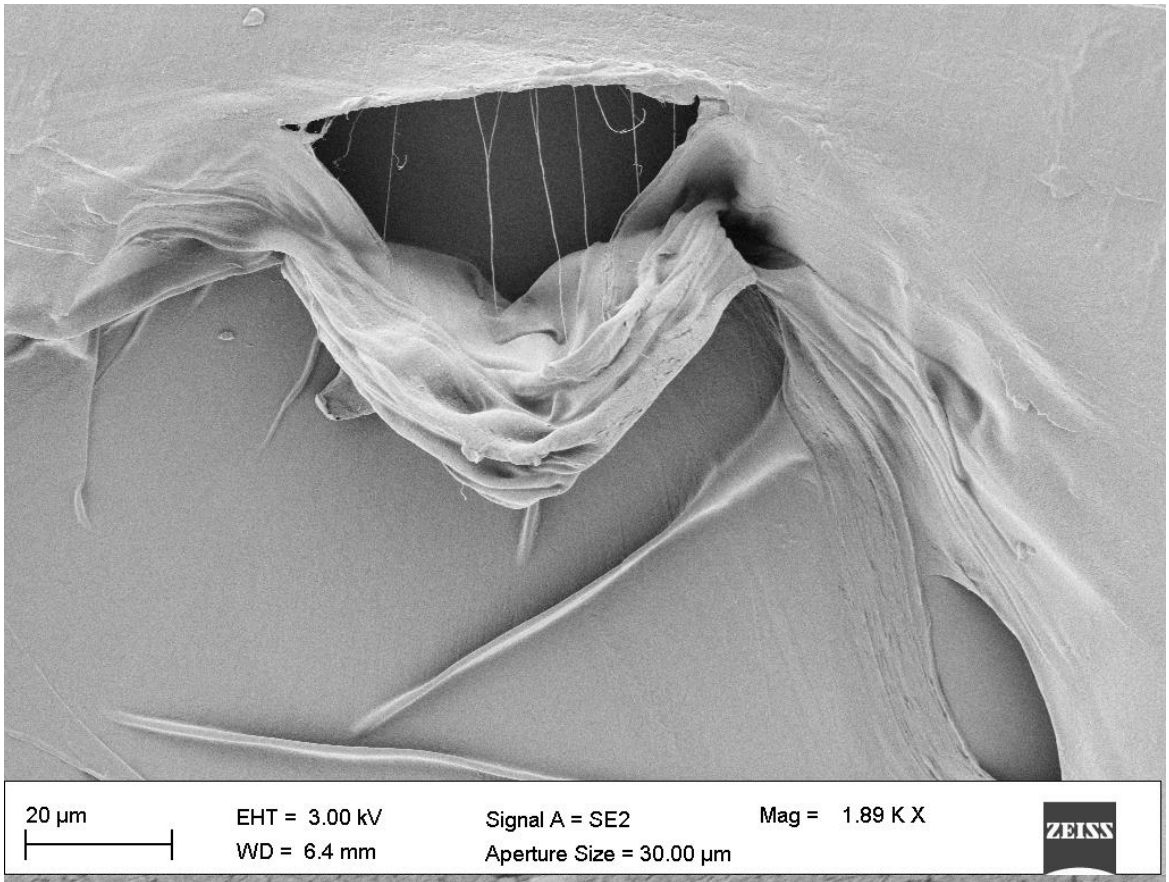
L'analisi morfologica mediante SEM è stata condota con l'obietvo di:
-valutare la topografa superfciale e la presenza di eventuale porosità nei diversi materiali, in relazione alla composizione (PVA sintetco vs. collagene/alginato naturale) e al metodo di retcolazione impiegato;
-confrontare la morfologia dello strato superiore (COL SA) e dello strato più profondo (NO COL SA) all'interno della medesima strutura sandwich, per verifcare eventuali diferenze morfologiche legate alla presenza dei colorant fuorescent o alla posizi one dello strato all'interno del costruto multstrato;
-confrontare la confgurazione a strato singolo (COL) con lo strato superiore della strutura sandwich (COL SA), a parità di composizione, al fne di valutare l'eventuale infuenza della confgurazione di stampa (sandwich vs. singolo strato) sulla morfologia superfciale del materiale.

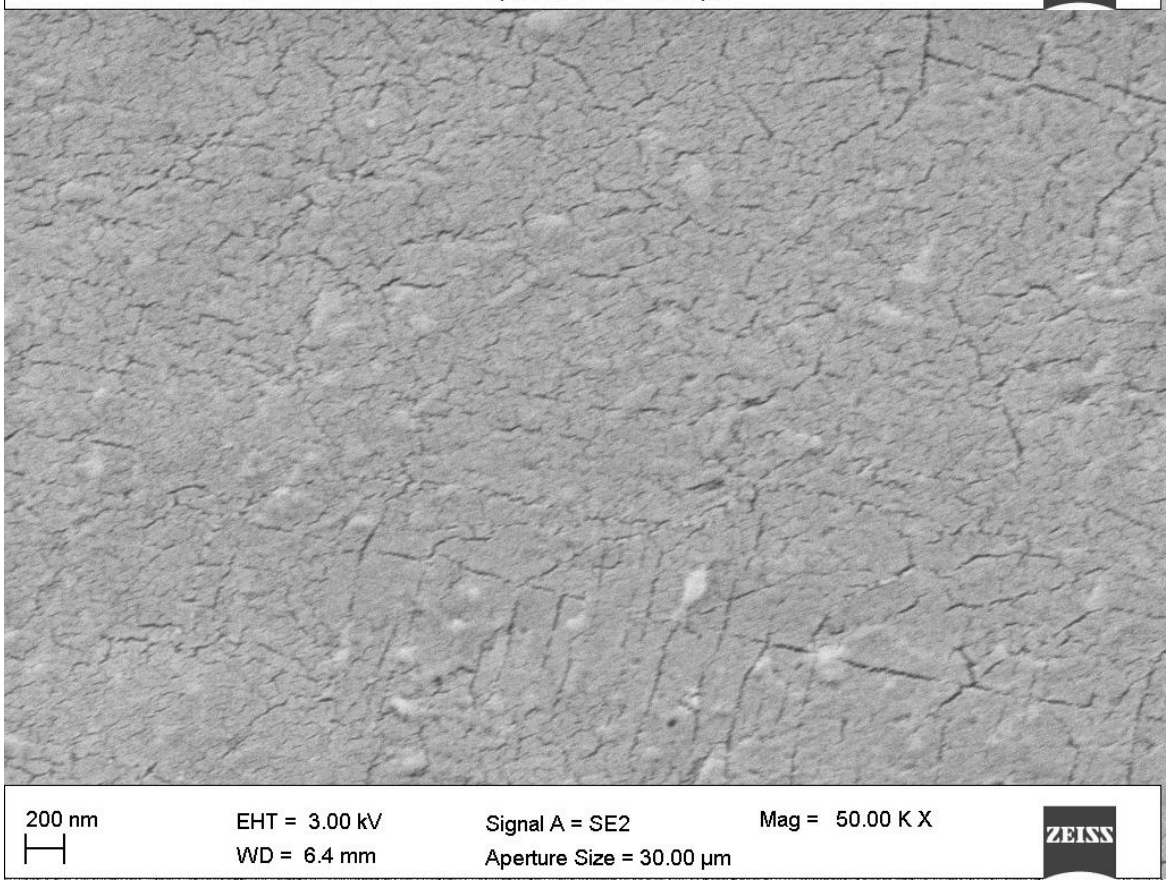
Di seguito vengono riportate e discusse le immagini SEM acquisite per ciascuna delle quattro tipologie di campione.

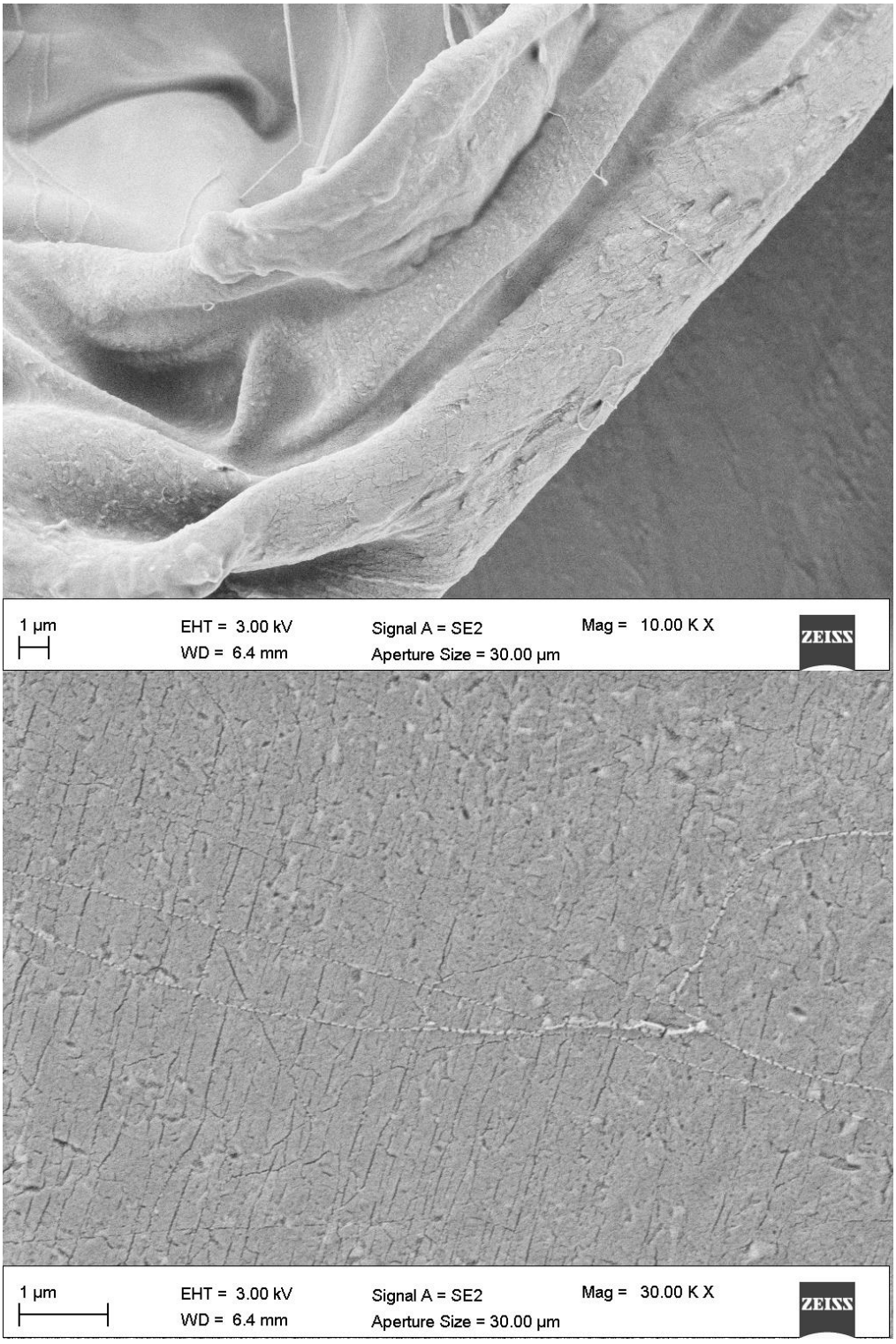
PVA — Film di PVA reticolato con acido citrico





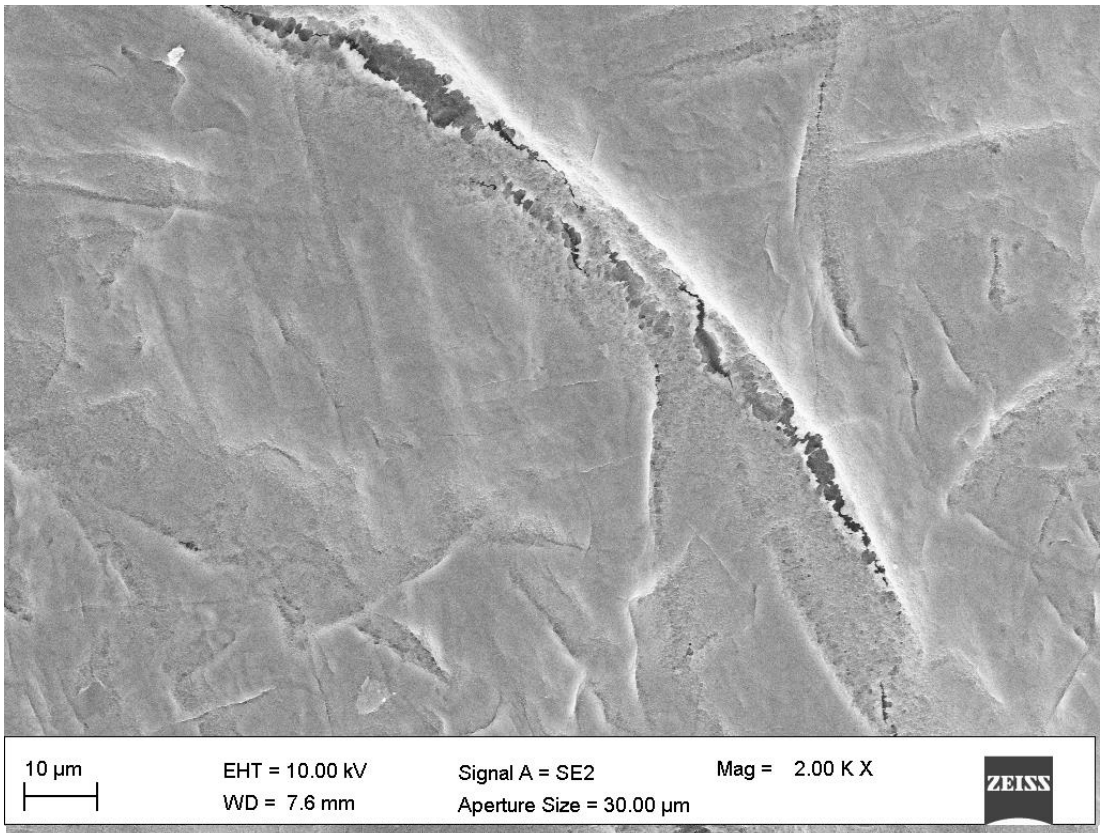

20 µm
EHT = 3.00 kV
WD = 6.4 mm
Signal A = SE2
Aperture Size = 30.00 µm
Mag = 1.89 K X
ZEISS

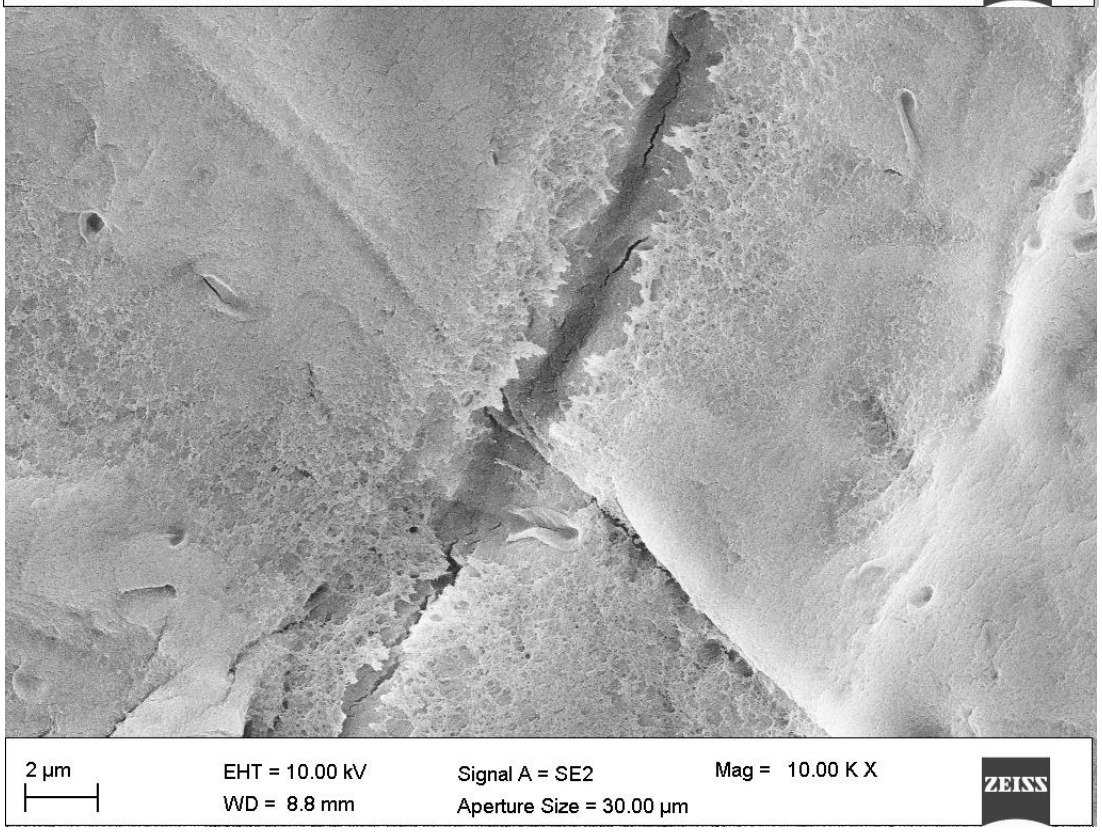

200 nm
EHT = 3.00 kV
WD = 6.4 mm
Signal A = SE2
Aperture Size = 30.00 µm
Mag = 50.00 K X
ZEISS

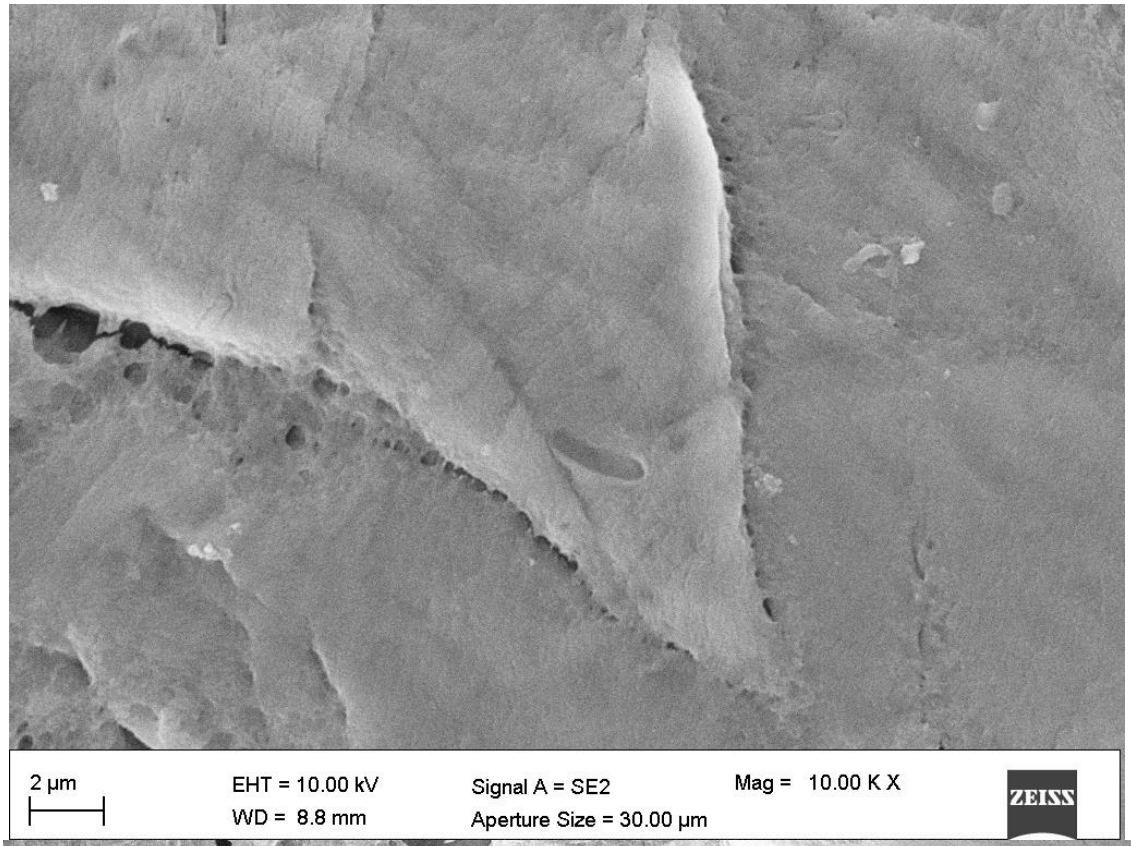


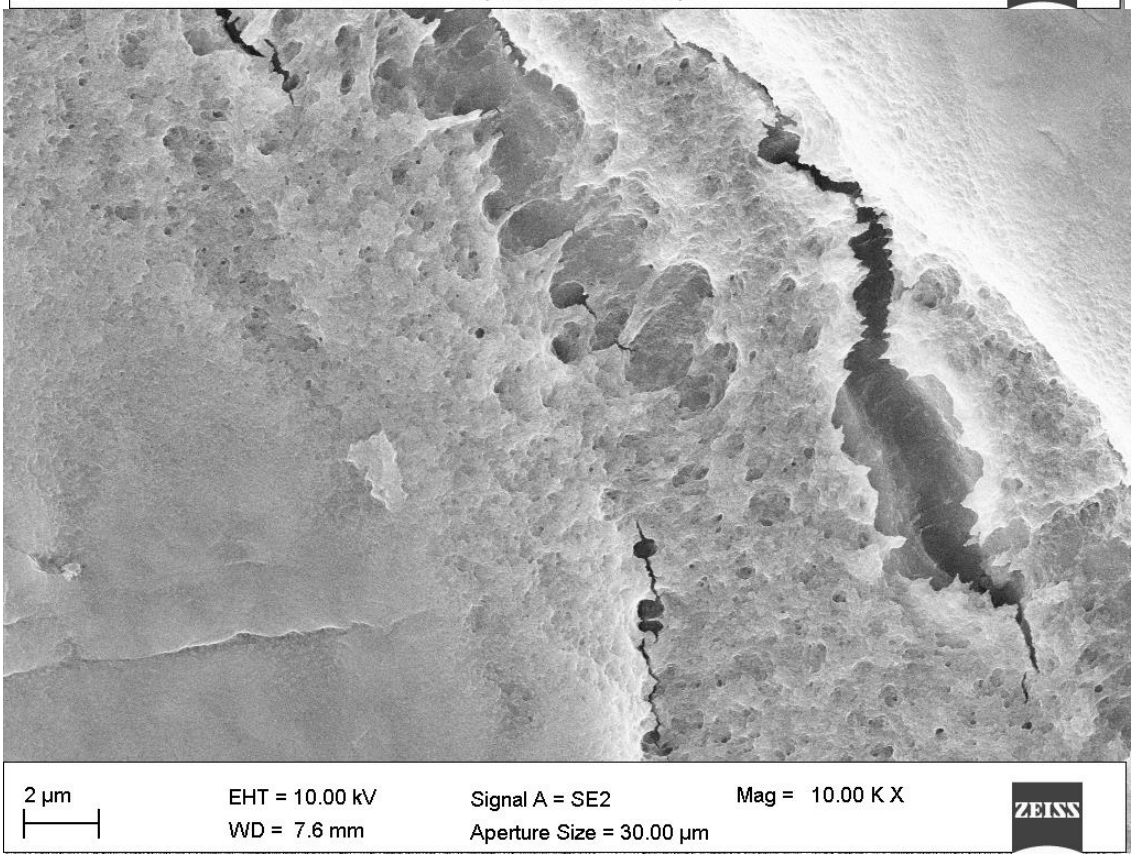
Nel complesso, le immagini SEM del campione **PVA** mostrano una superficie relativamente compatta e priva di porosità evidente, con una morfologia liscia ma non perfettamente omogenea: si osservano diffuse pieghettature e microincrespature superficiali (simili a piccole "grinze"), probabilmente dovute al processo di essiccazione/reticolazione in stufa, oltre ad alcune zone con lievi irregolarità o piccoli depositi/particolato sparso sulla superficie. Non si notano cricche marcate né una struttura a pori ben definiti come invece ci si aspetterebbe da una matrice idrogel altamente porosa: la superficie appare piuttosto densa e continua, coerente con un film polimerico reticolato compatto.

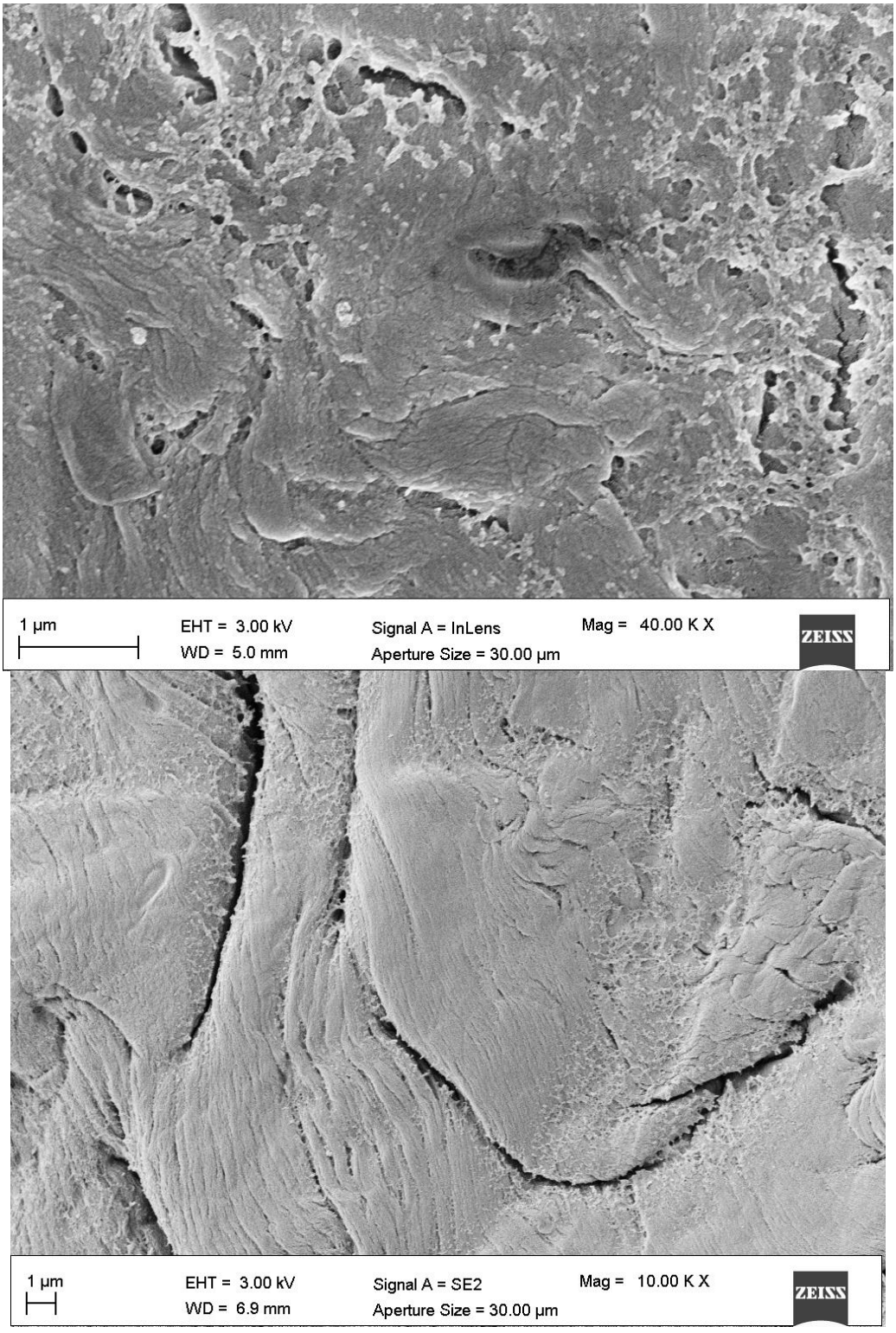
COL SA — Strato superiore del sandwich (alginato + coloranti)





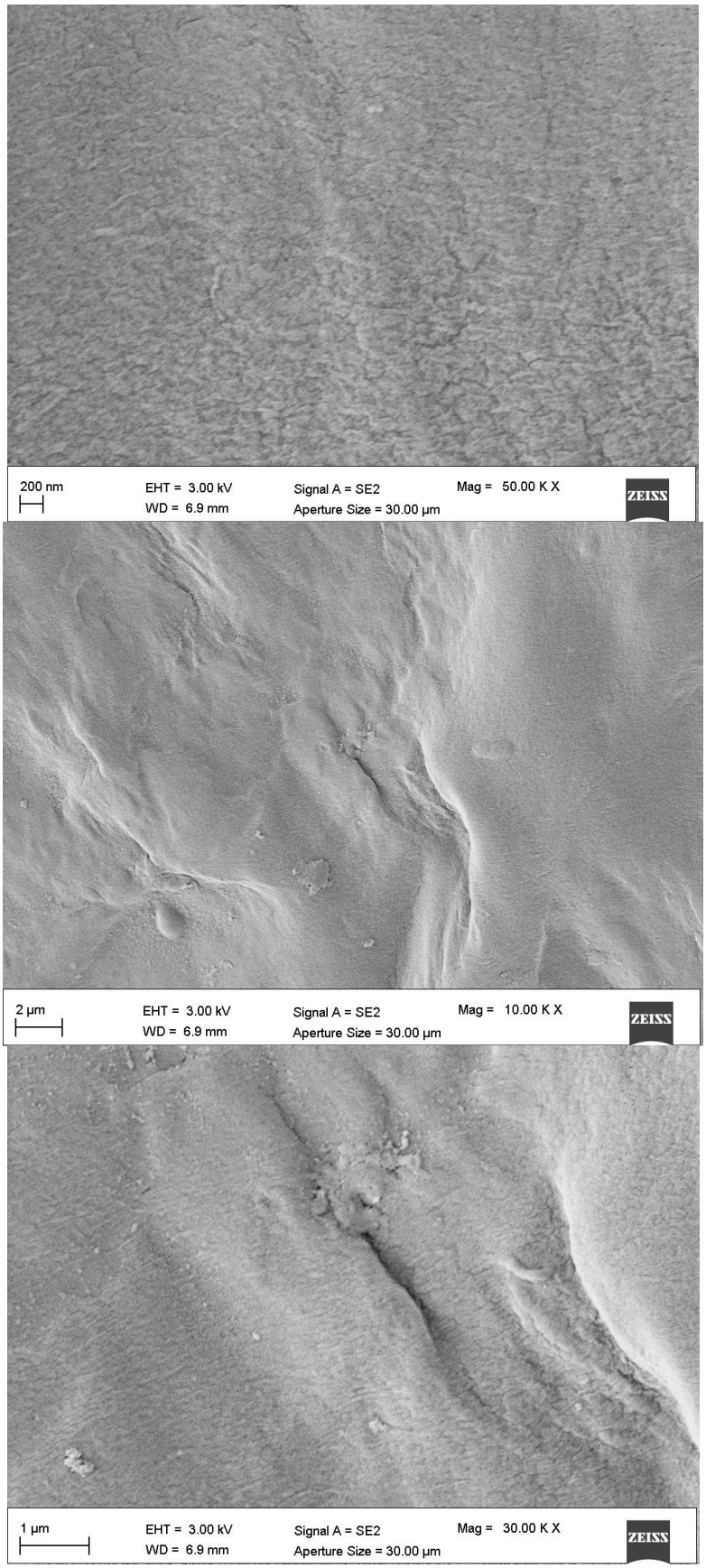

2 µm
EHT = 10.00 kV
WD = 8.8 mm
Signal A = SE2
Aperture Size = 30.00 µm
Mag = 10.00 K X
ZEISS


2 µm
EHT = 10.00 kV
WD = 7.6 mm
Signal A = SE2
Aperture Size = 30.00 µm
Mag = 10.00 K X
ZEISS



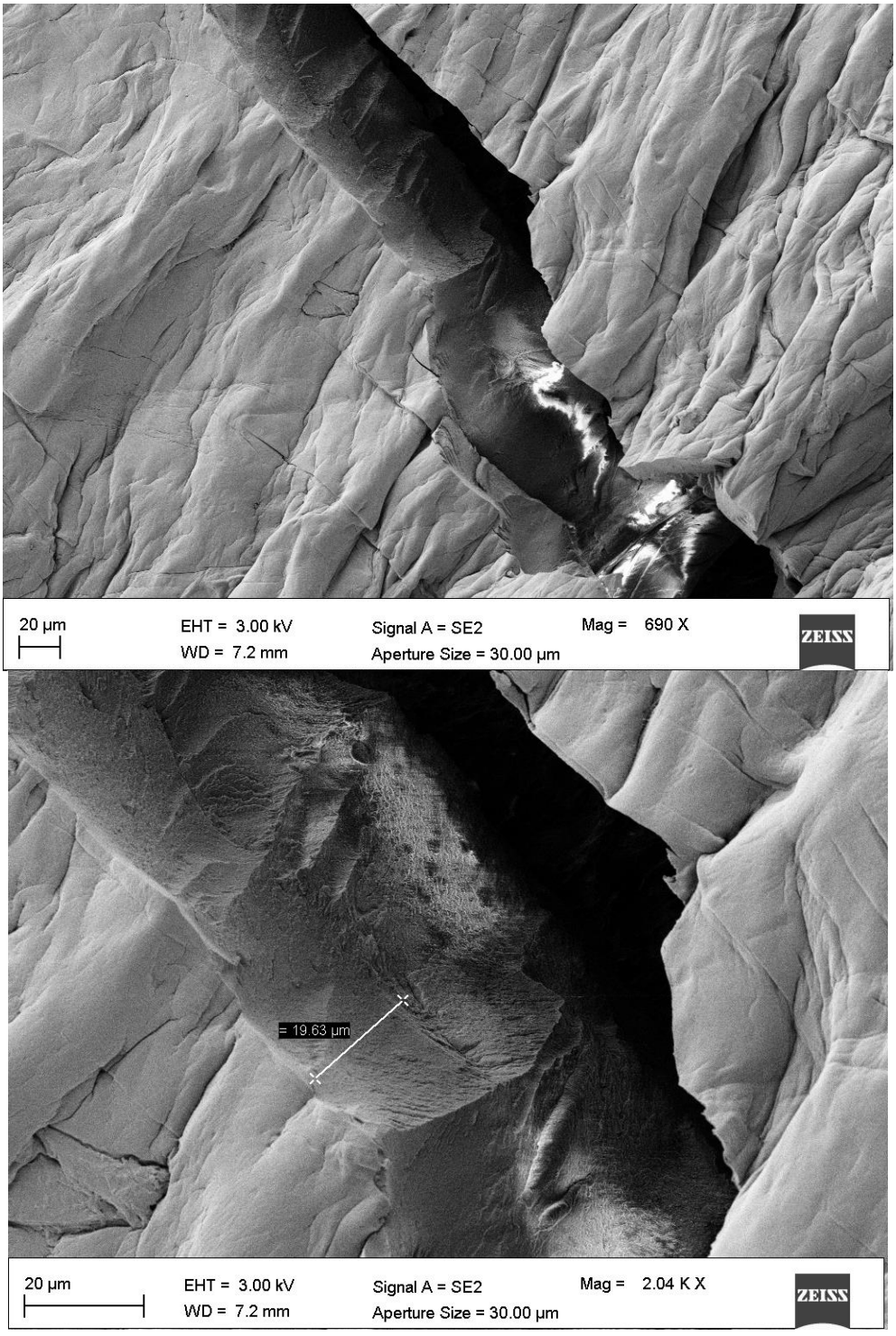
Rispetto al PVA (superficie densa, priva di porosità marcata), il COL SA presenta quindi una morfologia decisamente più porosa e disomogenea, in linea con la natura biopolimerica e con il processo di stampa a estrusione seguito da reticolazione in bagno di $CaCl_2$, che tende a generare strutture più irregolari rispetto a un semplice film polimerico sintetico essiccato in stufa.

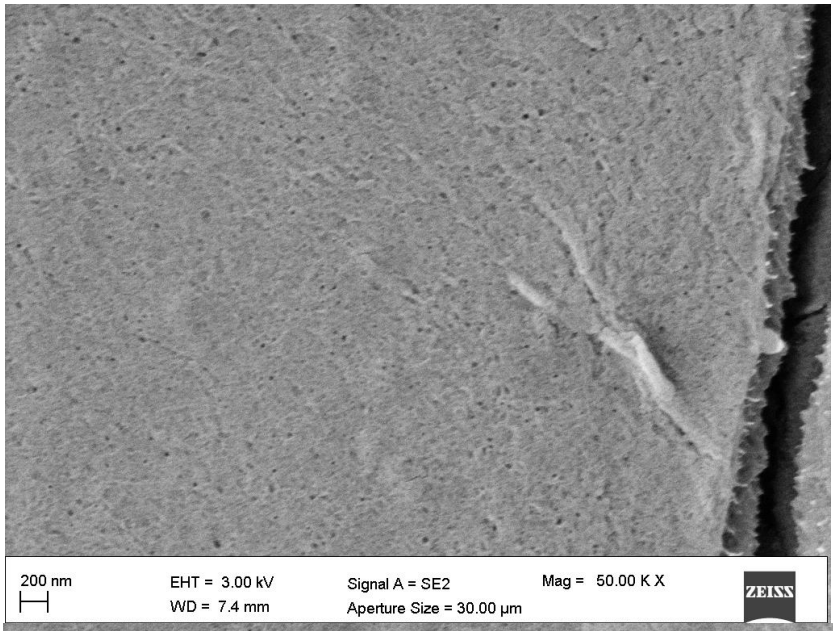
NO COL SA — Strato profondo del sandwich (alginato, senza coloranti)

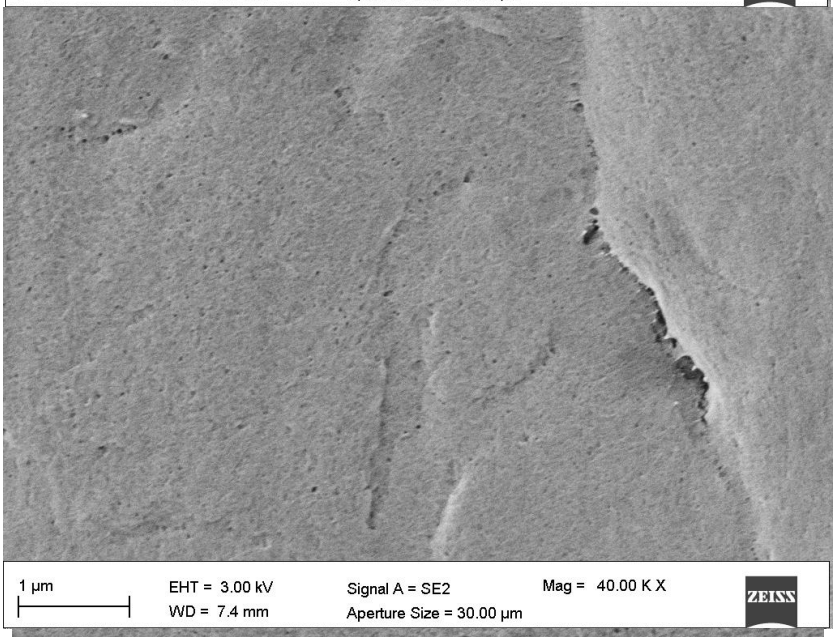


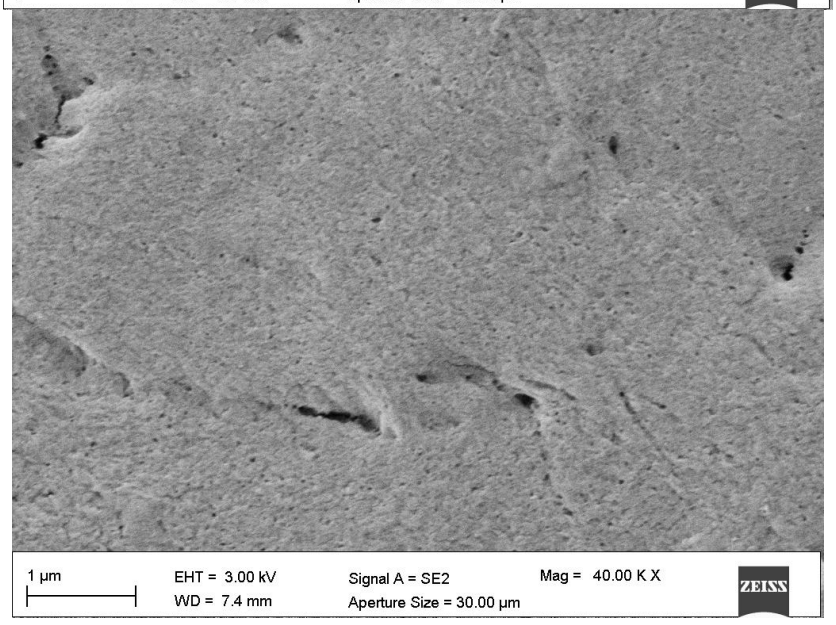
La differenza principale rispetto al COL SA riguarda l'assenza dei piccoli aggregati/particolato superficiale riconducibili ai coloranti: la superficie del NO COL SA appare quindi leggermente più "pulita" e omogenea, priva delle micro-inclusioni puntiformi osservate nello strato colorato

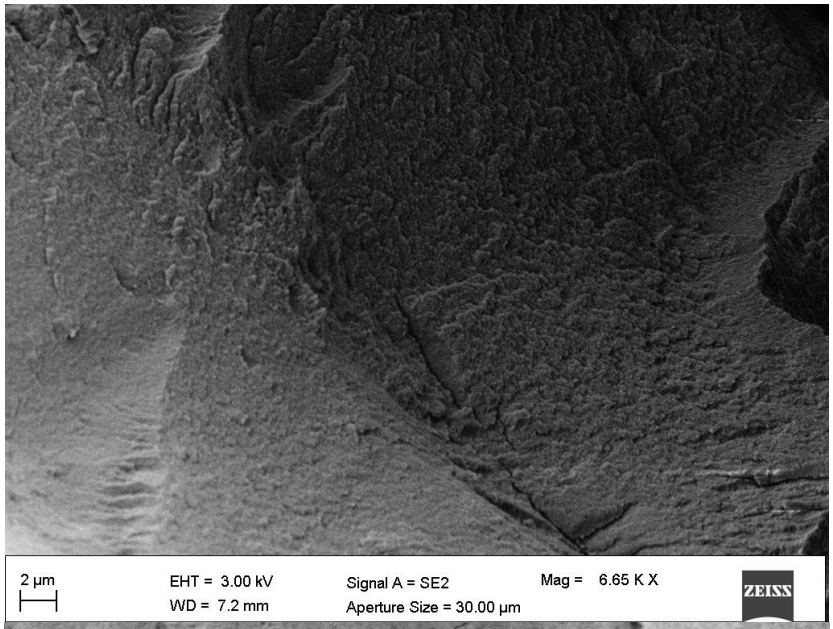
COL — Scaffold a strato singolo (stessa composizione di COL SA)

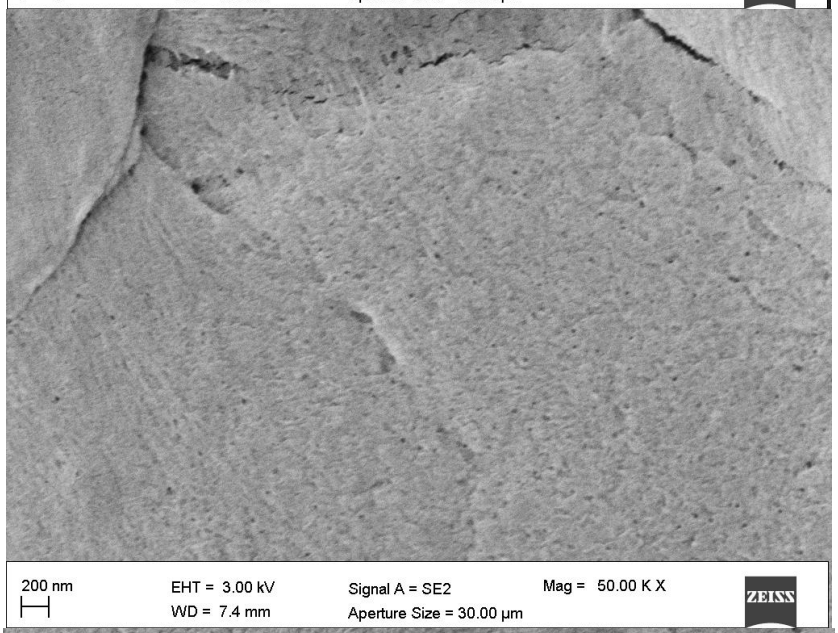


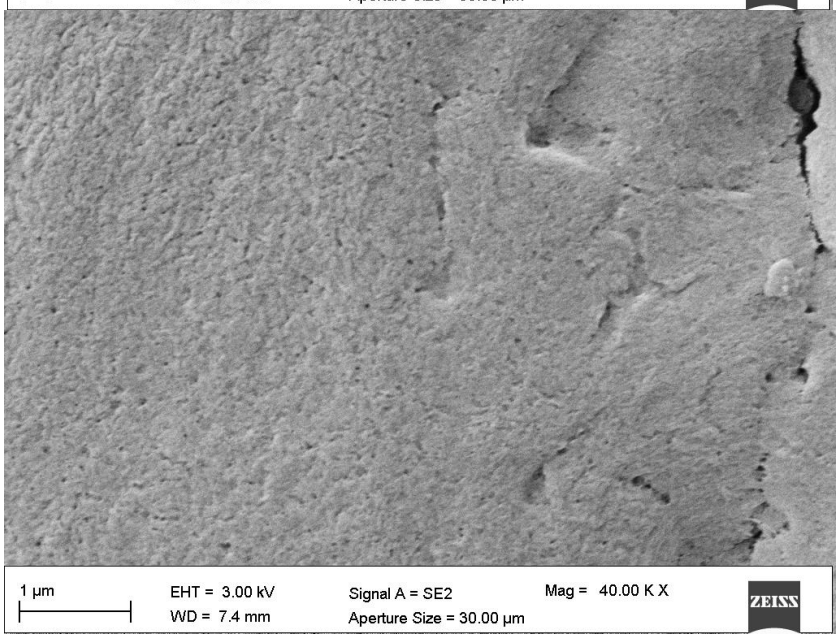

200 nm
EHT = 3.00 kV
WD = 7.4 mm
Signal A = SE2
Aperture Size = 30.00 µm
Mag = 50.00 K X
ZEISS


1 µm
EHT = 3.00 kV
WD = 7.4 mm
Signal A = SE2
Aperture Size = 30.00 µm
Mag = 40.00 K X
ZEISS


1 µm
EHT = 3.00 kV
WD = 7.4 mm
Signal A = SE2
Aperture Size = 30.00 µm
Mag = 40.00 K X
ZEISS


2 µm
EHT = 3.00 kV
WD = 7.2 mm
Signal A = SE2
Aperture Size = 30.00 µm
Mag = 6.65 K X
ZEISS


200 nm
EHT = 3.00 kV
WD = 7.4 mm
Signal A = SE2
Aperture Size = 30.00 µm
Mag = 50.00 K X
ZEISS


1 µm
EHT = 3.00 kV
WD = 7.4 mm
Signal A = SE2
Aperture Size = 30.00 µm
Mag = 40.00 K X
ZEISS

Microanalisi del campione COL SA

Spectrum: Acquisition

Element	Series	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Error (1 Sigma) [wt.%]
Carbon	K-series	29.18	38.79	48.07	5.08
Nitrogen	K-series	5.08	6.75	7.17	2.02
Oxygen	K-series	32.22	42.83	39.84	5.71
Sodium	K-series	0.57	0.75	0.49	0.09
Aluminium	K-series	1.28	1.70	0.94	0.13
Chlorine	K-series	1.27	1.69	0.71	0.13
Calcium	K-series	5.64	7.50	2.78	0.38
	Total:	75.23	100.00	100.00	

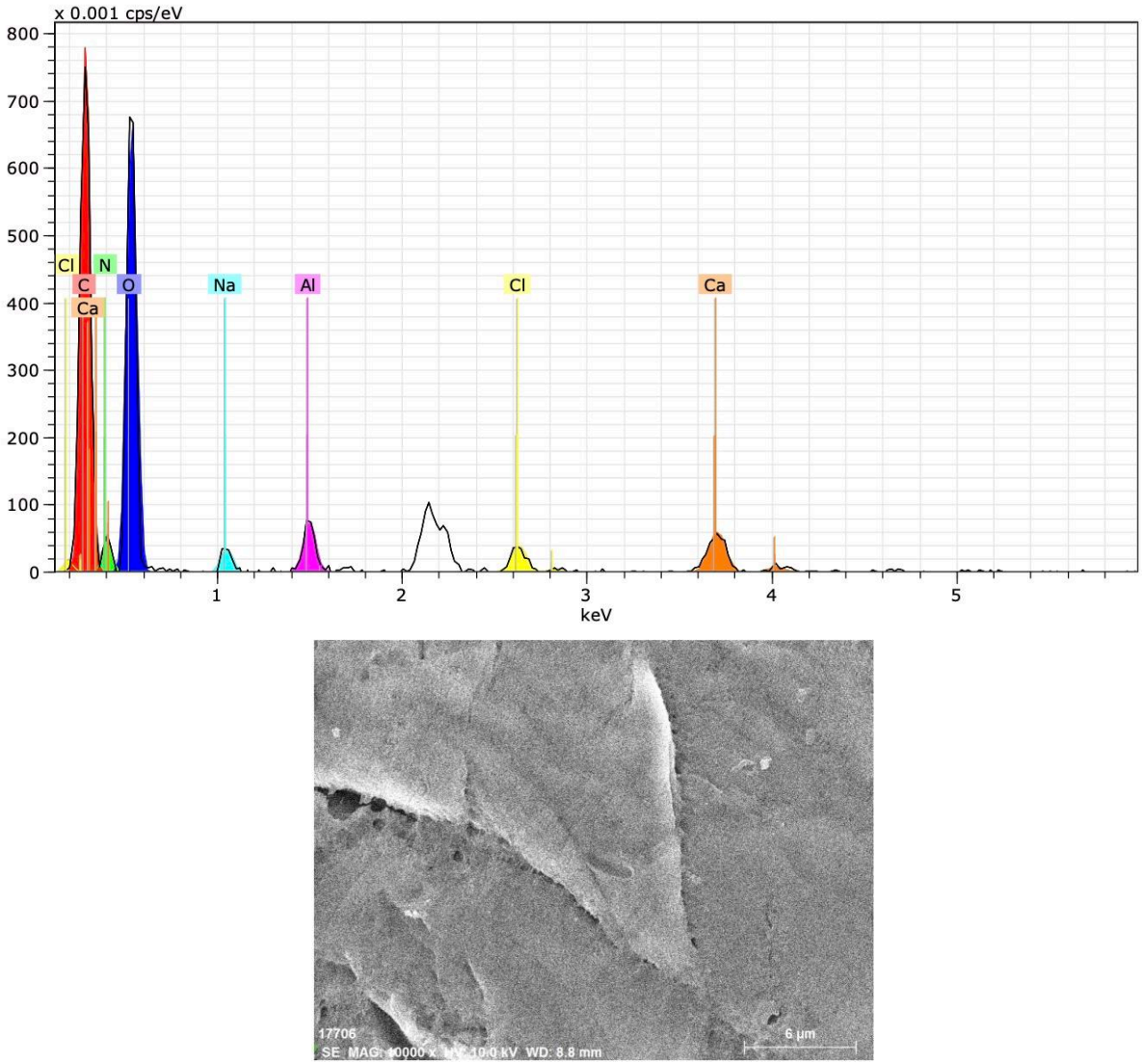
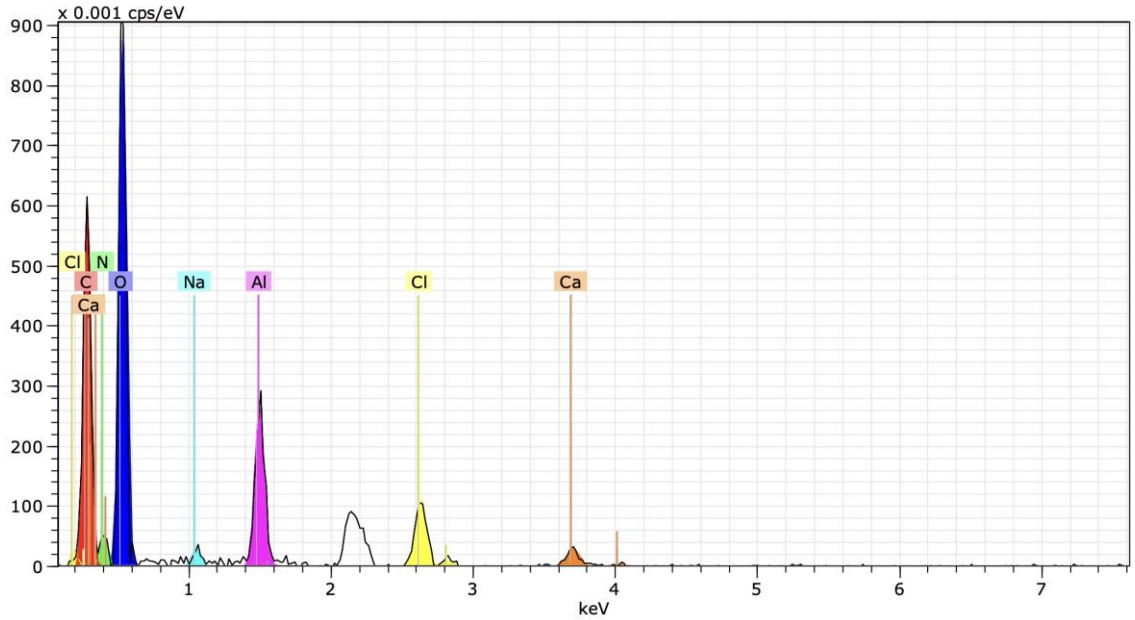


Fig. 12: Analisi EDS del campione COLSA. Sono riportati lo spettro caratteristico dei raggi X, la composizione elementare in peso e in percentuale atomica e l'immagine SEM della superficie analizzata

Spectrum: Acquisition

Element	Series	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Error (1 Sigma) [wt.%]
Carbon	K-series	26.80	34.20	43.32	4.92
Nitrogen	K-series	4.66	5.94	6.46	1.78
Oxygen	K-series	35.46	45.24	43.02	5.91
Sodium	K-series	0.66	0.85	0.56	0.11
Aluminium	K-series	5.12	6.53	3.68	0.32
Chlorine	K-series	3.41	4.35	1.87	0.22
Calcium	K-series	2.27	2.89	1.10	0.21
	Total:	78.37	100.00	100.00	



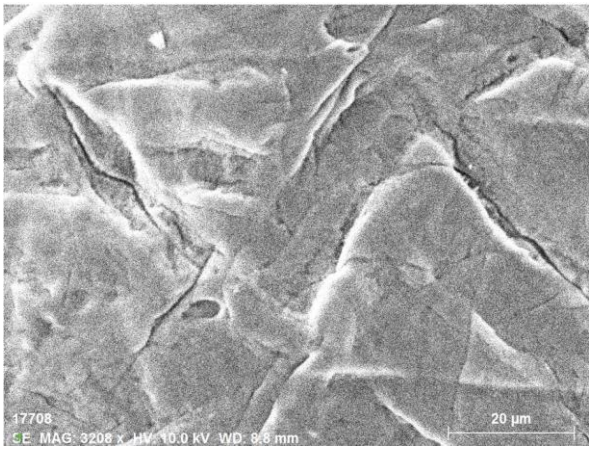


Fig. 13: Analisi EDS del campione COLSA. Sono riportati lo spettro caratteristico dei raggi X, la composizione elementare in peso e in percentuale atomica e l'immagine SEM della superficie analizzata

Spectrum: Acquisition

Element	Series	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Error (1 Sigma) [wt.%]
Oxygen	K-series	31.92	40.48	40.35	5.89
Carbon	K-series	25.05	31.77	42.18	5.38
Nitrogen	K-series	4.20	5.33	6.07	1.94
Aluminium	K-series	7.55	9.58	5.66	0.45
Chlorine	K-series	6.98	8.85	3.98	0.40
Sodium	K-series	0.45	0.57	0.40	0.09
Calcium	K-series	2.69	3.41	1.36	0.26
	Total:	78.84	100.00	100.00	

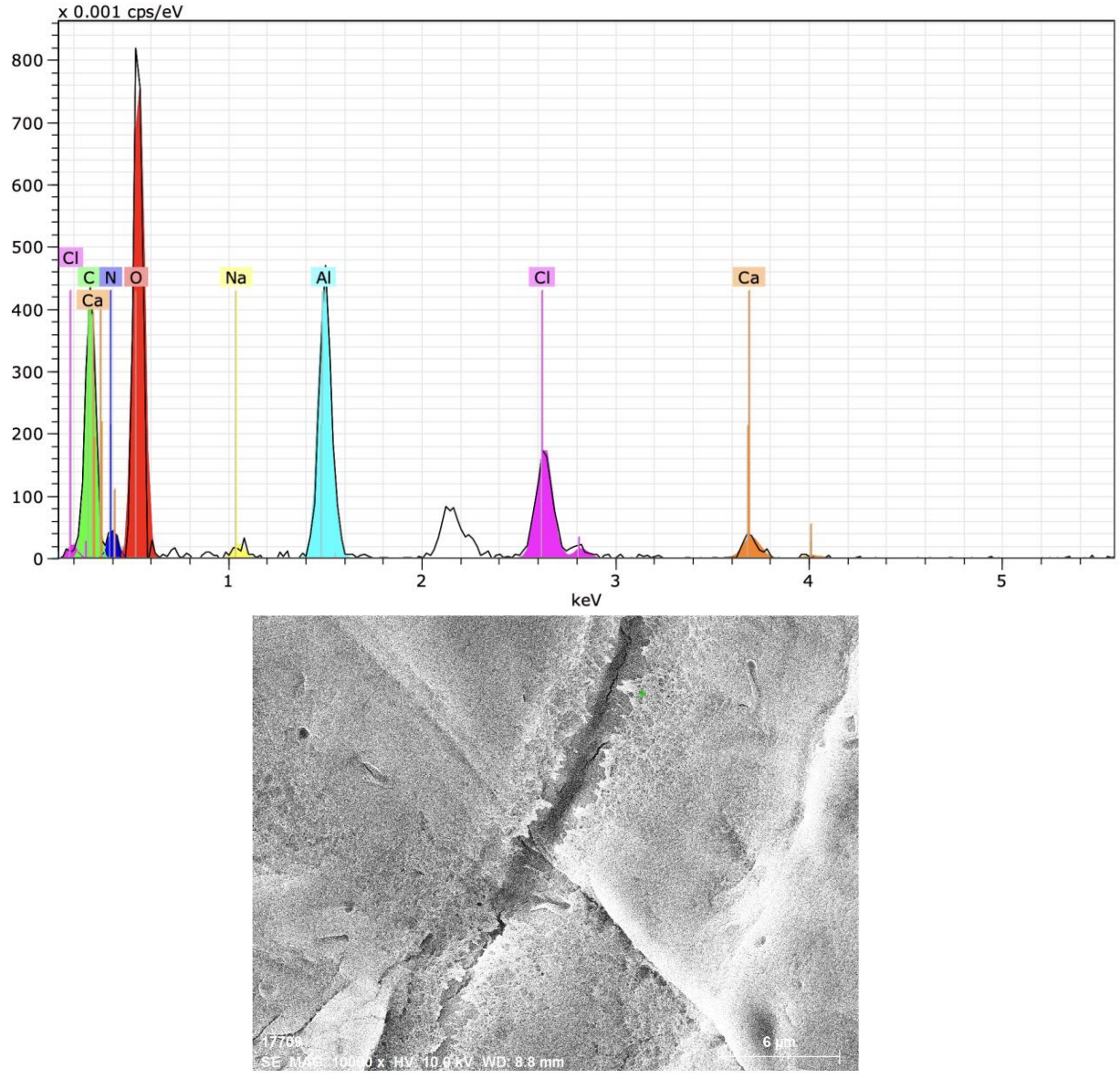


Fig. 14: Analisi EDS del campione COLSA. Sono riportati lo spettro caratteristico dei raggi X, la composizione elementare in peso e in percentuale atomica e l'immagine SEM della superficie analizzate

Capitolo 4 - Conclusioni

Il presente lavoro di tesi ha avuto l'obietvo di sviluppare e caraterizzare, in una fase preliminare, diverse matrici idrogel, di origine sia naturale (alginato, gelatna, gomma xantana) sia sintetca (PVA), funzionalizzate con colorant fuorescent seletvi, in vista di una possibile applicazione nella rilevazione di impronte digitali latent.

Sono state esplorate diverse formulazioni, variando composizione, concentrazioni e condizioni di retcolazione, e i materiali otenut sono stat processat sia tramite bioprintng a estrusione sia tramite colata manuale, per poi essere sotopost a una pr ima caraterizzazione morfologica mediante microscopia eletronica a scansione.

I risultat otenut costtuiscono un'indagine preliminare ed esploratva, utle a individuare le combinazioni più prometent tra quelle testate. Le diverse matrici verranno pertanto sotoposte, nelle fasi successive del progeto, a un'analisi più approfo ndita presso l'Università di Danzica, al fne di validarne in modo più rigoroso l'efetva applicabilità nell'ambito forense.

BIBLIOGRAFIA

[1] R. Kwok, R. Parson, S. Fieldhouse, L. Walton-Williams, "An evaluaton of two adhesive media for the recovery of DNA from latent fngermarks: A preliminary study", Forensic Science Internatonal, vol. 344, 2023, 111574.

(2] M. Zieger, C. Schneider, S. Utz, "DNA recovery from gelatn fngerprint lifers by direct proteolytc digeston", Forensic Science Internatonal, vol. 295, 2019, pp. 145 -149.

[3] S. Fieldhouse, E. Oravcoxa, L. Walton-Wiliams, "The efect of DNA recovery on the quality of latent fngermarks", Forensic Science Internatonal, vol. 257, 2016, pp. 78-88

[4] M. C. Gòmez-Guillén, B. Giménez, M. E. Lòpez-Caballero, M. P. Montero, "Functonal and bioactve propertes of collagen and gelatn from alternatve sources: A review", Food Hydrocolloids, vol. 25,2011, pp. 1813-1827.

[5] Edith van den Bosch, Constant Gielens "Gelatn degradaton at elevated temperature", Internatonal Journal of Biological Macromolecules, Volume 32, Issues 3 -5

[6] F. Garcia-Ochea, V. E Santos, J. A Casas, E. Gómez "Xanthan gum: producton, recovery, and propertes", Biotechnology Advances , Volume 18, Issue 7

[7] Nur Farisha S. Hussain, Sit Zafrah Zainal Abidin, Muhamad Kamil Yaakob, Sit Rudhziah Che Balian "Elucidatng the electronic structure, ionic transport and electrochemical characterizaton of agarose-based biopolymer electrolytes modulated by NaNO3 and NaPF6: A combined density functonal theory and experimental study", Solid State lonics, volume 443

[8] S. Arnot, A. Fulmer, W. E. Scot, I. C. M. Dea, R. Moorhouse, D. A. Rees, " The agarose double helix and its functon in agarose gel structure", Journal of Molecular Biology, vol. 90, 1974, pp. 269-284

[9] Colin I. Elliot, Theresa Stotesbury, "Encapsulaton of degraded DNA in alginate hydrogels: Rheological characterizaton, and applicability to forensic science", Science & Justce, Volume 66, Issue 2

[10] F. Mushtaq, Z. A. Raza, S. R. Batool, M. Zahid, O. C. Onder, A. Rafque, M. A. Nazeer,*Preparaton, propertes, and applicatons of gelatn -based hydrogels (GHs) in the environmental, technological, and biomedical sectors", Internatonal Journal of Biological Macromolecules, volume 218

[11]S. Yadav, G. Tejaswini, Fayiz Ul Haq, S. Pandey, R. R.J. Karande, A. Regre, P. Mohapatra, U. Kiran Roopavath, "Self-healing agarose-sucrose-borax hydrogel with ionic conductvity for 3D spheroid culture and microfuidic device fabricaton", Materials & Design, volume 267

[12] Chai W, An Y, Wang X, Yang Z, Wei Q. Optmizaton of SA -Gel Hydrogel Printng Parameters for Extrusion-Based 3D Bioprintng. Gels. 2025 Jul 17;11(7):552. doi : 10.3390/gels11070552. PMID: 40710713; PMCID: PMC12295643.

[13] Totani M, Nakamichi A, Kadokawa JI. Enzymatc Assembly of Chitosan -Based Network Polysaccharides and Their Encapsulaton and Release of Fluorescent Dye. Molecules. 2024 Apr 16;29(8):1804. doi: 10.3390/molecules29081804. PMID: 38675624; PMCID: PMC11052119.

[14] CELLINK (BICO), BIO X6 3D Bioprinter – documentazione tecnica del produtore. (www.cellink.com)

[15] panelYichen Tian, Yanan Li, Mengyuan Xu, Wenjie Li, Hailin Cong, Bing Yu, “Polyvinyl alcohol Hydrogels: Structure, Preparaton, Modifcaton Strategies and Biomedical Applicatons ”, Europea Polymer Journal Volume 244,

[16] Yanet Rodríguez Herrero, ... Aman Ullah, “Characterizaton of biobased materials ", advanced applicatons of biobased materials

[17] Pounds, C. A., Grigg, R., & Mongkolaussavaratana, T. (1990). The Use of 1,8-Diazafuoren -9-one (DFO) for the Fluorescent Detecton of Latent Fingerprints on Paper. A Preliminary Evaluaton. *Journal of Forensic Sciences*, 35(1), 169–175.

[18] Czarnomska, M., Lewkowicz, A., Gruszczyńska, E., Walczewska-Szewc, K., Gryczyński, Z., Bojarski, P., & Steinborn, S. (2024). Preliminary Investgaton of a Potental Optcal Biosensor Using the Diamond™ Nucleic Acid Dye Applied to DNA and Fricton Ridge Analysis from Fingerprint Traces. *Biosensors*, 14(11), 546.

[19] Riadi, R., et al. (2024). The Discovery of Forensics Chemistry: Latent Fingerprints. *Internatonal Journal of Chemistry Educaton* , 1(1), 7–13.