

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PAVIA  
FACOLTÀ DI INGEGNERIA  
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA CIVILE E ARCHITETTURA  
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA

## TESI DI LAUREA

# CUSTOMIZZAZIONE DI UNA STAMPANTE 3D FDM PER L'EROGAZIONE DI ALGINATO DI SODIO PER BIOINK

Candidato: **FRANCA SCOCOZZA**  
MAT **441679**

Relatore: Dott. **MICHELE CONTI**  
Correlatore: Ing. **STEFANIA MARCONI**

---

A.A. 2015/2016

*“Non ho alcun talento particolare. Sono solo appassionatamente curioso.”*  
*Albert Einstein*

# Sommario

La Fused Deposition Modeling (FDM) è uno dei processi di stampa 3D più diffusi grazie non solo alla sua facilità di utilizzo, semplicità e adattabilità del sistema, ma anche ai costi di produzione relativamente bassi. La FDM permette di realizzare parti o oggetti di elevato grado di complessità in un singolo e semplice processo che offre grande libertà all'utente. La tecnologia FDM si contraddistingue nel panorama della stampa 3D per la più ampia ed eterogenea gamma di materiali processabili, che spaziano dai polimeri termoplastici ad alte prestazioni meccaniche come Peek<sup>®</sup> o Ultem<sup>®</sup>, a quelli biocompatibili come Acido Polilattico e Policaprolattone, fino agli elastomeri tra cui i poliuretani. Il meccanismo di estrusione tipico di queste stampanti è limitato all'utilizzo con filamenti termoplastici con un grado di morbidezza non inferiore a circa 50 Shore A. Ciò non consente di processare materiali altamente viscosi come siliconi o idrogel, materiali per cui è necessario ricorrere a sistemi di estrusione a pressione.

Più in generale, la stampa 3D ha trovato grande sviluppo sia in ambito biomedicale per la produzione di impianti e protesi, sia nel campo dell'ingegneria dei tessuti per la produzione di scaffold, realizzati con polimeri termoplastici biocompatibili o con materiali ad elevata viscosità come gli idrogel. In questi composti è possibile incapsulare componenti cellulari come cellule, fattori di crescita e farmaci. Tale processo, chiamato Bioprinting, è in continua evoluzione: la disponibilità di bioplotter 3D a basso costo sostiene l'accesso al bioprinting promuovendo la ricerca, anche, se ad oggi, permangono le limitazioni soprattutto legate alla citotossicità cellulare della stampa e la sopravvivenza biologica a lungo termine.

Alla luce di quanto detto il presente lavoro ha previsto la customizzazione di una stampante 3D con tecnologia FDM (3ntr A4v2 della JdealForm) per l'estrusione di soluzioni viscosi come idrogel al fine di realizzare bioink, soluzione basata su un idrogel adatti all'incapsulamento di cellule. In particolare, una volta verificata l'adattabilità del sistema a stampare soluzioni viscosi sono stati realizzati bioink a base di idrogel composti da alginato di sodio, al quale è stato aggiunto un copolimero (la gelatina) a diverse concentrazioni ed incapsulate delle cellule tumorali immortalizzate (HeLa) o cellule di neuroblastoma umano (SH-5YSY). Individuata la concentrazione cellulare che ottimizza proliferazione e vitalità e la concentrazione di alginato e gelatina che ottimizzano il processo di stampa, è stato realizzato il bioink e estruso utilizzando la stampante FDM customizzata per verificare se il processo di stampa inficia la vitalità cellulare e conseguentemente la proliferazione.

Dai risultati emerge che la stampante FDM customizzata permette di stampare soluzio-

ni viscosi come idrogel e altri materiali garantendo buona risoluzione e ripetibilità della forma. Il sistema risulta adattabile a qualsiasi stampante commerciale che integra la tecnologia FDM permettendo l'utilizzo di tutti gli strumenti CAD e di slicing previsti dal tradizionale processo di stampa FDM e inoltre, risulta adeguato alla stampa di cellule, in particolare HeLa e SH-SY5Y, evitandone il danneggiamento e quindi utilizzabile, dopo opportune modifiche che ne migliorino la sterilità, per future applicazioni biologiche nell'ambito del Bioprinting come testing, drug discovery e sviluppo di nuovi modelli cellulari per lo studio di malattie.

# Struttura della tesi

Il documento è stato suddiviso in sei capitoli.

- Nel capitolo introduttivo è riportata un'analisi di letteratura sulla tecnologia FDM e sul Bioprinting con particolare attenzione sui sistemi a estrusione.
- Nel secondo capitolo è descritto il processo di customizzazione che ha previsto sia modifiche hardware che software della stampante 3D che integra tecnologia FDM presente nel Proto-Lab dell'Università di Pavia, la FDM A4v2 (3ntr-Jdeal-Form, Oleggio,NO).
- Nel terzo capitolo sono descritte le caratteristiche e le applicazioni in ambito del Bioprinting degli idrogel focalizzando l'attenzione sull'alginato di sodio, idrogel che per le sue caratteristiche, è stato reputato il più adatto da utilizzare per questo lavoro di tesi.
- Nel quarto capitolo sono presentate le prove di risoluzione utilizzando una soluzione di alginato di sodio a diverse concentrazioni in modo da verificare l'adattabilità e l'affidabilità del sistema a erogare idrogel e individuare la concentrazione migliore di alginato di sodio a livello di stampabilità.
- Nel quinto capitolo si presenta la realizzazione del bioink a base di idrogel composto da alginato di sodio, al quale è stato aggiunto un copolimero (la gelatina) e cellule e i relativi test di vitalità e proliferazione cellulare condotti per individuare la composizione del bioink che ottimizza la proliferazione. È descritto, inoltre, il protocollo utilizzato per estrarre le soluzioni di bioink utilizzando sia un protocollo standard di laboratorio che utilizzando la stampante FDM customizzata per verificare se il sistema inficia la vitalità e proliferazione cellulare.
- Nel sesto e ultimo capitolo sono presentate le conclusioni e gli sviluppi futuri del lavoro.

# Indice

<b>Lista delle tabelle</b>	<b>VIII</b>
<b>Lista delle figure</b>	<b>XII</b>
<b>1 Introduzione</b>	<b>1</b>
1.1 Stampa 3D tramite tecnologia FDM . . . . .	1
1.2 Bioprinting . . . . .	3
1.2.1 Tecniche di Bioprinting . . . . .	6
1.2.2 Stato dell'arte e punto di vista commerciale . . . . .	9
1.2.3 Processo di Bioprinting . . . . .	14
1.2.4 Limiti del Bioprinting . . . . .	14
1.3 Scopo del lavoro . . . . .	15
<b>2 Customizzazione di una stampante 3D FDM</b>	<b>16</b>
2.1 Stampante FDM 3ntr A4 . . . . .	16
2.2 Customizzazione della stampante FDM 3ntr A4 per l'erogazione di idrogel	17
2.2.1 Componenti dell'estrusore . . . . .	17
2.2.2 Modifiche hardware . . . . .	22
2.2.3 Modifiche software . . . . .	25
<b>3 Idrogel di alginato di sodio</b>	<b>28</b>
3.1 Gli idrogel . . . . .	28
3.2 L' alginato di sodio . . . . .	29
3.2.1 Composizione molecolare e proprietà . . . . .	29
3.2.2 Formazione dell'idrogel di alginato: metodo di gelificazione . . . . .	30
3.2.3 Applicazioni biomediche dell'alginato . . . . .	32
3.2.4 Vantaggi e svantaggi nell'utilizzo dell'alginato . . . . .	32
3.2.5 Il nostro utilizzo dell'alginato . . . . .	33
<b>4 Stampa di alginato di sodio</b>	<b>34</b>
4.1 Verifica stampabilità dell'alginato . . . . .	34
4.2 Verifica relazione tra la variazione della quantità di filamento da estrudere e lo spessore estruso . . . . .	35

4.3	Prove di risoluzione . . . . .	35
4.4	Prove di ripetibilità . . . . .	36
4.5	Risultati . . . . .	37
4.5.1	Verifica stampabilità dell'alginato . . . . .	37
4.5.2	Verifica relazione tra la variazione della quantità di filamento da estrudere e lo spessore estruso . . . . .	38
4.5.3	Prove di risoluzione . . . . .	39
4.5.4	Prove di ripetibilità . . . . .	50
4.5.5	Conclusioni . . . . .	54
4.6	Limiti e possibili risoluzioni . . . . .	54
4.7	Utilizzo del software Slic3r . . . . .	55
<b>5</b>	<b>Estrusione di bioink a base di alginato di sodio</b>	<b>57</b>
5.1	Considerazioni preliminari sul bioink . . . . .	58
5.1.1	Test di proliferazione . . . . .	58
5.2	Estrusione del bioink utilizzando il sistema customizzato: vitalità cellulare	63
5.2.1	Preparazione dell'esperimento . . . . .	63
5.2.2	Estrusione del bioink . . . . .	63
5.2.3	Risultati . . . . .	63
5.2.4	Limiti e possibili soluzioni . . . . .	64
<b>6</b>	<b>Conclusioni e sviluppi futuri</b>	<b>65</b>
6.1	Conclusioni . . . . .	65
6.2	Sviluppi futuri . . . . .	66
	<b>Bibliografia</b>	<b>68</b>

# Elenco delle tabelle

1.1	Biostampanti commerciali: tecnologia su cui si basano, materiali e costo. . . . .	13
2.1	Specifiche motore passo passo NEMA 17 della pompa peristaltica. . . . .	19
2.2	Specifiche tubo di silicone. . . . .	20
2.3	Specifiche ugello stampante in 3D mediante stampante polimerica. . . . .	21
3.1	Esempi di applicazioni dell'alginate in ambito biomedico. . . . .	32
3.2	Vantaggi e svantaggi nell'utilizzo dell'alginate. . . . .	32
4.1	Verifica della <b>stampabilità dell'alginate</b> : confronto tra le dimensioni attese ed erogate. . . . .	37
4.2	Verifica <b>relazione tra la variazione della quantità di filamento da estrarre e lo spessore estruso</b> : lunghezza e spessore delle quattro strisce di 15 mm erogate variando la quantità equivalente di materiale estruso e mantenendo costante la velocità di estrusione a [50 mm/min]. . . . .	39
4.3	Risultati relativi alle <b>circonferenze</b> stampate con <b>alginate di sodio al 2%</b> di concentrazione con diametro decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa crescente. La misura del diametro riportata si riferisce al diametro più esterno, mentre lo spessore è stato calcolato considerando la differenza tra il diametro esterno e interno. . . . .	41
4.4	Risultati relativi ai <b>quadrati</b> stampati con <b>alginate di sodio al 2%</b> di concentrazione con lato decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa crescente. La misura del lato riportata si riferisce al lato più esterno, mentre lo spessore è stato calcolato considerando la differenza tra il lato esterno e interno. I valori tratteggiati implicano che la forma risultante è un quadrato pieno. . . . .	42
4.5	Risultati relativi alle <b>griglie</b> stampate con <b>alginate di sodio al 2%</b> di concentrazione con ampiezza lato (l) e ampiezza celle (c) decrescente fissando la quantità equivalente di filamento estrusa a 0.1 mm. La misura dell'ampiezza dell'ampiezza lato riportata si riferisce al lato più esterno. . . . .	43

4.6	Risultati relativi alle <b>circonferenze</b> stampate con <b>alginato di sodio al 4%</b> di concentrazione con diametro decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa crescente. La misura del diametro riportata si riferisce al diametro più esterno, mentre lo spessore è stato calcolato considerando la differenza tra il diametro esterno e interno. . . . .	44
4.7	Risultati relativi ai <b>quadrati</b> stampati con <b>alginato di sodio al 4%</b> di concentrazione con lato decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa crescente. La misura del lato riportata si riferisce al lato più esterno, mentre lo spessore è stato calcolato considerando la differenza tra il lato esterno e interno. I valori tratteggiati implicano che la forma risultante è un quadrato pieno. . . . .	45
4.8	Risultati relativi alle <b>griglie</b> stampate con <b>alginato di sodio al 4%</b> di concentrazione con ampiezze del lato e delle celle . In questo caso la quantità equivalente di filamento estrusa è stata fissata a 0.2 mm. . . . .	46
4.9	Risultati relativi alle <b>circonferenze</b> stampate con <b>alginato di sodio al 4%</b> di concentrazione con diametro decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa crescente. La misura del diametro riportata si riferisce al diametro più esterno, mentre lo spessore è stato calcolato considerando la differenza tra il diametro esterno e interno. . . . .	48
4.10	Risultati relativi ai <b>quadrati</b> stampati con <b>alginato di sodio al 6%</b> di concentrazione con lato decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa crescente. La misura del lato riportata si riferisce al lato più esterno, mentre lo spessore è stato calcolato considerando la differenza tra il lato esterno e interno. Il valore tratteggiato implica che la forma risultante è un quadrato pieno. . . . .	49
4.11	Risultati relativi alle <b>griglie</b> stampate con <b>alginato di sodio al 4%</b> di concentrazione con ampiezze del lato e delle celle . La quantità equivalente di filamento estrusa è stata fissata a 0.1 mm. . . . .	50
4.12	Risultati relativi alle prove di <b>ripetibilità della circonferenza, del quadrato e della griglia</b> stampati con <b>alginato di sodio al 2%</b> di concentrazione. Sono riportate le minure nominali, le dimensioni estruse (le misure sono riferite al bordo più esterno della geometria), media e deviazione standard. . . . .	51
4.13	Risultati relativi alle prove di <b>ripetibilità della circonferenza, del quadrato e della griglia</b> stampati con <b>alginato di sodio al 4%</b> di concentrazione. Sono riportate le minure nominali, le dimensioni estruse (le misure sono riferite al bordo più esterno della geometria), media e deviazione standard. . . . .	52
4.14	Risultati relativi alle prove di <b>ripetibilità della circonferenza, del quadrato e della griglia</b> stampati con <b>alginato di sodio al 6%</b> di concentrazione. Sono riportate le minure nominali, le dimensioni estruse (le misure sono riferite al bordo più esterno della geometria), media e deviazione standard. . . . .	53
4.15	Limiti e possibili risoluzioni dell'erogazione di alginato di sodio con stampante FDM customizzata. . . . .	55

5.1	Prove di proliferazione delle cellule Hela incapsulate nel bioink a base di alginato di sodio e gelatina: nove differenti combinazioni di concentrazione della soluzione. . . . .	59
5.2	Prove di proliferazione delle cellule Hela e SH-SY5Y incapsulate nel bioink a base di alginato di sodio e gelatina al 4%, 2% e 1% di concentrazione. . .	62

# Elenco delle figure

1.1	Oggetti stampati utilizzando una stampante 3D che integra la tecnologia FDM [44]. . . . .	1
1.2	Processo di stampa con tecnologia FDM: 1) il materiale raggiunge la testina che scalda il filamento termoplastico permettendo la successiva estrusione tramite l'ugello, 2) il materiale è depositato sul piatto di stampa, 3) piatto di stampa è mobile in direzione z [6, 15]. . . . .	2
1.3	Slicing del modello 3D: (a) modello 3D, (b) scomposizione del modello in strati, (c) generazione codice g-code sulla base dei parametri di slicing, (d) stampa del materiale strato su strato. . . . .	3
1.4	Il Biofabrication, nell'ambito dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa, si divide in due approcci: Bioprinting e Bioassembly [28]. . . . .	4
1.5	Il bioink è stampato sul biopaper (strato gelatinoso): per realizzare la struttura 3D si alternano strati di bioink e biopaper finchè le cellule non si fondono e il biopaper si dissolve ottenendo il tessuto vivente finale [4]. . . . .	5
1.6	Classificazione delle tecniche di Bioprinting [9]. . . . .	6
1.7	Bioprinting basato sull'inkjet: (a) schema inkjet termica, (b) schema inkjet piezoelettrica [9]. . . . .	7
1.8	Schema Bioprinting basato sul laser [9]. . . . .	8
1.9	Schema Bioprinting basato sull'estrusione [9]. . . . .	9
1.10	Stampante Fab@Home modello 1 [6]. . . . .	10
1.11	Biostampanti: (a) Palmetto BioPrinter, (b) MtoBS [9]. . . . .	11
1.12	Biostampante MABP [9]. . . . .	12
1.13	Biostampanti commerciali: (a) NovoGen MMX Bioprinter™(Organovo) [9], (b) 3D Bioplotter® (EnvisionTEC) [9], (c) BioBot 1 (BioBot) [2], (d) INKREDIBLE/INKREDIBLE+ (Cellink) [2]. . . . .	13
1.14	Processo di Bioprinting. . . . .	14
2.1	Stampante 3ntr A4 con tecnologia FDM presente in Proto-Lab. . . . .	17
2.2	Interfaccia del software Repetier di gestione della stampante 3ntr: (a) collegamento al software Slic3r (quadrato rosso) per lo slicing dell'oggetto CAD, (b) codice g-code (quadrato rosso) generato sulla base dei parametri settati nel software Slice3r. . . . .	18

2.3	Pompa peristaltica: (a) disegni CAD del supporto che costituisce la pompa peristaltica, (b) vista laterale e (c) e retro del motore stepper e supporto assemblati, (d) focus del supporto realizzato in 3D con il tubo di silicone inserito nell'incavo, (e) copertura per fissare e evitare lo scioglimento del tubo durante il funzionamento. . . . .	19
2.4	Schema del principio di funzionamento della pompa peristaltica. . . . .	20
2.5	(a) CAD dell'ugello inserito a una delle due estremità del tubo, (b) ugello stampato inserito in una delle due estremità del tubo di silicone, (c) siringa precaricata della soluzione connessa alla seconda estremità del tubo di silicone. . . . .	21
2.6	Adattatore testina da fissare alla testina della stampante 3ntr A4v2: (a) CAD 3D, (b) realizzazione stampata in 3D. . . . .	22
2.7	Schema del set-up per l'estrusione di una soluzione viscosa come idrogel: (a) pompa peristaltica connessa alla stampante 3ntr A4v2, (b) tubo di silicone che preleva la soluzione durante il funzionamento della pompa, (c) siringa connessa al tubo precaricata di alginato, (d) ugello stampato in 3D, (e) adattatore fissato alla testina della stampante FDM. . . . .	23
2.8	Set-up per la customizzazione della stampante FDM 3ntr A4v2 per l'estrusione di una soluzione viscosa come idrogel. . . . .	24
2.9	Geometrie da estrarre realizzate tramite funzione MATLAB. Per ogni geometria è stato generato il codice g-code e sono state posizionate sul piatto di stampa nelle coordinate [7 163] mm a una distanza dal piatto di stampa di 1.3 mm. . . . .	27
2.10	Caricamento del g-code, generato in MATLAB, nel software Repetier e anteprima di stampa della geometria scelta. . . . .	27
3.1	Composizione chimica dell'alginato: (a) blocchi consecutivi di residui G (GGGGGG), (b) blocchi consecutivi di residui M (MMMMMM), (c) blocchi alternati di residui G e M (GMGMGM) [36]. . . . .	30
3.2	Crosslinking ionico per formare l'idrogel di alginato di sodio: solamente i blocchi dei residui di guluronato partecipano alla formazione del modello "egg-box" formando interstizi in cui sono collocati gli ioni calcio [36]. . . . .	31
4.1	Verifica <b>stampabilità dell'alginato</b> : (a) cerchio di diametro pari a 10 mm e quadrato di lato pari a 10 mm, (b) tre strisce di lunghezza pari a 15 mm aventi congiunzione sia lineare che obliqua, (c) griglia di ampiezza lato e celle pari a 15x15 mm e 5x5 mm rispettivamente. La quantità equivalente di filamento estrusa è stata fissata a 0.2 mm per il quadrato, circonferenza e strisce mentre per la griglia a 0.1 mm. La velocità è stata fissata a 90 mm/min per tutte le geometrie. . . . .	37

4.2	Verifica <b>relazione tra la variazione della quantità di filamento da estrudere e lo spessore estruso</b> : quattro strisce di lunghezza pari a 15 mm di alginato di sodio estruse al 2%, 4% e 6% di concentrazione mantenendo fissa la velocità a 50 mm/min e variando la quantità equivalente di materiale da estrudere $E$ . . . . .	38
4.3	Prova di <b>risoluzione della circonferenza</b> stampata utilizzando una soluzione di <b>alginato di sodio al 2%</b> di concentrazione con diametro ( $d$ ) decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) crescente. . . . .	40
4.4	Prova di <b>risoluzione del quadrato</b> stampato utilizzando una soluzione di <b>alginato di sodio al 2%</b> di concentrazione con lato ( $l$ ) decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) crescente. . . . .	41
4.5	Prova di <b>risoluzione della griglia</b> stampata utilizzando una soluzione di <b>alginato di sodio al 2%</b> di concentrazione con ampiezza lato ( $l$ ) e ampiezza celle ( $c$ ) decrescenti mantendo fissa la quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) a 0.1 mm. . . . .	42
4.6	Prova di <b>risoluzione della circonferenza</b> stampata utilizzando una soluzione di <b>alginato di sodio al 4%</b> di concentrazione con diametro ( $d$ ) decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) crescente. . . . .	44
4.7	Prova di <b>risoluzione del quadrato</b> stampato utilizzando una soluzione di <b>alginato di sodio al 4%</b> di concentrazione con lato ( $l$ ) decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) crescente. . . . .	45
4.8	Risultati relativi alle <b>griglie</b> stampate con <b>alginato di sodio al 4%</b> di concentrazione con ampiezza lato ( $l$ ) e ampiezza celle ( $c$ ) decrescente fissando la quantità equivalente di filamento estrusa a 0.1 mm. La misura dell'ampiezza dell'ampiezza lato riportata si riferisce al lato più esterno. . . . .	46
4.9	Prova di <b>risoluzione della circonferenza</b> stampata utilizzando una soluzione di <b>alginato di sodio al 6%</b> di concentrazione con diametro ( $d$ ) decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) crescente. . . . .	47
4.10	Prova di <b>risoluzione del quadrato</b> stampato utilizzando una soluzione di <b>alginato di sodio al 6%</b> di concentrazione con lato ( $l$ ) decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) crescente. . . . .	48
4.11	Risultati relativi alle <b>griglie</b> stampate con <b>alginato di sodio al 6%</b> di concentrazione con ampiezza lato ( $l$ ) e ampiezza celle ( $c$ ) decrescente fissando la quantità equivalente di filamento estrusa a 0.1 mm. La misura dell'ampiezza dell'ampiezza lato riportata si riferisce al lato più esterno. . . . .	49
4.12	Prova di <b>ripetibilità della circonferenza, quadrato e griglia</b> stampata utilizzando una soluzione di <b>alginato di sodio al 2%</b> di concentrazione mantenendo fissa la quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) a 0.1 mm. . . . .	51
4.13	Prova di <b>ripetibilità della circonferenza, quadrato e griglia</b> stampata utilizzando una soluzione di <b>alginato di sodio al 4%</b> di concentrazione mantenendo fissa la quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) a 0.1. . . . .	52

4.14	Prova di <b>ripetibilità della circonferenza, quadrato e griglia</b> stampata utilizzando una soluzione di <b>alginato di sodio al 6%</b> di concentrazione mantenendo fissa la quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) a 0.1. . .	53
4.15	Figure stampate di alginato di sodio al 4% di concentrazione sviluppando tramite software SolidWorks il modello 3D della geometria e generando automaticamente il codice g-code sulla base dei parametri settati tramite software di slicing Sli3r. . . . .	56
5.1	Risultati dei test di proliferazione delle cellule HeLa incapsulate all'interno di bioink a diverse concentrazioni di alginato di sodio e gelatina: (a) numero di cellule totali, nessuna differenza statistica tra i casi, (b) differenze statistiche rilevanti (* $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ ) aumentando la viscosità della soluzione.	60
5.2	Fotografie al microscopio per sovrintendere la crescita delle cellule HeLa al giorno 1 e al giorno 5 per il casi che hanno prodotto risultati migliori (2% alginato 2% gelatina), medi (1% alginato 1% gelatina) e peggiori (0% alginato 0% gelatina). . . . .	60
5.3	Test di proliferazione per individuare il numero ottimale di cellule da seminare per ml di soluzione: 75.000 cellule per ml ottimizza la proliferazione. .	61
5.4	Risultati del singolo test di proliferazione delle cellule HeLa e SH-SY5Y incapsulate all'interno di bioink al 4% di concentrazioni di alginato di sodio e gelatina: totale delle cellule proliferate, vive e morte. . . . .	62
5.5	Griglia di ampiezza lato pari a 15.146x15.146 mm e ampiezza celle pari a 4.664x4.664 stampata con bioink di alginato di sodio e gelatina al 4% di concentrazione e cellule: le misure sono comparabili con quelle ottenute stampando la soluzione di alginato puro alla stessa concentrazione, dunque l'aggiunta della gelatina non influisce sulla stampabilità della soluzione . .	64

# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 Stampa 3D tramite tecnologia FDM

La tecnologia Fused Deposition Modeling (FDM) è oggi uno dei processi di prototipazione rapida maggiormente diffusi; permette di produrre parti di elevata complessità in un singolo processo offrendo all'utente completa libertà di creazione e di utilizzo di una vasta gamma di materiali come elastomeri, ABS e molti altri (figura 1.1) [15] [44].



Figura 1.1: Oggetti stampati utilizzando una stampante 3D che integra la tecnologia FDM [44].

Le stampanti 3D FDM si basano su un processo di deposizione del materiale a strati dal basso verso l'alto [5].

Come mostrato nel processo schematico in figura 1.2, il polimero estruso a forma di filamento è arrotolato su un rocchetto, tramite l'azione di due rulli (comandati da motori passo passo) il filamento è srotolato dalla bobina e raggiunge l'ugello dell'estrusore della testina della stampante in cui è presente un'unità di controllo di temperatura che riscalda il materiale portandolo a uno stato semifuso permettendo l'estrusione (figura 1.2 (1)). È possibile gestire il flusso e guidare l'ugello lungo le direzioni x e y (figura 1.2 (2)) seguendo un tracciato definito da un software CAD, mentre il piatto di stampa è mobile in direzione

z (figura 1.2 (3)) [5]. La testina traccia il design di ogni strato e il filamento semifuso è estruso sul piatto di stampa in un'area definita e una volta depositato esso si solidifica. Tale procedura è ripetuta per tutti gli strati fino a fabbricare il modello 3D desiderato [15]. La scomposizione in strati e il posizionamento del file CAD 3D nel piatto di stampa, è possibile attraverso un apposito software di slicing <sup>1</sup> in cui è calcolato il percorso di estrusione del materiale (figura 1.3) [6, 5].

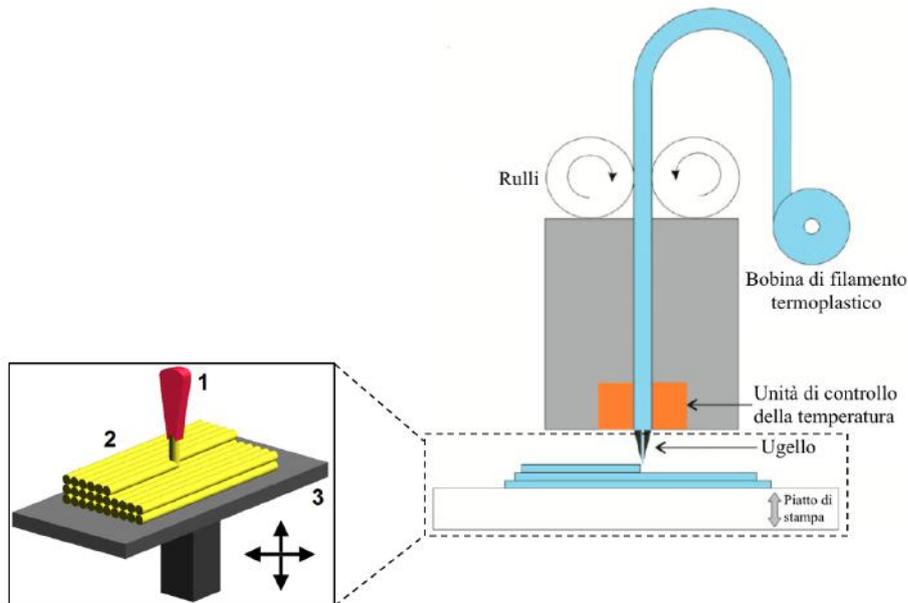


Figura 1.2: Processo di stampa con tecnologia FDM: 1) il materiale raggiunge la testina che scalda il filamento termoplastico permettendo la successiva estrusione tramite l'ugello, 2) il materiale è depositato sul piatto di stampa, 3) piatto di stampa è mobile in direzione z [6, 15].

Per creare, dunque, un oggetto con una stampante 3D FDM è necessario realizzare una sequenza di operazioni che comprende quattro passi principali [3]:

1. realizzazione di un modello CAD 3D in formato STL (figura 1.3 (a));
2. slicing del modello nei vari strati, o layer, che saranno riprodotti dalla stampante durante il processo (figura 1.3 (b));
3. fornire alla stampante i comandi operativi, ovvero il codice g-code, in modo che abbia le informazioni necessarie per stampare l'oggetto desiderato (figura 1.3 (c));
4. attivazione del processo di stampa grazie all'interfaccia utente e controllo della macchina durante la stampa (figura 1.3 (d)).

<sup>1</sup>Lo slicing consente il passaggio da un modello 3D di un oggetto alla sua realizzazione con una stampante 3D traducendo il modello in una serie di strati piani orizzontali, che saranno successivamente realizzati dalla stampante l'uno sopra l'altro [6].

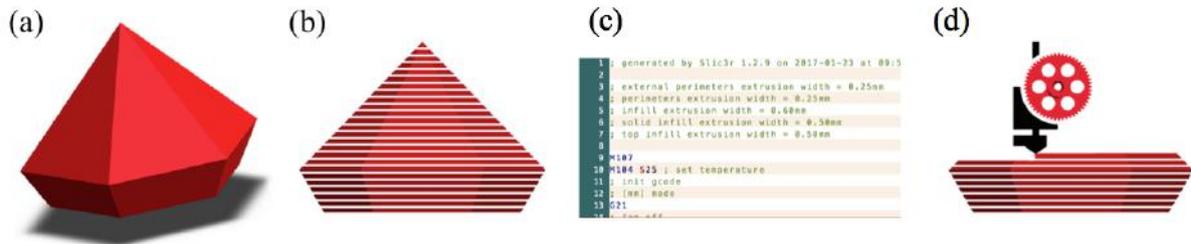


Figura 1.3: Slicing del modello 3D: (a) modello 3D, (b) scomposizione del modello in strati, (c) generazione codice g-code sulla base dei parametri di slicing, (d) stampa del materiale strato su strato.

Le stampanti FDM presentano numerosi vantaggi: in primo luogo è una tecnologia semplice da utilizzare e relativamente economica infatti, il costo di un sistema FDM include il costo della macchina (materiale e costi di post-produzione) e del materiale di scarto [44], inoltre, è possibile creare oggetti costituiti da multimateriali offrendo maggiore controllo all'operatore per uso sperimentale [15].

La stampa 3D ha trovato grande sviluppo nell'industria elettronica, aerospaziale, automobilistica, architettura e in molte altre per stampare prototipi, modelli 3D e beni di consumo [15]. Nel corso degli anni la tecnologia si è estesa fino a raggiungere, nel 2000, settore sanitario e in particolare in ambito medicale producendo impianti dentali e protesi [15] utilizzando polimeri termoplastici biocompatibili.

A oggi, nel mondo della produzione additiva cresce l'esigenza di stampare materiali viscosi come siliconi guadagnando attenzione soprattutto nel modo accademico, industriale in particolare in ambito medicale [38] per produrre impianti, protesi, scaffold con materiali aventi elevata viscosità [35].

Tra i materiali viscosi utilizzati per applicazioni biomediche e di ingegneria tissutale emergono gli idrogel: biomateriali utilizzati per incapsulare componenti biologiche e essere successivamente stampati. Il termine coniato per la stampa di cellule e anche organi che utilizzano questa tipologia di stampa è *Bioprinting* [23] di cui verrà fornita nel paragrafo successivo 1.2 una definizione dettagliata e una panoramica generale sulle tecniche, sullo stato dell'arte, sulle modalità di processo e infine gli svantaggi del Bioprinting.

## 1.2 Bioprinting

Il termine Bioprinting deriva dal termine Biofabrication, la cui definizione è stata data per la prima volta nel 2009 da Mironov et al. per il numero inaugurale della rivista *Biofabrication* [28]. L'evoluzione storica dei due termini è avvenuta in parallelo, infatti sono strettamente correlati tra loro e molto spesso difficilmente differenziabili [28].

Generalmente il termine Biofabrication descrive i processi naturali come la biomineraliz-

zazione e i processi tecnologici in diverse discipline soprattutto nell'ambito dell'ingegneria tissutale<sup>2</sup> (TE) e della medicina rigenerativa<sup>3</sup> (RM). Per quanto riguarda il TE e la RM, il Biofabrication prevede due approcci distinti: il Bioprinting e il Bioassembly<sup>4</sup> (figura 1.4) [28].

La definizione Bioprinting, a cui si fa riferimeto oggi, è stata data da Guillemot et al. nel 2010 indicandolo come:

*"the use of computer-aided transfer processes for patterning and assembling living and non-living materials with a prescribed 2D or 3D organization in order to produce bio-engineered structures serving in regenerative medicine, pharmacokinetic and basic cell biology studies"* [28].

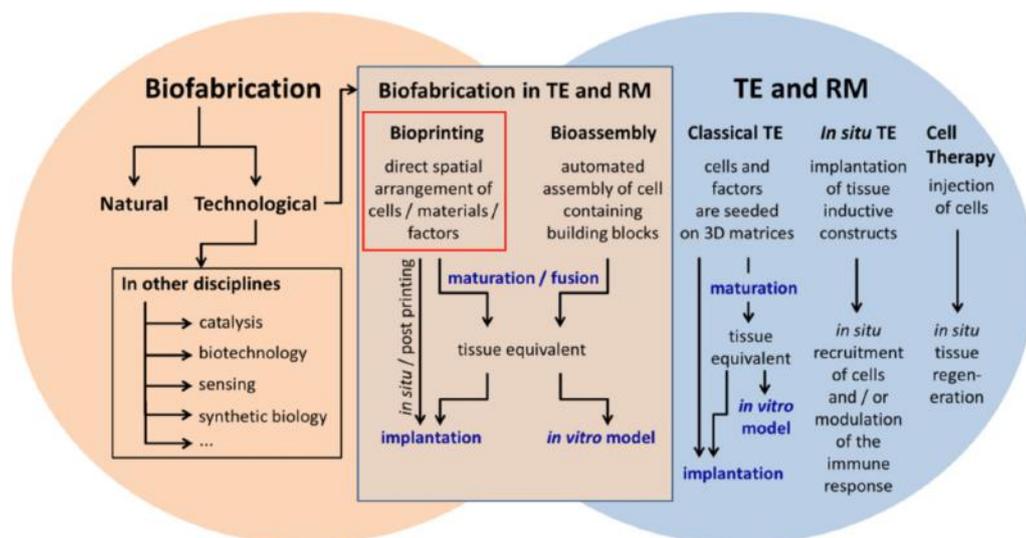


Figura 1.4: Il Biofabrication, nell'ambito dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa, si divide in due approcci: Bioprinting e Bioassembly [28].

Il Bioprinting è una tecnologia emergente, che con il suo rapido progresso, ha attirato grande attenzione diventando sempre più popolare nell'ambito dell'ingegneria dei tessu-

<sup>2</sup>Il termine ingegneria tissutale è stato definito come: *"an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and life sciences towards the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve biological tissue function or a whole organ"* [28].

<sup>3</sup>Il termine medicina rigenerativa è stato definito come: *"the application of tissue science, tissue engineering, and related biological and engineering principles that restore the structure and function of damaged tissues and organs"* [28].

<sup>4</sup>Il termine Bioassembly è stato definito come: *"the fabrication of hierarchical constructs with a prescribed 2D or 3D organization through automated assembly of pre-formed cell-containing fabrication units generated via cell-driven self-organization or through preparation of hybrid cell-material building blocks, typically by applying enabling technologies, including micro-fabricated molds or microfluidics"* [28].

ti e degli organi [52], mirando a fabbricare costrutti 3D di tessuti e organi depositando, strato dopo strato, prodotti biologici come cellule viventi, biomateriali, fattori di crescita, geni e farmaci [55] al fine di impiegarli direttamente sull'uomo [8, 53] per riparare o sostituire i tessuti danneggiati o come materiale per test e studi biologici e farmacologici [43, 18].

La capacità delle biostampanti 3D di depositare biomateriali con precisione micrometrica [11], in condizioni favorevoli alla crescita cellulare, dà un vantaggio rispetto ad altre tecnologie di produzione di scaffolds<sup>5</sup>, che presentano diverse limitazioni riguardo il controllo della struttura 3D e della distribuzione delle cellule [41].

Il Bioprinting si compone di tre elementi fondamentali [7]:

- *bioprinter*: la bioplotter è il dispositivo per l'erogazione e la deposizione del bio-  
inchiostro;
- *bioink*: gocce di singole cellule o aggregati cellulari che vengono stampati strato dopo  
strato in modo alternato;
- *biopaper*: la base su cui depositare il bioink, strato dopo strato, con cui poi si fonderà  
a formare il costrutto desiderato.

In figura 1.5 è mostrato il processo di realizzazione di un costrutto 3D cellulare. Il bioink è stampato tramite un bioplotter alternando strati di biopaper finché le cellule, contenute nel bioink, non si fondono determinando la scomparsa del biopaper stesso ottenendo il tessuto vivente finale [4].

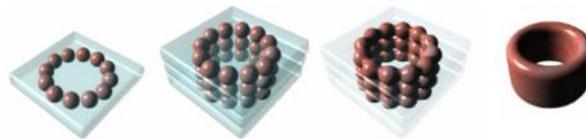


Figura 1.5: Il bioink è stampato sul biopaper (strato gelatinoso): per realizzare la struttura 3D si alternano strati di bioink e biopaper finché le cellule non si fondono e il biopaper si dissolve ottenendo il tessuto vivente finale [4].

---

<sup>5</sup>Impalcature tridimensionali di materiale nanocomposito polimerico biocompatibile che sostengono l'architettura cellulare permettendo l'adesione, la crescita, la differenziazione e la diffusione cellulare; definendo, inoltre, la forma finale dell'organo o tessuto da rigenerare [6].

### 1.2.1 Tecniche di Bioprinting

Il Bioprinting può essere classificato in base alle modalità di stampa, in particolare è possibile distinguere tre tecniche principali di Bioprinting basate sull'inkjet, laser e estrusione del bioink [9]. In figura 1.6 è mostrata la classificazione delle tecniche di Bioprinting. Data la grande varietà di tipologie cellulari, tali tecniche variano per precisione e accuratezza nella deposizione del materiale, stabilità e sopravvivenza cellulare [9].

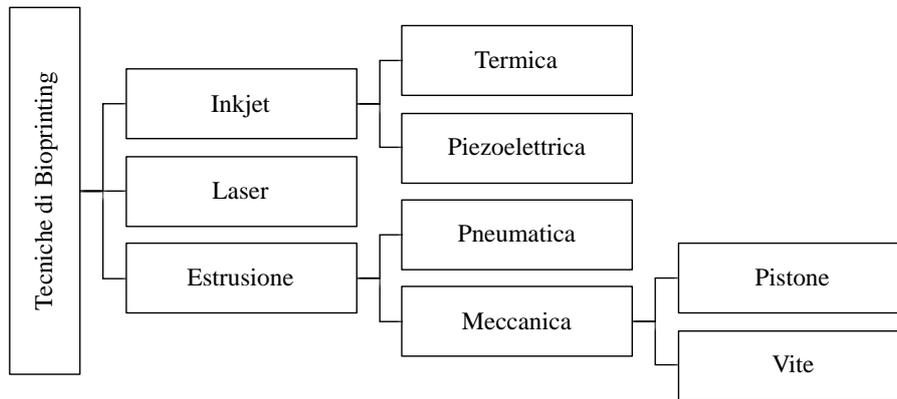


Figura 1.6: Classificazione delle tecniche di Bioprinting [9].

#### Inkjet

Il Bioprinting basato sull'inkjet rientra nelle tecniche di Bioprinting basate su gocce ed è stato il primo a essere utilizzato a partire dal 1980 [9].

La soluzione di bioink viene manipolata per generare delle goccioline che vengono depositate su un substrato [21] utilizzando stretti orifizi consentendo preciso posizionamento delle goccioline permettendo grande flessibilità all'utente [9].

Con questa tecnica il bioink è utilizzato per stampare, attraverso stretti ugelli non a contatto, cellule vive, contenute nel bioink, sottoforma di gocce [51]. Il getto erogato può essere di tre tipi: continuo, a comando (drop-on-demand) e elettrodinamico [21].

Diverse stampanti inkjet, termiche e piezoelettriche, con metodo drop-on-demand, sono state adattate per il Bioprinting.

- **Inkjet termica** è costituita da una camera con ugelli e componenti che vengono riscaldati (figura 1.7 (a)). Per generare la gocciolina un impulso di corrente è applicato

al componente, la temperatura dell'ink aumenta generando una bolla che permette la fuoriuscita dell'ink dall'orifizio [45].

- **Inkjet piezoelettrica** utilizza un cristallo piezoelettrico posizionato sul retro della camera dell'ink (figura 1.7 (b)). Un campo elettrico è applicato al cristallo causando così una vibrazione. Le vibrazioni interne spingono una piccola quantità di ink al di fuori dall'orifizio [33].

Il Bioprinting basato su gocce offre moltissimi vantaggi grazie alla sua semplicità, versatilità e controllo nella deposizione del materiale [21] permettendo di regolare il volume di bioink da depositare [50].

Tale tecnica di stampa è stata utilizzata per diverse applicazioni. Ad esempio Xu et al. realizzarono costrutti eterogenei multicellulari contenenti tre tipi differenti di cellule, che possono avere implicazioni cliniche per la costruzione di tessuti ossei vascolarizzati [53].

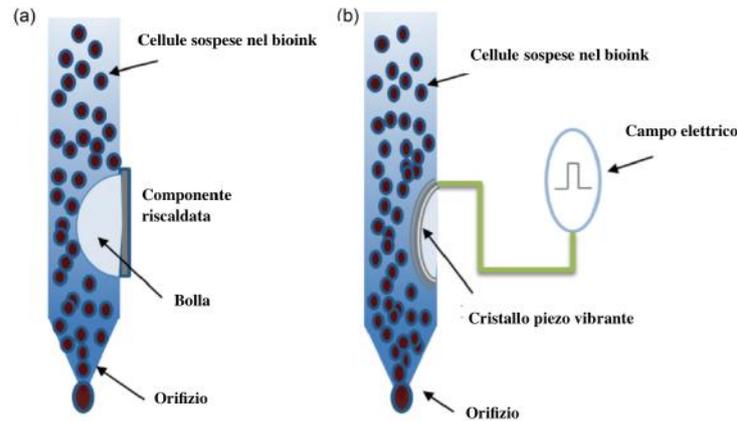


Figura 1.7: Bioprinting basato sull'inkjet: (a) schema inkjet termica, (b) schema inkjet piezoelettrica [9].

## Laser

La Laser-based direct writing (LDW) è stata introdotta nel 1999 ed è una delle tecniche più utilizzate di Bioprinting basate su laser [56].

La tecnica consiste nella generazione di un impulso laser utilizzato per trasferire le cellule sospese all'interno della soluzione da una diapositiva a un collettore. All'interno si creano delle bolle che a loro volta generano onde d'urto; quest'ultime forzano le cellule a oltrepassare la diapositiva e a depositarsi sul substrato collettore (figura 1.8) [9].

Nonostante tale tecnica permetta un'elevata risoluzione nella deposizione di cellule, presenta diversi svantaggi. Il calore e la luce generata dal laser può determinare il danneggiamento

delle cellule con conseguente riduzione dell'abilità delle cellule di comunicare e aggregarsi tra loro per formare il tessuto rigenerato. Generalmente, infatti, la vitalità cellulare del Bioprinting basato su laser è inferiore rispetto al Bioprinting basato sull'inkjet [9].

Le applicazioni che prevedono l'utilizzo di tale tecnica sono state sperimentate da Guillotin et al. i quali hanno stampato costrutti miniaturizzati di tessuti contenenti elevata densità cellulare [13]. Inoltre, Gaebel et al. hanno realizzato dei patch cardiaci di urea poliuretano seminati con cellule endoteliali di vena ombelicale umana e cellule staminali mesenchimali [47].

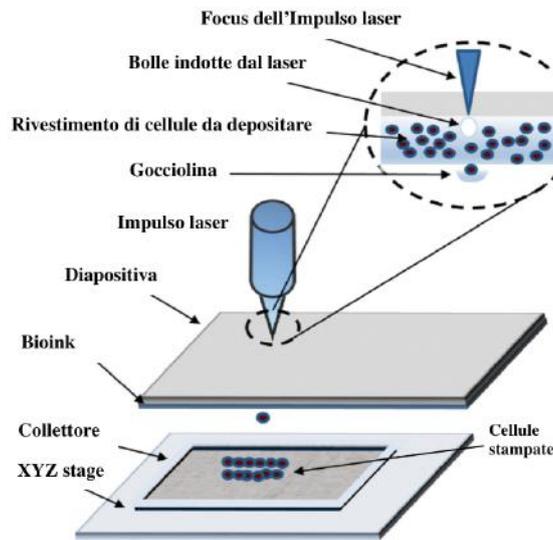


Figura 1.8: Schema Bioprinting basato sul laser [9].

## A estrusione

Il Bioprinting a estrusione è una combinazione di un sistema di erogazione pneumatico o meccanico del fluido e un sistema robotico automatico per l'estrusione e la stampa 3D [55].

Sotto il controllo di un computer il bioink è dispensato da un sistema di deposito su un substrato sul quale, grazie a una luce, soluzioni chimiche oppure a transistori termici, avviene la reticolazione del materiale ottenendo così la deposizione di cellule incapsulate in filamenti cilindrici permettendo la realizzazione di strutture tridimensionali (figura 1.9) [26].

L'estrusione meccanica della soluzione di bioink prevede l'utilizzo di un pistone o di una vite.

- Il pistone guida il deposito del materiale, fornendo un elevato controllo del flusso di bioink attraverso l'ugello [9].

- I sistemi a vite permettono un maggiore controllo spaziale e sono migliori per l'erogazione di bioink con viscosità superiore. Tuttavia, l'estrusione a vite può generare cadute di pressione lungo l'ugello, che potenzialmente possono essere nocive per le cellule caricate, pertanto, è necessario realizzare un attento design del set-up [9].

Nonostante il Bioprinting a estrusione sia considerato come la tecnica più conveniente per il processo di fabbricazione di tessuti e organi, vi sono numerose limitazioni per la realizzazione della struttura desiderata come lo sforzo di taglio e la limitata selezione del materiale a causa della necessità di incapsulare le cellule all'interno dell'idrogel e la sua rapida gelificazione [9].

Tale tecnica a estrusione è stata utilizzata per depositare differenti tipologie cellulari caricate in una vasta gamma di idrogel biocompatibili [58].

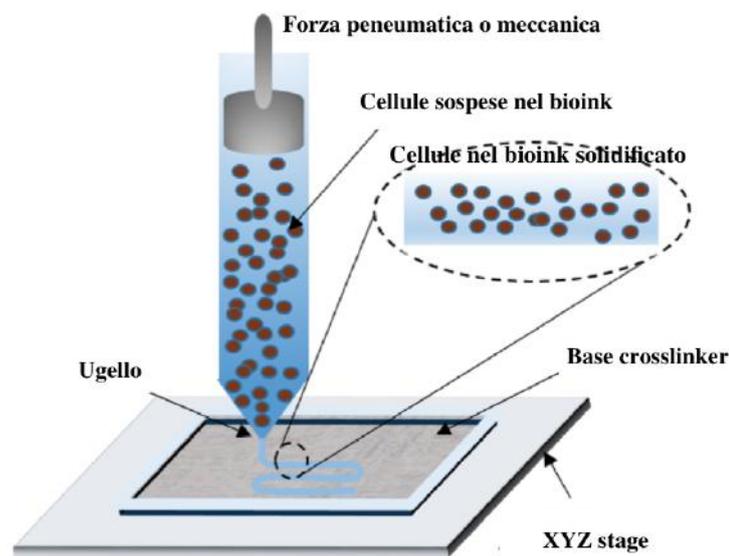


Figura 1.9: Schema Bioprinting basato sull'estrusione [9].

### 1.2.2 Stato dell'arte e punto di vista commerciale

Di seguito è presentata l'evoluzione tecnologica a cui sono stati soggetti i bioplotter utilizzati in ambito del Bioprinting con le relative applicazioni e una panoramica generale sul punto di vista commerciale delle biostampanti presenti oggi sul mercato.

#### Stato dell'arte

Nel 2000 il Rolf Muelhaupt's group al Freiburg Materials Research Center introdusse una tecnica di stampa 3D che prevedeva l'utilizzo di un gel termoreversibile in un mezzo liquido. Utilizzando una tecnica di Bioprinting basata sull'estrusione il Rolf Muelhaupt's group

riuscì per primo a documentare la deposizione di cellule vive [48, 27].

Successivamente nel 2002 Nakamura si rese conto del fatto che le goccioline di bioink in una stampante inkjet avevano la stessa dimensione delle cellule umane [54], dunque decise di adattare la tecnologia e nel 2008 realizzò una biostampante in grado di stampare un biotubo che mimava le funzionalità di un vaso sanguigno.

Le stampanti utilizzate per il Bioprinting devono possedere tre componenti fondamentali [9]:

- un sistema di spostamento robotico lungo i tre assi cartesiani  $x$ ,  $y$ ,  $z$ ;
- un erogatore per il bioink;
- un software per il controllo operativo per la stampa del bioink ad elevata risoluzione.

Grazie l'utilizzo di stampanti a tre estrusori sono stati stampati vasi sanguigni funzionanti e costruiti di tessuto cardiaco [49].

Fino al 2005 le biostampanti presenti sul mercato oltre ad avere costi elevati erano indicate per un uso industriale e con hardware proprietario, impedendo l'accessibilità della tecnologia al pubblico e di conseguenza limitando la ricerca e lo sviluppo del settore [22].

Per permettere un'evoluzione tecnologica più repentina del mondo del Bioprinting il progetto Fab@Home, condotto dagli studenti Evan Malone e Hod Lipson della Cornell University, aprì per la prima volta la stampa 3D multimateriale al pubblico [30]. Dal suo rilascio open-source nel 2006, è stata creata una stampante versatile e a basso costo (figura 1.10) per accelerare l'innovazione tecnologica e la sua migrazione nello spazio dei consumatori. Grazie al progetto Fab@Home nel 2012 il mercato delle stampanti 3D ha superato, per la prima volta, quello delle stampanti industriali, determinando la conclusione del progetto [22].

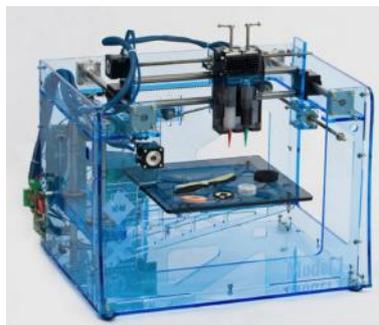


Figura 1.10: Stampante Fab@Home modello 1 [6].

In seguito agli sviluppi nel campo del Bioprinting la Medical University of South Carolina e la Clemson University svilupparono la Palmetto BioPrinter (figura 1.11 (a)) dotata di

tre dispenser intercambiabili per il deposito del biomateriale e un robot di posizionamento lungo gli assi x, y, z [9]. La stampante fu utilizzata per erogare bioink di steroide.

Per dispensare una vasta gamma di biomateriali e realizzare costrutti di tessuti 3D, Shim et al. svilupparono la Multihead Tissue/Organ Building System (MtoBS) (figura 1.11 (b)) dotata di un dispensing a sei teste sequenziale di PCL<sup>6</sup> e due soluzioni di alginato con e senza due differenti tipi di cellule condrociti o osteoblasti [32].

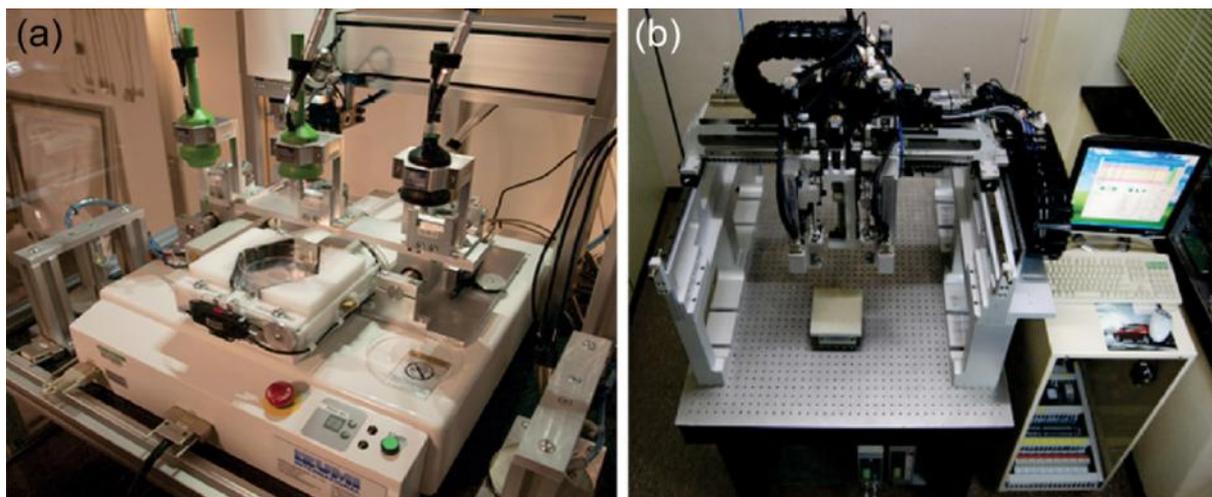


Figura 1.11: Biostampanti: (a) Palmetto BioPrinter, (b) MtoBS [9].

Nel 2014 Ozbolat et al. svilupparono la Multi-Arm Bioprinter (MABP) (figura 1.12)) che possiede due braccia indipendenti in grado di stampare in contemporanea strati multipli di bioink. Tale stampante permette di velocizzare il processo aumentando la flessibilità di stampa [25].

A oggi la tecnologia si muove soprattutto verso il Bioprinting a estrusione dell'idrogel, un reticolo polimerico tridimensionale e idrofilo in grado di assorbire grandi quantità di acqua o fluidi biologici. La definizione più dettagliata di idrogel e le relative applicazioni nell'ambito del Bioprinting verranno approfondite nel capitolo 3 paragrafo 3.1.

### Punto di vista commerciale

Negli ultimi vent'anni è stata sempre maggiore la richiesta di bioplotter 3D a basso costo e disponibili in grande scala, infatti molte sono state le stampanti robotiche commercializzate e ancor di più quelle ancora in fase di sviluppo [9].

A oggi il costo di mercato di una stampante 3D per il Bioprinting varia dai 10 mila \$ ai 200 mila \$ a seconda delle caratteristiche, precisione, prestazioni e risoluzione [9].

---

<sup>6</sup> Policaprolattone (PCL o PLC): polimero semicristallino sintetico biodegradabile [6].

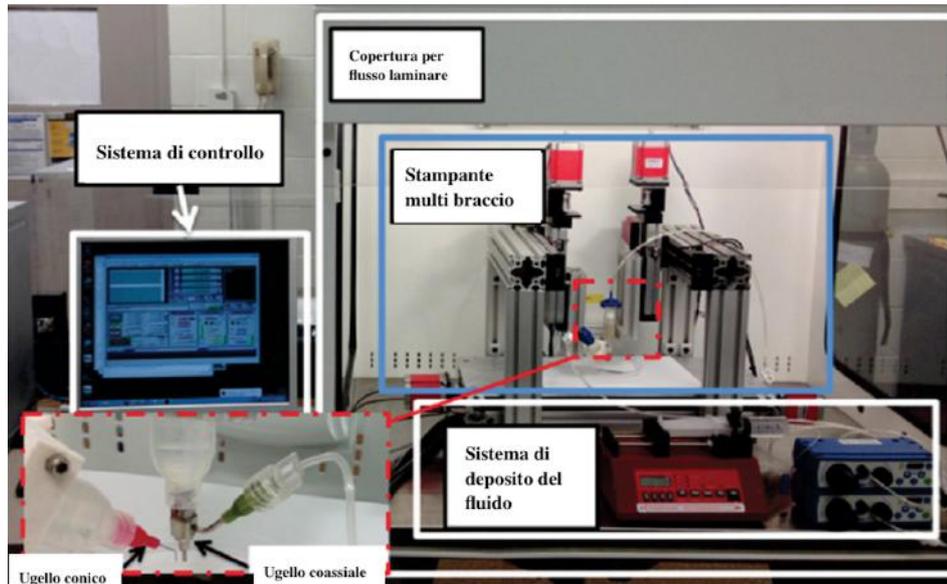


Figura 1.12: Biostampante MABP [9].

Alcuni esempi di stampanti disponibili in commercio sono: la NovoGen MMX Bioprinter™, la 3D Bioplotter® , la BioBlot e la INKREDIBLE.

- **NovoGen MMX Bioprinter™** (figura 1.13 (a)) prodotta da Organovo, permette la deposizione di un primo strato di idrogel come collagene e gelatina, successivamente l'iniezione di uno strato di bioink di cellule; gli strati successivi sono aggiunti uno sopra l'altro per creare la geometria desiderata. Al termine della stampa le cellule si fondono tra loro realizzando il materiale biologico [9]. La stampante è in vendita solo a grandi produttori di farmaci per realizzare tessuti bioartificiali [2].
- **3D Bioplotter®** (figura 1.13 (b)) prodotta dalla EnvisionTEC, si basa su un semplice processo di estrusione inventato dal Rolf Muelhaupt's group al Freiburg Materials Research Center [2]. La stampante permette di dispensare soluzioni aventi temperature comprese tra i 30 °C e 150 °C e una vasta gamma di biomateriali, compresi polimeri biodegradabili, che fungono da supporto per i costrutti di tessuto da stampare [27]. La 3D Bioplotter® presenta un costo piuttosto elevato di circa 200.000 \$ [2].
- **BioBot 1** (figura 1.13 (c)) prodotta dalla BioBots, utilizza un sistema di estrusione a pressione di idrogel come agarosio, collagene, alginato e glicole polietilene. La tecnologia blue light e luce UV permette la polimerizzazione del materiale evitando il danneggiamento delle cellule contenute al suo interno. Rispetto la NovoGene e la 3D Bioplotter®, la BioBot ha un costo più accessibile pari a 10.000 \$ [2].
- **INKREDIBLE** (figura 1.13 (d)) prodotta dalla Cellink, presenta due modelli: INKREDIBLE e INKREDIBLE+. Il primo modello utilizza un sistema di estrusione

pneumatica per la stampa di bioink a base di alginato e ha un costo di 10.000 \$ . Il secondo modello possiede tre caratteristiche aggiuntive rispetto al modello base: una tecnologia di pulizia della camera per rendere l'ambiente di stampa sterile e quindi adatto per il Bioprinting; una doppia estrusione per permettere la stampa di modelli dei tessuto e infine dei sensori digitali di pressione. La stampante ha un costo di 20.000 \$ [2].

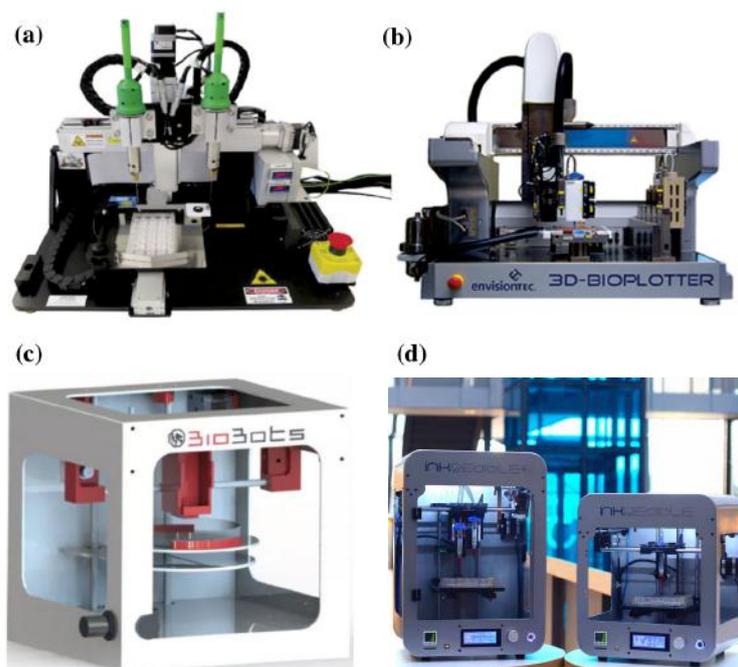


Figura 1.13: Biostampanti commerciali: (a) NovoGen MMX Bioprinter™(Organovo) [9], (b) 3D Bioplotter® (EnvisionTEC) [9], (c) BioBot 1 (BioBot) [2], (d) INKREDIBLE/INKREDIBLE+ (Cellink) [2].

In tabella 1.1 si riporta la tecnologia su cui si basano le singole stampanti sopra descritte oltre che il materiale utilizzato e il costo.

Stampante	Tecnologia	Materiale	Prezzo
NovoGen MMX Bioprinter™ 3D Bioplotter®	Estrusione con siringa Estrusione con siringa	Idrogel cellulari Idrogel, silicone, chitosano, ecc	Non in vendita Più di 200.000 \$
BioBot1	Estrusione con siringa, blue light	Agarosio, colagene, alginato, glicole polietilene	10.000\$
INKREDIBLE/ INKREDIBLE+	Estrusione con siringa	Bioink a base di alginato, altri materiali	10.000/20.000 \$

Tabella 1.1: Biostampanti commerciali: tecnologia su cui si basano, materiali e costo.

### 1.2.3 Processo di Bioprinting

Il processo di deposizione del bioink e quindi di realizzazione di costrutti 3D biologici funzionanti prevede un processo sequenziale costituito da diversi passaggi di cui si riporta la schematizzazione in figura 1.14.

Le cellule vive sono incapsulate all'interno dell'idrogel, che funge da biopaper, formando il bioink; grazie all'utilizzo di reagenti chimici viene favorita l'istantanea reticolazione dell'idrogel stesso durante o immediatamente dopo il Bioprinting, permettendo la realizzazione della struttura 3D [9]. Le cellule all'interno della struttura proliferano in vitro fornendo costrutti di tessuto biologico utilizzabili per impianti, modelli cellulari e drug screening. Tale processo può variare per tipologie cellulari, idrogel e stampanti utilizzati e per modalità di reticolazione.

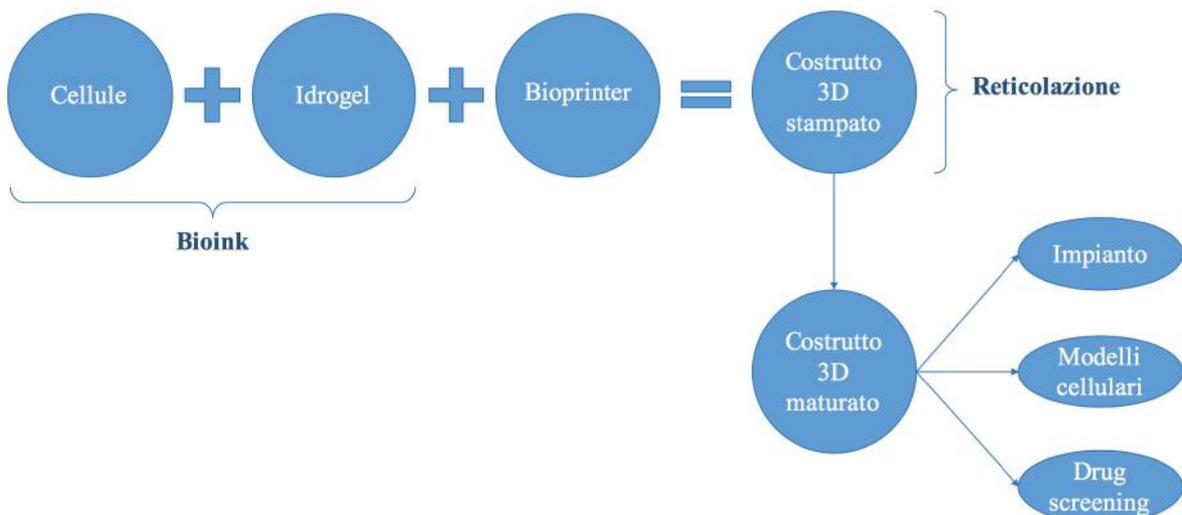


Figura 1.14: Processo di Bioprinting.

### 1.2.4 Limiti del Bioprinting

Nonostante le continue innovazioni e i grandi progressi ottenuti in questo campo, il Bioprinting è una tecnologia ancora in fase di crescita e presenta alcune limitazioni legate soprattutto alla vitalità, densità, citotossicità cellulare, disponibilità commerciale, sterilità, biocompatibilità del processo di stampa e versatilità dei bioplotter [45].

Inoltre, nonostante il Bioprinting sia una tecnologia emergente di grande potenzialità, le applicazioni cliniche su pazienti sono ancora molto limitate. Ad oggi, infatti, il Bioprinting è utilizzato principalmente per realizzare modelli di tessuti per drug discovery e drug screening in modo tale da limitare il numero di modelli animali abbattendo costi e tempi di

ricerca. Questo limite probabilmente è dovuto al fatto che la durata dei tessuti stampanti è limitata in quanto per garantire la loro sopravvivenza è necessario un giusto apporto di sangue e dunque lo sviluppo di una rete capillare che permetta la vascolarizzazione del tessuto stesso. A oggi tale tecnologia, infatti, non è ancora matura in tal senso.

### 1.3 Scopo del lavoro

Alla luce di quanto detto nei precedenti paragrafi, il presente lavoro ha lo scopo di condurre studi preliminari di deposizione di una soluzione viscosa di alginato di sodio a diverse concentrazioni mediante tecnica di Bioprinting a estrusione meccanica (classificazione figura 1.6). L'estrusione meccanica di bioink a cui si fa riferimento prevede la customizzazione di una stampante 3D che integra tecnologia Fused Deposition Modeling connettendo una pompa peristaltica a una delle stampanti FDM presente nel Proto-Lab. Successivamente la medesima soluzione di alginato di sodio è stata utilizzata per realizzare un bioink all'interno del quale sono incapsulate cellule al fine di realizzare costrutti 3D per future applicazioni in ambito biologico per lo sviluppo di nuovi modelli cellulari per lo studio di malattie, testing e drug discovery.

# Capitolo 2

## Customizzazione di una stampante 3D FDM

In questo capitolo è descritto il processo di customizzazione della stampante 3D FDM 3ntr A4v2 presente nel Proto-Lab dell'Università di Pavia per erogare soluzioni polimeriche viscosi come idrogel o altri materiali (paragrafo 2.2). Una volta effettuate le modifiche hardware e software della stampante 3D sono state condotte prove di stampabilità, di risoluzione e di ripetibilità per verificare i range di applicabilità e affidabilità del sistema (capitolo 4).

### 2.1 Stampante FDM 3ntr A4

La stampante che integra la tecnologia FDM presente nel Proto-Lab dell'Università di Pavia è la 3ntr A4 (figura 2.1); è prodotta della Jdeal-Form s.r.l di Oleggio (NO) ([www.3ntr.eu](http://www.3ntr.eu)) ed è una stampante 3D professionale a elevate prestazioni. Presenta un'area massima di stampa pari a 300x200x190 mm e una risoluzione di assi e spessore minimo di stampa pari a 0.15 mm e 0.05 mm rispettivamente. La velocità massima raggiungibile è di 200 mm/sec ed è in grado di stampare ogni tipologia di materiale termoplastico grazie a estrusori che raggiungono i 400 °C. Il piatto di stampa, invece, raggiunge una temperatura di 135 °C. Per gestire la stampante è utilizzato il software Repetier che consente di caricare e posizionare sul piatto di stampa il CAD 3D dell'oggetto da stampare ed effettuare l'operazione di slicing grazie al collegamento esterno al software Slic3r, in cui sono settati i parametri relativi alla stampa, al filamento e alla stampante (figura 2.2 (a)). Sulla base dei parametri settati, Slic3r trasforma il file 3D in comandi operativi utili per pilotare la stampante 3D, generando il codice g-code (figura 2.2 (b)) e dare inizio alla stampa. I dettagli del funzionamento del codice g-code e alcuni esempi sono presentati nel paragrafo 2.2.3.

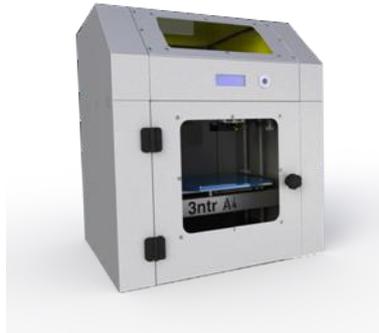


Figura 2.1: Stampante 3ntr A4 con tecnologia FDM presente in Proto-Lab.

## 2.2 Customizzazione della stampante FDM 3ntr A4 per l'erogazione di idrogel

Il processo di customizzazione della stampante FDM 3ntr A4 presente nel Proto-Lab è stato possibile grazie al contributo e alla continua collaborazione con l'azienda produttrice della stampante stessa e ha previsto due fasi principali:

- individuazione degli elementi di cui è composto il sistema (paragrafo 2.2.1);
- modifiche hardware e software della stampante 3ntr per l'erogazione della soluzione (paragrafi 2.2.2 e 2.2.3 rispettivamente);

Una volta completate le modifiche hardware e software è stata estrusa una soluzione di alginato di sodio per valutare la stampabilità e i range di risoluzione e ripetibilità del sistema realizzato. La descrizione delle prove di estrusione dell'alginato di sodio e i relativi risultati sono descritti nel capitolo 4.

### 2.2.1 Componenti dell'estrusore

Gli elementi individuati per customizzare la stampante e allestire il set-up per l'estrusione della soluzione viscosa sono:

- una pompa peristaltica;
- un tubo di silicone;
- un ugello;
- una siringa precaricata di alginato;
- un adattatore della testina della stampante 3D.

Di seguito sono descritti nel dettaglio i singoli elementi che compongono il set-up.

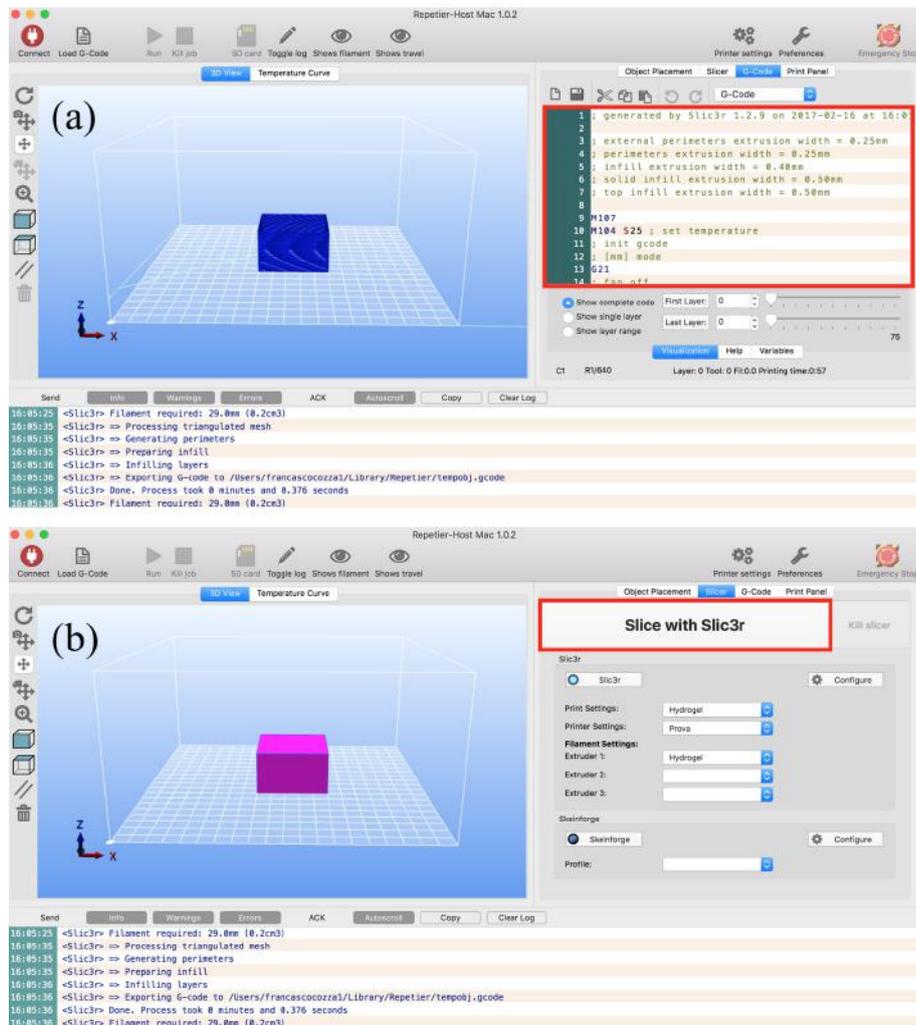


Figura 2.2: Interfaccia del software Repetier di gestione della stampante 3ntr: (a) collegamento al software Slic3r (quadrato rosso) per lo slicing dell'oggetto CAD, (b) codice g-code (quadrato rosso) generato sulla base dei parametri settati nel software Slic3r.

### Pompa peristaltica

La pompa peristaltica rappresenta il fulcro del set-up per l'estrusione della soluzione. È costituita da un motore passo passo NEMA 17 posto al centro di un supporto contenente un incavo in cui alloggia il tubo di silicone. Il motore NEMA 17 è stato fornito dall'azienda 3ntr Jdeal-Form e le specifiche sono riassunte in tabella 2.1. Il supporto, invece, è stato disegnato e stampato in 3D dal Proto-lab sulla base dei disegni CAD forniti dall'azienda stessa (figura 2.3 (a)). La pompa peristaltica assemblata con gli elementi appena descritti è mostrata in figura 2.3 (b), (c), (d) e (e).

Specifiche motore stepper NEMA 17	
Step	200
Giro completo	360°
Angolo di spostamento a ogni giro	1.8°
Ridotto	1:5

Tabella 2.1: Specifiche motore passo passo NEMA 17 della pompa peristaltica.

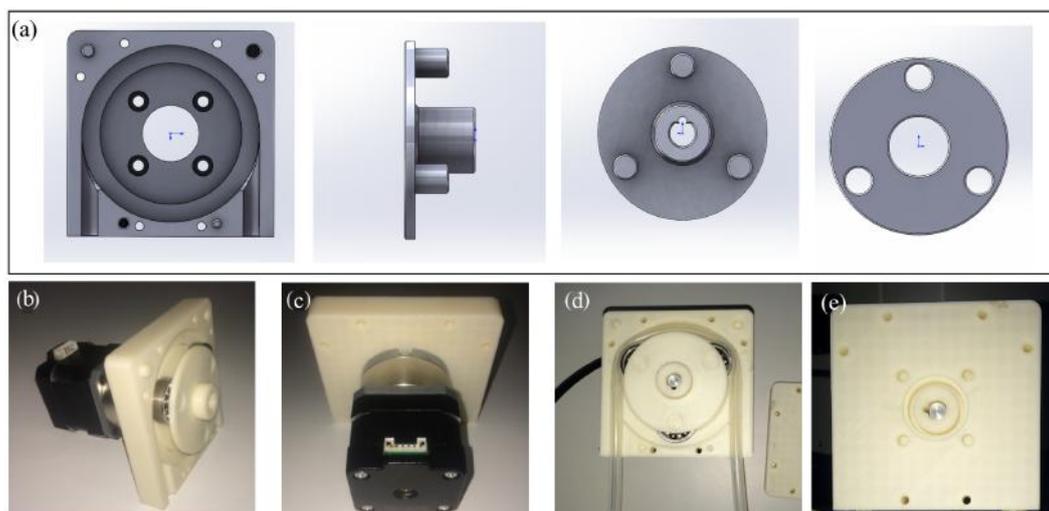


Figura 2.3: Pompa peristaltica: (a) disegni CAD del supporto che costituisce la pompa peristaltica, (b) vista laterale e (c) e retro del motore stepper e supporto assemblati, (d) focus del supporto realizzato in 3D con il tubo di silicone inserito nell'incavo, (e) copertura per fissare e evitare lo scioglimento del tubo durante il funzionamento.

Durante il funzionamento della pompa il tubo è compresso dall'azione rotatoria di due rulli sul rotante centrale (figura 2.4). Dopo il passaggio del primo rullo, il tubo recupera la sua forma iniziale creando il vuoto e la conseguente aspirazione della soluzione. Il fluido aspirato penetra nella cavità che si forma tra i due rulli e durante la rotazione viene spinto verso l'uscita dalla compressione del secondo rullo.

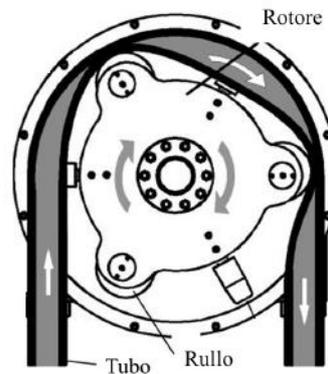


Figura 2.4: Schema del principio di funzionamento della pompa peristaltica.

### Tubo di silicone

Il tubo di silicone alloggia nell'incavo della pompa peristaltica e preleva la soluzione durante il funzionamento della pompa stessa. Le specifiche del tubo sono riassunte in tabella 2.2, mentre in figura 2.3 (b) è mostrato il tubo di silicone inserito nell'incavo della pompa.

Specifiche tubo di silicone	
Diametro interno	3.3 mm
Diametro esterno	6.13 mm
Lunghezza	57 cm
Volume totale	4.87 ml

Tabella 2.2: Specifiche tubo di silicone.

### Ugello e siringa precaricata della soluzione

L'ugello utilizzato per l'erogazione è stato anch'esso stampato in 3D presso il Proto-Lab mediante la stampante 3D Formlabs che utilizza una resina polimerica che solidifica grazie un fascio laser. Il design dell'ugello, di cui sono riportate le specifiche in tabella 2.3 e il disegno CAD in figura 2.5 (a), è stato sviluppato sulla base delle dimensioni e della forma dell'ugello della stampante 3ntr apportando alcune modifiche in modo tale da massimizzare e facilitare l'erogazione della soluzione.

In figura 2.5 (b) è presentato l'ugello stampato e inserito in una delle due estremità del tubo di silicone. Alla seconda estremità del tubo, invece, è collegata una siringa precaricata di alginato di sodio (figura 2.5 (c)), caricata prima dell'inizio della stampa della soluzione di interesse. Quando la pompa peristaltica è in funzione preleva l'alginato dalla siringa e la eroga tramite l'estrusore.

Specifiche ugello	
Diametro ugello	0.6 mm
Lunghezza totale	2.7 cm
Diametro maggiore	5.9 mm
Diametro minore	3.3 mm

Tabella 2.3: Specifiche ugello stampato in 3D mediante stampante polimerica.

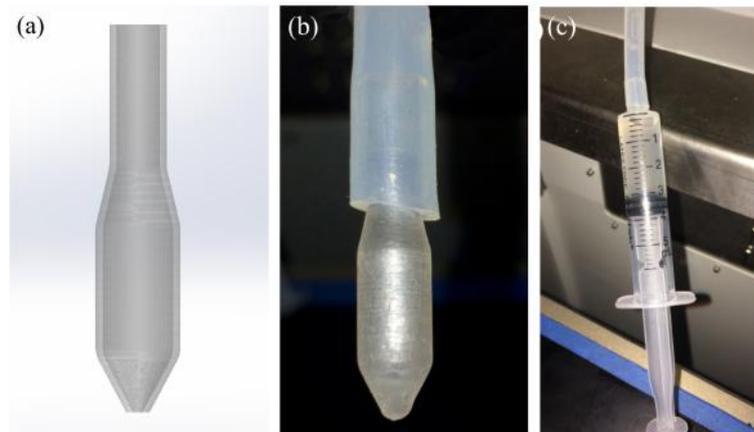


Figura 2.5: (a) CAD dell'ugello inserito a una delle due estremità del tubo, (b) ugello stampato inserito in una delle due estremità del tubo di silicone, (c) siringa precaricata della soluzione connessa alla seconda estremità del tubo di silicone.

### Adattatore della testina della stampante

L'adattatore, anch'esso realizzato e stampato in 3D presso il Proto-Lab, utilizzando una stampante 3ntr A4, permette il movimento dell'ugello. Esso è fissato alla testina della stampante 3D garantendo movimenti accurati lungo le direzioni x e y, mentre il piatto di stampa mobile permette gli spostamenti in direzione z.

L'adattatore, il cui disegno CAD, sviluppato utilizzando il software SolidWorks (SolidWorks 2015, Dassault Systemes), è mostrato in figura 2.6 (a), presenta una prima parte utile per fissare l'oggetto alla testina della stampante, un braccio, le cui dimensioni sono state stabilite considerando l'ingombro del supporto sul quale avverrà la stampa e un secondo braccio, allungabile, alla cui estremità presenta un foro in cui alloggia l'ugello.

Sono state realizzate diverse configurazioni di adattatori prima di ottenere quella finale la cui realizzazione stampata in 3D è mostrata in figura 2.6 (b).

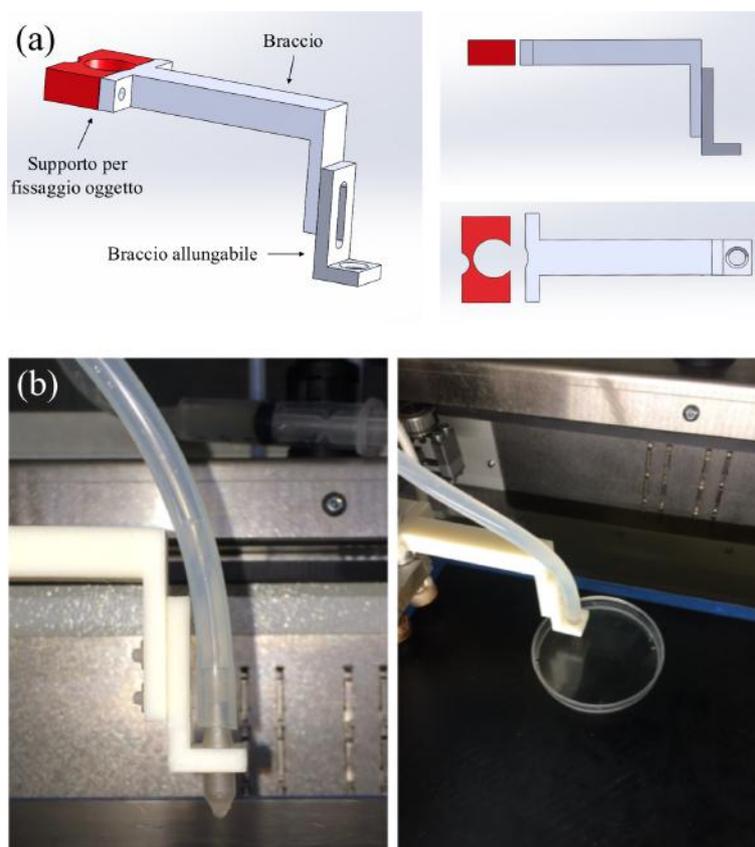


Figura 2.6: Adattatore testina da fissare alla testina della stampante 3ntr A4v2: (a) CAD 3D, (b) realizzazione stampata in 3D.

### 2.2.2 Modifiche hardware

Il processo di estrusione prevede che la pompa peristaltica (figura 2.7 (a)) prelevi, tramite il tubo di silicone (figura 2.7 (b)), la soluzione dalla siringa precaricata (figura 2.7 (c)) della soluzione stessa erogandola tramite l'ugello (figura 2.7 (d)) che alloggia nell'adattatore (figura 2.7 (e)) fissato alla testina della stampante.

A tale scopo la modifica hardware sostanziale, prevista per la realizzazione del set-up desiderato, è stata il collegamento del motore stepper alla stampante 3ntr attraverso un cavo precedentemente connesso al motore passo passo che comanda la rotazione della bobina e quindi l'avanzamento del filamento del materiale termoplastico da estrudere durante il classico processo di stampa FDM (figura 2.7 (a)).

Le modifiche secondarie hanno previsto il posizionamento della pompa peristaltica e il fissaggio nell'angolo in alto a sinistra della stampante, in corrispondenza della testina. Successivamente l'adattatore è stato fissato alla testina della stampante. Il tubo di silicone è stato inserito nell'apposito incavo della pompa peristaltica e nelle due estremità del tubo sono stati inseriti rispettivamente l'ugello e la siringa precaricata della soluzione in esame. Per ottimizzare la lunghezza del tubo di silicone la testina della stampante è

stata spostata il più vicino possibile alla pompa peristaltica in modo tale da ridurre al minimo la lunghezza del tubo e allo stesso tempo il percorso che la soluzione compie durante il processo di stampa, limitando così la formazione di eventuali bolle d'aria dannose per la realizzazione del costruito 3D finale. Inoltre, in previsione del precaricamento del tubo di una soluzione di bioink basato su una soluzione di alginato di sodio e cellule, la diminuzione della lunghezza del tubo è fondamentale per preservare la vitalità delle cellule evitandone il danneggiamento. L'ugello, infine, è stato inserito nell'apposito foro presente sull'adattatore. In figura 2.8 è mostrato il set-up completo.

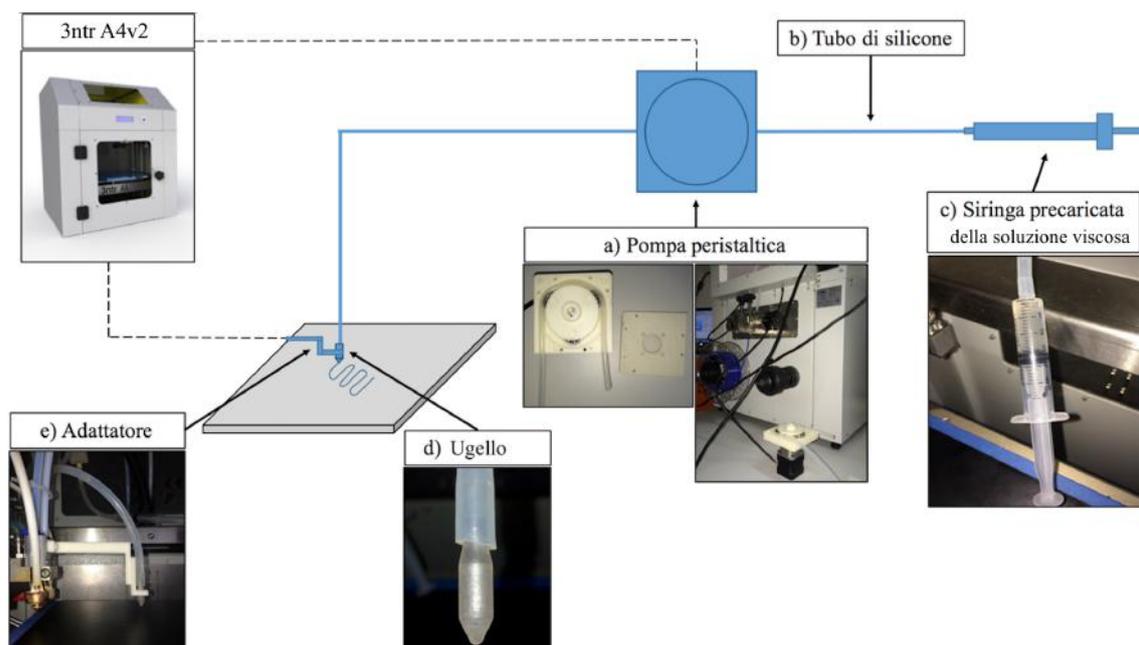


Figura 2.7: Schema del set-up per l'estrusione di una soluzione viscosa come idrogel: (a) pompa peristaltica connessa alla stampante 3ntr A4v2, (b) tubo di silicone che preleva la soluzione durante il funzionamento della pompa, (c) siringa connessa al tubo precaricata di alginato, (d) ugello stampante in 3D, (e) adattatore fissato alla testina della stampante FDM.

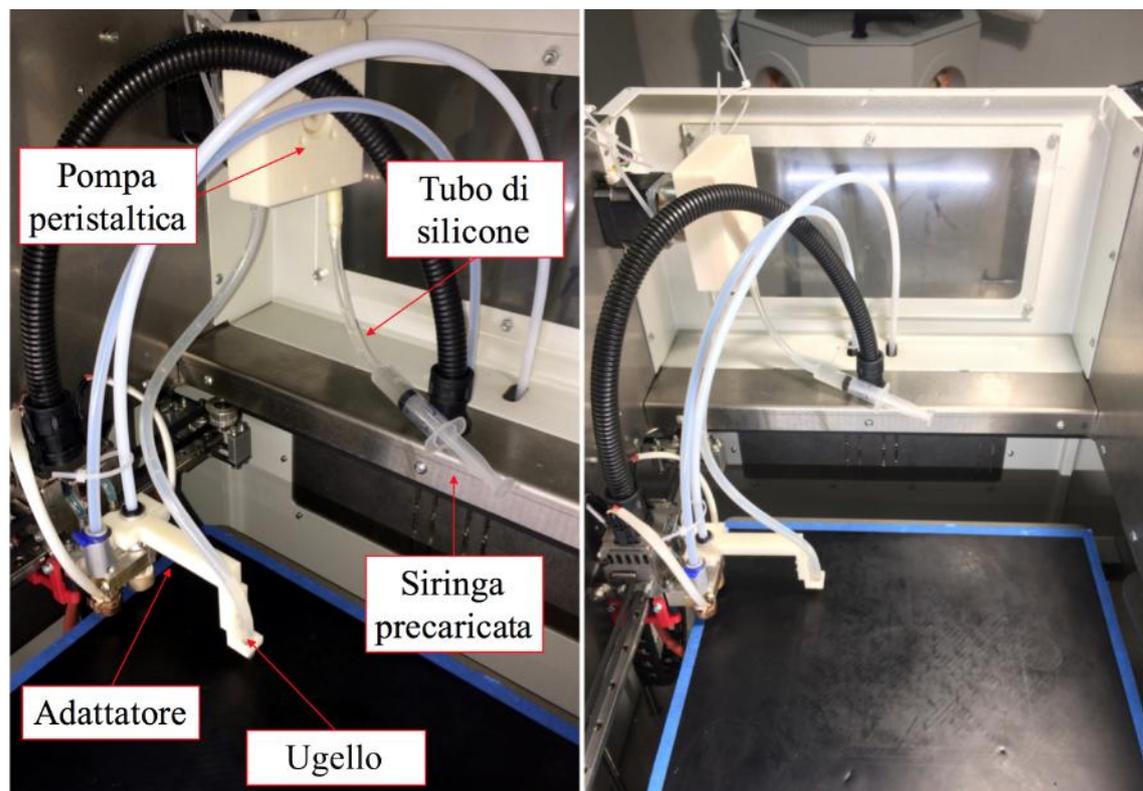


Figura 2.8: Set-up per la customizzazione della stampante FDM 3ntr A4v2 per l'estrusione di una soluzione viscosa come idrogel.

### 2.2.3 Modifiche software

Una volta ottimizzato l'hardware del set-up è possibile procedere con le modifiche software del sistema.

Come precedentemente detto nel paragrafo 1.1, per stampare in 3D un oggetto è necessario fornire alla stampante il g-code generato automaticamente dal software Slic3r in seguito lo slicing del CAD dell'oggetto in esame.

La modifica software del sistema customizzato per l'estrusione di soluzioni viscosi, consiste nell'implementazione di un codice MATLAB (The Mathworks R2014b) che fornisca alcune forme geometriche monostrato più o meno complesse e che automaticamente generi il codice g-code della geometria in esame. È stato deciso di generare il g-code tramite software MATLAB piuttosto che realizzare il CAD 3D utilizzando SolidWorks e in seguito effettuare lo slicing, in quanto per valutare la stampabilità del sistema e svolgere i test preliminari di stampa su geometrie monostrato e non molto complesse, risulta più semplice e veloce variare le dimensioni della geometria e i parametri di stampa tramite script MATLAB. Utilizzando Slic3r tale passaggio, soprattutto per la variazione delle dimensioni della geometria, risulterebbe difficoltoso in quanto occorrerebbe modificare il CAD 3D dell'oggetto, operazione sicuramente molto più lunga e complessa.

Una volta ultimata l'ottimizzazione del set-up sarà possibile procedere con la realizzazione CAD 3D di oggetti più complessi e multistrato per cui sarà necessario l'utilizzo del software Slic3r per lo slicing del modello 3D.

Di seguito sono descritti i comandi principali del codice g-code e le modalità di generazione sia per la stampa FDM tramite l'uso di Slic3r, sia per l'estrusione di soluzioni viscosi utilizzando MATLAB.

#### Codice g-code: comandi

Il codice g-code rappresenta un insieme di comandi da fornire alla stampante per realizzare l'oggetto 3D desiderato e ogni istruzione corrisponde a un'azione della macchina. Un generico file per la stampa 3D prevede [1]:

- una parte introduttiva in cui comandi forniti sono utilizzati per preparare la macchina, posizionare e riscaldare l'estrusore e il piano;
- una parte esecutiva in cui vengono forniti i codici per lo spostamento l'estrusore affinché crei l'oggetto desiderato;
- una parte conclusiva per terminare il processo di stampa.

Un comando g-code generico è identificato da un codice, formato da una lettera e un numero, seguito da diversi parametri formati anch'essi da una lettera e un numero [1].

Tra i comandi principali utilizzati per realizzare il costrutto 3D ricordiamo:

- *G1*: per movimentare l'estrusore lungo le direzioni x e y e il piatto di stampa lungo la direzione z [mm];

- $E$ : rappresenta la quantità di filamento estrusa [mm], in pratica quanti millimetri di materiale la bobina, pilotata dal motore stepper, deve fornire all'ugello;
- $F$ : identifica il feedrate [mm/min] ovvero la velocità con cui viene fornito all'estrusore un certo quantitativo di materiale  $E$ .

Di seguito si presenta un esempio dei comandi appena descritti:

*G1 X10 Y5 Z0 E0.5 F90*

Il comando si traduce in uno spostamento ( $G1$ ) lungo l'asse x di 10 millimetri ( $X10$ ), lungo l'asse y di 5 millimetri ( $Y5$ ), senza alcun spostamento del piatto di stampa in direzione z ( $Z0$ ). Durante lo spostamento si verifica l'estrusione di 0.5 mm di materiale ( $E0.5$ ) con una velocità pari a 90 mm/min.

La quantità di filamento estrusa in un tradizionale processo di stampa FDM, rappresenta la quantità, in millimetri, di materiale da estrudere per ogni cambio di coordinate. Nel caso del sistema customizzato, tale valore rappresenta una quantità equivalente: il filamento è sostituito con la soluzione viscosa dunque il valore si trasforma in quantità, espressa in misure di volume, che la pompa peristaltica fornisce all'ugello.

### **Stampa FDM: utilizzo del software Slic3r per la generazione del g-code**

Nella classica stampa FDM il software Slic3r è utilizzato per lo slicing del modello 3D. I parametri di slicing settabili sono l'altezza dello strato, lo spessore di estrusione e del diametro del filamento, la velocità di estrusione e molti altri parametri sulla base dei quali automaticamente è generato il codice g-code all'interno del quale sono presenti i comandi necessari per stampare il modello 3D desiderato.

All'aumentare dello spessore del filamento e al diminuire dello spessore di estrusione, diminuisce il parametro  $E$  relativo alla quantità di filamento da estrudere. Inoltre, il prodotto tra la velocità di estrusione, l'altezza dello strato e lo spessore di estrusione determinano il flow rate.

### **Estrusione di soluzioni viscosi: utilizzo di MATLAB per la generazione del g-code**

Il processo di estrusione di soluzioni viscosi ha previsto l'utilizzo del software MATLAB sia per realizzare la geometria dell'oggetto da stampare che per generare il codice g-code. A tale scopo sono state implementate quattro funzioni, ognuna delle quali fornisce le coordinate x e y necessarie per realizzare una geometria distinta. Le geometrie implementate sono: cerchio, quadrato, griglia e strisce di cui è possibile scegliere la congiunzione lineare o obliqua. In figura 2.9 sono mostrate un esempio delle cinque possibili figure.

Le funzioni sono richiamate in un unico script MATLAB in cui è possibile:

- scegliere quale delle cinque geometrie stampare;

- definire le dimensioni della geometria scelta;
- impostare la posizione x e y dell'oggetto sul piatto di stampa;
- settare la velocità di stampa  $F$  e la quantità equivalente di filamento da estrarre  $E$ .

Sulla base dei valori dei parametri forniti e le coordinate x e y dei punti, automaticamente è generato il codice g-code della geometria scelta. Una volta caricato il g-code nel software di gestione della stampante Repetier e visualizzata l'anteprima di stampa, è possibile dare inizio alla stampa 2.10

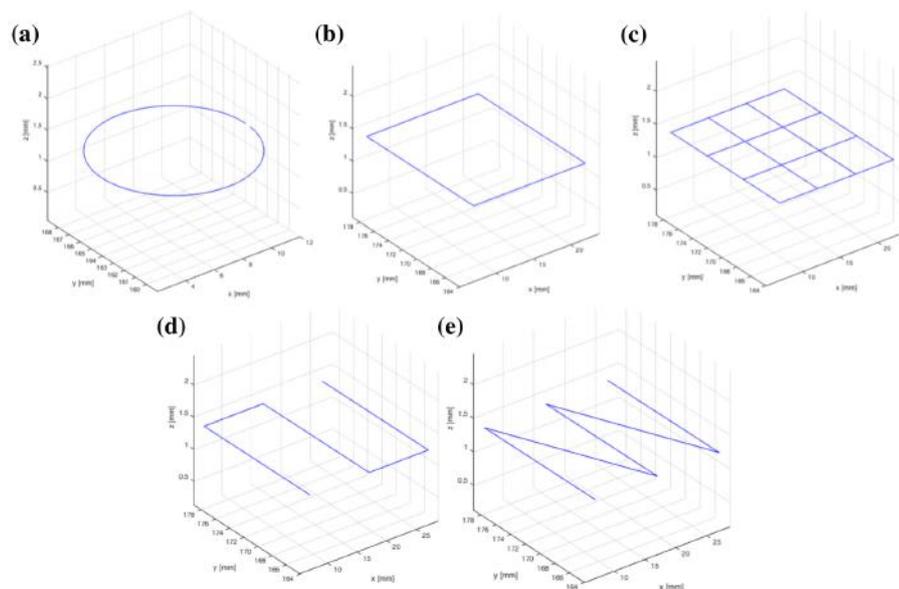


Figura 2.9: Geometrie da estrarre realizzate tramite funzione MATLAB. Per ogni geometria è stato generato il codice g-code e sono state posizionate sul piatto di stampa nelle coordinate [7 163] mm a una distanza dal piatto di stampa di 1.3 mm.

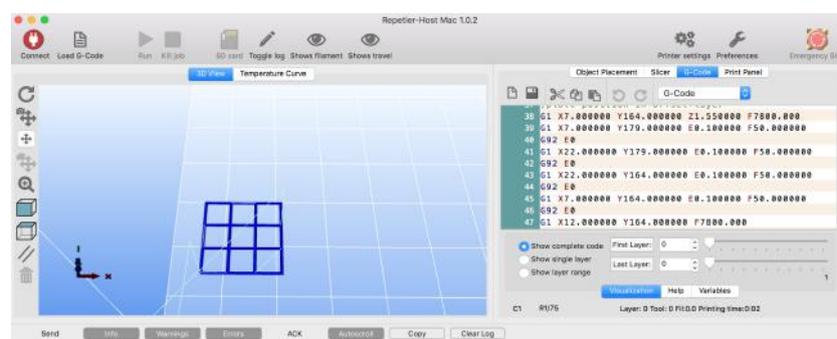


Figura 2.10: Caricamento del g-code, generato in MATLAB, nel software Repetier e anteprima di stampa della geometria scelta.

# Capitolo 3

## Idrogel di alginato di sodio

### 3.1 Gli idrogel

Gli idrogel sono reti 3D costituite da polimeri idrofili ad alto contenuto di acqua [36] ampiamente utilizzati nel campo dell'ingegneria tissutale grazie alle sue caratteristiche simili ai componenti naturali della matrice extracellulare [9]. L'idrofilità è uno dei principali fattori che determinano la biocompatibilità degli idrogel rendendoli adatti a incapsulare componenti biologici come cellule vive e fattori di crescita in un ambiente 3D, altamente idratato e meccanicamente solidale, simile a quello di molti tessuti biologici naturali [9].

Nel Bioprinting gli idrogel sono utilizzati come bioink all'interno dei quali è possibile incapsulare cellule vive [40]; essi sono erogati al fine di generare una forma definita, fissata, successivamente, attraverso gelificazione. Il processo di gelificazione, o anche detto cross-linking, generalmente è una reazione di reticolazione chimica o fisica.

Gli idrogel possono essere classificati in idrogel naturali come l'alginato, il collagene, la fibrina e il citosano oppure in idrogel sintetici come il pluronic e il glicole polietilenico [9]. Idrogel naturali come agar, agarosio, collagene, gelatina, alginato, miscele di alginato e gelatina sono già stati utilizzati per il Bioprinting e inoltre, moltissimi idrogel fotopolimerizzanti sono stati sviluppati recentemente e applicati per stampare costrutti 3D al cui interno sono state inglobate cellule vive [37].

Una delle sfide principali per il Bioprinting è realizzare costrutti 3D di idrogel contenenti cellule che abbiano le seguenti caratteristiche [37]:

- dimensioni clinicamente rilevanti con elevata accuratezza rispettando le forme predefinite;
- adeguata stabilità meccanica che venga preservata anche durante la coltivazione cellulare;
- realizzare costrutti che non inficiano la vitalità cellulare.

Cruciale per questi tre aspetti è il processo di reticolazione che porta alla gelificazione della struttura stampata necessaria per preservare la forma e assicurarne la stabilità. È necessario dunque un processo di crosslinking efficace sia dal punto di vista meccanico che biologico e allo stesso tempo compatibile con le cellule incapsulate nell'idrogel [37].

L'alginato è uno dei biopolimeri più comuni utilizzati nel campo del Bioprinting soprattutto grazie alle condizioni di gelificazione non eccessivamente aggressive evitando l'uso di agenti chimici reticolanti che potrebbero danneggiare le entità cellulari [37]. Proprio per tale caratteristica, l'alginato e in particolare l'alginato di sodio, è stato scelto in questo lavoro, come idrogel per sviluppare un materiale stampabile per realizzare costrutti 3D contenenti cellule che abbiano le caratteristiche elencate precedentemente. Nel paragrafo 3.2, è descritta la composizione chimica, le proprietà e le applicazioni in ambito biomedico dell'alginato di sodio.

## 3.2 L' alginato di sodio

L'acido alginico è un polimero anionico naturale biocompatibile ottenuto dall'alga bruna<sup>1</sup>. Uno dei suoi sali derivati è l'alginato di sodio ( $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$ ), il quale, grazie alla sua biocompatibilità, bassa tossicità, costo relativamente basso e lieve gelificazione mediante l'aggiunta di cationi bivalenti come  $\text{Ca}^{2+}$ , è utilizzato per molte applicazioni biomediche [57].

### 3.2.1 Composizione molecolare e proprietà

**Composizione molecolare:** l'alginato è un copolimero lineare contenente blocchi di residui, consecutivi o alternati, di  $\beta$ -D-mannuronato (M) e di  $\alpha$ -L-gulonato (G) (figura 3.1) [36].

#### Proprietà fisiche e meccaniche

Il rapporto dei residui M e G, le sequenze, la lunghezza dei blocchi G e il peso molecolare (compreso tra i 32000 e 400000 g/mol [36]) sono fattori che influiscono sulle proprietà fisiche e meccaniche dell'alginato e i risultanti idrogel [39]. Le proprietà fisiche, infatti, controllano significativamente la stabilità del gel, la quantità di farmaco rilasciata dal gel, il fenotipo e la funzione delle cellule incapsulate nel gel di alginato [36]. Le proprietà meccaniche dell'idrogel di alginato, invece, migliorano grazie all'aumento della lunghezza dei blocchi G e del peso molecolare [36].

---

<sup>1</sup>Le alghe brune, appartenenti alla classe delle Phaeophyceae, sono organismi complessi pluricellulari sia dal punto di vista anatomico che morfologico. Sono organismi quasi esclusivamente marini e prediligono acque fredde e ben ossigenate [6].

## Viscosità

La viscosità dell'alginato aumenta con la diminuzione del pH e raggiunge un massimo intorno a un pH compreso tra 3 e 3.5, i gruppi carbossilici dell'alginato incapsulati diventano protonati formando legami idrogeno [36]. In una soluzione di alginato formata da un elevato peso molecolare, il polimero diventa molto viscoso e spesso l'eccessiva viscosità non è desiderata all'interno del processo [42] in quanto potrebbe provocare il danneggiamento delle cellule o proteine incapsulate all'interno dell'idrogel a causa di elevate forze di taglio generate durante la miscelazione [24]. Dunque il pH deve essere compatibile con le cellule.

## Biocompatibilità

Nonostante la biocompatibilità dell'alginato sia stata ampiamente valutata sia in vivo che in vitro, ci sono ancora dibattiti riguardo l'impatto della composizione dell'alginato [36]. Infatti l'alginato è ottenuto da fonti naturali, quindi presenta potenzialmente varie impurità quali metalli pesanti, endotossine, proteine e composti polifenolici [36]. È dunque importante purificare l'alginato con una procedura di estrazione multi-step portando il composto a un'elevata purezza in modo tale da non indurre reazioni esterne al corpo [19].

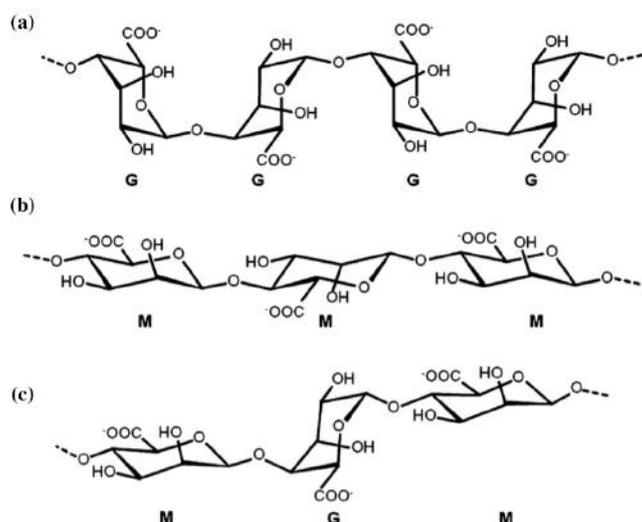


Figura 3.1: Composizione chimica dell'alginato: (a) blocchi consecutivi di residui G (GGGGGG), (b) blocchi consecutivi di residui M (MMMMMM), (c) blocchi alternati di residui G e M (GMGMGM) [36].

### 3.2.2 Formazione dell'idrogel di alginato: metodo di gelificazione

Generalmente, per realizzare gli idrogel, come detto precedentemente nel paragrafo 3.1, si utilizza una reazione di cross-linking chimico o fisico dei polimeri idrofili che può essere di tipo ionico, covalente, termico e cellulare [36]; inoltre la tipologia di crosslinking scelta è fondamentale per garantire buona stabilità dell'idrogel rendendolo compatibile con i

componenti biologici incapsulati al suo interno. Per realizzare l'idrogel di alginato di sodio, in questo lavoro è stato utilizzato il cross-linking ionico dell'alginato di sodio grazie alle sue caratteristiche e facilità di preparazione.

### Cross-linking ionico

Il metodo consiste nel combinare una soluzione acquosa di alginato con agenti ionici reticolanti come cationi divalenti (ad esempio il  $\text{Ca}^{2+}$ ) [36].

Alcuni studi hanno dimostrato che solamente i blocchi G dell'alginato partecipano alla reticolazione intermolecolare con cationi divalenti come il  $\text{Ca}^{2+}$  per formare l'idrogel [36]: i blocchi G di uno dei polimeri dell'alginato formano giunzioni con i blocchi delle catene dei polimeri adiacenti definendo il cosiddetto modello "egg-box" del cross-linking formando interstizi in cui sono collocati gli ioni calcio; il risultato è una rete di idrogel (figura 3.2) [20].

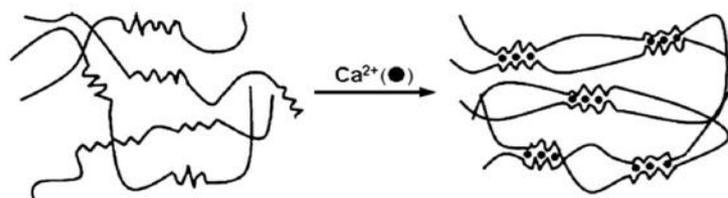


Figura 3.2: Crosslinking ionico per formare l'idrogel di alginato di sodio: solamente i blocchi dei residui di guronato partecipano alla formazione del modello "egg-box" formando interstizi in cui sono collocati gli ioni calcio [36].

Il grado di gelificazione è un fattore critico nel controllo dell'uniformità e della forza del gel quando si utilizzano cationi divalenti, infatti una gelificazione più lenta produce strutture più uniformi con integrità meccaniche superiori [17].

Anche la temperatura di gelificazione influisce sulle proprietà meccaniche del gel: a temperature più basse la reattività degli ioni reticolanti è ridotta e il cross-linking è più lento, la risultante struttura reticolata ha un ordine maggiore migliorando le proprietà meccaniche [10]. Inoltre, le proprietà meccaniche degli idrogel reticolati dipendono dalla struttura chimica dell'alginato: i gel preparati con un alginato ad alto contenuto di residui G esibiscono una stiffness maggiore rispetto a quelli aventi una bassa quantità di residui G [34].

Il calcio cloruro ( $\text{CaCl}_2$ ) è uno degli agenti reticolanti più utilizzati; esso conduce una semplice e rapida gelificazione, ma allo stesso tempo risulta essere poco controllata a causa dell'elevata solubilità del composto in soluzioni acquose [36]. Una soluzione per rallentare e controllare la gelificazione è utilizzare un buffer contenente il fosfato (ad esempio l'esametafosfato di sodio): durante la reazione, i gruppi fosfato nel buffer competono con il gruppo carbossilico dell'alginato con gli ioni calcio ritardando la gelificazione [36].

### 3.2.3 Applicazioni biomediche dell'alginato

L'alginato ha dimostrato avere grande potenzialità di utilizzo come biomateriale in molte applicazioni biomediche in particolare per realizzare rivestimenti per il trattamento di ferite acute o croniche, per applicazioni farmaceutiche per il rilascio controllato di farmaci, per colture cellulari in vitro e per l'ingegneria tissutale [36]. Nel contesto dell'ingegneria tissutale l'alginato è stato largamente utilizzato per Bioprinting di tessuti e organi [16]. L'impiego efficace dell'alginato di sodio in diversi protocolli pre-clinici sostengono una ricerca continua e ulteriori studi del materiale stesso utilizzato come idrogel potenziale per future applicazioni cliniche [14]. In tabella 3.1 sono riportate le principali applicazioni dell'alginato di sodio in ambito biomedico e le relative referenze dei lavori condotti.

Applicazione	Referenze
Trattamento di ferite acute	Rabbany et al. (2010), Murakami et al. (2010)
Rilascio controllato di farmaci	Zhang et al. (2010)
Bioprinting di tessuti e organi:	
- Vasi	Duan et al. (2013), Khalil and Sun (2009)
- Ossa	Loozen et al. (2013)
- Muscolo scheletrico	Zhang et al. (2013)
- Tumori	Zhao et al. (2014)
- Tessuto adiposo	Gruene et al. (2011a)

Tabella 3.1: Esempi di applicazioni dell'alginato in ambito biomedico.

### 3.2.4 Vantaggi e svantaggi nell'utilizzo dell'alginato

L'alginato è un biomateriale che presenta buone caratteristiche, ma allo stesso tempo diversi svantaggi; in tabella 3.2 sono riassunti i vantaggi e svantaggi nell'utilizzo dell'alginato di sodio.

Vantaggi [17]	Svantaggi [37, 29]
Biocompatibile	Limitata stiffness meccanica
Costi non elevati	Limitate proprietà fisiche
Lieve gelificazione	Stampabilità limitata
Semplicità di modifica per preparare derivati dell'alginato	Difficoltà del materiale a conservare la forma dopo la deposizione

Tabella 3.2: Vantaggi e svantaggi nell'utilizzo dell'alginato.

Sulla base degli svantaggi appena elencati, uno degli approcci per migliorare la stampabilità degli idrogel è aumentare la concentrazione del polimero stesso [31], ma allo stesso tempo una concentrazione elevata, maggiore al 4%, provoca una significativa riduzione della viabilità cellulare [37]. Una delle strategie per ovviare al problema è combinare l'alginato con

altri biopolimeri come ad esempio gelatina [60, 12], metilcellulosa [37], xantan gum [59], agarosio [46], collagene[60] migliorando sia la stampabilità della soluzione che la vitalità cellulare.

### **3.2.5 Il nostro utilizzo dell'alginato**

Alla luce di quanto detto l'alginato di sodio, per le sue caratteristiche, è l'idrogel scelto e reputato il più adatto per questo lavoro. Soluzioni di alginato a diverse concentrazioni sono state erogate mediante una stampante 3D con tecnologia FDM customizzata per l'erogazione di soluzioni viscosi per valutare il grado di affidabilità e adattabilità del sistema realizzato (capitolo 4). Per migliorare la proliferazione cellulare, come consigliato da letteratura (paragrafo 3.2.4), l'alginato di sodio è stato combinato con la gelatina e utilizzato per sviluppare un bioink in cui incapsulare cellule in modo da estrarre costrutti 3D all'interno dei quali le cellule possono proliferare generando un frammento di tessuto per applicazioni e studi biologici (capitolo 5).

# Capitolo 4

## Stampa di alginato di sodio

Una volta completate le modifiche hardware e software del sistema, descritte nel capitolo 2, è possibile iniziare le prove di estrusione. La soluzione viscosa da estrarre presa in considerazione è l'alginato di sodio a concentrazioni crescenti. La preparazione dell'alginato di sodio è stata condotta in collaborazione con la dottoressa Cinzia Ferrari del Laboratorio di Chirurgia Sperimentale dell'Università di Pavia. In questo capitolo sono descritte le prove preliminari svolte per valutare la stampabilità dell'alginato di sodio (paragrafo 4.1) e come una variazione della quantità equivalente di filamento estrusa incide sullo spessore di estrusione (paragrafo 4.2); a seguire sono state svolte prove di risoluzione e ripetibilità per valutare il grado di affidabilità del sistema (paragrafi 4.3 e 4.4). I risultati delle prove sono raccolti nel paragrafo 4.5. Verificata, infine, l'adattabilità del sistema a stampare soluzioni viscosi, è stato utilizzato il software Solidworks per sviluppare il modello CAD di figure complesse e non simmetriche e il software Slic3r per lo slicing e la generazione del codice g-code (paragrafo ??).

### 4.1 Verifica stampabilità dell'alginato

Per verificare la stampabilità dell'alginato di sodio sono state stampate le cinque geometrie disponibili nel set delle funzioni MATLAB implementate come precedentemente descritto nel paragrafo 2.2.3, impostando le dimensioni e i parametri di stampa richiesti. Le geometrie stampate sono:

- circonferenza di diametro pari a 10 mm;
- quadrato di lato pari a 15 mm;
- griglia di ampiezza pari a 15x15 mm con ampiezza celle pari a 5x5 mm.
- tre strisce di lunghezza pari a 15 mm, distanti 10 mm tra loro e connesse tramite giuntura lineare e obliqua.

La velocità di stampa impostata per tutte le geometrie è pari a 90 mm/min e la quantità equivalente di filamento estrusa pari a 0.2 mm, considerando un filamento termoplastico di sezione 2.85 mm.

Sulla base dei valori forniti sono stati generati i codici g-code e una volta caricati nel software Repetier è stato possibile iniziare la stampa.

Le geometrie sono state stampate utilizzando una soluzione di alginato di sodio al 2% di concentrazione su una piastra di Petri il cui fondo è stato pretrattato con una soluzione di calcio cloruro al 4% di concentrazione che ha agito da biopaper, permettendo sia una maggiore adesione dell'alginato sulla Petri sia una prima reticolazione della struttura stampata. Le dimensioni caratteristiche delle diverse geometrie stampate sono state misurate manualmente utilizzando un calibro per verificare che le dimensioni della geometria erogata fossero congruenti con quelle attese. I risultati relativi a tale prova sono presentati nel paragrafo 4.5.

## 4.2 Verifica relazione tra la variazione della quantità di filamento da estrudere e lo spessore estruso

Per valutare come una variazione della quantità equivalente di filamento estrusa  $E$  incida sulla larghezza di estrusione, sono state erogate quattro strisce di lunghezza pari a 15 mm distanti 5 mm tra loro con una quantità equivalente di filamento estruso  $E$  crescente:

- 0.1 mm;
- 0.2 mm;
- 0.3 mm;
- 0.4 mm.

Tale verifica è stata condotta utilizzando una concentrazione di alginato di sodio pari al 2% in modo tale, da valutare quali differenze, a livello di stampabilità e spessore dell'estrusione, intercorrano tra i diversi valori. Anche in questo caso i risultati sono riportati nel paragrafo 4.5.

## 4.3 Prove di risoluzione

Le prove di risoluzione in esame sono state condotte al fine di stabilire quale sia la risoluzione minima ottenibile dal sistema realizzato. A tale scopo sono state stampate tre geometrie standard di diverse dimensioni.

- **Circonferenza:**
  - diametro pari a 15 mm;

- diametro pari a 10 mm;
- diametro pari a 5 mm.
- **Quadrato:**
  - lato pari a 15 mm;
  - lato pari a 10 mm;
  - lato pari a 5 mm.
- **Griglia:**
  - ampiezza lato pari a 15x15 mm e celle 5x5 mm;
  - ampiezza lato pari a 15x15 mm e celle 3x3 mm;
  - ampiezza lato pari a 15x15 mm e celle 2.5x2.5 mm.

Per le circonferenze e i quadrati è stata variata la quantità equivalente di filamento estrusa  $E$ , mentre per la griglia è stato mantenuto un valore di  $E$  fisso in quanto, essendo una geometria di un grado di complessità superiore rispetto le altre, un elevato valore di  $E$ , non avrebbe permesso la stampa della struttura stessa. Tutte le prove di risoluzione hanno previsto l'utilizzo di tre concentrazioni di alginato di sodio pari al 2%, 4% e 6% per valutare se un incremento della concentrazione e quindi della viscosità, aumentasse la stampabilità della soluzione. I risultati sono riportati nel paragrafo 4.5.

## 4.4 Prove di ripetibilità

Una volta accertato quale sia la risoluzione minima ottenibile dal sistema, passo successivo è realizzare strutture ripetibili, ovvero che possano essere riprodotte conservando le stesse caratteristiche, ottenendo costrutti che abbiano grandezze e volumi definiti e standardizzati. Le prove di ripetibilità svolte hanno previsto la stampa di:

- un cerchio di diametro pari a 10 mm;
- un quadrato di lato pari a 10 mm;
- una griglia di ampiezza lato pari a 15x15 mm e ampiezza celle pari a 5x5 mm.

Ogni geometria è stata stampata per cinque volte rispettando le stesse condizioni di stampa (quantità estruse, velocità di stampa e modalità di biopaper) per le tre concentrazioni di alginato di sodio al 2%, 4% e 6%. I risultati sono presentati nel paragrafo 4.5.

## 4.5 Risultati

### 4.5.1 Verifica stampabilità dell'alginato

In figura 4.1 si presentano le geometrie stampate, in particolare un cerchio di diametro pari a 10 mm, un quadrato di lato pari a 10 mm, una griglia di ampiezza lato e celle pari a 15x15 mm e 3x3 mm rispettivamente e tre strisce di lunghezza pari a 15 mm aventi congiunzione sia lineare che obliqua. La quantità equivalente di filamento estrusa è stata fissata a 0.2 mm per il quadrato, circonferenza e strisce, mentre per la griglia a 0.1 mm. La velocità, invece, è stata fissata a 90 mm/min. Le differenze tra le dimensioni attese ed erogate sono riportate in tabella 4.1.



Figura 4.1: Verifica **stampabilità dell'alginato**: (a) cerchio di diametro pari a 10 mm e quadrato di lato pari a 10 mm, (b) tre strisce di lunghezza pari a 15 mm aventi congiunzione sia lineare che obliqua, (c) griglia di ampiezza lato e celle pari a 15x15 mm e 5x5 mm rispettivamente. La quantità equivalente di filamento estrusa è stata fissata a 0.2 mm per il quadrato, circonferenza e strisce mentre per la griglia a 0.1 mm. La velocità è stata fissata a 90 mm/min per tutte le geometrie.

Geometria	Misure nominali	Misure reali
Circonferenza	Diametro: 10 mm	Diametro: 10.852 mm
Quadrato	Lato: 15 mm	Lato: 15.489 mm
Strisce congiunzione obliqua	Lunghezza: 15 mm	Lunghezza: 15 mm
	Distanza strisce: 10 mm	Distanza strisce: 10 mm
Strisce congiunzione lineare	Lunghezza: 15.03 mm	Lunghezza: 15.035 mm
	Distanza strisce: 10 mm	Distanza strisce: 10 mm
Griglia	Ampiezza lato: 15x15 mm	Ampiezza lato: 15.357x15.357 mm
	Ampiezza celle: 5 mm	Ampiezza celle: 3.721x3.721 mm

Tabella 4.1: Verifica della **stampabilità dell'alginato**: confronto tra le dimensioni attese ed erogate.

Il controllo sulla geometria è buono, infatti è possibile stampare geometrie desiderate con buona affidabilità (figura 4.1), inoltre è possibile variare le dimensioni grazie allo script

MATLAB in modo semplice e veloce, ottenendo geometrie di diverse dimensioni. A livello quantitativo le misure delle geometrie estruse non combaciano perfettamente con quelle nominali (tabella 4.1): l'alginato di sodio puro, una volta erogato, non conserva la forma desiderata determinando, come da aspettative, un aumento delle dimensioni della geometria come conseguenza dello spessore di estrusione e della natura intrinseca dell'alginato che provoca il collasso della struttura stampata.

#### 4.5.2 Verifica relazione tra la variazione della quantità di filamento da estrudere e lo spessore estruso

In figura 4.2 sono presenti le quattro strisce di 15 mm di lunghezza estruse, per le tre concentrazioni di alginato di sodio al 2% fissando la velocità di estrusione ad un valore minore pari a 50 mm/min e variando la quantità di materiale estruso  $E$ . I valori delle misure sono riportati in tabella 4.2 in cui si presenta il confronto tra la lunghezza reale e quella nominale e lo spessore delle strisce erogate per ogni valore di  $E$ .

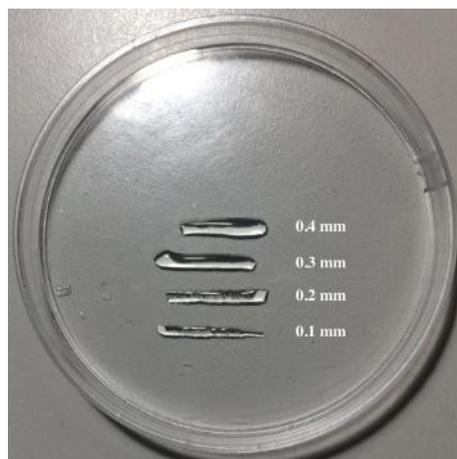


Figura 4.2: Verifica **relazione tra la variazione della quantità di filamento da estrudere e lo spessore estruso**: quattro strisce di lunghezza pari a 15 mm di alginato di sodio estruse al 2%, 4% e 6% di concentrazione mantenendo fissa la velocità a 50 mm/min e variando la quantità equivalente di materiale da estrudere  $E$ .

Se da un lato si ha un buon controllo della geometria, dall'altro il controllo dell'estrusione risulta più difficoltoso. La figura 4.2 mostra il fatto che lo spessore delle strisce varia a seconda della quantità di materiale estruso settato, infatti all'aumentare di quest'ultima, aumenta, in modo non lineare, lo spessore della striscia. Quanto detto è confermato anche a livello quantitativo dalle misure reali ottenute tramite misurazione con il calibro di cui si riportano i valori in tabella 4.2.

Concentrazione alginato	Filamento equivalente [mm]	Lunghezza nominale [mm]	Lunghezza reale [mm]	Spessore [mm]
2%	0.1	15	15.016	1.911
	0.2		15.047	2.254
	0.3		15.01	2.357
	0.4		15.028	2.712

Tabella 4.2: Verifica **relazione tra la variazione della quantità di filamento da estrarre e lo spessore estruso**: lunghezza e spessore delle quattro strisce di 15 mm erogate variando la quantità equivalente di materiale estruso e mantenendo costante la velocità di estrusione a [50 mm/min].

### 4.5.3 Prove di risoluzione

Di seguito sono mostrati i risultati relativi alle prove di risoluzione condotte estrudendo le tre geometrie standard (circonferenza, quadrato e griglia) con una soluzione di alginato di sodio al 2%, 4% e 6% di concentrazione. Oltre a essere riportate le dimensioni geometriche attese e la quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) impostata, sono presenti le misure reali delle dimensioni geometriche ottenute tramite misurazione con calibro digitale. I risultati delle misure sono riportate in termini di media dei valori prelevati in diversi punti della geometria stampata.

#### Alginato di sodio 2%

- **Circonferenza:** da una prima analisi qualitativa (figura 4.3) emerge il fatto che all'aumentare di  $E$  aumenta lo spessore di estrusione. Stampando, inoltre, una circonferenza avente diametro minore, come nel caso di 5 mm e utilizzando un valore elevato di  $E$ , non è rispettata la geometria attesa (figura 4.3 (d.3)), dunque la quantità equivalente di filamento estrusa risulta essere inadeguata per le dimensioni della geometria in esame a tal punto che la geometria risultante è un cerchio pieno piuttosto che una circonferenza. I risultati a livello quantitativo, riportati in tabella 4.3, confermano quanto detto in precedenza: all'aumentare di  $E$  aumenta sia lo spessore che il diametro della geometria, discostandosi talvolta in modo sostanziale, dalla misura nominale del diametro, soprattutto nel caso di decrescita della dimensione della geometria, mentre le geometrie aventi dimensioni maggiori rispettano le grandezze attese. Fissando, quindi, valori di  $E$  minori è possibile garantire una buona risoluzione della stampa di geometrie aventi anche dimensioni minori.
- **Quadrato:** anche in questo caso da una prima analisi qualitativa (figura 4.4) emerge il fatto che all'aumentare di  $E$  aumenta lo spessore di estrusione e stampando un quadrato avente lato minore e un valore elevato di  $E$ , non è rispettata la geometria attesa, infatti considerando il quadrato di lato pari a 5 mm, solo nel caso di  $E$  pari a 0.1 mm è ottenuta la geometria attesa, negli altri casi la geometria risultante è

un quadrato pieno (figura 4.4 b.3, c.3 e d.3). Quanto detto è confermato a livello quantitativo dai valori riportati in tabella 4.4.

- **Griglia:** in figura 4.5 sono mostrati i risultati della prova di risoluzione relativi alla griglia, mentre in tabella 4.5, oltre a essere riportate le ampiezze attese del lato (l) e delle celle (c) sono presenti le misure reali delle ampiezze ottenute tramite misurazione con calibro. La quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) è stata mantenuta fissa a 0.1 mm in quanto valori maggiori avrebbero impedito la realizzazione della geometria. Da una prima analisi qualitativa, nonostante la griglia sia la geometria più complessa rispetto a quelle stampate precedentemente, mantiene una buona risoluzione della forma sia per quanto riguarda il caso delle celle con ampiezza 5x5 mm che 3x3 mm. Nel caso delle celle 2.5x2.5 mm la risoluzione non è ottima ed è risultato difficoltoso effettuare la misurazione manuale tramite calibro a causa delle dimensioni notevolmente ridotte. In generale, le misure delle ampiezze delle celle, come riportato in tabella 4.5 non rispettano quelle attese risultando nettamente inferiori.

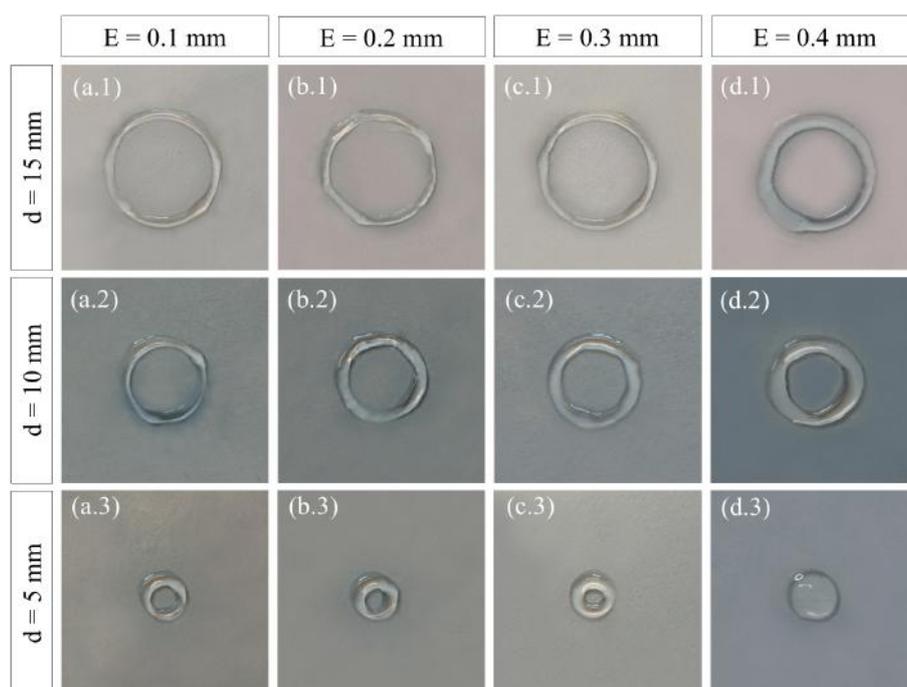


Figura 4.3: Prova di **risoluzione della circonferenza** stampata utilizzando una soluzione di **alginato di sodio al 2%** di concentrazione con diametro (d) decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) crescente.

Risoluzione circonferenza 2% alginato di sodio			
Misure nominali [mm]		Misure reali [mm]	
Diametro	Filamento equivalente	Diametro	Spessore
15	0.1	15.232	1.458
	0.2	15.338	1.384
	0.3	15.771	2.436
	0.4	16.075	3.542
10	0.1	10.253	1.929
	0.2	10.856	2.82
	0.3	11.22	3.419
	0.4	12.08	4.985
5	0.1	5.666	1.968
	0.2	5.791	3.134
	0.3	6.137	5.533
	0.4	6.934	—

Tabella 4.3: Risultati relativi alle **circonferenze** stampate con **alginato di sodio al 2%** di concentrazione con diametro decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa crescente. La misura del diametro riportata si riferisce al diametro più esterno, mentre lo spessore è stato calcolato considerando la differenza tra il diametro esterno e interno.

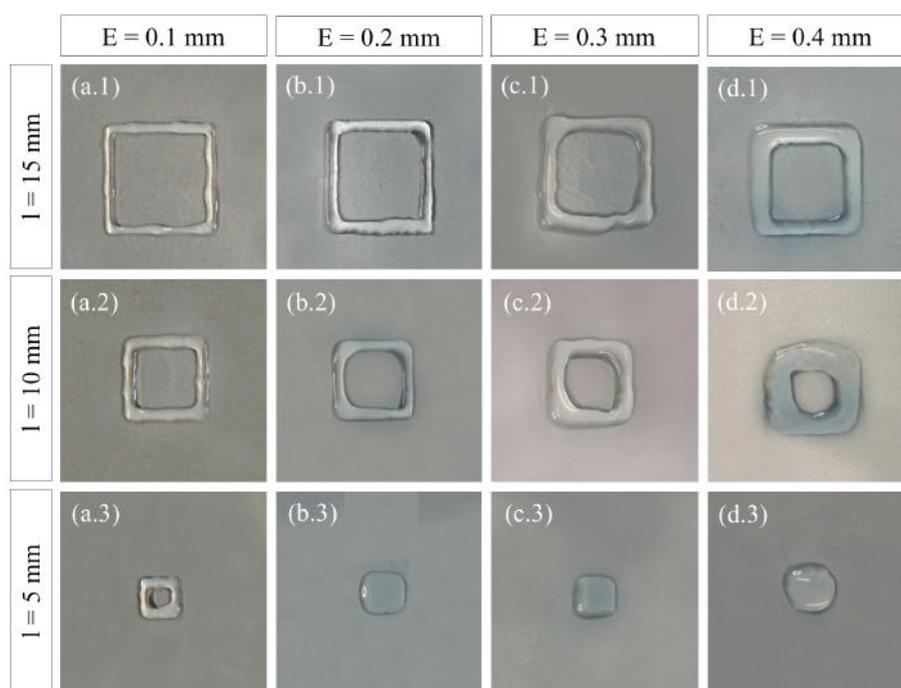


Figura 4.4: Prova di **risoluzione del quadrato** stampato utilizzando una soluzione di **alginato di sodio al 2%** di concentrazione con lato ( $l$ ) decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) crescente.

Risoluzione quadrato 2% alginato di sodio			
Misure nominali [mm]		Misure reali [mm]	
Lato	Filamento equivalente	Lato	Spessore
15	0.1	15.354	1.155
	0.2	15.487	2.112
	0.3	15.551	2.283
	0.4	15.689	2.91
10	0.1	10.317	2.096
	0.2	11.463	3.071
	0.3	12.481	5.05
	0.4	12.839	6.884
5	0.1	5.33	1.962
	0.2	7.845	—
	0.3	7.773	—
	0.4	7.982	—

Tabella 4.4: Risultati relativi ai **quadrati** stampati con **alginato di sodio al 2%** di concentrazione con lato decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa crescente. La misura del lato riportata si riferisce al lato più esterno, mentre lo spessore è stato calcolato considerando la differenza tra il lato esterno e interno. I valori tratteggiati implicano che la forma risultante è un quadrato pieno.

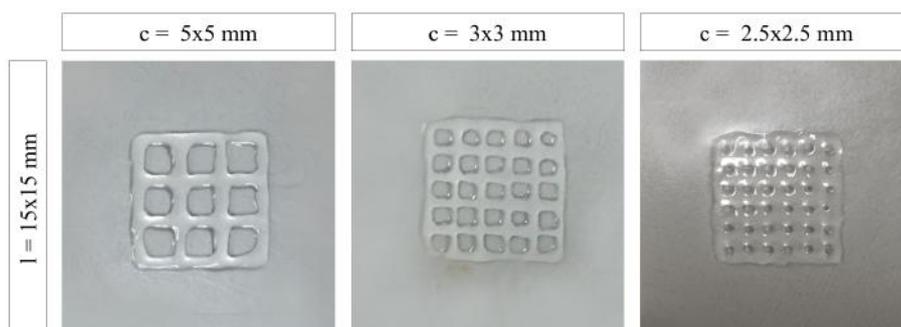


Figura 4.5: Prova di **risoluzione della griglia** stampata utilizzando una soluzione di **alginato di sodio al 2%** di concentrazione con ampiezza lato ( $l$ ) e ampiezza celle ( $c$ ) decrescenti mantenendo fissa la quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) a 0.1 mm.

Risoluzione griglia 2% alginato di sodio			
Misure nominali [mm]		Misure reali [mm]	
Ampiezza lato	Ampiezza celle	Ampiezza lato	Ampiezza celle
15x15	5x5	15.351x15.351	3.725x3.725
15x15	3x3	15.349x15.349	2.086x2.086
15x15	2.5x2.5	15.358x15.358	1.024x1.024

Tabella 4.5: Risultati relativi alle **griglie** stampate con **alginato di sodio al 2%** di concentrazione con ampiezza lato ( $l$ ) e ampiezza celle ( $c$ ) decrescente fissando la quantità equivalente di filamento estrusa a 0.1 mm. La misura dell'ampiezza dell'ampiezza lato riportata si riferisce al lato più esterno.

### Alginato 4%

- **Circonferenza:** come per l'alginato al 2% di concentrazione, anche in questo caso, all'aumentare di  $E$  aumenta lo spessore della circonferenza (figura 4.6). L'alginato al 4% di concentrazione preserva maggiormente le dimensioni della geometria per tutti i valori di  $E$ . Tale evento può essere confermato analizzando la tabella 4.6 in cui si nota una maggiore congruenza del diametro delle geometrie estruse con quelle attese. L'alginato al 4% di concentrazione sembra essere più adatto alla stampa.
- **Quadrato:** come per i casi precedentemente analizzati, anche in questo caso, è possibile notare un aumento dello spessore del lato della geometria all'aumentare di  $E$  (figura 4.7). A differenza della circonferenza, le dimensioni dei diametri estrusi discostano maggiormente da quelli attesi e inoltre, considerando il quadrato di lato pari a 5 mm per  $E$  pari a 0.3 mm e 0.4 mm non è stata ottenuta la geometria attesa presentando un quadrato pieno (figura 4.7 c.3 e d.3). Quanto detto è confermato anche a livello quantitativo dai valori riportati in tabella 4.7.
- **Griglia:** sia dall'analisi qualitativa (figura 4.8) che quantitativa (tabella 4.8) emerge il fatto che, a differenza dell'alginato ad 2% di concentrazione, le dimensioni delle geometrie erogate si avvicinano maggiormente a quelle attese. Anche in questo caso le celle 2.5x2.5 mm mostrano risoluzione peggiore a causa delle dimensioni notevolmente ridotte. Anche in questo caso, la quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) è stata fissata a 0.1 mm.

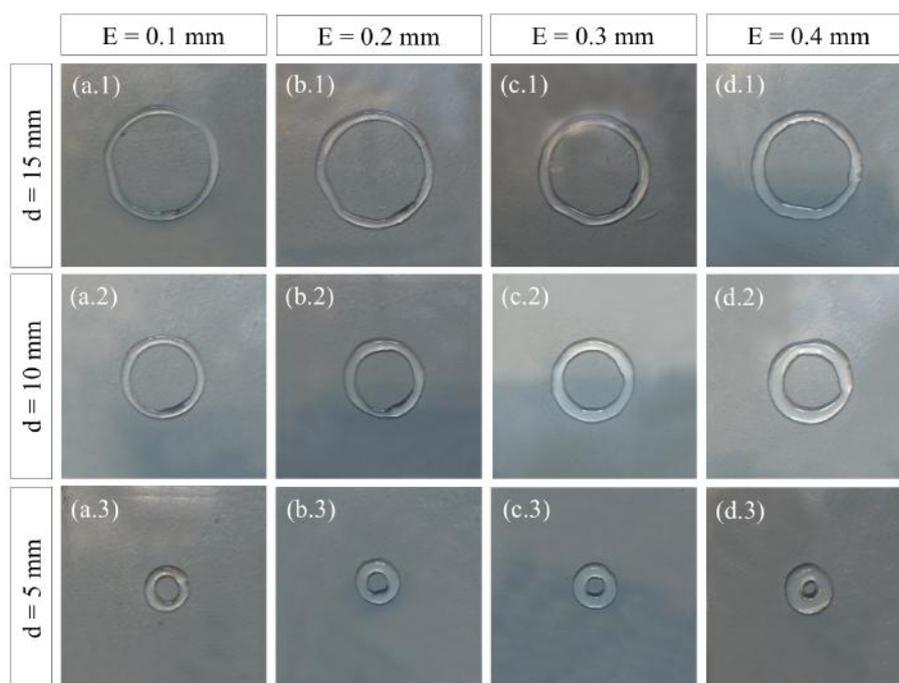


Figura 4.6: Prova di **risoluzione della circonferenza** stampata utilizzando una soluzione di **alginate di sodio al 4%** di concentrazione con diametro ( $d$ ) decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) crescente.

Risoluzione circonferenza 4% alginate di sodio			
Misure nominali		Misure reali	
Diametro	Filamento equivalente	Diametro	Spessore
15	0.1	15.151	1.35
	0.2	15.298	1.437
	0.3	15.534	2.323
	0.4	15.876	2.669
10	0.1	10.187	1.548
	0.2	10.391	1.874
	0.3	10.557	2.49
	0.4	10.744	3.331
5	0.1	5.352	1.556
	0.2	5.494	3.291
	0.3	5.882	5.633
	0.4	6.548	5.977

Tabella 4.6: Risultati relativi alle **circonferenze** stampate con **alginate di sodio al 4%** di concentrazione con diametro decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa crescente. La misura del diametro riportata si riferisce al diametro più esterno, mentre lo spessore è stato calcolato considerando la differenza tra il diametro esterno e interno.

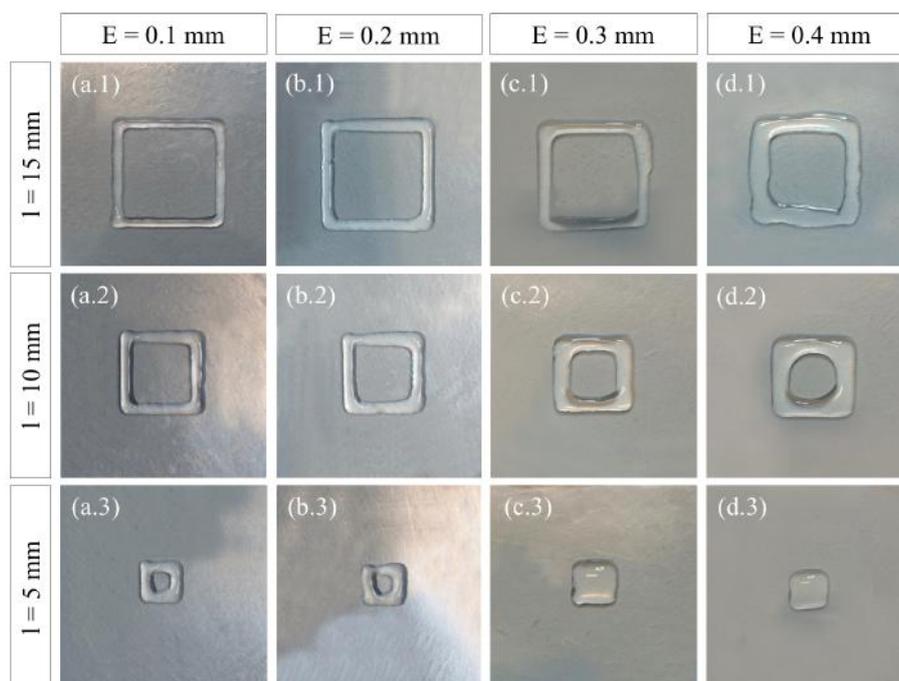


Figura 4.7: Prova di **risoluzione del quadrato** stampato utilizzando una soluzione di **alginate di sodio al 4%** di concentrazione con lato ( $l$ ) decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) crescente.

Risoluzione quadrato 4% alginate di sodio			
Misure nominali [mm]		Misure reali [mm]	
Lato	Filamento equivalente	Lato	Spessore
15	0.1	15.145	1.459
	0.2	15.212	1.685
	0.3	15.369	1.882
	0.4	15.581	3.013
10	0.1	10.252	0.685
	0.2	10.729	1.394
	0.3	11.02	2.396
	0.4	11.952	3.044
5	0.1	5.177	1.76
	0.2	5.372	1.951
	0.3	6.226	—
	0.4	7.179	—

Tabella 4.7: Risultati relativi ai **quadrati** stampati con **alginate di sodio al 4%** di concentrazione con lato decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa crescente. La misura del lato riportata si riferisce al lato più esterno, mentre lo spessore è stato calcolato considerando la differenza tra il lato esterno e interno. I valori tratteggiati implicano che la forma risultante è un quadrato pieno.

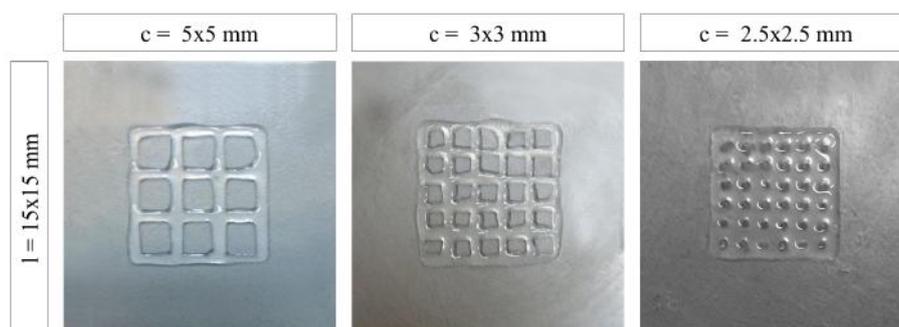


Figura 4.8: Risultati relativi alle **griglie** stampate con **alginato di sodio al 4%** di concentrazione con ampiezza lato ( $l$ ) e ampiezza celle ( $c$ ) decrescente fissando la quantità equivalente di filamento estrusa a 0.1 mm. La misura dell'ampiezza dell'ampiezza lato riportata si riferisce al lato più esterno.

Risoluzione griglia 4% alginato di sodio			
Misure nominali [mm]		Misure reali [mm]	
Ampiezza lato	Ampiezza celle	Ampiezza lato	Ampiezza celle
15x15	5x5	15.148x15.148	4.68x4.68
15x15	3x3	15.153x15.153	2.883x2.883
15x15	2.5x2.5	15.145x15.145	1.123x1.123

Tabella 4.8: Risultati relativi alle **griglie** stampate con **alginato di sodio al 4%** di concentrazione con ampiezze del lato e delle celle. In questo caso la quantità equivalente di filamento estrusa è stata fissata a 0.2 mm.

**Alginato 6%**

- **Circonferenza:** l'alginato al 6% di concentrazione preserva nella maggior parte delle volte la forma della geometria per tutti i valori di  $E$  (figura 4.9). I risultati, riassunti in tabella 4.9, mostrano il fatto che le dimensioni estruse sono maggiori rispetto le attese soprattutto nel caso di diametro pari a 10 mm e 5 mm. Anche in questo caso all'aumentare di  $E$  aumenta lo spessore della geometria.
- **Quadrato:** all'aumentare di  $E$  aumenta lo spessore del lato della geometria e le dimensioni dei diametri estrusi discossano maggiormente da quelli attesi. Quanto detto è confermato dai risultati riportati in tabella 4.10. Considerando il quadrato di lato pari a 5 mm per  $E$  pari a 0.4 mm non è stata ottenuta la geometria attesa presentando un quadrato pieno (figura 4.7 d.3).
- **Griglia:** anche in questo caso la quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) è stata fissata a 0.1 mm. Sia dall'analisi qualitativa (figura 4.11) che quantitativa (tabella 4.11) emerge il fatto che, le dimensioni delle geometrie erogate si discossano maggiormente da quelle attese. Nel caso delle celle 2.5x2.5 mm esse sono quasi indistinguibili mostrando scarsa risoluzione e inoltre le misure prelevate manualmente tramite calibro risultano molto approssimate a causa delle dimensioni delle celle.

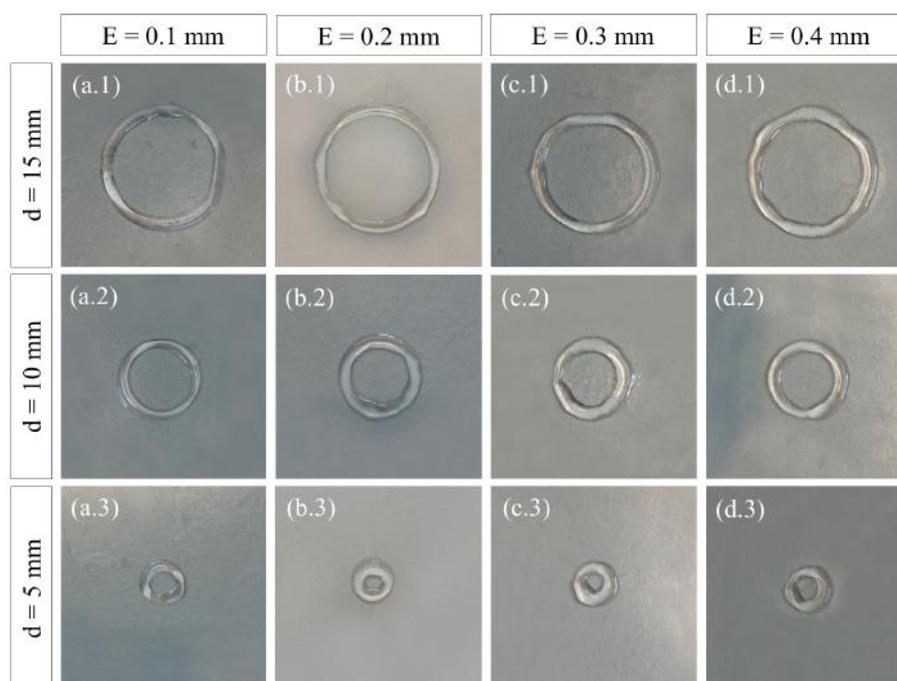


Figura 4.9: Prova di **risoluzione della circonferenza** stampata utilizzando una soluzione di **alginato di sodio al 6%** di concentrazione con diametro ( $d$ ) decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) crescente.

Risoluzione circonferenza 6% alginato di sodio			
Misure nominali		Misure reali	
Diametro	Filamento equivalente	Diametro	Spessore
15	0.1	15.141	1.319
	0.2	15.397	1.842
	0.3	15.583	2.096
	0.4	15.835	3.424
10	0.1	10.148	1.466
	0.2	11.346	2.749
	0.3	10.659	2.792
	0.4	10.751	3.725
5	0.1	5.285	1.923
	0.2	5.367	2.997
	0.3	5.731	3.42
	0.4	6.069	3.587

Tabella 4.9: Risultati relativi alle **circonferenze** stampate con **alginato di sodio al 4%** di concentrazione con diametro decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa crescente. La misura del diametro riportata si riferisce al diametro più esterno, mentre lo spessore è stato calcolato considerando la differenza tra il diametro esterno e interno.

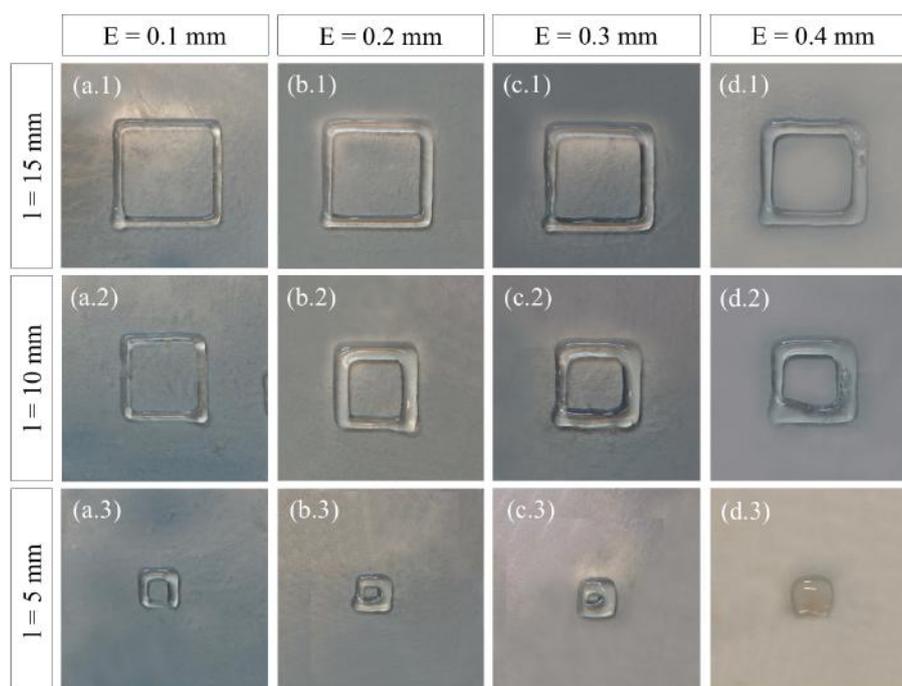


Figura 4.10: Prova di **risoluzione del quadrato** stampato utilizzando una soluzione di **alginato di sodio al 6%** di concentrazione con lato ( $l$ ) decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) crescente.

Risoluzione quadrato 6% alginato di sodio			
Misure nominali [mm]		Misure reali [mm]	
Lato	Filamento equivalente	Lato	Spessore
15	0.1	15.173	0.92
	0.2	15.239	2.894
	0.3	15.473	3.346
	0.4	15.738	3.811
10	0.1	10.446	0.887
	0.2	10.799	2.59
	0.3	11.175	3.957
	0.4	11.266	4.329
5	0.1	5.243	0.789
	0.2	5.638	2.155
	0.3	6.231	5.637
	0.4	7.086	—

Tabella 4.10: Risultati relativi ai **quadrati** stampati con **alginato di sodio al 6%** di concentrazione con lato decrescente e quantità equivalente di filamento estrusa crescente. La misura del lato riportata si riferisce al lato più esterno, mentre lo spessore è stato calcolato considerando la differenza tra il lato esterno e interno. Il valore tratteggiato implica che la forma risultante è un quadrato pieno.

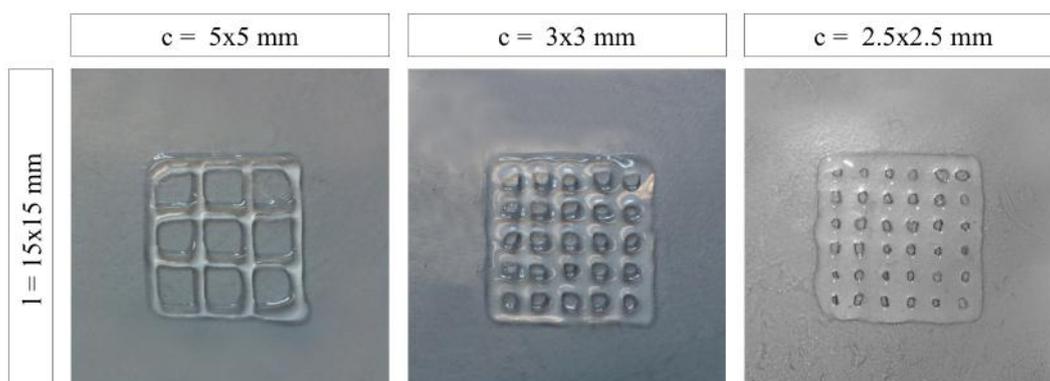


Figura 4.11: Risultati relativi alle **griglie** stampate con **alginato di sodio al 6%** di concentrazione con ampiezza lato ( $l$ ) e ampiezza celle ( $c$ ) decrescente fissando la quantità equivalente di filamento estrusa a 0.1 mm. La misura dell'ampiezza dell'ampiezza lato riportata si riferisce al lato più esterno.

Risoluzione griglia 6% alginato di sodio			
Misure nominali [mm]		Misure reali [mm]	
Ampiezza lato	Ampiezza celle	Ampiezza lato	Ampiezza celle
15x15	5x5	15.176x15.176	4.86x4.86
15x15	3x3	15.183x15.183	1.651x1.651
15x15	2.5x2.5	15.174x15.174	0.833x0.833

Tabella 4.11: Risultati relativi alle **griglie** stampate con **alginato di sodio al 4%** di concentrazione con ampiezze del lato e delle celle . La quantità equivalente di filamento estrusa è stata fissata a 0.1 mm.

#### 4.5.4 Prove di ripetibilità

Di seguito sono riportati i risultati relativi alle prove di ripetibilità condotte estrudendo per cinque volte le tre geometrie standard (circonferenza, quadrato e griglia) con una soluzione di alginato di sodio al 2%, 4% e 6% di concentrazione. Le geometrie sono state estruse mantenendo fissa la quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ), sulla base dei risultati ottenuti dalle precedenti prove di risoluzione, scegliendo quella che avesse geometria migliore. Anche in questo caso le geometrie sono state quantificate utilizzando un calibro effettuando diverse misurazioni su tutti i lati delle figure e i valori sono stati mediati in modo tale da ottenere una misura consistente.

- **Alginato 2%**: in figura 4.12 sono mostrati i risultati della prova di ripetibilità relativi alle tre geometrie. Da una prima analisi qualitativa le geometrie sembrano avere grandezze ripetibili. Tale risultato è confermato dai valori delle dimensioni delle geometrie, riportati in tabella 4.12, in cui le dimensioni erogate sono piuttosto simili a quelle attese e dalla deviazione standard che presenta valori piccoli, sintomo di poca variabilità della misura dal valore medio e di conseguenza un buon grado di affidabilità della ripetibilità della misura.
- **Alginato 4%**: anche in questo caso le geometrie mostrano un buon grado di ripetibilità (figura 4.13). Tale risultato è confermato dai valori delle dimensioni delle geometrie, riassunti in tabella 4.13 in cui le dimensioni erogate sono simili a quelle attese e dai valori della deviazione standard che risultano non elevati per tutte le geometrie e conseguenza di poca variabilità della misura.
- **Alginato 6%**: come per l'alginato al 2% e al 4% di concentrazione le geometrie sembrano avere grandezze ripetibili (figura 4.14) e le dimensioni erogate, come mostra la tabella 4.14, sono simili a quelle attese e la deviazione standard mostra valori approssimabili allo zero.

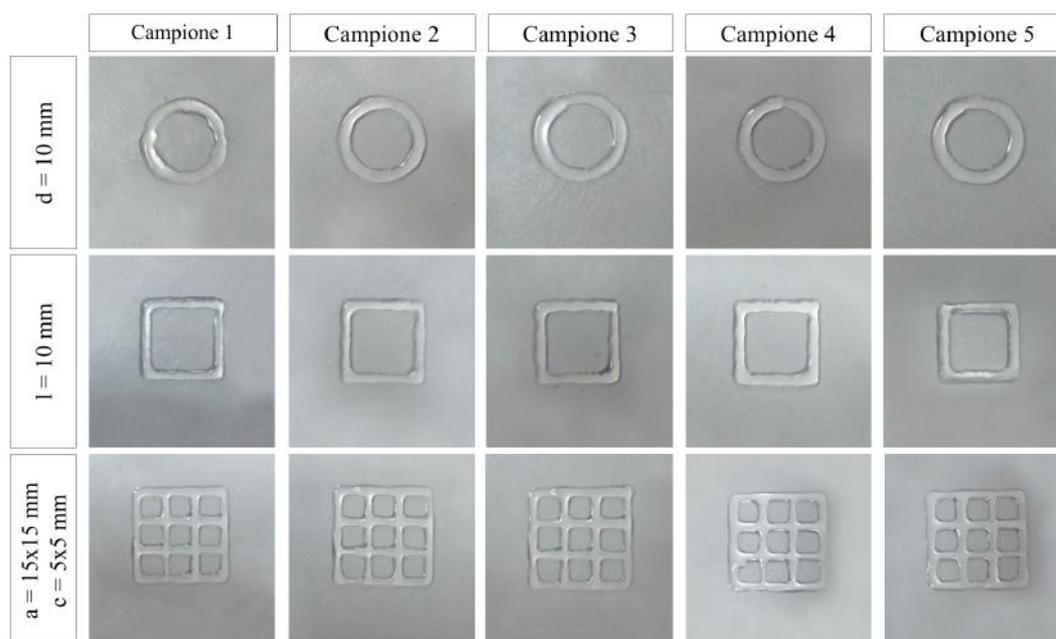


Figura 4.12: Prova di **ripetibilità della circonferenza, quadrato e griglia** stampata utilizzando una soluzione di **alginato di sodio al 2%** di concentrazione mantenendo fissa la quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) a 0.1 mm.

Ripetibilità alginato 2%					
Geometria	Campione	Misure nominali [mm]	Misure reali [mm]	Media [mm]	Deviazione Standard[mm]
Circonferenza	1	Diametro 10	10.252	10.2542	0.0065
	2		10.249		
	3		10.248		
	4		10.259		
	5		10.263		
Quadrato	1	Lato 10	10.311	10.3118	0.0056
	2		10.317		
	3		10.308		
	4		10.318		
	5		10.305		
Griglia	1	Ampiezza lato 15x15 Ampiezza celle 5x5	15.348/3.724	15.351 3.7218	0.006 0.0052
	2		15.359/3.726		
	3		15.351/3.719		
	4		15.354/3.714		
	5		15.343/3.726		

Tabella 4.12: Risultati relativi alle prove di **ripetibilità della circonferenza, del quadrato e della griglia** stampati con **alginato di sodio al 2%** di concentrazione. Sono riportate le misure nominali, le dimensioni estruse (le misure sono riferite al bordo più esterno della geometria), media e deviazione standard.

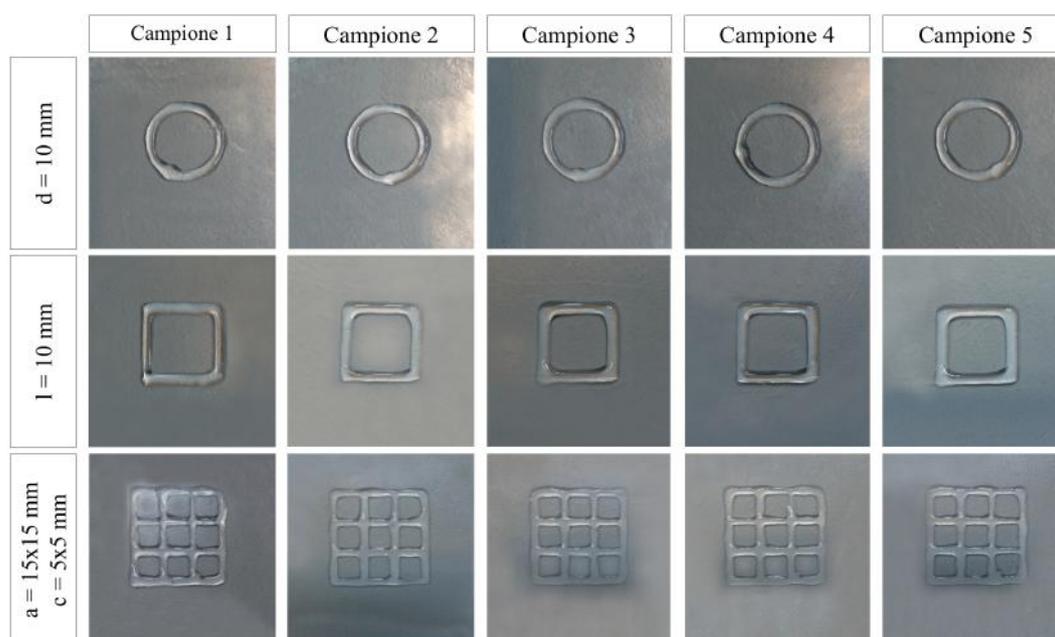


Figura 4.13: Prova di **ripetibilità della circonferenza, quadrato e griglia** stampata utilizzando una soluzione di **alginato di sodio al 4%** di concentrazione mantenendo fissa la quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) a 0.1.

Ripetibilità alginato 4%					
Geometria	Campione	Misure nominali [mm]	Misure reali [mm]	Media [mm]	Deviazione Standard [mm]
Circonferenza	1	Diametro 10	10.182	10.1884	0.0052
	2		10.192		
	3		10.185		
	4		10.195		
	5		10.188		
Quadrato	1	Lato 10	10.253	10.253	0.0057
	2		10.248		
	3		10.261		
	4		10.256		
	5		10.247		
Griglia	1	Ampiezza lato 15x15	15.147/4.667	15.149 4.669	0.007 0.0076
	2		15.158/4.681		
	3	Ampiezza celle 5x5	15.156/4.662		
	4		15.145/4.674		
	5		15.142/4.665		

Tabella 4.13: Risultati relativi alle prove di **ripetibilità della circonferenza, del quadrato e della griglia** stampati con **alginato di sodio al 4%** di concentrazione. Sono riportate le misure nominali, le dimensioni estruse (le misure sono riferite al bordo più esterno della geometria), media e deviazione standard.

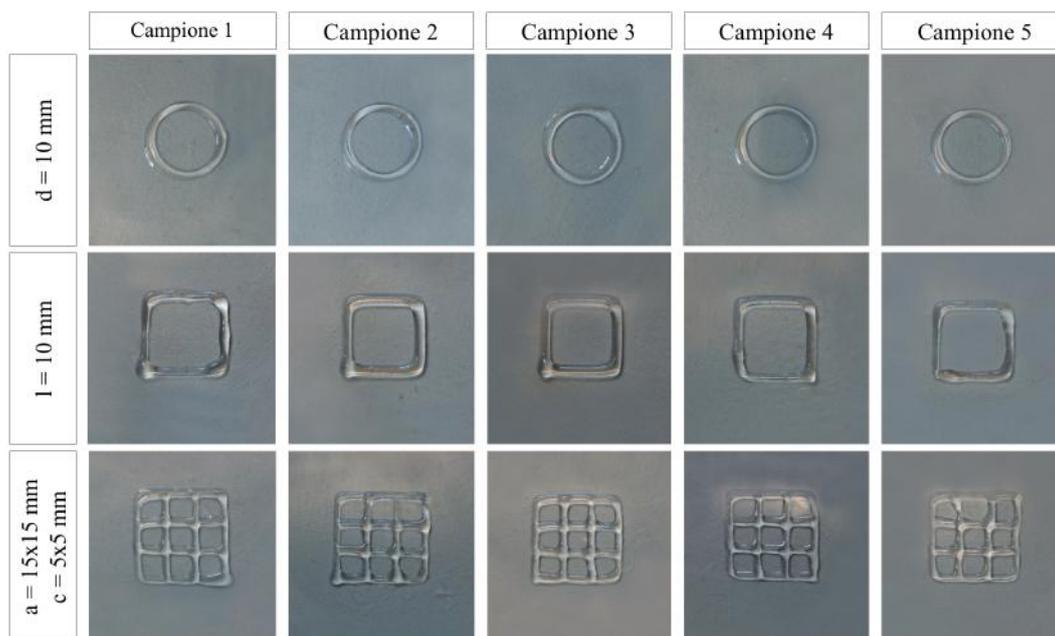


Figura 4.14: Prova di **ripetibilità della circonferenza, quadrato e griglia** stampata utilizzando una soluzione di **alginato di sodio al 6%** di concentrazione mantenendo fissa la quantità equivalente di filamento estrusa ( $E$ ) a 0.1.

Ripetibilità alginato 6%					
Geometria	Campione	Misure nominali [mm]	Misure reali [mm]	Media [mm]	Deviazione Standard[mm]
Circonferenza	1	Diametro 10	10.138	10.1446	0.0078
	2		10.146		
	3		10.151		
	4		10.138		
	5		10.153		
Quadrato	1	Lato 10	10.453	10.4438	0.0069
	2		10.441		
	3		10.435		
	4		10.442		
	5		10.448		
Griglia	1	Ampiezza lato 15x15	15.183/4.864	15.1764 4.8666	0.0049 0.0076
	2		15.176/4.877		
	3	Ampiezza celle 5x5 mm	15.174/4.859		
	4		15.17/4.872		
	5		15.179/4.861		

Tabella 4.14: Risultati relativi alle prove di **ripetibilità della circonferenza, del quadrato e della griglia** stampati con **alginato di sodio al 6%** di concentrazione. Sono riportate le misure nominali, le dimensioni estruse (le misure sono riferite al bordo più esterno della geometria), media e deviazione standard.

### 4.5.5 Conclusioni

Sulla base dei risultati emersi nel paragrafo 4.5 è possibile affermare che la customizzazione di una stampante 3D con tecnologia FDM è adatta per estrarre una soluzione di alginato di sodio a diverse concentrazioni. Grazie alle funzioni MATLAB è possibile realizzare geometrie semplici e variare i parametri delle dimensioni e di stampa in modo semplice e immediato, generando automaticamente il codice g-code utile per stampare la geometria desiderata garantendo buona affidabilità e ripetibilità sia della forma che dimensioni.

Il set-up è in grado di stampare geometrie più o meno complesse di diverse grandezze conservando una buona risoluzione, anche per geometrie millimetriche fino a una dimensione di 5 mm, per tutte le concentrazioni di alginato di sodio. Le geometrie di piccole dimensioni, inoltre, migliorano la risoluzione se la quantità equivalente di filamento è fissata a valori bassi come 0.2 mm e minori o uguali a 0.1 mm, per quanto riguarda soluzioni di alginato al 2% e 4% di concentrazione, discorso differente vale per l'alginato al 6% di concentrazione, la cui eccessiva viscosità impedisce l'erogazione costante a causa delle bolle d'aria formate durante il processo di preparazione della soluzione del materiale, dunque la quantità equivalente di filamento estrusa settabile non può essere inferiore a 0.1 mm. Anche le prove di ripetibilità hanno rivelato risultati soddisfacenti mostrando buona ripetibilità sia nella forma che nelle dimensioni della geometria in esame, per tutte le concentrazioni di alginato. Alla luce di quanto detto, le soluzioni di alginato di sodio al 4% e 6% di concentrazioni sono maggiormente stampabili producendo geometrie aventi dimensioni approssimabili a quelle attese. Soprattutto la soluzione al 4% risulta essere la migliore a livello di stampabilità in quanto conserva maggiormente la forma evitando l'espansione del materiale sulla Petri, il collasso della struttura durante la deposizione e la formazione di bolle d'aria durante il processo di stampa come accade per l'alginato al 6% di concentrazione.

## 4.6 Limiti e possibili risoluzioni

Uno dei limiti fondamentali è la formazione delle bolle d'aria che inibiscono l'estrusione. Occorre quindi, prima di ogni estrusione, verificare la presenza o meno di bolle d'aria nell'ugello e nel caso fossero presenti forzare l'erogazione del materiale in modo tale da eliminare la bolla. La formazione di bolle d'aria, inoltre, aumenta incrementando la concentrazione dell'alginato in quanto esso presenta microbolle che si formano durante il processo di realizzazione della soluzione. Una delle soluzioni è eliminare le bolle prima dell'utilizzo della soluzione, utilizzando apposita strumentazione. Tale processo è stato effettuato per la soluzione al 6% di concentrazione, ma con scarsi risultati. Una delle soluzioni potrebbe essere quella di sottoporre la soluzione agli ultrasuoni durante la preparazione in modo tale da rompere le microbolle.

Ulteriore limite è la viscosità dell'alginato, infatti a causa della sua natura intrinseca, una volta depositato non conserva la forma provocando una variazione delle dimensioni geometriche attese e il collasso della struttura. Tale problema è attenuato utilizzando una concentrazione maggiore di alginato di sodio, ad esempio al 4%, che allo stesso tempo,

nella maggior parte delle volte, non presenta la formazione delle bolle d'aria durante il processo di stampa. Un'altra soluzione per evitare il collasso della struttura è sottoporre l'alginato al processo di crosslinking con il calcio cloruro, subito dopo o durante la stampa donando maggiore rigidità e sostegno alla struttura.

<b>Limiti</b>	<b>Soluzione</b>
Formazione bolle d'aria	Ultrasuoni
Variatione dimensioni della geometria	Aumento concentrazione di alginato
Collasso struttura	Crosslinking con calcio cloruro

Tabella 4.15: Limiti e possibili risoluzioni dell'erogazione di alginato di sodio con stampante FDM customizzata.

## 4.7 Utilizzo del software Slic3r

Una volta appurato che il sistema customizzato è adatto a stampare soluzioni viscosi, è possibile procedere con la realizzazione di figure più complesse sviluppando un modello 3D, effettuando lo slicing del modello e sulla base dei parametri settati, generare automaticamente il codice g-code. In figura 4.15 sono mostrate un esempio di figure stampate utilizzando il software Solidworks per sviluppare il modello CAD della figura desiderata e il software Slic3r per lo sclicing e la generazione del g-code e una soluzione di alginato di sodio pari al 4% di concentrazione. La stampante customizzata è in grado di realizzare figure complesse e non simmetriche con un buon grado di affidabilità. Il sistema, dunque, può essere utilizzato nelle stesse modalità di una qualsiasi stampante 3D permettendo l'utilizzo di tutti gli strumenti CAD e di slicing previsti dal tradizionale processo di stampa FDM e risulta essere adattabile a qualsiasi stampante 3D commerciale che integra tale tecnologia.

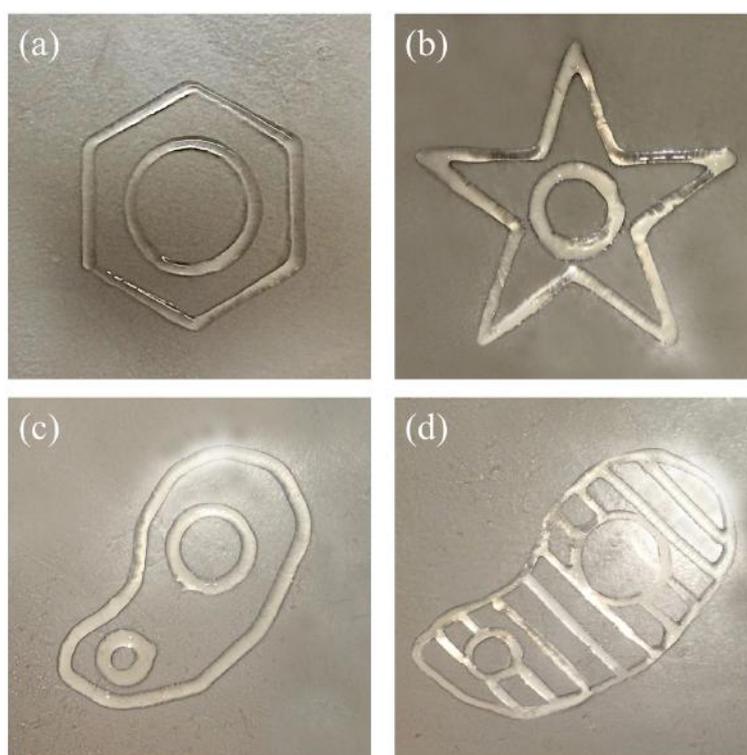


Figura 4.15: Figure stampate di alginato di sodio al 4% di concentrazione sviluppando tramite software SolidWorks il modello 3D della geometria e generando automaticamente il codice g-code sulla base dei parametri settati tramite software di slicing Slic3r.

## Capitolo 5

# Estrusione di bioink a base di alginato di sodio

Una volta allestito il set-up per la customizzazione della stampante FDM 3ntr (capitolo 2) e verificata l'affidabilità del sistema a estrarre l'alginato di sodio (capitolo 4), il secondo obiettivo del lavoro è utilizzare l'alginato di sodio per realizzare un bioink all'interno del quale sono incapsulate delle cellule. In questo modo è possibile stampare direttamente un costrutto 3D in cui le cellule possano proliferare per il drug delivery e testing.

Ruolo fondamentale, durante la realizzazione di un costrutto 3D cellulare, utilizzabile e di rilevanza biologica, è svolto dal bioink, infatti, è necessario che esso ottimizzi la stampa e allo stesso tempo permetta alle cellule di proliferare preservando la vitalità. Nel capitolo che segue, paragrafo 5.1, sono riportate alcune considerazioni preliminari circa il bioink da utilizzare e i test di proliferazione cellulare condotti su diversi campioni di bioink estrusi utilizzando protocolli standard di laboratorio senza stampante. Come suggerito da letteratura (capitolo 3), i bioink in esame sono costituiti da una soluzione di alginato di sodio alla quale è stato aggiunto un copolimero, la gelatina, per migliorare la proliferazione e vitalità cellulare e differiscono dalla concentrazione della soluzione al fine di trovare la concentrazione di alginato di sodio e il numero di cellule che ottimizzi la proliferazione stessa. Successivamente, paragrafo 5.2, sono stati condotti test di vitalità cellulare su campioni estrusi utilizzando la stampante 3ntr per valutare se il sistema customizzato allestito sia dannoso per le cellule e se inficia la vitalità; inoltre è stato verificato se la variazione della composizione del bioink, aggiungendo la gelatina, influenzi la stampabilità della soluzione e se può essere comparata con la soluzione di alginato puro. Una volta appurata la validità del sistema a stampare bioink, preservando la vitalità cellulare e la stampabilità, è possibile considerare la stampante FDM per future applicazioni biologiche.

I test di vitalità e proliferazione descritti nei paragrafi che seguono sono stati svolti in collaborazione con il Laboratorio di Neurobiologia Sperimentale dell'Istituto Neurologico Casimiro Mondino di Pavia diretto dalla Professoressa Cristina Cereda, in particolare con il Dottore Matteo Bordoni e Dottoressa Valentina Fantini.

## 5.1 Considerazioni preliminari sul bioink

Fondamentale per un'adeguata crescita cellulare è il bioink. Come accennato nel paragrafo 3.2.4, dati sperimentali di letteratura, rivelano il fatto che, per aumentare la stampabilità dell'alginato è possibile incrementare la concentrazione della soluzione di alginato fino al 4% oppure combinare l'alginato con altri biopolimeri che migliorano non solo la stampabilità della soluzione, ma anche la vitalità delle cellule facilitandone l'adesione sulle pareti della struttura erogata. È necessario, dunque, trovare quale sia la concentrazione di alginato di sodio che ottimizzi la proliferazione cellulare e allo stesso tempo sia stampabile. A tale scopo sono stati condotti test di proliferazione cellulare in collaborazione con il Laboratorio di Neurobiologia Sperimentale dell'Istituto Neurologico Casimiro Mondino di Pavia e sono stati utilizzati bioink considerando diverse combinazioni di concentrazioni di alginato di sodio e gelatina incapsulando all'interno della soluzione cellule HeLa (cellule tumorali immortalizzate). Il set-up sperimentale, descritto con maggiore dettaglio nel paragrafo 5.1.1, ha previsto la preparazione e l'estrusione tramite pipetta di campioni di bioink a diverse concentrazioni di alginato di sodio, gelatina e cellule. Successivamente, è stato necessario verificare che l'aggiunta del copolimero all'alginato non inficia la stampabilità della soluzione (paragrafo 5.2).

### 5.1.1 Test di proliferazione

#### Protocollo sperimentale

Il protocollo sperimentale allestito ha previsto cinque passaggi fondamentali.

1. **Preparazione dei composti di alginato di sodio e gelatina:** le polveri di alginato di sodio e gelatina sono state disciolte in una soluzione salina di Phosphate-buffered saline <sup>1</sup> (PBS) utilizzando un agitatore meccanico e una piastra magnetica per garantire l'omogeneità della soluzione.
2. **Sterilizzazione:** entrambe le soluzioni sono state autoclavate per 20 minuti a una temperatura di 121 °C e successivamente portate a temperatura ambiente. L'alginato di sodio in seguito l'autoclavatura ha perso la sua consistenza diventato liquido a causa delle alte temperature, ma non la sua viscosità è stato deciso, quindi di procedere comunque con il test.
3. **Conta cellulare:** le cellule tumorali immortalizzate (HeLa) sono state contate utilizzando un conta cellule automatico.
4. **Preparazione dei campioni**

- L'alginato di sodio e la gelatina sono stati dispensati in una provetta e miscelati utilizzando uno shakeratore automatico. Sono stati realizzati nove campioni,

---

<sup>1</sup>Soluzione tampone comunemente utilizzata nella ricerca biologica per mantenere il pH costante e garantire l'omeostasi cellulare. La soluzione contiene cloruro di sodio, fosfato di sodio e cloruro di potassio.

ognuno con una combinazione di concentrazione di alginato di sodio e gelatina (tabella 5.1).

Campione	Alginato	Gelatina
1	2%	2%
2	2%	1%
3	2%	0%
4	1%	2%
5	1%	1%
6	1%	0%
7	0%	2%
8	0%	1%
9	0%	0%

Tabella 5.1: Prove di proliferazione delle cellule Hela incapsulate nel bioink a base di alginato di sodio e gelatina: nove differenti combinazioni di concentrazione della soluzione.

- Successivamente sono state incapsulate 500.000 cellule HeLa per ogni campione. I campioni sono stati nuovamente shakerati per garantire l'omogeneità delle cellule all'interno della soluzione.
- È stata, infine, aggiunta una soluzione di PBS per raggiungere un volume del campione pari a 600  $\mu$ l.
- I campioni sono stati dispensati in un wellplate e posizionati in incubatrice a 37 °C per la coltura cellulare.

5. **Coltura cellulare:** il giorno successivo la semina, per ogni campione, sono stati aggiunti 2 ml di terreno di coltura e coltivati per 5 giorni.

Nelle settimane successive sono stati condotti i triplicati della prova di proliferazione seguendo il medesimo protocollo.

## Risultati

In figura 5.1 si presentano i risultati ottenuti dalle prove di proliferazione. Per valutare le differenze statistiche tra i diversi casi è stata applicato un test Anova a una via mediante il software Graph pad Prism 5. In figura 5.1 (a) si presenta il numero di cellule in totale (vive e morte) per tutti i campioni analizzati. I risultati non rilevano alcuna differenza statisticamente significativa tra i diversi casi suggerendo il fatto che né l'alginato di sodio né la gelatina, a tali concentrazioni, influenzano la proliferazione cellulare. Risultati differenti rilevano il grafico in figura 5.1 (b) in cui è riportato il numero di cellule vive. In questo caso esistono differenze statisticamente significative (\* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$ ), in

particolare è possibile notare come un aumento della viscosità della soluzione, incrementando sia l'alginato di sodio che la gelatina, porti ad un aumento della vitalità cellulare. Una possibile spiegazione di tale evento è che in presenza del bioink le cellule non vadano da inibizione da contatto, potendo crescere su più piani. Nel caso in cui le cellule non sono state incapsulate nel bioink a base di alginato e gelatina hanno proliferato fino a ricoprire il fondo del pozzetto, le nuove cellule, invece, non avendo alcun substrato sul quale aderire, non sono sopravvissute. È probabile che il numero di cellule seminato sia eccessivo per le dimensioni del wellplate.

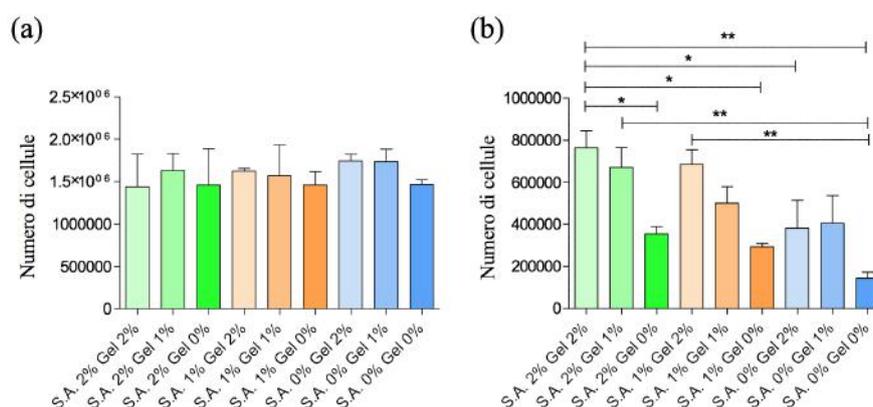


Figura 5.1: Risultati dei test di proliferazione delle cellule HeLa incapsulate all'interno di bioink a diverse concentrazioni di alginato di sodio e gelatina: (a) numero di cellule totali, nessuna differenza statistica tra i casi, (b) differenze statistiche rilevanti ( $*p < 0.05$  e  $**p < 0.01$ ) aumentando la viscosità della soluzione.

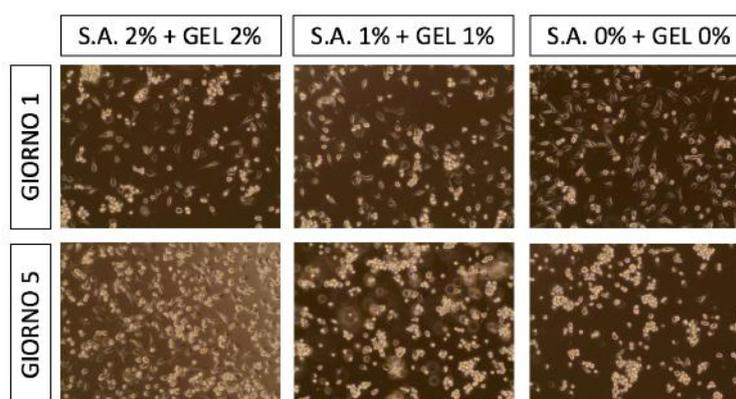


Figura 5.2: Fotografie al microscopio per sovrintendere la crescita delle cellule HeLa al giorno 1 e al giorno 5 per il caso che hanno prodotto risultati migliori (2% alginato 2% gelatina), medi (1% alginato 1% gelatina) e peggiori (0% alginato 0% gelatina).

### Ottimizzazione del numero di cellule da incapsulate nel bioink

Al fine di determinare quale sia il numero di cellule adatto da incapsulare nel bioink per ottimizzare la proliferazione è stato seminato, senza il bioink di alginato di sodio e gelatina, un quantitativo decrescente di cellule. Le cellule seminate sono state di due tipi: HeLa e SH-SY5Y (linea cellulare costituita da neuroblastoma umano). La figura 5.3 rivela che il numero di cellule adatto per ottimizzare la proliferazione è pari a 75.000 per ml di soluzione per entrambe le linee cellulari.

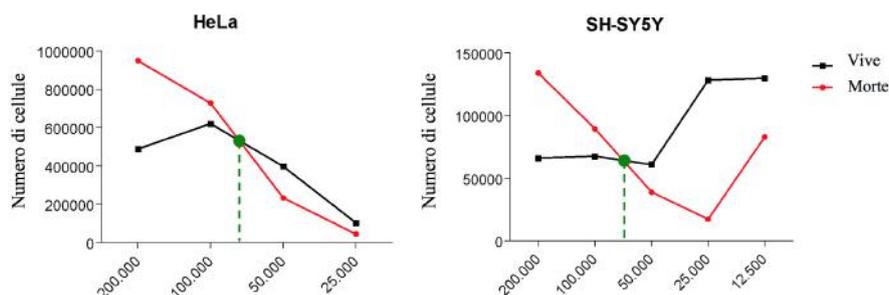


Figura 5.3: Test di proliferazione per individuare il numero ottimale di cellule da seminare per ml di soluzione: 75.000 cellule per ml ottimizza la proliferazione.

### Variazioni del bioink: aumento della concentrazioni di alginato di sodio

Seguendo lo stesso protocollo descritto sopra, ulteriori test di proliferazione sono stati condotti incrementando la concentrazione di alginato di sodio e gelatina al 4%, soluzione risultata migliore a livello di stampabilità e incapsulando 75.000 cellule HeLa e SH-SY5Y per ml di soluzione, numero di cellule risultato migliore a livello proliferativo. Le combinazioni di alginato, gelatina e cellule considerate sono presentate in tabella 5.2. Dei seguenti test e saranno svolti in un secondo momento per la validazione statistica.

I risultati preliminari del primo test di proliferazione sono presentati in figura 5.4. Il grafico rappresenta la quantità di cellule totali (vive e morte) proliferate. Ricordando che il numero di cellule seminate è pari a 75.000 cellule/ml è mostrata elevata proliferazione per tutte le concentrazioni di alginato per entrambe le linee cellulari. I risultati della vitalità cellulare non sono mostrati in quanto è necessario effettuare il triplicato dell'esperimento per la validazione statistica e ottenere un risultato consistente; in compenso una prima analisi al microscopio ha mostrato che la vitalità cellulare, per entrambe le linee cellulari, dell'alginato e gelatina al 4% di concentrazione, sia migliore rispetto l'alginato a concentrazioni inferiori, dunque è possibile affermare che l'alginato di sodio e gelatina al 4% di concentrazione aumenti leggermente la proliferazione delle cellule rispetto al 2% e 1% soprattutto per le SH-SY5Y.

Campione	Alginato	Gelatina	Cellule
1	4%	4%	HeLa
2	2%	2%	HeLa
3	1%	1%	HeLa
4	4%	4%	HeLa
5	2%	2%	HeLa
6	1%	1%	HeLa
7	4%	4%	SH-SY5Y
8	2%	2%	SH-SY5Y
9	1%	1%	SH-SY5Y
10	4%	4%	SH-SY5Y
11	2%	2%	SH-SY5Y
12	1%	1%	SH-SY5Y

Tabella 5.2: Prove di proliferazione delle cellule HeLa e SH-SY5Y incapsulate nel bioink a base di alginato di sodio e gelatina al 4%, 2% e 1% di concentrazione.

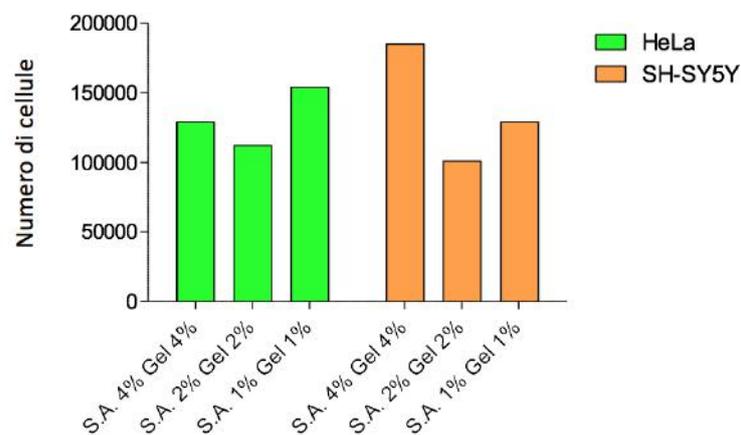


Figura 5.4: Risultati del singolo test di proliferazione delle cellule HeLa e SH-SY5Y incapsulate all'interno di bioink al 4% di concentrazioni di alginato di sodio e gelatina: totale delle cellule proliferate, vive e morte.

## 5.2 Estrusione del bioink utilizzando il sistema customizzato: vitalità cellulare

Le prove preliminari descritte nel paragrafo precedente sono state fondamentali per individuare la combinazione ottimale di concentrazione di alginato di sodio, gelatina e cellule per realizzare un bioink adatto all'estrusione utilizzando la stampante 3ntr customizzata. Fondamentale per questo lavoro è valutare se il sistema realizzato sia adatto per la stampa di cellule e se inficia sulla vitalità delle stesse. A tale scopo, contestualmente ai test di proliferazione appena descritti, sono stati condotti test di vitalità cellulare estrudendo lo stesso bioink a base di una soluzione di alginato di sodio e gelatina al 4% di concentrazione in cui sono state incapsulate 75.000 cellule HeLa per ml di soluzione.

### 5.2.1 Preparazione dell'esperimento

Il campione di bioink da estrarre è stato preparato nel laboratorio di Neurobiologia Sperimentale e caricato all'interno di una siringa da 5 ml. I componenti del set-up a contatto con la soluzione, tubo di silicone e ugello, sono stati sterilizzati nel laboratorio stesso con luce UV per un'ora. La siringa precaricata, il tubo di silicone e l'ugello sono stati trasportati presso il Proto-Lab per la stampa, preservando il più possibile le condizioni di sterilità.

### 5.2.2 Estrusione del bioink

Una volta connessa la pompa peristaltica alla stampante 3ntr, inserito il tubo di silicone nell'apposito incavo della pompa stessa, collegato la siringa e l'ugello ai due estremi dell'estrusore e posizionato l'ugello all'interno dell'adattatore è stato possibile procedere con l'estrusione dei campioni.

È stata implementata una nuova funzione MATLAB per generare il g-code per estrarre su una piastra di Petri tre campioni di bioink impostando una quantità equivalente di filamento pari a 2 mm con una velocità pari a 5 mm/min. Terminata la stampa i campioni sono stati riportati nel Laboratorio di Neurobiologia Sperimentale e sono stati aggiunti 8 ml di terreno di coltura e posizionati in incubatrice a 37 °C. Dopo quattro giorni è stata valutata la vitalità cellulare delle cellule incapsulate.

Utilizzando lo stesso bioink, inoltre, è stata stampata una griglia di ampiezza pari a 15x15 mm e ampiezza celle 5x5 mm e sono state misurate le grandezze geometriche tramite calibro per verificare che l'aggiunta del copolimero non inficia la stampabilità della soluzione rispetto la soluzione costituita da alginato puro.

### 5.2.3 Risultati

Dopo quattro giorni di incubazione le cellule non solo hanno proliferato in modo adeguato, ma risultano vitali senza presentare la crescita di batteri o altri agenti esterni. Il processo di stampa, dunque, non ha inficiato la vitalità e proliferazione cellulare.

Le misure ottenute tramite calibro digitale della griglia di ampiezza pari a 15x15 mm e ampiezza celle 5x5 mm sono comparabili a quelle ottenute dalle precedenti prove descritte nel capitolo 4, dunque è possibile dedurre che la gelatina non influisce sulla stampabilità dell'alginato, ma migliora la proliferazione rendendo la soluzione di alginato e gelatina del tutto comparabile a alla soluzione di alginato puro alla medesima concentrazione.

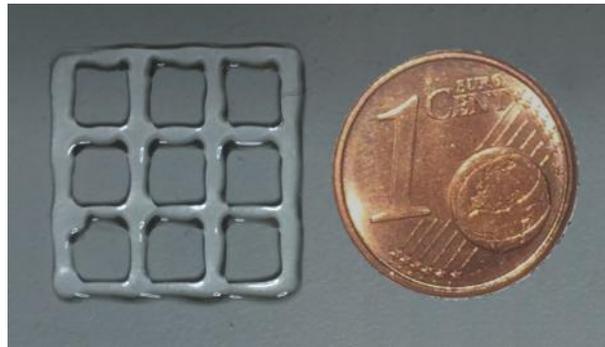


Figura 5.5: Griglia di ampiezza lato pari a 15.146x15.146 mm e ampiezza celle pari a 4.664x4.664 stampata con bioink di alginato di sodio e gelatina al 4% di concentrazione e cellule: le misure sono comparabili con quelle ottenute stampando la soluzione di alginato puro alla stessa concentrazione, dunque l'aggiunta della gelatina non influisce sulla stampabilità della soluzione

#### 5.2.4 Limiti e possibili soluzioni

I campioni di alginato di sodio in incubatrice a 37 °C sono disciolti, dunque per preservare la forma tridimensionale è necessario, anche in questo caso, ricorrere al crosslinking dell'alginato con il calcio cloruro per valutare la vitalità e proliferazione cellulare delle strutture reticolate occorre utilizzare un apposito Kit (LIVE/DEAD Cell Viability Assays – Invitrogen) che valuta il numero di cellule vive all'interno del campione attraverso tecniche di fluorescenza.

# Capitolo 6

## Conclusioni e sviluppi futuri

### 6.1 Conclusioni

Il lavoro di tesi presentato ha visto la customizzazione di una stampante 3D con tecnologia FDM presente nel Proto-Lab dell'Università di Pavia per l'estrusione di soluzioni viscosi tipo idrogel. La realizzazione di tale customizzazione ha richiesto soprattutto delle modifiche hardware e in particolare il collegamento di una pompa peristaltica alla stampante FDM per prelevare, tramite un tubo di silicone, una soluzione viscosa, precaricata in una siringa ed erogata tramite un ugello, che alloggia in un adattatore fissato alla testina della stampante. L'implementazione di uno script MATLAB ha permesso di generare il codice g-code (codice di comando stampante) relativo a delle forme geometriche, di complessità variabile, permettendo la stampa monostato dell'idrogel. Una volta effettuate tali modifiche della stampante 3D sono state condotte prove di stampabilità, di risoluzione e di ripetibilità per verificare i range di applicabilità e affidabilità del sistema realizzato.

Si è poi proceduto alla realizzazione di un bioink composto da alginato di sodio, gelatina e cellule di due tipi: cellule tumorali immortalizzate (HeLa) e cellule di neuroblastoma umano (SH-SY5Y). La creazione del bioink ha previsto dei test di proliferazione e vitalità cellulare atte a individuare il dosaggio delle componenti del bioink per massimizzare la sopravvivenza cellulare in ognuno dei due casi. Tali test hanno portato all'individuazione di un bioink al 4% di alginato di sodio e 4% di gelatina, che è stato poi estruso sia manualmente, con tecnica standard di laboratorio, sia con il sistema di stampa FDM customizzato per valutare l'effetto del processo di estrusione sulla vitalità cellulare.

I risultati suggeriscono che il sistema proposto permette facilmente di customizzare una stampante FDM trasformandola in modo rapido ed economico in un sistema in grado di estrarre e depositare in maniera controllata soluzioni viscosi tipo idrogel realizzando geometrie più o meno complesse con buona risoluzione e affidabilità. In particolare, stampando una soluzione di alginato di sodio, la risoluzione della geometria erogata migliora con la diminuzione della quantità di filamento estrusa e la soluzione di alginato di sodio al 4% risulta la migliore concentrazione per garantire sia la forma, sia la risoluzione che la ripetibilità della geometria. Per realizzare figure complesse e asimmetriche è stato utilizzato

il software Solidworks per sviluppare il modello CAD della figura in esame e il software Slic3r per lo slicing e la generazione del codice g-code. L'aggiunta della gelatina alla soluzione di alginato di sodio per la realizzazione del bioink ha determinato un miglioramento della proliferazione senza influenzare la stampabilità, risultando comparabile con la soluzione di alginato di sodio pura della medesima concentrazione. Utilizzando, inoltre, il sistema customizzato per erogare campioni di bioink costituiti dall'idrogel di alginato di sodio e gelatina entrambi al 4% di concentrazione e cellule è stato verificato che il processo di stampa non inficia sulla vitalità cellulare evitando la crescita di agenti esterni o batteri e dunque è adatto per l'estrusione di cellule per future applicazioni biologiche. In conclusione il sistema realizzato, una volta superati dei problemi di sterilità della camera di stampa, può essere utilizzato come qualsiasi stampante 3D FDM e risulta adattabile a qualsiasi stampante commerciale che integra tale tecnologia permettendo l'utilizzo di tutti gli strumenti CAD e di slicing previsti dal tradizionale processo di stampa FDM.

## 6.2 Sviluppo futuri

Gli sviluppi futuri previsti per il lavoro di tesi in esame sono molteplici e interessano sia l'aspetto ingegneristico che biologico. Dal punto di vista ingegneristico lo sviluppo principale riguarda l'hardware del sistema in particolare il miglioramento delle condizioni di sterilità, la variazione della forma dell'ugello e la doppia estrusione. Ulteriore sviluppo consiste nel progettare modelli 3D complessi e multistrato tramite software di CAD e utilizzare il software Slic3r per lo slicing del modello 3D e la generazione automatica del g-code. Per quanto riguarda l'aspetto biologico lo sviluppo futuro consiste nel miglioramento del bioink che sia adatto per il crosslinking. Di seguito sono descritti dettagliatamente gli sviluppi futuri che riguardano entrambi gli aspetti sopra citati.

- **Hardware**

- **Miglioramento delle condizioni di sterilità:** è possibile prevedere un'ulteriore customizzazione della stampante 3D in collaborazione con l'azienda produttrice J-Deal s.r.l. per realizzare un prototipo di stampante di dimensioni ridotte avente camera sterile per l'estrusione di bioink oppure da posizionare sotto cappa.
- **Variazione della forma dell'ugello:** a seconda della viscosità della soluzione utilizzata si vogliono modificare le dimensioni e la forma dell'ugello per ottimizzare l'erogazione del materiale.
- **Doppia estrusione:** per erogare contemporaneamente diverse soluzioni in cui, nel caso del bioink, possono essere incapsulate, in ognuno dei bioink, due linee cellulari differenti per sviluppare nuovi modelli cellulari per lo studio di malattie. L'idea è ottenere una copia dei singoli elementi che compongono l'attuale setup. La modifica sostanziale riguarda l'adattatore di cui è necessario stampare una versione modificata che preveda due bracci ognuno che presenti un foro nel quale inserire l'ugello.

- **Bioink**

- **Reticolazione dell’alginato:** l’idea è sfruttare il processo di crosslinking dell’alginato di sodio con il calcio cloruro per garantire la tridimensionalità della struttura erogata, in questo modo se è inserita in incubatrice per la proliferazione cellulare la struttura stampata non perde la forma e l’alginato non fonde. Il processo di reticolazione, inoltre, permetterebbe di realizzare strutture multistrato. In questo contesto è prevista la ricerca di un metodo valido per la conta cellulare migliorando il protocollo di immunofluorescenza nelle strutture reticolate
- **Test di proliferazione e vitalità cellulare:** sono previsti test per triplicare l’esperimento descritto nel paragrafo 5.1.1 al fine di validare i risultati ottenuti.
- **Test biologici:** per esprimere il fenotipo neurale delle cellule SH-SY5Y utilizzate nel capitolo 5 e per differenziare cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) nelle strutture 3D.

# Bibliografia

- [1] *3d printing creative*; [www.3dprintingcreative.it](http://www.3dprintingcreative.it); consultato il 11/11/2016.
- [2] *3D Printing Industry*; <https://3dprintingindustry.com/news/top-10-bioprinters-55699/>; consultato il 06/11/2016.
- [3] *3darwin*; [www.3darwin.it](http://www.3darwin.it); consultato il 08/11/2016.
- [4] *ExplainTheFuture.com*; <http://www.explainingthefuture.com/bioprinting.html>; Consultato il 01/08/2016.
- [5] *Stratasys*; [www.stratasys.com](http://www.stratasys.com); consultato il 07/11/2016.
- [6] *Wikipedia*; [www.wikipedia.it](http://www.wikipedia.it).
- [7] Giovannelli A. Bioprinting: stato dell'arte e applicazioni biomediche. Master's thesis, Alma mater-Università di Bologna, 2014/2015.
- [8] Skardal A. and Atala A. Biomaterials for integration with 3-d bioprinting,. *Annals of Biomedical Engineering*, 2015.
- [9] Dababneh A.B. and Ozbolat I.T. Bioprinting technology: a current state of art review. *Journal Manufacturing Science and Engineering*, 2014.
- [10] Augst A.D., Kong H.J., and Mooney D.J. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci*, 2006.
- [11] Derby B. Printing and prototyping of tissues and scaffolds. *Science*, 2012.
- [12] Duan B., Hockaday L.A., Kang K.H., and Butch J.T. 3d bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2012.
- [13] Guillotin B., Souquet A., Catros S., Duocastella M., Pippenger B., and Bellance S. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials*, 2010.

- [14] Aguado B.A., Mulyasasmita W., Su J., Lampe K.J., and Heilshorn S.C. Improving viability of stem cells during syringe needle flow through the design of hydrogel cell carriers. *Tissue Engineering*, 2012.
- [15] Gross B.C., Erkal J.E., Lockwood S. J., Chen C., and Spence D.M. Evaluation of 3d printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences. *Analytical Chemistry*, 2014.
- [16] Mandrycky C., Wang Z., Kim K., and Kim D. 3d bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology A*, 2015.
- [17] Kuo C.K. and Ma P.X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*, 2001.
- [18] Melchels F.P.W., Domingos M.A.N., Klein T.J., Malda J., Bartolo P.J., and Huttmacher D.W. Additive manufacturing of tissues and organs. *Progress in Pol*, 2012.
- [19] Orive G., Ponce S., Hernandez R.M., Gascon A.R., Igartua M., and Pedraz J.L. Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials*, 2002.
- [20] Grant G.T., Morris E.R., Rees D.A., Smith P.J.C., and Thom D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations egg-box model. *FEBS Letters*, 1973.
- [21] Gudapati H., Madhuri D., and Ozbolat I. A comprehensive review on droplet-based bioprinting: Past, present and future. *Biomaterials*, 2016.
- [22] Lipson H. and Kurman M. The new world of 3d printing. *Wiley Press*, 2013.
- [23] Yong He, FeiFei Yang, HaiMing Zhao, Qing Gao, Bing Xia, and JianZhong Fu. Research on the printability of hydrogels in 3d bioprinting. *Scientific Reports*, 2016.
- [24] Kong H.J., Smith M.K., and Mooney D.J. Designing alginate hydrogels to maintain viability of immobilized cells. *Biomaterials*, 2003.
- [25] Ozbolat I., Chen H., and Yu Y. Development of multi-arm bioprinter for hybrid biofabrication of tissue engineering constructs. *Robotics and Computer Integrated Manufacturing*, 2014.
- [26] Ozbolat I. and Yu Y. Bioprinting toward organ fabrication: Challenges and future trends. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2013.
- [27] Beaman J., Antwood C., Bergman T. L., Bourell D., Hollister S., and Rosen D. Additive subtractive manufacturing research and development in europe. *Technical Report No. 21224*, 2004.

- [28] Groll J., Boland T., Blunk T., Burdick J., Cho D., Dalton P., Derby B., Forgacs G., Li K., Mironov V., Moroni L., Nakamura M., Shu W., Takeuchi S., Vozzi G., Woodfield T., Xu T., Yoo J., and Malda J. Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. *Biofabrication*, 2016.
- [29] Jia J., Richards D.J., Pollard S., Tan Y., and Rodriguez J. AND Visconti R.G. Engineering alginate as bioink for bioprinting. *Acta Biomaterialia*, 2010.
- [30] Kwan J. Design of electronics for a high-resolution, multi-material, and modular 3d printer. *Master thesis*, 2013.
- [31] Malda J., Visser J., and Melchels F.P. 25th anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication. *Advance Materials*, 2013.
- [32] Shim J., Lee J., Kim J., and Cho D. Bioprinting of a mechanically enhanced three-dimensional dual cell-laden construct for osteochondral tissue engineering using a multi-head tissue/organ building system. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2012.
- [33] Stachowiak J., Richmond D., Li T., Brochard F., and Fletcher A. Inkjet formation of unilamellar lipid vesicles for cell-like encapsulation. *Lab on a Chip*, 2009.
- [34] Drury J.L., Dennis R.G., and Mooney D.J. The tensile properties of alginate hydrogels. *Biomaterials*, 2004.
- [35] Li J.M., Tian X., and Chen X. A brief review of dispensing-based rapid prototyping techniques in tissue scaffold fabrication: role of modeling on scaffold properties prediction,. *Biofabrication*, 2009.
- [36] Lee K. and Mooney D. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in polymer Science*, 2011.
- [37] Schütz K., Placht A.M., Paul B., Brüggemeier S., Gelinsky M., , and Lode A. Three-dimensional plotting of a cell-laden alginate/ methylcellulose blend: towards biofabrication of tissue engineering constructs with clinically relevant dimensions. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2015.
- [38] F. F. Liravi, Darleux R., and Toyserkani E. Additive manufacturing of 3d structures with non-newtonian highly viscous fluids: Finite element modeling and experimental validation. *Additive Manufacturing*, 2016.
- [39] George M. and Abraham T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs. *Journal Control Release*, 2006.
- [40] Lutolf M., Gilbert P., and Blau H. Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature*, 2009.

- [41] Nakamura M., Iwanaga S., Henmi C., Arai K., and Nishiyama Y. Biomatrices and biomaterial for future developments of bioprinting and biofabrication. *Biofabrication*, 2010.
- [42] Le Roux M.A., Guilak F., and Setton L.A. Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999.
- [43] Shanks N., Greek R., and Greek J. Are animal models predictive for humans? *Philos Ethics Humanities in Medicine*, 2009.
- [44] Dudek P. Fdm 3d printing technology in manufacturing composite elements. *Archives of Meta*, 2017.
- [45] Le Hue P. Progress and trends in inkjet printing technology. *Journal of Imaging Science and Technology*, 1998.
- [46] Gu Q., Tomaskovic Crook E., Lozano R., Chen Y., Kapsa R.M., Zhou Q., Wallace G.G., and Crook J.M. Functional 3d neural mini-tissues from printed gel-based bioink and human neural stem cells. *Advanced Healthcare Mater*, 2016.
- [47] Gaebel R., Ma N., Liu J., Guan J., Koch L., Kolpsch C., Gruene M., Toelk A., Wang W., Mark P., Wang F., Chichkov B., Li W., and Steinhoff G. Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration. *Biomaterials*, 2011.
- [48] Lander R., Hubner U., Schmelzeisen R., and Muelhaupt R. “rapid prototyping of scaffolds derived from thermo reversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering, . *Biomaterials*, 2002.
- [49] Coatnye S., Gandhi B., Park B., Dzilno D., Tapia E., Kamarthy G., and Sidhu I. 3d bio-printing. *Fung Technical Report No. 2013.04.17*, 2013.
- [50] Murphy S.V. and Atala A. 3d bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 2014.
- [51] Boland T., Xu T., Damon B., and Cui X. Application of inkjet printing to tissue engineering. *Biotechnol Journal*, 2006.
- [52] Ozbolat I. T. Bioprinting scale-up tissue and organ constructs for transplantation. *Trends in Biotechnology*, 2015.
- [53] Xu T., Zhao W., Zhu J.M., Albanna M.Z., Yoo J.J., and Atala A. Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple cell types prepared by inkjet printing technology. *Biomaterials*, 2013.
- [54] Manoj V. The journey from cell culture to bioprinting and beyond. *H Magazine*, 2013.

- [55] Mironov V. Printing technology to produce living tissue., *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2003.
- [56] Wang W., Gang L., and Huang Y. Modeling of bubble expansion induced cell mechanical profile in laser-assisted cell direct writing. *Journal Manufacturing Science and Engineering*, 2009.
- [57] Gombotz W.R. and Wee S.F. Protein release from alginate matrices. *Adverse Drug Delivey Review*, 1998.
- [58] Yan Y., Wang X., Pan Y., Liu H., Cheng J., Xiong Z., Lin, F., Wu R., Zhang R.a, and Lu Q. Fabrication of viable tissue-engineered constructs with 3d cell-assembly technique. *Biomaterials*, 2015.
- [59] Tan Y.S.E and Yeong W. Y. irect bioprinting of alginate-bases tubular construct using multi-nozzle extrusion-based technique. *1st International Conference on Progress in Additive Manufacturing*, 2014.
- [60] Wu Z., Su X., Xu Y., Kong B., Sun W., and Mi S. Bioprinting three-dimensional cell-laden tissue constructs with controllable degradation. *Scientific Reports*, 2016.

# Ringraziamenti

Vorrei ricordare tutti coloro che mi hanno aiutato nella stesura di questa tesi. Un particolare ringraziamento al mio relatore, il Dottore Michele Conti, per la pazienza e l'appoggio costante mostrato nell'arco di questi nove mesi: senza la sua guida, questa tesi non esisterebbe. Un ringraziamento alla mia correlatrice, l'Ingegnere Stefania Marconi e l'intero Proto-Lab dell'Università di Pavia per l'apporto dato al lavoro e la disponibilità. Un ringraziamento al Professore Ferdinando Auricchio che mi ha permesso di svolgere la tesi presso il suo dipartimento. Vorrei ringraziare, inoltre, coloro che hanno collaborato alla realizzazione della tesi: l'Ingegnere Davide Ardizzoia di 3ntr di Jdeal-Form, la dottoressa Cinzia Ferrari del Laboratorio di Chirurgia Sperimentale dell'Università di Pavia, la Professoressa Cristina Cereda, il Dottore Matteo Bordoni e la Dottoressa Valentina Fantini del Laboratorio di Neurobiologia Sperimentale della Fondazione Istituto Nazionale Casimiro Mondino.

Per ultimo, ma non per importanza, un ringraziamento ai miei genitori, parenti e amici che hanno reso questo periodo il più bello, stimolante, emozionante ed entusiasmante della prima parte della mia vita. Mi piacerebbe citare ognuno di voi, ma temo di dilungarmi troppo, quindi lascio un personale ringraziamento e lo dedico a te che stai leggendo proprio in questo momento.

*Grazie per avermi sostenuto, supportato e sopportato,  
grazie per la pazienza, le risate, le giornate,  
grazie per il bene e l'amore.  
Grazie a te, che sei qui.*

Franca