

POLITECNICO DI TORINO

Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



Politecnico di Torino

Tesi di Laurea Magistrale

Studio di Fattibilità per il Monitoraggio in Tempo Reale delle Colture Cellulari in Bioreattore tramite Analisi di Impedenza

Relatori

Prof. Danilo DEMARCHI

Prof. Alessandro SANGINARIO

Prof. Diana MASSAI

Candidato

Marco GRECO

LUGLIO 2024

Sommario

Le cellule di mammifero, in vivo, crescono in ambienti tridimensionali (3D) complessi, dove la forma e la composizione chimica della matrice extracellulare (ECM) influenzano profondamente le loro risposte fisiologiche. Tradizionalmente, le tecniche di coltura cellulare sono eseguite su superfici bidimensionali (2D), solitamente in vetro o polistirene. Sebbene la coltura 2D sia accessibile e conveniente, è ben documentato che gli studi su cellule 2D possono produrre artefatti significativi. Per questo motivo, sono stati sviluppati metodi avanzati per la coltura cellulare in ambienti 3D in vitro. Un approccio consolidato per la coltura cellulare 3D consiste nell'utilizzare scaffold, tipicamente composti da biopolimeri, per imitare l'ECM fisiologica. Attualmente, il controllo del processo di differenziazione delle cellule mesenchimali in cellule ossee all'interno di un bioreattore richiede l'apertura del bioreattore, interrompendo la coltura cellulare. Il presente studio di fattibilità propone l'uso della misurazione dell'impedenza come metodo non invasivo per monitorare in tempo reale la differenziazione cellulare all'interno del bioreattore. Nella fase iniziale sono state eseguite misure di conducibilità in diversi tipi di acqua (distillata, di rubinetto e salina) utilizzando un holder in PDMS con elettrodi a piastre. In seguito, è stato implementato un sistema di acquisizione collegato all'impedenziometro Keysight Technologies e4990A per effettuare misure di impedenza continue (24 ore) in un piccolo volume di acqua.. Sono state poi estese le misure a una tanica d'acqua di rubinetto, integrando una termocoppia per correlare la variazione di impedenza con la temperatura dell'acqua, sia in condizioni statiche che dinamiche mediante agitazione con stirrer. I risultati hanno confermato che la conducibilità dell'acqua di rubinetto è maggiore rispetto a quella distillata e che l'impedenza aumenta in condizioni di movimento. Infine, le misure sono state condotte in un bioreattore a perfusione con pompa peristaltica impostata con una portata di 0.3 microlitri al minuto per 72 ore, utilizzando uno scaffold in PLA in acqua di rubinetto. I risultati preliminari suggeriscono che questo setup è promettente per il monitoraggio in tempo reale della crescita cellulare. Il passo successivo sarà l'integrazione dell'elettronica all'interno del bioreattore, che permetterà un monitoraggio continuo e automatizzato dei parametri di crescita cellulare senza interrompere il processo. Inoltre, sarà utilizzato un mezzo di coltura specifico per

la differenziazione delle cellule mesenchimali in cellule ossee, ottimizzato per supportare la vitalità e la funzionalità delle cellule nel lungo periodo. Questi sviluppi mirano a migliorare la precisione e l'efficacia del monitoraggio, riducendo al minimo le interferenze e aumentando il rendimento del bioprocesso. Questo studio dimostra la fattibilità della misurazione dell'impedenza come metodo non invasivo per il monitoraggio in tempo reale della differenziazione cellulare nei bioreattori, aprendo nuove prospettive per l'ottimizzazione dei bioprocessi nella medicina rigenerativa.

Indice

Elenco delle tabelle	VII
Elenco delle figure	VIII
1 Introduzione	1
1.1 Impedenza Elettrica	1
1.1.1 L'impedenza nel mondo biologico	8
1.1.2 L'impedenza durante la Differenziazione Cellulare	11
1.1.3 Impedenza in ortopedia	12
1.2 Coltura Cellulare	13
1.2.1 Coltura Cellulare 3D	15
1.3 Scaffold	17
1.4 I Bioreattori	19
1.4.1 Tipologie di Bioreattori	21
1.4.2 Bioreattori a Perfusiones	22
2 Materiali	25
2.1 Camera di Coltura	25
2.1.1 Progettazione	25
2.1.2 Produzione	26
2.2 Unità di Perfusiones	27
2.2.1 Configurazione	28
2.3 Stampanti 3D	29
2.3.1 Raise3D Pro3	29
2.3.2 Formlabs Form 3	33
2.3.3 Materiali di Stampa	36
2.3.4 Applicazioni	37
2.4 Impedenzimetro Keysight E4990A	40
2.4.1 Elettrodi	42

3	Metodi e Test	44
3.1	Verifica Preliminare delle Misurazioni	44
3.2	Utilizzo di Elettrodi d'Oro su PCB Circolare	52
3.3	Automazione delle Misurazioni	54
3.3.1	Principi di Funzionamento del Codice	54
3.3.2	Procedure di Misurazione	55
3.4	Utilizzo del Circuito di Perfusione	58
3.4.1	Procedure di Misurazione	58
3.5	Applicazioni Future	59
3.5.1	Sistema di Misura dell'Impedenza	61
4	Risultati	65
4.1	Prima Fase di Misurazione – Elettrodi a Piastre	65
4.2	Seconda Fase di Misurazione – Elettrodi Circolari	68
4.3	Terza Fase di Misurazione – Automazione delle Misure	73
4.4	Quarta fase di misurazione – Circuito di Perfusione	81
5	Conclusioni	84
	Bibliografia	86

Elenco delle tabelle

3.1	Valore Nominale Resistenze.	62
3.2	Valore Frequenze.	64

Elenco delle figure

1.1	Andamento della corrente alternata e continua	1
1.2	Impedenza elettrica di un mezzo conduttore	2
1.3	Impedenza elettrica come somma di resistenza e reattanza	3
1.4	Comportamento di un circuito puramente resistivo	4
1.5	Comportamento di un circuito capacitivo	4
1.6	Rappresentazione dell'impedenza come numero complesso	5
1.7	Diagramma di Bode	6
1.8	Diagramma di Nyquist	7
1.9	Diagramma di Cole-Cole	7
1.10	Modellizzazione elettrica semplificata del tessuto biologico	8
1.11	Differenziazione Cellulare	11
1.12	Coltura Cellulare 2D.	14
1.13	Coltura Cellulare 3D.	14
1.14	Bioreattori a perfusione	23
2.1	(a) Vista frontale del bioreattore aperto con il l'hoder in PDMS, l'o-ring in silicone e lo scaffold. (b) Sezione trasversale con profilo a S.	26
2.2	Camera di coltura stampata. A destra la parte superiore, a sinistra la parte inferiore.	27
2.3	Banco di prova del set-up di perfusione.	28
2.4	Schema del set-up di perfusione composto dal serbatoio del terreno, tubi in silicone, pompa peristaltica e camera di coltura.	29
2.5	Stampante Raise3D Pro3.	30
2.6	Stampante Formlabs Form3.	34
2.7	Mold inferiore per elettrodi circolari.	37
2.8	Mold inferiore per elettrodi a piastre.	37
2.9	Scaffold stampati in PLA	38
2.10	Scaffold stampati in PVA	38
2.11	Top View del CAD bioreattore modificato	38
2.12	Bottom View CAD del bioreattore modificato	38
2.13	Pezzo inferiore del bioreattore modificato	39

2.14	Pezzo inferiore del bioreattore modificato	39
2.15	CAD del pezzo inferiore del mold con spazio micrometrico.	39
2.16	Pezzo inferiore del mold stampato con la stampante Form2.	39
2.17	Impedenzometro Keysight E4990A.	41
2.18	PCB circolare con quattro elettrodi d'oro.	43
2.19	Top view della PCB circolare con quattro elettrodi d'oro.	43
3.1	Set-up di misura del circuito RC.	45
3.2	CAD 1 parte inferiore del mold per gli elettrodi a piastre.	46
3.3	CAD 2 parte inferiore del mold per gli elettrodi a piastre.	46
3.4	CAD 3 parte inferiore del mold per gli elettrodi a piastre.	46
3.5	CAD parte superiore del mold.	46
3.6	Mold rotto a causa della bassa densità di riempimento.	47
3.7	Mold completo con gli elettrodi a piastre inseriti.	48
3.8	Visione laterale della parte inferiore del mold per vedere come vengono bloccati gli elettrodi.	48
3.9	PDMS colato all'interno del mold.	48
3.10	Mold completo con gli elettrodi a piastre in forno.	48
3.11	Risultato dopo la prima colata di PDMS.	49
3.12	Visione laterale dell'holder con gli elettrodi a piastre	50
3.13	Visione dall'alto dell'holder con gli elettrodi a piastre.	50
3.14	Posizionamento degli elettrodi ago all'interno dell'holder.	51
3.15	Setup di misura con gli elettrodi ad ago.	51
3.16	Mold per la costruzione dell'holder con elettrodi circolari.	52
3.17	Colata di PDMS nell'holder.	52
3.18	Visione laterale dell'holder con gli elettrodi circolari.	53
3.19	Visione dall'alto dell'holder con gli elettrodi circolari.	53
3.20	File .mat contenente le informazioni sull'impedenza misurata.	55
3.21	Setup per le misurazioni con acqua distillata.	56
3.22	Setup per le misurazioni con acqua di rubinetto in condizioni statiche.	57
3.23	Setup per le misurazioni con acqua di rubinetto in condizioni statiche.	57
3.24	scheda di valutazione EVAL-ADuCM355QSPZ	60
3.25	Confronto delle misure di resistenza svolte con il multimentro e l'ADuCM355.	63
3.26	Errore percentuale commesso nelle misurazioni utilizzando la scheda ADuCM355 rispetto al valore reale delle resistenze.	63
3.27	Confronto delle misure del circuito RC a diverse frequenze svolte con l'impedenzometro e l'ADuCM355.	64
4.1	Confronto del valore reale del circuito RC rispetto al valore nominale.	66
4.2	Misura dell'impedenza tramite elettrodi a piastre in diverse soluzioni.	66

4.3	Misura tramite elettrodi ad ago inseriti all'interno del PDMS. . . .	67
4.4	Misura dell'impedenza tramite elettrodi circolari affacciati tra loro. . . .	69
4.5	Misura dell'impedenza tramite elettrodi circolari vicini tra loro. . . .	69
4.6	Misura dell'impedenza tramite elettrodi circolari accoppiati tra loro. . . .	70
4.7	Confronto delle misure delle tre diverse configurazioni degli elettrodi in acqua distillata.	70
4.8	Confronto delle misure delle tre diverse configurazioni degli elettrodi in acqua di rubinetto.	71
4.9	Confronto delle misure delle tre diverse configurazioni degli elettrodi in acqua salata.	71
4.10	Linee di campo in diverse configurazioni degli elettrodi.	72
4.11	Sweep in frequenza in un circuito RC.	73
4.12	Misure con l'holder immerso in acqua distillata senza scaffold.	74
4.13	Misure con l'holder immerso in acqua distillata con scaffold.	74
4.14	Misure con l'holder immerso in acqua distillata con lo scaffold sciolto.	75
4.15	Misure con l'holder immerso in acqua di rubinetto senza scaffold in condizioni statiche.	76
4.16	Misure con l'holder immerso in acqua di rubinetto con scaffold in condizioni dinamiche.	77
4.17	Misure con l'holder immerso in acqua di rubinetto senza scaffold in condizioni dinamiche.	77
4.18	Misure con l'holder immerso in acqua di rubinetto con scaffold in condizioni dinamiche.	78
4.19	Confronto dell'impedenza dell'acqua distillata e dell'acqua di rubi- netto senza lo scaffold.	79
4.20	Confronto delle misure in acqua di rubinetto in condizioni statiche e dinamiche.	79
4.21	Confronto dell'impedenza dell'acqua distillata e dell'acqua di rubi- netto con lo scaffold.	80
4.22	Misure con l'holder senza scaffold nel circuito di perfusione.	81
4.23	Misure con l'holder con scaffold in PLA nel circuito di perfusione.	82
4.24	Misure con l'holder con scaffold in PVA nel circuito di perfusione.	83

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Impedenza Elettrica

Come noto, un circuito elettrico può essere concepito come un sistema che consente il movimento ordinato di cariche elettriche lungo un percorso chiuso, sfruttando la conduttività dei suoi componenti. La corrente che attraversa un circuito può assumere due forme principali: una forma continua (DC) o una forma alternata (AC). La prima è caratterizzata da un flusso costante di cariche elettriche in una sola direzione; la seconda, invece, implica un flusso che cambia periodicamente direzione nel tempo (figura 1.1).

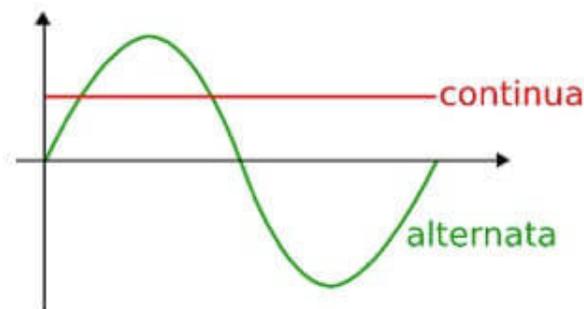


Figura 1.1: Andamento della corrente alternata e continua

I parametri fondamentali che definiscono la corrente alternata includono [1]:

- L'**ampiezza**, la quale rappresenta il valore massimo della corrente o della tensione;
- La **frequenza**, che invece indica il numero di cicli completati in un secondo e si misura in Hertz (Hz);
- La **fase** che descrive la relazione temporale tra l'onda di corrente e l'onda di tensione.

Mentre la corrente continua non può passare attraverso un condensatore, la corrente alternata può farlo mediante il rapido cambiamento di direzione del flusso di carica. La facilità con cui la corrente può passare tramite l'elemento capacitivo è determinata dalla frequenza della corrente applicata: infatti maggiore è la frequenza, più rapidamente le cariche sono in grado di passare avanti e indietro.

Nei circuiti elettrici, l'impedenza costituisce uno dei concetti centrali, rappresentando l'opposizione che un circuito offre al flusso di corrente (figura 1.2).

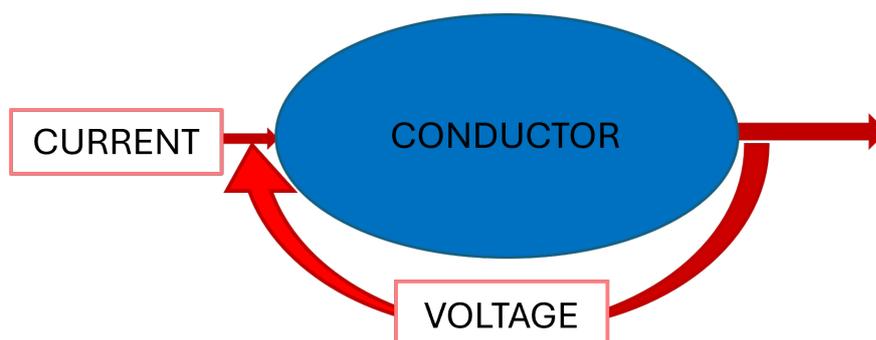


Figura 1.2: Impedenza elettrica di un mezzo conduttore

La legge fondamentale dell'impedenza, espressa come

$$Z = \frac{V}{I}$$

evidenzia la relazione tra tensione e corrente in un circuito.

Al fine di comprendere l'impedenza elettrica, è necessario avere una solida comprensione dei concetti quali (i) la resistenza, (ii) la reattanza induttiva e (iii) la reattanza capacitiva (figura 1.3).

- La **resistenza** (R) è la parte del circuito che dissipa l'energia sotto forma di calore e si misura in ohm.
- La **reattanza induttiva** (X_L) è la capacità di un componente del circuito (come un'induttanza) di opporsi ai cambiamenti nella corrente e si misura in ohm.
- La **reattanza capacitiva** (X_C) è la capacità di un componente del circuito (come un condensatore) di immagazzinare energia elettrica e si misura anch'essa in ohm.

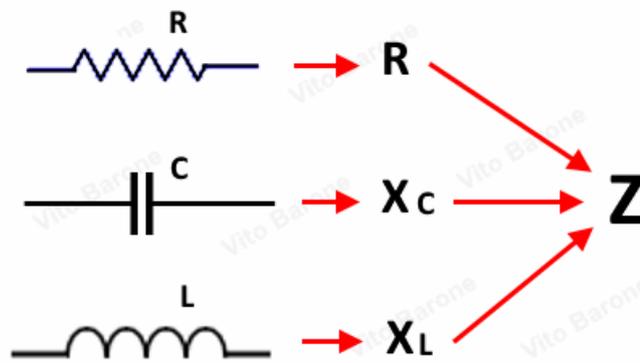


Figura 1.3: Impedenza elettrica come somma di resistenza e reattanza

Per calcolare l'impedenza di un circuito, è necessario considerare la combinazione delle resistenze, delle induttanze e dei condensatori presenti in un circuito. Per esempio, in un circuito semplice contenente solo resistenze, l'impedenza totale consiste semplicemente nella somma delle resistenze. In circuiti complessi contenenti induttanze e/o condensatori, è necessario, invece, utilizzare formule specifiche per calcolare l'impedenza [1, 2]:

- L'impedenza di un'induttanza è data da $Z_L = j\omega L$, dove ω è la frequenza angolare del segnale ($\omega = 2\pi f$) e L è l'induttanza.
- L'impedenza di un condensatore è data da: $Z_C = -j\frac{1}{\omega C}$, dove C è la capacità del condensatore.

L'analisi dei circuiti mediante l'impedenza permette di semplificare notevolmente l'interpretazione dei circuiti complessi che includono componenti reattivi come induttanze e condensatori.

Il comportamento di un circuito a corrente alternata è definito dalle onde di corrente e tensione, che hanno ampiezze differenti ma la stessa frequenza. Quando i picchi delle due onde coincidono, si dice che la corrente è "**in fase**" con la tensione, come avviene in un circuito puramente resistivo. [3]

I resistori si comportano allo stesso modo sia nei circuiti in corrente continua che in corrente alternata, in quanto non dipendono dalla frequenza (figura 1.4).

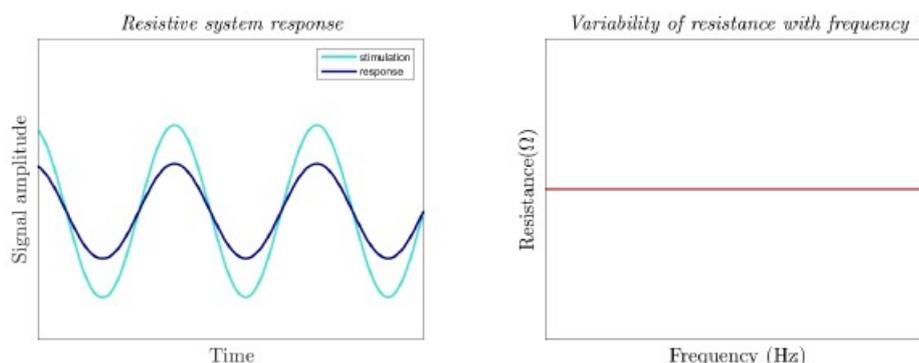


Figura 1.4: Comportamento di un circuito puramente resistivo

Tuttavia, se il circuito contiene condensatori, i processi di carica e scarica rallentano l'onda di tensione rispetto all'onda di corrente, provocando un **ritardo nella fase**. In tal caso, la corrente è considerata fuori fase (figura 1.5).

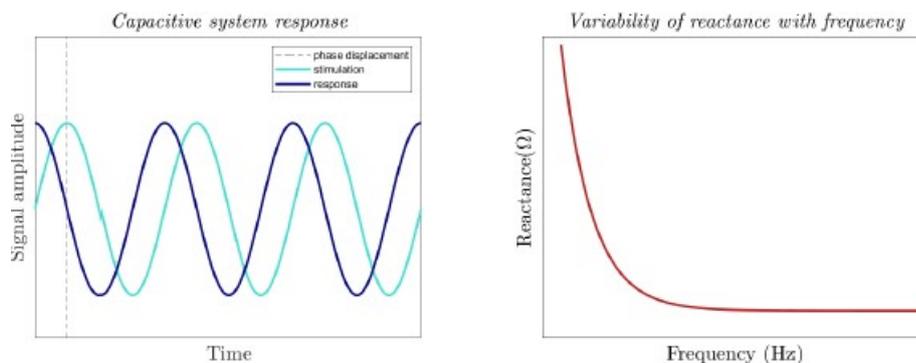


Figura 1.5: Comportamento di un circuito capacitivo

L'**angolo di fase** ($\varphi = \frac{X_C}{R}$) misura questa differenza di fase tra tensione e corrente in un circuito a corrente alternata. Poiché l'elemento capacitivo influenza la fase del segnale, la risposta complessiva del circuito non è sempre in fase con l'eccitazione. Questa differenza di fase può variare infatti da 0° a 90° , a seconda della combinazione di resistenza e capacità presenti nel circuito [2].

L'impedenza di un circuito rappresentata come un numero complesso può essere suddivisa in due componenti: la parte reale e la parte immaginaria (figura 1.6); la parte reale dell'impedenza è associata alla resistenza ed è in fase con l'eccitazione; la parte immaginaria è associata alla reattanza e può introdurre ritardi o anticipi nella risposta del circuito [2, 4].

$$Z = R + jX$$

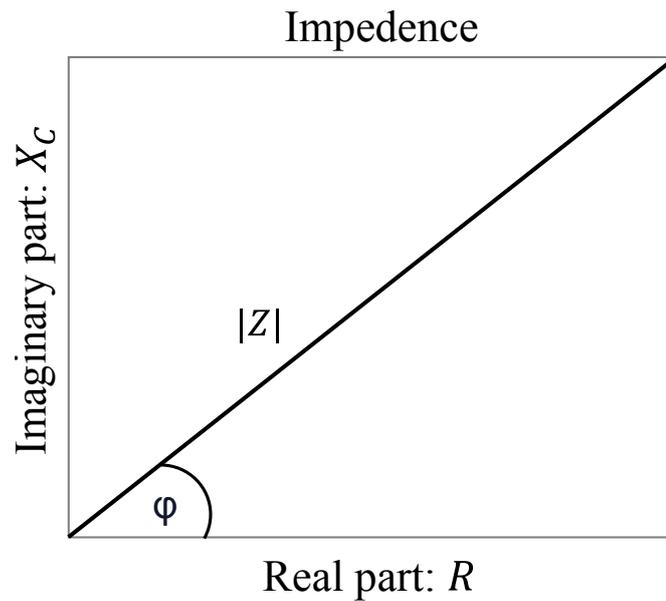


Figura 1.6: Rappresentazione dell'impedenza come numero complesso

Per visualizzare graficamente i comportamenti del circuito a corrente alternata e continua, si utilizzano diagrammi quali il diagramma di Bode, il diagramma di Nyquist e il diagramma di Cole-Cole. Tali diagrammi consentono di visualizzare in modo chiaro e intuitivo come l'impedenza varia con la frequenza, fornendo informazioni cruciali per la progettazione e l'ottimizzazione dei circuiti.

- **Diagramma di Bode (figura 1.7):** I diagrammi di Bode sono utilizzati per visualizzare la risposta in frequenza di un sistema. Essi mostrano come l'ampiezza e la fase della risposta del sistema variano al variare della frequenza del segnale di ingresso. Nei circuiti elettrici, i diagrammi di Bode ci permettono di analizzare l'impedenza elettrica in funzione della frequenza;

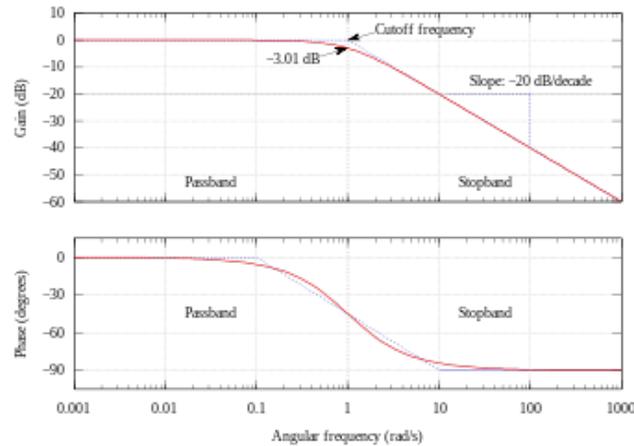


Figura 1.7: Diagramma di Bode

- **Diagramma di Nyquist (figura 1.8):** Il diagramma di Nyquist è utilizzato per rappresentare la risposta in frequenza di un sistema complesso mediante l'uso del piano complesso. Com'è possibile vedere dalla figura 1.8, la parte reale dell'impedenza è rappresentata sull'asse delle ascisse, mentre la parte immaginaria è rappresentata sull'asse delle ordinate. Il diagramma di cui discutiamo è particolarmente utile nell'analisi dei sistemi a retroazione, ma può essere applicato anche all'analisi dell'impedenza elettrica; infatti, consente di visualizzare come la parte reale e immaginaria dell'impedenza variano con la frequenza, fornendo informazioni cruciali sul comportamento del circuito.

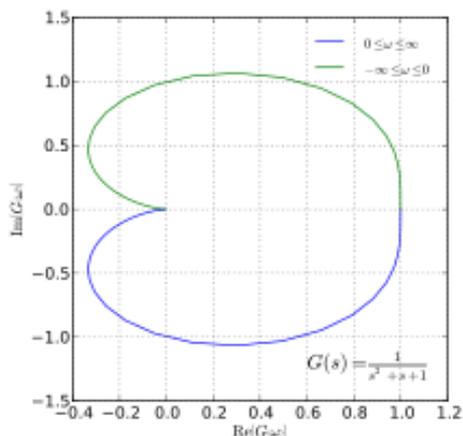


Figura 1.8: Diagramma di Nyquist

- **Diagramma di Cole-Cole (figura 1.9):** Quest'ultimo diagramma viene utilizzato principalmente nell'ambito della caratterizzazione dei materiali e dei tessuti biologici, fornendo informazioni sulla distribuzione dei tempi di rilassamento nei materiali e quindi evidenziando la complessità della risposta del sistema.

Sebbene sia meno comune nell'analisi dei circuiti elettrici rispetto ai diagrammi appena analizzati, il diagramma di Cole-Cole può essere utilizzato per studiare l'impedenza elettrica di materiali complessi, come ad esempio i tessuti biologici.

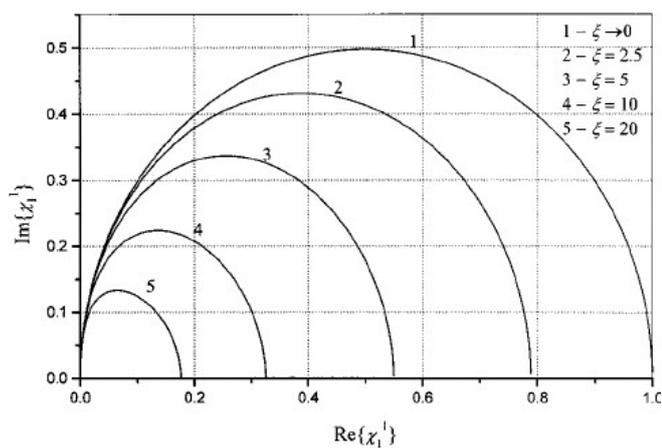


Figura 1.9: Diagramma di Cole-Cole

1.1.1 L'impedenza nel mondo biologico

L'impedenza, sebbene ampiamente studiata nell'ambito dell'ingegneria elettrica, trova interessanti applicazioni anche nel contesto biologico, fornendo nuove prospettive nella comprensione dei tessuti biologici e nelle applicazioni mediche; infatti, la bioimpedenza si è rivelata un'importante tecnica per analizzare le caratteristiche elettriche dei tessuti viventi e ha trovato applicazioni in diversi settori, dall'analisi diagnostica alla bioingegneria.

Più nel dettaglio, la bioimpedenza è definita come la misura dell'impedenza elettrica dei tessuti biologici, la quale è influenzata da diverse proprietà fisiche e strutturali dei tessuti stessi.

Questa tecnica consente di ottenere informazioni dettagliate sulla composizione e sulla struttura dei tessuti, fornendo importanti indicazioni sullo stato di salute e sulle eventuali patologie presenti [5].

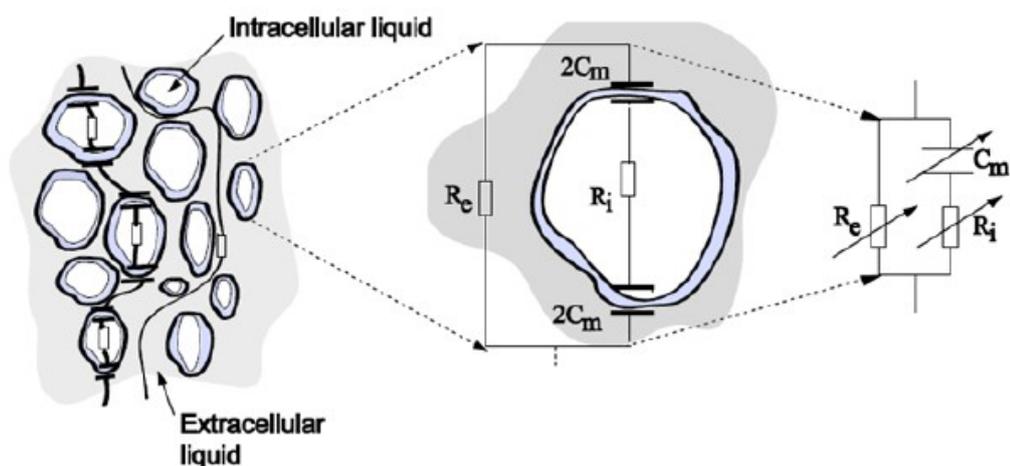


Figura 1.10: Modellizzazione elettrica semplificata del tessuto biologico

La modellizzazione elettrica dei tessuti biologici [6] (figura 1.10) costituisce un'area di ricerca fondamentale in biofisica e bioingegneria, posto che i tessuti viventi presentano una complessità notevole con un'ampia gamma di proprietà elettriche. Queste proprietà, le quali includono resistività e permittività, sono essenziali per comprendere la propagazione dell'elettricità attraverso i tessuti biologici e per sviluppare tecnologie diagnostiche e terapeutiche avanzate.

Proprietà Elettriche dei Tessuti Biologici

- **Resistività e Conduttività:** la resistività di un tessuto biologico misura la sua opposizione al flusso di corrente elettrica, mentre la conduttività è l'inverso della resistività e indica quanto facilmente la corrente può passare attraverso il tessuto. La resistività e la conduttività sono influenzate da diversi fattori, tra cui la composizione chimica, la struttura cellulare, la densità cellulare e l'umidità del tessuto. Uno dei fattori più significativi è la quantità di acqua presente nei tessuti, poiché l'acqua è un eccellente conduttore di elettricità grazie alla presenza di ioni disciolti. I tessuti con una maggiore concentrazione di acqua tendono ad avere una resistività più bassa e una maggiore conduttività elettrica.
- **Permittività:** tale proprietà è una misura di quanto un materiale sia in grado di immagazzinare energia elettrica in presenza di un campo elettrico. Nei tessuti biologici, la permittività è influenzata dalla struttura molecolare e dalla composizione dei tessuti, e può variare notevolmente tra diversi tipi di tessuto. A titolo esemplificativo, la permittività del tessuto adiposo è diversa da quella del tessuto muscolare a causa delle differenti composizioni molecolari e strutturali.

Misurazione dell'Impedenza Elettrica nei Tessuti Biologici

Un aspetto cruciale nella caratterizzazione elettrofisiologica dei tessuti biologici è la misurazione dell'impedenza elettrica che può essere effettuata utilizzando elettrodi posizionati sulla superficie del tessuto o inseriti all'interno del tessuto stesso.

I metodi di misurazione più utilizzati sono:

- **Spettroscopia di Impedenza Elettrica:** la spettroscopia di impedenza elettrica (EIS) è una tecnica utilizzata per misurare l'impedenza di un tessuto biologico su un'ampia gamma di frequenze. Questa tecnica applica un segnale elettrico variabile nel tempo al tessuto e misura la risposta in termini di ampiezza e fase del segnale. Le variazioni nella risposta del tessuto a diverse frequenze possono fornire informazioni dettagliate sulla struttura e sulle proprietà elettriche del tessuto, come la distribuzione di resistenza e capacità [3].
- **Elettrodi di Misurazione:** gli elettrodi utilizzati per misurare l'impedenza possono essere di diversi tipi, a seconda dell'applicazione specifica. Gli elettrodi superficiali sono normalmente utilizzati per misurazioni non invasive, mentre gli elettrodi impiantabili possono fornire informazioni più dettagliate e localizzate sul tessuto interno. Gli elettrodi possono essere realizzati in diversi materiali, come oro, platino

o materiali biocompatibili, per garantire una buona conduzione elettrica e minimizzare l'interferenza con i tessuti biologici.

Applicazioni della Misurazione dell'Impedenza

Le misurazioni dell'impedenza elettrica nei tessuti biologici hanno numerose applicazioni in campo medico e di ricerca, tra le quali la diagnosi di patologie, il monitoraggio della progressione di malattie e condizioni mediche e la valutazione dell'efficacia di trattamenti terapeutici [7].

- **Diagnosi di Patologie:** l'impedenza elettrica può essere utilizzata per diagnosticare varie patologie, come il cancro, le malattie cardiovascolari e le infezioni. Ad esempio, i tumori tendono ad avere proprietà elettriche diverse rispetto ai tessuti sani circostanti, e queste differenze possono essere rilevate tramite misurazioni di impedenza.
- **Monitoraggio del Progresso di Condizioni Mediche:** la misurazione dell'impedenza può essere utilizzata per monitorare il progresso della guarigione delle fratture ossee, la rigenerazione dei tessuti e il recupero da interventi chirurgici. La spettroscopia di impedenza può fornire informazioni in tempo reale sulla formazione di nuovo tessuto osseo, la deposizione di minerali e la vascolarizzazione del sito di frattura.
- **Valutazione di Trattamenti Terapeutici:** le variazioni nell'impedenza elettrica possono riflettere modifiche indotte da trattamenti terapeutici, come l'applicazione di fattori di crescita, biomateriali e terapie farmacologiche. Ad esempio, la spettroscopia di impedenza può essere utilizzata per valutare l'efficacia di nuovi biomateriali progettati per favorire la rigenerazione dei tessuti o per monitorare la risposta delle cellule a trattamenti farmacologici specifici.

1.1.2 L'impedenza durante la Differenziazione Cellulare

Nell'ambito dell'ingegneria biomedica, l'analisi dell'impedenza cellulare durante il processo di differenziazione delle cellule mesenchimali in cellule ossee (figura 1.11) rivela importanti *insight* sulle proprietà elettriche e morfologiche delle cellule coinvolte.

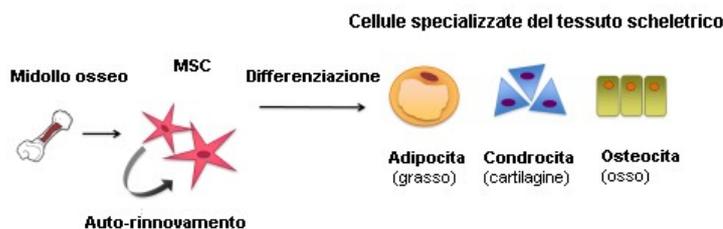


Figura 1.11: Differenziazione Cellulare

Inizialmente, le cellule mesenchimali, che sono multipotenti, ovvero capaci di differenziarsi in vari tipi di cellule specializzate (seppur non in tutte le cellule del corpo) mostrano un'impedenza relativamente bassa, caratterizzata da una maggiore capacità di proliferazione e mobilità.

Durante la fase di differenziazione, le cellule mesenchimali subiscono una serie di cambiamenti morfologici e biochimici che ne influenzano l'impedenza. Ad esempio, è possibile osservare un aumento della produzione di matrice extracellulare e una maggiore mineralizzazione, che contribuiscono ad aumentare l'impedenza cellulare. Inoltre, le cellule mesenchimali in via di differenziazione sviluppano una maggiore complessità morfologica, con l'acquisizione di caratteristiche tipiche delle cellule ossee, come la formazione di estensioni citoplasmatiche e la deposizione di calcio [1].

La misurazione dell'impedenza cellulare durante il processo di differenziazione delle cellule mesenchimali in cellule ossee può essere effettuata utilizzando diverse tecniche sperimentali. Una delle metodologie più comuni è rappresentata dall'impedenziometria a microelettrodi, metodologia che consente la misurazione dell'impedenza in tempo reale su singole cellule o popolazioni cellulari. Tale tecnica prevede l'utilizzo di microelettrodi posizionati in prossimità delle cellule in coltura, consentendo la registrazione dell'impedenza cellulare durante il processo di differenziazione.

Inoltre, l'impedenza cellulare può essere valutata utilizzando tecniche di bioimpedenza non invasive, come l'impedenziometria a radiofrequenza o a microonde. Queste metodologie consentono la misurazione dell'impedenza cellulare attraverso

l'interazione delle onde elettromagnetiche con il tessuto biologico, senza la necessità di contatto diretto con le cellule [2].

La caratterizzazione dell'impedenza cellulare durante la differenziazione delle cellule mesenchimali in cellule ossee fornisce informazioni cruciali sulla dinamica del processo di differenziazione e sulle proprietà elettriche delle cellule coinvolte. Queste informazioni possono essere utilizzate per sviluppare nuove strategie terapeutiche per la rigenerazione ossea, nonché per la progettazione di scaffolds e biomateriali che mimano le caratteristiche elettriche del tessuto osseo, promuovendo così la differenziazione cellulare e la guarigione delle lesioni ossee.

1.1.3 Impedenza in ortopedia

L'impedenza elettrica ha trovato applicazioni significative anche nel campo dell'ortopedia e della biologia cellulare, campi nei quali viene utilizzata per esaminare le proprietà elettriche delle cellule ossee, sviluppare nuove terapie rigenerative e comprendere i meccanismi che regolano la crescita, la differenziazione e la rigenerazione delle cellule ossee [8].

Infatti, l'impedenza non è solo uno strumento diagnostico, ma può altresì essere impiegata per modulare il comportamento delle cellule e influenzarne la funzionalità. Le applicazioni dell'impedenza in ortopedia offrono nuove prospettive per il trattamento delle patologie ossee e la promozione della rigenerazione tissutale, aprendo la strada a nuove terapie e trattamenti nell'ambito dell'ortopedia e della medicina rigenerativa.

Il ruolo dell'impedenza nell'accelerare il processo di guarigione

L'impedenza viene utilizzata come indicatore non invasivo per valutare lo stato di salute ossea e monitorare la progressione delle patologie ortopediche. Studi recenti hanno evidenziato il ruolo che svolge l'impedenza nell'accelerare il processo di guarigione delle fratture ossee e nel favorire la rigenerazione ossea. In particolare, l'applicazione di campi elettrici può stimolare la proliferazione e la differenziazione delle cellule mesenchimali in cellule ossee mature, facilitando così il processo di guarigione. Uno degli approcci più promettenti nell'utilizzo dell'impedenza in ortopedia è rappresentato dalla terapia elettrochimica, che combina l'impedenza con l'applicazione di correnti elettriche per promuovere la guarigione delle fratture ossee e stimolare la rigenerazione dei tessuti ossei danneggiati. Questa tecnica sfrutta i principi dell'elettrochimica per modificare l'ambiente cellulare e favorire la crescita delle cellule ossee [9].

Il ruolo dell'impedenza nel monitorare la guarigione delle fratture

L'utilizzo della spettroscopia di impedenza in ortopedia rappresenta una metodologia innovativa per monitorare in modo non invasivo e accurato il progresso della guarigione delle fratture. Questa tecnica sfrutta le variazioni dell'impedenza elettrica dei tessuti ossei durante il processo di guarigione, consentendo di ottenere informazioni dettagliate sulla riparazione del tessuto osseo. L'impedenza elettrica può essere influenzata da vari fattori durante il processo di guarigione delle fratture, tra le quali si segnalano la formazione di nuovo tessuto osseo, la deposizione di calcio e la vascolarizzazione del sito di frattura. Pertanto, la spettroscopia di impedenza offre un'opportunità unica per valutare in tempo reale e in modo non invasivo la progressione della guarigione delle fratture, consentendo ai clinici di adottare approcci terapeutici personalizzati e ottimizzati per ciascun paziente [10].

1.2 Coltura Cellulare

La coltura cellulare rappresenta un pilastro fondamentale della ricerca biomedica e della biotecnologia moderna, permettendo la crescita, la manipolazione e lo studio delle cellule in condizioni controllate, al di fuori del loro ambiente naturale. Questa tecnica è cruciale per una vasta ed eterogenea gamma di applicazioni scientifiche, dall'esplorazione della biologia cellulare alla scoperta di nuovi farmaci, dalla terapia genica e cellulare alla produzione di vaccini e proteine terapeutiche.

La coltura cellulare coinvolge la crescita di cellule derivate da organismi multicellulari in un ambiente artificiale. Quest'ultimo può variare da piastre di Petri a flaconi di coltura, dove le cellule sono mantenute in condizioni ottimali di temperatura, pH, umidità e concentrazione di anidride carbonica. La disponibilità di nutrienti essenziali come aminoacidi, vitamine, minerali, glucosio e fattori di crescita è cruciale per la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule.

I componenti essenziali della coltura cellulare sono:

- **Substrato o Mezzo di Crescita:** Il substrato su cui le cellule crescono può essere solido (come piastre di Petri) o liquido (come flaconi di coltura). Le superfici solide vengono spesso trattate con proteine di adesione cellulare, come la fibronectina o il collagene, per facilitare l'adesione delle cellule. I mezzi di coltura liquidi sono ricchi di nutrienti essenziali per supportare la crescita cellulare e sono regolarmente cambiati per rimuovere i prodotti di scarto e fornire nutrienti freschi.
- **Condizioni Ambientali:** Le condizioni ambientali devono essere rigorosamente controllate e mantenute per garantire un ambiente stabile per le cellule. La temperatura è generalmente mantenuta intorno ai 37°C per le cellule di

mammifero, con una concentrazione di anidride carbonica regolata intorno al 5% per mantenere il pH del mezzo di coltura. Il pH stesso è mantenuto intorno a 7,2-7,4 per la maggior parte delle colture cellulari. L'umidità è anche un fattore critico per evitare la disidratazione delle cellule.

- **Strumenti di Coltura:** Lavorare con colture cellulari richiede una serie di strumenti specializzati, tra cui incubatori, cappe a flusso laminare per garantire un ambiente sterile, microscopi per l'osservazione delle cellule, centrifughe per la separazione cellulare e dispositivi di crioconservazione

Nella coltura cellulare 2D, le cellule crescono su superfici piane e aderenti. Questo metodo è il più tradizionale ed è ampiamente utilizzato data la sua semplicità nonché i suoi bassi costi operativi. Tuttavia, tale metodo non è in grado di riflettere accuratamente l'ambiente tridimensionale naturale delle cellule nei tessuti viventi, influenzando la differenziazione cellulare e le risposte ai trattamenti farmacologici [11]. La preparazione del substrato e il seeding delle cellule sono passaggi cruciali, seguiti dal mantenimento delle cellule in condizioni controllate e dal passaggio quando le cellule raggiungono la confluenza.

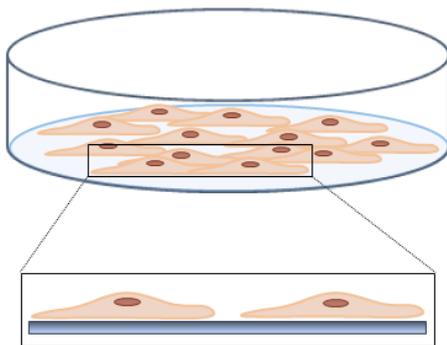


Figura 1.12: Coltura Cellulare 2D.

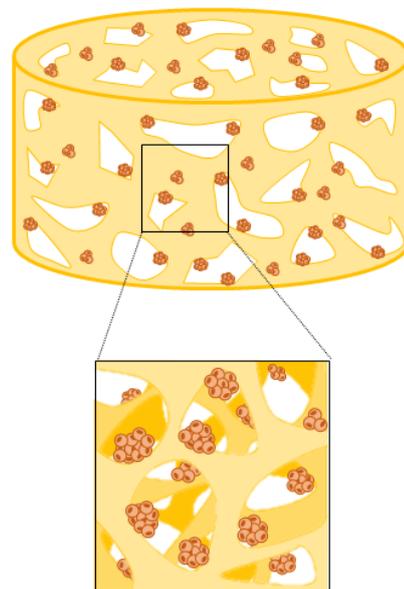


Figura 1.13: Coltura Cellulare 3D.

1.2.1 Coltura Cellulare 3D

La coltura cellulare 3D (figura 1.13) invece rappresenta un approccio più avanzato e fisiologicamente rilevante rispetto alla coltura 2D (figura 1.12) di cui si è appena detto. Tale metodo, infatti, è in grado di simulare più efficacemente le condizioni in vivo, facendo crescere le cellule in ambienti tridimensionali, come sferoidi, organoidi o matrici extracellulari, e consentendo una migliore comprensione delle interazioni cellulari e delle risposte ai trattamenti. Però, richiede competenze avanzate e attrezzature specializzate, aumentando la complessità e i costi dell'implementazione [12, 13].

Nella coltura cellulare tridimensionale (3D) di cui si discute, gli scaffold giocano un ruolo cruciale nel fornire un ambiente di supporto strutturale e chimico per le cellule. Questi materiali sono progettati per mimare le caratteristiche dell'ambiente extracellulare dei tessuti viventi, consentendo alle cellule di crescere e interagire in modo più simile a quanto accade in vivo.

La procedura della coltura cellulare segue i seguenti passaggi:

1. **Preparazione dell'Scaffold o Matrice 3D:** Gli scaffold sono strutture tridimensionali che supportano la crescita delle cellule. La loro preparazione include la sterilizzazione e la formazione di una matrice tridimensionale appropriata;
2. **Seeding delle Cellule negli Scaffold:** Questo processo richiede la distribuzione uniforme delle cellule all'interno della matrice, garantendo una distribuzione omogenea per la crescita e la differenziazione;
3. **Mantenimento delle Condizioni di Coltura 3D:** Le colture 3D sono mantenute in condizioni di coltura controllate, spesso in incubatori con controllo dell'umidità, della temperatura e della concentrazione di anidride carbonica. È essenziale anche monitorare la diffusione dei nutrienti e dell'ossigeno attraverso la matrice per evitare condizioni di stress metabolico nelle cellule interne;
4. **Promozione della Differenziazione e della Formazione di Strutture Complesse:** Alcuni tipi di colture 3D richiedono l'aggiunta di specifici fattori di crescita o stimoli biochimici per promuovere la differenziazione cellulare e la formazione di strutture complesse, cruciale per replicare le caratteristiche fisiologiche dei tessuti in vivo;
5. **Analisi dei Risultati:** L'analisi delle colture cellulari 3D richiede l'utilizzo di tecniche avanzate di imaging.

Nonostante la coltura cellulare tridimensionale (3D) offra numerosi vantaggi rispetto alla coltura 2D, anch'essa presenta alcune limitazioni significative che

non possono non essere prese in considerazione. Tali limitazioni, infatti, possono influenzare l'interpretazione dei dati sperimentali e la validità dei modelli 3D utilizzati nella ricerca biomedica e nella medicina rigenerativa. Tra i limiti più significativi si segnalano:

1. **Complessità Tecnica e Costi Elevati:** La coltura cellulare tridimensionale richiede attrezzature specializzate e competenze tecniche avanzate rispetto alla coltura 2D. Da ciò ne deriva un aumento significativo dei costi operativi e nonchè la complessità dell'implementazione, rendendo questa tecnica meno accessibile per molti laboratori di ricerca e istituzioni [11, 13];
2. **Standardizzazione e Riproducibilità:** Le variazioni nei materiali degli scaffold, nella preparazione del gel e matrice, e nelle condizioni di coltura possono influenzare la riproducibilità dei risultati sperimentali. Tale variabilità può compromettere la validità e l'affidabilità dei modelli 3D utilizzati per lo screening di farmaci e la ricerca di base [13, 14];
3. **Diffusione dei Nutrienti e dell'Ossigeno:** diversamente dalla coltura 2D, dove i nutrienti e l'ossigeno possono diffondere facilmente attraverso un sottile strato di medio di coltura, nei modelli 3D più spessi questo processo può diventare limitante. Ciò può influenzare la crescita cellulare, la differenziazione e la risposta ai trattamenti farmacologici [11];
4. **Mimetizzazione In Vivo Limitata:** Nonostante i miglioramenti rispetto alla coltura 2D, i modelli 3D non sono comunque ancora in grado di riprodurre completamente l'ambiente tissutale in vivo. Molti aspetti della complessità biologica, come la perfusione vascolare, l'interazione con le cellule stromali, e la risposta immunitaria, non sono completamente mimati negli attuali sistemi di coltura cellulare 3D. Questa mancanza di mimetizzazione può influenzare la fisiologia cellulare e la risposta ai trattamenti farmacologici [murphy20143d , 15];
5. **Limitazioni nell'Analisi e nelle Tecniche di Imaging:** L'analisi delle colture cellulari tridimensionali può essere più complessa rispetto alla coltura 2D, specialmente per la valutazione della morfologia, della distribuzione delle proteine e delle interazioni cellulari all'interno degli scaffold. Sono infatti spesso necessarie delle tecniche avanzate di imaging per ottenere immagini dettagliate e analizzare le strutture 3D, aumentando la complessità e i costi delle analisi sperimentali [15];
6. **Tempo e Risorse Necessarie per lo Sviluppo di Modelli 3D:** Lo sviluppo e la caratterizzazione di modelli 3D efficaci richiedono tempo e risorse considerevoli. Questo include la progettazione degli scaffold appropriati, la

validazione dei protocolli di coltura, e l'ottimizzazione delle tecniche di analisi [11, 14].

Ciò evidenziato, la coltura cellulare tridimensionale rappresenta comunque un passo significativo verso modelli più predittivi e biologicamente rilevanti rispetto alla coltura 2D.

1.3 Scaffold

L'impedenza può essere impiegata, altresì, nell'ingegneria tissutale per sviluppare scaffold e biomateriali che mimano le proprietà elettriche dei tessuti ossei, favorendo l'adesione, la differenziazione e la crescita delle cellule ossee. Progettare substrati biomimetici che riproducono queste caratteristiche elettriche può migliorare l'efficacia delle terapie rigenerative e accelerare il processo di guarigione.

In aggiunta, gli scaffold sono utilizzati per creare modelli in vitro di tessuti e organi umani per la ricerca di base, lo sviluppo di nuovi farmaci e terapie, e la medicina personalizzata [16], fornendo un supporto tridimensionale alle cellule terapeutiche durante il trapianto, migliorando così l'efficacia delle terapie cellulari.

Gli **scaffold**, conosciuti anche come impalcature o strutture di supporto, sono progettati per mimare l'architettura e le proprietà dei tessuti biologici nativi, fornendo un ambiente fisico e biochimico che favorisce la rigenerazione dei tessuti danneggiati o persi a causa di traumi, malattie o condizioni congenite. Ad esempio, gli scaffold sono impiegati per la rigenerazione ossea, cartilaginea, cutanea, muscolare, nervosa e vascolare.

Nel contesto dell'ingegneria tissutale, la progettazione degli scaffold è guidata da diversi obiettivi chiave.

In primo luogo, gli scaffold devono essere biocompatibili, ossia non causare reazioni avverse nel tessuto circostante o nel corpo dell'ospite. La biocompatibilità è essenziale per garantire l'integrazione degli scaffold nel tessuto ospite e per prevenire risposte immunitarie nocive che potrebbero compromettere il successo della rigenerazione tissutale.

In secondo luogo, gli scaffold devono essere porosi e permeabili, consentendo il passaggio di nutrienti, ossigeno e fattori di crescita attraverso la struttura e facilitando lo scambio di cellule e metaboliti. La porosità degli scaffold è cruciale per favorire una migliore vascolarizzazione del tessuto rigenerato e per garantire una distribuzione uniforme delle cellule all'interno della struttura [17].

Oltre alle caratteristiche appena descritte, biocompatibilità e porosità, gli scaffold devono essere anche biodegradabili, e dunque in grado di degradarsi nel tempo e di essere sostituiti gradualmente dal nuovo tessuto rigenerato. La degradabilità

degli scaffold è un aspetto critico per garantire che la struttura di supporto non interferisca con la funzione del tessuto rigenerato e che venga gradualmente rimpiazzata dalla matrice extracellulare prodotta dalle cellule durante il processo di rigenerazione tissutale.

La velocità e il meccanismo di degradazione degli scaffold possono essere regolati attraverso la selezione dei materiali e dei metodi di fabbricazione, consentendo un controllo preciso sulla cinetica di degradazione e sulle proprietà meccaniche degli scaffold [18].

La morfologia della superficie degli scaffold è un altro fattore chiave che influisce sull'adesione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule. Superfici rugose o modellate possono favorire l'adesione cellulare e la formazione di tessuti più uniformi e funzionali.

La composizione chimica degli scaffold è altrettanto importante, poiché può influenzare la biocompatibilità, la degradabilità e la capacità di interagire con le cellule e i fattori di crescita. Materiali come polimeri sintetici, biopolimeri naturali e materiali ibridi sono comunemente utilizzati per la fabbricazione degli scaffold, ciascuno con caratteristiche specifiche che influenzano le prestazioni degli scaffold [16].

Tecniche di fabbricazioni

Esistono diversi approcci per la fabbricazione degli scaffold, e ciascuno di essi presenta sia vantaggi che limitazioni specifiche.

Uno dei metodi più comuni è l'estrusione biologica, che prevede l'utilizzo di una sospensione cellulare e di un materiale di supporto, solitamente un idrogel, che viene estruso attraverso un ugello per formare la struttura desiderata degli scaffold. Questo approccio consente di produrre scaffold con una vasta gamma di forme e dimensioni, ma può essere limitato dalla complessità delle strutture che possono essere prodotte.

Un altro approccio comune è la deposizione di materiali, che coinvolge la deposizione di materiali in strati sottili per creare la struttura degli scaffold. Tecniche come la stampa 3D, la litografia a due fotoni e la stampa a getto di inchiostro consentono un controllo preciso sulla geometria e sulla composizione chimica degli scaffold, ma possono essere limitate dalla necessità di materiali specializzati e da costi elevati di attrezzature [14].

Un terzo approccio è l'auto-assemblaggio, che sfrutta le proprietà di auto-assemblaggio di molecole biologiche, come i peptidi o gli acidi nucleici, per formare strutture tridimensionali. Questo approccio consente di produrre scaffold con una precisa organizzazione molecolare e di controllare la morfologia a scala nanometrica, ma può essere limitato dalla complessità della progettazione e dalla stabilità delle

strutture formate [19].

Le proprietà strutturali e biochimiche degli scaffold influenzano significativamente la loro efficacia nel guidare la rigenerazione tissutale. La porosità degli scaffold, ad esempio, influenza la capacità di fornire un ambiente tridimensionale che favorisce la crescita cellulare e lo scambio di nutrienti e metaboliti. Gli scaffold con una porosità adeguata hanno dimostrato di favorire una migliore rigenerazione tissutale rispetto a quelli con una struttura più compatta.

Nonostante i progressi significativi nella progettazione e nella fabbricazione degli scaffold, sussistono ancora diverse sfide da affrontare per migliorare ulteriormente le loro prestazioni e le loro applicazioni. Ad esempio, sarà necessario sviluppare nuovi materiali e rivestimenti che ne migliorino la biocompatibilità e riducano il rischio di reazioni avverse o rigetto da parte dell'organismo ospite. Ancora, gli scaffold devono essere progettati per fornire un ambiente che supporti la crescita e la funzionalità delle cellule, consentendo la formazione di tessuti che riproducono le caratteristiche e le funzioni del tessuto nativo. Risulta altresì fondamentale ottimizzarne la velocità e il meccanismo di degradazione, ciò al fine di garantire una rigenerazione tissutale efficace e senza complicazioni.

1.4 I Bioreattori

I bioreattori rappresentano dispositivi fondamentali nell'ambito dell'ingegneria biotecnologica, utilizzati per la coltura e la manipolazione di organismi viventi in condizioni controllate al fine di produrre biomasse, metaboliti o prodotti specifici [20]. Essi sono impiegati in una vasta gamma di settori, tra i quali, a titolo esemplificativo, la produzione farmaceutica, l'industria alimentare, l'ingegneria ambientale e la ricerca scientifica.

Il ruolo principale di un bioreattore è quello di fornire un ambiente ottimale per la crescita e la proliferazione di microrganismi o cellule, garantendo al contempo un controllo preciso delle variabili ambientali che influenzano il processo di coltura [21].

Ciò detto, tra i componenti principali possiamo eidentziare:

- **Camera di coltura:** ovvero un contenitore in cui si sviluppano e si riproducono gli organismi viventi e la cui progettazione è fondamentale per ottimizzare le condizioni di crescita. Le camere di coltura possono presentare notevoli differenze in termini di dimensioni e forme, e ciò a seconda delle esigenze specifiche del processo. Nei bioreattori di laboratorio, le camere di coltura sono, infatti, spesso piccole e cilindriche, mentre nei bioreattori industriali possono essere molto grandi e di forma variabile per ospitare volumi elevati

di coltura. Materiali quali acciaio inossidabile, vetro borosilicato e plastica vengono comunemente utilizzati per costruire queste camere a seconda delle esigenze di sterilità, resistenza chimica e trasparenza. La distribuzione uniforme del substrato nutritivo è cruciale per prevenire zone di stagnazione o accumulo, che potrebbero compromettere l'efficacia del processo di coltura [22].

- **Sistema di agitazione:** componente critico che garantisce la miscelazione efficiente del substrato nutritivo e degli organismi all'interno della camera di coltura. Esistono vari tipi di sistemi di agitazione, inclusi agitatori meccanici, bolle di gas e agitazione magnetica, ciascuno che presenta i propri vantaggi e le relative limitazioni. Gli agitatori meccanici (ad esempio, pale o turbine) sono comunemente usati nei bioreattori a batch e continui per garantire una distribuzione uniforme dei nutrienti e dell'ossigeno. La miscelazione è essenziale non solo per la distribuzione dei nutrienti, ma anche per mantenere un ambiente omogeneo in termini di temperatura e pH. Inoltre, un'adeguata agitazione previene la formazione di biofilm e aggregati cellulari, che potrebbero ostacolare la crescita e il metabolismo delle cellule coltivate [23].
- **Sistemi di controllo:** ovvero avanzati meccanismi elettronici e software progettati per monitorare e regolare le condizioni di coltura. Questi sistemi includono controllori di temperatura, pH, ossigeno disciolto e altri parametri cruciali. La regolazione puntuale di questi fattori è fondamentale per mantenere le condizioni ottimali di crescita e produzione. Ad esempio, i controllori di temperatura utilizzano termostati e riscaldatori per mantenere la temperatura desiderata, mentre i controllori di pH aggiungono automaticamente acidi o basi per mantenere il pH a livelli ottimali. I sistemi di controllo possono essere programmati per adattarsi ai cambiamenti nelle condizioni di coltura, consentendo una coltivazione più efficiente e produttiva. Inoltre, con l'avanzamento della tecnologia, molti sistemi di controllo sono ora integrati con software di monitoraggio remoto, consentendo agli operatori di supervisionare i processi a distanza [24].
- **Sensori:** svolgono un ruolo vitale nei bioreattori, fornendo dati in tempo reale sulle condizioni interne del bioreattore. Tra i più comuni segnalano i sensori di temperatura, pH, ossigeno disciolto e CO₂. Questi dispositivi di monitoraggio sono collegati ai sistemi di controllo, i quali utilizzano le informazioni raccolte per regolare automaticamente le condizioni di coltura. Ad esempio, un sensore di ossigeno disciolto può rilevare una diminuzione dei livelli di ossigeno e attivare un sistema di aerazione per compensare. Allo stesso modo, un sensore di pH può rilevare cambiamenti nell'acidità e regolare l'aggiunta di tamponi per mantenere il pH stabile. L'uso di sensori avanzati garantisce che le condizioni

di coltura rimangano entro i limiti ottimali, migliorando così la qualità e la consistenza del prodotto finale. In tempi recenti, sono stati sviluppati sensori miniaturizzati e a basso costo, che consentono il monitoraggio *in situ* di più parametri simultaneamente.

1.4.1 Tipologie di Bioreattori

Esistono diverse tipologie di bioreattori, ciascuna ottimizzata per specifiche applicazioni e requisiti di processo [12]. tra le varie e principali tipologia possiamo citare: i bioreattori a batch, i bioreattori a flusso continuo, i bioreattori a membrana e, infine, i bioreattori a perfusione.

Bioreattori a Batch

I bioreattori a batch sono i più semplici ed in questi sistemi, tutti i componenti nutritivi necessari per la coltura degli organismi vengono aggiunti all'inizio del processo. Dopo l'inoculazione delle cellule o dei microrganismi, il sistema viene sigillato e lasciato operare senza ulteriori aggiunte di substrati o rimozione di prodotti. Durante il processo, invece, i nutrienti vengono consumati e i prodotti metabolici si accumulano fino a raggiungere la fase stazionaria, momento nel quale la crescita cellulare si arresta a causa dell'esaurimento dei nutrienti o dell'accumulo di prodotti di scarto tossici. Questo tipo di bioreattore è ideale per la produzione di prodotti in piccole quantità e per processi che richiedono un alto grado di controllo e standardizzazione. Triva comunemente applicazione nella produzione di antibiotici, enzimi e altre biomolecole complesse. Si consideri, a titolo esemplificativo, come trovi applicazione pratica nella produzione di birra, dove il processo fermentativo avviene in un ambiente chiuso senza aggiunte esterne di substrati dopo l'inizio della fermentazione [22].

Bioreattori a Flusso Continuo

I bioreattori a flusso continuo, invece, rappresentano una configurazione avanzata in cui da un lato il substrato nutritivo viene continuamente introdotto nel sistema, dall'altro la biomassa viene costantemente rimossa. Tale approccio consente di mantenere le cellule in una fase di crescita esponenziale per periodi prolungati, aumentando la produttività del processo. I bioreattori a flusso continuo sono particolarmente vantaggiosi per applicazioni industriali su larga scala, dove è necessario un alto rendimento produttivo e una qualità costante del prodotto. Tali bioreattori trovano applicazione nella produzione di biocarburanti, bioplastiche e nella fermentazione industriale per la sintesi di vari composti chimici. Il controllo dei parametri operativi come la velocità di diluizione e la concentrazione del substrato è cruciale per ottimizzare la crescita cellulare e la produttività. Ad esempio, nella

produzione di etanolo da biomassa lignocellulosica, i bioreattori a flusso continuo permettono di mantenere un tasso di produzione elevato e costante [22].

Bioreattori a Membrana

I bioreattori a membrana utilizzano membrane semipermeabili per separare il substrato nutritivo dagli organismi coltivati. Le membrane consentono il passaggio selettivo di nutrienti e prodotti di scarto, mantenendo al contempo le cellule all'interno del bioreattore. Questo tipo di bioreattore offre un controllo preciso delle condizioni di coltura ed è particolarmente indicato ed utilizzato per colture a lungo termine e processi di produzione ad alta densità cellulare. Inafatti, i bioreattori a membrana sono particolarmente utili nella produzione di proteine ricombinanti, anticorpi monoclonali e altre biomolecole complesse che richiedono condizioni di coltura stabili e prolungate. A titolo esemplificativo, si consideri che viene utilizzato per la produzione di ormoni umani ricombinanti, come l'insulina, dove il bioreattore a membrana consente di mantenere una produzione continua e costante, riducendo il rischio di contaminazione e migliorando la qualità del prodotto finale [22].

Bioreattori a Perfusione

I bioreattori a perfusione (figura 1.14) prevedono un flusso continuo di substrato nutritivo all'interno del sistema, garantendo una distribuzione uniforme dei nutrienti e dell'ossigeno alle cellule coltivate. Questo tipo di bioreattore è progettato per mantenere le cellule in uno stato di crescita ottimale per periodi prolungati, consentendo la raccolta continua dei prodotti di interesse. I bioreattori a perfusione sono particolarmente adatti per la coltura di cellule animali e vegetali, che richiedono un ambiente di coltura dinamico e ben ossigenato per crescere e differenziarsi correttamente. Essi sono ampiamente utilizzati nell'ingegneria tissutale, nella produzione di vaccini e nella coltura di cellule staminali per terapie avanzate; infatti, trovano ampio utilizzo nella produzione di tessuti ingegnerizzati per la rigenerazione ossea, dove i bioreattori a perfusione forniscono un ambiente ottimale per la proliferazione e la differenziazione delle cellule staminali in osteoblasti, migliorando l'efficienza del processo di rigenerazione tissutale [25].

1.4.2 Bioreattori a Perfusione

Il funzionamento dei bioreattori a perfusione si basa sulla creazione di un flusso continuo di nutrienti e gas attraverso il sistema di coltura. Questo flusso costante mantiene le cellule o gli organismi in un ambiente dinamico e ben ossigenato, promuovendo così la crescita cellulare e la produzione di biomolecole. Il substrato nutritivo viene continuamente rimosso o aggiunto al sistema per garantire un apporto costante di nutrienti e una rimozione efficace dei prodotti di scarto.

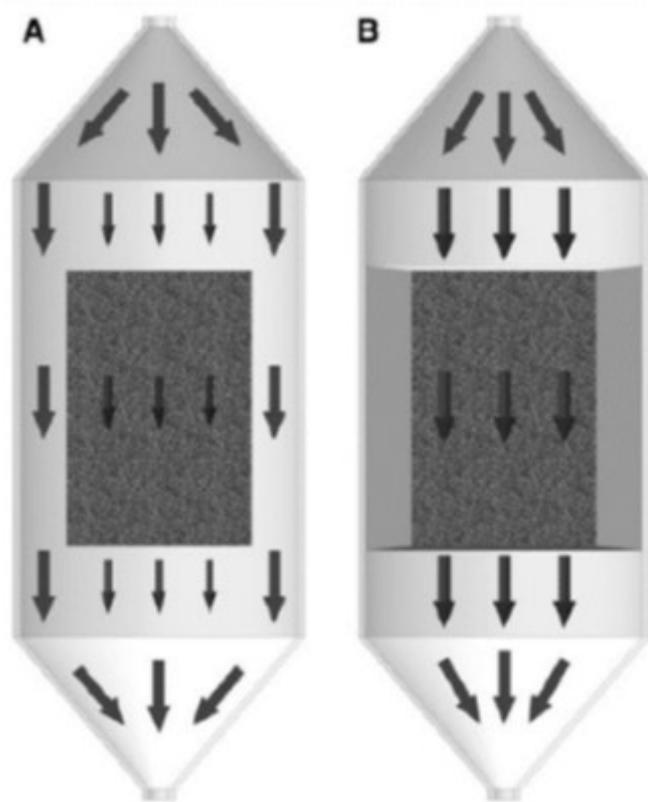


Figura 1.14: Bioreattori a perfusione

I parametri di funzionamento, come la velocità di flusso, la concentrazione di nutrienti e la temperatura, vengono regolati per mantenere condizioni ottimali di coltura nel bioreattore.

Per tali ragioni, i bioreattori a perfusione offrono un approccio dinamico e altamente controllato per la coltura cellulare e la produzione di prodotti biologici.

Le diverse configurazioni dei bioreattori a perfusione consentono di adattare il sistema alle specifiche esigenze del processo, offrendo vantaggi significativi in termini di efficienza e qualità del prodotto finale [13].

Questo tipo di bioreattori possono essere realizzati in diverse configurazioni, ciascuna con caratteristiche specifiche che li rendono adatti a determinate applicazioni. Le principali configurazioni dei bioreattori a perfusione includono:

- **Bioreattori a Flusso Continuo:** Questa configurazione prevede un flusso costante di substrato nutritivo all'interno del sistema, mentre le cellule o gli organismi coltivati vengono mantenuti in un ambiente di coltura continuamente rinnovato. Il flusso continuo consente un'eliminazione efficace dei prodotti di

scarto e un apporto costante di nutrienti, mantenendo così condizioni ottimali di coltura nel tempo;

- **Bioreattori a Letto Fisso:** In questa configurazione, il substrato di coltura è immobilizzato su un supporto solido all'interno del bioreattore. Il flusso del substrato nutritivo attraverso il letto fisso favorisce l'interazione tra le cellule e il substrato, consentendo una crescita cellulare efficace e una produzione mirata di metaboliti o prodotti specifici;
- **Bioreattori a Membrana:** Questa configurazione impiega membrane semipermeabili per separare il flusso di nutrienti e gas dal flusso cellulare e consente il passaggio selettivo di sostanze tra la camera di coltura e il mezzo di coltura, consentendo un controllo preciso delle condizioni ambientali e una rimozione efficiente dei prodotti di scarto;
- **Bioreattori a Microfluidica:** Questa ultima configurazione utilizza canali microfluidici per fornire un flusso preciso di nutrienti e gas alle cellule in coltura e consente una coltura cellulare ad alta densità e un controllo dettagliato delle condizioni di coltura, rendendoli ideali per applicazioni di ricerca e sviluppo di nuove terapie cellulari.

In conclusione, la capacità di misurare l'impedenza in ambienti tridimensionali potrebbe offrire nuove prospettive nella valutazione della vitalità e della funzionalità cellulare, migliorando significativamente la nostra comprensione delle dinamiche cellulari in un contesto più fisiologicamente rilevante. Tuttavia, le metodologie attualmente disponibili per tali analisi sono limitate, rendendo indispensabile lo sviluppo di tecniche innovative [26].

Nel prossimo capitolo, verranno dettagliati i materiali utilizzati per il progetto. In particolare, si descriverà la camera di coltura progettata per mantenere condizioni ottimali di crescita cellulare, l'unità di perfusione che assicura un flusso continuo di nutrienti, e le stampanti 3D utilizzate per creare scaffold personalizzati. Ad ultimo, verrà presentato l'impedenzometro E4990A, strumento fondamentale per le misurazioni di impedenza nelle colture 3D. Questi materiali e strumenti costituiscono la base tecnica su cui si fonda l'intero progetto di ricerca.

Capitolo 2

Materiali

Questo capitolo descrive in dettaglio i materiali utilizzati nel presente studio, fondamentale per garantire la replicabilità e la comprensione dei risultati ottenuti. La scelta e la caratterizzazione accurata dei materiali sono cruciali per la riuscita degli esperimenti, in particolare quando si tratta di misurazioni delicate come quelle di impedenza in sistemi biologici.

Verranno presentati i materiali impiegati, inclusi la camera di coltura e l'unità di perfusione. Saranno inoltre fornite informazioni sulle strumentazioni e sulle attrezzature utilizzate per le misurazioni.

L'obiettivo di questo capitolo è, dunque, fornire una rappresentazione completa dei materiali e delle metodologie, offrendo una base solida per la comprensione dei risultati sperimentali e delle conclusioni tratte.

2.1 Camera di Coltura

La camera di coltura del bioreattore è progettata per ospitare scaffold di varie dimensioni, permettendo la semina delle cellule e la loro coltura sotto perfusione regolabile [27].

2.1.1 Progettazione

L'ottimizzazione del design della camera di coltura è stata realizzata tramite un processo iterativo che ha coinvolto la progettazione, modellazione, prototipazione e test. Più nel dettaglio, la camera è composta da due parti cilindriche cave avvitabili, ciascuna dotata di una filettatura luer. Un o-ring in silicone (VMQ 80.5/SIL80F, durezza 70 Sh A) con diametro interno di 26,7 mm e sezione radiale di 1,78 mm garantisce la tenuta stagna. La geometria interna permette di ospitare scaffold di

diverse dimensioni (diametro: 7-10 mm, altezza: 1-15 mm) inseriti a pressione in supporti di silicone (Sylgard 184, Dow Corning) su misura (diametro esterno: 24 mm, altezza: 15 mm), garantendo la perfusione diretta. Il terreno di coltura entra dal fondo della camera, fluisce attraverso il costruito ed esce dall'alto seguendo un percorso a forma di S. La camera di coltura (figura 2.1) utilizzata ha un'altezza totale di 65 mm. L'ingresso è posizionato a 20,4 mm dalla base e la scanalatura dell'o-ring ha una larghezza di 2,4 mm e si trova a 1,5 mm dalla superficie interna della parte superiore. La geometria interna è caratterizzata da due sezioni troncoconiche (altezza: 6 mm, angolo: circa 31°) che riducono il volume di priming a 2,5 mL. Questa configurazione convoglia il terreno di coltura direttamente verso il costruito, evitando zone di ricircolo o stagnazione.

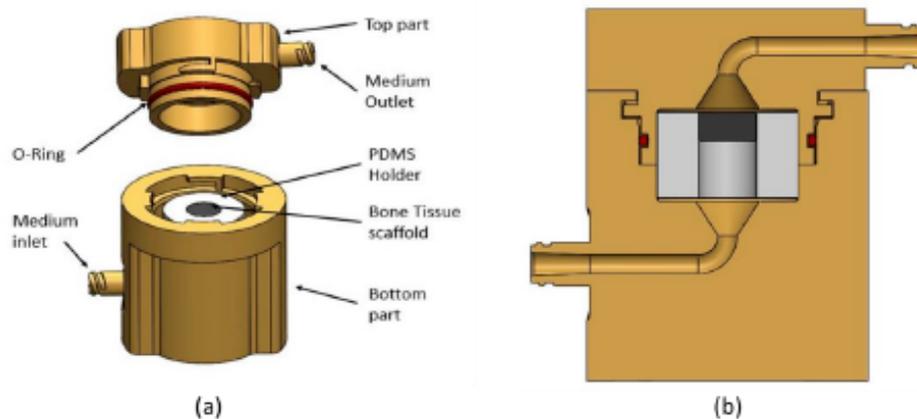


Figura 2.1: (a) Vista frontale del bioreattore aperto con il l'holder in PDMS, l'o-ring in silicone e lo scaffold. (b) Sezione trasversale con profilo a S.

2.1.2 Produzione

I componenti della camera di coltura sono stati realizzati (figura 2.2) mediante stereolitografia a bassa forza utilizzando la stampante 3D Form3 (Formlabs) e un fotopolimero citocompatibile e autoclavabile (Dental SG Resin, Formlabs). Questa tecnica offre un buon compromesso tra risoluzione di stampa, velocità ed economicità. Le fasi di produzione includono:

1. Creazione del file 3D-CAD con SolidWorks.
2. Conversione in file STL (Standard Triangulation Language) per discretizzare la geometria.

3. Orientamento dell'oggetto e creazione dei supporti con il software PreForm (Formlabs), prestando attenzione alla posizione dei supporti per migliorare la qualità della superficie finale.
4. Generazione automatica del percorso UV per la stampa.
5. Stampa dell'oggetto: i raggi UV solidificano strati successivi di resina fino alla creazione del pezzo completo.
6. Pulizia e post-polimerizzazione: il pezzo viene pulito dalla resina residua e posto in un forno UV per completare la polimerizzazione.
7. Rimozione manuale dei supporti.

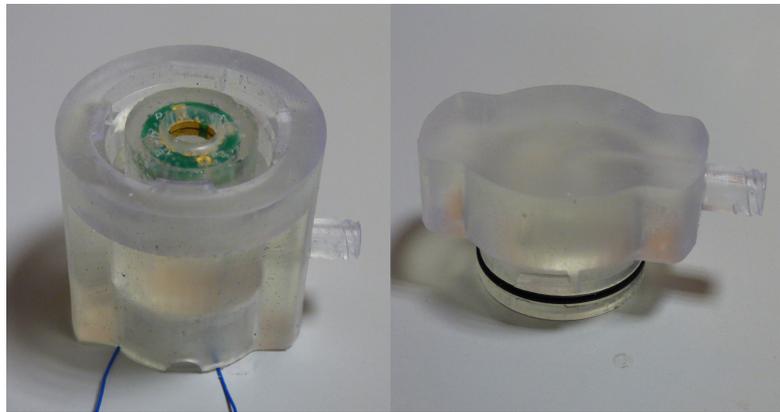


Figura 2.2: Camera di coltura stampata. A destra la parte superiore, a sinistra la parte inferiore.

2.2 Unità di Perfusione

L'unità di perfusione è progettata per fornire una perfusione continua, essenziale per garantire un adeguato trasporto di nutrienti e metaboliti attraverso il costrutto coltivato e per fornire una stimolazione fisiologica dello shear stress indotto dal flusso. A seconda della modalità impostata (flusso unidirezionale o bidirezionale) e delle velocità di flusso, è possibile ottenere diversi effetti in termini di proliferazione e differenziazione cellulare. È stato dimostrato che la proliferazione cellulare è promossa da velocità di flusso fino a 0,1 mL/min, mentre la differenziazione osteogenica è potenziata da velocità di flusso di 0,5 mL/min [28]. La portata impostata per le nostre misure è pari a 0.3mL/min.

2.2.1 Configurazione

L'unità di perfusione che è possibile vedere in figura 2.3 è composta dai seguenti componenti:

1. Pompa peristaltica Ismatec;
2. Tubo Pharmed ID = 2.59 mm con connettori luer maschio e femmina da 3/32";
3. Tre tubi Tygon ID = 1/8", lunghi 30 cm, ciascuno con connettori luer maschio e femmina da 1/8";
4. Serbatoio con due tubi Pharmed, entrambi con connettori luer maschio.



Figura 2.3: Banco di prova del set-up di perfusione.

Lo schematico del circuito è mostrato in figura 2.4.

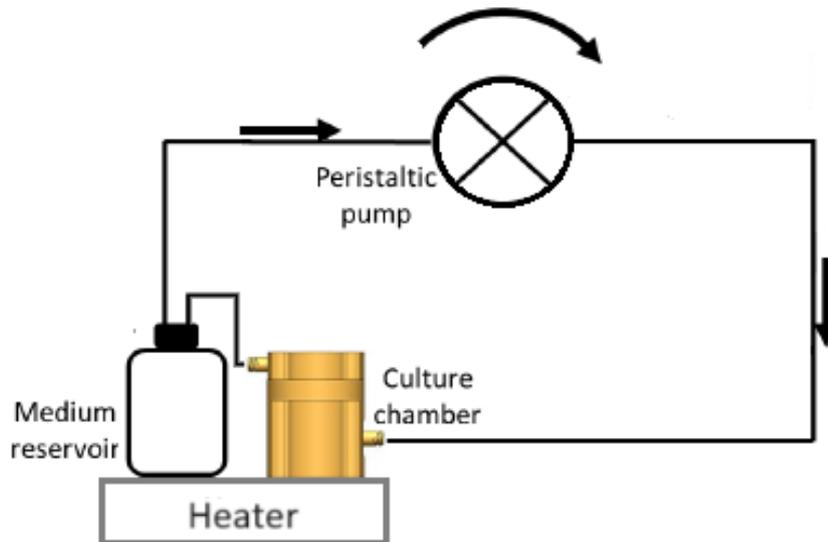


Figura 2.4: Schema del set-up di perfusione composto dal serbatoio del terreno, tubi in silicone, pompa peristaltica e camera di cultura.

2.3 Stampanti 3D

Nel presente studio sono state utilizzate due diverse stampanti 3D: la Raise3D Pro3 e la Form 2 (Formlabs). Queste stampanti hanno permesso di realizzare componenti complessi e precisi, fondamentali per lo sviluppo e l'ottimizzazione del bioreattore e dei relativi supporti. La stampa 3D, o produzione additiva, è una tecnologia che permette di creare oggetti tridimensionali mediante la deposizione di strati successivi di materiale. Questa tecnologia è stata rivoluzionaria per la prototipazione e la produzione su piccola scala, consentendo la realizzazione rapida e precisa di componenti personalizzati. Le due stampanti utilizzate nel progetto, la Raise3D Pro3 e la Form 2, rappresentano due approcci distinti alla stampa 3D, ciascuna con i propri vantaggi e caratteristiche specifiche.

2.3.1 Raise3D Pro3

La Raise3D Pro3 mostrata in figura 2.5 è una stampante 3D FDM (Fused Deposition Modeling) di alta precisione, progettata per la prototipazione rapida e la produzione

su piccola scala. Questa stampante è particolarmente adatta per la realizzazione di pezzi di grandi dimensioni o per la stampa simultanea di più oggetti.

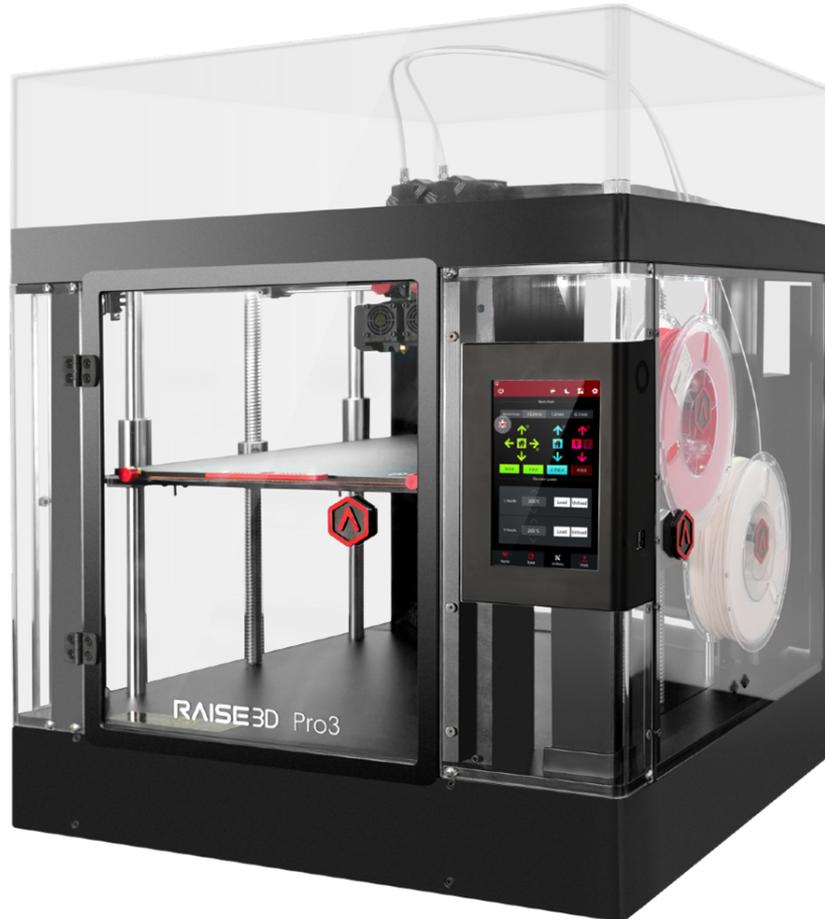


Figura 2.5: Stampante Raise3D Pro3.

Tra le sue caratteristiche principali si segnalano:

- **Volume di Stampa:** 300 x 300 x 300 mm, ideale per la realizzazione di pezzi di grandi dimensioni o la stampa simultanea di più oggetti. Questo ampio volume consente la produzione di componenti complessi e di grandi dimensioni in un'unica operazione di stampa, riducendo i tempi e i costi di produzione.
- **Risoluzione di Stampa:** Da 10 a 250 micron, che garantisce elevata precisione e qualità superficiale. La possibilità di scegliere tra diverse risoluzioni consente di bilanciare la qualità della stampa con la velocità di produzione, ottimizzando il processo in base alle specifiche esigenze del progetto.

- **Doppio Estrusore:** Consente la stampa con due materiali diversi o con due colori differenti. Questa funzionalità è particolarmente utile per la produzione di componenti con caratteristiche multifunzionali, come strutture di supporto solubili in acqua o la combinazione di materiali con proprietà meccaniche diverse.
- **Sistema di Livellamento Automatico:** Assicura una calibrazione precisa migliorando la qualità di stampa. Il sistema di livellamento automatico riduce il rischio di errori di stampa e garantisce una migliore adesione del primo strato, fondamentale per la riuscita dell'intero processo.

Dettagli Tecnici

La Raise3D Pro3 utilizza un sistema di estrusione a caldo per depositare strati successivi di materiale fuso, che si solidificano rapidamente formando l'oggetto tridimensionale. Il processo di stampa inizia con la preparazione del modello digitale, che viene convertito in un formato compatibile con la stampante (STL). Successivamente, il software di slicing divide il modello in strati orizzontali e genera il percorso di stampa per l'estrusore. Durante la stampa, l'estrusore si muove lungo gli assi X, Y e Z, depositando il materiale fuso strato per strato. La qualità della stampa dipende dalla precisione dei movimenti dell'estrusore e dalla stabilità della piattaforma di stampa. La Raise3D Pro3 è dotata di un sistema di raffreddamento efficace, che permette al materiale di solidificarsi rapidamente, migliorando la precisione e la qualità superficiale dei pezzi stampati. Di seguito vengono illustrati in dettaglio i principali aspetti tecnici della Raise3D Pro3:

1. Struttura e Movimento:

- **Sistema di Guida:** La Raise3D Pro3 utilizza un sistema di guide lineari per assicurare movimenti precisi e stabili dell'estrusore lungo gli assi X e Y. Questo sistema riduce le vibrazioni e migliora la qualità di stampa, soprattutto per oggetti complessi o di grandi dimensioni.
- **Piattaforma di Costruzione Riscaldata:** La piattaforma di costruzione è riscaldata per migliorare l'adesione del primo strato e ridurre il warping (deformazione) dei materiali durante la stampa. La temperatura della piattaforma può essere regolata in base al tipo di materiale utilizzato.

2. Estrusori:

- **Doppio Estrusore:** La Raise3D Pro3 è dotata di un doppio estrusore, che permette di stampare con due materiali o colori diversi simultaneamente. Questo è particolarmente utile per la stampa di strutture di supporto solubili in acqua o per la combinazione di materiali con proprietà meccaniche differenti.

- **Sistema di Raffreddamento:** Gli estrusori sono dotati di ventole di raffreddamento per stabilizzare la temperatura del materiale subito dopo l'estrusione, migliorando la precisione dei dettagli e riducendo la deformazione.

3. Sistema di Alimentazione del Filamento:

- **Alimentazione Diretta:** Il sistema di alimentazione del filamento è progettato per garantire una spinta costante e precisa del filamento nell'estrusore, minimizzando il rischio di intasamenti e migliorando la qualità della stampa.
- **Compatibilità dei Materiali:** La Raise3D Pro3 è compatibile con una vasta gamma di materiali, inclusi PLA, ABS, PETG, PVA e molti altri. Questa versatilità permette di scegliere il materiale più adatto per ogni specifica applicazione.

4. Software e Connettività:

- **Raise3D IdeaMaker:** Il software proprietario IdeaMaker facilita la preparazione dei file di stampa, con funzionalità di slicing avanzate e interfacce user-friendly. È possibile regolare una vasta gamma di parametri di stampa per ottimizzare i risultati.
- **Connettività:** La stampante può essere connessa via USB, Ethernet o Wi-Fi, permettendo il monitoraggio e il controllo remoto delle operazioni di stampa. Questa funzionalità è particolarmente utile per la gestione di progetti complessi o per operazioni di stampa in batch.

5. Sensori e Sicurezza:

- **Sensori di Livellamento Automatico:** La Raise3D Pro3 è dotata di sensori per il livellamento automatico del letto di stampa, che garantiscono una calibrazione precisa e migliorano l'adesione del primo strato.
- **Ripristino della Stampa dopo un Interruzione:** In caso di interruzione di corrente o altri problemi, la stampante può riprendere la stampa dal punto in cui si era interrotta, riducendo sprechi di materiale e tempi di inattività.

Processo di Stampa

- **Preparazione del Modello:** è necessario caricare il modello 3D nel software di slicing ideaMaker, convertire il modello in un percorso di estrusione e ottimizzare le impostazioni di stampa (temperatura, velocità, supporti).

- **Riscaldamento del Filamento:** la testa di stampa riscalda il filamento termoplastico fino a fonderlo.
- **Deposizione del Filamento:** il filamento fuso viene estruso attraverso un ugello; e depositato sul piano di stampa secondo il profilo del modello.
- **Costruzione Strato per Strato:** la piattaforma di costruzione si muove in coordinazione con la testa di stampa. Successivamente avverrà la formazione degli strati successivi per creare il modello tridimensionale.
- **Raffreddamento:** una volta completata la stampa, il modello viene lasciato raffreddare.
- **Rifinitura Post-Stamp:** infine, avviene la rimozione dei supporti (se necessario) e l'eventuale rifinitura per migliorare la qualità della superficie del modello.

2.3.2 Formlabs Form 3

La stampante 3D Form 3, prodotta da Formlabs (figura2.6), rappresenta una delle tecnologie più avanzate nel campo della stampa 3D, apprezzata per la sua precisione e affidabilità. Questo dispositivo utilizza un processo noto come stereolitografia a resina liquida (SLA), che permette di ottenere oggetti con un livello di dettaglio e una finitura superficiale superiore rispetto ad altre tecnologie di stampa 3D; infatti, uno dei principali vantaggi della Form 3 è proprio la qualità delle stampe.



Figura 2.6: Stampante Formlabs Form3.

La Form 3 si distingue per l'utilizzo della tecnologia LFS (Low Force Stereolithography), un'evoluzione della stereolitografia tradizionale. Questo metodo riduce le forze di distacco durante la stampa, permettendo di ottenere superfici più lisce e risoluzione elevata, capace di catturare dettagli minuti che altre tecnologie di stampa 3D potrebbero non riuscire a riprodurre.. La LFS utilizza un laser che solidifica la resina liquida strato dopo strato, con un sistema di specchi che guida il raggio laser con estrema precisione. Il risultato è una riduzione delle imperfezioni e una maggiore fedeltà del modello rispetto al progetto originale.

Dettagli Tecnici

La Form 3 ha un'area di costruzione di 145 x 145 x 185 mm, consentendo la creazione di oggetti relativamente grandi o la stampa di più oggetti piccoli contemporaneamente. La risoluzione del laser è di 25 micron, con uno spot del laser di 85 micron e una velocità di 22.5 mm/s, permettendo tempi di stampa rapidi senza compromettere la qualità. La stampante offre connettività USB, Ethernet e Wi-Fi, facilitando il trasferimento dei file di stampa. Utilizza il software PreForm, un programma intuitivo che ottimizza automaticamente l'orientamento, i supporti e altre impostazioni per garantire la migliore qualità di stampa possibile. Inoltre, un sistema di rilevamento avanzato con sensori monitora e mantiene condizioni ottimali durante la stampa, mentre il sistema di livellamento automatico garantisce l'accuratezza della costruzione.

Processo di Stampa

La tecnologia di stampa 3D utilizzata dalla Form 3 è chiamata Low Force Stereolithography (LFS), un'evoluzione della tradizionale stereolitografia (SLA). Ecco una panoramica del processo:

1. Preparazione del Modello:

- Il modello 3D viene caricato nel software PreForm;
- PreForm ottimizza automaticamente l'orientamento, supporti e altre impostazioni per la migliore qualità di stampa.

2. Esposizione del Laser:

- Il laser solidifica la resina liquida strato dopo strato;
- Un sistema di specchi galvanometrici guida il laser con alta precisione, garantendo dettagli nitidi e superfici lisce.

3. Riduzione delle Forze di Distacco:

- La tecnologia LFS utilizza una pellicola flessibile nel serbatoio della resina per ridurre le forze durante il distacco del pezzo dallo strato precedente;
- Questo riduce le sollecitazioni sul modello e previene difetti, migliorando la fedeltà della stampa.

4. Raffinamento e Post-Processing:

- Dopo la stampa, il modello richiede una pulizia per rimuovere la resina non polimerizzata;
- Il modello viene poi sottoposto a post-curing in un'unità di polimerizzazione UV per raggiungere le proprietà meccaniche e termiche desiderate.

2.3.3 Materiali di Stampa

La Raise3D Pro3 supporta una vasta gamma di materiali termoplastici, tra cui:

- **PLA (Polylactic Acid):** Un biopolimero derivato da risorse rinnovabili come il mais. Il PLA è facile da stampare, ha una bassa tendenza al warping e produce dettagli nitidi. È adatto per la prototipazione rapida e applicazioni non strutturali.
- **ABS (Acrylonitrile Butadiene Styrene):** Un materiale resistente e leggero, utilizzato comunemente per applicazioni industriali e componenti strutturali. L'ABS ha una buona resistenza agli urti e alle alte temperature, ma richiede una piattaforma di costruzione riscaldata per ridurre il warping.
- **PETG (Polyethylene Terephthalate Glycol):** Un materiale che combina la facilità di stampa del PLA con la resistenza dell'ABS. Il PETG è trasparente, resistente agli agenti chimici e ideale per applicazioni che richiedono robustezza e durabilità.
- **PVA (Polyvinyl Alcohol):** Un materiale idrosolubile utilizzato principalmente per creare supporti removibili. Il PVA si dissolve in acqua, facilitando la rimozione dei supporti senza danneggiare il pezzo stampato.
- **TPU (Thermoplastic Polyurethane):** Un materiale flessibile e resistente, ideale per applicazioni che richiedono elasticità e resistenza all'abrasione.

Invece, La Form 3 utilizza una vasta gamma di resine fotopolimeriche che offrono una varietà di proprietà meccaniche e fisiche per adattarsi a diverse applicazioni:

- **Standard Resins:** Per prototipazione rapida con alta risoluzione e finitura superficiale eccellente, disponibili in vari colori.
- **Engineering Resins:** Con proprietà meccaniche avanzate per applicazioni ingegneristiche, tra cui Tough, Durable, Flexible, Elastic, e High Temp.
- **Medical Resin:** UResine biocompatibili per dispositivi medici personalizzati, con certificazioni ISO per l'uso sicuro in contesti medici.
- **Special Resin:** Resine specifiche per applicazioni particolari come la resina trasparente per ottiche e la resina resistente alle alte temperature.

2.3.4 Applicazioni

Con la Raise3D Pro3 sono stati stampati:

- **Mold di Diverse Misure e Conformazioni:** Diversi mold, tra cui quelli mostrati in figura 2.7 e figura 2.8, sono stati progettati per facilitare l'integrazione degli elettrodi nel PDMS, garantendo una perfetta aderenza e allineamento. I parametri di stampa sono stati ottimizzati per ottenere strutture robuste e lisce, necessarie per evitare la rottura durante la separazione del mold dalla struttura in PDMS.



Figura 2.7: Mold inferiore per elettrodi circolari.



Figura 2.8: Mold inferiore per elettrodi a piastre.

- **Scaffold in PLA e PVA:** Gli scaffold in PLA in figura 2.9 hanno offerto un supporto rigido, mentre quelli in PVA in figura 2.10, essendo idrosolubili, hanno permesso di osservare variazioni di impedenza nel tempo, sciogliendosi in acqua. La possibilità di utilizzare scaffold in PVA ha permesso di studiare il comportamento di un materiale in un ambiente dinamico, monitorando le variazioni di impedenza dovute alla dissoluzione del materiale.

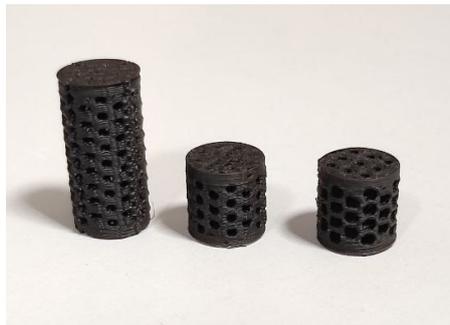


Figura 2.9: Scaffold stampati in PLA



Figura 2.10: Scaffold stampati in PVA

- **Bioreattore Modificato:** Una camera di coltura ad hoc per l'ultima fase delle misure è stata stampata in Clear Resin. Questa è stata progettata (figura 2.11 e figura 2.12) e stampata con la Form3 per il collegamento con gli altri strumenti di misura utilizzati, permettendo di far uscire i fili degli elettrodi dall'interno della camera di coltura (figura 2.13 e figura 2.14).

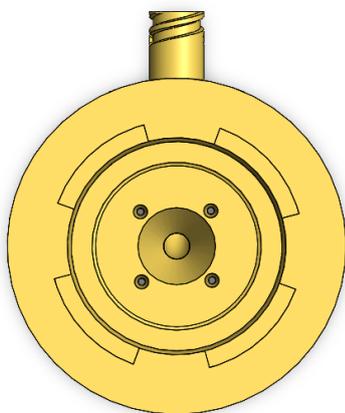


Figura 2.11: Top View del CAD bioreattore modificato

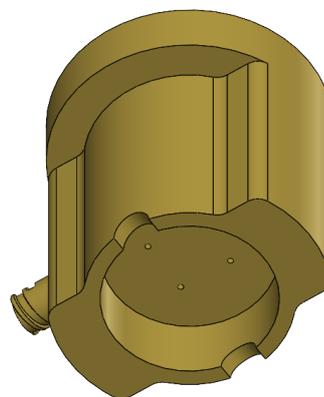


Figura 2.12: Bottom View CAD del bioreattore modificato



Figura 2.13: Pezzo inferiore del bioreattore modificato

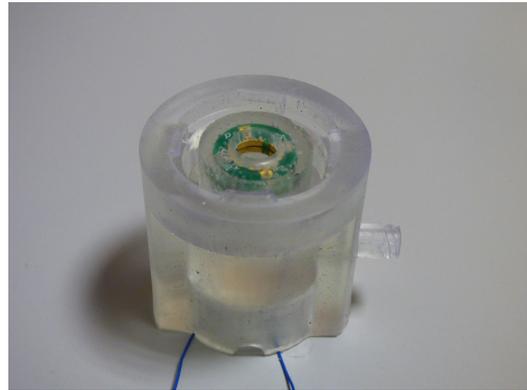


Figura 2.14: Pezzo inferiore del bioreattore modificato

Sempre, con la Form 3 è stato stampato il mold mostrato in figura 2.16 che consentisse di ottenere un sottile strato di PDMS (200 micrometri) a copertura della circonferenza interna dell'elettrodo, esposta al flusso delle cellule. Il disegno CAD di tale mold è mostrato in figura 2.15. Tale precisione non sarebbe stata possibile con la Raise3D Pro3. Questo componente è fondamentale per garantire una perfetta adesione del PDMS all'elettrodo e per ottimizzare il flusso delle cellule nel bioreattore.

L'integrazione delle stampanti Raise3D Pro3 e Formlabs Form 3 nel processo

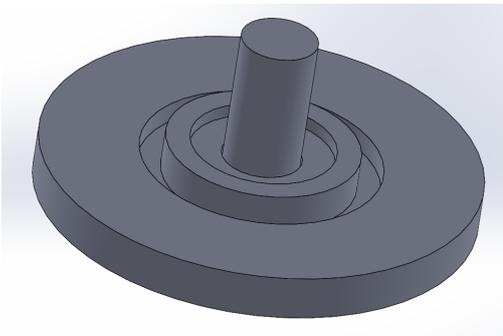


Figura 2.15: CAD del pezzo inferiore del mold con spazio micrometrico.

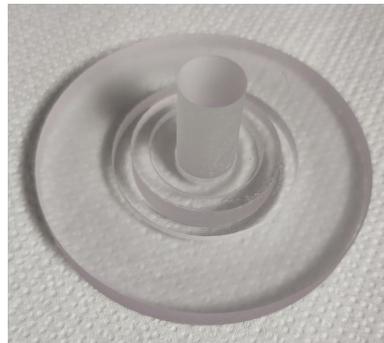


Figura 2.16: Pezzo inferiore del mold stampato con la stampante Form2.

di progettazione e produzione ha offerto un'ampia gamma di possibilità per la creazione di componenti complessi e altamente dettagliati. La combinazione di diverse tecnologie di stampa 3D e materiali ha permesso di ottimizzare ogni fase del progetto, garantendo risultati di alta qualità e precisione.

2.4 Impedenziometro Keysight E4990A

Nel contesto del progetto di ricerca, l'impedenziometro Keysight E4990A (figura 2.17) ha avuto un ruolo fondamentale grazie alla sua capacità di effettuare misurazioni precise e dettagliate dell'impedenza su una vasta gamma di frequenze. Questo strumento rappresenta un elemento cruciale nell'ambito dell'ingegneria elettronica e delle scienze applicate, offrendo funzionalità avanzate che garantiscono l'accuratezza e la ripetibilità delle misurazioni.

L'impedenziometro Keysight E4990A è in grado di coprire un'ampia gamma di frequenze, da 20 Hz a 120 MHz, consentendo la misurazione di componenti e sistemi operanti in diverse bande di frequenza. Questa ampia gamma di frequenze è particolarmente utile per applicazioni che vanno dalle basse frequenze, utilizzate per misurare resistenze e capacità, fino alle alte frequenze, necessarie per analizzare induttanze e altri componenti reattivi. La possibilità di operare su un intervallo così ampio di frequenze rende l'E4990A uno strumento estremamente versatile e adattabile a molteplici esigenze di misurazione.

Uno dei punti di forza dell'E4990A è la sua precisione, con una precisione di base dello 0,08%. Questo garantisce che le misurazioni siano altamente accurate, minimizzando gli errori e fornendo dati affidabili su cui basare analisi e decisioni successive. L'alta precisione è essenziale in contesti di ricerca e sviluppo, dove anche piccole variazioni nei dati possono avere un impatto significativo sui risultati finali.

L'interfaccia utente del Keysight E4990A è progettata per essere intuitiva e facile da utilizzare. Il display touch-screen a colori facilita la configurazione dei parametri di misurazione e la visualizzazione dei risultati. Questa caratteristica rende l'E4990A accessibile anche a utenti che potrebbero non avere una vasta esperienza con strumenti di misurazione avanzati, riducendo la curva di apprendimento e permettendo di concentrarsi maggiormente sull'analisi dei dati.



Figura 2.17: Impedenzmetro Keysight E4990A.

Tra le funzionalità avanzate dell'E4990A vi è la capacità di misurare non solo l'impedenza, ma anche altri parametri elettrici cruciali come la resistenza in corrente continua (DC), la capacità e l'induttanza. Questa multifunzionalità consente di utilizzare lo strumento per una vasta gamma di test e analisi, aumentando la sua utilità in diverse applicazioni tecniche e scientifiche. Inoltre, l'E4990A può compensare automaticamente eventuali errori di misurazione dovuti a fattori ambientali o alle condizioni del dispositivo sotto test (DUT), garantendo che i risultati siano il più accurati possibile anche in condizioni di prova variabili.

Dal punto di vista tecnico, il Keysight E4990A è progettato con una struttura robusta e componenti di alta qualità, assicurando affidabilità e durata nel tempo. Il sistema di misurazione si basa su un meccanismo di feedback di precisione che controlla il segnale di test, ottimizzando la linearità e la stabilità delle misure. Questo è particolarmente importante per applicazioni che richiedono un alto grado di accuratezza e ripetibilità.

Il processo di misurazione inizia con la preparazione del dispositivo sotto test (DUT), che viene collegato all'impedenzmetro. Successivamente, l'utente può configurare i parametri di misurazione tramite l'interfaccia touch-screen, selezionando la gamma di frequenze e il tipo di misurazione desiderata. Durante la misurazione, l'impedenzmetro applica un segnale di test al DUT e misura la risposta del dispositivo, calcolando l'impedenza e altri parametri elettrici rilevanti.

Un aspetto fondamentale del Keysight E4990A è la capacità di acquisire e analizzare i dati in modo efficiente. Il dispositivo è dotato di diverse opzioni di interfaccia, tra cui USB, GPIB e LAN, che facilitano il trasferimento dei dati acquisiti a un computer per un'ulteriore analisi. Questo permette di integrare facilmente l'E4990A in un ambiente di test automatizzato, migliorando la produttività e riducendo i tempi di misura.

Nell'ambito del progetto di ricerca, l'impedenziometro E4990A è stato collegato al PC mediante connessione USB e le misurazioni sono state automatizzate utilizzando un codice Python, impostando i seguenti parametri:

- **Sweep in frequenza:** da 20 Hz e 20 kHz
- **Numero di punti:** 1601
- **Precisione di misura:** 5
- **Parametri misurati:** modulo e fase dell'impedenza

I dati acquisiti vengono salvati in formato .mat e successivamente elaborati tramite MATLAB per visualizzarli graficamente, consentendo un'analisi dettagliata delle risposte dell'impedenza nel corso del tempo o in diverse condizioni di test.

2.4.1 Elettrodi

Per l'impedenziometro E4990A, sono stati utilizzati elettrodi cilindrici su PCB (Printed Circuit Board). Questi elettrodi, generalmente realizzati in rame e poi placcati con oro per garantire biocompatibilità e non tossicità per le cellule in contatto, offrono una misura più accurata grazie alla loro forma e configurazione. La PCB cilindrica mostrata in figura 2.19, con un diametro interno di 10 mm, è stata progettata per adattarsi perfettamente alle dimensioni dello scaffold, garantendo un inserimento preciso.

Sulla PCB sono stati integrati quattro elettrodi d'oro, disposti in modo da coprire uniformemente la circonferenza dello scaffold (figura 2.18, massimizzando la regione di contatto e quindi l'accuratezza della misurazione. Per migliorare ulteriormente la capacità di monitoraggio su diverse aree dello scaffold, due elettrodi sono stati saldati in configurazione verticale. Questa struttura verticale assicura una copertura estesa e simultanea di più zone, migliorando l'efficacia del monitoraggio e la raccolta dei dati.



Figura 2.18: PCB circolare con quattro elettrodi d'oro.



Figura 2.19: Top view della PCB circolare con quattro elettrodi d'oro.

Capitolo 3

Metodi e Test

Lo studio si suddivide in quattro fasi principali, ognuna delle quali rappresenta una fase critica del progetto, attraverso le quali si è cercato di ottimizzare le tecniche di misurazione e di implementare un sistema automatizzato per raccogliere dati in modo continuo. Di seguito viene fornita una panoramica dettagliata delle diverse fasi di questo studio.

3.1 Verifica Preliminare delle Misurazioni

La prima fase dello studio ha avuto come obiettivo la verifica preliminare delle misurazioni utilizzando componenti elettrici di base. È stato iniziato con la misurazione di un semplice circuito RC parallelo, composto da una resistenza di $330\ \Omega$ e un condensatore da $2.2\ \mu\text{F}$ (figura 3.1). Questo primo passo era fondamentale per garantire l'accuratezza delle misurazioni e per acquisire familiarità con l'impedenziometro Keysight E4990A. Tali test preliminari si sono rivelati essenziali per stabilire un protocollo di misura preciso e per identificare eventuali errori sistematici.

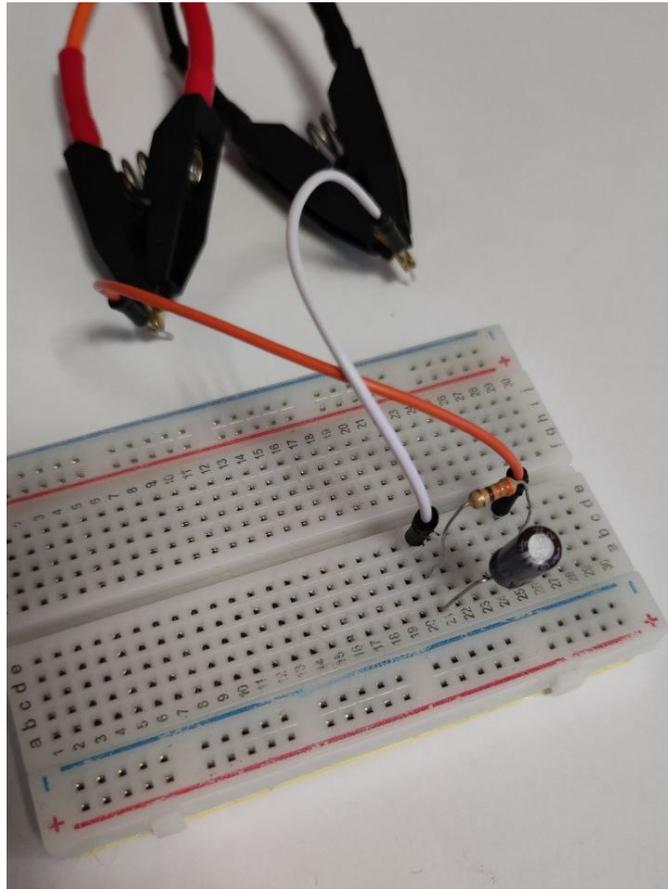


Figura 3.1: Set-up di misura del circuito RC.

Successivamente, l'attenzione si è concentrata sull'utilizzo di elettrodi a piastre con dimensioni di 6x14x1,5 mm. Per questa fase, sono state progettate diverse tipologie di stampi utilizzando il software Solidworks. Questi stampi permettono di posizionare gli elettrodi in varie configurazioni, sia più vicini che più distanti tra loro, con l'obiettivo di ottenere la posizione più precisa possibile, nonostante la conformazione dell'elettrodo non permetta una misura accurata a causa della struttura circolare dello scaffold.

Il progetto degli stampi si suddivide in due parti: superiore (figura 3.5) e inferiore (figure 3.2-3.4). Entrambe le parti sono state progettate con misure specifiche per ottenere holder di altezza pari a 15 mm, diametro interno di 10 mm e diametro esterno di 24 mm.

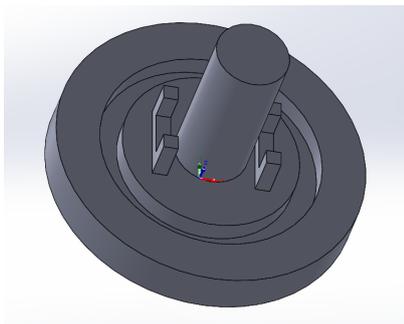


Figura 3.2: CAD 1 parte inferiore del mold per gli elettrodi a piastre.

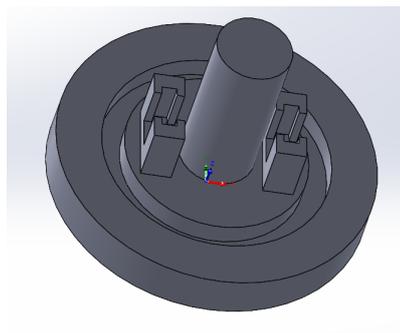


Figura 3.3: CAD 2 parte inferiore del mold per gli elettrodi a piastre.

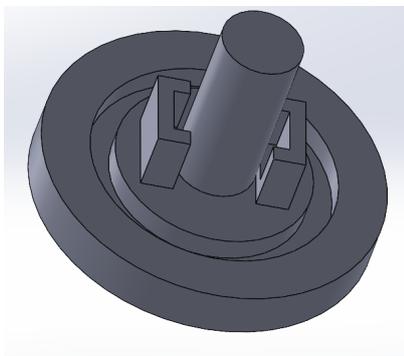


Figura 3.4: CAD 3 parte inferiore del mold per gli elettrodi a piastre.

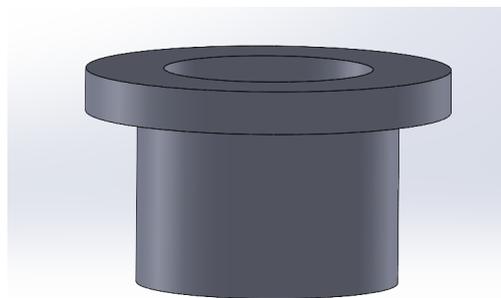


Figura 3.5: CAD parte superiore del mold.

Una volta completata la progettazione degli stampi, questi sono stati realizzati utilizzando una stampante Raise3D Pro3, con PLA come materiale di stampa. Le impostazioni di stampa utilizzate sono state: temperatura dell'estrusore pari a 217°C e temperatura del tappeto pari a 60°C.

Durante la preparazione dello slicing, sono stati impostati anche i seguenti parametri:

- **Layer:**
 - Altezza layer: 0,2000 mm
 - Pareti: 3,0
- **Riempimento:**
 - Densità di riempimento: 20
 - Tipo di riempimento: Gyroid
- **Supporto:**
 - Genere di supporto: nessuno
- **Piattaforme:**
 - Piattaforme: solo brim

Le prime stampe sono state realizzate con una densità di riempimento del 20% per accelerare il processo di stampa e ridurre lo spreco di materiale. Tuttavia, questa scelta ha portato alla rottura dello stampo durante la fase di rimozione dell'holder, com'è possibile vedere in figura 3.6. Invece, l'uso della piattaforma brim ha migliorato l'adesione del pezzo alla piattaforma di stampa.



Figura 3.6: Mold rotto a causa della bassa densità di riempimento.



Figura 3.7: Mold completo con gli elettrodi a piastre inseriti.

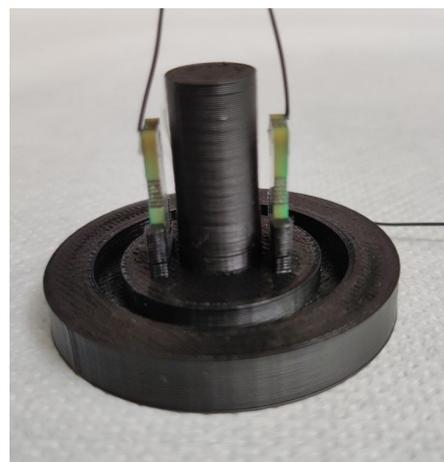


Figura 3.8: Visione laterale della parte inferiore del mold per vedere come vengono bloccati gli elettrodi.

Dopo la stampa dei mold e il preciso posizionamento degli elettrodi, mostrato in figura 3.7 e in figura 3.8, è stata utilizzata la tecnica della soft lithography per creare gli holder in PDMS (polidimetilsilossano, Sylgard 184, Dow Corning) (figura 3.9) . Questa tecnica prevede la miscelazione del pre-polimero e dell'agente polimerizzante, la colata del PDMS non polimerizzato in uno stampo personalizzato e la polimerizzazione in forno a 50°C per 3,5 ore, come mostrato in figura 3.10.



Figura 3.9: PDMS colato all'interno del mold.



Figura 3.10: Mold completo con gli elettrodi a piastre in forno.

Una prima colata di PDMS è stata effettuata all'interno dello stampo per inglobare gli elettrodi. Una volta asciugato, l'holder è stato separato dalla parte inferiore dello stampo. Come si può vedere in figura 3.11 è necessaria una seconda colata per completare l'holder.

Il risultato finale è mostrato in figura 3.12 e 3.13



Figura 3.11: Risultato dopo la prima colata di PDMS.

L'uso del PDMS è giustificato dalle sue proprietà specifiche:

- **Elasticità:** Il PDMS è molto flessibile e può essere inserito a pressione all'interno del bioreattore senza rompersi.
- **Trasparenza:** La trasparenza del PDMS consente di osservare il corretto posizionamento degli elettrodi e dello scaffold all'interno.
- **Biocompatibilità:** La biocompatibilità del PDMS lo rende adatto per applicazioni a contatto con tessuti biologici.
- **Idrofobicità:** La natura idrofobica del PDMS evita che trattenga l'acqua con cui viene a contatto.

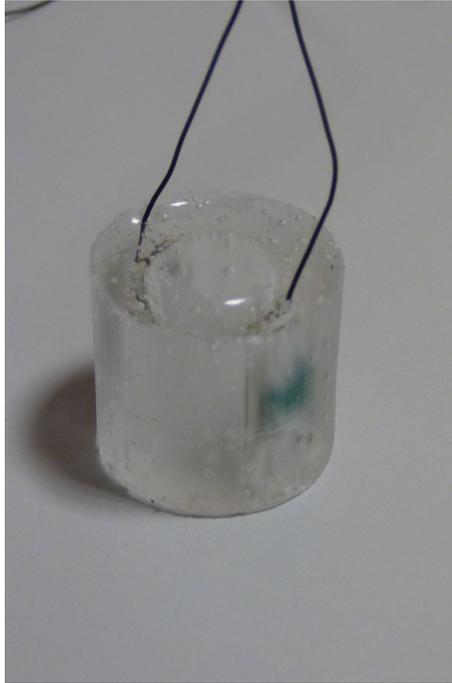


Figura 3.12: Visione laterale dell'holder con gli elettrodi a piastre



Figura 3.13: Visione dall'alto dell'holder con gli elettrodi a piastre.

Una volta completati gli holder, si è proceduto alle misurazioni, inserendoli in diverse soluzioni: acqua distillata, acqua di rubinetto e acqua salata, così da misurare le diverse conducibilità. Durante il confronto delle misurazioni in queste tre condizioni, è stato subito evidente un elevato valore di impedenza.

In un passaggio successivo, sono state ripetute le misurazioni utilizzando un holder privo di elettrodi a piastre, ma impiegando elettrodi ad ago inseriti manualmente come mostrato in figura 3.14 e 3.15. Quando gli elettrodi ad ago erano inseriti all'interno dell'holder, i valori misurati erano comparabili a quelli ottenuti con gli elettrodi a piastre.

Tuttavia, se gli aghi penetravano l'holder, entrando direttamente in contatto con la soluzione all'interno, si osservava una diminuzione sostanziale dell'impedenza. Questo ha portato alla conclusione che lo strato di PDMS tra l'elettrodo e la soluzione funge da isolante.

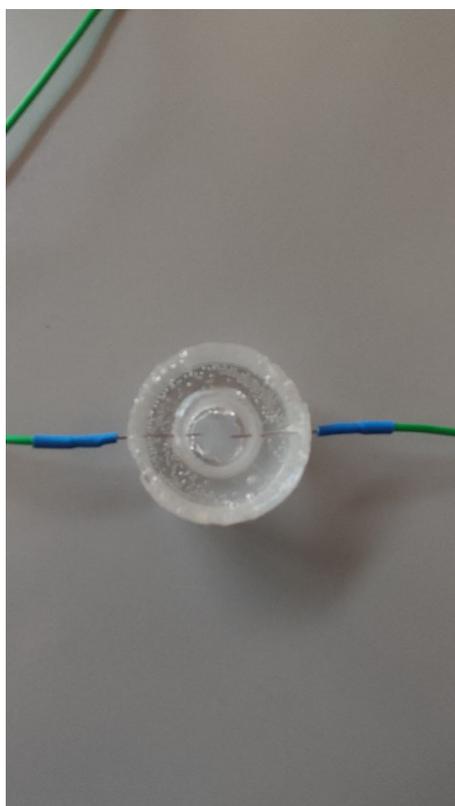


Figura 3.14: Posizionamento degli elettrodi ago all'interno dell'holder.

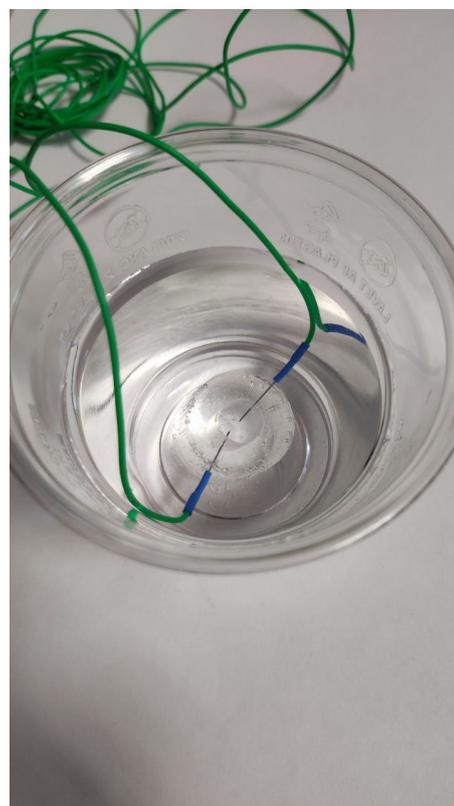


Figura 3.15: Setup di misura con gli elettrodi ad ago.

Questa prima analisi ha consentito di migliorare ulteriormente il protocollo di misura e di apportare modifiche mirate per ottimizzare l'accuratezza delle misurazioni. In particolare, sono state considerate modifiche strutturali agli elettrodi e l'utilizzo di materiali alternativi per ridurre l'isolamento indotto dal PDMS.

3.2 Utilizzo di Elettrodi d'Oro su PCB Circolare

Nella seconda fase della ricerca, si è proceduto all'introduzione di elettrodi d'oro su PCB circolare con diametro interno pari a 10 mm, diametro esterno pari a 18 mm e con uno spessore di 1,63 mm, con l'obiettivo di migliorare la precisione delle misurazioni. Questa configurazione degli elettrodi è stata scelta strategicamente per massimizzare la regione di misura e per adattarsi in modo ottimale alla forma circolare dello scaffold. Gli elettrodi d'oro, noti per le loro proprietà di alta conducibilità e resistenza alla corrosione, hanno permesso di ottenere misurazioni più affidabili e consistenti. Inoltre, l'oro è biocompatibile e presenta una bassa tossicità, rendendolo un materiale sicuro per l'utilizzo a contatto con cellule umane.

La procedura di design degli stampi (figura 3.16, della stampa e dell'utilizzo della soft lithography (figura 3.17 è stata mantenuta invariata rispetto alla fase precedente. Sono stati progettati e stampati stampi in PLA utilizzando ancora la stampante Raise3D Pro3, seguendo i medesimi parametri di stampa precedentemente descritti.



Figura 3.16: Mold per la costruzione dell'holder con elettrodi circolari.

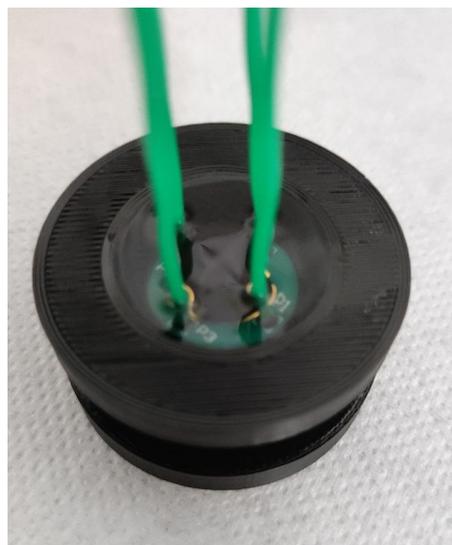


Figura 3.17: Colata di PDMS nell'holder.

In questo caso si sono ottenuti degli holder come in figura 3.18 e 3.19.

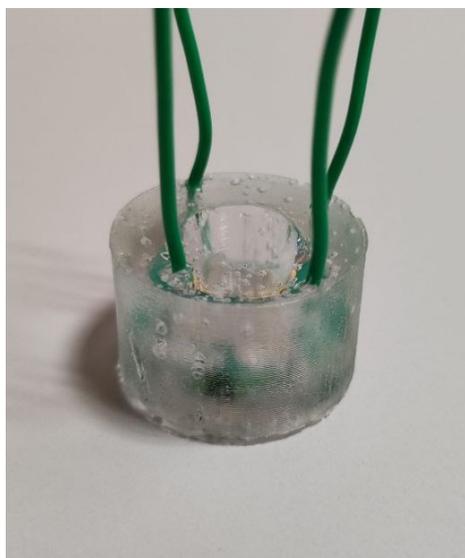


Figura 3.18: Visione laterale dell'holder con gli elettrodi circolari.

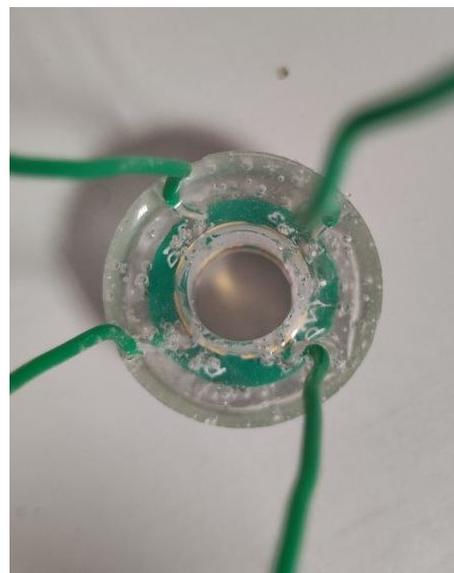


Figura 3.19: Visione dall'alto dell'holder con gli elettrodi circolari.

L'introduzione degli elettrodi d'oro su PCB circolare ha comportato la ripetizione delle misurazioni nelle stesse condizioni utilizzate con gli elettrodi a piastra. In particolare, le misurazioni sono state effettuate in tre diverse soluzioni: acqua distillata, acqua di rubinetto e acqua salata. L'adozione degli elettrodi d'oro ha permesso di ottenere risultati più soddisfacenti, potendo rimuovere il PDMS tra gli elettrodi e l'oggetto di misura, confermando l'efficacia di questa configurazione nel migliorare la precisione delle misurazioni.

La PCB con quattro elettrodi ha permesso di sperimentare diverse configurazioni di misurazione. Le configurazioni testate includevano l'uso di due elettrodi adiacenti, due elettrodi posizionati di fronte l'uno all'altro e l'accoppiamento di due elettrodi alla volta. Ogni configurazione è stata valutata per determinare quale offriva la maggiore accuratezza e affidabilità nelle misurazioni della conducibilità delle soluzioni.

L'utilizzo di elettrodi d'oro su PCB circolare ha quindi rappresentato un significativo avanzamento nella metodologia di misurazione. La scelta di questo materiale e della configurazione circolare degli elettrodi si è rivelata vincente, migliorando non solo la precisione delle misurazioni ma anche la loro affidabilità nel tempo. La biocompatibilità e la bassa tossicità dell'oro hanno ulteriormente garantito la sicurezza delle misurazioni a contatto con cellule umane, rendendo questa soluzione particolarmente adatta per applicazioni biomediche.

Questa fase dello studio ha fornito importanti indicazioni per lo sviluppo futuro di sistemi di misurazione avanzati, sottolineando l'importanza della scelta dei materiali e della configurazione degli elettrodi.

3.3 Automazione delle Misurazioni

Dopo aver ottimizzato la configurazione degli elettrodi, il progetto ha proceduto verso l'automazione del processo di misurazione. Questo avanzamento mirava a raccogliere dati per periodi prolungati, consentendo un monitoraggio continuo delle variazioni di impedenza nel tempo. L'automazione ha permesso di ridurre l'intervento manuale e di aumentare l'efficienza delle misurazioni.

Il codice utilizzato per l'automazione è uno script di acquisizione per l'analizzatore di impedenza Keysight E4990A, scritto in Python. L'obiettivo principale dello script è configurare l'analizzatore, eseguire misure di sweep in frequenza delle impedenze e salvare i dati in un file `.mat` per ulteriori analisi.

3.3.1 Principi di Funzionamento del Codice

1. **Lettura della Configurazione:** Lo script legge una configurazione da un file `.ini`, che specifica i parametri necessari per l'acquisizione, tra cui:
 - start frequency: 20 Hz
 - stop frequency: 20 kHz
 - number of points: 1601
 - measurement speed: 5
 - number of sweep averages: 1
 - number of point averages: 1
 - oscillator voltage: 0.5 V
 - bias voltage: 0 V
 - number of intervals: 1
 - interval period: 0
2. **Connessione allo Strumento:** Utilizzando la libreria `pyvisa`, lo script comunica con l'analizzatore di impedenza tramite USB.
3. **Esecuzione della Misura:** Una volta configurati i parametri di sweep, lo script esegue le misure di impedenza e raccoglie i dati.

4. **Salvataggio dei Dati:** I dati acquisiti vengono salvati in un file `.mat` utilizzando la libreria `scipy.io`. Questo file contiene informazioni sull'impedenza misurata, la frequenza, la tensione di polarizzazione e altre informazioni di configurazione, mostrate in figura 3.20.

Name	Value
time	137x26 char
shortCmpStatus	0
phi_Z	1601x137 double
oscillatorVoltage	0.5000
openCmpStatus	0
numberOfSweepAverages	1
numberOfPointAverages	1
mod_Z	1601x137 double
measurementSpeed	5
idn	'Keysight Technologies,E4990A,MY54404121,A.04.00'
Frequency	1601x1 double
fixture	'FIXT16089'
biasVoltageMeasurement	[]
biasVoltage	0
biasCurrentMeasurement	[]
acqProgramVersion	'2.6'

Figura 3.20: File `.mat` contenente le informazioni sull'impedenza misurata.

La precisione di misura è stata impostata al valore massimo, pari a 5, il che corrisponde a una velocità di misura minore. Il tempo di acquisizione è risultato pari a 322241 ms (circa 5.37 minuti). Il tempo di riposo, impostato tramite il comando `time.sleep`, è stato scelto in modo da avere una misura ogni 10 minuti, quindi 277759 ms (circa 4.63 minuti).

Le prime misure automatizzate sono state effettuate su un circuito RC parallelo (con valore della resistenza pari a $330\ \Omega$ e valore della capacità pari a $2.2\ \mu\text{F}$), per verificare il corretto funzionamento del codice di acquisizione. Successivamente, utilizzando scaffold stampati in PVA (polivinil alcol), è stato valutato se il sistema fosse in grado di percepire variazioni di impedenza. Il PVA è un materiale solubile in acqua, il che lo rende ideale per questi test.

3.3.2 Procedure di Misurazione

Inizialmente, le misure sono state effettuate immergendo l'holder in un bicchiere d'acqua distillata per 24 ore (figura 3.21, per acquisire un valore di riferimento.

Successivamente, utilizzando un altro bicchiere d'acqua distillata, in quanto la precedente misura poteva aver contaminato l'acqua, è stata eseguita una seconda misura della durata di 24 ore, inserendo nell'holder anche lo scaffold in PVA. Si è osservato che il materiale, una volta disciolto, tendeva a concentrarsi nelle vicinanze dell'elettrodo, portando alla decisione di utilizzare un recipiente più capiente contenente 3 litri d'acqua di rubinetto, una soluzione più conduttiva.

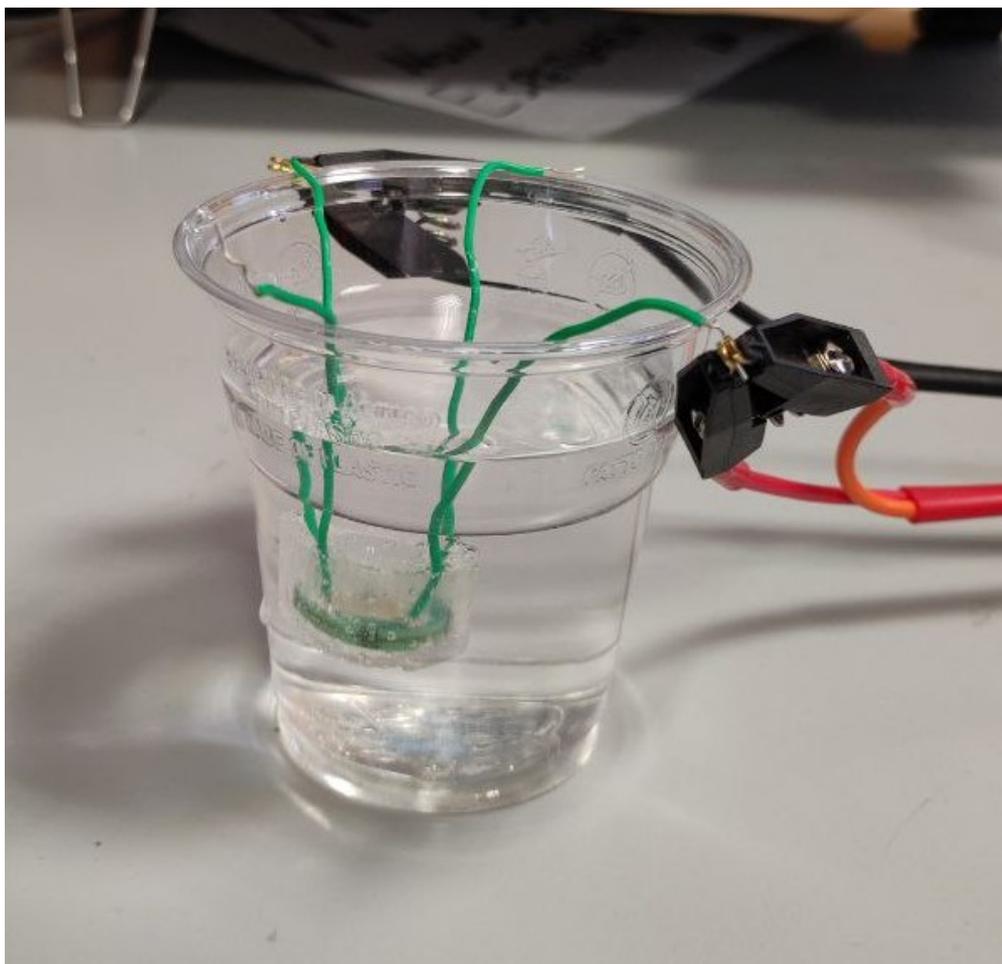


Figura 3.21: Setup per le misurazioni con acqua distillata.

Le nuove misurazioni sono state effettuate sia in condizioni statiche (figura 3.22) che dinamiche (figura 3.23). Per le condizioni dinamiche, è stato utilizzato uno stirrer magnetico per indurre un movimento all'interno del recipiente. Inoltre, è stata inserita una termocoppia nel recipiente per valutare se il valore di impedenza misurato fosse influenzato anche dalla temperatura.

Per entrambe le configurazioni, statica e dinamica, sono state inizialmente effettuate

misurazioni di riferimento della durata di 48 ore, inserendo nel recipiente l'holder senza lo scaffold ma con la termocoppia. L'acqua inizialmente fredda ha permesso di osservare un maggiore cambiamento della temperatura nelle prime 24 ore, mentre nelle ultime 24 ore la temperatura era pressoché costante.

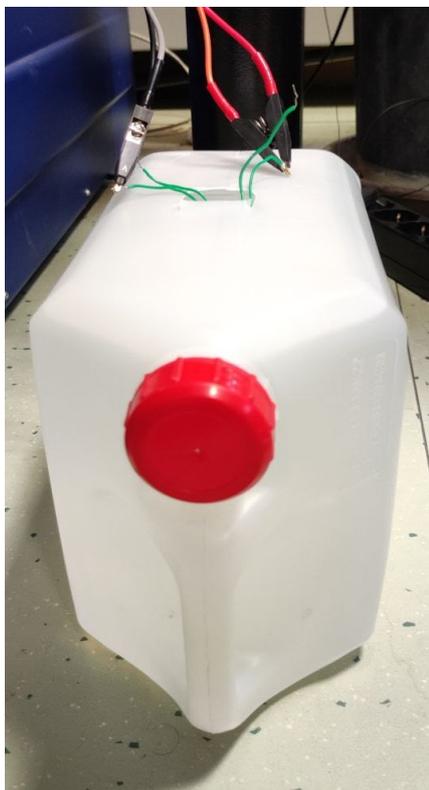


Figura 3.22: Setup per le misurazioni con acqua di rubinetto in condizioni statiche.



Figura 3.23: Setup per le misurazioni con acqua di rubinetto in condizioni statiche.

Successivamente, le misure sono state ripetute per 24 ore inserendo nell'holder anche lo scaffold in PVA. Sono stati utilizzati scaffold con diverse porosità, quindi con diverse quantità di materiale, per valutare l'influenza della quantità di PVA disciolto sulla precisione delle misure. Si è osservato che scaffold con una maggiore quantità di materiale si scioglievano meno rispetto a quelli con una minore quantità. Dall'analisi delle immagini, è emerso che lo scaffold in PVA iniziava a sciogliersi dal centro, diffondendosi gradualmente nell'acqua. I dati raccolti sono stati salvati in file .mat e successivamente elaborati tramite software Matlab per l'analisi grafica. Questa automazione ha permesso di ottenere una maggiore quantità di dati, riducendo al minimo l'intervento manuale e aumentando l'efficienza del processo di misurazione. Le misurazioni automatizzate hanno dimostrato la capacità del

sistema di rilevare variazioni significative di impedenza, confermando l'efficacia della configurazione degli elettrodi e dell'holder in PDMS. Inoltre, l'utilizzo di condizioni statiche e dinamiche ha permesso di esplorare diverse situazioni sperimentali, aumentando la robustezza dei risultati ottenuti.

3.4 Utilizzo del Circuito di Perfusione

Nell'ultima fase delle misurazioni, è stato impiegato un circuito che comprendesse l'utilizzo di un bioreattore leggermente modificato e di una pompa peristaltica per simulare condizioni che si avvicinassero il più possibile a quelle reali. Questa configurazione ha permesso di osservare il comportamento del fluido in un flusso costante, con una portata impostata dalla pompa peristaltica pari a 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$. In particolare, nel bioreattore sono stati creati dei fori all'interno per permettere la fuoriuscita dei fili saldati sugli elettrodi. I fili utilizzati avevano un diametro di 0.25 mm, quindi i fori sono stati realizzati con uno spessore di 1 mm. Successivamente, questi fori sono stati sigillati con PDMS per prevenire perdite dal bioreattore, garantendo così l'integrità del sistema durante le misurazioni.

3.4.1 Procedure di Misurazione

Prima di procedere con le misurazioni sugli scaffold, è stata effettuata una misura di riferimento della durata di 24 ore. Durante questa fase, l'holder non conteneva alcuno scaffold, consentendo di misurare l'impedenza dell'acqua in movimento all'interno del sistema. Questa misura di riferimento è stata fondamentale per stabilire un baseline rispetto al quale confrontare le misurazioni successive.

Successivamente, sono state condotte due misurazioni separate della durata di 48 ore ciascuna, utilizzando due differenti tipologie di scaffold:

1. **Scaffold in PLA:** Nella prima misura di 48 ore, è stato inserito nell'holder uno scaffold in PLA. Questa misura ha permesso di osservare il comportamento dell'impedenza in presenza di uno scaffold che, pur non dissolvendosi rapidamente come il PVA, poteva comunque influenzare le proprietà del fluido circostante attraverso la sua struttura fisica e le interazioni superficiali.
2. **Scaffold in PVA:** Nella seconda misura di 48 ore, è stato utilizzato uno scaffold in PVA. Durante questa misura, l'impedenza è stata monitorata attentamente per rilevare eventuali cambiamenti dovuti alla dissoluzione dello scaffold, che avrebbero modificato la conducibilità del fluido circostante.

Le misurazioni ottenute con entrambe le tipologie di scaffold hanno fornito dati preziosi per comprendere come la presenza di materiali differenti influenzi

l'impedenza del sistema. In particolare, l'utilizzo del circuito di perfusione ha permesso di osservare le variazioni di impedenza in un ambiente dinamico e più rappresentativo delle condizioni reali rispetto a un fluido statico.

L'impedenza dell'acqua in movimento, misurata durante la fase di riferimento, ha fornito un punto di confronto cruciale per valutare l'effetto degli scaffold. Le misurazioni successive hanno mostrato come la presenza del PLA, con la sua struttura stabile ma influente, e del PVA, con la sua capacità di dissolversi, abbiano alterato le proprietà del fluido in modi distinti.

3.5 Applicazioni Future

Al termine del presente lavoro di tesi, emerge la necessità di integrare l'elettronica necessaria per la misura della variazione di impedenza all'interno del bioreattore. Tale integrazione deve mantenere il bioreattore chiuso ermeticamente, senza possibilità di applicare fori come fatto nel bioreattore modificato. Inoltre, è fondamentale esplorare il comportamento delle cellule mesenchimali durante la differenziazione, valutando a quale frequenza esse rispondano nel migliore dei modi per ottenere una valutazione più precisa.

La misurazione dell'impedenza delle cellule ossee richiede la scelta di una frequenza adeguata che possa penetrare il tessuto e fornire informazioni accurate senza danneggiarlo. La frequenza ottimale dipende dal tipo di informazione che si vuole ottenere e dalle caratteristiche specifiche del tessuto osseo. In generale, per la misurazione dell'impedenza dei tessuti biologici, le frequenze comprese tra 1 kHz e 1 MHz sono comunemente utilizzate. Tuttavia, per le cellule ossee in particolare, si possono considerare le seguenti frequenze e motivazioni:

1. **Basse frequenze (1 kHz - 10 kHz):** Queste frequenze sono utili per misurare la resistenza dei tessuti, poiché le correnti a basse frequenze tendono a passare attraverso i fluidi extracellulari.
2. **Frequenze intermedie (10 kHz - 100 kHz):** A queste frequenze, la corrente può penetrare più profondamente nelle strutture cellulari, fornendo informazioni sull'integrità delle membrane cellulari e sulla composizione intracellulare ed extracellulare.
3. **Alte frequenze (100 kHz - 1 MHz):** Queste frequenze possono attraversare più facilmente le membrane cellulari e sono utili per analizzare le proprietà dielettriche delle cellule ossee, come la polarizzazione e la capacità.

Per ottenere una valutazione complessiva dell'impedenza delle cellule ossee, una frequenza compresa tra 10 kHz e 100 kHz potrebbe essere ottimale. In particolare,

50 kHz è spesso utilizzata negli studi di bioimpedenza poiché offre un buon equilibrio tra penetrazione nel tessuto e risoluzione delle proprietà cellulari. Tuttavia, poiché le caratteristiche specifiche del tessuto osseo possono variare, può essere utile effettuare misurazioni a più frequenze, per ottenere un quadro completo delle proprietà elettriche del tessuto.

Per l'integrazione dell'elettronica, è stata scelta la scheda di valutazione EVAL-ADuCM355QSPZ della Analog Devices mostrata in figura 3.24. Questo chip è dotato di:

- Convertitore analogico-digitale (ADC) a 16 bit
- Convertitore digitale-analogico (DAC) ad alta velocità
- Periferiche di comunicazione, come l'interfaccia periferica seriale (SPI) e il ricevitore/trasmittitore asincrono universale (UART).

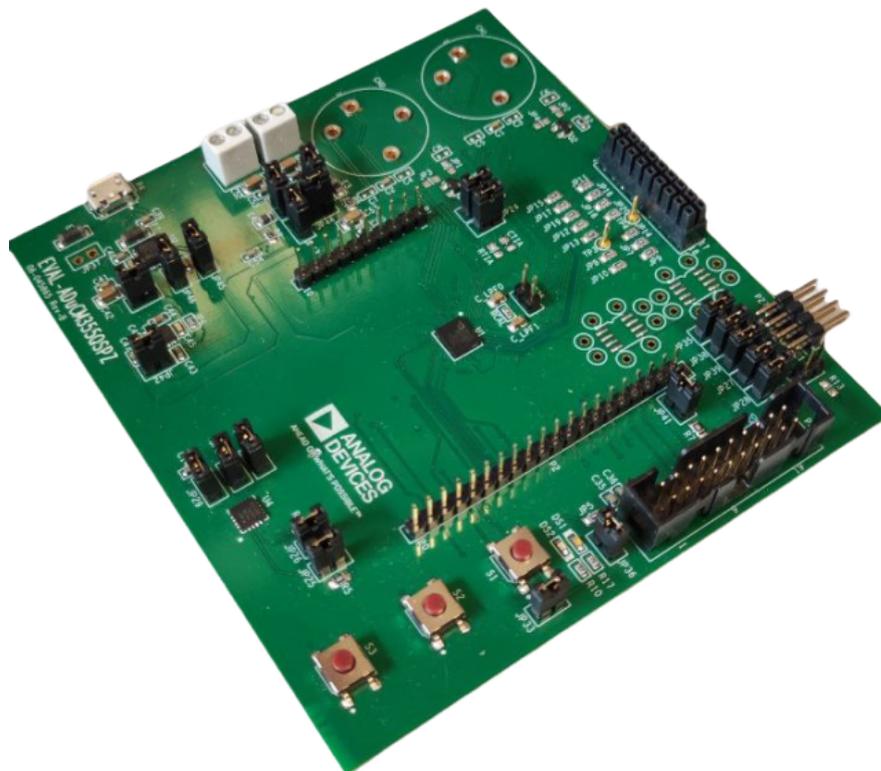


Figura 3.24: scheda di valutazione EVAL-ADuCM355QSPZ

L'ADC opera con una velocità di conversione di 800 kHz o 1,6 MHz e un intervallo di ingresso compreso tra -0,9 V e 0,9 V. Inoltre, include ingressi in corrente tramite amplificatori a transimpedenza (TIA) con resistenza di carico programmabile. Il DAC ad alta velocità è progettato per le misure di impedenza e consente di emettere segnali con frequenze fino a 200 kHz.

L'ADuCM355 include un sottosistema digitale con diverse funzioni di post-elaborazione dei risultati dell'ADC, come i filtri passa-basso e notch, la media e le statistiche programmabili dell'ADC e la trasformata discreta di Fourier (DFT). Tra i filtri passa-basso, il Sinc3 è quello che il produttore raccomanda vivamente di utilizzare. Si tratta di un filtro digitale con un numero programmabile di campioni (2, 4 o 5 campioni) per applicare il filtro. La DFT è utilizzata per la misura dell'impedenza e può essere implementata utilizzando da 4 a 16384 campioni.

Una delle caratteristiche principali dell'ADuCM355 è che include un sistema progettato specificamente per la misurazione dell'impedenza. Questo sistema è programmato in C, utilizzando l'ambiente di sviluppo integrato (IDE) raccomandato dal produttore, IAR® Embedded Workbench for Arm, che supporta il processore dell'ADuCM55 (Arm® Cortex™-M3).

3.5.1 Sistema di Misura dell'Impedenza

A differenza di molti dispositivi di misurazione dell'impedenza, l'ADuCM355 impone una tensione fissa e misura la corrente corrispondente.

Il sistema è suddiviso in quattro macroblocchi:

1. **Generazione di forme d'onda:** Questo macroblocco è costituito da un generatore di forme d'onda (WG), un DAC ad alta velocità a 12 bit, un blocco di filtri passa-basso (LPF) e un amplificatore di guadagno programmabile (PGA) con un guadagno massimo di due. Il WG genera un'onda sinusoidale digitale con un'ampiezza massima di 600 mV picco-picco e una frequenza fino a 200 kHz. L'onda viene poi convertita in analogica nel DAC. Il segnale viene fatto passare attraverso l'LPF per rimuovere il rumore ad alta frequenza e poi viene amplificato con il PGA, raggiungendo tensioni fino a 1,2 V picco-picco. Il segnale generato ha come uscita di questo macroblocco i pin PDAC e NDAC.
2. **Iniezione di tensione:** La soluzione tampone dell'amplificatore di eccitazione (EAB), così come una serie di interruttori e impedenze Z da misurare, compongono questo macroblocco. I diversi carichi Z possono essere collegati e misurati individualmente attivando gli interruttori corrispondenti. Anche la scheda di valutazione include una resistenza da 200 Ω , collegata agli interruttori denominati RCAL. L'EAB dispone di quattro ingressi: PDAC, NDAC,

P e N. PDAC e NDAC sono le uscite del macroblocco di generazione delle onde. P e N sono i pin a cui viene collegato il carico Z. Questo amplificatore deve garantire che l'ampiezza differenziale degli ingressi PDAC-NDAC sia la stessa di quella di P-N. Ciò significa che la caduta di tensione in Z deve essere uguale a quella generata nel macroblocco precedente. L'EAB ha un'uscita che inietta la corrente corrispondente in Z per garantire ciò. L'uscita di questo blocco è la corrente che passa in Z.

3. **Misura della corrente:** Il macroblocco è conformato per il TIA ad alta velocità, un multiplexer e un ADC. Il TIA converte la corrente in una tensione, la cui ampiezza dipende dall'entità della resistenza R_{TIA} , che può essere modificata internamente o esternamente. Il multiplexer ha solo la funzione di selezionare il TIA come ingresso dell'ADC. L'ADC a 16 bit converte il segnale in digitale, che è l'uscita di questo blocco.
4. **Elaborazione del segnale:** Questo macroblocco ha due componenti: il blocco di post-elaborazione e il blocco di comunicazione. Nel primo sono presenti tutti i filtri che possono essere applicati al segnale, come i filtri notch o passa-basso. Nel secondo sono presenti le periferiche per la trasmissione dei dati tramite UART o SPI.

Anche in questo caso, sono state svolte delle misure su semplici componenti elettronici quali resistenze e un circuito RC parallelo.

Per le misure sulle resistenze (figura 3.25) è stato utilizzato un set di 17 resistenze con valori compresi tra $330\ \Omega$ e $110\ \text{k}\Omega$ (tabella 3.1).

Tabella 3.1: Valore Nominale Resistenze.

Valore Nominale Resistenze (Ω)			
330 Ω	3 k Ω	33 k Ω	91k Ω
510 Ω	5.1 k Ω	43 k Ω	110k Ω
750 Ω	8.2 k Ω	51 k Ω	
1.2 k Ω	15 k Ω	62 k Ω	
2 k Ω	20 k Ω	75 k Ω	

Tramite l'utilizzo del multimetro, è stato calcolato il valore reale della resistenza, così da poterlo confrontare con il valore misurato tramite la scheda.

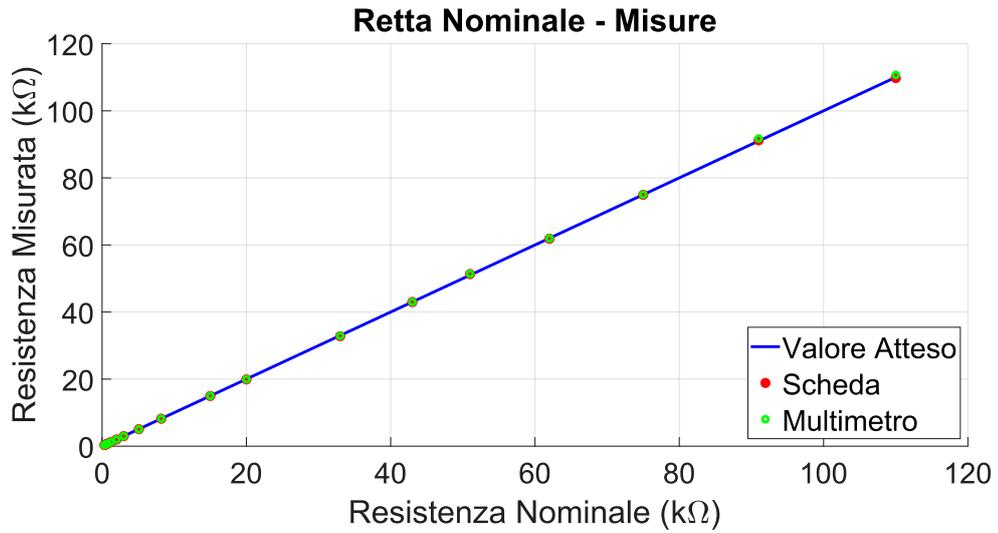


Figura 3.25: Confronto delle misure di resistenza svolte con il multimetro e l'ADuC355.

Riscontrando un errore percentuale trascurabile, minore dell'1% (mostrato in figura 3.26), si è passati a valutare il circuito RC.

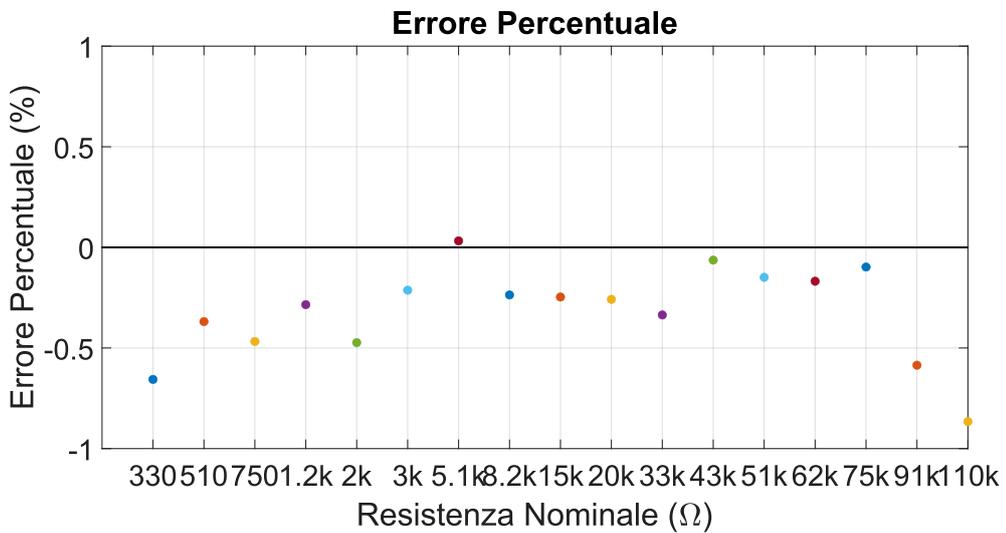


Figura 3.26: Errore percentuale commesso nelle misurazioni utilizzando la scheda ADuC355 rispetto al valore reale delle resistenze.

Per le misure del circuito RC, è stata utilizzata una resistenza pari a $330\ \Omega$ e un condensatore pari a $2.2\ \mu\text{F}$, effettuando misurazioni a diverse frequenze (tabella 3.2).

Tabella 3.2: Valore Frequenze.

Valore Frequenze (Hz)		
50 Hz	2 kHz	20 kHz
100 Hz	2 kHz	30 kHz
250 Hz	5 kHz	40 kHz
500 Hz	7 kHz	50 kHz
1 kHz	10 kHz	60 kHz

In questo caso, è stato utilizzato l'impedenziometro per valutare il valore dell'impedenza del circuito. Da un confronto delle misure, è possibile notare in figura 3.27 come la misura fatta con la scheda dia valori non esatti. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che a basse frequenze (al di sotto di 30/35 kHz) la scheda non funziona correttamente. Tuttavia, una volta superato questo valore di frequenza, il valore di impedenza risulta troppo basso (sotto i 200 ohm), causando la saturazione del dispositivo. Un'idea potrebbe essere quella di utilizzare una resistenza in serie di valore pari almeno a 300 ohm, così da verificare se l'effettivo problema sia la saturazione del dispositivo.

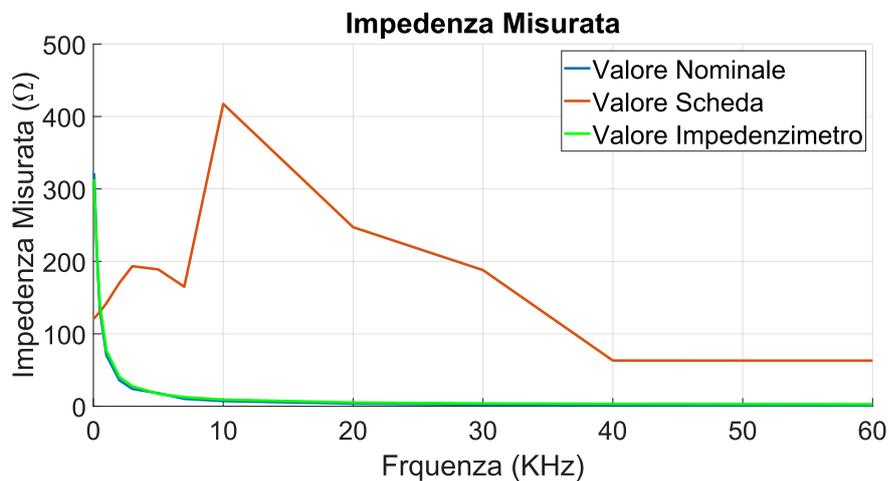


Figura 3.27: Confronto delle misure del circuito RC a diverse frequenze svolte con l'impedenziometro e l'ADuC355.

Capitolo 4

Risultati

In questa sezione, si procederà con l'analisi dei dati ottenuti durante le varie fasi del progetto, confrontando i risultati delle diverse configurazioni degli elettrodi e discutendo l'efficacia dell'automazione nel migliorare la qualità e la quantità dei dati raccolti.

4.1 Prima Fase di Misurazione – Elettrodi a Piastre

Come indicato in precedenza, la prima misura è stata effettuata su un semplice circuito RC parallelo, il cui risultato è mostrato in figura a4.1 per verificare il corretto utilizzo dello strumento di misura.

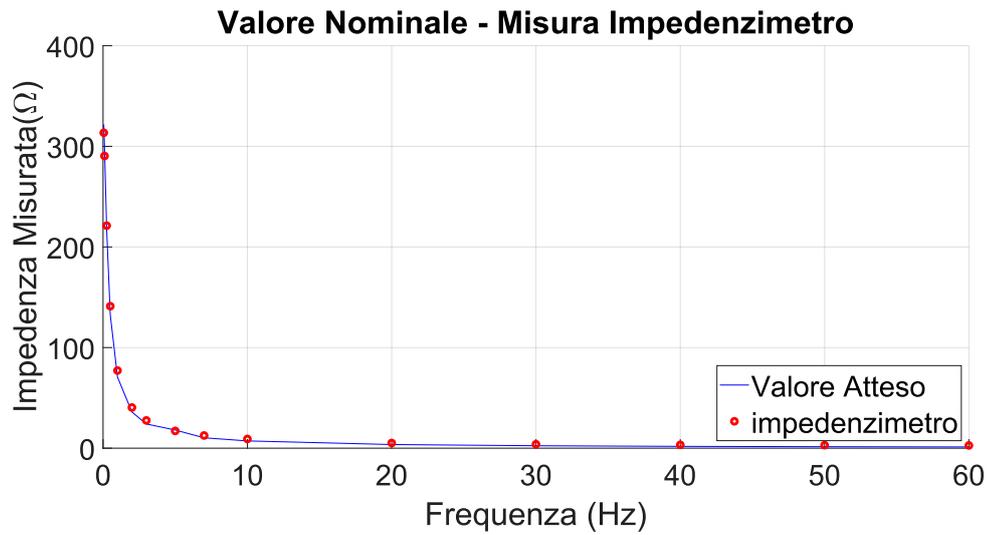


Figura 4.1: Confronto del valore reale del circuito RC rispetto al valore nominale.

La figura 4.2 illustra le misurazioni ottenute tramite l'utilizzo degli elettrodi a piastre inseriti all'interno dell'holder in PDMS. Lo strato di PDMS, essendo un materiale isolante, non consente una misurazione corretta; infatti, il risultato della misura è un elevato valore di impedenza.

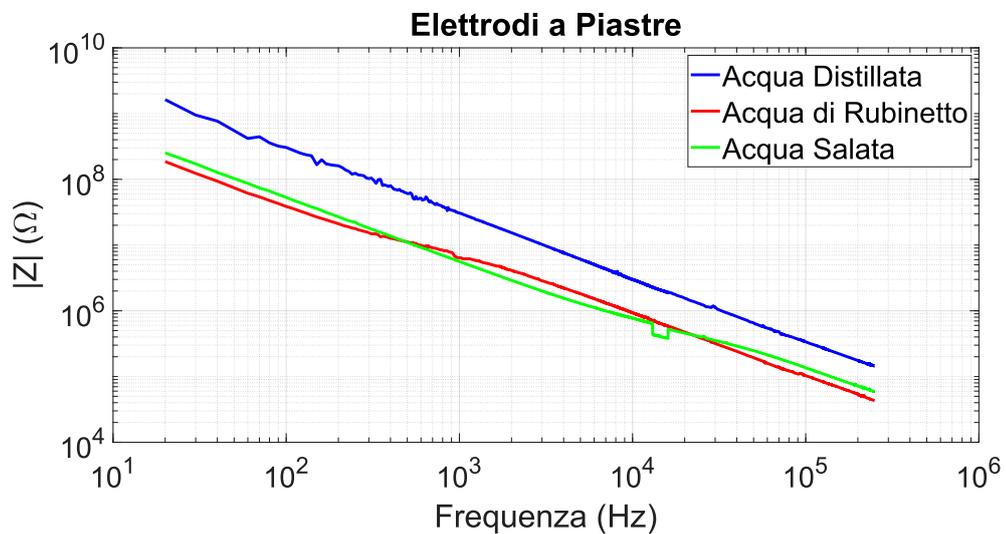


Figura 4.2: Misura dell'impedenza tramite elettrodi a piastre in diverse soluzioni.

A basse frequenze, l'impedenza misurata attraverso un materiale isolante può risultare molto alta. Questo avviene perché, a basse frequenze, il materiale ha

più tempo per reagire alle variazioni del campo elettrico applicato. In sostanza, il materiale si comporta come un isolante molto efficace, causando un'impedenza misurata elevata.

Aumentando la frequenza, il materiale isolante può iniziare a polarizzarsi più rapidamente in risposta ai cambiamenti del campo elettrico, ma frequenze più alte, il materiale potrebbe non essere in grado di seguire le variazioni del campo elettrico con la stessa rapidità, portando a una riduzione dell'impedenza.

A conferma del fatto che l'alto valore di impedenza fosse dovuto al PDMS, sono state effettuate ulteriori valutazioni utilizzando elettrodi ad ago inseriti manualmente all'interno del PDMS e attraversandolo, quindi perforandolo e andando direttamente a contatto con la soluzione di cui si voleva misurare la conducibilità.

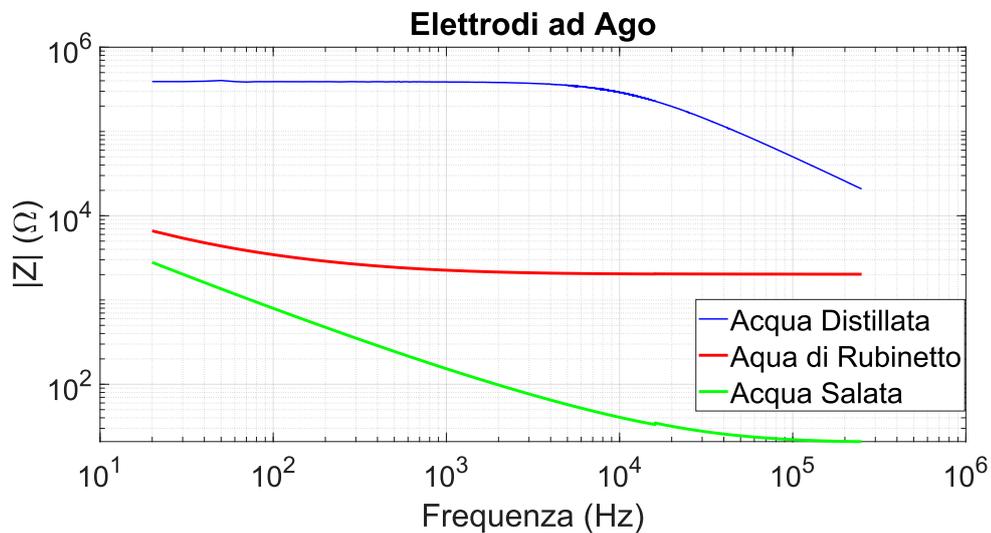


Figura 4.3: Misura tramite elettrodi ad ago inseriti all'interno del PDMS.

Dalle misurazioni in figura 4.3, si può notare come, perforando il PDMS, i valori di impedenza siano significativamente inferiori. Questo conferma che il PDMS isolava l'intera misurazione, impedendo una corretta rilevazione della conducibilità della soluzione.

L'impedenza delle soluzioni acquose varia significativamente in base alla loro composizione ionica e alle proprietà elettriche, comportandosi in modi distinti al variare della frequenza.

Nell'acqua salata, ad esempio, la presenza di numerosi ioni come Na⁺ e Cl⁻ conferisce una elevata conducibilità elettrica. A basse frequenze, la mobilità limitata degli ioni e le interazioni con le molecole d'acqua contribuiscono a una resistenza più alta. Tuttavia, con l'aumento della frequenza, gli ioni riescono a seguire più rapidamente il campo elettrico applicato, riducendo l'effetto resistivo.

Nell'acqua di rubinetto, la concentrazione inferiore di ioni come calcio, magnesio, cloruro e solfato riduce la capacità di condurre corrente rispetto all'acqua salata. Questa minore concentrazione ionica porta a una variazione meno pronunciata dell'impedenza con la frequenza. La combinazione di effetti resistivi e capacitivi, derivanti dalla presenza di diversi tipi di ioni, si bilancia mantenendo l'impedenza più stabile attraverso diverse frequenze.

Contrariamente, l'acqua distillata, priva praticamente di ioni disciolti, mostra un comportamento completamente diverso. La mancanza di ioni mobili implica una resistenza costante ed elevata su una vasta gamma di frequenze.

Dopo i 10 kHz si osserva una diminuzione dell'impedenza misurata. Questo potrebbe essere causato dal fatto che l'elettrodo ad ago non ha completamente perforato l'holder di PDMS, il quale ha un comportamento da filtro passa basso a valori pari a 10 kHz.

4.2 Seconda Fase di Misurazione – Elettrodi Circolari

Nella seconda fase di misurazione, si è passati all'utilizzo di elettrodi circolari placcati in oro, eliminando la necessità di ricoprirli con il PDMS e permettendo il contatto diretto con l'oggetto di cui si desiderava misurare il valore di impedenza, coerenti rispetto a quelli ottenuti tramite le misure con gli elettrodi ad ago riportati nella precedente figura.

I grafici riportati nelle figure 4.4-4.6 mostrano come, per tutte le configurazioni degli elettrodi, si ottengano misurazioni accurate e affidabili.

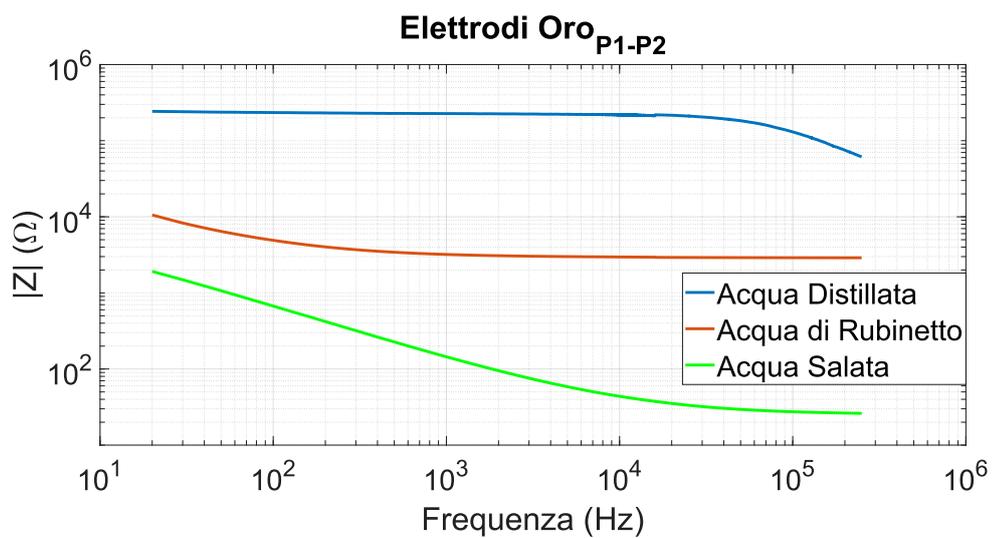


Figura 4.4: Misura dell'impedenza tramite elettrodi circolari affacciati tra loro.

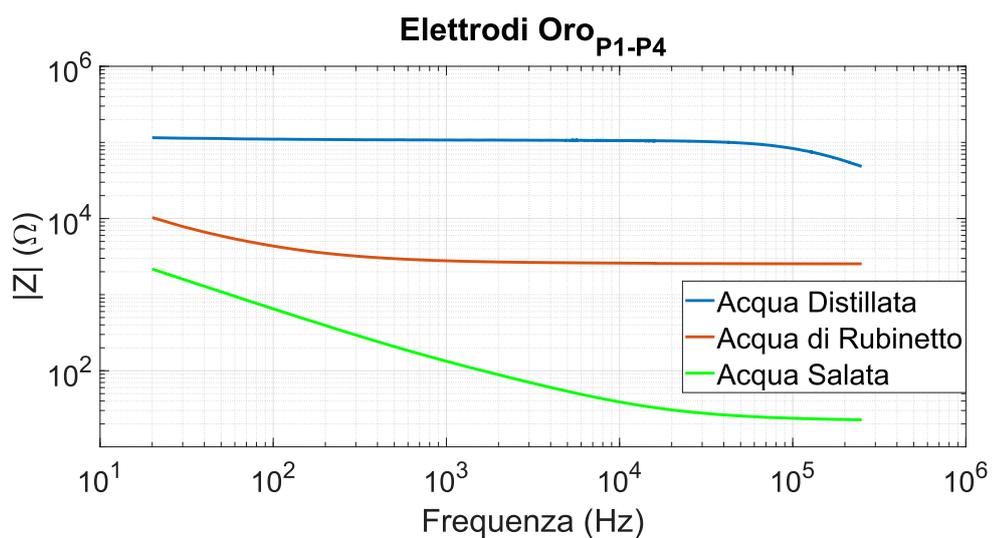


Figura 4.5: Misura dell'impedenza tramite elettrodi circolari vicini tra loro.

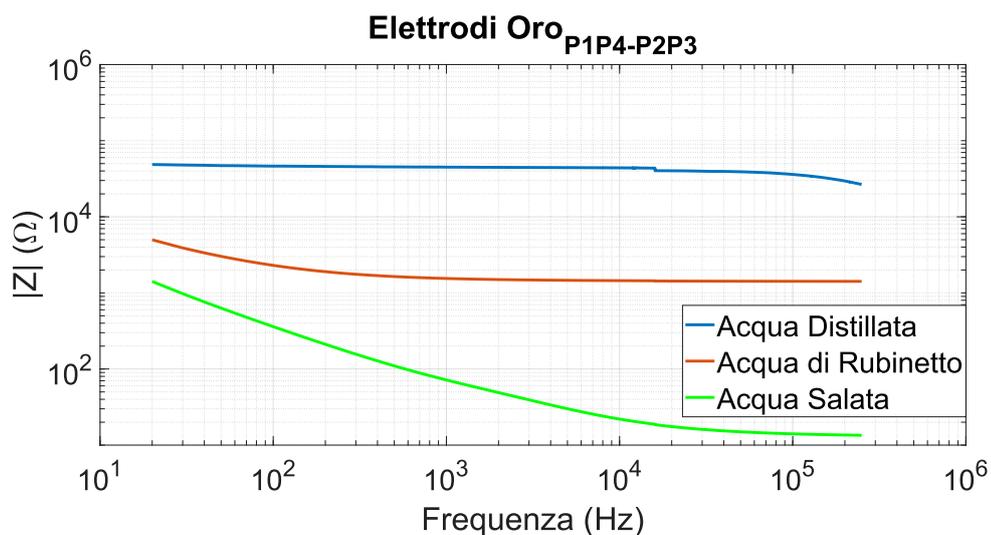


Figura 4.6: Misura dell'impedenza tramite elettrodi circolari accoppiati tra loro.

Nella successiva serie di misure (figure 4.7-4.9), si sono confrontati i risultati ottenuti dalle varie configurazioni degli elettrodi nello stesso liquido, riscontrando valori di impedenza maggiori nella configurazione P1-P2.

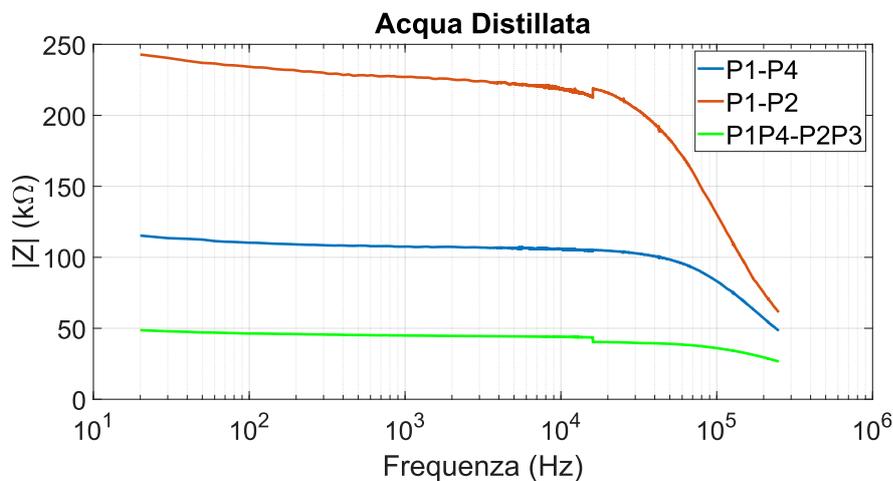


Figura 4.7: Confronto delle misure delle tre diverse configurazioni degli elettrodi in acqua distillata.

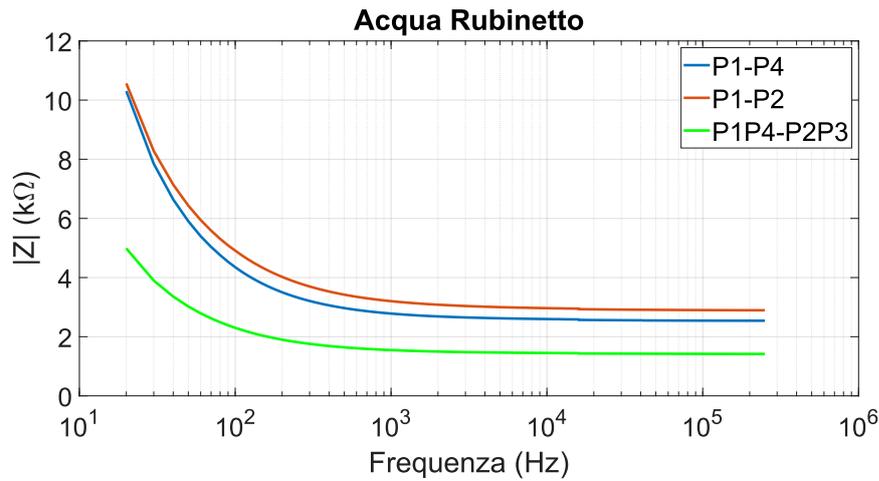


Figura 4.8: Confronto delle misure delle tre diverse configurazione degli elettrodi in acqua di rubinetto.

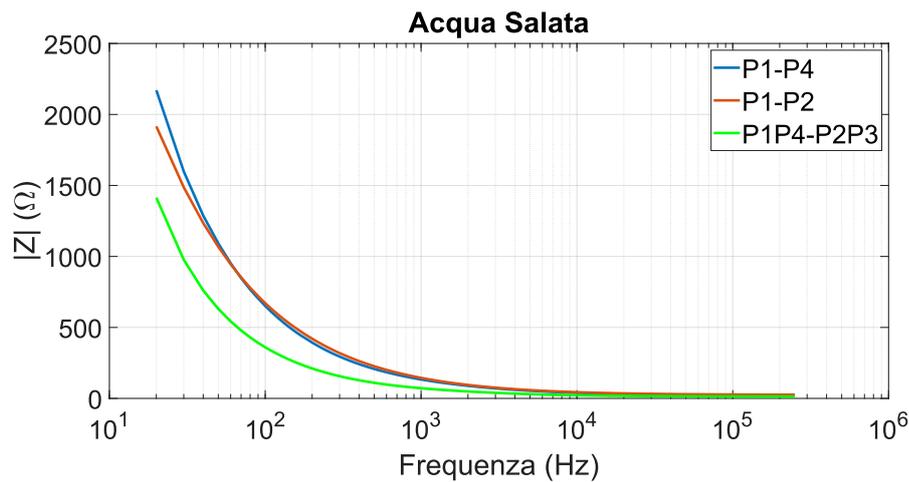


Figura 4.9: Confronto delle misure delle tre diverse configurazione degli elettrodi in acqua salata.

In figura 4.10, infatti, è possibile analizzare come il percorso del flusso di corrente tra P1 e P2, essendo più lungo, incontra una maggiore resistenza rispetto al percorso tra P1 e P4. Inoltre, anche la distribuzione del campo elettrico può influire sul flusso di corrente. Il campo elettrico tra P1 e P2 è più disperso a causa della maggiore distanza tra questi due elettrodi. Un campo elettrico più disperso implica che la densità di corrente è più bassa, portando a una maggiore impedenza. Invece, la distanza tra P1 e P4 essendo minore porta a un campo elettrico più concentrato,

provocando una maggiore densità di corrente e quindi un valore di impedenza inferiore.

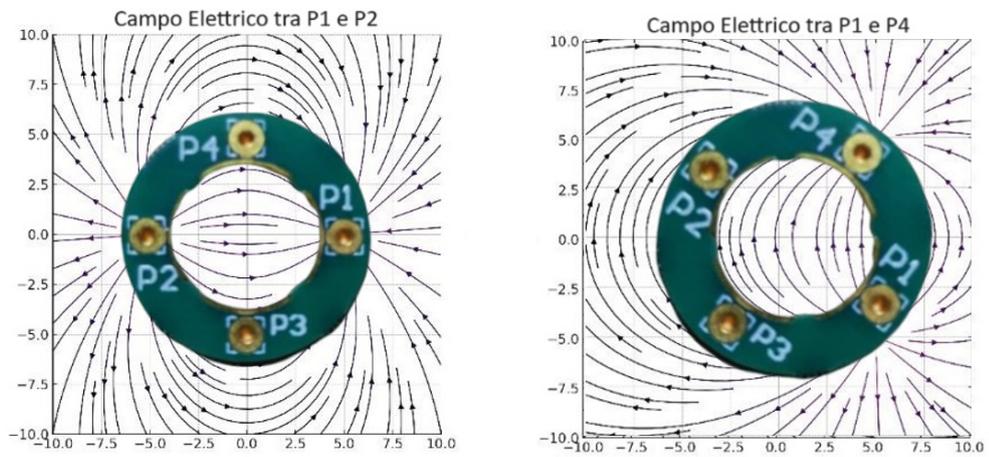


Figura 4.10: Linee di campo in diverse configuraizoni degli elettrodi.

4.3 Terza Fase di Misurazione – Automazione delle Misure

Nella terza fase di misurazione, è stato implementato un sistema automatizzato per l'acquisizione dei dati di impedenza al fine di garantire una misurazione costante e precisa nel tempo. Il valore di impedenza di un circuito RC è stato monitorato per 24 ore e, come illustrato in figura 4.11, si osserva che i valori di impedenza rilevati sono rimasti costanti durante tutto il periodo di misurazione. Questo risultato dimostra l'efficacia e la corretta configurazione del sistema di automazione della misura.

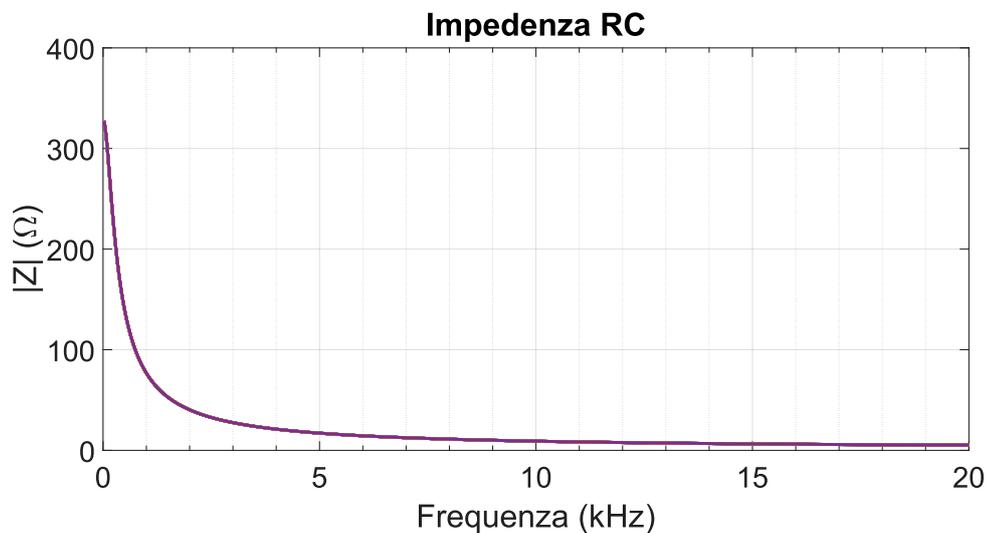


Figura 4.11: Sweep in frequenza i un circuito RC.

Successivamente, le misurazioni effettuate in acqua distillata con e senza scaffold all'interno dell'holder hanno mostrato una significativa differenza dovuta alla presenza dello scaffold. In particolare, si è osservata una diminuzione dell'impedenza media da circa 180 kOhm (senza scaffold), mostrata in figura 4.13, a circa 40 kOhm (con scaffold), mostrata in figura 4.12.

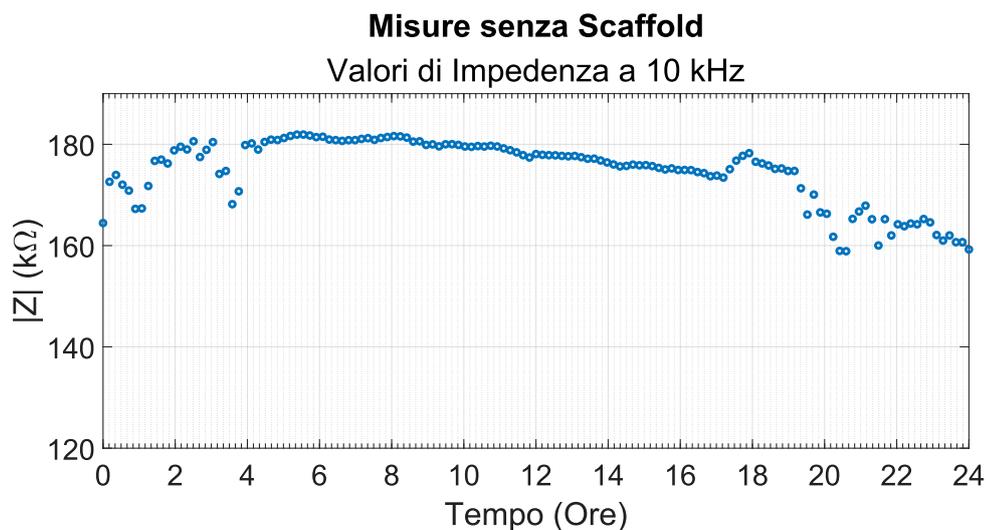


Figura 4.12: Misure con l'holder immerso in acqua distillata senza scaffold.

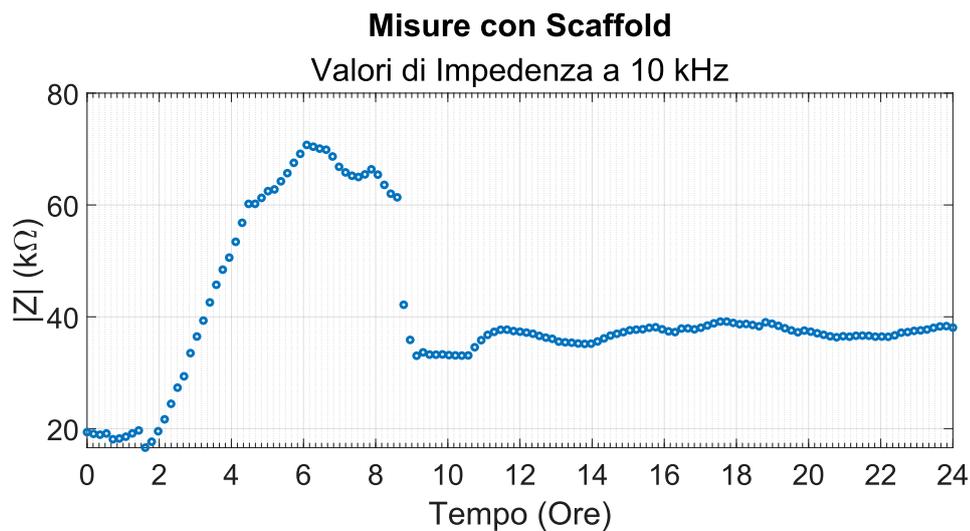


Figura 4.13: Misure con l'holder immerso in acqua distillata con scaffold.

Questo risultato suggerisce che lo scaffold, inizialmente aumentando l'impedenza, si stesse gradualmente sciogliendo, portando a una maggiore quantità di acqua distillata nella zona di misura. Dopo circa 10 ore, si ritiene che lo scaffold si sia completamente disciolto, formando una sostanza gelatinosa compatta che si è posizionata tra gli elettrodi, determinando un valore costante di impedenza. Questo comportamento è ulteriormente confermato dalla figura 4.14, che mostra

come, misurando l'impedenza per 24 ore all'interno di un bicchiere contenente lo scaffold sciolto, il valore medio dell'impedenza si assesti intorno ai 43/44 kOhm.

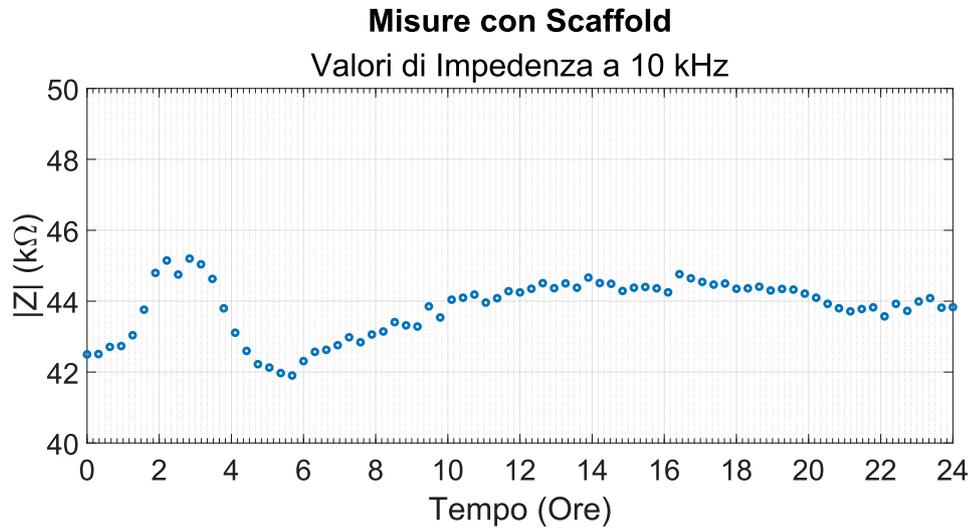


Figura 4.14: Misure con l'holder immerso in acqua distillata con lo scaffold sciolto.

Successivamente, è stato utilizzato un nuovo setup di misura, consistente in un recipiente contenente acqua di rubinetto in condizioni statiche. Dai dati raccolti in figura 4.15, si nota immediatamente come il valore di impedenza dell'acqua di rubinetto sia significativamente inferiore rispetto a quello dell'acqua distillata. Le misurazioni di riferimento, effettuate per 48 ore senza scaffold, hanno tenuto conto anche del comportamento della temperatura dell'acqua nello stesso arco temporale.

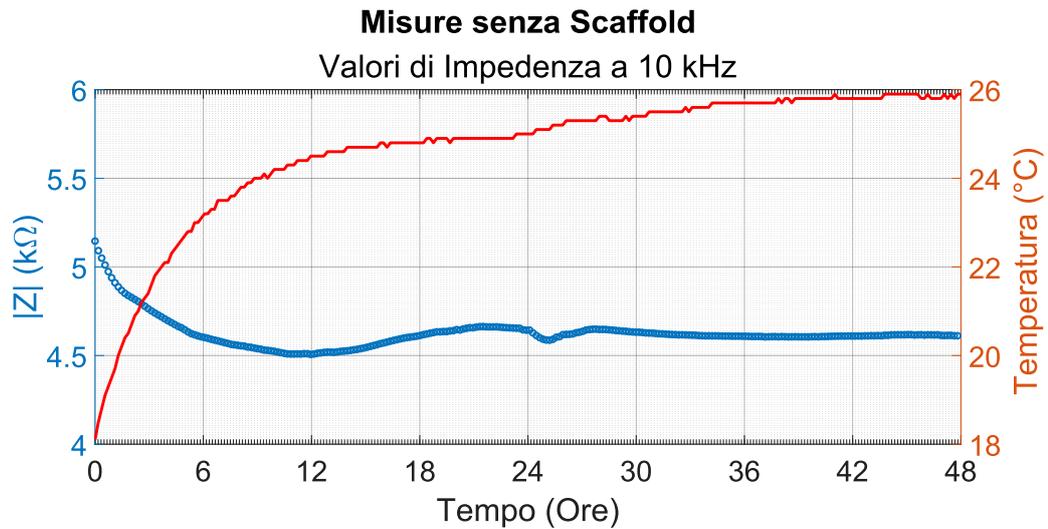


Figura 4.15: Misure con l'holder immerso in acqua di rubinetto senza scaffold in condizioni statiche.

È evidente che il valore di impedenza è influenzato dalla temperatura dell'acqua. Nelle prime 11 ore, quando la temperatura passa da 18°C a circa 25°C, l'impedenza varia notevolmente, per poi stabilizzarsi nel resto della misura, in concomitanza con la stabilizzazione della temperatura tra 25°C e 26°C.

Questa dipendenza è principalmente attribuibile alla conduttività elettrica del liquido e alla sua costante dielettrica, entrambe influenzate dai cambiamenti termici. Quando la temperatura aumenta, la conduttività elettrica dell'acqua aumenta anche, poiché le particelle acquose acquisiscono maggiore energia cinetica, facilitando un movimento più libero degli ioni carichi all'interno della soluzione. Di conseguenza, la resistenza elettrica del liquido diminuisce, influenzando direttamente l'impedenza.

D'altra parte, la costante dielettrica dell'acqua tende a diminuire all'aumentare della temperatura, poiché le molecole d'acqua, con il loro moto termico più veloce, hanno meno tempo per allinearsi con un campo elettrico applicato, riducendo così la componente reattiva dell'impedenza.

Inserito lo scaffold in PVA all'interno dell'holder in condizioni statiche, è possibile vedere in figura 4.16 che il valore all'inizio delle misurazioni è maggiore rispetto alle misure di riferimento di figura 4.15. Questo valore è dato dalla presenza dello scaffold. Nel tempo lo scaffold inizia a sciogliersi, per cui è possibile osservare un valore decrescente dell'impedenza, fino a 12 ore dall'inizio della misura, momento in cui lo scaffold si sarà completamente disciolto, ottenendo così valori paragonabili alla misura di impedenza dell'acqua in condizioni statiche senza scaffold.

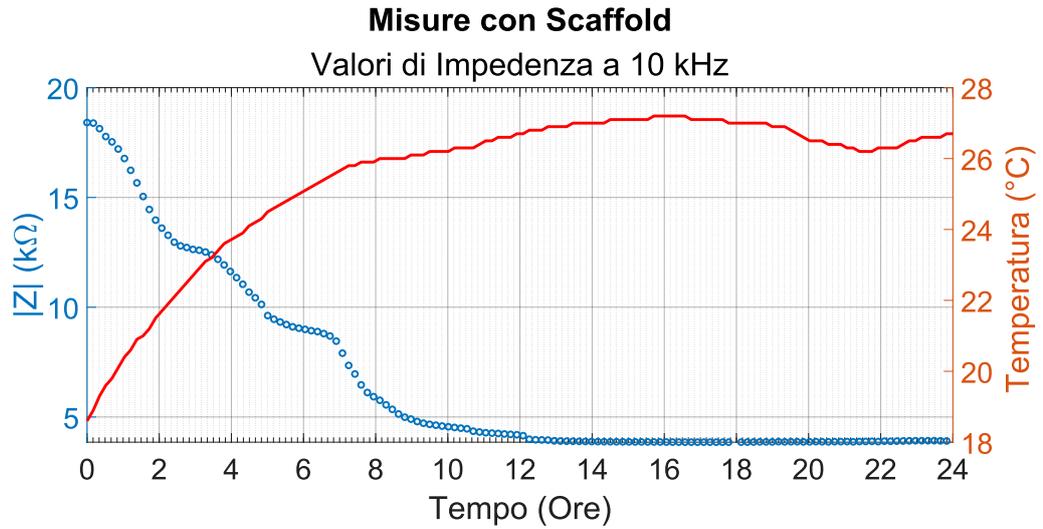


Figura 4.16: Misure con l'holder immerso in acqua di rubinetto con scaffold in condizioni dinamiche.

Il comportamento descritto per le misure in condizioni statiche senza scaffold è stato osservato anche nelle misure in condizioni dinamiche (figura 4.17).

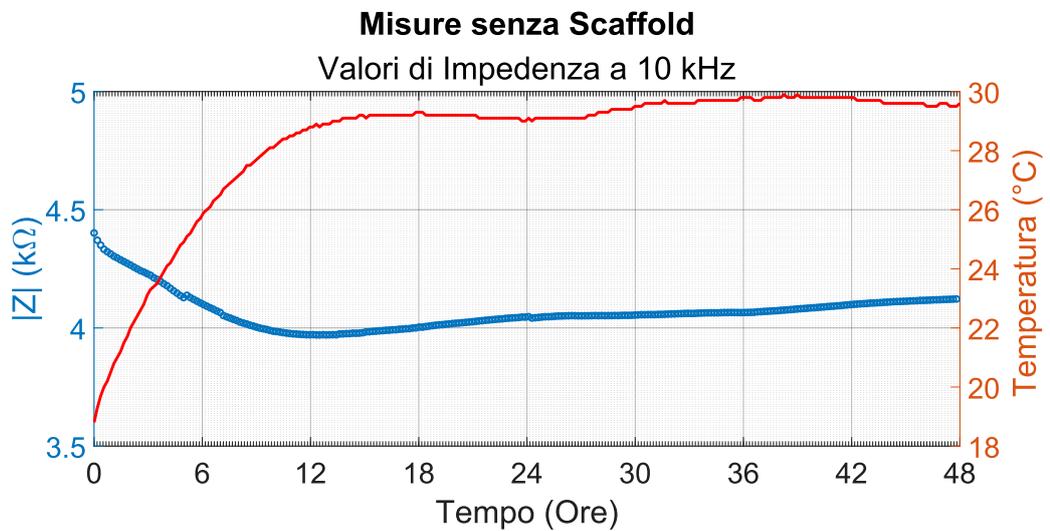


Figura 4.17: Misure con l'holder immerso in acqua di rubinetto senza scaffold in condizioni dinamiche.

Quando lo scaffold viene inserito nel sistema di misura, l'impedenza iniziale rilevata è maggiore, ma diminuisce gradualmente man mano che lo scaffold in

PVA si scioglie, permettendo un maggiore passaggio di acqua di rubinetto tra gli elettrodi. Dopo circa 7 ore, quando lo scaffold si è completamente sciolto, il valore di impedenza si stabilizza, raggiungendo il valore dell'impedenza dell'acqua di rubinetto (figura 4.18).

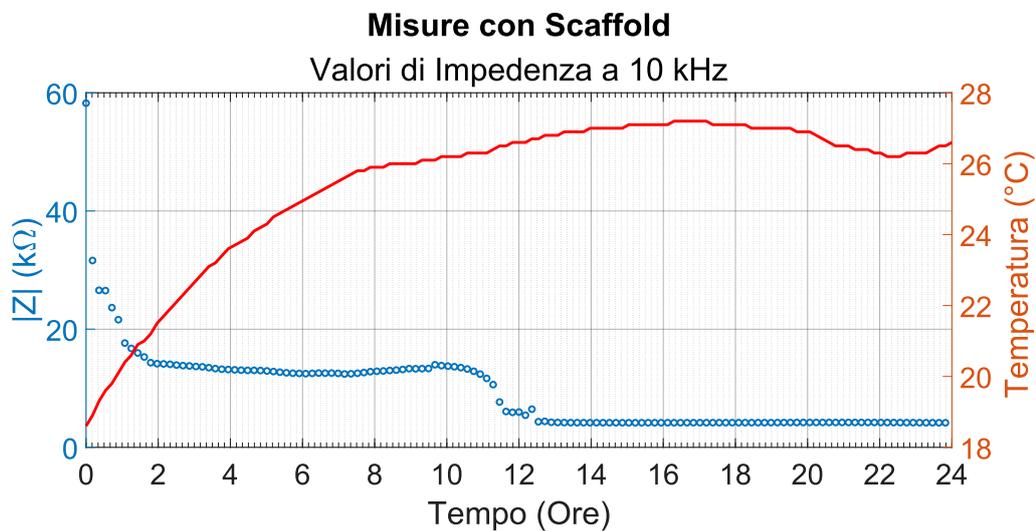


Figura 4.18: Misure con l'holder immerso in acqua di rubinetto con scaffold in condizioni dinamiche.

Per verificare ulteriormente il corretto funzionamento del sistema di acquisizione, sono state confrontate varie misure che mostrano valori attesi.

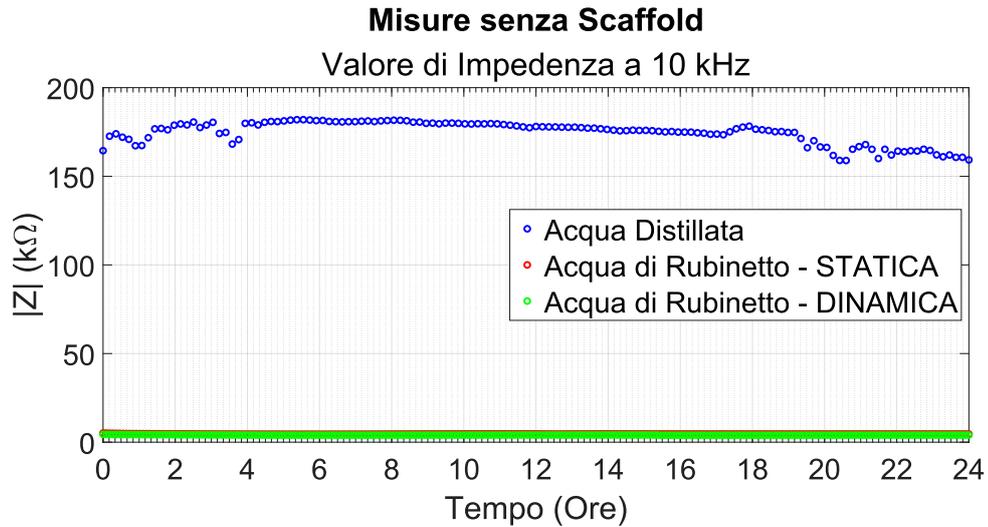


Figura 4.19: Confronto dell'impedenza dell'acqua distillata e dell'acqua di rubinetto senza lo scaffold.

I risultati ottenuti in figura 4.19 dimostrano chiaramente che l'impedenza dell'acqua distillata è significativamente maggiore rispetto a quella dell'acqua di rubinetto.

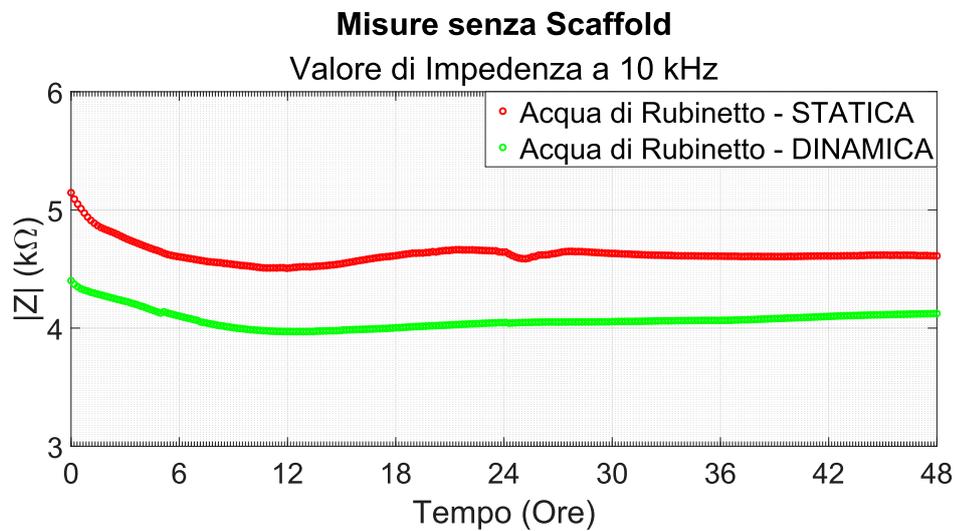


Figura 4.20: Confronto delle misure in acqua di rubinetto in condizioni statiche e dinamiche.

Inoltre, in figura 4.20, si può osservare come l'impedenza dell'acqua di rubinetto in condizioni dinamiche è risultata inferiore rispetto a quella in condizioni statiche.

Questo perchè quando degli elettrodi immersi in soluzione subiscono movimento, ad esempio a causa di agitazione o turbolenza del liquido, l'impedenza tende a diminuire. Questo è dovuto principalmente alla variazione della distribuzione dei doppi strati elettrici attorno agli elettrodi. Quando un elettrodo è in movimento o subisce agitazione, la struttura del doppio strato elettrico può essere perturbata, portando a una variazione delle capacità elettriche tra l'elettrodo e la soluzione. Infatti, la distanza del doppio strato diminuisce, portando ad un aumento della capacità. Poiché l'impedenza (Z) nei circuiti elettrici è generalmente inversamente proporzionale alla capacità (C), un cambiamento nella capacità porterà a un cambiamento corrispondente nell'impedenza.

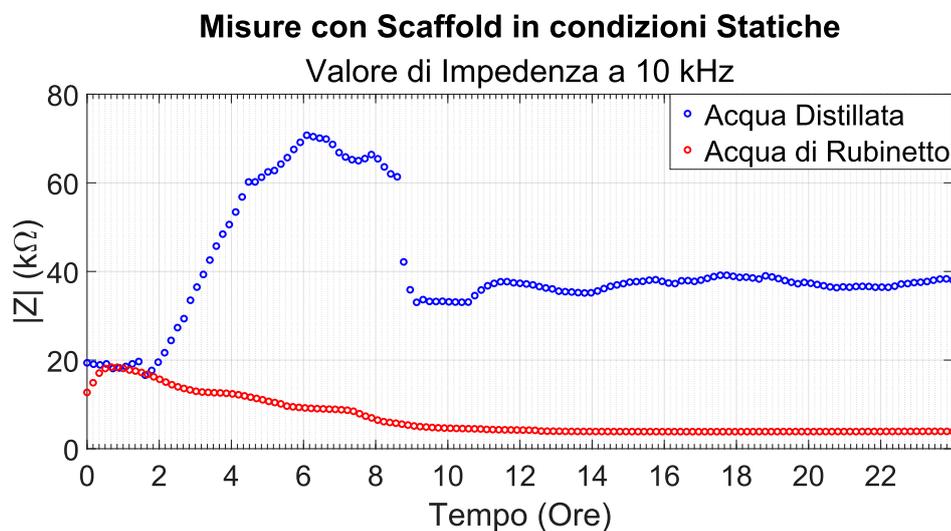


Figura 4.21: Confronto dell'impedenza dell'acqua distillata e dell'acqua di rubinetto con lo scaffold.

Infine, in figura 4.13 si vede che anche i diversi valori di impedenza rilevati in acqua distillata e in acqua di rubinetto con scaffold soddisfano le aspettative iniziali: il valore iniziale di impedenza è simile, ma, sciogliendosi nel tempo, lo scaffold permette un maggiore passaggio di liquido tra gli elettrodi, influenzando così i valori di impedenza misurati. In conclusione, l'automazione del processo di misurazione si è dimostrata efficace, consentendo di ottenere misure costanti e precise. La configurazione degli elettrodi e le condizioni sperimentali (statiche e dinamiche) hanno mostrato comportamenti coerenti con le aspettative teoriche, validando così l'approccio metodologico adottato nel progetto.

4.4 Quarta fase di misurazione – Circuito di Perfusionione

Le tre misurazioni effettuate tramite il circuito di perfusione hanno ulteriormente convalidato i dati analizzati nelle varie fasi dello studio. Inizialmente, una misurazione è stata condotta senza posizionare lo scaffold all'interno della camera di coltura, registrando un valore di impedenza sostanzialmente costante mostrato in figura ??, rappresentativo dell'acqua di rubinetto utilizzata come riferimento.

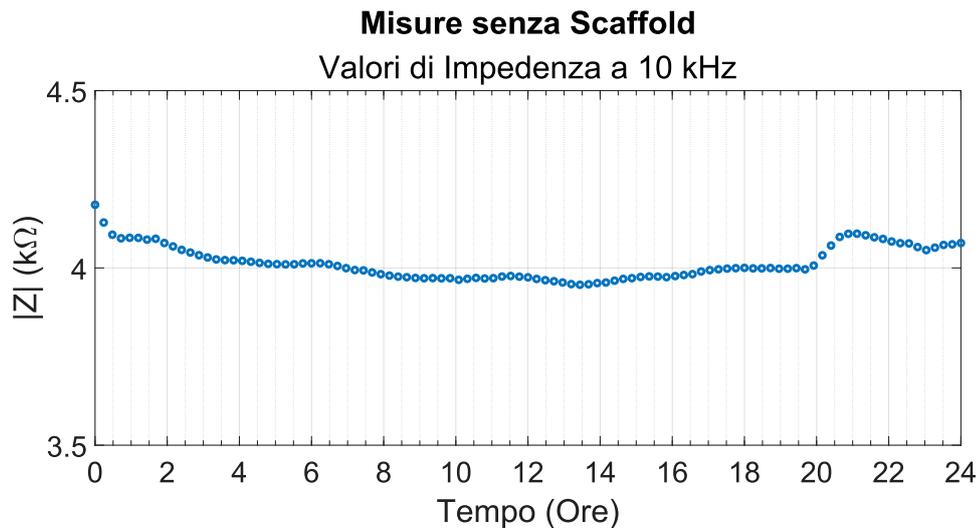


Figura 4.22: Misure con l'holder senza scaffold nel circuito di perfusione.

Successivamente, dopo aver posizionato uno scaffold in PLA all'interno dell'holder nella camera di coltura, è stato osservato un valore medio di impedenza di circa 11.7 kOhm (figura 14.23). Questo valore è significativamente diverso dal riferimento della soluzione pura, indicando chiaramente l'effetto dell'inserimento dello scaffold nel sistema di misurazione.

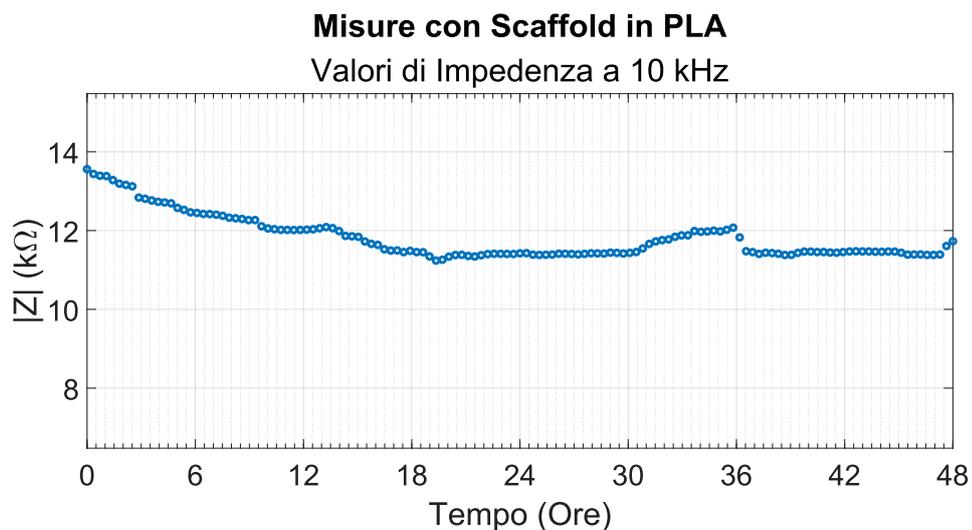


Figura 4.23: Misure con l'holder con scaffold in PLA nel circuito di perfusione..

La terza misurazione in figura 4.24 è stata eseguita utilizzando uno scaffold in PVA. Inizialmente, l'impedenza registrata era più elevata rispetto alla soluzione di riferimento, poiché lo scaffold integro ha una struttura che interferisce con il passaggio del segnale elettrico. Nel corso di 6 ore di monitoraggio continuo, è stato osservato un andamento decrescente dell'impedenza, indicativo del graduale dissolvimento dello scaffold. Alla fine del periodo di osservazione, l'impedenza si è stabilizzata a un valore comparabile con quello della soluzione di riferimento, suggerendo il completo dissolvimento dello scaffold in PVA nel mezzo di coltura.

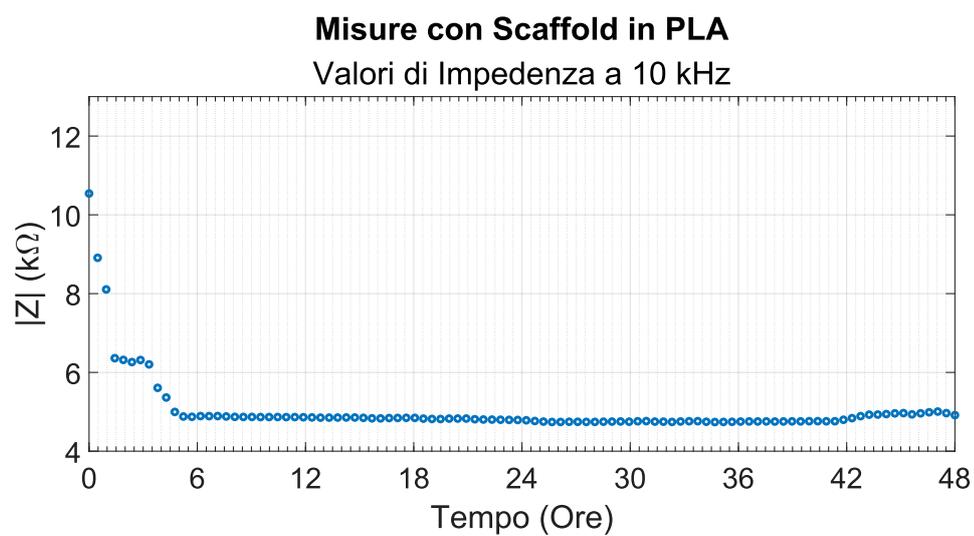


Figura 4.24: Misure con l'holder con scaffold in PVA nel circuito di perfusione.

Questi risultati confermano che il circuito di perfusione è in grado di rilevare in modo sensibile le variazioni di impedenza correlate alla presenza e alla dissoluzione degli scaffold nel sistema di coltura.

Capitolo 5

Conclusioni

Lo studio di fattibilità è stato portato a termine con successo, dimostrando la capacità del sistema di rilevare variazioni di impedenza in diverse condizioni sperimentali. I valori ottenuti in ogni circostanza sono risultati coerenti con le previsioni teoriche e i dati sperimentali, confermando sia l'affidabilità del sistema di misurazione che la validità delle misurazioni stesse. Questo risultato ha sottolineato la robustezza della metodologia adottata e la sua applicabilità in contesti reali. La capacità di rilevare variazioni significative di impedenza apre nuove prospettive per il monitoraggio delle colture cellulari tridimensionali (3D). Le attuali tecniche di monitoraggio spesso richiedono interventi invasivi e l'interruzione degli esperimenti per valutare la differenziazione cellulare all'interno dei bioreattori. In contrasto, l'approccio basato sulla misurazione dell'impedenza permette un monitoraggio in tempo reale e non invasivo, che rappresenta un progresso significativo nel campo. Questa metodologia innovativa consente di seguire la crescita e la differenziazione delle cellule senza interrompere il processo sperimentale, migliorando notevolmente l'efficienza e l'accuratezza dei risultati ottenuti. Il successo dello studio non solo ha confermato la capacità del setup di misurare variazioni di impedenza in soluzioni acquose, ma ha anche posto le basi per sviluppi futuri nel monitoraggio non invasivo delle colture cellulari 3D. L'approccio proposto supera le limitazioni delle tecniche attuali, potenzialmente aprendo la strada a nuove applicazioni nella ricerca biomedica e nella medicina rigenerativa. I futuri studi si concentreranno sul miglioramento del sistema sviluppato, spostandosi dall'uso di soluzioni acquose a mezzi di coltura cellulari. Sarà fondamentale determinare la frequenza ottimale per la misurazione dell'impedenza, identificando quella alla quale le cellule rispondono in modo più efficace per gli obiettivi prefissati. Una volta stabilita la frequenza ottimale, si procederà all'integrazione dell'elettronica per la misurazione, considerando attentamente la scelta dei materiali, la loro biocompatibilità, le potenziali perdite derivanti dall'inserimento dell'elettronica nella camera di coltura e le procedure di sterilizzazione necessarie.

Bibliografia

- [1] Andrés Sánchez-Iglesias, Milagros Fernández-Lucas e José L Teruel. «The electrical basis of bioimpedance». In: *Nefrología (English Edition)* 32.2 (2012), pp. 133–135 (cit. alle pp. 2, 3, 11).
- [2] D Holder. «Appendix A. Brief introduction to bioimpedance». In: *Electrical Impedance Tomography: methods, history and applications* (2010), p. 411 (cit. alle pp. 3–5, 12).
- [3] David Naranjo-Hernández, Javier Reina-Tosina e Mart Min. «Fundamentals, recent advances, and future challenges in bioimpedance devices for healthcare applications». In: *Journal of Sensors* 2019.1 (2019), p. 9210258 (cit. alle pp. 4, 9).
- [4] Alexander V Smirnov, Dmitriv V Nikolaev, Sergey G Rudnev e R Splinter. «Bioelectric impedance analysis». In: *Handbook of Physics in Medicine and Biology*. CRC Press Boca Raton, FL, USA, 2010, pp. 25–1 (cit. a p. 5).
- [5] Sami Gabriel, RW Lau e Camelia Gabriel. «The dielectric properties of biological tissues: III. Parametric models for the dielectric spectrum of tissues». In: *Physics in medicine & biology* 41.11 (1996), p. 2271 (cit. a p. 8).
- [6] Benjamín Sánchez Terrones, Ebrahim Louarroudi, Rik Pintelon e Ramon Bragós Bardia. «Modeling the non-stationary behaviour of time-varying electrical bioimpedance». In: *19th IMEKO TC-4, 2013, July 18-19: Symposium Measurements of Electrical Quantities*. Universitat Politècnica de Catalunya (UPC). 2013, pp. 378–384 (cit. a p. 8).
- [7] Padma Batra e Rajiv Kapoor. «Electrical bioimpedance: Methods and applications». In: *Int. J.* 3.4 (2015), pp. 702–707 (cit. a p. 10).
- [8] Allan R Hambley. *Electrical engineering: principles and applications*. Vol. 4. Prentice Hall, 2017 (cit. a p. 12).
- [9] Michelle Griffin e Ardeshir Bayat. «Electrical stimulation in bone healing: critical analysis by evaluating levels of evidence». In: *Eplasty* 11 (2011) (cit. a p. 12).

-
- [10] Monica C Lin, Safa T Herfat, Chelsea S Bahney, Meir Marmor e Michel M Maharbiz. «Impedance spectroscopy to monitor fracture healing». In: *2015 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*. IEEE. 2015, pp. 5138–5141 (cit. a p. 13).
- [11] Mina J Bissell e Derek Radisky. «Putting tumours in context». In: *Nature Reviews Cancer* 1.1 (2001), pp. 46–54 (cit. alle pp. 14, 16, 17).
- [12] R Ian Freshney. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons, 2015 (cit. a p. 15).
- [13] Rasheena Edmondson, Jessica Jenkins Broglie, Audrey F Adcock e Liju Yang. «Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors». In: *Assay and drug development technologies* 12.4 (2014), pp. 207–218 (cit. alle pp. 15, 16).
- [14] Sean V Murphy e Anthony Atala. «3D bioprinting of tissues and organs». In: *Nature biotechnology* 32.8 (2014), pp. 773–785 (cit. alle pp. 16–18).
- [15] Britta Weigelt. «HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents». In: *Info: Lawrence Berkeley National Laboratory* (2010) (cit. a p. 16).
- [16] Robert Langer. «VacantiJP: Tissue engineering». In: *Science* 260.5110 (1993), pp. 920–926 (cit. alle pp. 17, 18).
- [17] Scott J Hollister. «Porous scaffold design for tissue engineering». In: *Nature materials* 4.7 (2005), pp. 518–524 (cit. a p. 17).
- [18] Elsie S Place, Nicholas D Evans e Molly M Stevens. «Complexity in biomaterials for tissue engineering». In: *Nature materials* 8.6 (2009), pp. 457–470 (cit. a p. 18).
- [19] Kuen Yong Lee e David J Mooney. «Alginate: properties and biomedical applications». In: *Progress in polymer science* 37.1 (2012), pp. 106–126 (cit. a p. 19).
- [20] Ivan Martin, David Wendt e Michael Heberer. «The role of bioreactors in tissue engineering». In: *TRENDS in Biotechnology* 22.2 (2004), pp. 80–86 (cit. a p. 19).
- [21] Huang-Chi Chen e Yu-Chen Hu. «Bioreactors for tissue engineering». In: *Biotechnology letters* 28 (2006), pp. 1415–1423 (cit. a p. 19).
- [22] Michael L Shuler. «Bioprocess engineering.» In: *Prentice-Hall* (1992), pp. 412–420 (cit. alle pp. 20–22).
- [23] Peter F Stanbury, Allan Whitaker e Stephen J Hall. *Principles of fermentation technology*. Elsevier, 2013 (cit. a p. 20).

- [24] Pauline M Doran. *Bioprocess engineering principles*. Elsevier, 1995 (cit. a p. 20).
- [25] Diana Alves Gaspar, Viviane Gomide e Fernando Jorge Monteiro. «The role of perfusion bioreactors in bone tissue engineering». In: *Biomatter* 2.4 (2012), pp. 167–175 (cit. a p. 22).
- [26] Hanieh Nokhbatolfoghahaei, Maryam R Rad, Mohammad-Mehdi Khani, Nasser Nadjmi, Arash Khojasteh et al. «Application of bioreactors to improve functionality of bone tissue engineering constructs: a systematic review». In: *Current stem cell research & therapy* 12.7 (2017), pp. 564–599 (cit. a p. 24).
- [27] Beatrice Masante. «Perfusion and electromagnetic stimulation bioreactor for bone tissue engineering: optimization, characterization and validation tests». Tesi di dott. Politecnico di Torino, 2021 (cit. a p. 25).
- [28] Stefano Gabetti et al. «An automated 3D-printed perfusion bioreactor combinable with pulsed electromagnetic field stimulators for bone tissue investigations». In: *Scientific Reports* 12.1 (2022), p. 13859 (cit. a p. 27).