

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria dei Materiali

Tesi di Laurea Magistrale

**Sviluppo di materiali per stampa 3D in campo
biologico: immobilizzazione di proteine.**



Relatore

prof. Marco Sangermano

Corelatore

prof. Candido Fabrizio Pirri

Candidato

Francesca Vottero

Marzo 2018

Fai della tua vita un sogno, e di un sogno, una realtà.

(Antoine-Marie Roger de Saint-Exupery)

Indice

1. INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	7
2. L'ADDITIVE MANUFACTURING	9
2.1. 3D PRINTING DI MATERIALI METALLICI, CERAMICI E POLIMERICI	10
2.2. 3D PRINTING DI MATERIALI BIOCOMPATIBILI	15
2.2.1. BIOPRINTING DI MATERIALI BIOLOGICI	15
2.2.2. BIOPRINTING DI MATERIALI NON BIOLOGICI	19
2.3. APPLICAZIONI DEI MATERIALI STAMPATI TRAMITE 3D BIOPRINTING	21
2.3.1. APPLICAZIONI DEL SISTEMA PEGDA-BSA	22
2.4. FOTORETICOLAZIONE DI UNA FORMULAZIONE POLIMERICA	23
2.5. CONIUGARE UNA STAMPANTE DLP CON UN'APPLICAZIONE BIOLOGICA	25
3. LE PROTEINE E LA LORO IMMOBILIZZAZIONE	27
3.1. STRUTTURA E FUNZIONE DELLE PROTEINE	27
3.2. METODI DI IMMOBILIZZAZIONE DI UNA PROTEINA	31
3.2.1. METODI IRREVERSIBILI	32
3.2.1.1. Legame covalente	32
3.2.1.2. Intrappolamento	34
3.2.2. METODI REVERSIBILI	34
3.2.2.1. Adsorbimento	34
3.2.2.2. Legame per bioaffinità	35
3.2.2.3. Legame ionico	36
3.2.2.4. Chelazione o legame metallico	36
3.2.2.5. Ponti disolfuro	37
3.3. APPLICAZIONI DI SUBSTRATI CON PROTEINE IMMOBILIZZATE	37
4. MATERIALI E METODI	39
4.1. MATERIALI	39
4.2. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	42
4.2.1. FORMULAZIONI PER LA STAMPA DEI FILM	42
4.2.2. PROCESSO DI STAMPA DLP	43
4.2.3. PROCESSO DI IMMOBILIZZAZIONE SUPERFICIALE SUI FILM	43
4.2.3.1. Protocolli di attivazione e immobilizzazione	43
4.2.3.2. Immobilizzazione di BSA sui film	44
4.2.3.3. Immobilizzazione di HRP sui film	44
4.2.3.4. Immobilizzazione con HRP sul cubo forato	44
4.2.4. RILASCIO DELLA PROTEINA	45

4.2.5. FORMULAZIONI LIQUIDE	45
4.3. TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE	46
4.3.1. SPETTROSCOPIA IR IN RIFLETTANZA TOTALE ATTENUATA (ATR)	46
4.3.2. SPETTROFOTOMETRIA UV-VIS	46
4.3.3. CALORIMETRIA A SCANSIONE DIFFERENZIALE (DSC)	46
4.3.4. VALUTAZIONE DELL'IMMOBILIZZAZIONE TRAMITE SAGGIO COLORIMETRICO ELISA	47
4.3.5. MICROSCOPIA OTTICA	47
5. RISULTATI E DISCUSSIONE	49
5.1. SPETTROSCOPIA ALL'INFRAROSSO A RIFLETTANZA TOTALE ATTENUATA	49
5.2 STUDIO DEL RILASCIO TRAMITE SPETTROSCOPIA UV	55
5.3 SPETTROSCOPIA ATR DOPO RILASCIO IN AMBIENTE ACQUOSO	56
5.4 ANALISI TRAMITE CALORIMETRIA A SCANSIONE DIFFERENZIALE (DSC) PER I CAMPIONI CON BSA INTRAPPOLATA NELLA MATRICE POLIMERICA	58
5.5 ANALISI FUNZIONALE DI UNA PROTEINA IMMOBILIZZATA IN SUPERFICIE	59
5.6. STUDI SULL'OMOGENEITÀ DI INTRAPPOLAMENTO IN BULK	62
5.7. STAMPA DI STRUTTURE A GEOMETRIA COMPLESSA	65
6. CONCLUSIONI	69
BIBLIOGRAFIA	71
SITOGRAFIA	75

1. Introduzione e scopo della tesi

Il presente progetto di tesi è focalizzato sull'additive manufacturing per la produzione di sistemi biologici. Ad oggi, infatti, sono molte le tecniche di stampa 3D in uso, ed anche le applicazioni tendono a ricoprire sempre più ambiti produttivi; tuttavia, la produzione di sistemi biologici tramite manifattura additiva è ancora un mondo poco esplorato. Per questo motivo, nel corso di questa tesi, si è voluto eseguire uno studio proprio su quest'ultima tematica, cercando – nel dettaglio – di coniugare la stampa Digital Light Printing (DLP) di matrici a base polietilenglicole diacrilato (PEGDA) con l'immobilizzazione di proteine, ed in particolare di albumina di siero bovino (BSA), usata essenzialmente come proteina modello durante i test preliminari, e di un enzima, la perossidasi del rafano (HRP).

A tal proposito, nel corso di questa tesi si presenterà dapprima una sezione bibliografica, elaborata basandosi su fonti di letteratura, e in secondo luogo una sezione sperimentale, sviluppata presso i laboratori del Dipartimento di Scienza e Tecnologia Applicata (DISAT) del Politecnico di Torino e dell'Istituto Italiano di Tecnologia (IIT) della sede di Torino.

Per quanto riguarda la sezione bibliografica, questa sarà a sua volta suddivisa in due capitoli. Il Capitolo 2 sarà incentrato sullo stato dell'arte relativo a tutte le tecniche di additive manufacturing per materiali metallici, ceramici, polimerici e biologici e si concluderà con un paragrafo dedicato proprio alle applicazioni già testate e implicanti l'uso di PEGDA e BSA. Il Capitolo 3, d'altro canto, sarà invece dedicato ad una parte più strettamente biologica, fornendo i concetti base di struttura e funzionalità di una proteina, nonché i principali metodi di immobilizzazione.

Nella letteratura ad oggi disponibile, il metodo di immobilizzazione più consolidato è senza dubbio quello che coinvolge l'immobilizzazione della biomolecola in questione unicamente sulla superficie del materiale stampato. Tuttavia, un intrappolamento interno comporterebbe non solo la presenza della proteina in tutto il bulk polimerico e dunque una maggiore quantità di proteina inglobata, ma soprattutto un notevole risparmio in termini di tempo di preparazione e ottenimento del campione, e dunque in termini economici.

Per questo, nella sezione sperimentale, si è studiato un nuovo metodo di immobilizzazione proteica per materiali provenienti da manifattura additiva: l'inserimento della proteina direttamente all'interno di una formulazione polimerica preparata per la stampa DLP.

Per poter raggiungere l'obiettivo principe, si è dunque deciso di verificare anzitutto la possibilità di immobilizzazione superficiale di una proteina su di una matrice ottenuta tramite 3D printing e di sviluppare – in un secondo momento – i confronti con quanto si verifichi nel caso di intrappolamento interno.

In questo modo è stato possibile evidenziare le eventuali differenze nella tipologia di legame instaurantesi tra la matrice e la proteina, dal quale derivano inoltre le differenze nel rilascio della medesima una volta posto il componente finale in ambiente acquoso. Oltre a ciò, gli studi presentati terranno anche in conto della funzionalità della proteina immobilizzata, nonché del mantenimento della sua struttura nativa in tutte le fasi di preparazione del campione.

Nel dettaglio, la sezione sperimentale sarà anch'essa esposta in due capitoli. Nel Capitolo 4 saranno elencati i materiali, i procedimenti e le tecniche di caratterizzazione utilizzate, mentre nel Capitolo 5 saranno riportati i risultati conseguiti, accompagnati da relativa discussione.

Da ultimo, nel Capitolo 6 saranno presentate le conclusioni di questo lavoro di tesi, con particolare riferimento a possibili sviluppi futuri riguardanti il medesimo ambito di analisi della sezione sperimentale e alle possibili applicazioni da esso derivabili.

2. L'additive manufacturing

Con il termine “**additive manufacturing**” (AM) si indica l'insieme di tecnologie produttive che si contrappongono alle classiche tecniche di formatura dei materiali, quali ad esempio i metodi basati sulla fusione o sul rammollimento del materiale (stampaggio o estrusione) o le tecniche sottrattive in cui il componente finale 3D si ottiene generalmente dall'asportazione di materiale da una preforma grezza (laminazione, taglio, foratura), (Sangermano, 2014).

Pertanto, a differenza dei metodi tradizionali, nell'additive manufacturing l'oggetto 3D viene formato mediante l'aggiunta strato per strato di materiale. Proprio per questo spesso ci riferisce a questo insieme di tecniche con il termine “3D printing” o “stampa 3D”.

Esistono differenti tipologie di tecnologie annoverabili nell'additive manufacturing, ma tutte si basano sull'utilizzo di un modello CAD, che consiste nella rappresentazione digitale del componente da costruire. La macchina, che si occupa della sua produzione è in grado di leggere i dati di questo file, generalmente convertiti in un file di estensione STL, e di ricostruire strato dopo strato l'oggetto (Wong et al., 2012).

Questa tecnica produttiva è in uso da decine di anni: il primo brevetto risale al 1982, quando Chuck Hull inventò la prima stampante stereolitografica, esaminata nel seguito di questo paragrafo (Whitaker, 2014). Ciò che ha fatto la differenza negli ultimi anni è stato l'ingente calo del prezzo delle stampanti, che ha permesso all'additive manufacturing di diffondersi in sempre più settori produttivi.

La produzione tramite sovrapposizione progressiva di strati può essere applicata a tutte le tipologie di materiali: metallici, ceramici, polimerici e persino biologici. Per questo i campi applicativi degli oggetti prodotti con stampa additiva sono molteplici e spaziano dal settore biomedicale al settore aerospaziale, passando per il settore meccanico-automobilistico e per l'industria manifatturiera di oggettistica varia (Chua, 2014). Inoltre non mancano vendite di prodotti stampati nel mondo del design di interni o della gioielleria (Design American Standard Brands, 2015).

La diffusione della stampa additiva è sicuramente avvenuta grazie ai grandi vantaggi che essa offre rispetto alle classiche tecniche di formatura. Anzitutto, è possibile ottenere oggetti di forma notevolmente complessa, addirittura alcune geometrie sono ottenibili solo per additive manufacturing e non attraverso altre tecnologie, come nel caso di trachee biorisorbibili (Kang, 2004), protesi vascolari (Norotte, 2013), piccoli ingranaggi per il settore aerospaziale (Biffi et al., 2017), palette di turbine pregiate (Biffi et al., 2017). In secondo luogo, non esistono scarti di produzione e si produce l'oggetto direttamente nella sua forma finale, eliminando i costi della linea produttiva dovuti ad operazioni di finitura e assemblaggio, oltre che a comportare un notevole risparmio di materiale (Sangermano, 2014). Infine, un vantaggio piuttosto inusuale risiede nella possibilità di inviare al cliente direttamente il file CAD, tagliando i costi di trasporto, dal momento che sarà il cliente stesso a stampare l'oggetto nella propria sede.

Come è facile intuire, le tecnologie di additive manufacturing oggi disponibili sono moltissime. Nel seguito verranno descritti i principi di funzionamento delle principali tipologie, suddividendole in base alla classe di materiale con cui vengono normalmente impiegate.

2.1. 3D printing di materiali metallici, ceramici e polimerici

Per quanto riguarda l'ambito metallurgico la sinterizzazione 3D risulta essere un processo produttivo molto interessante. Ad oggi, le due metodiche più largamente impiegate sono la fusione selettiva mediante fascio laser (**Selective Laser Melting - SLM**) e la fusione selettiva mediante fascio elettronico (**Electron Beam Melting - EBM**).

Entrambe le tecniche SLM ed EBM lavorano con un letto di polveri metalliche, prodotte *ad hoc* rispettando rigidi requisiti in termini di granulometria, distribuzione di taglie e resistenza meccanica. Normalmente, le polveri utilizzate hanno un diametro compreso tra i 5 e i 70 μm ed hanno forma all'incirca sferica – come mostrato in Figura 2.1 – per permettere un buon scorrimento ed un buon grado di impacchettamento in fase di sinterizzazione (Biffi et al., 2017). La più importante tecnologia per l'ottenimento delle suddette polveri è l'atomizzazione via gas (Murr et al., 2012).

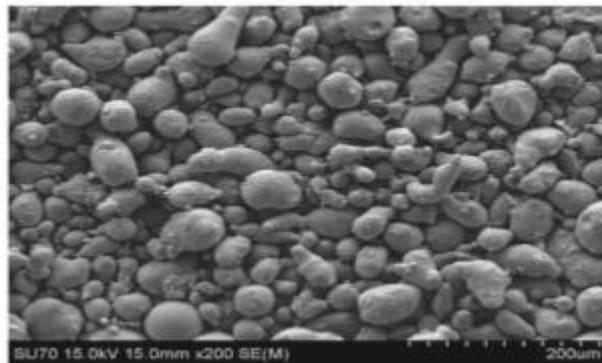


Figura 2.1 Immagine al SEM delle polveri utilizzate nell'EBM e nell'SLM (Biffi et al., 2017)

Per quanto concerne i materiali impiegati nel settore dell'AM metallurgico, solitamente si ricorre a polveri di acciai inossidabili, acciai maraging, Inconel, leghe di Ti-Al-V e leghe di Cr (Biffi et al., 2017).

Il sistema SLM funziona come illustrato in Figura 2.2: un laser ha la funzione di apportare energia ad un letto di polveri metalliche, in modo da fonderle selettivamente nelle zone di interesse e produrre così l'oggetto di interesse, che si appoggia al di sopra di una piattaforma. In seguito alla formazione del primo strato di materiale sinterizzato, la piattaforma si abbassa e lo strato di polveri da sinterizzare viene rinnovato grazie all'utilizzo di un rullo cilindrico (Frazier, 2014).

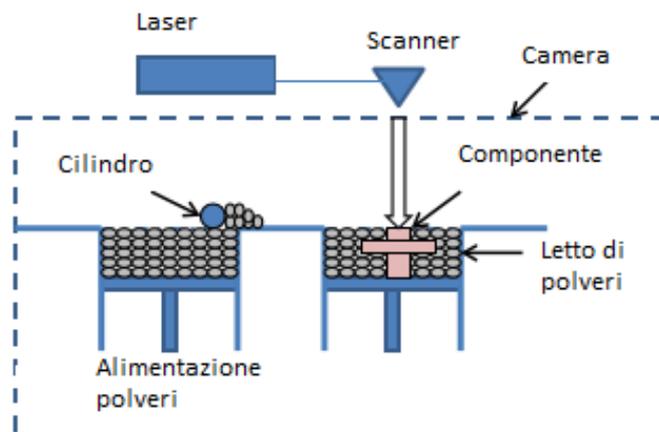


Figura 2.2 Sistema SLM (Frazier, 2014)

Il sistema EBM è simile, ma per fondere selettivamente le polveri ricorre ad un fascio elettronico: per questo motivo tale sistema necessita di lavorare in vuoto e ciò porta alla produzione di un materiale sicuramente esente da contaminazioni, basti pensare all'ossigeno, che normalmente ossiderebbe le polveri.

Per contro, il bisogno di un'atmosfera in vuoto, comporta un notevole allungamento dei tempi di produzione, con aumento dei costi. Per questa ragione l'EBM è attualmente impiegato solo per la produzione di oggetti impiegati nel settore aerospaziale o biomedicale (Biffi et al., 2017).

Tra le applicazioni metallurgiche in cui, in assoluto, si ricorre sempre più alla manifattura additiva meritano anzitutto nota le palette di turbine in lega di titanio per il settore aerospaziale, di cui un esempio è mostrato in Figura 2.3, e le protesi impiantabili ad alta porosità superficiale, realizzate in lega di titanio o cobalto e riportate anch'esse in Figura 2.3. Altre applicazioni sono rappresentate da: componenti strutturali ferrosi, billette di acciai per utensili, magneti permanenti, utensili da taglio in metallo duro, boccole autolubrificanti, utensili diamantati (Biffi et al., 2017).

In genere sui componenti metallici così prodotti, a valle del processo di stampaggio 3D sono necessari dei passaggi per preservare l'integrità del pezzo e la sua funzionalità quali stress relief tramite trattamento termico e trattamenti superficiali (per esempio lappatura), (Ugues, 2015).



Figura 2.3 Palette di turbina in lega di titanio (grm-consulting.co.uk) e protesi in lega di titanio e cobalto (Fournier, 2016)

Spostandoci al settore dei componenti ceramici, anche qui l'additive manufacturing ha decisamente potuto prendere piede negli ultimi anni. Per produrre delle strutture dense, con un alto livello di proprietà meccaniche, la metodologia deve basarsi su delle paste o sospensioni con alta percentuale di polveri, in grado di garantire una distribuzione di taglie molto omogenea (Calignano, 2017). Una delle tecnologie più promettenti nel campo dell'AM per materiali ceramici sembra essere la **Digital Light Processing (DLP)**, che nel caso di interesse assume il nome di **Manifattura ceramica basata su litografia (LCM)**, (Calignano, 2017).

Nella LCM si ha una polvere ceramica dispersa all'interno di un binder polimerico fotoreticolabile a formare uno slurry. Quest'ultimo viene selettivamente fotoreticolato tramite luce UV mediante l'uso di una maschera, producendo così il "green" ceramico, ovvero la preforma cruda (pre-sinterizzazione) dell'oggetto. Segue quindi un post-trattamento, durante il quale la fase polimerica viene rimossa e le polveri ceramiche vengono ulteriormente densificate, creando così un denso manufatto ceramico, che avrà applicazione nella maggior parte dei casi in dispositivi biomedici impiantabili, in supporti catalitici, nei filtri o nell'elettronica (Homa et al., 2015). Alcuni esempi applicativi sono riportati in Figura 2.4.

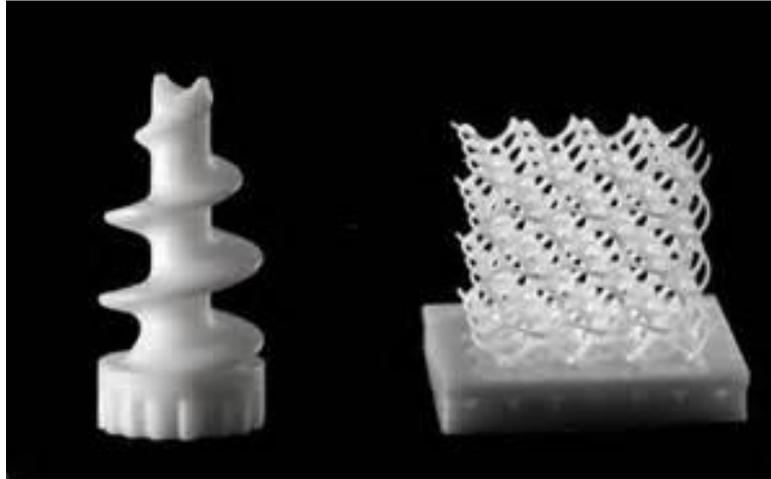


Figura 2.4 Vite biomedicale e filtro molecolare prodotti tramite LCM (3DPrint.com, 2014)

Altre tecnologie sfruttate per ottenere dei sinterizzati ceramici sono poi la **Selective Laser Sintering (SLS)**, e la **Laminated Object Manufacturing (LOM)**, molto usata per produrre componenti elettronici o sistemi di isolamento e riscaldamento per il sistema edilizio.

Nella tecnologia SLS si utilizzano delle polveri in maniera molto simile a quanto avviene nell'SLM, descritta pocanzi. Tali polveri vengono depositate su di un supporto e selettivamente sinterizzate tramite un laser. Dopodiché il supporto scorre verso il basso, permettendo la deposizione e sinterizzazione di un successivo strato di polveri (Olananni, 2015).

Nella tecnologia LOM, un film di green ceramico viene tagliato in elementi di uguali dimensioni, che formeranno i vari strati dell'oggetto finale (Mueller, 1999). Tali strati di manufatto nella forma di green verranno appunto sovrapposti e uniti, a costruire il prodotto ultimo.

Dopo aver dato una rapida scorsa alle tecnologie di 3D printing per metalli e ceramici, ci si rivolge ora all'ambito polimerico, il quale è sicuramente più ampio e complesso in termini di materiali impiegati e metodiche di stampa disponibili.

Nell'ottica di stampare degli oggetti polimerici in 3D, tra le stampanti principali si annoverano senza dubbio le tipologie **Fused deposition modeling (FDM)**, **Stereolitografia (SLA)**, **Digital Light Printing (DLP)**.

Una stampante del tipo FDM è rappresentata in Figura 2.5. In essa, del polimero fuso viene estruso da una testa di estrusione, in grado di muoversi in due direzioni x e y lungo una stessa quota z . Man mano che il polimero estruso viene depositato, la piattaforma di costruzione si abbassa lungo la direzione z , in modo da permettere la successiva formazione dei diversi strati di materiale. Oltre alla bobina di materiale per la costruzione generalmente esiste una bobina di materiale di supporto.

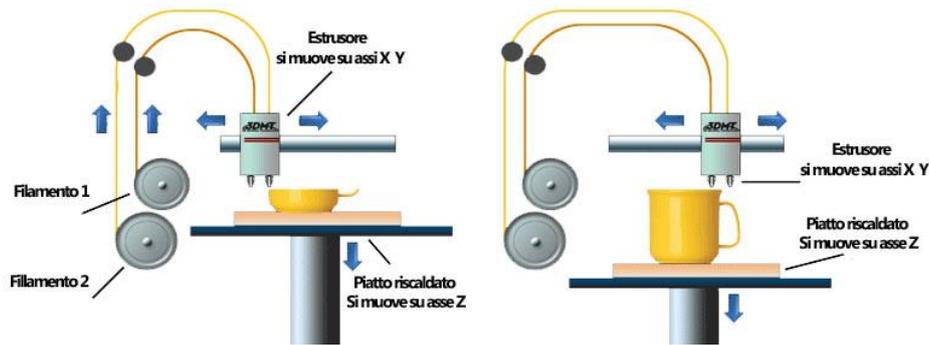


Figura 2.5 Stampante FDM (Kataleo.com, 2014)

Questa tecnica risulta essere la più diffusa in assoluto nel mondo del 3D printing, anche grazie al suo basso costo. Normalmente la FDM viene impiegata per stampare polimeri termoplastici, quali PP, PC, Nylon, PLA, ABS, PVA (Calignano et al., 2017).

Le applicazioni di oggetti stampati tramite FDM sono molteplici e presenti in molti settori dell'industria manifatturiera e del design; in Figura 2.6 se ne riportano alcuni esempi.



Figura 2.6 Esempi di oggetti prodotti tramite stampante FDM (printernet.co.uk, 2015)

Altra tecnica fondamentale è la **stereolitografia (SLA)**. È questa la prima tecnica di prototipazione rapida in assoluto (il primo brevetto risale al 1986), ma rimane sempre una delle più diffuse, dal momento che permette di ottenere oggetti con una perfetta finitura superficiale. Il suo funzionamento è schematizzato in Figura 2.7.

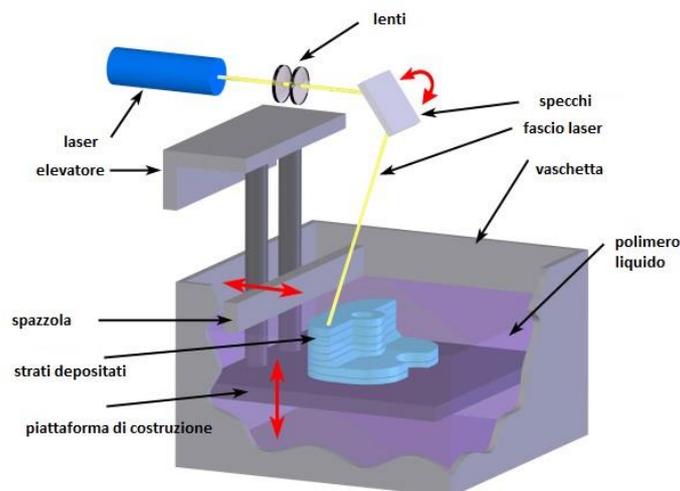


Figura 2.7 Stampante SLA (Hanzlicek, 2014)

Sostanzialmente, si ha un fascio laser che viene collimato in modo selettivo, grazie a degli specchi, solo sulla porzione di resina che si intende reticolare. La piattaforma sulla quale man mano reticolano e dunque si formano i vari strati dell'oggetto finale, è in grado di abbassarsi, permettendo la deposizione progressiva di nuovi strati (Hanzlicek, 2014).

Come intuibile dalla necessità del fascio laser, questo tipo di stampante, non viene utilizzata con dei polimeri termoplastici, bensì trova applicazione con le resine fotosensibili, soprattutto quelle di tipo acrilico e metacrilico, anche se in alcuni casi sono stati ottenuti componenti con resine epossidiche (Hanzlicek, 2014).

Grazie proprio alla possibilità per la SLA di realizzare componenti estremamente dettagliati e con perfetta finitura superficiale, essa viene molto frequentemente adoperata per produrre oggetti che subiranno poi test sulla qualità dell'accoppiamento in fase di esercizio, verifiche dimensionali o ancora, studi di ergonomia (Hanzlicek, 2014).

L'ultima tipologia di stampante per produzioni 3D è quella di tipo **Digital Light Processing (DLP)**, mostrata in Figura 2.8, che – come sarà presentato nel Capitolo 4 relativo ai materiali e metodi dello studio sperimentale svolto – è la tipologia utilizzata nel corso di questo lavoro di tesi e può essere considerata un'evoluzione della stampante SLA.



Figura 2.8 Stampante DLP

Il principio su cui si basa la DLP è sintetizzato in Figura 2.9. Una soluzione polimerica è inserita all'interno di una vaschetta recante un vetro trasparente. Sulla vaschetta viene fatta aderire la piattaforma sulla quale i vari strati di materiali si depositeranno, tramite progressivo scorrimento verso il basso. La reticolazione avviene irraggiando generalmente con luce visibile (400-700 nm) dal basso verso l'alto attraverso il vetro della vaschetta contenente il liquido da polimerizzare. A differenza di altre tecniche viste, qui, la piattaforma di costruzione scorre verso l'alto man mano che la produzione dell'oggetto procede. Alla fine del processo la piattaforma sarà elevata al suo massimo livello e l'oggetto, che risulterà attaccato dalla base, verrà delicatamente rimosso tramite l'aiuto di un raschietto.

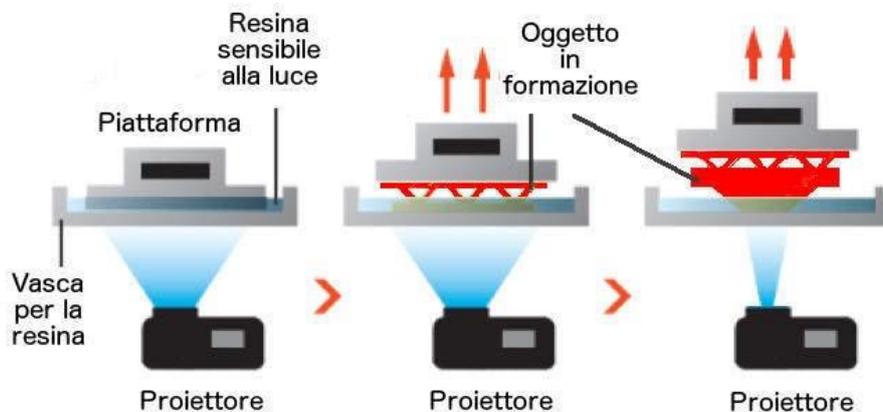


Figura 2.9 Schema di funzionamento di una stampante DLP

Al centro della tecnologia DLP vi è il dispositivo digitale a microspecchi (**DMD-Digital Micromirror Device**), (Hornbeck, 1997). Questi, altro non è che un modulatore di luce; trattasi di un microchip sulla cui superficie sono posti milioni di specchi, ai quali è offerta la possibilità di muoversi in modo totalmente indipendente gli uni dagli altri. Il dispositivo DMD è utile al fine di incrementare la risoluzione conseguibile in fase di stampa ed anche le velocità del processo. È grazie a questo microchip che una stampante DLP può stampare singoli pixel, garantendo risoluzioni molto alte (Hornbeck, 1997).

I materiali con cui normalmente viene impiegata una DLP sono delle formulazioni di fotopolimeri, quali tipicamente acrilati polifunzionali e metacrilati, spesso additivati con un componente non polimerico al fine di ridurre la percentuale di ritiro volumetrico e le deformazioni conseguenti (Hornbeck, 1997).

Prima di affrontare le varie tipologie di tecnologie in commercio, si era accennato alla presenza di materiali biologici tra i possibili materiali da stampa 3D. In effetti, accanto alle più comuni classi di materiali metallici, ceramici e polimerici, si è fatta largo, negli ultimi decenni, questa nuova categoria, con la quale si annoverano materiali consistenti di cellule, tessuto cartilagineo e tessuto osseo (Murphy et al., 2014).

Il mondo della stampa 3D non poteva certamente essere indifferente a questa innovazione, ed è per questo che la ricerca ha prodotto dei sistemi di stampa *ad hoc*, adibiti appositamente alla creazione di oggetti per il mondo biomedicale, quali protesi impiantabili, *scaffolds*, sistemi bioerodibili e sistemi per il rilascio controllato di farmaci. Questa branca di additive manufacturing per materiali biologici viene denominata 3D bioprinting.

2.2. 3D printing di materiali biocompatibili

I materiali di uso biomedico stampabili tramite tecniche additive sono generalmente classificabili in due classi:

1. Materiali biologici veri e propri, quali quelli utilizzati in ingegneria tissutale, quali collagene, alginati, gelatina, cellulosa (Ratner et al., 2004)
2. Materiali non biologici, ma comunque biocompatibili, quali vetri bioattivi, idrossiapatite sintetica, cementi ossei, polietilenglicole, acido polilattico (Ratner et al., 2004).

Oltre alla stampa di materiali biologici veri e propri, quindi, spesso il 3D bioprinting trova applicazione con materiali non prettamente biologici, ma comunque in grado di soddisfare i requisiti strutturali, funzionali e di biocompatibilità minimi (Murphy et al., 2014).

Nel corso di questa tesi verrà descritto un lavoro sperimentale basato proprio sull'utilizzo di molecole sintetiche, quali il polietilenglicole-diacrilato (PEGDA). Il vantaggio principale di tali materiali rispetto ai materiali propriamente biologici risiede nella possibilità di ottenere una funzionalizzazione puntuale, fondata sulle esigenze richieste da una particolare applicazione.

Nonostante scopo della tesi sia una trattazione concernente la seconda tipologia di materiale utilizzabile nel bioprinting, si ritiene comunque utile – ai fini di costruire un quadro il più completo possibile – fornire una trattazione generale anche sulla prima tipologia, data la sua importanza applicativa. Nel seguito sarà quindi presentata una panoramica su entrambe le classi.

2.2.1. Bioprinting di materiali biologici

Rispetto alla stampa 3D tradizionale, il bioprinting di materiali biologici comporta una serie di complessità ulteriori, quali la scelta del materiale, la presenza o meno di fattori di crescita e differenziazione, nonché la necessità di adattare la tecnica alla sensibilità delle cellule viventi.

In generale, si può affermare che la stampa 3D di sostanze biologiche possa essere basata su uno tra i seguenti tre approcci fondamentali: la “**Biomimetica**”, “**l’Auto-Assemblaggio Autonomo**” e la “**Costruzione di blocchi di Mini-Tessuto**” (Murphy et al., 2014).

La biomimetica o biomimesi è “*la disciplina che studia e imita le caratteristiche degli esseri viventi come modello cui ispirarsi per il miglioramento di attività e tecnologie umane*” (Treccani, 2018). Nel caso particolare in esame, l’approccio biomimetico si basa sul tentativo di riprodurre specifici componenti cellulari tissutali, aventi una funzione peculiare; necessita pertanto di una conoscenza estremamente dettagliata del mondo “micro”, ottenuta tramite lo studio approfondito del comportamento alla microscala del tessuto biologico.

La tecnica dell’auto assemblaggio autonomo permette invece di riprodurre il tessuto biologico a partire dallo sviluppo di un organo embrionale, utilizzato come guida. Per usufruire di questa metodica, è indubbia la necessità di una conoscenza adeguata dei meccanismi di generazione e sviluppo del tessuto embrionale e della organogenesi, al fine di poter manipolare l’ambiente biologico e permettere al processo embrionale di verificarsi nel tessuto biostampato (Murphy et al., 2014).

Infine, esiste l’approccio basato sulla costituzione di mini-tessuto, definibile come il più piccolo componente strutturale e funzionale del tessuto, quale ad esempio un nefrone renale. Tali mini-tessuti possono essere formati separatamente e successivamente assemblati a creare una struttura di maggiori dimensioni. Per fare ciò si possono seguire due vie: la prima prevede l’autoassemblaggio di cellule sferiche in un macro-tessuto, tramite un design e un’organizzazione biologicamente ispirata; la seconda, più accurata, prevede la riproduzione ad alta risoluzione di un’unità strutturale e la successiva permesso a tale unità di assemblarsi in un macro-tessuto funzionale (Murphy et al., 2014).

Come si può intuire, indipendentemente da quale sia l’approccio produttivo scelto, è fondamentale possedere un’accurata conoscenza della composizione e dell’organizzazione dei componenti biologici.

A tal fine, sono molteplici le tecniche di analisi utilizzate, ma le principali sono le tecniche di diagnostica per immagini, che costituiscono uno strumento fondamentale spesso non distruttivo per ottenere informazioni circa la struttura e la funzionalità dei componenti biologici, a livello cellulare, tissutale ed organico.

Tra le più comunemente impiegate nel settore biomedico, meritano nota la “**Computer Tomography**” o “**Tomografia Computerizzata**” (TC) e la “**Magnetic Resonance Imaging**” o “**Risonanza magnetica**” (MIR). Accanto ad esse vengono utilizzati dei modelli matematici e dei software di design basati sul metodo CAD-CAM per riprodurre ed analizzare i dati collezionati.

La tomografia computerizzata si basa sull’assorbimento e relativa misura dell’attenuazione di raggi X da parte del campione tissutale. L’immagine viene ricostruita per strati. A seconda del numero atomico degli atomi presenti all’interno dello strato di campione analizzato, si ottiene una differente attenuazione del fascio, secondo la legge di assorbimento di *Lambert-Beer* (Equazione 2.1):

$$I(t) = I_0 e^{-\mu t} \quad 2.1)$$

dove $I(t)$ è l’intensità del fascio in funzione del cammino percorso nel mezzo (t), I_0 è l’intensità del fascio incidente, e μ è il coefficiente di attenuazione di massa (Hounsfield, 1973).

Nella risonanza magnetica invece, il campione di tessuto biologico viene sottoposto ad un campo magnetico statico, che induce l’orientazione secondo la propria direzione dello spin dei protoni del campione. Tale orientazione genera nel tessuto un piccolo campo magnetico indotto e alcuni movimenti oscillatori detti di “precessione”, dalla cui misura dipende il risultato dell’analisi (Slichter, 2013).

Preso conoscenza della struttura e della funzionalità del componente biologico di interesse e scelto il tipo di approccio di design più congruo alle proprie esigenze (tra approccio biomimetico, auto-assemblaggio e creazione di mini-tessuti), si può procedere con la stampa vera e propria.

A tal proposito, le tecnologie di più largo impiego sono tre e sono: **Inkjet, Micro-Estrusione e Stampa Assistita da Laser.**

Nella tecnologia Inkjet – rappresentata in Figura 2.10 – il materiale da costruzione (tipicamente un polimero termoplastico o una sostanza biologica) e un agente di supporto sono mantenuti nel loro stato fuso all'interno di una riserva riscaldata. Questi sono quindi iniettati all'interno di una testa di stampa, dalla quale sono eiettati e depositati in forma di goccioline su di un supporto. Non appena raggiungono il substrato, sia il materiale da costruzione sia l'agente di supporto si raffreddano e solidificano all'istante. A questo punto un rullo cilindrico si muove sulla superficie per smussarne le rugosità, e nel frattempo le particelle asportate vengono aspirate da un collettore. Dopodiché, come in molte altre tecniche, la piattaforma si abbassa per consentire la deposizione e formazione di un nuovo strato dell'oggetto finale (Murphy et al., 2014).

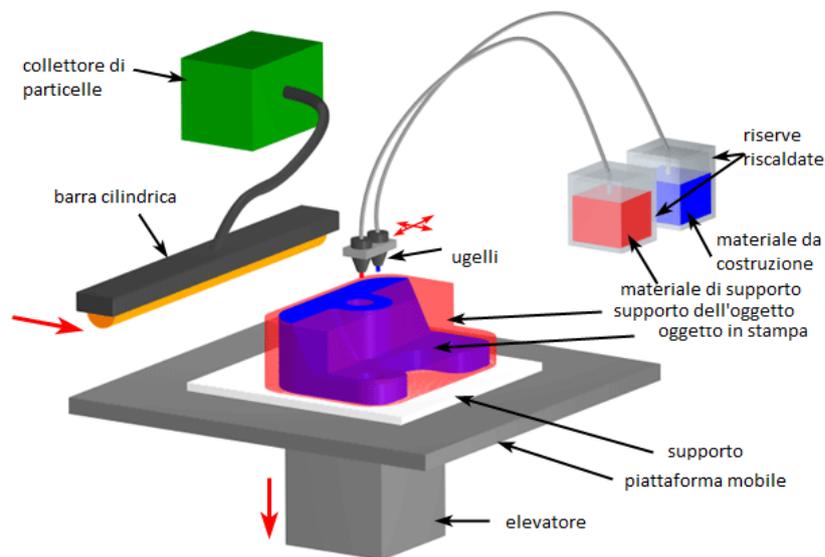


Figura 2.10 Stampante Inkjet (custompartnet.com, 2018)

Nella tecnologia per il bioprinting, l'inchiostro viene rimpiazzato con del materiale biologico. In questa tipologia di stampante, energia termica o acustica viene utilizzata per formare delle gocce di liquido ed eiettarle su di un substrato, dove prende forma il prodotto da stamparsi.

Per quanto riguarda l'ambito biologico, è stato dimostrato che l'energia termica, contrariamente a quanto si possa immaginare, è comunque adottabile, in quanto le temperature raggiunte (200-300°C), se mantenute per brevi lassi di tempo, pari all'ordine dei μ s, non sono dannose per le molecole biologiche, quali ad esempio il DNA (Murphy et al., 2014). Pertanto, se esiste la possibilità di scelta, il metodo termico è preferibile, in quanto consente maggiori velocità di stampa, costi inferiori, e una maggiore gamma di applicazioni possibili. Ad ogni modo, i rischi di esposizione delle cellule a stress di tipo termico e meccanico e la possibilità di generare gocce di dimensione non uniforme, vanno presi in considerazione (Murphy et al., 2014).

In alternativa, come accennato pocanzi, si può adottare un principio di eiezione acustico. In questo caso, all'interno delle teste della stampante, è presente un cristallo piezoelettrico, dal quale viene generata un'onda acustica in grado appunto di frammentare il liquido in piccole gocce, lasciate cadere una ad una in modo regolare sul supporto (Murphy et al., 2014). Uno dei principali vantaggi della tecnica acustica risiede nella possibilità di formare delle gocce di dimensione regolare. Oltre a ciò, è importante la direzionalità garantita

alle stesse in fase di eiezione. Tuttavia, le frequenze utilizzate dalla stampante, si aggirano in questo caso tra i 15 e i 20 kHz, e questo potrebbe danneggiare le cellule: va pertanto effettuata un'accurata analisi preliminare prima di procedere con la stampa (Murphy et al., 2014).

In generale, a prescindere dalla tipologia di stampante adottata, la viscosità del liquido non deve essere molto alta: si stima come valore soglia una viscosità non superiore a 10 cP, onde evitare una richiesta di pressione troppo elevata per depositare il materiale da stampare (Murphy et al., 2014).

Per quanto concerne invece la stampa tramite microestrusione, questa sostanzialmente si basa sul modello FDM e i suoi principali metodi di deposizione si basano su sistemi pneumatici o meccanici a pistone o a vite (Jones, 2012). Questi ultimi offrono un controllo di deposizione più diretto rispetto ai primi, aventi invece problemi di ritardo causato dal gas compresso. Dal canto loro, i sistemi a controllo pneumatico sono più semplici e ben adattabili a materiali ad alte densità (Jones, 2012).

In generale, rispetto alle altre tecniche di stampa, la microestrusione consente di depositare densità di cellule molto elevate, ma per contro la possibilità di sopravvivenza del materiale biologico depositato è ridotta, a causa degli stress di taglio in esso indotti (Murphy et al., 2014).

Infine, con la stampa SLS, dettagliata precedentemente, è invece possibile stampare fluidi biologici aventi una viscosità compresa tra 1 e 300 mPa/s, ottenendo densità di celle fino a 10^8 cellule/ml (Murphy et al., 2014).

Un confronto tra le principale tecniche di bioprinting con materiali biologici è riportato in Tabella 2.1. In essa vengono sostanzialmente riassunti i principali parametri scorsi nei paragrafi precedenti, ponendo inoltre l'accento su fattori differenti, quali la viscosità del materiale, il costo, il tempo di indurimento e la capacità di sopravvivenza cellulare (Murphy et al., 2014).

Tabella 2.1 Confronto tra le principali tecniche di bioprinting (Murphy et al., 2014)

Parametro	Inkjet	Microestrusione	Assistita da laser
Viscosità del materiale	3.5–12 mPa/s	Da 30 mPa/s a $> 6 \times 10^7$ mPa/s	1–300 mPa/s
Metodo di indurimento	Chimico, Fotoreticolazione	Chimico, Fotoreticolazione, Termico	Chimico, Fotoreticolazione
Tempo di preparazione	Breve	Da breve a medio	Da medio a lungo
Velocità di stampa	Veloce (da 1 a 10000 gocce/s)	Lento (10–50 $\mu\text{m/s}$)	Medio-veloce (200–1600 mm/s)
Risoluzione o dimensione delle gocce	50 μm	5 μm	Risoluzione alla microscala
Possibilità di sopravvivenza cellulare	> 85%	40-80%	> 95%

Parametro	Inkjet	Microestrusione	Assistita da laser
Densità cellulare	Bassa, 10^6 cellule/ml	Alta, cellule sferoidali	Media, 10^8 cellule/ml
Costo della stampante	Basso	Medio	Alto

2.2.2. Bioprinting di materiali non biologici

Tra i requisiti minimi da soddisfarsi per un materiale sintetico vi sono la biocompatibilità, la produzione di prodotti di degradazione non tossici e il mantenimento delle proprietà meccaniche in esercizio (eccezion fatta per i polimeri biorassorbibili). A tal proposito, risultano particolarmente interessanti sostanze come gli idrogel sintetici, che permettono il controllo delle proprietà fisiche già in fase di sintesi (Ratner et al., 2004).

Uno studio più accurato concernente le proprietà minime richieste ad un materiale per biostampa, indica cinque principali classi di caratteristiche da soddisfare: stampabilità, biocompatibilità, cinetica di degradazione e formazione di prodotti non tossici, proprietà meccaniche e strutturali, biomimesi (Ratner et al., 2004). Tali classi sono dettagliate in Tabella 2.2.

Tabella 2.2 Proprietà e requisiti dei materiali per biostampa (Ratner, 2004)

Classe di proprietà	Requisiti da controllare
Stampabilità	<ul style="list-style-type: none"> • Viscosità; • Assottigliamento al taglio; • Tendenza al crosslink;
Biocompatibilità	<ul style="list-style-type: none"> • Assenza di risposta infiammatoria nel bersaglio;
Cinetica di degradazione e formazione di prodotti non tossici	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilità di controllo della degradazione; • Rispetto della cinetica con cui le cellule si sostituiscono al materiale impiantato; • Non tossicità dei prodotti di degradazione; • Rapido metabolismo dei prodotti di degradazione;
Proprietà meccaniche e strutturali	<ul style="list-style-type: none"> • Capacità di mantenimento delle proprietà in esercizio; • Capacità di soddisfare selettivamente proprietà adatte alla pelle, alla cartilagine oppure all'osso;
Biomimesi	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilità di adesione al bersaglio; • Possibilità per le cellule di migrazione, proliferazione e differenziazione; • Compatibilità per cellule di tipo sia endogeno sia esogeno; • Rispetto di forma e dimensione naturale delle cellule.

Come illustrato in Tabella 2.2 per la stampabilità sono requisiti importanti la viscosità e con essa l'assottigliamento al taglio del materiale in esame, mentre per la biocompatibilità vengono presi in considerazione altri fattori, quali la non tossicità del materiale e la capacità, nel caso di un materiale

biorassorbibile, di degradarsi in tempi veloci e senza dare origine a prodotti tossici. Oltre a ciò, vanno tenute in conto le proprietà meccaniche e strutturali del materiale prescelto, esaminando ad esempio vincoli di mantenimento delle proprietà in esercizio, soprattutto nel caso in cui sia prevista un'adesione variabile nel tempo con la matrice biologica (materiali biorassorbibili) (Ratner et al., 2014).

Differenti materiali di sintesi sono in grado di rispondere in modo positivo a queste esigenze. Una sommaria classificazione è riportata in Tabella 2.3, dove le varie classi di materiali sono associate al tipo di stampante normalmente utilizzato per la loro messa in forma.

Tabella 2.3 Materiali e processi per biostampa (Bose et al., 2013)

Processo	Materiali
InkJet	PCL Idrossiapatite (HA) Vetri bioattivi Vetri bioattivi mesoporosi/compositi alginati PLA PEG Vetri PLA/(PEG)/G5 Poli(idrossimetilglicolide-co-e-caprolattone) Vetro bioattivo 6P53B
Selective Laser Sintering	PCL Nano HA Calcio fosfato(CaP)/poli(idrossibutirrato-co-idrossivalerato) (PHBV) Idrossiapatite carbonata (CHAp)/poli(L-acido lattico) (PLLA) PLLA-fosfato tricalcico (TCP) PHBV
Stereolitografia	Poli(propilene fumarato)(PPF)/dietil fumarato (DEF) PPF/DEF-HA PDLLA/HAb-TCP
Fused Deposition Model	Fosfato tricalcico (TCP) TCP/polipropilene (PP) Allumina PCL TCP/PCL

In Tabella 2.3 è possibile vedere quali siano i principali materiali impiegati per ciascuna tipologia di stampante: tali materiali sono generalmente classificati tenendo in considerazione i requisiti necessari a ciascun processo (viscosità del materiale, proprietà meccaniche e strutturali, biocompatibilità) (Bose et al., 2015).

2.3. Applicazioni dei materiali stampati tramite 3D bioprinting

Il 3D bioprinting ha innumerevoli sbocchi applicativi nel campo della bioingegneria tissutale, spaziando dalla produzione di ossa e denti, alla costituzione di protesi vascolari, fino alla formazione di strutture porose, denominate “*scaffolds*” (Kang, 2015).

Questi ultimi, un cui esempio è riportato in Figura 2.11, sono spesso effettuati mediante stampa con SLS, Inkjet o fusione di polveri ceramiche a base di calcio fosfato e fosfato tricalcico, ma talvolta anche con polietilene. I vantaggi dell’impiego di tali materiali risiedono nella loro biocompatibilità, nell’osteoconduttività e nella riproducibilità della struttura ossea naturale (Kang, 2015).

Essenzialmente, utilizzare un processo di additive manufacturing per produrre degli scaffolds consente un perfetto controllo della distribuzione di taglie dei pori e permette di scegliere il grado di interconnessione dei medesimi. Tale possibilità di gestione circa la percentuale di porosità in volume permette di formare un prodotto con le caratteristiche meccaniche il più possibile vicine a quelle desiderate, che possono inoltre essere ulteriormente migliorate tramite la scelta di un opportuno post-trattamento o tramite l’aiuto di alcuni modificatori di composizione, quali tipicamente ossidi di Silicio o Zirconio (Kang, 2015).

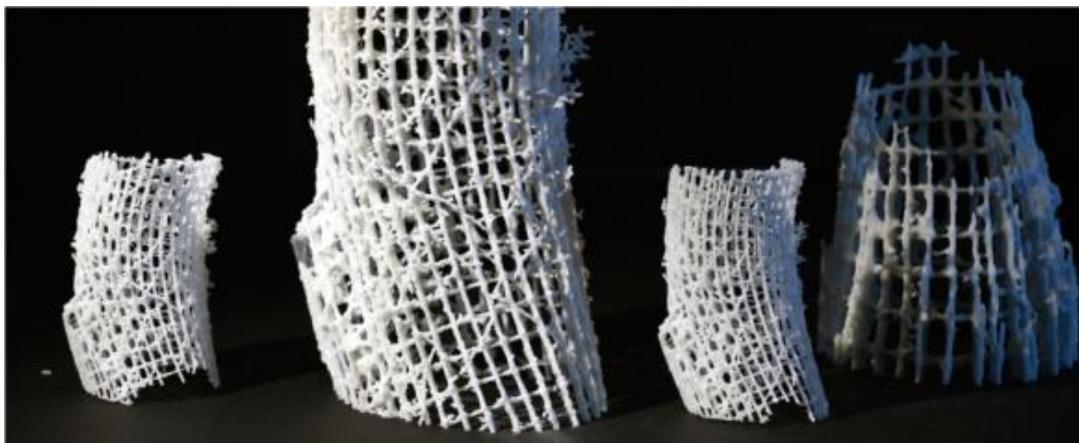


Figura 2.11 Esempio di scaffolds ottenuti per biostampa (Horizon-magazin.eu, 2014)

In generale, è possibile affermare che la resistenza a compressione di uno scaffold aumenta al diminuire della taglia dei pori (Bose et al., 2013). Alcuni studi hanno dimostrato come sia possibile – per scaffolds in TCP – avere una resistenza pari a 10.95 ± 1.28 MPa per scaffolds recanti pori di taglia media di $500 \mu\text{m}$, con una percentuale totale di porosità aperta del 42% (Bose et al., 2013).

Un modo innovativo per incrementare le proprietà meccaniche di uno scaffold prevede l’infiltrazione di un polimero o di un monomero, quale ad esempio una miscela di mismetacrilato oligolattide (DLM-1) contenente il 10% w/w di idrossietilmetacrilato (Bose et al., 2013).

Oltre agli scaffolds, come sopraccitato, tramite bioprinting è possibile produrre delle strutture cilindriche atte alla costruzione di protesi vascolari, come illustrato in Figura 2.12. Queste vengono formate a partire da un bioinchiostro successivamente estruso a formare dei cilindri, mono o multi-canale (Norotte, 2013).



Figura 2.12 Protesi vascolare costruita tramite biostampa (3dprintmagazine.com, 2017)

Per quanto concerne poi il campo dell'ingegneria tissutale, i materiali più diffusi sono degli idrogel. Ad esempio, l'unione di silicone, condrociti e nanoparticelle conduttive di argento, ha permesso di produrre un orecchio sintetico, come mostrato in Figura 2.13 (Mannoor et al., 2013).



Figura 2.13 Orecchio sintetico di silicone, condrociti e argento (Mannoor et al., 2013)

Cambiando tipologia di campo applicativo, merita nota l'utilizzo della stampa 3D nella produzione di dispositivi atti al rilascio controllato di farmaci. Questi sistemi impiantabili sono fabbricati stampando una soluzione in grado di solubilizzare una determinata polvere, al di sopra di un letto di polvere, costituente il farmaco. Tipicamente si producono dei film dello spessore di circa 200 μm (Pisano, 2014). Tramite questa tecnologia è possibile sintetizzare dispositivi per il rilascio controllato di differenti tipologie di farmaci. Parlasti di rilascio controllato poiché – a partire dal design in CAD dell'elemento da produrre – è possibile ottenere diverse cinetiche di rilascio. Oltre a ciò, il prodotto finale può presentarsi in varie geometrie e addirittura contenere più tipologie di farmaco, depositate sul medesimo sistema impiantabile (Pisano, 2014).

Nel corso di questa tesi, come anticipato, si è fatto utilizzo del PEGDA come materiale principale per la stampa. Il PEGDA – nel corso dello sviluppo delle tecnologie basate sul bioprinting – ha trovato impiego nella produzione di dispositivi microfluidici (Pisano, 2014). In questo caso, si è utilizzata una stampante stereolitografica per conseguire dei dispositivi aventi dei canali microfluidici a sezione rettangolare, aventi dimensioni di 150x300 μm (Qaderi, 2015).

2.3.1. Applicazioni del sistema PEGDA-BSA

Questo lavoro di tesi verte sulla stampa 3D di un film in PEGDA contenente proteine, in particolar modo della BSA. Nell'intento di comprendere a fondo l'interazione tra queste due sostanze, è utile offrire uno sguardo anche ad altre applicazioni, risultato di tecnologie differenti, nelle quali il polimero si trova a lavorare in sinergia con questa proteina.

Un primo e significativo esempio concerne il rilascio di BSA da un idrogel di PEGDA (Lin et al., 2006). In effetti, gli idrogel polimerici sono stati spesso utilizzati per la sintesi di matrici atte al rilascio controllato di farmaci. Nel lavoro citato, miscelando PEGDA e BSA disciolta in un tampone salino (PBS, Phosphate buffer solution), Lin e la sua équipe sono riusciti a sintetizzare un idrogel, in grado di rilasciare della proteina, in

maniera direttamente proporzionale alla quantità inserita nella miscela di partenza, come illustrato in Figura 2.14 (Lin et al., 2006).

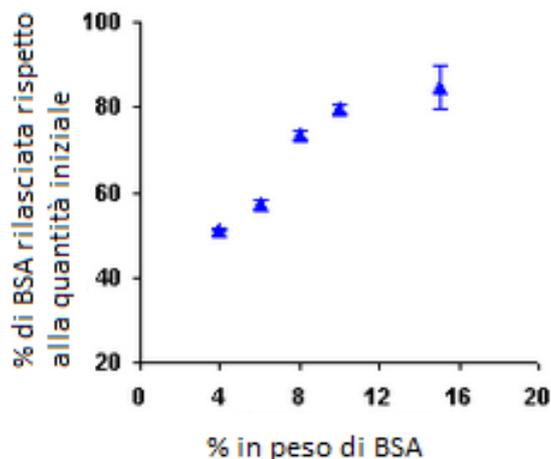


Figura 2.14 Rilascio di BSA da parte di un idrogel sintetico (Lin et al., 2006)

La medesima argomentazione, ovvero il rilascio di BSA da un idrogel di PEGDA, è poi stata studiata anche da altri autori, che sono riusciti a dimostrare come – considerando una soluzione composta dal 30% PEGDA, 66% PBS e 4% BSA – il rilascio avvenga totalmente nell’arco di 1h (Boon et al., 2003).

Oltre agli studi sul rilascio, meritevole di nota è senza dubbio la ricerca nella quale si descrive la produzione di uno scaffold in PEGDA con BSA, al fine di creare un materiale per la matrice extracellulare avente potenziali applicazioni nel campo dell’ingegneria tissutale (Wang et al., 2015). Lo stesso gruppo di ricerca si è poi occupato di produrre differenti tipologie di superficie, in modo da studiare su quale di esse l’adesione cellulare fosse migliore (Wang et al., 2015). Tali superfici sono state generate tramite crosslinking della proteina iniziale a costituire o un coating oppure una struttura 3D spugnosa, emulante la morfologia naturale di una struttura ECM (Wang et al., 2015).

2.4. Fotoreticolazione di una formulazione polimerica

Le tecniche presentate per la stampa 3D di una formulazione polimerica, si basano tutte sulla sua fotoreticolazione. Proprio per questa ragione è indispensabile comprenderne i principali meccanismi chimici.

Quando si parla di “*fotoreticolazione*” o “*fotopolimerizzazione*” ci si riferisce ad un processo di interazione tra la formulazione liquida ed una radiazione luminosa, che normalmente ha una lunghezza d’onda appartenente allo spettro dell’ultravioletto, ma che in alcuni casi può anche essere infrarossa oppure visibile (Sangermano, 2014). In quest’ultimo caso, esiste la concreta possibilità di ridurre i rischi operativi, dal momento che le lampade visibili o LED sono sicuramente meno dannose per gli occhi (Sangermano, 2014).

Il processo di reticolazione per via luminosa può avvenire secondo un meccanismo di addizione a stadi o a catena. A prescindere da quale sia poi il metodo di crescita seguito, in generale è fondamentale l’assorbimento della radiazione luminosa da parte di una molecola contenuta all’interno della formulazione polimerica di partenza. Questa molecola è il fotoiniziatore e la sua caratteristica imprescindibile è quella di avere un gap energetico tra lo stato fondamentale e lo stato eccitato esattamente uguale all’energia associata al fascio di luce

utilizzato in fase di irraggiamento. Infatti, solo in questo caso, la molecola sarà in grado di assorbire la radiazione.

Il cammino più diffuso, nonché quello utilizzato in questo lavoro di tesi, è quello che prevede una reazione di addizione. Se quest'ultima è di tipo radicalico, significa che la specie propagante la catena è un radicale, mentre se è di tipo ionico significa che è uno ione: in modo particolare si parlerà di addizione cationica se lo ione è positivo, anionica se lo ione è negativo (Sangermano, 2014).

Le resine oggetto della parte sperimentale presentate al Capitolo 4, seguono una polimerizzazione radicalica, per la quale il processo può essere schematizzato come in Figura 2.15.

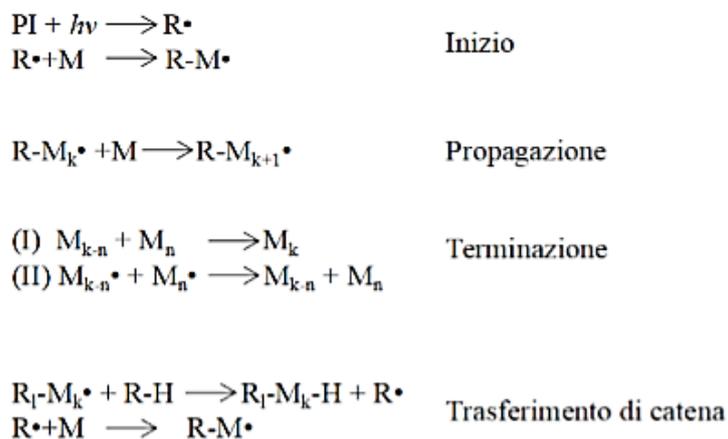


Figura 2.15 Schema di una polimerizzazione radicalica (Sangermano, 2014)

Il fotoiniziatore (PI, in Figura 2.15), in seguito all'interazione con la radiazione luminosa, origina una specie radicalica (R), la quale va a reagire con il monomero (M) dando origine allo stadio di propagazione della catena. Dopo la fase di propagazione vi è lo stadio di terminazione della catena: questo, come illustrato, può avvenire per accoppiamento o disproporzione. In alternativa alla terminazione di catena classica, può avvenire un trasferimento di catena: se così capita, il macroradicalico che sta crescendo interagisce con un'altra catena e a questa strappa un protone, spegnendosi. Al contempo però una nuova specie macroradicalica si è formata dalla catena che ha donato l'idrogeno. Ogni volta che avviene un trasferimento di catena, il grado di reticolazione del polimero finale diventa maggiore.

Tornando ora al fotoiniziatore, vi è da dire che quando questo assorbe l'energia della radiazione dà origine alla specie radicalica. Quando si generano due radicali liberi in seguito ad una scissione omolitica del legame in posizione α ad un carbonio, si parla di fotoiniziatori del tipo Norrish I: la maggior parte dei fotoiniziatori di questo tipo sono dei composti aromatici carbonilici (Sangermano, 2014).

Quando invece il radicale libero si forma in seguito ad un'estrazione di idrogeno da un'altra molecola – detta coiniziatore e spesso coincidente con il monomero stesso – si è nel campo dei fotoiniziatori del tipo Norrish II: gran parte di questi fotoiniziatori viene annoverata tra i chetoni aromatici (Sangermano, 2014).

Infine, si vedranno ora i principali vantaggi e svantaggi di una resina fotopolimerizzabile.

Una resina fotopolimerizzabile consente un sensibile risparmio energetico e dunque economico rispetto ai processi tradizionali, garantendo inoltre un ridotto impiego di VOC (volatile organic compound). Il risparmio energetico è diretta conseguenza dei rapidi tempi di reticolazione e della elevata produttività associata (Sangermano, 2014). Oltre a ciò, un ulteriore vantaggio risiede nell'ampia disponibilità sul mercato di monomeri fotopolimerizzabili per via radicalica (Sangermano, 2014).

D'altro canto, gli svantaggi non mancano. Su tutti, nei processi di fotopolimerizzazione classica si era confinati a uno spazio di geometria bidimensionale e con spessori relativamente piccoli (<1 mm) perché la reazione può ovviamente avvenire solo per esposizione diretta alla luce (Sangermano, 2014). Questo svantaggio è stato superato grazie alla stampa 3D. Tuttavia, allo stesso tempo, è necessario un fotoiniziatore che possieda uno spettro di assorbimento della radiazione luminosa compatibile con la sorgente utilizzata e che non entri in competizione con un eventuale colorante presente nella formulazione (Sangermano, 2014). Quest'ultimo, se dosato opportunamente, è fondamentale per ottenere elevate risoluzioni di stampa poiché, essendo in grado di assorbire la radiazione incidente, collabora con il fotoiniziatore, permettendo un miglior controllo della profondità di penetrazione della radiazione (Sangermano, 2014).

Altre questioni che possono generare delle difficoltà sono poi la necessità di un trattamento di post-reticolazione per ottenere completa conversione, la presenza di solventi nelle formulazioni e il ritiro volumetrico. Infine, è bene non dimenticare la necessità di contrastare l'inibizione da ossigeno (fenomeno per cui l'ossigeno tende a reagire con i radicali polimerici, spegnendoli) tramite dei composti in grado di reagire con esso o per mezzo di gas inerte (Sangermano, 2014).

2.5. Coniugare una stampante DLP con un'applicazione biologica

Dopo aver illustrato le principali tecniche di additive manufacturing per le varie classi di materiali ed aver dato un quadro generale sullo stato dell'arte in materia di bioprinting, si giunge ora al cuore di questo lavoro di tesi.

L'obiettivo è infatti quello di coniugare l'utilizzo di una stampante di tipo DLP – normalmente impiegata con materiali di tipo polimerico in campo non biologico – con un'applicazione in campo biologico, che viene invece solitamente conseguita utilizzando altre tecnologie di additive manufacturing.

L'intento nasce dalla considerazione dei vantaggi che una stampante DLP potrebbe apportare ad un dispositivo con applicazione nel settore biologico, quali ad esempio una migliore risoluzione e una maggiore velocità della stampa, nonché minori problemi di ritiro e una maggiore facilità operativa (Sangermano, 2014).

L'intento di questa tesi sarà, come già accennato, quello di utilizzare il PEGDA come materiale base e di immobilizzare una proteina nella sua matrice polimerica o sulla sua superficie. Prima di procedere con la parte sperimentale vera e propria, è quindi utile comprendere quali siano i possibili meccanismi di immobilizzazione proteica all'interno di una matrice polimerica, indipendentemente dal metodo di produzione della medesima. Su tale tematica verte appunto il successivo Capitolo 3.

3. Le proteine e la loro immobilizzazione

Nel corso di questo capitolo verranno anzitutto fornite le principali informazioni e definizioni circa le proteine e la loro struttura e funzione. In seguito si presenterà poi una panoramica inerente lo stato dell'arte delle principali tecniche di immobilizzazione delle medesime su di un generico materiale di supporto.

3.1. Struttura e funzione delle proteine

Le proteine sono il tipo di biomolecola più diffuso e anche per questo sono presenti in ogni cellula. Esse sono costituite da una sequenza di amminoacidi, legati insieme tramite formazione di un legame peptidico. Per amminoacido si intende una molecola formata da un carbonio centrale al quale sono legati un gruppo amminico, un gruppo carbossilico ed una catena laterale, diversa per ciascun amminoacido.

In Figura 3.1-A è mostrata la struttura tipica di un amminoacido, mentre in Figura 3.1-B è rappresentato lo schema della reazione di formazione del legame peptidico.

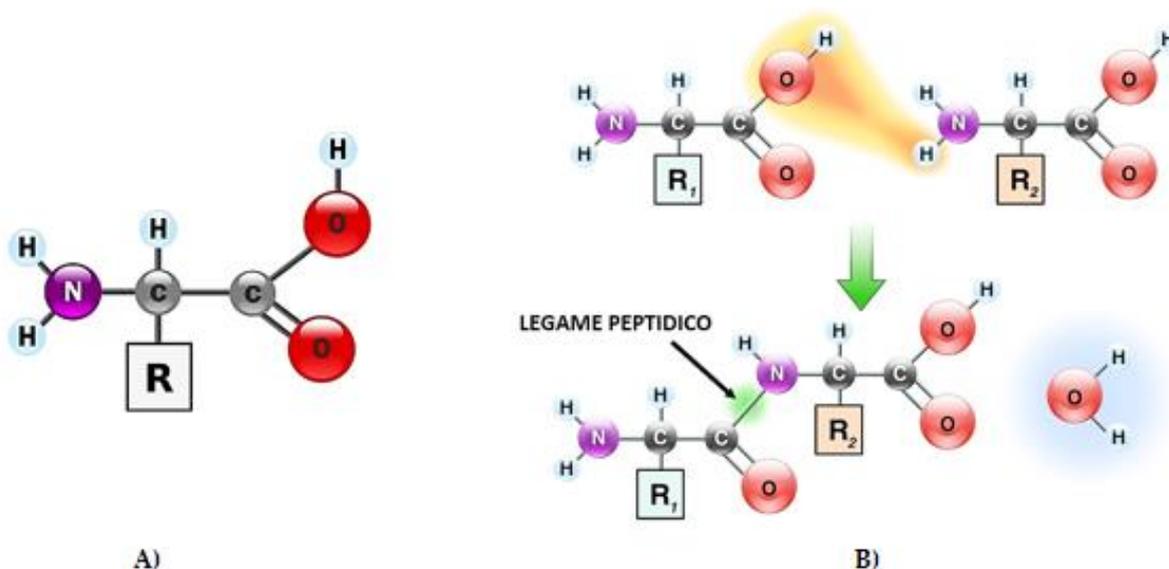
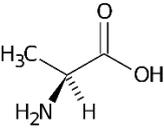
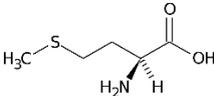
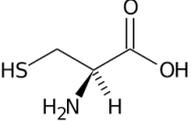
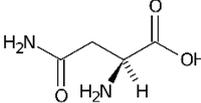
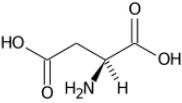
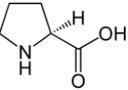
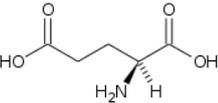
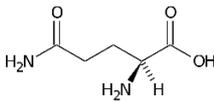
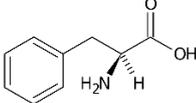
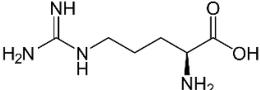
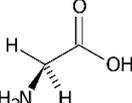
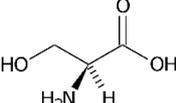
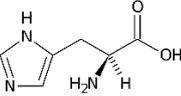
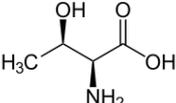
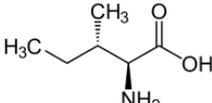
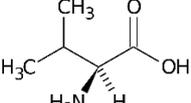
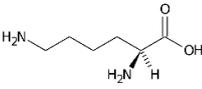
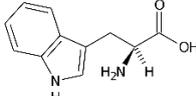
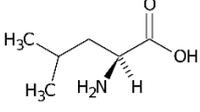
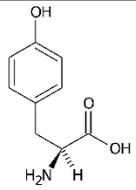


Figura 3.1 Struttura di un amminoacido (A) e formazione del legame peptidico (B), (chimica-online.it)

Gli amminoacidi che formano le proteine sono venti e sono riportati in Tabella 3.1.

Tabella 3.1 I 20 amminoacidi presenti nelle proteine

NOME	STRUTTURA	NOME	STRUTTURA
Alanina (Ala o A)		Metionina (Met o M)	
Cisteina (Cys o C)		Asparagina (Asn o N)	
Acido Aspartico (Asp o D)		Prolina (Pro o P)	
Acido Glutammico (Glu o E)		Glutamina (Gln o Q)	
Fenilalanina (Phe o F)		Arginina (Arg o R)	
Glicina (Gly o G)		Serina (Ser o S)	
Istidina (His o H)		Treonina (Thr o T)	
Isoleucina (Ile o I)		Valina (Val o V)	
Lisina (Lys o K)		Triptofano (Trp o W)	

Leucina (Leu o L)		Tirosina (Tyr o Y)	
------------------------------	---	-------------------------------	---

Le proteine, che sono per l'appunto formate da sequenze di questi amminoacidi, hanno una struttura particolare, legata alla loro funzione.

Questa struttura deriva dal fatto che le catene di amminoacidi, dette catene polipeptidiche, si ripiegano in strutture altamente ordinate e questi ripiegamenti minimizzano l'energia conformazionale (Caetano-Anolles et al, 2009). La teoria che spiega tale concetto è nota con il nome di "*ipotesi termodinamica*" e sostanzialmente consiste nell'ammettere che la struttura tridimensionale di una proteina nel proprio mezzo fisiologico (determinato dalle condizioni di pH, solvente, forza ionica, temperatura) sia l'unica nella quale l'energia libera di Gibbs assume il valore più basso possibile. Pertanto, la conformazione naturale di una proteina è sì determinata dalla sequenza di amminoacidi, ma anche dalla totalità delle interazioni interatomiche, in un dato ambiente fisiologico (Anfisen, 1973).

Furono Linderstrøm-Lang e Schellman, nel 1950, a intuire che la struttura di una proteina è in verità gerarchica, con quattro ordini di organizzazione, come mostrato in Figura 3.2.

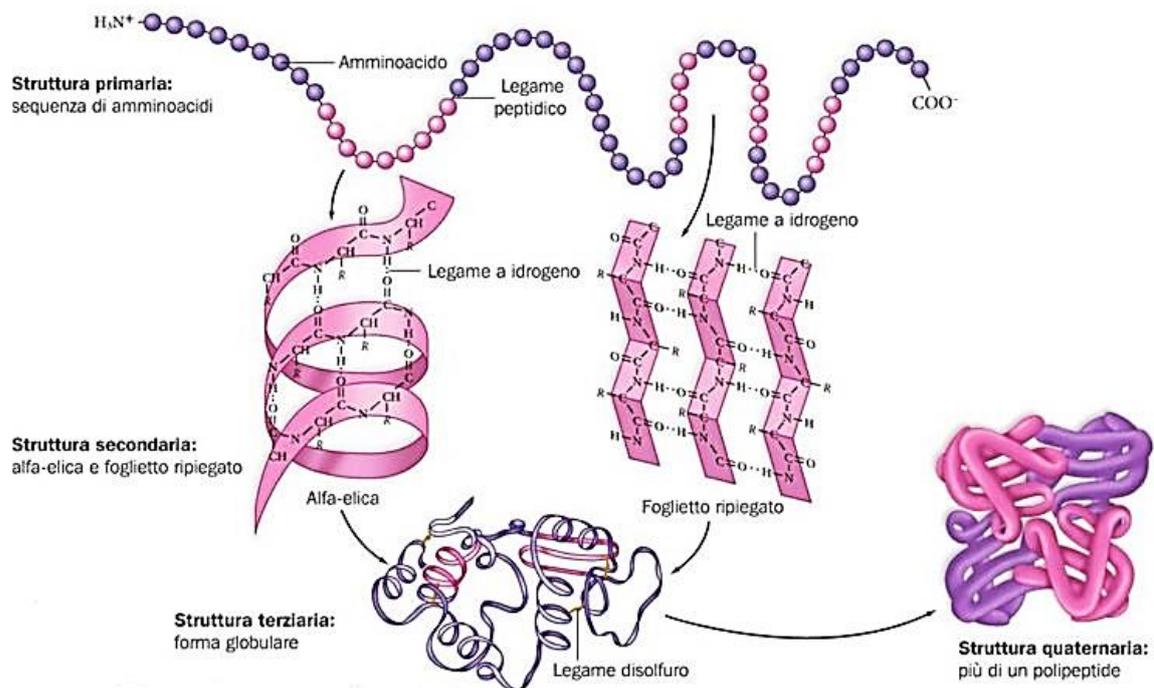


Figura 3.2 Classificazione delle strutture di una proteina (chimica-online.it)

Per l'appunto, la struttura primaria è quella costituita semplicemente dalla sequenza di amminoacidi ovvero dalla catena polipeptidica. La struttura secondaria si forma invece in seguito a legami idrogeno dei gruppi polari: le possibili tipologie di ripiegamento sono l' α -elica e il β -foglietto (Palau et al., 1982).

Nel caso di α -elica, la struttura è stabilizzata da legami idrogeno che hanno luogo all'interno della stessa catena, in modo particolare il caso più stabile sarebbe quello di un legame tra il gruppo CO di un amminoacido ed il gruppo NH_2 di un amminoacido situato quattro residui dopo il primo. In questo modo, vista la distanza tra due

successivi amminoacidi, per ogni giro dell'elica sono presenti 3.6 residui amminoacidi. Il caso di β -foglietto, è invece composto da due o più catene polipeptiche completamente estese: anche in questa struttura, la stabilizzazione è dovuta a legami idrogeno, ma questa volta di tipo intermolecolare (tra catene polipeptidiche adiacenti) e non più intramolecolare, come nel caso precedente (Berg et al., 2002).

Procedendo con la gerarchia strutturale, la struttura terziaria consta di un ulteriore ripiegamento stabilizzato da interazioni tra gruppi laterali della struttura secondaria. In tal caso, le interazioni coinvolte possono essere:

- Legami disolfuro;
- Legami idrogeno;
- Interazioni idrofobiche;
- Forze di Van der Waals;
- Legami ionici.

Infine, la struttura quaternaria implica l'aggregazione di catene polipeptiche separate in un'unica unità biologica supramolecolare (Friedrich, 2014).

Le forze coinvolte in questo caso possono essere:

- Interazioni idrofobiche;
- Legami idrogeno;
- Legami ionici.

Si pensi che una catena di 149 residui di amminoacidi, ciascuno avente due legami in grado di ruotare e due o tre orientazioni favorite o permesse, è in grado di assumere un numero compreso tra le 4^{149} e le 9^{149} conformazioni (Anfisen, 1973). Tuttavia, è necessario riferire che non tutti gli eventi di inizio ripiegamento (eventi di nucleazione) sono possibili, ma soltanto alcuni di essi, che tengono conto di uno sfondo implicito di regole stereochimiche (Anfisen, 1973). Come detto in precedenza, la struttura complessiva di una proteina definisce in modo puntuale la funzione cui la proteina stessa è preposta.

In termini generali, le proteine possono essere suddivise in base alla propria funzione, alla propria forma o in base alla propria natura chimica (Alberts, 2008).

In base alla funzione, le proteine possono ad esempio essere classificate in otto categorie principali (enzimi, ormoni, di trasporto, di riserva, di movimento, strutturali, di difesa, stress-responsive). In base alla forma, invece, le proteine possono essere fibrose, se il loro rapporto tra le diagonali è superiore a 10, oppure globulari, se il rapporto è inferiore a 10. Infine, se si osserva la natura chimica, si possono definire tre categorie: proteine semplici, coniugate e derivate. Quelle semplici sono costituite esclusivamente da amminoacidi, mentre le coniugate sono formate da proteine unite a molecole di tipo diverso, detto gruppo prostetico (quale un lipide, un carboidrato, un acido nucleico).

Quando una proteina si denatura, perde la propria struttura nativa e di conseguenza anche la propria funzione (Branden, 1999). Per questo motivo, quando si opera con delle proteine, è importante mantenere delle condizioni di processo che non ne provochino la denaturazione. Ad esempio, questo viene tenuto in conto nel caso in cui si voglia procedere con l'immobilizzazione di una proteina.

3.2. Metodi di immobilizzazione di una proteina

L'immobilizzazione di una proteina consiste nella sua adesione al di sopra o all'interno di un supporto inerte ed insolubile.

La scelta del materiale tiene conto di numerosi fattori (Bickerstaff G. F., 1997):

- Proprietà fisiche e meccaniche quali resistenza, area superficiale disponibile, forma, grado di porosità ed eventuale tipologia di porosità;
- Caratteristiche chimiche come idrofilia, inerzia, gruppi funzionali disponibili per processi di modifica;
- Caratteristiche di stabilità che potrebbero influenzare la resa e l'attività residua dell'enzima;
- Resistenza all'attacco di batteri, funghi, agenti chimici;
- Biocompatibilità;
- Rispetto di determinati requisiti economici e di impatto ambientale.

In Tabella 3.2 si riportano alcuni esempi di materiali tipicamente usati come supporto per l'immobilizzazione.

Tabella 3.2 Esempi di materiali spesso usati come supporti per l'immobilizzazione di una proteina (Guisan, 2006)

Inorganico	Organico	Biologico
Allumina	Polietilene	Cellulosa
Ossido di Nickel	Polistirene	Agarosio
Acciaio inox	Poliacrilato	Destrano
Vetro poroso	Nylon	Alginato
Silice porosa	Poliacrilammide	Amido
Silice fusa	Polimetilmetacrilato	Chitosano
Terra diatomacea	Polipirrolo	Osso
Ossidi di ferro	Polianilina	Collagene
Titania	Polifenolo	Gelatina
Pietra pomice	Poliestere	Liposomi
Zirconia	Polivinilalcole	Cellule
Carbonio attivo	Politetrafluoroetilene	Chitina
Oro	Polietilenglicole	Carragenina

I metodi di immobilizzazione sono molteplici e possono sommariamente essere suddivisi in metodi irreversibili e metodi reversibili.

I metodi irreversibili comprendono i metodi secondo i quali l'immobilizzazione avviene a seguito della formazione di un legame covalente e i metodi basati sull'intrappolamento interno.

Per quanto riguarda invece i metodi reversibili, questi comprendono l'adsorbimento, l'immobilizzazione tramite formazione di un legame ionico, di un legame per bioaffinità, di un legame metallico o ancora tramite la formazione di ponti disolfuro. In alcuni casi l'adsorbimento può anche essere considerato irreversibile perché la funzionalità della proteina può andare persa nel processo di attacco/distacco dalla superficie. Per semplicità in questo lavoro verrà descritto solo tra i metodi reversibili.

Una sintesi delle possibili tecnologie di immobilizzazione è riportata nello schema di Figura 3.3.

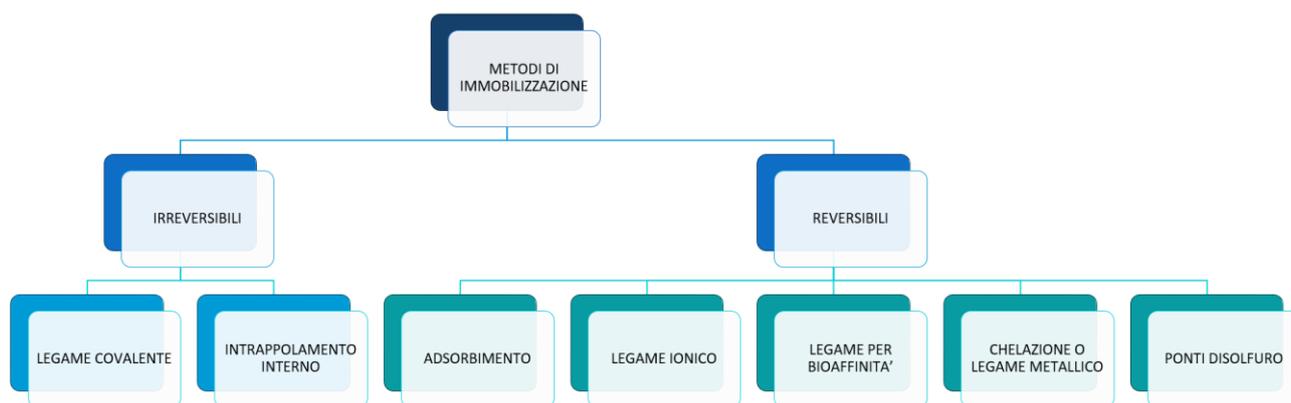


Figura 3.3 Schema dei principali metodi di immobilizzazione

Nel seguito saranno dunque descritti con maggiore dettaglio i diversi metodi di immobilizzazione.

3.2.1. Metodi irreversibili

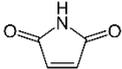
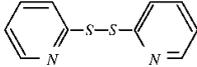
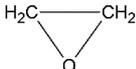
I metodi irreversibili sono quelli in cui la proteina immobilizzata non può essere più rimossa senza una consistente perdita di attività oppure senza una distruzione irreparabile del supporto (Guisan, 2006). Le tecnologie ad oggi note come irreversibili sono essenzialmente due: la formazione di un legame covalente e l'intrappolamento interno. Nel seguito ciascuna di esse verrà analizzata con maggior dettaglio.

3.2.1.1. Legame covalente

Il legame covalente nasce dalla presenza di determinati gruppi funzionali sulla proteina e di determinate funzionalità chimiche reattive nei loro confronti sul supporto. Degli esempi di binomi gruppo – funzione reattiva sono presentati in Tabella 3.3. Normalmente, se questi gruppi non sono presenti sulla superficie del materiale polimerico, è necessario modificare quest'ultima tramite radiazioni ionizzanti, gas plasma, grafting fotochimico o modifiche chimiche (Rusmini et al., 2007).

Tabella 3.3 Esempi di coppie di gruppi reattivi utili alla formazione di un legame covalente (Rusmini et al., 2007)

Gruppo funzionale della proteina	Gruppo funzionale necessario sul substrato	
-NH₂	Carbossilico	$\text{R}-\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{array}$
	Estere attivo (NHS)	
	Aldeidico	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \end{array}$
	Epossidico	

-SH	Maleimide	
	Piridil-disolfuro	
	Vinil-solfone	$\text{H}_2\text{C}=\text{S}(=\text{O})_2-$
-COOH	Amminico	NH_2-
-OH	Epossidico	

La formazione di un legame covalente con il supporto fa riferimento al concetto di crosslinking. Quest'ultimo è infatti definito come il processo chimico per cui due o più molecole vengono unite tra loro tramite un legame covalente (thermoscientific.com). In molti casi, per agevolare la formazione di un legame covalente tra il materiale di supporto e la proteina da immobilizzare si può utilizzare una molecola intermedia, ovvero un agente cross-linkante. Questo avviene soprattutto nei casi in cui i gruppi funzionali presentati in Tabella 3.3 non siano naturalmente presenti sul supporto scelto. La parte più importante di un agente di crosslinking sono i suoi gruppi reattivi. Ad esempio, l'1-Etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimide (EDC) è in grado di reagire con un gruppo carbossilico (presente sul supporto) producendo o-acilisourea, come mostrato in Figura 3.4. Questo intermedio di reazione reagisce a sua volta con il gruppo amminico primario presente sulla proteina, legando questa al supporto e rilasciando isourea come sottoprodotto di reazione (Crosslinker technical handbook, thermoscientific.com).

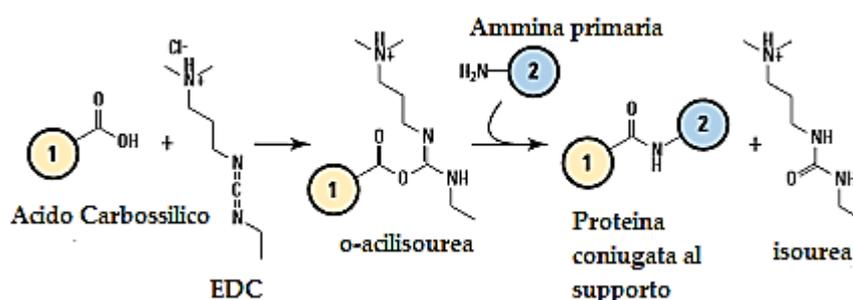


Figura 3.4 Reazione di crosslinking con EDC (thermoscientific.com)

Per migliorare ulteriormente la resa di reazione si possono far reagire congiuntamente EDC ed N-idrossisulfosuccinimide (sulfo-NHS). In questo caso, dopo che si è prodotto l'intermedio di reazione o-acilisourea, esistono tre strade percorribili. La prima è quella precedentemente descritta e non contempla alcun ruolo da parte dell'NHS. La seconda prevede invece semplicemente l'idrolisi dell'intermedio di reazione con produzione di altri gruppi carbossilici. Infine, la terza via prevede che l'intermedio acilisourea reagisca con la sulfo-NHS per produrre un nuovo intermedio stabile: è quest'ultimo a reagire con il gruppo amminico presente sulla proteina, legandolo in modo covalente al supporto (Crosslinker technical handbook, thermoscientific.com). Lo schema di reazione è rappresentato in Figura 3.5.

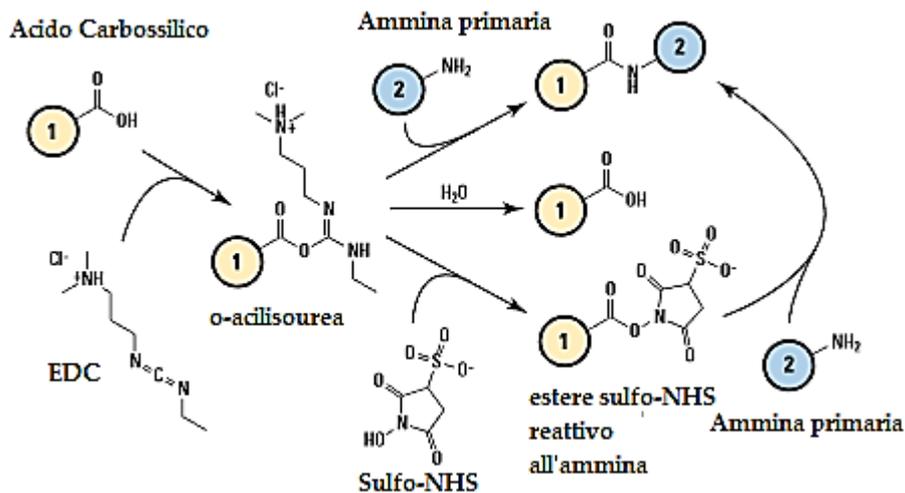


Figura 3.5 Reazione di crosslinking con EDC ed NHS (thermoscientific.com)

3.2.1.2. Intrappolamento

Un altro metodo di immobilizzazione irreversibile è l'intrappolamento. Questo può avvenire in gel, fibre o microcapsule, tramite legami di tipo covalente o non (Singh, 2009).

Nel caso di processi sol-gel ad esempio, si parte dalla formazione di un sol. Per fare questo, si miscelano a temperatura ambiente un precursore alcossido (quale il tetrametil-ortosilicato, TMOS o il tetraetil-ortosilicato, TEOS), acqua, un co-solvente, un catalizzatore acido o basico e la sostanza che si desidera intrappolare (Gupta et al., 2007). Dopodiché, in seguito a reazioni di idrolisi e condensazione, il sol si trasforma in gel. Una volta essiccato, questo darà origine essenzialmente ad un vetro poroso a base silicio: proprio in questi pori rimane intrappolata la proteina (Gupta et al., 2007). Grazie alla natura porosa del network sol-gel, le specie intrappolate rimangono accessibili e possono interagire con agenti chimici esterni o altri analiti (Flora et al., 2001). Tuttavia, esistono anche degli svantaggi. Tra tutti, il più importante è il fatto che le proprietà chimiche e biologiche delle specie intrappolate possano subire delle variazioni a causa della ridotta libertà di movimento e delle interazioni con la superficie interna dei pori (Gupta et al., 2007).

Per quanto riguarda l'intrappolamento in fibre o microcapsule, il concetto di base è il medesimo: si parte anche in questo caso da una soluzione contenente i precursori della matrice e la specie da intrappolare e si procede alla sua reticolazione, tramite via termica o fotochimica (Sangermano, 2014).

3.2.2. Metodi reversibili

Contrariamente ai metodi irreversibili, queste tecnologie consentono, come intuibile dal nome, di rimuovere la proteina immobilizzata senza alterarne la funzionalità caratteristica, né distruggere il supporto (Rusmini et al., 2007). Le cinque principali tecniche di immobilizzazione reversibile sono: adsorbimento, adesione per bioaffinità, formazione di un legame ionico, chelazione o formazione di un legame metallico, formazione di ponti disolfuro. Alla loro analisi sono dedicati i successivi sotto paragrafi.

3.2.2.1. Adsorbimento

Un primo ed importante metodo reversibile consiste nell'immobilizzazione per adsorbimento, che avviene grazie a interazioni di tipo idrofobico, legami idrogeno o forze di van der Waals. La natura delle forze coinvolte nell'immobilizzazione reversibile per adsorbimento, fa sì che la proteina possa essere facilmente rimossa cambiando alcune condizioni operative, quali pH, temperatura, forza ionica o polarità del solvente (Brena, 2013).

Lo strato risultante dall'immobilizzazione è tipicamente eterogeneo e orientato in maniera casuale, dal momento che ciascuna molecola tende a minimizzare le interazioni di tipo repulsivo. Inoltre, la capacità di adsorbimento in strati piani è limitata dall'ingombro sterico della proteina, il quale può ridurre la funzionalità nel caso in cui il grado di impaccamento sia piuttosto elevato (Rusmini et al., 2007).

Tra i materiali più utilizzati in questo metodo vi sono gli alginati e i composti alginato-chitosano, che spesso vengono impiegati per produrre delle microparticelle contenenti una proteina da rilasciare. In questo caso, il pH cui viene reticolato il polimero può avere una diretta conseguenza sull'efficienza di intrappolamento. Per esempio, in una matrice di alginato-chitosano, contenente il 50% di BSA, se il pH in fase di reticolazione passa da 3.5 a 5.5, l'efficienza di intrappolamento scende dallo 0.47 allo 0.24: ciò significa che a parità di concentrazione iniziale, le microcapsule intrappolano meno proteina se reticolate ad un pH maggiore e, dunque, saranno in grado di rilasciarne di meno (Coppi, 2002).

Infine, questo genere di immobilizzazione è facile da ottenere ed è attraente dal punto di vista economico, tuttavia è sconsigliato in tutti i casi in cui si possa avere un leggero cambiamento delle condizioni operative (temperatura, pH, forza ionica, polarità del solvente) perché questo potrebbe portare alla perdita di adesione da parte della proteina (Rusmini et al., 2007).

3.2.2.2. Legame per bioaffinità

Tra i metodi di immobilizzazione reversibile rientra anche quello per bioaffinità. In questo caso, esistono due possibili vie per immobilizzare la proteina: o la matrice del supporto viene precedentemente accoppiata con un ligando affine alla proteina target, oppure è la proteina stessa ad essere accoppiata con il ligando a lei affine prima di essere immobilizzata sul supporto (Sardar et al., 2000). Indipendentemente da quale sia la specie che per prima reagisce con il ligando, è importante rispettare determinati vincoli di orientazione, in modo che il sito di legame del ligando vada sempre ad interfacciarsi con il sito di legame della proteina target (Roy and Gupta, 2006).

La Tabella 3.4 riporta degli esempi di coppie ligando-proteina e relative applicazioni (Roy and Gupta, 2006).

Tabella 3.4 Coppie ligando-proteina e relative applicazioni (Roy and Gupta, 2006)

Ligando	Proteina immobilizzata	Applicazione
CBD (cibacron blue)	Glucosio ossidasi	Biosensori per glucosio (Phelps et al., 1995)
IgG	Proteina G β -2	Fibra ottica per amplificazione dei prodotti del DNA (Mauro et al., 1996)
Avidina	Substrato biotinilato	Micro-canali per le proteine (Patel et al., 2000)
Co ³⁺	Concanavalina A	Diretta misura della concentrazione di glucosio (Sosnitza et al., 1998)
Ni ²⁺	Lattato-idrogenasi	Bioelettrodi per monitorare conversione del lattato in piruvato (Cosnier, 2003)

Siero Albumina Umana accoppiata con Concanavalina A	Perossidasi	Biosensore per la misura del perossido di idrogeno (Koneke et al., 1996)
Concanavalina A-sefarosio	Cellobiosio	Idrolisi del cellobiosio (Woodward, 1985)

3.2.2.3. Legame ionico

La cosiddetta immobilizzazione tramite legame ionico, può anche avvenire in realtà tramite una tipologia di legame molto particolare, che è il ponte salino (Brena et al., 2013). Si tratta della combinazione di due differenti interazioni non covalenti: il legame ionico vero e proprio e il legame idrogeno.

Il ponte salino è un legame proprio della struttura proteica: come infatti illustrato in Figura 3.6, spesso, questo ponte salino si può formare tra un gruppo carbossilato anionico (RCOO^-) ed un gruppo ammonio cationico (RNH_3^+) (Kumar et al., 1999).

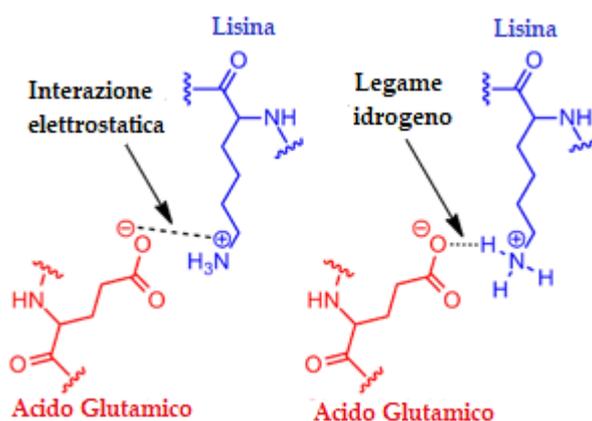


Figura 3.6 Formazione di un cosiddetto ponte salino tramite gruppi presenti sugli amminoacidi (wikipedia.org)

Una problematica legata all'immobilizzazione tramite legame ionico risiede nella difficoltà nel reperire le condizioni sotto cui la proteina rimane adesa in modo forte e, al contempo, non perde minimamente la propria attività.

Un esempio di applicazione di immobilizzazione tramite legame ionico si può trovare nell'immobilizzazione di residui di lisina ed arginina sulla superficie di un film di titanio (TiO_2), (Topoglidis et al., 1998). In questo caso vengono sfruttate delle forze di tipo ionico tra i gruppi carichi negativamente del supporto ed i gruppi carichi positivamente dei residui di amminoacidi. Il fine applicativo di questo studio concerne dei dispositivi per bioanalisi basati su metodiche di trasduzione del segnale di tipo sia ottico sia elettrico (Topoglidis et al., 1998).

3.2.2.4. Chelazione o legame metallico

Questo metodo è basato sulle proprietà di alcuni metalli di transizione. Questi sono spesso il titanio e lo zirconio, vista la non tossicità dei loro ossidi, ma possono anche essere spesso oro e argento, o più raramente ferro, vanadio, stagno. In modo particolare, il titanio è l'elemento, tra i citati, che presenta lo stato di ossidazione più stabile ed ha due numeri di coordinazione, pari a 4 e 6 e rispettivamente generanti una geometria tetraedrica ed ottaedrica. Quando questo elemento o un altro tra quelli indicati viene fatto precipitare su di una superficie, si parte sempre da un suo sale, tipicamente un cloruro, posto in soluzione acquosa. Durante la precipitazione, i suoi ioni in soluzione vengono coordinati con le proteine, tramite alcuni gruppi che possono

agire da ligando. Ne sono degli esempi i gruppi carbossilici liberi, i gruppi fenol-idrossilici, i gruppi sulfidrilici e i gruppi amminici (Guisan, 2006).

Grazie alla coordinazione che avviene in soluzione, il metallo di transizione precipita sulla superficie avendo già legata a sé la proteina prescelta per l'immobilizzazione.

3.2.2.5. Ponti disolfuro

L'immobilizzazione tramite legami disolfuro è particolare, in quanto, sebbene si formi un legame covalente tra il supporto e la proteina immobilizzata, questo legame può facilmente essere rotto, rendendo il processo reversibile (Brena et al., 2013). Tale rottura avviene sotto determinate condizioni e ad opera di un opportuno agente riducente, quale ad esempio il ditiotreitolo (DTT). Oltre a ciò, la reattività è solitamente alta, dal momento che è possibile regolarla modificando il pH: la reattività del gruppo tiolo è infatti facilmente modulabile tramite alterazioni del pH (Brena et al., 2013).

3.3. Applicazioni di substrati con proteine immobilizzate

Sono molti gli ambiti in cui trova applicazione l'immobilizzazione proteica. Ne sono degli esempi i biosensori, i bioreattori e i sistemi per il rilascio controllato di farmaci.

Come primo esempio, si può per l'appunto citare un biosensore, che altro non è che uno strumento di analisi composto da un sistema biologico (che può ad esempio essere un enzima, un anticorpo o un batterio) e da un sistema di trasduzione del segnale (Palleschi, 1989). In esso, il sistema biologico ivi immobilizzato è in grado di interagire con il substrato che si vuole misurare, determinando così la specificità del sensore (Palleschi, 1989).

Nel caso specifico di un biosensore enzimatico, quando una specie chimica reagisce con l'enzima immobilizzato, produce un composto elettroattivo in grado di diffondere verso la superficie dell'elettrodo, generando un segnale elettrico. Questi, una volta rilevato da un opportuno strumento, offre delle informazioni circa la quantità ovvero la concentrazione della sostanza in questione (Palleschi, 1989).

Lo schema di un biosensore enzimatico è rappresentato in Figura 3.8.

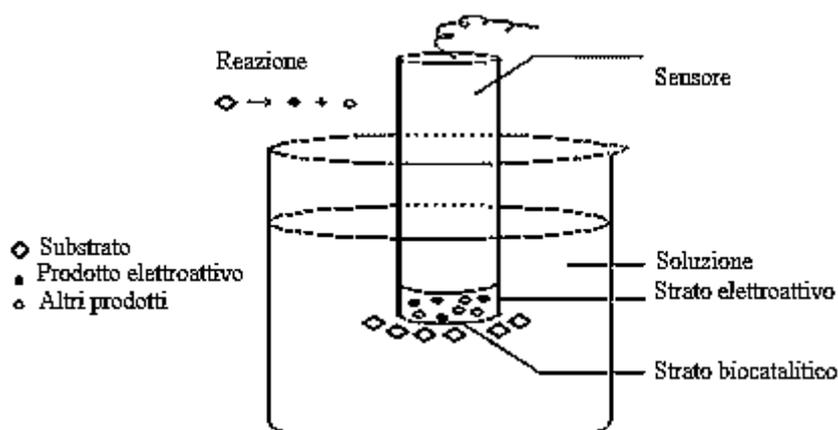


Figura 3.8 Schema di un biosensore enzimatico (Palleschi, 1989)

Per quanto concerne invece l'ambito dei bioreattori, si può citare come esempio l'immobilizzazione della lipasi su di un supporto organico. La lipasi serve per catalizzare una serie di reazioni, generalmente inscritte nel termine di interesterificazione. In modo particolare, le reazioni cui essa prende parte sono l'idrolisi dei legami

esterei del triacilglicerolo e la sua reazione inversa, ovvero la formazione di legami esterei a partire da alcol ed acido carbossilico (Balcao et al., 1996).

Nell'ambito del rilascio controllato di farmaci, infine, un esempio è quello in cui si producono dei trasportatori di farmaci a base di alginato indurito con calcio e chitosano. Su questi vengono immobilizzate delle proteine campione, come la BSA, al fine di mostrare la possibilità di trasportare all'interno dell'organismo umano delle sostanze curative bypassando la distruzione dei medesimi che si avrebbe con una normale ingestione orale, a causa dell'acidità del tratto intestinale (Coppi et al., 2002).

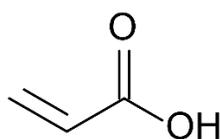


Figura 4.4 Formula di struttura dell'acido acrilico (Sigma Aldrich)

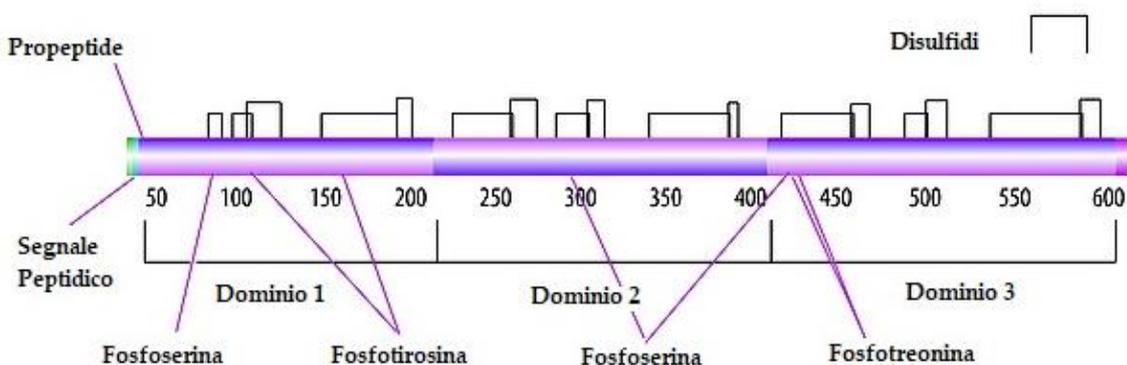


Figura 4.5 Struttura della BSA (Sigma Aldrich)

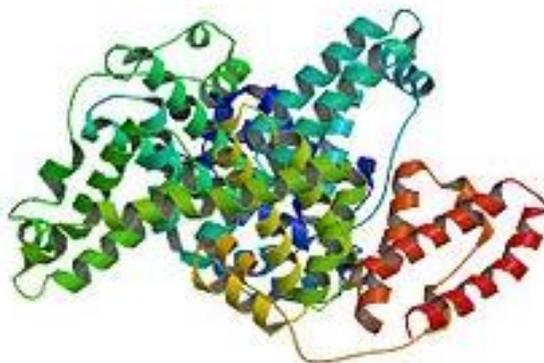


Figura 4.6 Struttura 3D della BSA (wikipedia.org)

L'inserimento del colorante è stato finalizzato all'ottenimento di una migliore risoluzione in fase di stampa, mentre l'acido acrilico è stato utilizzato per permettere il legame tra proteina e matrice, e la cui rilevazione è oggetto del presente lavoro sperimentale.

Tra i campioni stampati, su quelli non contenenti la BSA in bulk, è stata condotta un'immobilizzazione superficiale, usando come biomolecole da immobilizzare la BSA stessa o l'enzima perossidasi del rafano (HRP, Merck Millipore) e come reagenti per le varie fasi di attivazione e immobilizzazione le seguenti sostanze: N-idrossisulfosuccinimide 98% (NHS, Sigma Aldrich, Figura 4.7) ed N-etil-N'-(3dimetilamminopropil)carbodiimide 99% (EDC, Sigma Aldrich, Figura 4.8) in una soluzione acquosa di Acido 2-[N-morfolino]-etansolfonico (MES, Sigma Aldrich) ed NaCl Sigma Aldrich), PBS e infine una soluzione di quest'ultimo e poliossietilenglicole-sorbitan monolaurato (Tween-20™, Sigma Aldrich).

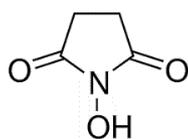


Figura 4.7 Formula di struttura dell'NHS (Sigma Aldrich)

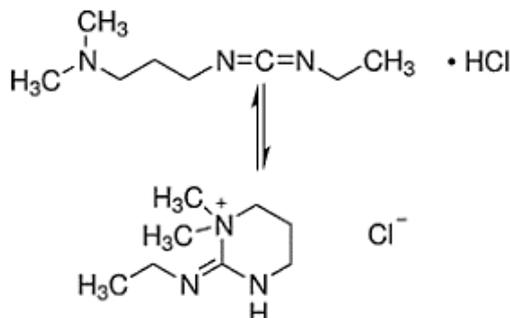


Figura 4.8 Formula di struttura dell'EDC (Sigma Aldrich)

Sui campioni immobilizzati con enzima è poi stata fatta una valutazione dell'immobilizzazione tramite saggio colorimetrico usando come reagenti per lo sviluppo enzimatico il TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, Sigma Aldrich, Figura 4.9) e l'acido solforico 0.5 M.

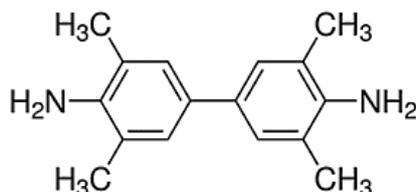


Figura 4.9 Formula di struttura del TMB (Sigma Aldrich)

Procedendo con i materiali, per quanto concerne invece alcune formulazioni liquide preparate per test preliminari, queste sono state preparate utilizzando anche altre tipologie di fotoiniziatori, quali l'Irgacure 819 (BASF, Figura 4.10) disperso in etanolo (Sigma Aldrich) e il BAPO-ONa, prodotto anch'esso presso i laboratori del Prof. Hansjorg Grutzmacher all'ETH (Zurigo, Svizzera). Insieme al fotoiniziatore si sono poi inseriti l'HRP e la fluoresceina isotiocianato (FITC, Sigma Aldrich, Figura 4.11). Questi sono stati utilizzati rispettivamente per poter studiare l'efficacia di immobilizzazione tramite saggio colorimetrico e per poter valutare l'omogeneità di dispersione all'interno del campione di una sostanza con fluoroforo.

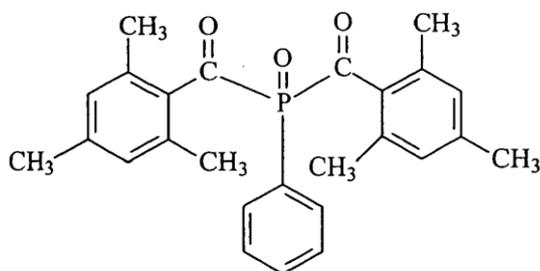


Figura 4.10 Formula di struttura dell'Irgacure 819 (BASF)

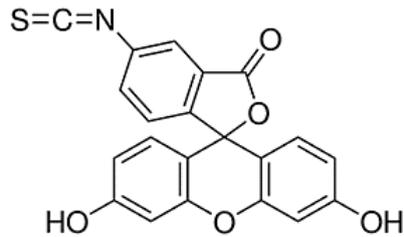


Figura 4.11 Formula di struttura della FITC (Sigma Aldrich)

Infine, la stampa di componenti complessi è stata condotta con i medesimi materiali utilizzati per la stampa di film, tranne che in un caso, dove si è fatto uso del colorante Brilliant Green (Figura 4.12, Sigma Aldrich).

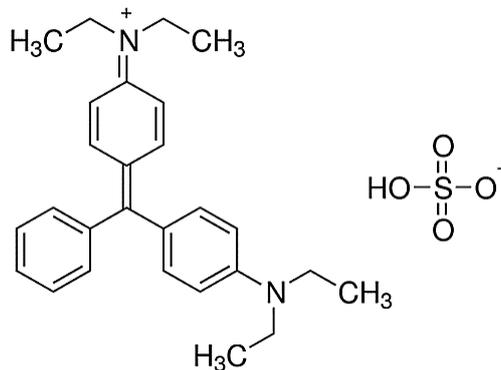


Figura 4.12 Formula di struttura del Brilliant Green (Sigma Aldrich)

4.2. Preparazione dei campioni

In questo paragrafo verranno spiegati i procedimenti per la preparazione di tutti i differenti campioni, partendo dalle formulazioni iniziali per la produzione dei film destinati tanto all'immobilizzazione in bulk, quanto all'immobilizzazione superficiale.

4.2.1. Formulazioni per la stampa dei film

Per quanto riguarda la preparazione delle formulazioni per la stampa dei film, si è deciso di produrre quattro diverse tipologie di formulazioni, nel seguito elencate.

La prima formulazione è costituita da:

- PEGDA: 50% w/w;
- PBS: 50% w/w;
- BAPO-OH: 2 phr;
- Reactive Orange: 0.04 phr.

La seconda formulazione è ricavata dalla prima formulazione aggiungendo lo 0.5 phr di BSA.

Per quanto riguarda invece la terza formulazione, questa è composta da:

- PEGDA: 50% w/w;
- PBS: 50% w/w;
- BAPO-OH: 2 phr;
- Reactive Orange: 0.04 phr;

- Acido Acrilico: 10% molare rispetto alle moli di PEGDA.

Infine, la quarta formulazione è ottenuta dalla terza, aggiungendo ancora lo 0.5 phr di BSA.

Le formulazioni sono state preparate seguendo un ordine preciso nella miscelazione dei reagenti. In modo particolare, nel caso di presenza della proteina, si è sempre prima disciolta quest'ultima all'interno del proprio buffer (il PBS) e solo successivamente si sono addizionati gli altri reagenti. Oltre a ciò, le polveri, ovvero il BAPO-OH e il colorante, sono sempre state inserite per ultime. Una volta completata la miscelazione dei componenti, tutte le formulazioni sono poi state sottoposte a 1 minuto di sonicazione tramite dispositivo Sonorex, a frequenza 37 kHz.

4.2.2. Processo di stampa DLP

Dopo aver preparato le formulazioni, queste sono state utilizzate per produrre dei film di area 3x6 cm e spessore 0.7 mm. Oltre a ciò si sono anche stampate delle geometrie più complesse, quali un honeycomb ed un cubo forato.

La stampa è stata eseguita mediante una stampante 3DPrinter-HD 2.0 (rappresentata nel Capitolo 2) prodotta da Robot Factory, le cui principali caratteristiche sono descritte nel seguito:

- Lunghezza d'onda: 400-780 nm;
- Intensità del fascio: 12 mW/cm²;
- Risoluzione: 50 µm;
- Spessore degli strati: 100-10 µm;
- Vaschetta di crescita: Siligel.

Per la produzione dei film si è mantenuto un tempo di esposizione pari a 6.3 secondi per ciascuno strato. Nel caso dell'honeycomb il tempo di esposizione è stato impostato a 14 secondi per la base e 9 secondi per l'oggetto. Infine, per il cubo forato si sono mantenuti 10 secondi per la base e 9 secondi per l'oggetto. In tutti i casi lo slicing è stato effettuato ogni 50 micron.

Per eseguire la stampa, la formulazione è stata versata all'interno della vaschetta di crescita aggiungendovi 40 mg di olio di silicone per sfavorire l'adesione del pezzo al fondo della vaschetta. Una volta prodotto, ciascun componente è stato staccato dalla piattaforma di crescita tramite l'ausilio di un raschietto e immerso in PBS per 30 secondi per favorire il rilascio delle sostanze non polimerizzate. Dopodiché i componenti sono stati asciugati tramite carta assorbente e sottoposti a un processo di post-reticolazione UV per un tempo di 4 minuti.

4.2.3. Processo di immobilizzazione superficiale sui film

Sui film ottenuti dalle formulazioni costituite da PEGDA, PBS, BAPO-OH e colorante e PEGDA, PBS, BAPO-OH, acido acrilico e colorante è stata effettuata l'immobilizzazione superficiale sia della proteina BSA sia dell'enzima HRP. Successivamente quest'ultimo è stato immobilizzato anche sul cubo forato.

Prima dell'immobilizzazione vera e propria i campioni sono stati attivati in modo da favorire la formazione del legame tra la proteina e il substrato. Nel seguito si descriveranno dunque dapprima i protocolli di attivazione e immobilizzazione e solo successivamente si forniranno i dettagli degli esperimenti realizzati.

4.2.3.1. Protocolli di attivazione e immobilizzazione

L'attivazione dei campioni è stata eseguita secondo tre fasi:

- I. Incubazione del campione in un tampone acquoso MES 100 mM, NaCl 150 mM a pH 4.7 per 15 minuti.
- II. Inserimento del campione in una soluzione acquosa di MES 100 mM con EDC ed NHS in rapporto 4:10 mM per 15 minuti.

III. Tre lavaggi del campione da 5 minuti ciascuno in PBS e successiva asciugatura del campione con azoto.

Al termine del processo di attivazione, si è proseguito con l'immobilizzazione. Questa è stata condotta incubando il campione attivato in una soluzione contenente la proteina da immobilizzare per un tempo pari a 1 ora. Solo nel caso del cubo forato si è mantenuta l'incubazione over night. Dopodiché i campioni sono stati lavati con tre lavaggi successivi, ciascuno da 5 min, in PBS Tween. Le quantità e concentrazioni utilizzate sono riportate nei successivi paragrafi.

4.2.3.2. Immobilizzazione di BSA sui film

Per quanto riguarda l'immobilizzazione con BSA, da ciascun film rispettivamente a base PEGDA o PEGDA con acido acrilico, si sono tagliati 3 campioni di dimensioni 1x1 cm². Tutti sono stati ugualmente attivati e successivamente immobilizzati, utilizzando 3 mL (per ogni campione) di una soluzione di BSA allo 0.5% w/v in PBS.

4.2.3.3. Immobilizzazione di HRP sui film

Per effettuare l'immobilizzazione dell'HRP, da ciascun film rispettivamente con e senza acido acrilico, sono stati tagliati dei campioni di dimensione 5x5 mm². I vari campioni sono stati utilizzati per valutare l'immobilizzazione dell'enzima (HRP) sulla superficie del campione precedentemente attivato o meno. Per le diverse tipologie di substrato sono stati preparati anche dei campioni negativi (senza HRP). Per ogni condizione sono state preparate tre ripetizioni, che hanno subito una procedura sperimentale secondo quanto riportato in Tabella 4.1, e le misure sono quindi state mediate.

Tabella 4.1 Suddivisione dei campioni per l'immobilizzazione dell'HRP.

Film	Campione	Procedura sperimentale	
		Attivazione	Immobilizzazione con HRP
PEGDA	A		
	B		x
	C	x	
	D	x	x
PEGDA con acido acrilico	E		
	F		x
	G	x	
	H	x	x

Per l'immobilizzazione si sono utilizzati per ciascun campione 25 µL di una soluzione di HRP 0.5 µg/mL in PBS per 1 ora a temperatura ambiente. I controlli negativi (senza HRP) sono comunque stati incubati con 25 µL di PBS, in modo da presentare le medesime condizioni di swelling dei campioni immobilizzati. Al termine dell'immobilizzazione i campioni sono stati lavati con 300 µL di PBS-Tween per 3 volte per 5 minuti.

4.2.3.4. Immobilizzazione con HRP sul cubo forato

Per quanto riguarda l'immobilizzazione sul cubo forato si è fatto uso di una soluzione di HRP in PBS 0.5 µg/mL, utilizzandone 500 µL per ciascun campione. I controlli negativi (senza HRP) sono comunque stati incubati con 500 µL di PBS, in modo da presentare le medesime condizioni di swelling dei campioni immobilizzati. Al termine dell'immobilizzazione i campioni sono stati lavati con 500 µL di PBS-Tween.

4.2.4. Rilascio della proteina

Tutti i film con la BSA immobilizzata in superficie o intrappolata nel materiale polimerico sono stati sottoposti a rilascio della medesima in PBS. I campioni utilizzati sono della dimensione di 1x1 cm² e per ciascuna tipologia di film sono state utilizzate 3 repliche, in modo da poter ottenere un valor medio. Il rilascio è stato monitorato nel tempo, mantenendo la soluzione in costante agitazione a temperatura ambiente. I prelievi sono stati pari a 5 µL ciascuno, effettuati rispettivamente a 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 300, 420, 540, 1440 minuti dopo l'inizio dell'incubazione.

4.2.5. Formulazioni liquide

Oltre ai film visti nei precedenti paragrafi, si sono preparate anche delle formulazioni liquide con due diversi scopi:

1. Analizzare l'interazione tra la FITC e alcune tipologie di fotoinziatore in differenti condizioni di irraggiamento per valutare l'eventuale rottura della molecola di fluoroforo;
2. Analizzare le interazioni tra l'HRP e alcune tipologie di fotoinziatore in differenti condizioni di irraggiamento per studiare la possibile denaturazione enzimatica con conseguente perdita di funzionalità.

Le formulazioni di interesse non contengono monomero e sono state prodotte a partire da due soluzioni di 6 mL rispettivamente di FITC in concentrazione 2 mg/mL e di HRP in concentrazione 500 ng/mL.

Da ciascuna di queste soluzioni di 6 mL, se ne sono prelevate due aliquote da 3 mL: solo a una delle due è stato aggiunto il fotoinziatore in proporzione 0.1% w/w. Per entrambe le aliquote da 3 mL, di cui solo una contenente anche il fotoinziatore, si sono fatti i seguenti trattamenti:

- 1 mL: nessun irraggiamento;
- 1 mL: 1 minuto di irraggiamento nel visibile;
- 1 mL: 1 minuto di irraggiamento nel visibile e 4 minuti nell'UV.

L'elenco delle formulazioni preparate è riportato in Tabella 4.2.

Tabella 4.2 Elenco delle formulazioni liquide con i rispettivi trattamenti di irraggiamento.

FORMULAZIONE	CAMPIONE	IRRAGGIAMENTO		
		Nessuno	1 minuto nel visibile	4 minuti nell'UV
PBS-FITC o PBS-HRP	A	X		
	B		X	
	C		X	X
PBS-FITC o PBS-HRP e BAPO-OH 0.1%	D	X		
	E		X	
	F		X	X
PBS-FITC o PBS-HRP e BAPO-ONa	G	X		
	H		X	
	I		X	X
PBS-FITC o PBS-HRP e BAPO-OH 0.01%	J	X		
	K		X	
	L		X	X
PBS-FITC o PBS-HRP e Irgacure 819 in etanolo	M	X		
	N		X	
	O		X	X

PBS-FITC o PBS- HRP e etanolo	P	X		
	Q		X	
	R		X	X

4.3. Tecniche di caratterizzazione

Nel seguito di questo paragrafo si presenteranno le tecniche di caratterizzazione utilizzate per lo studio dei campioni prodotti. Per ciascuna tecnica si citeranno nel dettaglio le tipologie di campione analizzato.

4.3.1. Spettroscopia IR in riflettanza totale attenuata (ATR)

I film stampati tramite tecnologia DLP sono stati analizzati tramite spettroscopia IR in modalità ATR con un Bruker Tensor 27. In modo particolare, quindi, queste analisi sono state condotte sia sui campioni senza BSA sia su quelli con BSA immobilizzata in superficie o intrappolata all'interno della matrice polimerica. Per quanto riguarda i film contenenti BSA nella matrice o in superficie, le analisi sono state ripetute anche dopo aver sottoposto i campioni a rilascio in PBS.

L'analisi è stata condotta da 4000 a 500 cm^{-1} con 32 scansioni e i dati sono stati raccolti dal software OPUS e successivamente elaborati tramite OriginPro 8. I valori di assorbanza sono stati tutti normalizzati rispetto al picco del carbonile (1728 cm^{-1} circa), in modo da ottenere dei risultati direttamente confrontabili.

4.3.2. Spettrofotometria UV-VIS

Per valutare il rilascio della BSA da parte dei film aventi la proteina immobilizzata in superficie o intrappolata, i liquidi prelevati a istanti di tempo differenti sono stati analizzati tramite spettroscopia UV-VIS con uno spettrofotometro Varian, Cary 5000, equipaggiato con Tray-Cell (Hellma). L'analisi è stata condotta tra 200 e 350 nm, ed i dati ottenuti sono quindi stati elaborati tramite software OriginPro 8.

Le curve sono state normalizzate portandole a zero a 340 nm; dopodiché il valore di assorbanza è stato analizzato a 280 nm, lunghezza d'onda alla quale assorbono le proteine. I valori ottenuti sono quindi stati mediati.

4.3.3. Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

La calorimetria a scansione differenziale è stata effettuata sui film stampati tramite DLP e non aventi BSA immobilizzata in superficie. Nel dettaglio, i film analizzati tramite DSC sono i seguenti:

1. PEGDA, PBS, BAPO-OH;
2. PEGDA, PBS, BAPO-OH, acido acrilico;
3. PEGDA, PBS, BAPO-OH, BSA;
4. PEGDA, PBS, BAPO-OH, BSA, acido acrilico.

Per le analisi si è fatto uso dello strumento Netzsch DSC 401 Phoenix (Figura 4.13), compiendo – per ciascuna analisi – due cicli termici, al fine di contrastare eventuali instabilità termiche nel sistema. La rampa termica si è impostata pari a 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, mentre il range di temperatura è stato fatto variare da -70 a 100 $^{\circ}\text{C}$.

Infine, i dati ricavati sono stati elaborati tramite software OriginPro 8.

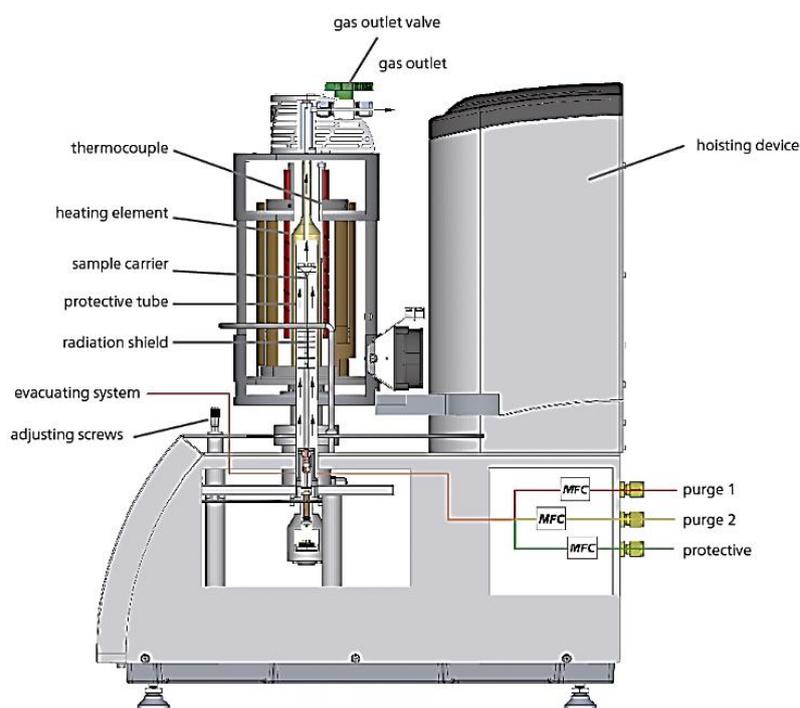


Figura 4.13 Netzsch DSC 401 Phoenix (Netzsch.com)

4.3.4. Valutazione dell'immobilizzazione tramite saggio colorimetrico ELISA

Per valutare l'immobilizzazione sui film aventi HRP immobilizzato in superficie e per valutare l'attività dell'HRP nelle formulazioni liquide è stato sfruttato uno sviluppo colorimetrico di tipo **Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**.

Secondo tale protocollo, i campioni in esame sono stati incubati con TMB (substrato dell'enzima HRP) per 3 minuti; successivamente la reazione è stata stoppata tramite l'aggiunta di H_2SO_4 0.5 M, in rapporto TMB: H_2SO_4 pari a 1:1 (Chiadò et al., 2016). Al termine della reazione, la densità ottica delle soluzioni (OD) è stata acquisita a 450 e 630 nm tramite un lettore a micropietra 2100 C (Ivymen Optic System), (Chiadò et al., 2016). Infine, per quanto riguarda il caso dei campioni su cui era stata condotta l'immobilizzazione, per poter garantire una misura quantitativa della quantità di biomolecole immobilizzate, si è realizzata una curva di titolazione, misurando l'OD alle stesse lunghezze d'onda e ricavando dunque l'attività enzimatica in diluizioni seriali di HRP in PBS, a partire dalla concentrazione di 25 ng/mL. A questo punto, sfruttando il confronto con i valori di OD della curva di titolazione, i valori di OD relativi ai campioni immobilizzati sono stati normalizzati e convertiti in densità superficiali di biomolecole immobilizzate ($\text{molecole}/\text{cm}^2$), (Chiadò et al., 2016).

4.3.5. Microscopia ottica

La microscopia ottica è stata utilizzata per caratterizzare le formulazioni liquide contenenti FITC. I campioni sono stati analizzati acquisendo delle immagini con un microscopio Leica DLMN equipaggiato con una telecamera Leica DFC340 FX (Figura 4.14). In particolare, le acquisizioni sono state ottenute illuminando con luce bianca, e senza filtri, o con un filtro per analisi FITC, impostando come parametri i seguenti valori: esposizione: 2 secondi, guadagno: 10x, gamma: 0.65.



Figura 4.14 Microscopio Leica DLMN (leica-microsystems.com)

Le immagini sono state successivamente elaborate tramite il software Bio7, basato su uno sviluppo di ImageJ, per mezzo del quale è stato possibile interpretare l'immagine in scala di grigi, associando ad ogni colore un valore in scala di grigi. Per file in formato RGB, come quelli in esame, la scala di grigi viene suddivisa in 256 valori, dove il numero 110 corrisponde al verde associato alla massima fluorescenza possibile.

Al fine di ottenere un grafico recante in ordinata un valore di grigio ed in ascissa una distanza, è stato necessario tracciare una retta di lunghezza fissa lungo l'immagine, in modo da tagliare perpendicolarmente la fotografia della goccia. Non solo, per avere una media con relativa barra di errore, le rette tracciate sono state cinque.

A ciascuna retta corrisponde un grafico, avente un massimo ed un minimo nei valori di grigio. Questi sono stati segnati e sottratti ed il risultato è stato mediato (elaborando anche la relativa barra di errore) per le cinque misure.

5. Risultati e discussione

In base a quanto riportato in letteratura come stato dell'arte sulle tecniche di immobilizzazione proteica usando un materiale polimerico come supporto, il metodo di immobilizzazione superficiale è quello meglio consolidato. A tal proposito, in questo lavoro di tesi il primo obiettivo è stato quello di indagare la possibilità di effettuare un'immobilizzazione superficiale su un materiale polimerico ottenuto tramite stampa 3D. In seguito si è poi continuato il lavoro testando una tecnica di immobilizzazione differente: l'intrappolamento della proteina in tutto il materiale polimerico. L'interesse di quest'ultimo metodo risiede nel fatto che esso consentirebbe un notevole risparmio in termini di tempi di produzione e quindi di investimenti economici, dal momento che la proteina viene direttamente inserita nella formulazione liquida polimerica, prima che questa subisca il processo di stampa. Non solo, aumentando la quantità di proteina si potrebbe aumentare anche la resa di un prodotto (per esempio nel caso in cui questo provenga da una reazione catalizzata da una proteina, come nel caso di un enzima).

Seguendo dunque il filo logico alla base del presente progetto di tesi, nel seguito si presenteranno i risultati delle prove attuate sui campioni aventi la proteina immobilizzata solo superficialmente e si procederà mano a mano al confronto con le medesime analisi condotte però sui campioni contenenti la proteina intrappolata.

Anzitutto, nell'ottica di testare la corretta funzionalizzazione con proteina, si sono condotte delle analisi tramite spettroscopia all'infrarosso a riflettanza totale attenuata (ATR).

5.1. Spettroscopia all'infrarosso a riflettanza totale attenuata

L'analisi ATR è stata utilizzata per studiare l'interazione tra la matrice polimerica e la proteina e in particolare la formazione di legami chimici tra le due. Tramite questo strumento di analisi si ottengono degli spettri di assorbimento del campione in un range di lunghezze d'onda nel campo dell'infrarosso. Il metodo di elaborazione dei dati prevede dunque l'associazione dei picchi caratteristici dello spettro a gruppi e modi vibrazionali presenti nelle sostanze costituenti la formulazione. Nel dettaglio, la tecnica in riflettanza totale attenuata si differenzia dalla normale spettroscopia infrarosso perché permette di indagare la superficie del campione: i dati ottenuti si riferiscono ad uno spessore pari a circa 2 μm .

Per quanto concerne l'analisi vera e propria, tanto per i campioni aventi la proteina immobilizzata superficialmente, quanto per quelli con la proteina intrappolata nel polimero bulk, sono state prodotte (come dettagliato nel Capitolo 4 due tipologie differenti di matrici:

- PEGDA, PBS, BAPO-OH;
- PEGDA, ACIDO ACRILICO, PBS, BAPO-OH.

Per prima cosa dunque, per poter arrivare a comprendere quali picchi fossero associabili alla presenza della proteina, si sono dovuti evidenziare negli spettri di assorbimento i picchi correlabili alla presenza dell'acido acrilico, unico elemento di differenza tra le due matrici. Per questo, in un primo momento si sono confrontati gli spettri di assorbimento delle matrici base, ovvero rispettivamente il PEGDA ed il PEGDA con acido acrilico, in modo da isolare i picchi diversi (Figura 5.1).

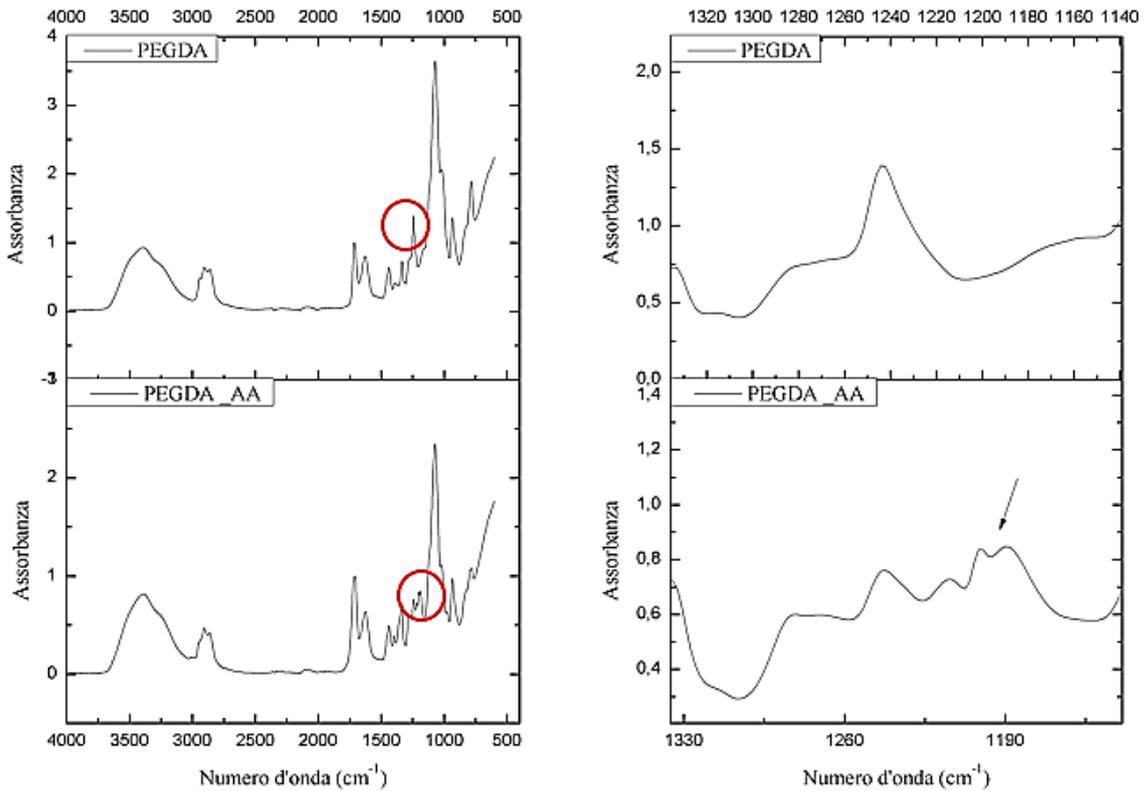


Figura 5.1 Confronto e relativo zoom tra gli spettri della matrice di solo PEGDA (A) e quella di PEGDA ed acido acrilico (B).

Dal confronto tra gli spettri della matrice di solo PEGDA e quella di PEGDA e acido acrilico risulta un'unica importante differenza nei picchi a 1190 cm^{-1} , frequenza alla quale è associata la vibrazione del gruppo C-O-H presente nell'acido acrilico (Charles, 1987). Al fine di avvalorare la tesi inerente l'associazione del picco a 1190 cm^{-1} , si è proceduto con l'analisi all'ATR del solo acido acrilico, producendo il confronto del suo spettro di assorbimento con quello della matrice a base PEGDA ed acido acrilico (Figura 5.2).

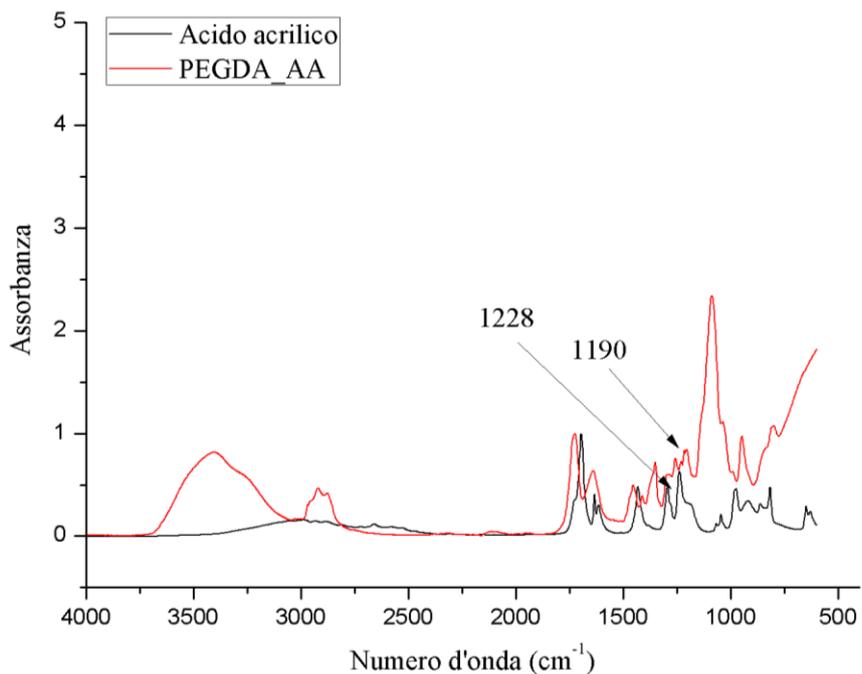


Figura 5.2 Confronto tra lo spettro dell'acido acrilico e quello della matrice di PEGDA con acido acrilico

Come indicato in Figura 5.2, il picco inerente la vibrazione di bending del C-O-H dell'acido è nel componente puro ad un numero d'onda leggermente superiore, pari a 1228 cm^{-1} . Questo è possibile dal momento che – come noto in letteratura, questo picco può oscillare, a seconda delle condizioni sperimentali, tra i 1140 e i 1230 cm^{-1} (Charles, 1987). A questo punto, si è preso in considerazione lo spettro della matrice PEGDA con acido acrilico e BSA immobilizzata superficialmente, in modo da poter comprendere se la presenza della proteina portasse a delle variazioni nello spettro di assorbimento in termini di picchi nuovi o cambiamenti dei picchi esistenti (Figura 5.3).

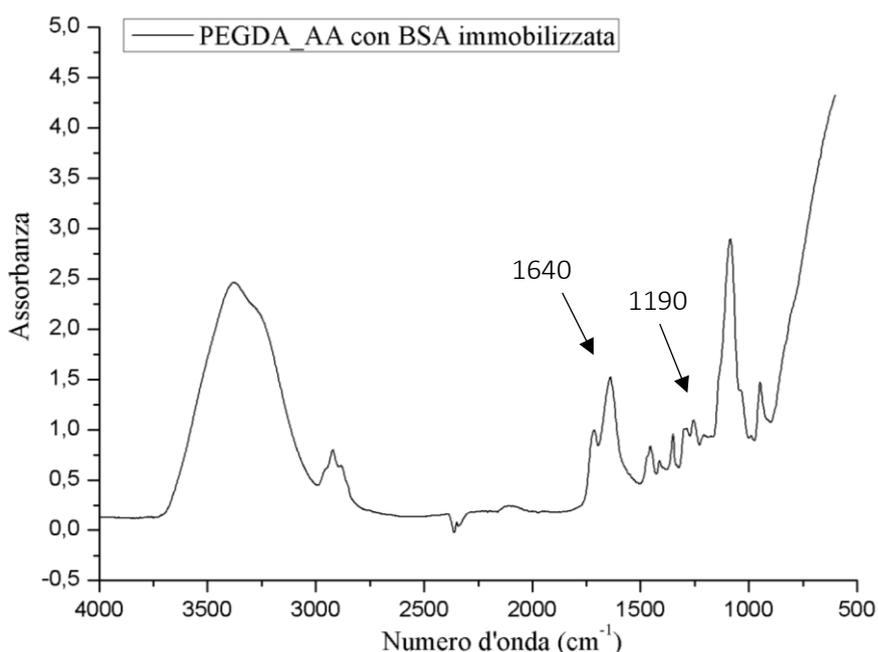


Figura 5.3 Spettro di assorbimento del campione di PEGDA e acido acrilico su cui è stata immobilizzata la BSA.

Nell'assorbimento del campione presentato in Figura 5.3, innanzitutto, non è più presente alcun picco nell'intorno di 1190 cm^{-1} . Ciò testimonia che l'immobilizzazione della proteina è avvenuta in modo efficiente e tramite la formazione di un legame chimico covalente. Questi, come illustrato in Figura 5.4, si forma tra il gruppo carbossilico dell'acido acrilico e il gruppo amminico della proteina, e prende il nome di legame ammidico o peptidico, nel caso puntuale in cui riguardi un gruppo amminico di una proteina.

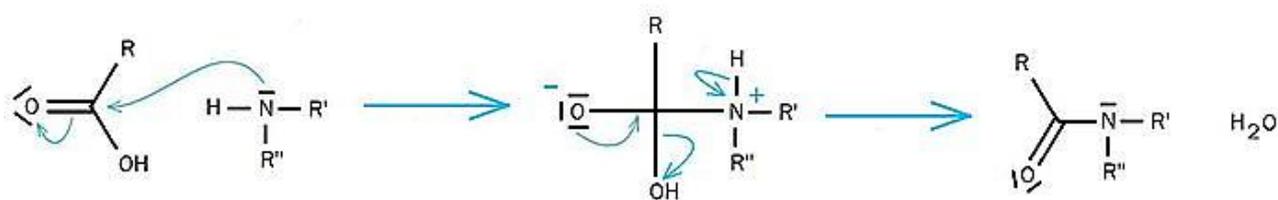


Figura 5.4 Formazione di un legame ammidico tra un gruppo carbossilico ed un gruppo amminico.

Oltre a ciò, la presenza della proteina incide sull'intensità (ovvero sull'aspetto quantitativo) di alcuni picchi, quali ad esempio quelli nell'intorno di 1640 cm^{-1} , dove la presenza della vibrazione di legame del gruppo amminico si somma alle normali vibrazioni dei gruppi carbonilici della matrice polimerica (Grdadolnik e Maréchal, 2001).

Una volta nota la modalità di legame della proteina nel caso di immobilizzazione superficiale sulla matrice contenente l'acido acrilico, si è approfondita, per completezza, l'analisi anche nel caso di immobilizzazione

sulla matrice senza acido acrilico. In questo caso, si è scelto di riportare direttamente un confronto tra lo spettro di assorbimento della suddetta matrice con BSA immobilizzata superficialmente e quello della stessa matrice senza proteina (Figura 5.5).

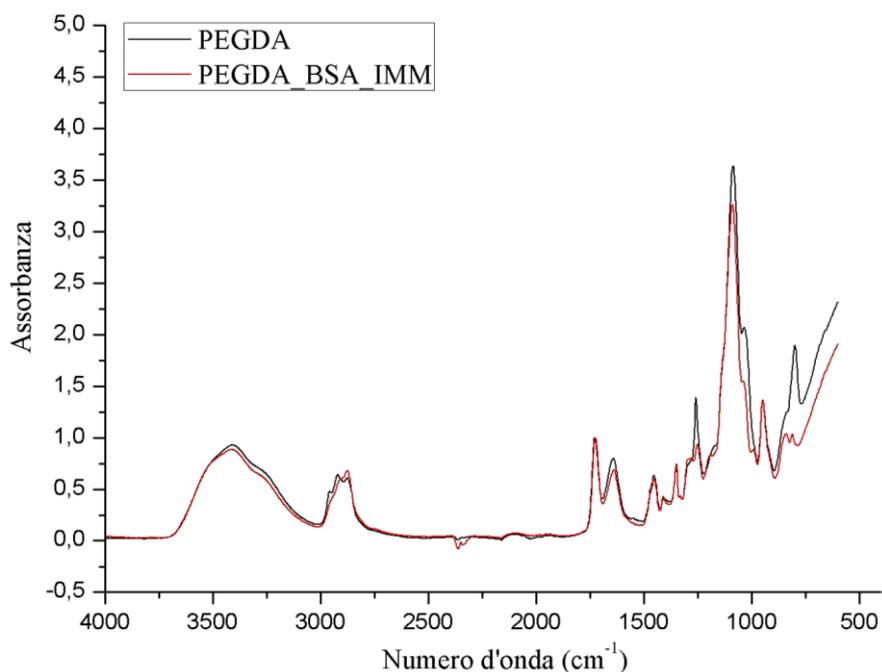


Figura 5.5 Confronto tra lo spettro della matrice di PEGDA con BSA immobilizzata superficialmente e lo spettro della stessa matrice senza proteina.

Come si può evincere dalla Figura 5.5, non esistono di fatto differenze in termini qualitativi nei picchi di assorbimento delle due matrici con e senza proteina, rispettivamente.

La mancanza di variazioni nello spettro di assorbimento della matrice di PEGDA con BSA immobilizzata rispetto alla semplice matrice di solo PEGDA non è sufficiente ad indicare la non avvenuta immobilizzazione superficiale. Infatti, è possibile che l'assenza di acido acrilico nella matrice abbia semplicemente fatto sì che la quantità di proteina legata fosse nettamente inferiore rispetto al caso in cui invece era presente l'acido acrilico. Pertanto, per avere risposta certa in merito alla questione, si analizzeranno nei prossimi paragrafi i dati delle analisi tramite saggio ELISA e i dati del rilascio della proteina in un tampone acquoso.

Tornando alla spettroscopia IR, una volta noti gli spettri dei campioni immobilizzati superficialmente, si è potuta constatare la possibilità di immobilizzare una proteina sulla superficie di un campione stampato tramite tecnologia DLP, evidenziando un legame di tipo chimico. A questo punto si sono dunque studiati i campioni contenenti la proteina nel polimero, per comprendere se da un lato fosse possibile stampare con una proteina all'interno della formulazione, e dall'altro quale fosse – nel caso di risposta affermativa al primo interrogativo – il tipo di legame instaurantesi tra la proteina e la matrice.

Per rispondere alle nostre domande, si è proceduto semplicemente con l'analisi degli spettri di assorbimento delle due matrici base con BSA nel materiale bulk. Partendo dalla matrice di PEGDA e acido acrilico (Figura 5.6), si può notare anzitutto che la proteina è presente grazie all'aumento di intensità del picco a 1640 cm⁻¹, dovuto alle vibrazioni di stretching del gruppo amminico, presente solo nella proteina. Oltre a ciò è ancora visibile, nonostante la presenza della BSA, il picco a 1190 cm⁻¹, prima evidenziato come caratteristico della presenza dell'acido acrilico. Questa importante differenza con il campione immobilizzato superficialmente potrebbe indicare che in questo caso (intrappolamento interno) non esista un legame chimico, ma soltanto

un'interazione di tipo fisico, ma una tale affermazione necessita di ulteriori prove, dal momento che sarebbe vera soltanto nel caso in cui tutto l'acido acrilico sia impegnato in legami con proteine.

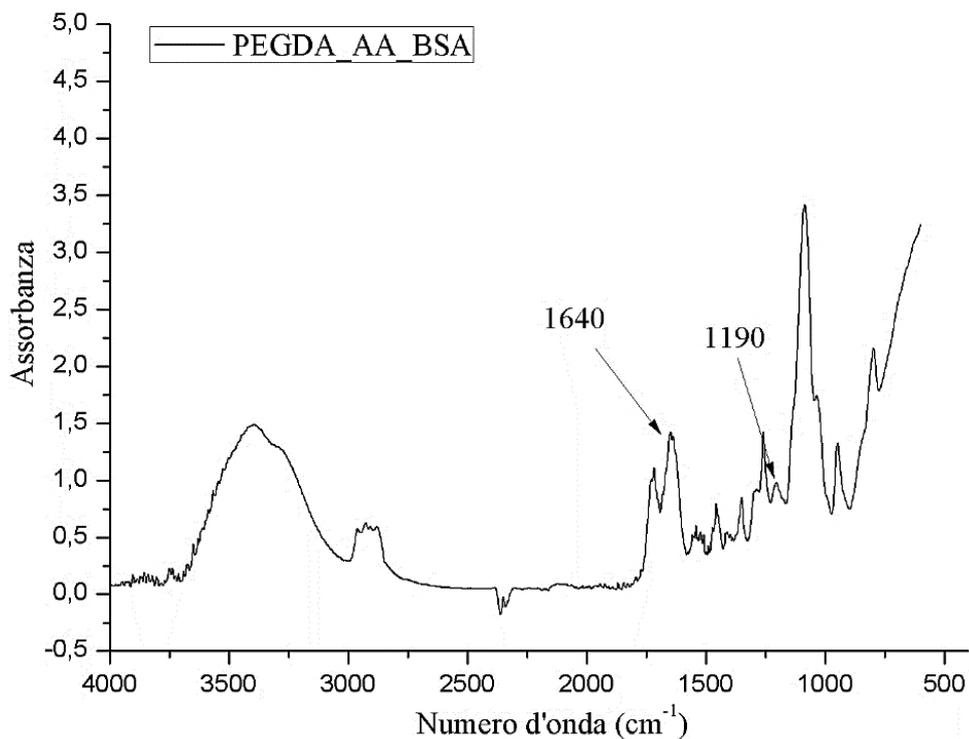


Figura 5.6 Spettro di assorbimento della matrice di PEGDA ed acido acrilico con BSA intrappolata internamente

Procedendo poi con l'analisi del campione con la matrice di solo PEGDA e BSA intrappolata in bulk, se ne mostra per completezza lo spettro di assorbimento (Figura 5.7).

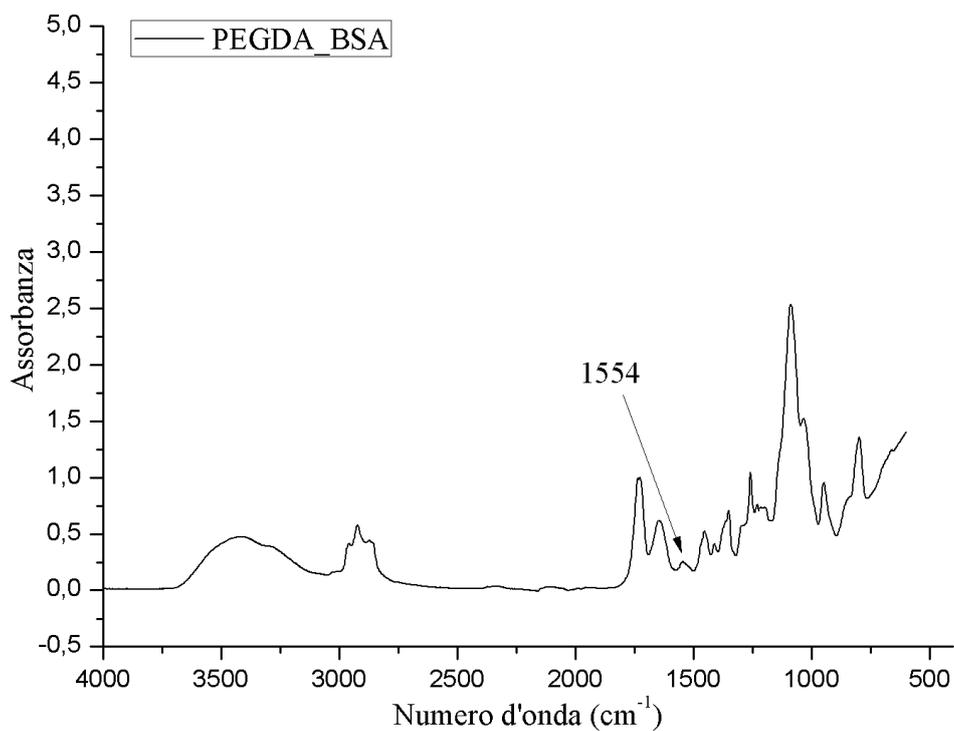


Figura 5.7 Spettro di assorbimento della matrice di PEGDA con BSA intrappolata internamente

In questo campione manca il picco dell'acido acrilico, come atteso, ma oltre a ciò esiste un picco nuovo a 1554 cm^{-1} . Insieme a questo, si può notare che quello che prima era un picco aumentato in intensità a 1640 cm^{-1} , in questo spettro presenta invece intensità paragonabile a quella di uno spettro senza proteina. Tutto ciò è probabilmente dovuto al cambiamento della frequenza di vibrazione del gruppo amminico (da 1640 a 1554 cm^{-1}) a causa di differenti condizioni di idratazione (Grdadolnik e Maréchal, 2001). Infatti, il campione che ha subito l'immobilizzazione superficiale è stato attivato tramite immersione in un tampone acquoso ed ha dunque avuto modo di presentare un grado di idratazione decisamente maggiore rispetto al campione che è invece stato stampato e successivamente post-reticolato per mezzo di un irraggiamento UV.

Per concludere, si è considerato il confronto tra il campione di PEGDA con BSA e quello di solo PEGDA. Eccezion fatta per il picco a 1554 cm^{-1} , non vi sono ulteriori differenze: questo dimostra che anche nel caso di una matrice senza acido acrilico la proteina viene intrappolata in modo semplicemente fisico, senza formazione di alcun legame chimico con la matrice ospitante (Figura 5.8).

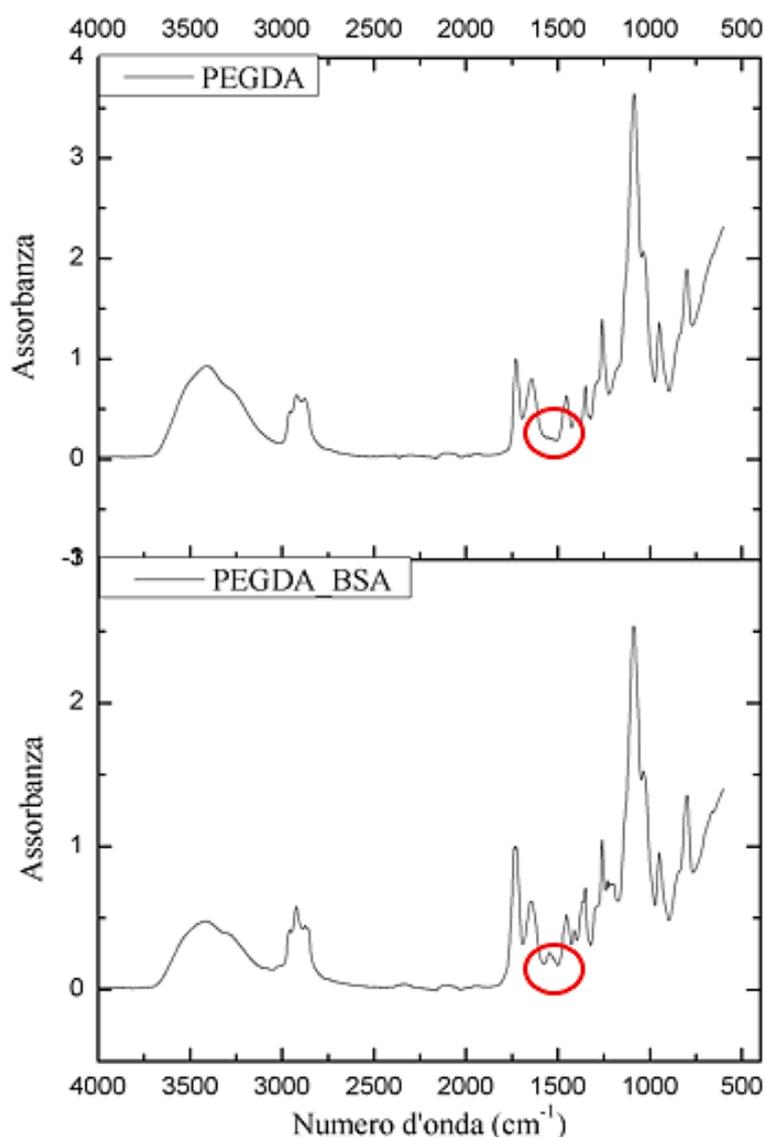


Figura 5.8 Confronto tra lo spettro di assorbimento del film di PEGDA e quello del film di PEGDA con BSA intrappolata.

Alla luce di questa prima parte di analisi sperimentale è dunque possibile trarre le seguenti conclusioni.

1. La realizzazione tramite stampa 3D di un componente polimerico contenente nella formulazione una biomolecola nel proprio tampone acquoso è possibile.
2. La tipologia di legame che la proteina forma con la matrice ospitante dipende dalla tecnica adottata per l'immobilizzazione. In modo particolare, nel caso di immobilizzazione superficiale si ha la formazione di un legame chimico covalente tra un gruppo carbossilico della matrice ed un gruppo amminico della proteina; nel caso di intrappolamento interno si ha invece soltanto un'interazione di tipo fisico con la matrice.

Note queste informazioni, ci si è quindi chiesti se la differenza in termini di tipologia di legame instaurantesi tra la matrice e la proteina potesse avere delle conseguenze sulla capacità di rilascio della proteina stessa una volta mantenuto il campione in un tampone acquoso per 24 ore.

Si procede pertanto alla presentazione dei dati relativi agli studi sul rilascio, partendo ancora una volta dall'immobilizzazione superficiale, la tecnica più consolidata dal punto di vista della letteratura presente.

5.2 Studio del rilascio tramite spettroscopia UV

Come anticipato, gli studi sul rilascio da parte dei campioni aventi la proteina immobilizzata rispettivamente in superficie o in bulk sono stati condotti al fine di osservare quali variazioni comportasse il differente tipo di legame presente tra matrice e proteina.

Dapprima sono stati studiati i campioni con BSA immobilizzata superficialmente (Figura 5.9), e solo in un secondo momento sono stati analizzati i film con proteina in bulk (Figura 5.10).

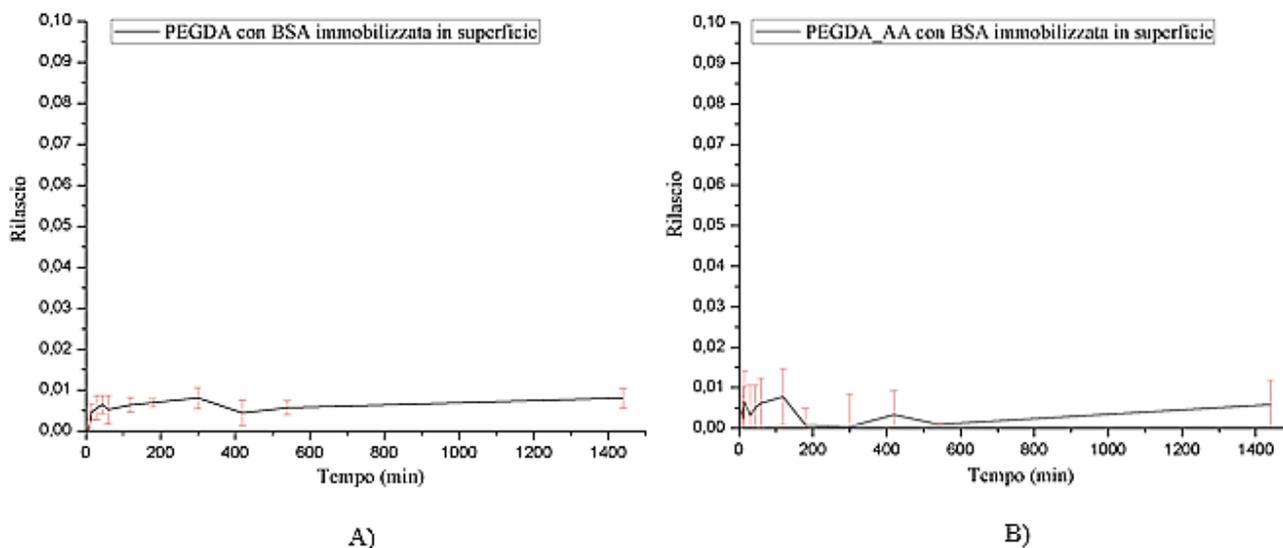


Figura 5.9 Rilascio della BSA immobilizzata superficialmente sui film di PEGDA (A) e PEGDA con acido acrilico (B)

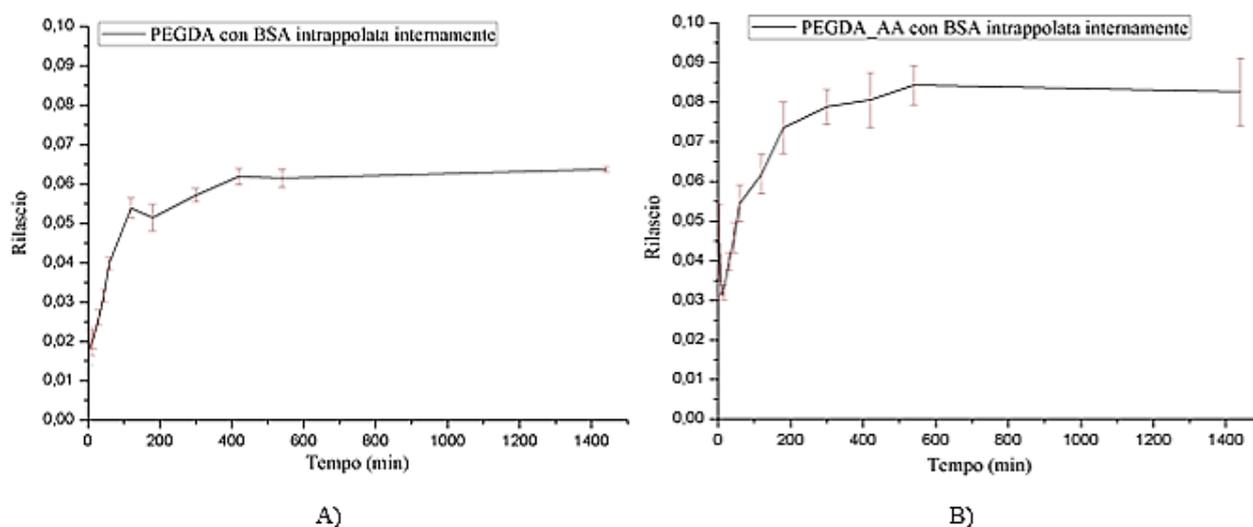


Figura 5.10 Rilascio della BSA intrappolata in bulk nei film di PEGDA (A) e PEGDA con acido acrilico (B)

Come si può notare dalla Figura 5.9, i film di PEGDA o PEGDA con acido acrilico aventi la BSA immobilizzata in superficie di fatto non rilasciano proteina, nemmeno dopo un tempo pari a 24h: infatti il rilascio è minimo e quasi asintotico alla linea dello zero. La ragione di ciò, per quanto riguarda il campione con acido acrilico, è da ricondursi al fatto che, come anticipato nel corso delle analisi di spettroscopia all'infrarosso, nel caso di immobilizzazione superficiale il legame che si forma è un legame di tipo chimico. Osservando, tuttavia, il rilascio da parte del campione con matrice di PEGDA (caso A in Figura 5.9), si vede che esiste in tal caso un minimo rilascio di proteina: ciò testimonia che nonostante l'assenza dell'acido acrilico una frazione di BSA – seppur molto esigua – si è comunque legata alla superficie.

Per quanto riguarda invece il rilascio da parte dei film con proteina intrappolata (Figura 5.10), contrariamente a quanto avveniva nel rilascio della proteina immobilizzata, la quantità di BSA rilasciata è molto maggiore. Questo risultato costituisce un'ulteriore conferma del fatto che nel caso di intrappolamento interno il legame con la matrice è di tipo fisico: infatti, l'immersione del polimero in soluzione acquosa causa un rigonfiamento delle maglie che permette la fuoriuscita della proteina intrappolata solamente in modo fisico. Se il legame fosse di tipo chimico, probabilmente ne verrebbe rilasciata in quantità minore, anche se non è possibile sapere con esattezza se tutta la proteina intrappolata viene rilasciata, o se una parte resta legata in modo covalente all'interno della matrice polimerica.

Oltre a ciò, dal grafico riportato in Figura 5.10 B) si può evidenziare un rilascio maggiore nel caso in cui la matrice contenga anche acido acrilico. Tale situazione è dovuta al fatto che proprio l'acido stesso, essendo monofunzionale, tende ad allargare la maglia del PEGDA, portando alla formazione di un reticolo più lasco e consentendo quindi, a parità di grado di rigonfiamento della matrice, una percentuale di rilascio più elevata. Questo risultato confermerebbe quindi l'ipotesi di interazione non covalente tra la matrice e la proteina.

A questo punto, si è quindi proceduto con una nuova analisi tramite spettroscopia ATR sugli stessi campioni, dopo che questi sono stati incubati in tampone acquoso per gli studi di rilascio.

5.3 Spettroscopia ATR dopo rilascio in ambiente acquoso

Al fine di offrire un'ulteriore e definitiva conferma della tipologia di legame formantesi tra la proteina e la matrice polimerica nei due casi di immobilizzazione superficiale e in bulk, sui campioni contenenti acido acrilico e sottoposti a rilascio sono state condotte delle nuove analisi ATR. Queste ultime sono riportate in

Figura 5.11, dove si fa rispettivamente riferimento ai campioni di PEGDA e acido acrilico con BSA in bulk e PEGDA e acido acrilico con BSA in superficie.

Come si può notare dalla Figura 5.11-A) nel caso di intrappolamento interno vi è una sostanziale differenza tra lo spettro IR prima del rilascio e quello dopo il rilascio: questo testimonia l'effettivo rilascio della proteina BSA, che non era dunque legata in modo chimico bensì era intrappolata in modo fisico. Al contrario, dalla Figura 5.11-B) si può evincere che nel caso di immobilizzazione superficiale, gli spettri IR prima e dopo il rilascio sono praticamente sovrapponibili: il rilascio della proteina non è di fatto avvenuto, dal momento che questa è legata alla matrice tramite ponti covalenti e non tramite semplici interazioni fisiche.

In conclusione, alla luce degli studi sul rilascio e tenuto conto dei risultati conseguiti con l'analisi ATR, si può affermare che esiste sì la possibilità di stampare tramite 3D printing delle strutture contenenti una proteina, ma quest'ultima sarà intrappolata solo fisicamente e sarà pertanto facilmente rilasciabile. Questo è un risultato particolarmente significativo dal momento che si è riusciti a collegare univocamente la tecnica di immobilizzazione con la tipologia di legame tra proteina e matrice. Uno sviluppo futuro potrebbe pertanto implicare l'utilizzo tanto dell'immobilizzazione superficiale quanto dell'intrappolamento interno per conseguire una struttura biocompatibile sulla cui superficie sia fissata una biomolecola con funzione permanente e al cui interno sia invece presente un'altra biomolecola in grado di essere rilasciata in modo controllato nell'ambiente circostante.

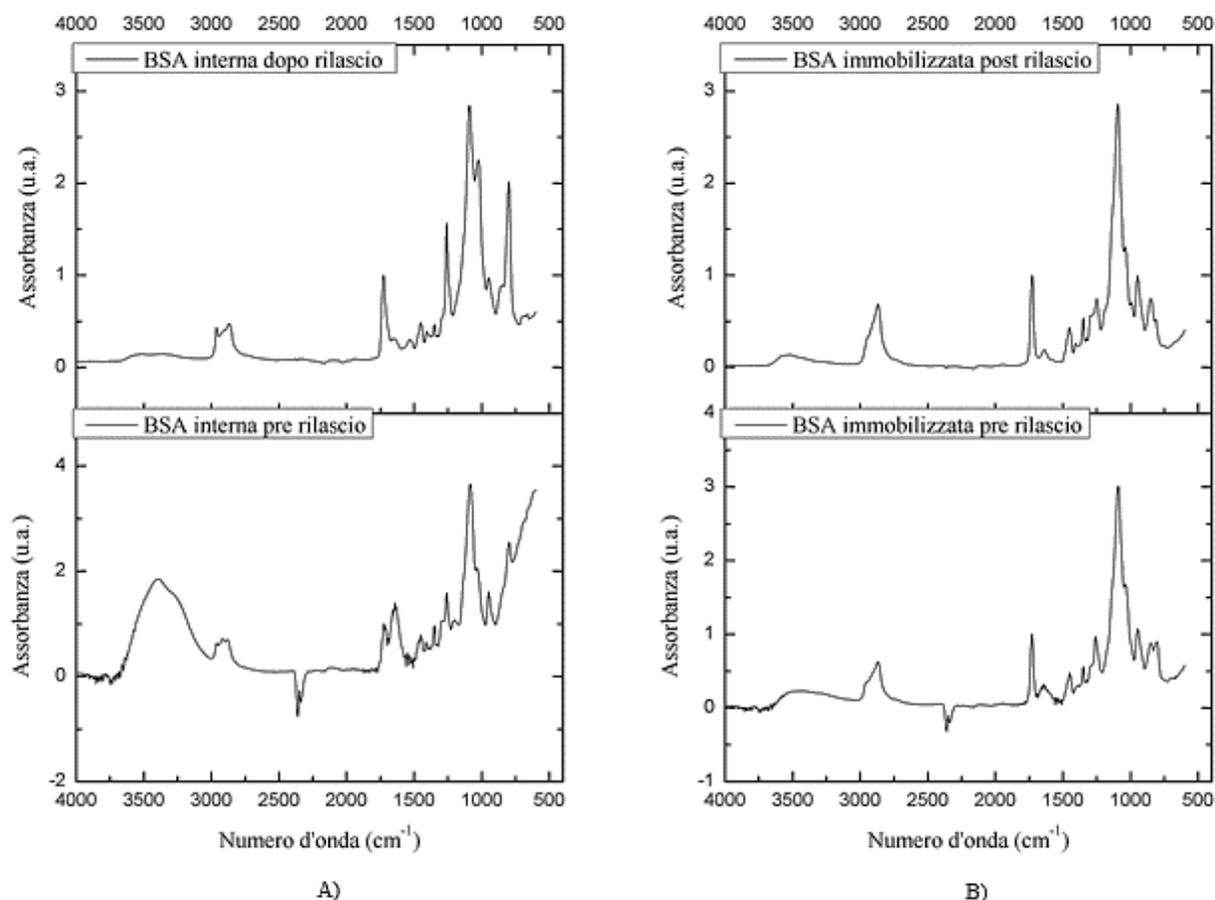


Figura 5.11 Confronto degli spettri IR prima e dopo rilascio in PBS per i campioni con PEGDA, acido acrilico e rispettivamente BSA immobilizzata in bulk (caso A) o in superficie (caso B)

Giunti a questo punto, è però necessario verificare che né la funzionalizzazione superficiale né il processo di stampa portino a un danneggiamento della proteina, cosa che sarà oggetto degli studi riportati nei paragrafi successivi.

5.4 Analisi tramite calorimetria a scansione differenziale (DSC) per i campioni con BSA intrappolata nella matrice polimerica

Una volta noti i comportamenti della proteina nelle due matrici, rispettivamente a base PEGDA con e senza acido acrilico, ed associata la possibilità di stampare con la proteina internamente, si è deciso di analizzare tramite calorimetria a scansione differenziale (DSC) i campioni con BSA intrappolata. In questo modo si è voluto fare una prima verifica dello stato funzionale della proteina, ovvero stimare se questa fosse denaturata o meno nel campione stampato.

Tale analisi tramite calorimetria a scansione differenziale ha permesso di conoscere gli eventi endotermici ed esotermici verificatisi nei campioni sottoposti ad una rampa di riscaldamento. In questo modo, una volta ottenuti i grafici è stato possibile associare i vari fenomeni ad eventi precisi legati ad una data sostanza nel campione, grazie al confronto con dati raccolti in letteratura.

Nel seguito si presentano pertanto i grafici relativi ai due campioni PEGDA con BSA intrappolata e PEGDA con acido acrilico e BSA intrappolata (Figura 5.12 e Figura 5.13, rispettivamente).

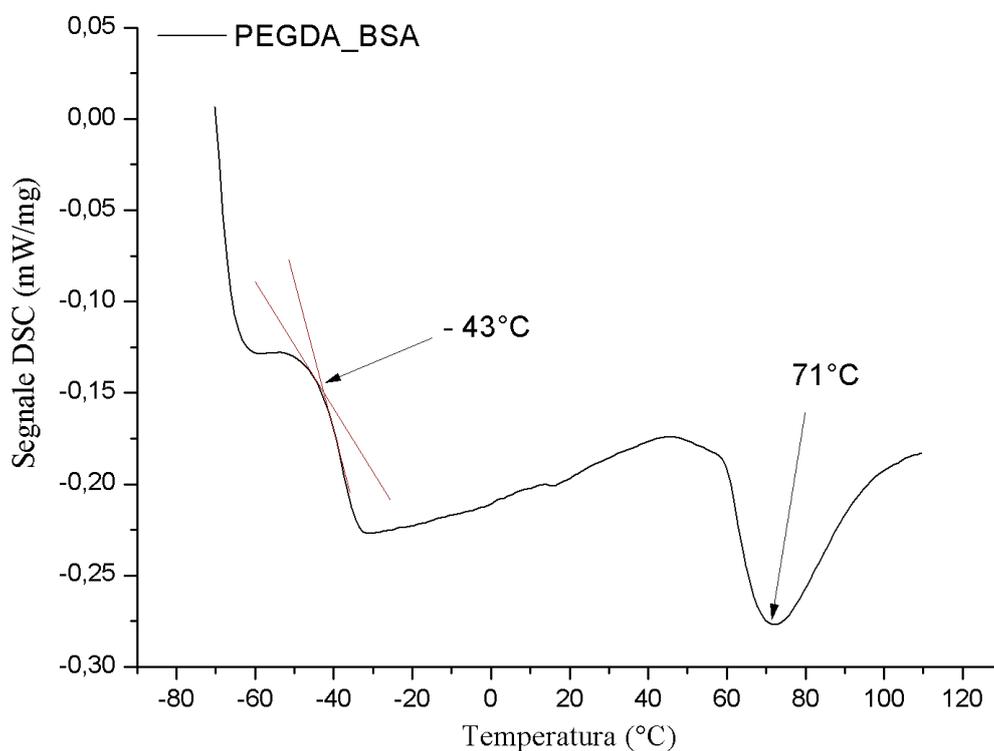


Figura 5.12 Analisi DSC del film di solo PEGDA e di quello con BSA intrappolata.

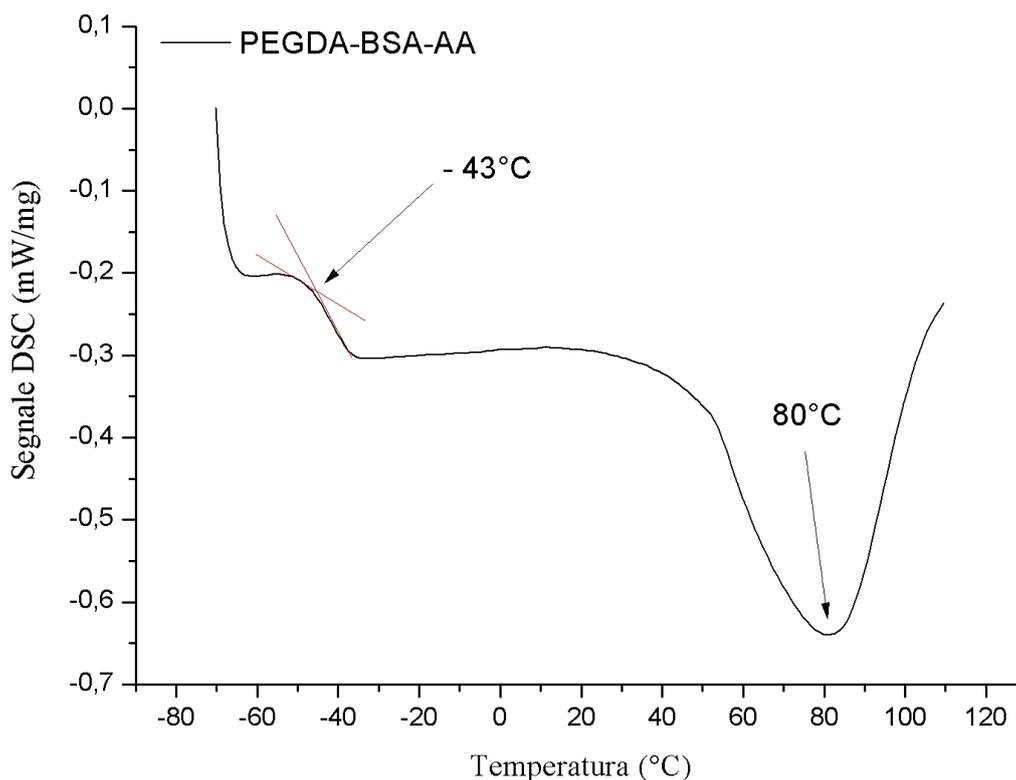


Figura 5.13 Analisi DSC del film con BSA in bulk e matrice di PEGDA ed acido acrilico

In entrambi i campioni i fenomeni termici più evidenti sono una transizione vetrosa a -43°C ed una fusione a circa 71°C per il campione senza acido acrilico e a circa 80°C per il campione con acido acrilico. La prima temperatura individuata è la temperatura di transizione vetrosa (T_g) della matrice in PEGDA, mentre il secondo fenomeno endotermico coincide con la temperatura di fusione della proteina, che è generalmente collocata tra i 60 ed 80°C , in funzione del pH dell'ambiente circostante (Michnik et al., 2005).

Per quanto riguarda invece i film con proteina in superficie si è optato per uno studio più preciso, vista la possibilità – in questo secondo caso – di analizzare in modo puntuale l'attività tramite saggio ELISA.

5.5 Analisi funzionale di una proteina immobilizzata in superficie

Per valutare la funzionalità di una proteina immobilizzata si ricorre normalmente alla misura della sua attività, stimando la capacità di conversione del proprio "substrato", definito come la molecola che la proteina è in grado di trasformare chimicamente. Tuttavia, la proteina in esame deve essere un enzima: solo questo tipo di proteina è infatti in grado di reagire chimicamente con il substrato, producendo un segnale rilevabile.

Per questo motivo, per sviluppare l'analisi funzionale di una proteina immobilizzata in superficie, sono stati utilizzati dei film che recassero sullo strato superficiale non una semplice proteina, quale la BSA, bensì un enzima, ovvero la HRP. Per quanto riguarda la tipologia di matrice sono stati usati sia dei film a base PEGDA sia dei film a base PEGDA con acido acrilico.

Su entrambe le tipologie di film aventi HRP immobilizzato in superficie è stato effettuato un saggio colorimetrico ELISA, secondo il protocollo riferito nel Capitolo 4 e i valori di OD ricavati sono stati convertiti in densità superficiali di molecole immobilizzate ($\text{molecole}/\text{cm}^2$), permettendo così di ottenere i risultati nel seguito riportati in Figura 5.14.

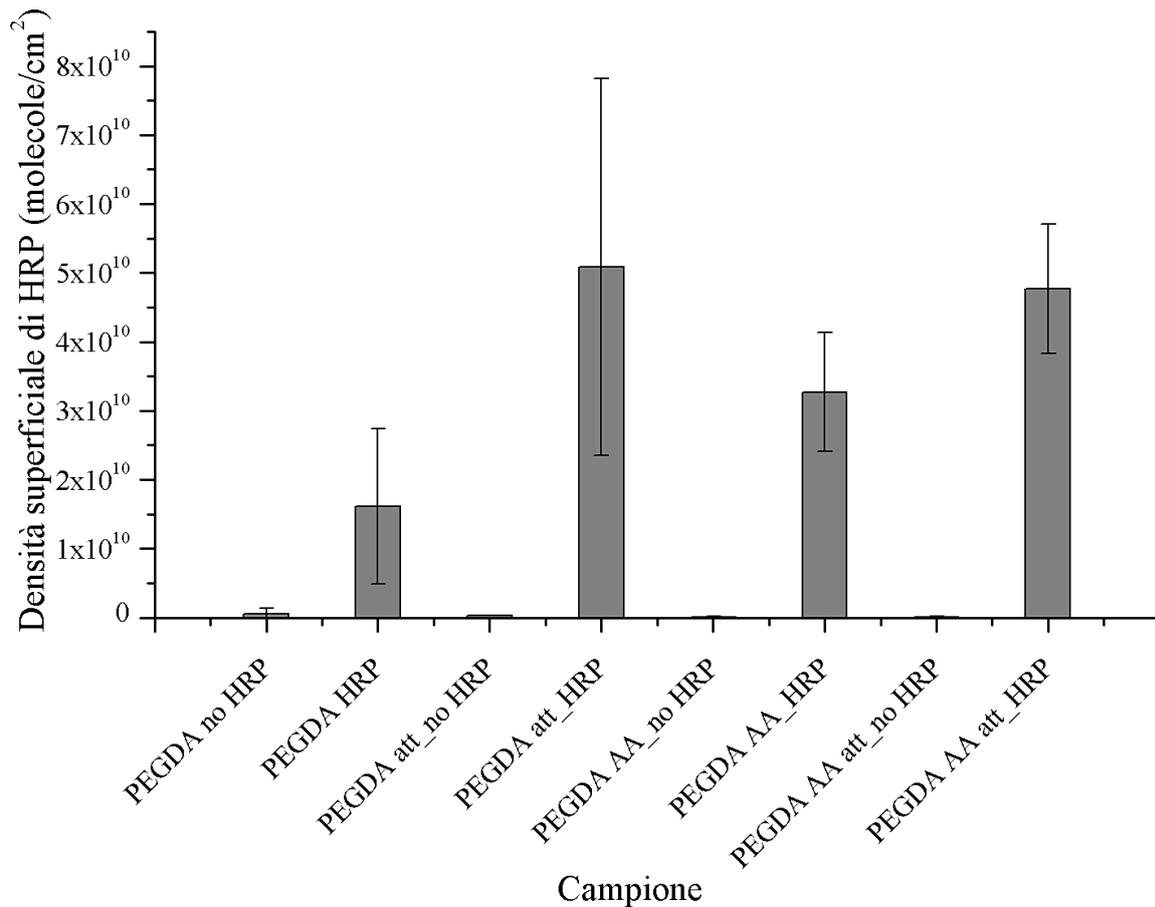


Figura 5.14 Istogramma relativo ai risultati della valutazione dell'immobilizzazione tramite saggio colorimetrico ELISA. I dati fanno riferimento alla densità superficiale di molecole immobilizzate (molecole/cm²) su campioni di solo PEGDA, o di PEGDA e acido acrilico (AA), i cui gruppi COOH sono stati o meno attivati ("att").

Come si può notare dall'istogramma di Figura 5.14, nel caso dell'immobilizzazione a seguito di attivazione del campione, la densità superficiale è stata decisamente maggiore rispetto ai casi in cui non era stata effettuata l'attivazione. Infatti, i valori di densità superficiale per il campione senza acido acrilico sono $1.61 \cdot 10^{10}$ molecole/cm² per il campione senza attivazione e $5.08 \cdot 10^{10}$ molecole/cm² per il campione attivato. Per quanto riguarda invece il campione con acido acrilico, i valori di densità superficiale sono $3.27 \cdot 10^{10}$ molecole/cm² e $4.77 \cdot 10^{10}$ molecole/cm². Il fatto che per il campione attivato, la densità superficiale sia maggiore nel campione senza acido acrilico ($5.08 \cdot 10^{10}$ anziché $4.77 \cdot 10^{10}$) va poi collegato alla barra di errore, che è decisamente più elevata nel caso del campione senza acido acrilico: l'errore per il campione con acido acrilico è infatti pari a 9.37 mentre quello per il campione senza acido acrilico è solo 2.73. Questo è giustificabile pensando al fatto che probabilmente, nel caso del campione senza acido, la HRP è comunque in grado di attaccarsi, ma dal momento che l'adesione avviene solamente in modo fisico, essa viene rilasciata più facilmente: da questo deriva un valore localmente maggiore, ma unito ad una barra di errore così ampia.

Una volta ottenute queste analisi, si è poi scelto di effettuare anche degli studi preliminari per poter eventualmente utilizzare la stessa analisi anche per i campioni contenenti una biomolecola in bulk. Pertanto, il comportamento dell'enzima è stato osservato testando delle formulazioni liquide e senza PEGDA, ma contenenti l'enzima e un tipo di fotoiniziatore differente, inserito a diverse concentrazioni in tampone PBS. Come anticipato nel Capitolo 4, ciascuna formulazione è stata sottoposta a diversi cicli di irraggiamento, in modo da emulare quanto avviene in un normale processo di stampa e post-reticolazione, e dopodiché è stata

valutata tramite saggio colorimetrico ELISA. I risultati sono schematizzati nell'istogramma riportato in Figura 5.15.

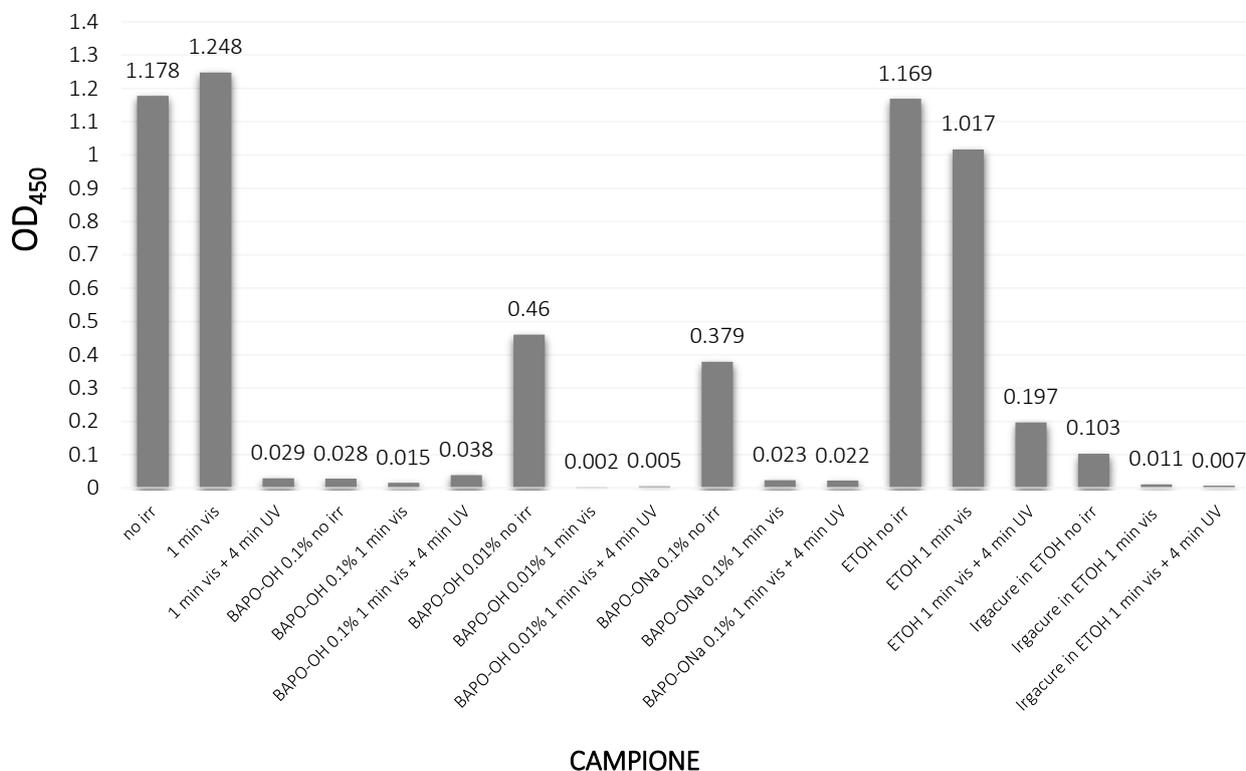


Figura 5.15 Istogramma relativo alle valutazioni enzimatiche effettuate tramite saggio colorimetrico ELISA sulle formulazioni liquide

Da questo istogramma si può vedere che la presenza stessa del fotoiniziatore inficia in modo significativo l'attività enzimatica anche nel caso di concentrazioni molto basse. Se l'attività enzimatica non fosse alterata, il valore dovrebbe aggirarsi intorno a 1,2, intensità di assorbimento della formulazione pura, senza fotoiniziatore. Il fatto che questo valore si abbassi in tutti i casi in cui è presente un fotoiniziatore e lo faccia oltremodo nel caso di irraggiamento con radiazione ultravioletta, significa che in queste formulazioni avviene una significativa perdita dell'attività enzimatica. Infatti, se l'enzima perde la propria attività, non è più in grado di reagire con il substrato dando origine alla colorazione della soluzione caratteristica di quelle lunghezze d'onda di assorbimento. La perdita di attività enzimatica nelle diverse formulazioni irraggiate indica dunque che nel caso di intrappolamento interno un saggio enzimatico non può essere utilizzato per testare la funzionalità dell'enzima immobilizzato.

Ulteriori sviluppi potrebbero dunque concernere altre tipologie di test per sondare con ulteriore dettaglio il comportamento della proteina all'interno del film ed eventualmente – in caso di esito negativo – la ricerca di altre tipologie di fotoiniziatori idrosolubili e non inficanti l'attività enzimatica.

Dopo aver effettuato le presentate analisi, si è anche cercato di studiare l'omogeneità di dispersione della proteina nel bulk polimerico: i risultati sono riferiti nel successivo paragrafo.

5.6. Studi sull'omogeneità di intrappolamento in bulk

Per conoscere l'omogeneità di dispersione di una proteina in una matrice polimerica è possibile utilizzare l'analisi al microscopio in fluorescenza, impiegando come proteina sonda non la semplice BSA, ma la sua versione marcata fluorescente, la BSA-FITC.

Prima di procedere si è voluto tuttavia osservare il comportamento della FITC in presenza di un fotoiniziatore e di un irraggiamento sia visibile sia ultravioletto, dal momento che non esistono in letteratura casi in cui essa venga stampata insieme ad una matrice polimerica. Per fare ciò si è deciso di testare differenti formulazioni liquide con diverse tipologie e concentrazioni di fotoiniziatori e con processi di irraggiamento che emulassero quelli subiti nelle fasi di stampa e post-reticolazione del film biostampato. Nonostante l'elenco di tali formulazioni liquide sia già stato riferito nel Capitolo 4, lo si riporta nuovamente per permettere una più agile comprensione dei risultati ottenuti (Tabella 5.1). Nell'ultima colonna è indicato il valore del delta presentato nella scala dei valori di grigio elaborata con il software Bio7: si parla di delta perché ci si riferisce ad una differenza tra il massimo ed il minimo valore registrati nell'immagine catturata al microscopio. Nel dettaglio, il massimo valore attribuibile alla tonalità di verde associata alla fluorescenza della FITC è pari a 110. Più il valore è basso rispetto al dato massimo, più significa che la FITC si è frammentata ed ha dunque perso la sua capacità di emettere in fluorescenza. La deviazione standard è espressa sulla base di 5 differenti misure.

Tabella 5.1 Elenco dei test effettuati sulle formulazioni liquide e relativi valori di intensità associati.

FORMULAZIONE	CAMPIONE	IRRAGGIAMENTO			VALORE DEL DELTA
		Nessuno	1 minuto nel visibile	4 minuti nell'UV	
PBS-FITC o PBS-HRP	A	X			103 ± 0.23
	B		X		110 ± 0.00
	C		X	X	84 ± 0.186
PBS-FITC o PBS-HRP e BAPO-OH 0.1%	D	X			85 ± 0.21
	E		X		46 ± 0.16
	F		X	X	27 ± 0.31
PBS-FITC o PBS-HRP e BAPO-ONa	G	X			106 ± 0.149
	H		X		102 ± 0.17
	I		X	X	72 ± 0.199
PBS-FITC o PBS-HRP e BAPO-OH 0.01%	J	X			110 ± 0.00
	K		X		94 ± 0.27
	L		X	X	75 ± 0.19
PBS-FITC o PBS-HRP e Irgacure 819 in etanolo	M	X			110 ± 0.00
	N		X		110 ± 0.00
	O		X	X	32 ± 0.276
PBS-FITC o PBS-HRP e etanolo	P	X			110 ± 0.00
	Q		X		110 ± 0.00
	R		X	X	110 ± 0.00

Le immagini catturate al microscopio in fluorescenza ed associate ai campioni illustrati in Tabella 5.1 sono riportate in Figura 5.16. Invece la Figura 5.18 mostra un esempio del tipo di grafico ricavato dallo studio del profilo di grigio tramite software Bio7.

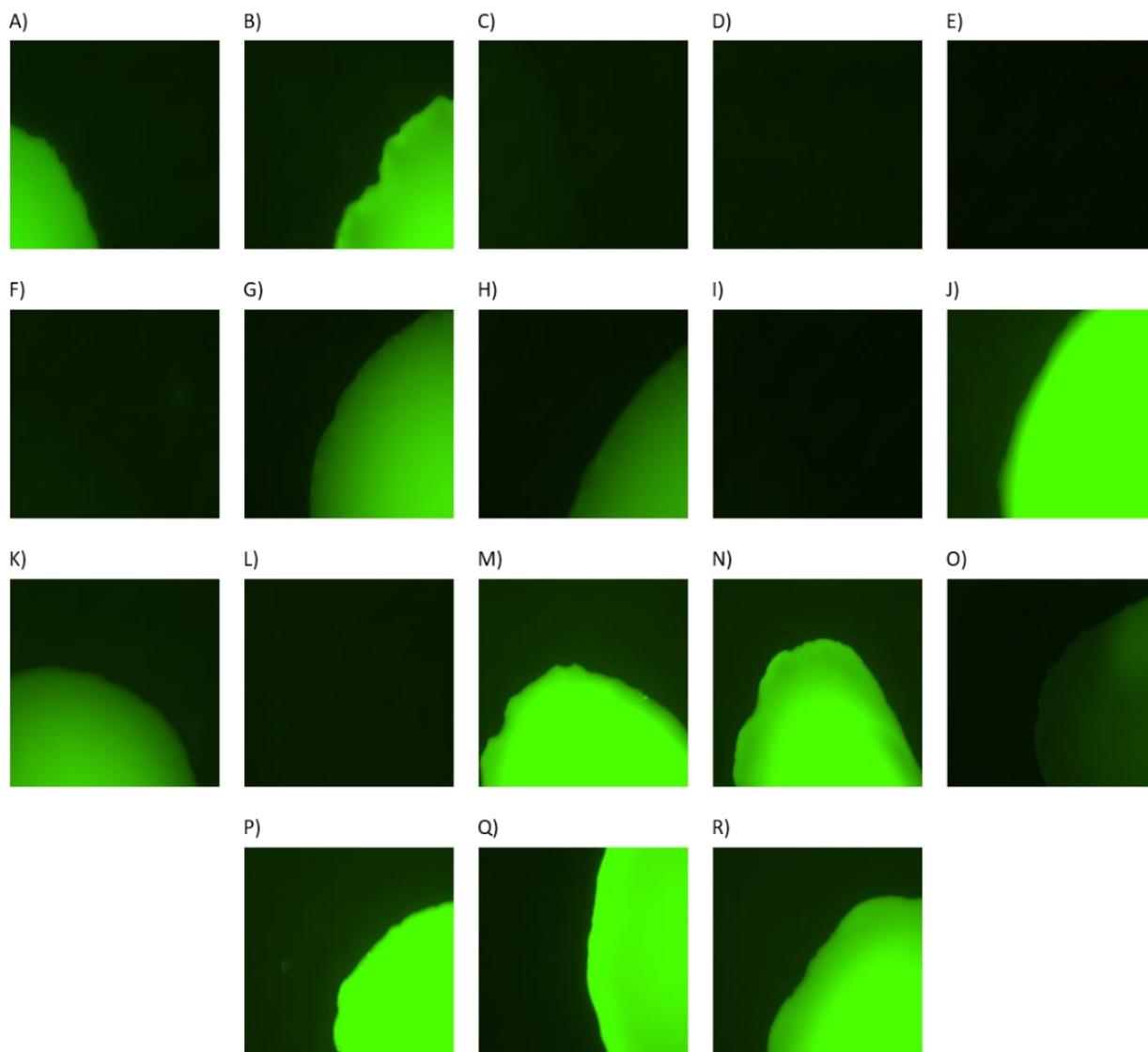


Figura 5.16 Immagini delle gocce di formulazione liquida catturate al microscopio in fluorescenza.

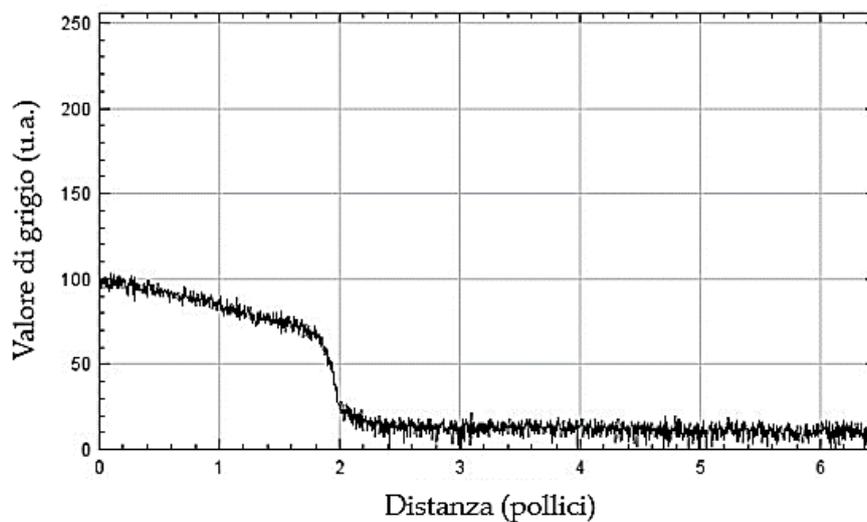


Figura 5.17 Esempio di grafico di elaborazione di immagine tramite software Bio7. Il campione di riferimento è il campione A.

La sintesi dei dati ottenuti è meglio visibile nell'istogramma riferito in Figura 5.18.

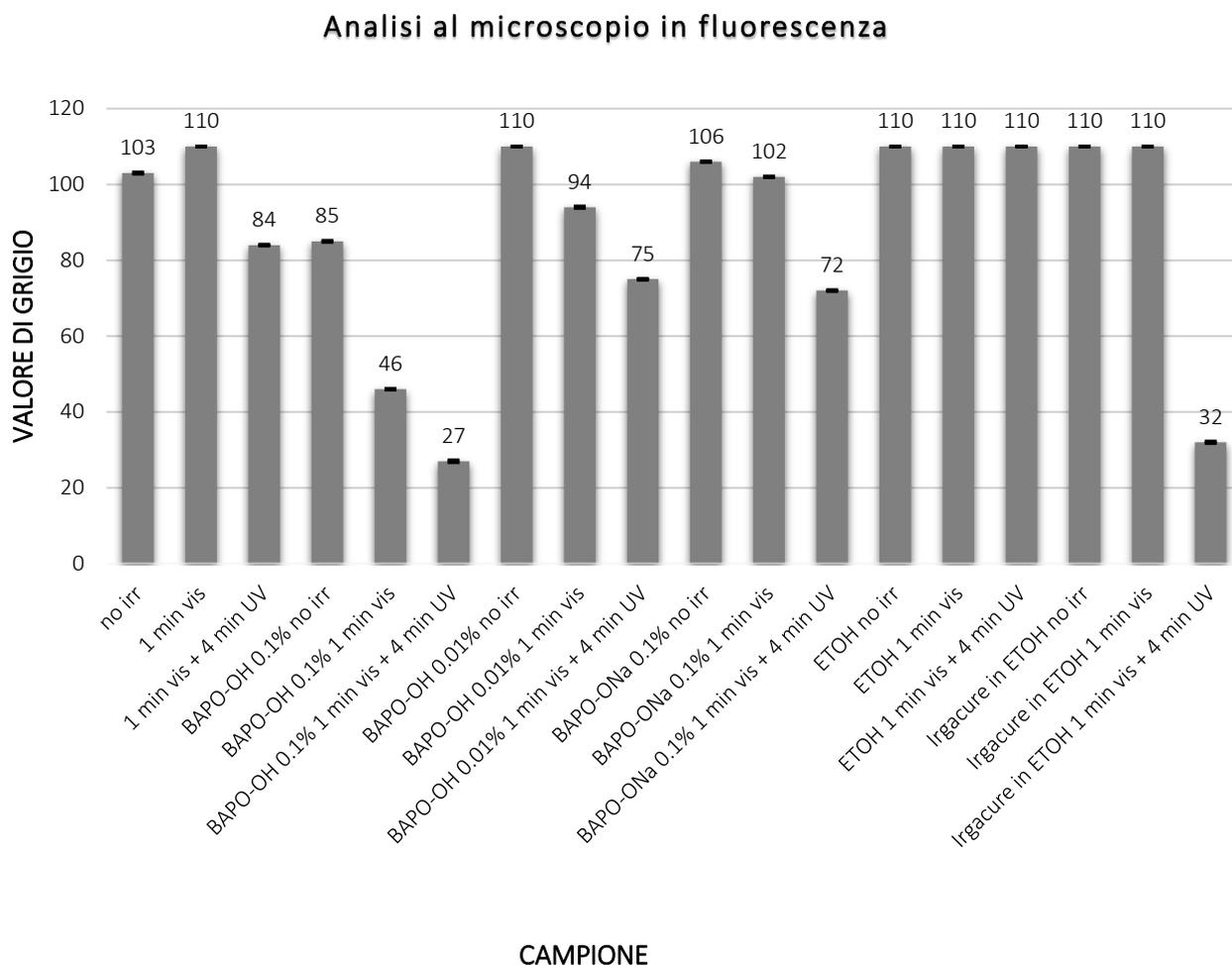


Figura 5.18 Iistogramma relativo alle analisi effettuate tramite microscopio in fluorescenza

Alla luce dei dati riportati, il valore di grigio massimo (110), ovvero i campioni in cui il fluoroforo risulta integro e funzionale è stato riscontrato nei campioni:

- Che non contengono alcun fotoiniziatore;
- Che non hanno subito alcun tipo di irraggiamento.

Data tuttavia la necessità della presenza di un fotoiniziatore ai fini della stampa, si è ritenuto opportuno cercare comunque, per sviluppi futuri, quale fosse il miglior fotoiniziatore possibile per mantenere la fluorescenza della FITC. A tal proposito, per quanto riguarda i campioni che hanno subito un irraggiamento di un minuto nella luce visibile, il comportamento migliore è offerto dai campioni contenenti Irgacure 819 in etanolo, i quali presentano il valore più alto possibile. Se invece si passa ad osservare i campioni che hanno subito l'irraggiamento nell'UV oltre che nel visibile, il comportamento migliore è dato dai campioni contenenti BAPO-OH allo 0.01%. Oltretutto, il valore di grigio associato al medesimo campione, ma con solo irraggiamento nel visibile, è pari a 94, che non è comunque molto distante dal valore massimo (110). Osservando invece il BAPO-ONa, i valori sono pari a 102 per l'irraggiamento visibile e a 72 per visibile seguito da ultravioletto.

Con questi studi preliminari concernenti il comportamento della FITC, è stata quindi compresa l'impossibilità di utilizzare questo metodo di analisi per lo studio dell'omogeneità di dispersione all'interno della matrice polimerica. Si può infatti ipotizzare che la presenza di radicali vada a inficiare l'attività di fluorescenza, degradando il fluoroforo che quindi non risulta più visibile.

Ipotizzare un semplice cambiamento del fotoiniziatore non è possibile, dal momento che la natura e la quantità di fotoiniziatore utilizzato, ovvero BAPO-OH allo 0.1% in peso, sono state selezionate secondo alcuni importanti criteri:

1. Il BAPO-OH è un fotoiniziatore idrosolubile;
2. Lo 0.1% w/w permette di stampare tramite tecnologia DLP una formulazione di per sé molto liquida vista la necessità del tampone acquoso ospitante la proteina da inglobare nel bulk;
3. Il BAPO-OH non necessita di essere sciolto in un solvente organico.

Pertanto, non potendo utilizzare l'analisi al microscopio in fluorescenza, in un'analisi futura sarà necessario rivolgersi ad altre tecniche.

5.7. Stampa di strutture a geometria complessa

Al termine delle analisi sperimentali si è deciso di eseguire la stampa tramite DLP di alcuni componenti a geometria complessa e di ottenere in un caso un campione avente la BSA intrappolata internamente (Figura 5.19) e nell'altro un campione avente la HRP immobilizzata in superficie (Figura 5.20).

Queste stampe sono state realizzate al fine di mostrare la concreta possibilità di produrre tramite 3D printing delle strutture a geometria complessa a piacere e di effettuare su di esse l'immobilizzazione di una proteina, tanto sulla superficie quanto nel bulk.

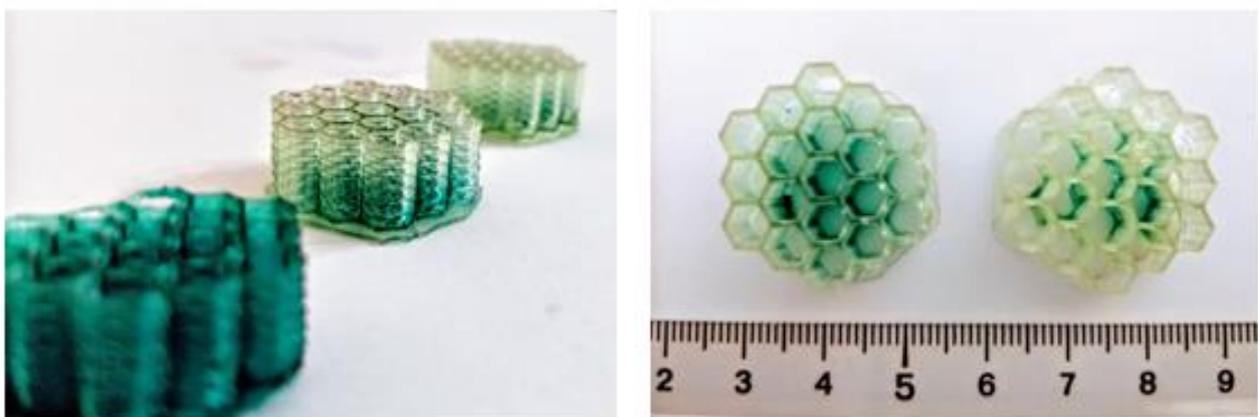


Figura 5.19 Fotografie dei campioni a geometria honeycomb aventi BSA intrappolata in bulk.

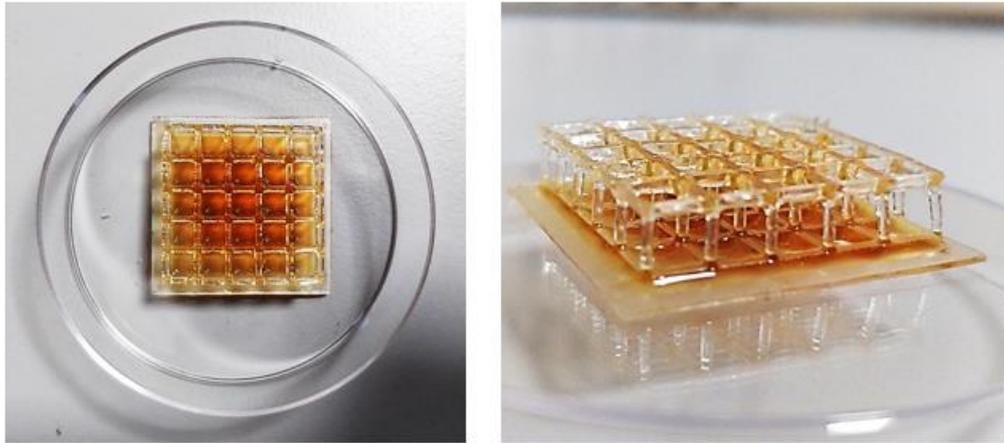


Figura 5.20 Fotografie del campione a base PEGDA ed acido acrilico, avente la HRP immobilizzata in superficie.

Come ulteriore dimostrazione, nel caso del cubo forato con immobilizzata la HRP in superficie è stata effettuata una valutazione dell'immobilizzazione tramite saggio colorimetrico ELISA, i cui risultati sono riportati dell'istogramma di Figura 5.21.

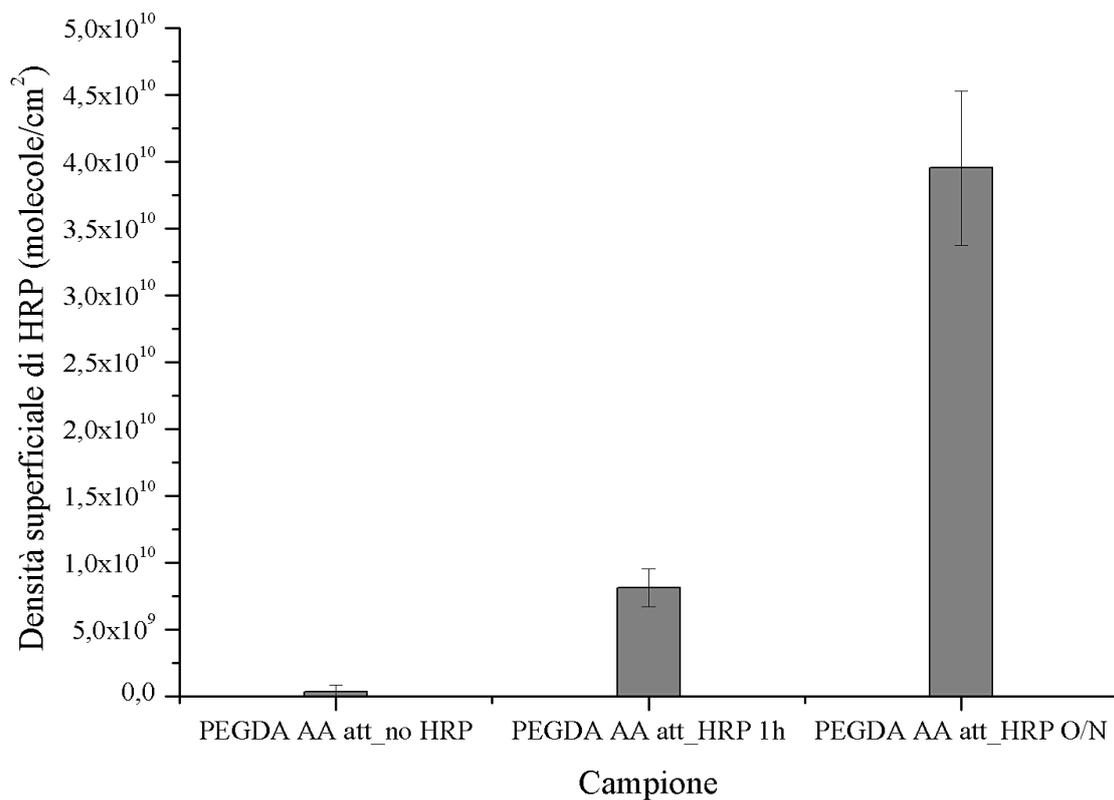


Figura 5.21 Iistogramma relativo alla valutazione dell'immobilizzazione tramite saggio colorimetrico sulla struttura cubo forato

Nell'istogramma di Figura 5.21, il valore corrispondente all'incubazione pari a un'ora sul campione di PEGDA con acido acrilico è stato inserito al fine di rendere possibile un confronto diretto con quanto avviene nel caso dei film (incubati per 1h con l'enzima in fase di immobilizzazione). Come si può vedere, la quantità ottenuta in questo caso è inferiore (circa ¼), ed è stata quindi ripetuta con tempi più lunghi. È possibile che per l'immobilizzazione sul campione 3D siano necessari tempi più lunghi per via della complessità spaziale del campione, e per la presenza di effetti di limitazioni al trasferimento di massa dovute alla diffusione. Pertanto, al fine di agevolare la comprensione, si riporta l'istogramma di Figura 5.22, nel quale è indicato un confronto

tra le densità superficiali di HRP immobilizzata e l'istogramma di Figura 5.23, nel quale è invece elaborato un confronto tra le quantità di enzima immobilizzato, rispettivamente per il film e per il cubo forato.

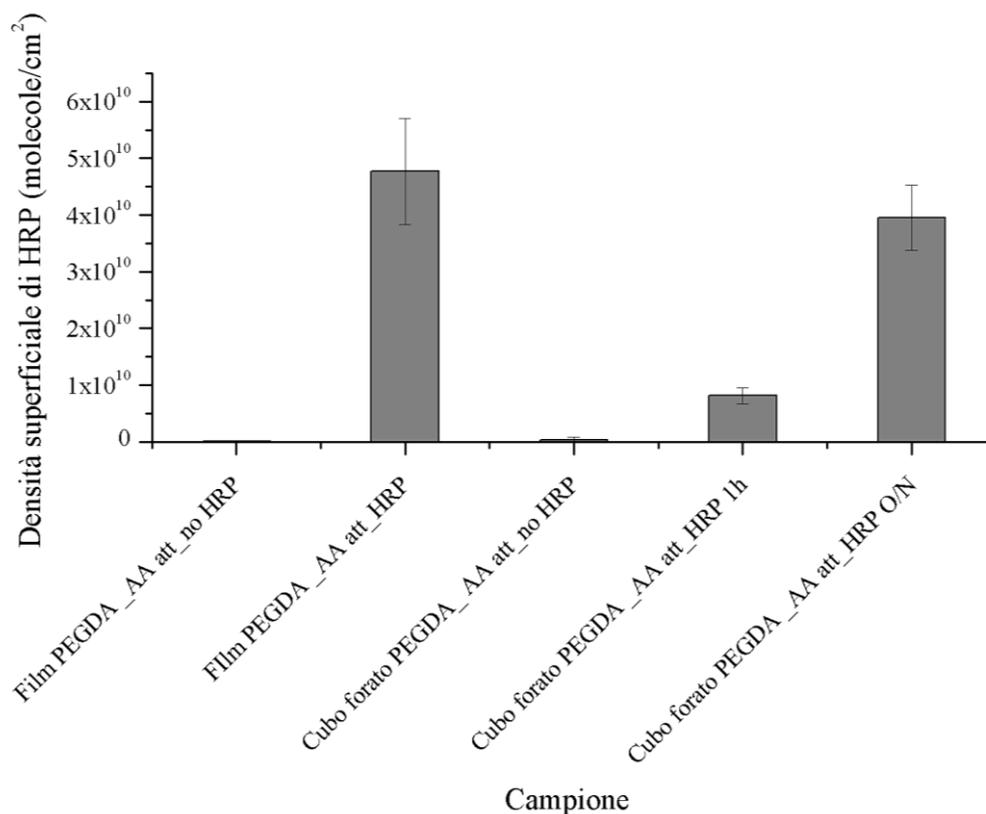


Figura 5.22 Confronto tra le densità superficiali (molecole/cm²) di HRP immobilizzate, rispettivamente nel caso dei film e del cubo forato

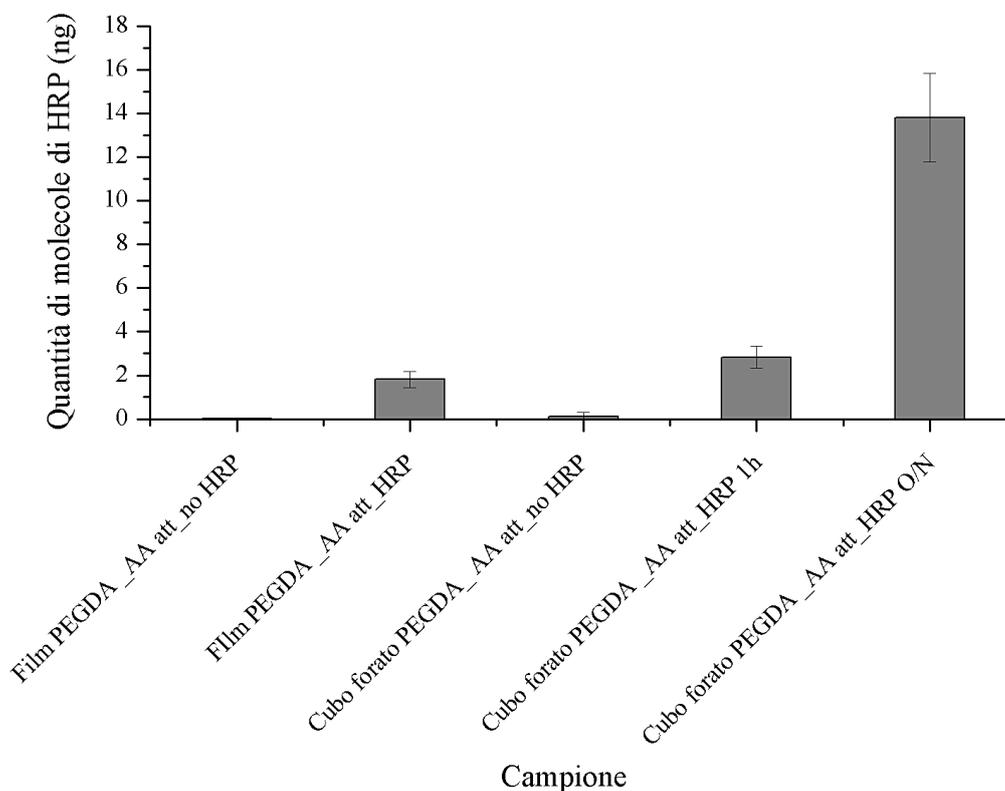


Figura 5.23 Confronto tra le quantità (ng) di molecole di HRP immobilizzate, rispettivamente nel caso dei film e del cubo forato

Per quanto riguarda le densità superficiali, nel caso di incubazione pari a 1h, il valore ottenuto per il film è di $47.7 * 10^9$ molecole/cm², mentre per il cubo forato è di $8.12 * 10^9$ molecole/cm², quindi circa 6 volte inferiore in quest'ultimo caso. Tuttavia, per il caso del cubo forato, il valore ottenuto nel caso di incubazione over night diventa pari a $39.5 * 10^9$ molecole/cm². Questo significa dunque che l'immobilizzazione sul cubo forato è più lenta rispetto al caso del film, dal momento che la geometria del supporto è più complessa e dunque è richiesto più tempo per il completo ricoprimento della superficie del campione.

Per quanto riguarda invece il confronto tra le quantità espresse in ng (Figura 5.23), nel caso di incubazione di 1h, i valori sono simili: 1.8 ng per il film e 2.8 ng per il cubo forato. Una quantità maggiore nel caso del cubo forato è riconducibile alla maggiore area di supporto offerta. Infatti, nel caso di incubazione over night, per il cubo forato, la quantità di HRP sale a 13.8 ng. Tuttavia, considerato che il completo ricoprimento superficiale si ha, per ragioni legate alla geometria del campione, dopo un tempo pari a 1h per il film e dopo un tempo over night per il cubo forato, le massime quantità di HRP immobilizzato sono rispettivamente pari a 1.8 ng per il film e a 13.8 ng per il cubo forato. Tutto ciò è proprio dovuto alla maggior area superficiale, che a parità di densità di molecole immobilizzate, corrisponde ad un maggior quantitativo assoluto di enzima disponibile per unità di volume (quasi di 8 volte superiore rispetto ai film).

6. Conclusioni

Con il presente progetto di tesi si è studiato un possibile sviluppo dei materiali polimerici stampabili tramite 3D printing in ambito biologico. Nel dettaglio, ci si è focalizzati sulla stampa di strutture polimeriche aventi una proteina immobilizzata in superficie o in bulk. La ricerca condotta su tale tematica ha permesso di comprendere anzitutto la possibilità di ottenere la stampa tramite DLP, in geometrie sia semplici sia complesse, di una formulazione contenente il 50% di soluzione acquosa. In secondo luogo, è stato possibile collegare due precise tecniche di immobilizzazione a due differenti tipologie di legame. Infatti, è stato dimostrato che qualora l'immobilizzazione sia basata su un intrappolamento in bulk della biomolecola, il legame che si instaura tra quest'ultima e la matrice polimerica ospitante è di tipo puramente fisico; al contrario, nel caso in cui l'immobilizzazione sia effettuata a posteriori della stampa e solo sulla superficie del substrato polimerico, il legame che si forma tra la biomolecola e la matrice sottostante è di tipo chimico covalente.

Questo risultato apre la strada a future prospettive applicative: ad esempio, si potrebbe giungere alla produzione tramite DLP di un componente biocompatibile ed eventualmente impiantabile avente una certa biomolecola intrappolata nel suo bulk ed un'altra, differente, immobilizzata solamente sulla sua superficie. Sfruttando il dato secondo cui la sostanza interna sarebbe legata in modo fisico, mentre quella esterna lo sarebbe in modo chimico, sarebbe possibile produrre una struttura avente una sostanza facilmente rilasciabile intrappolata nel materiale ed una non rilasciabile sulla superficie. Grazie a ciò, un simile componente potrebbe essere in grado sia di essere accettato dall'organismo grazie alla biomolecola in superficie, sia di rilasciare al tempo stesso un'altra biomolecola dall'interno, destinata ad esempio a scopi terapeutici.

Oltre al risultato principale ed appena esposto, ulteriori indagini hanno permesso di ottenere risultati aggiuntivi. Questi sono riferiti al caso di intrappolamento interno e sono l'impossibilità, da un lato, di utilizzare la microscopia in fluorescenza per lo studio inerente l'omogeneità di dispersione di una biomolecola, e dall'altro, di mantenere la funzionalità della biomolecola e conseguentemente di effettuare una valutazione dell'immobilizzazione tramite saggio colorimetrico. Entrambe queste problematiche sono dovute alla fotoscissione subita dalle molecole coinvolte a causa dell'irraggiamento presente nelle fasi di stampa e post reticolazione. Sviluppi futuri potrebbero pertanto riguardare uno studio inerente nuove tecniche di analisi adoperabili per la conoscenza dell'omogeneità di dispersione e per la valutazione dell'immobilizzazione in campo biologico.

Da ultimo, una ricerca futura potrebbe senza dubbio essere incentrata sull'implementazione dei sistemi studiati, ampliando il campo non solo dei materiali stampabili tramite DLP ed applicabili in ambito biologico ma anche quello delle biomolecole immobilizzabili.

Bibliografia

- ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J. et al., **2008**, Molecular Biology of the Cell, 5th.
- ANFISEN C. B., **1973**, Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181(4096), pp.223-230.
- BALCÃO, V. M., PAIVA A. L., MALCATA F., X., **1996**, Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, 18.6: 392-416.
- BERG J. M., TYMOCZKO J. L., STRYER L., **2002**, Biochemistry, *W. H. Freeman and Company*, New York.
- BICKERSTAFF, G. F., **1997**, Immobilization of enzymes and cells. In: *Immobilization of enzymes and cells*. Humana press, p. 1-11.
- BIFFI, C. A.; TUISSI, A., **2017**, Stato dell'arte sulle tecniche di produzione additiva per metalli. *Metall. Ital*, 109: 5-10.
- BOON N. W., ENG M. C. B., **2002**, Protein encapsulation using UV PEG hydrogels.
- BOSE S., VAHABZADEH S., BANDYOPADHYAY A., **2013**, Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials today*, 16.12: 496-504.
- BRANDEN C. I. et al., **1999**, Introduction to protein structure. *Garland Science*.
- BRENA B., GONZÁLEZ-POMBO P., BATISTA-VIERA F., **2013**, Immobilization of enzymes: a literature survey. In: *Immobilization of enzymes and cells*. Humana Press, Totowa, NJ, p. 15-31.
- CAETANO-ANOLLES G., WANG M., CAETANO-ANOLLES D., MITTENTHL J. E., **2009**, The origin, evolution and structure of the protein world. *Biochemical Journal*, 417(3), pp.621-637.
- CALIGNANO F. et al., **2017**, Overview on additive manufacturing technologies. *Proceedings of the IEEE*, 105.4: 593-612.
- CHARLES S. W., et al., **1987**, Infrared spectrum and rotational isomerism of acrylic acid. *Journal of molecular structure*, 157.1-3: 17-29.
- CHIADÒ A. et al., **2016**, Optimization and characterization of a homogeneous carboxylic surface functionalization for silicon-based biosensing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 143: 252-259.
- CHUA C. K., LEONG K. F., **2014**, *3D Printing and Additive Manufacturing: Principles and Applications (with Companion Media Pack) of Rapid Prototyping Fourth Edition*. World Scientific Publishing Company.
- COPPI, G., et al., **2002**, Protein immobilization in crosslinked alginate microparticles. *Journal of microencapsulation*, 19.1: 37-44.
- COSNIER S., **2003**, Biosensors based on electropolymerized films: new trends, *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 507–520.

- FLORA K. K., BRENNAN J. D., **2001**, Effect of matrix aging on the behaviour of human serum albumin entrapped in a tetraethyl orthosilicate-derived glass. *Chemistry of materials*, 13.11: 4170-4179.
- FRAZIER W. E., **2014**, Metal additive manufacturing: a review. *Journal of Materials Engineering and Performance*, 23.6: 1917-1928.
- FRIEDRICH P., **2014**, *Supramolecular enzyme organization: quaternary structure and beyond*. Elsevier.
- GRDADOLNIK J., MARECHAL Y., **2001**, Bovine serum albumin observed by infrared spectrometry. II. Hydration mechanisms and interaction configurations of embedded H₂O molecules. *Biopolymers*, 62.1: 54-67.
- GUISAN J. M., **2006**, *Immobilization of enzymes and cells*. Springer Science & Business Media.
- GUPTA, R.; CHAUDHURY, N. K., **2007**, Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: Problems and future prospects. *Biosensors and Bioelectronics*, 22.11: 2387-2399.
- HANZLICEK I., PENTEK M., **2014**, Computational Modeling of Stereolithography. In: *IEEE GSC*.
- HOMA J., SCHWENTENWEIN M., **2015**, A Novel Additive Manufacturing Technology for High-Performance Ceramics. In: *Advanced Processing and Manufacturing Technologies for Nanostructured and Multifunctional Materials: A Collection of Papers Presented at the 38th International Conference on Advanced Ceramics and Composites January 27-31, 2014 Daytona Beach, Florida*. John Wiley & Sons, Inc., p. 33-40.
- HORNBECK L. J., **1997**, Digital light processing for high-brightness high-resolution applications. In: *Projection Displays III*. International Society for Optics and Photonics, p. 27-41.
- HOUNSFIELD G. N., **1973**, Computerized transverse axial scanning (tomography): Part 1. Description of system. *The British journal of radiology*, 46.552: 1016-1022.
- JONES N., **2012**, Science in three dimensions: the print revolution. *Nature* 487, 22–23.
- KANG H-W., YOO, J. J., ATALA A., **2015**, Bioprinted scaffolds for cartilage tissue engineering. In: *Cartilage Tissue Engineering*. Humana Press, New York, NY, p. 161-169.
- KONEKE R., MENZEL C., ULBER R., SCHUGERL, K., SALEEMUDDIN M., **1996**, Reversible coupling of glucoenzymes on fluoride-sensitive FET biosensors based on lectin-glucoprotein binding. *Biosens. Bioelectron.* 11, 1229–1236.
- KUMAR S., NUSSINOV R., **1999**, Salt bridge stability in monomeric proteins¹. *Journal of molecular biology*, 293.5: 1241-1255.
- LIN C-C., METTERS A. T., **2006**, Enhanced protein delivery from photopolymerized hydrogels using a pseudospecific metal chelating ligand. *Pharmaceutical research*, 23.3: 614.
- MANNOOR M. S. et al., **2013**, 3D printed bionic ears. *Nano letters*, 13.6: 2634-2639.
- MAURO J. M., CAO L. K., KONDRACKI L. M., WALZ S. E., CAMPBELL J. R., **1996**, Fiber-optic fluorometric sensing of polymerase chain reaction-amplified DNA using an immobilized DNA capture protein. *Anal. Biochem.* 235, 61–72.
- MICHNIK A., MICHALIK K., DRZAZGA Z., **2005**, Stability of bovine serum albumin at different pH. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 80.2: 399-406.

- MUELLER B., KOCHAN D., **1999**, Laminated object manufacturing for rapid tooling and patternmaking in foundry industry. *Computers in Industry*, 39.1: 47-53.
- MÜLLER G. et al., **2015**, Simple One-Pot Syntheses of Water-Soluble Bis (acyl) phosphane Oxide Photoinitiators and Their Application in Surfactant-Free Emulsion Polymerization. *Macromolecular rapid communications*, 36.6: 553-557.
- MURPHY S. V., ATALA A., **2014**, 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature biotechnology*, 32.8: 773.
- MURR L. E. et al., **2012**, Fabrication of metal and alloy components by additive manufacturing: examples of 3D materials science. *Journal of Materials Research and technology*, 1.1: 42-54.
- NOROTTE C. et al., **2009**, Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials*, 30.30: 5910-5917.
- PALAU J., ARGOS P., PUIGDOMENECH P., **1982**, Protein secondary structure. *Chemical Biology & Drug Design*, 19(4), pp.394-401.
- PALLESCHI G., **1989**, Biosensori in medicina. *Caleidoscopio*, 42.
- PATEL N., BHANDARI R., SHAKESHEFF K. M. et al., **2000**, Printing patterns of biospecifically-adsorbed protein. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 11, 319–331.
- PHELPS M. R., HOBBS J. B., KILBURN D. G., TURNER R. F. B., **1995**, An autoclavable biosensor for microbial fermentation monitoring and control. *Biotechnol. Bioeng.* 46, 514–524.
- PISANO R., **a.a. 2014/2015**, Appunti del corso di Fenomeni di Trasporto, *Politecnico di Torino*.
- OLAKANMI E. O., COCHRANE R. F., DALGARNO K. W., **2015**, A review on selective laser sintering/melting (SLS/SLM) of aluminium alloy powders: Processing, microstructure, and properties. *Progress in Materials Science*, 74: 401-477.
- QADERI K., **2015**, Polyethylene Glycol Diacrylate (PEGDA) Resin Development for 3D-Printed Microfluidic Devices.
- RATNER B. D., **2004**, et al. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. *Elsevier*.
- ROY I., GUPTA M. N., **2006**, Bioaffinity immobilization. In: *Immobilization of enzymes and cells*. Humana Press, p. 107-116.
- RUSMINI F., ZHONG Z., FEIJEN J., **2007**, Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules*, 8.6: 1775-1789.
- SANGERMANO M., **a.a. 2014/2015**, Appunti del corso di Scienza e tecnologia dei materiali polimerici, *Politecnico di Torino*.
- SARDAR M., ROY I., GUPTA M. N., **2000**, Simultaneous purification and immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on the reversibly soluble polymer Eudragit™ L-100. *Enzyme and Microbial Technology*, 27.9: 672-679.
- SINGH B. D., **2009**, Biotechnology expanding horizons. India: Kalyani.
- SLICHTER C. P., **2013**, Principles of magnetic resonance. *Springer Science & Business Media*.

- SOSNITZA P., FAROOGI M., SALEEMUDDIN M., ULBER R., and SCHEPER T., **1998**, Application of reversible immobilization techniques for biosensors. *Anal. Chim. Acta* 368, 197–203.
- TOPOGLIDIS E. et al., **1998**, Protein adsorption on nanocrystalline TiO₂ films: an immobilization strategy for bioanalytical devices. *Analytical chemistry*, 70.23: 5111-5113.
- UGUES D., **a.a. 2015-2016**, Appunti del corso di Impianti Metallurgici, *Politecnico di Torino*.
- WANG K. et al. **2015**, Scaffold materials from glycosylated and PEGylated bovine serum albumin. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103.9: 2839-2846.
- WHITAKER M., **2014**, The history of 3D printing in healthcare. *The Bulletin of the Royal College of Surgeons of England*, 96.7: 228-229.
- WONG K. V., HERNANDEZ A., **2012**, A review of additive manufacturing. *ISRN Mechanical Engineering*.
- WOODWARD J., **1985**, Immobilized enzymes: Adsorption and covalent coupling. In: *Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach*, (Woodward, J., ed.), IRL Press, Oxford, UK, pp. 3–17.

Sitografia

<http://kataléo.com/blog/category/stampa-3d/>

<http://www.chimica-online.it/organica/struttura-delle-proteine.htm>

<http://www.custompartnet.com/wu/images/rapid-prototyping/inkjet-printing.png>

<http://www.grm-consulting.co.uk/gasturbine>

http://www.treccani.it/magazine/lingua_italiana/domande_e_risposte/lessico/lessico_194.html

<https://3dprint.com/13733/lithoz-eos-langer-investment/>

<https://3dprintmagazine.com/tissues-blood-vessels-3d-printed/>

https://horizon-magazine.eu/article/3d-printed-bones-could-be-used-reconstruct-faces_en.html

<https://patents.google.com/patent/EP1832631A1/en>

<https://www.focus.it/tecnologia/innovazione/organismi-umani-la-stampante-3d-biologica>

<https://www.linkedin.com/pulse/making-medical-3d-printed-metal-implant-steve-fourrier>

<https://www.wikipedia.org/>

<https://www.leica-microsystems.com/it/prodotti/microscopi-ottici/microscopi-verticali/dettagli/product/leica-dm-lm/>