

Università degli Studi di Padova – Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea in Ingegneria chimica e dei materiali

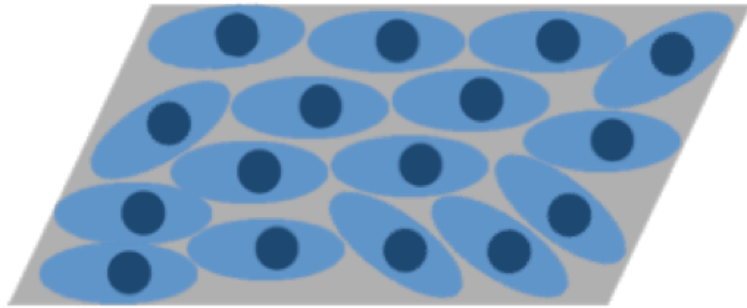
## ***Relazione per la prova finale***

# ***«Analisi del coefficiente di diffusione di biomateriali per la creazione di modelli 3D per la biostampa»***

Tutor universitario: Prof. Elisa Cimetta

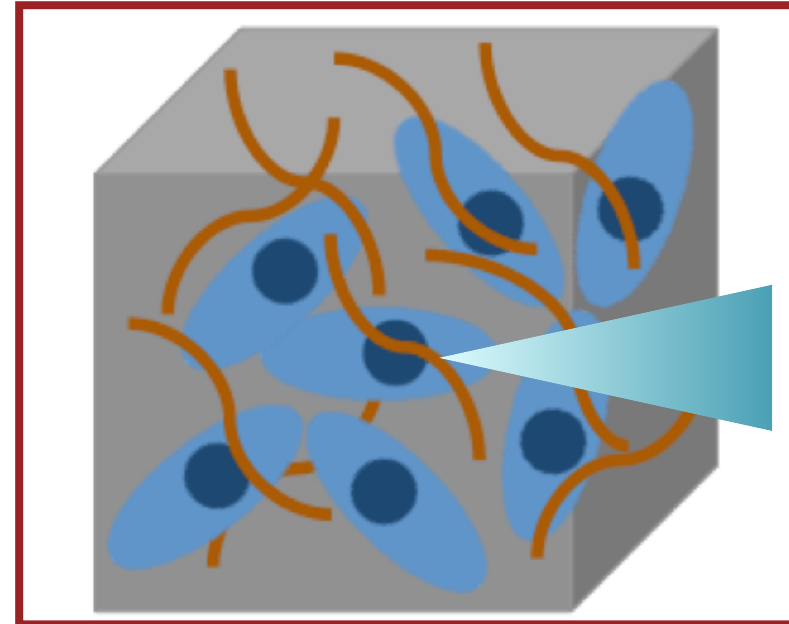
Laureando: *Scarfò Letizia*

Padova, 25/10/2022



## COLTURE CELLULARI 2D

- Mono-strato cellulare
- Limitate interazioni cellula-cellula
- Distribuzione non fisiologica dei nutrienti

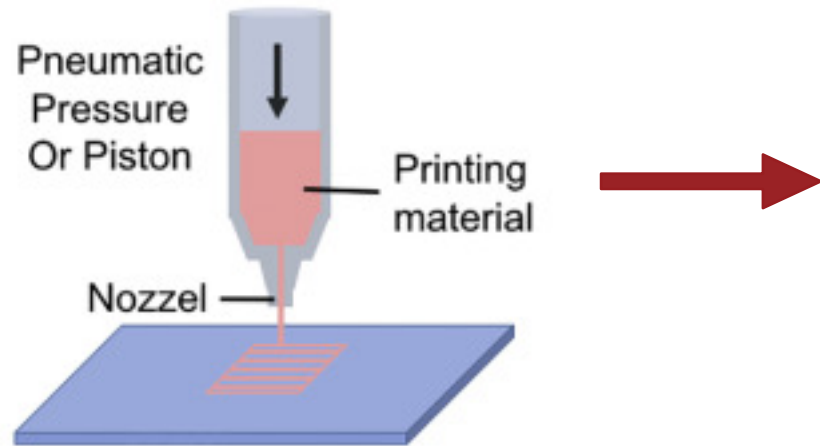


Gradiente di  
nutrienti e O<sub>2</sub>

## COLTURE CELLULARI 3D

- Interazioni spaziali tridimensionali cellula-cellula e cellula-ECM
- Distribuzione fisiologica dei nutrienti

## Biostampa ad estrusione



## HYDROGEL

rete polimerica reticolata e gonfia  
d'acqua prodotta dalla semplice  
reazione di uno o più monomeri

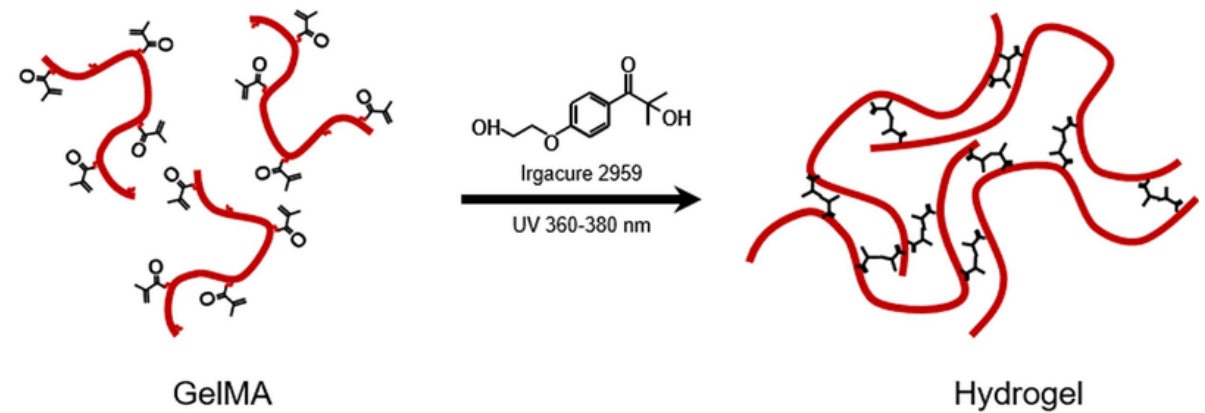
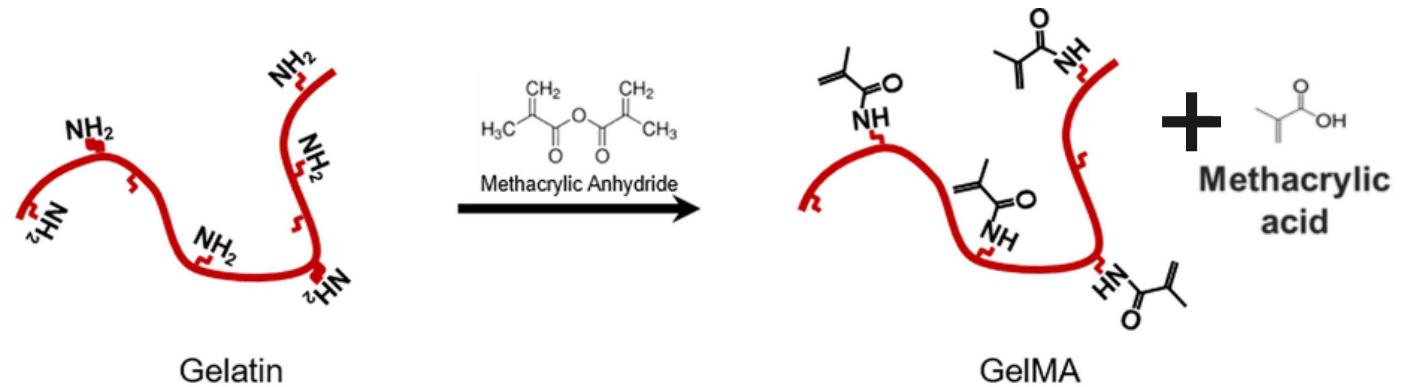
Naturali

Sintetici e semi-sintetici

- Non tossicità
- Adeguato swelling
- Stabilità

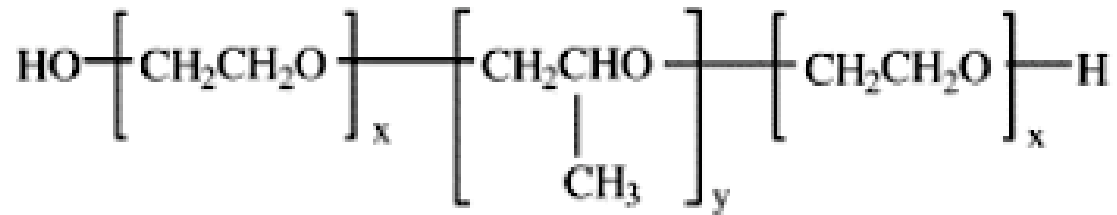
- Biocompatibilità
- Proprietà regolabili

- Dissoluzione gelatina 10% w/v a 40°C
- Aggiungere 50  $\mu$ L di MA /g di gelatina
- La reazione dura 2 ore a 40°C
- Aggiungere HCl per aggiustare il pH
- Dialisi per 5 giorni
- Liofilizzazione per 7 giorni



Utilizzando una percentuale di **Pluronic F127** si ottiene un blend di hydrogel con una **maggior porosità**

**Pluronic F127 40% w/v**

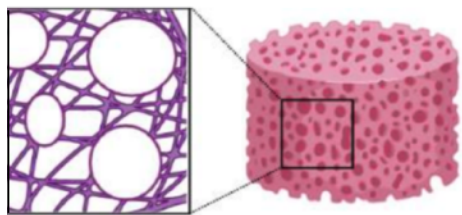


EO

PO

EO

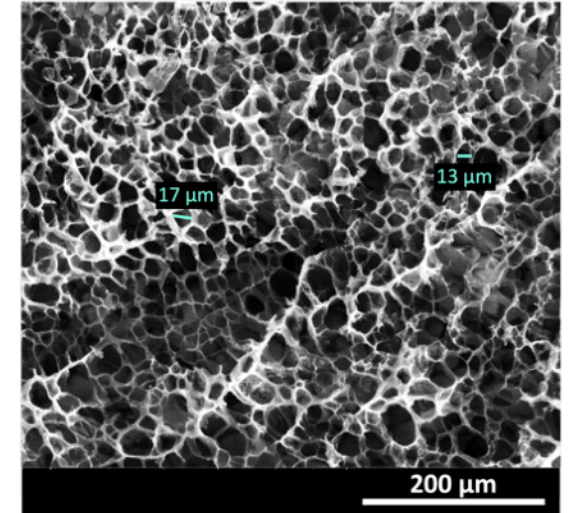
- 1) GeIMA
- 2) GeIMA-PLU 0.5%



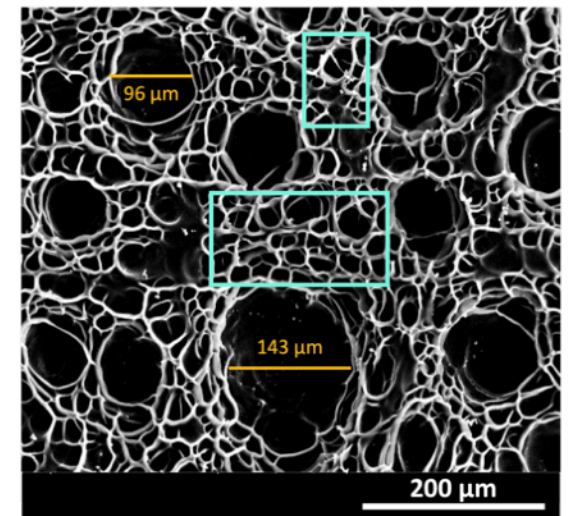
L'aggiunta del Pluronic influenza anche il coefficiente di diffusione?



GeIMA



GeIMA-PLU 0.5%



Confronto coefficiente di  
diffusione di diversi biomateriali

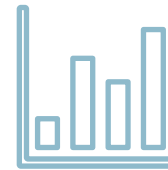
- 1) GelMA
- 2) GelMA-PLU 0.5%



Preparazione campioni da diversi  
lotti di GelMA e GelMA-PLU



Analisi FRAP con destrani di  
diversi pesi molecolari

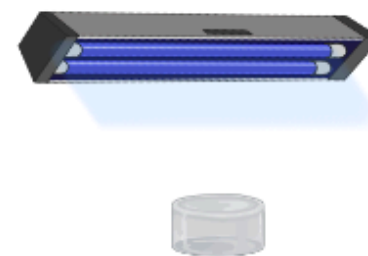


Calcolo e confronto  $\mathcal{D}$   
tramite algoritmo  
Matlab



Conferma risultati  
attesi

Calcolo diffusività di  
molecole di simile MW



1

Preparazione  
hydrogel:  
si aggiunge irgacure  
(e pluronic)

2

Casting dell'hydrogel  
nello stampo

3

Reticolazione  
tramite UV  
365 nm

4

Incubazione con  
destrani



## FRAP - Fluorescence Recovery After Photobleaching

- il campione viene marcato con dei fluorofori (destrani)
- si bersaglia l'area di bleaching con un laser a 488 nm
- viene monitorato il processo di recupero di intensità



Curva di recupero d'intensità



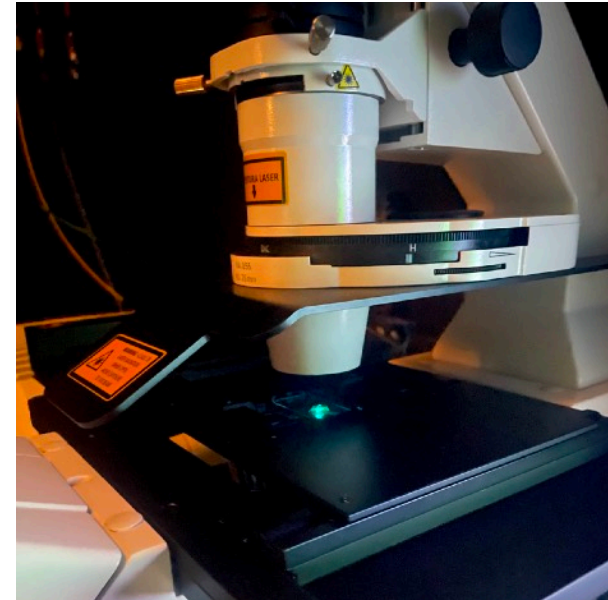
Calcolo coeff. di diffusione:

$$D_{confocale} = \frac{r_e^2 + r_n^2}{8\tau_{1/2}}$$

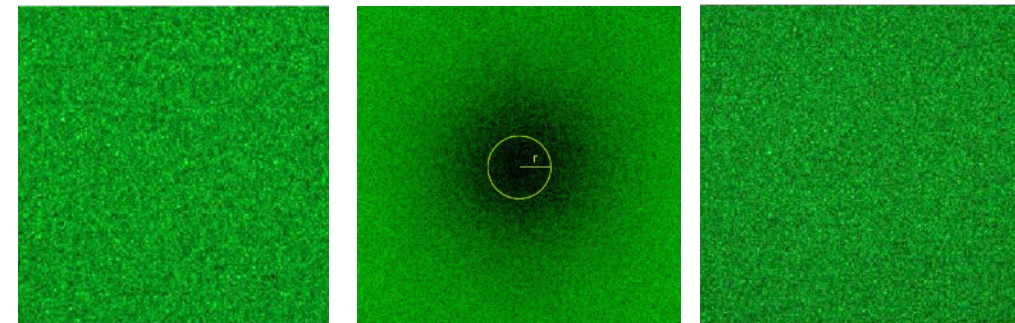
$r_n$  = raggio ROI

$r_e$  = raggio effettivo =  $r_n$

$\tau_{1/2}$  = tempo di metà recupero



- Ingrandimento: 63x
- Cicli di *bleaching*: 20
- tempo di osservazione: 90 s
- Raggio ROI: 20  $\mu$ m



Tempo



I dati non sono tra di loro comparabili

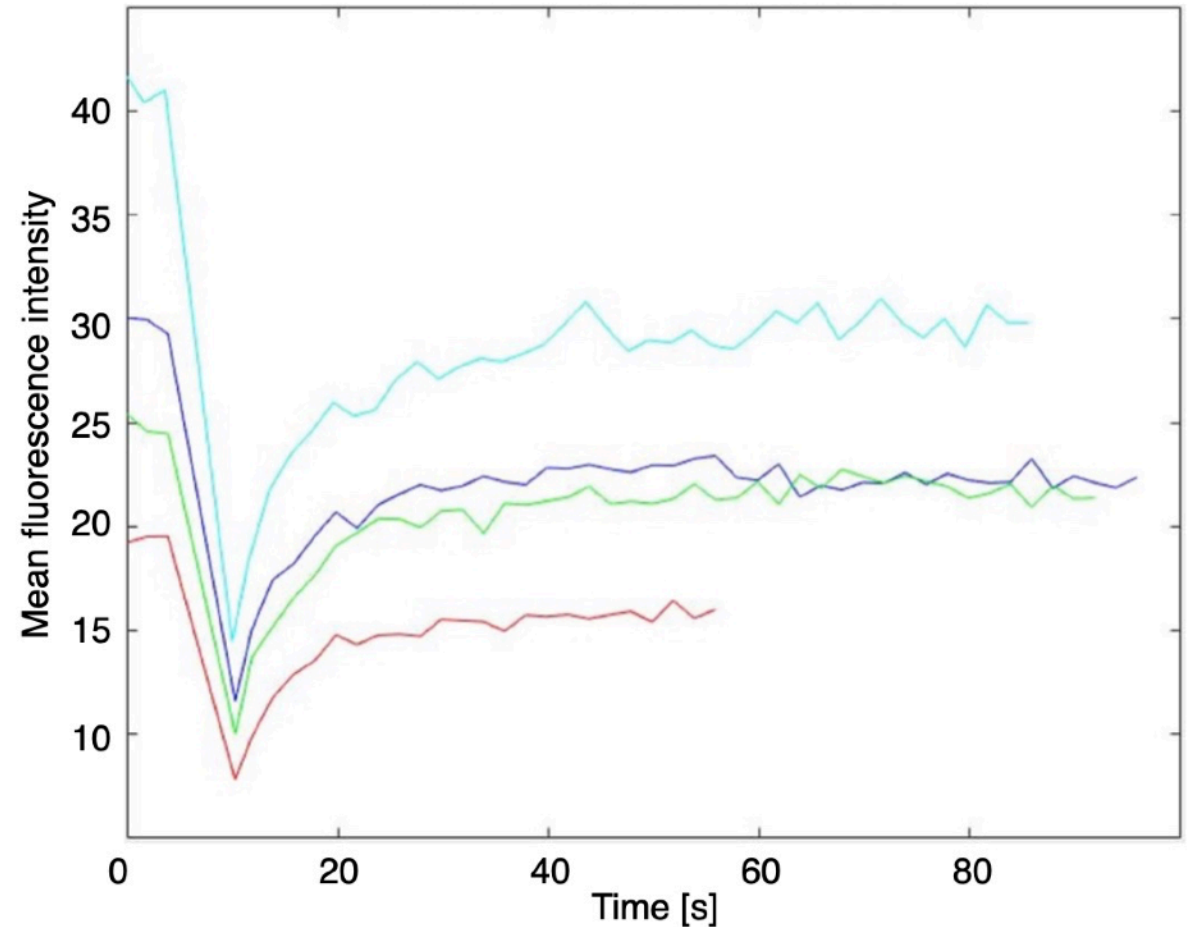


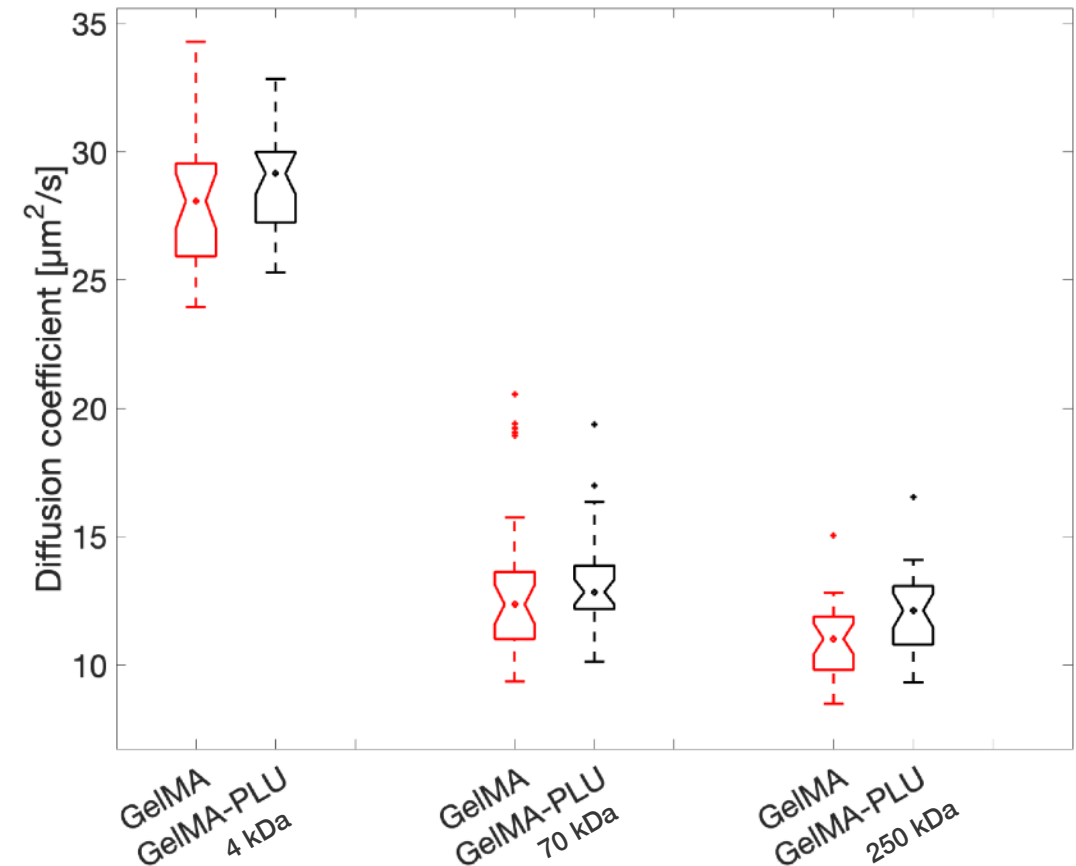
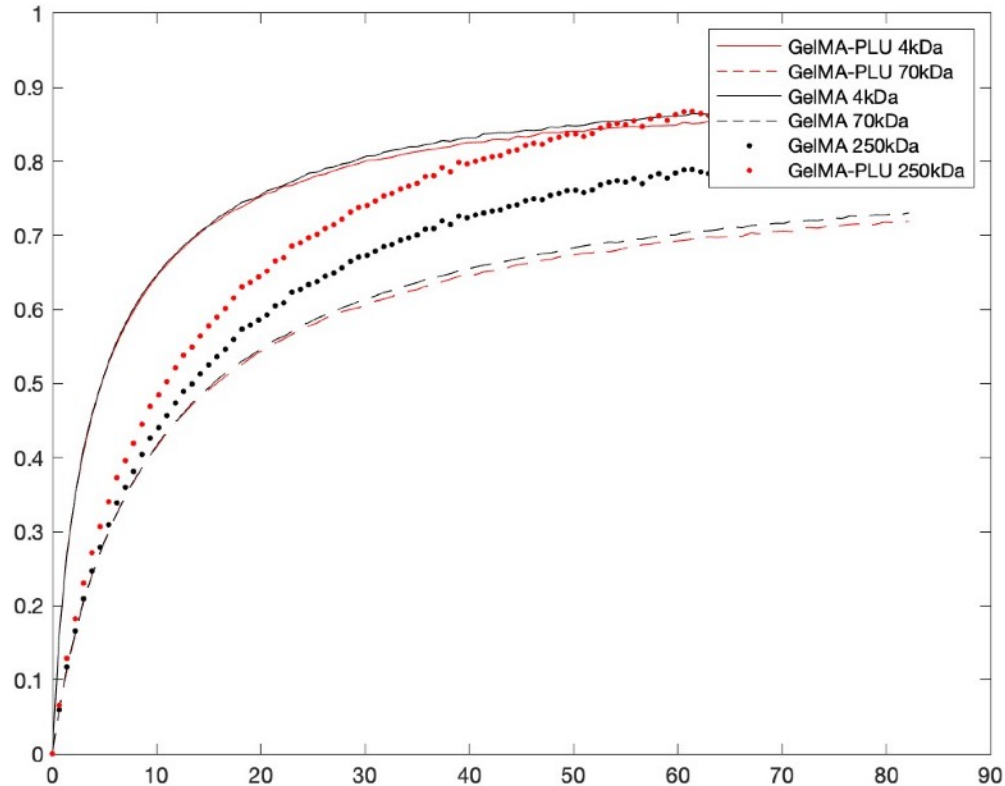
Normalizzazione

1. Sottrazione del **fondo**
2. Sottrazione del **tempo di bleach**  
( $t_{\text{bleach}} = t_0$ )
3. Normalizzazione sull'**intervallo misurato**
4. **Fitting** dei dati sperimentali



Calcolo del tempo di metà recupero  $\tau_{1/2}$

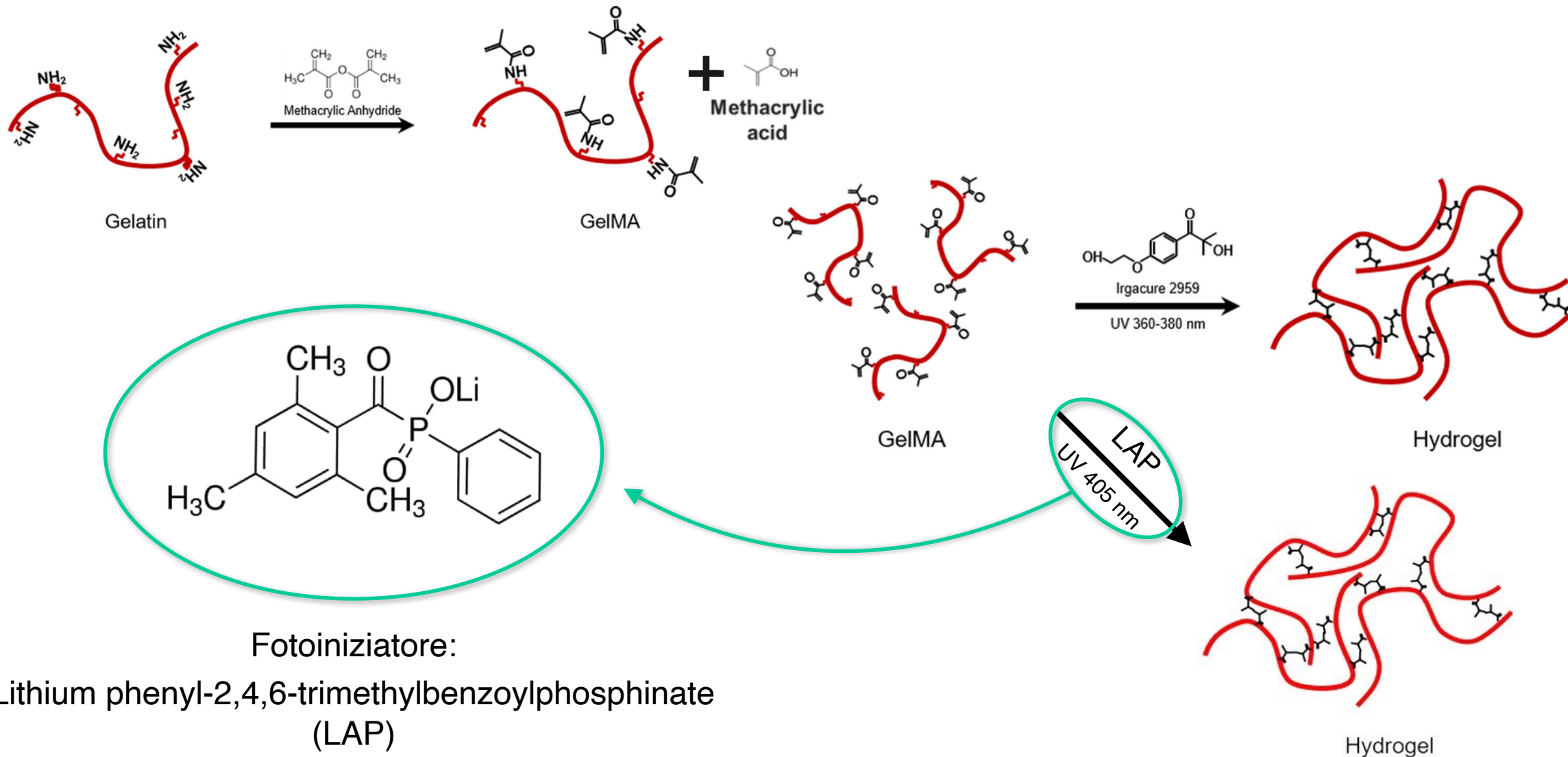


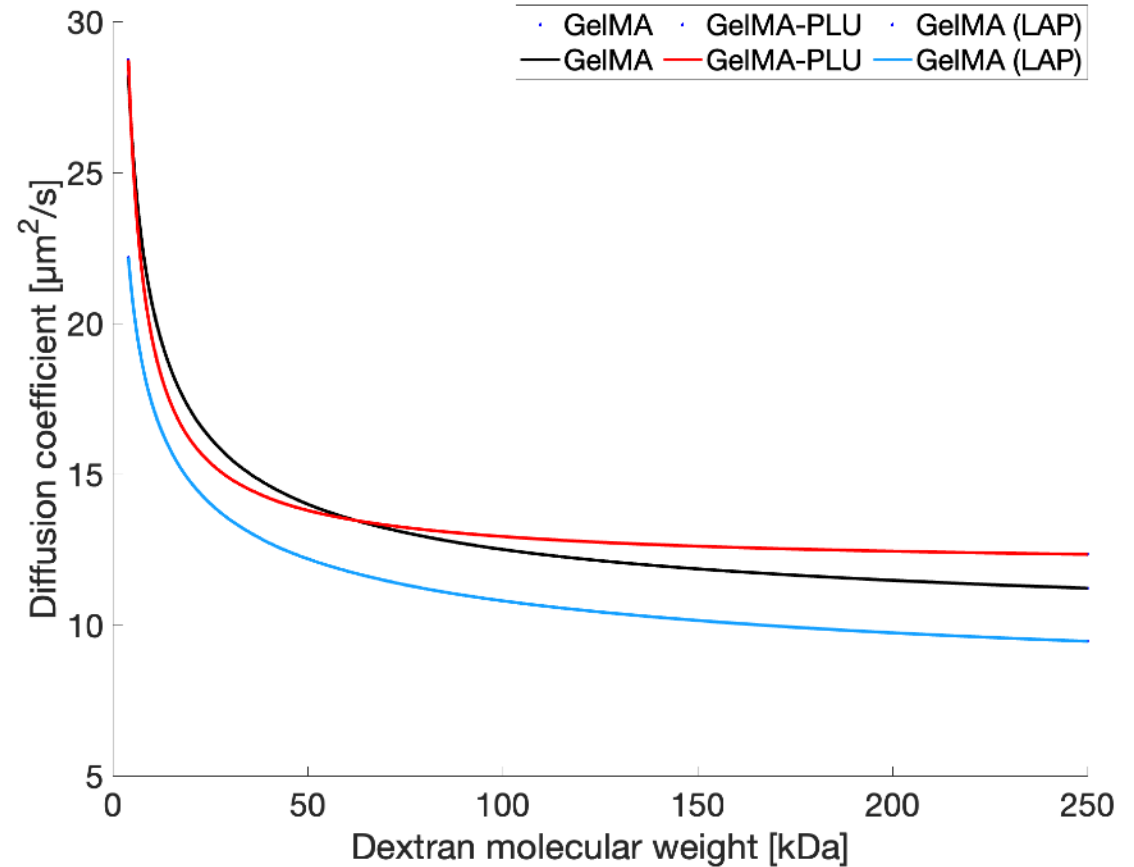
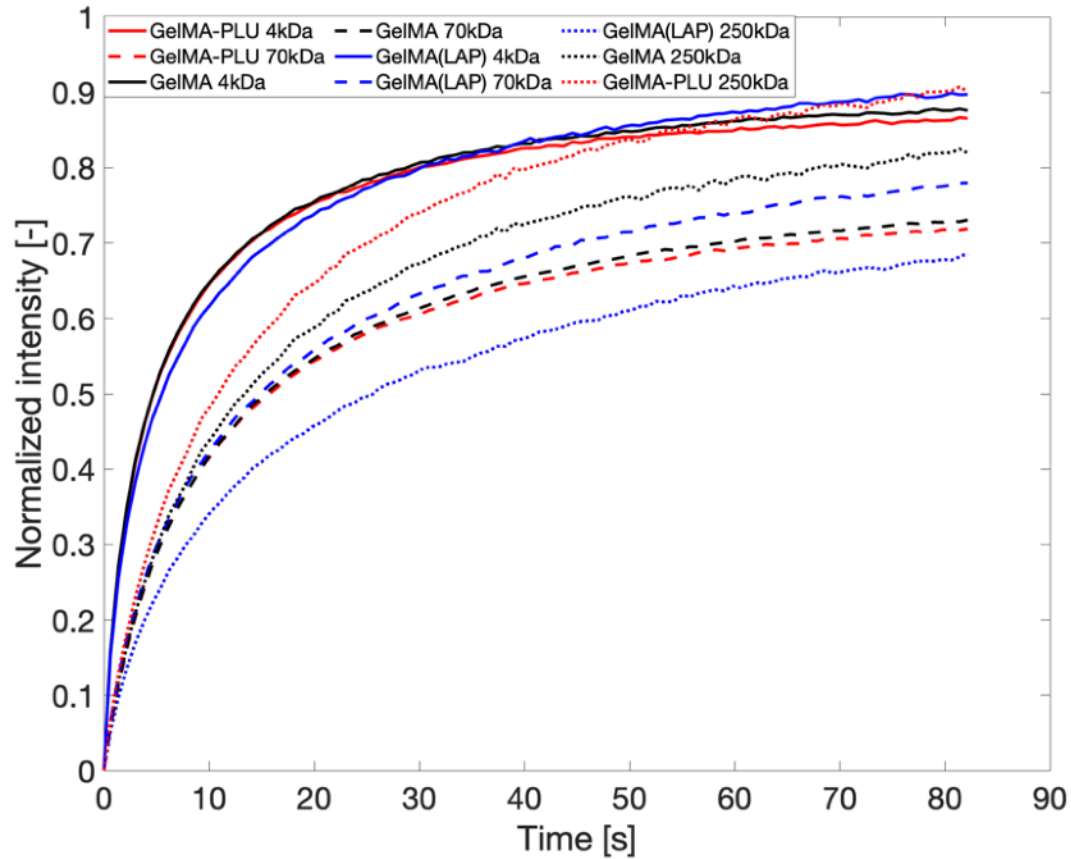


Coeff. di diffusione [μm <sup>2</sup> /s]	4kDa	70kDa	250kDa
GelMA	28.2 ± 2.8	13.2 ± 3.3	11.2 ± 1.8
GelMA-PLU	28.7 ± 2	13.3 ± 1.9	12.4 ± 2.1



L'aggiunta di Pluronic aumenta leggermente il coeff. di diffusione dell'hydrogel





La caratterizzazione di un ulteriore biomateriale permette di valutare quale tra i 3 risultati più adatto per le applicazioni richieste

- **Sintesi** materiali per biostampa 3D
- **Ottimizzazione dei parametri** per l'analisi FRAP
- Stesura di uno **script Matlab**
- **Confronto** tra diversi biomateriali



Identificazione di un trend logaritmico tra i valori di  $D$  rispetto a molecole di peso molecolare dai 4 ai 250 kDa nei diversi biomateriali



Il blend con il pluronic migliora leggermente la diffusività dell'hydrogel ma non proporzionalmente alla dimensione dei pori

**Grazie per l'attenzione!**