

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITA' DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE DI INGEGNERIA BIOMEDICA

Caratterizzazione di scaffold biologici con misura di impedenza elettrica complessa

Elaborata ne corso di Sensori e Nanotecnologie LM

Relatore:

Prof. TARTAGNI MARCO

Co-Relatori:

Prof. CRESCENTINI MARCO

Dott. JOSEPH LOVECCHIO

Prof. GIORDANO EMANUELE

Tesi di laurea di:

LI SIOI

ANNO ACADEMICO 2019-2020

SESSIONE I

PALORE CHIAVE:

Scaffold a base di alginato

Electrochemical impedance spectroscopy

Concentrazione di ioni di calcio

Elettrodi di platino ad ago

Conducibilità

La vita è un'avventura affascinante, ogni momento è prezioso...

人生的每一刻都值得珍惜，每一秒都值得去爱，热爱可抵岁月漫长...

Alla mia famiglia...

致我的家人...

Sommario

Abstract	1
Capitolo I: Introduzione.....	2
Capitolo II: Materiali e metodi	10
Capitolo III: Misurazione	17
Capitolo IV: Risultati e discussioni	37
Conclusione e futuri sviluppati	51
Bibliografia.....	53
Ringraziamenti	58

Abstract:

Scaffold al base di alginato tridimensionale è uno dei bioreattori più utilizzati comunemente. È stato già applicato alla rigenerazione di tessuto osseo e alla coltura cellulare tridimensionale. Ha molti vantaggi: buona biocompatibilità, buona biodegradabilità, porosità, non tossicità e basso costo, oltre questi, ha una struttura simile alla matrice extracellulare, è stato uno dei più popolari oggetti delle ricerche negli ultimi anni. Lo scaffold si produce buttando la soluzione di alginato in un bagno di Ca^{2+} , la risorsa può essere $CaCl_2$ o $CaCO_3$, le molecole di alginato e Ca^{2+} , costruiscono una struttura detta 'egg-box' attraverso cross-linking, la concentrazione di Ca^{2+} , può influenzare le proprietà di scaffold, omogeneità, porosità ecc. Negli ultimi anni, molti ricercatori hanno già studiato la relazione tra la concentrazione di Ca^{2+} e le proprietà meccaniche di scaffold a base di alginato, ad esempio, modulo di Yang, elasticità ecc. Lo scopo di questo lavoro invece, è studiare le proprietà elettrochimiche dello scaffold a base di alginato. Studia la risposta allo stimolo elettrico analizzando EIS (electrochemical impedance spectroscopy), prosegue i test agli scaffold di diverse concentrazioni di Ca^{2+} , per capire come la concentrazione di Ca^{2+} influenza le proprietà dello scaffold attraverso un metodo elettrico non invasivo.

Capitolo I: Introduzione

1.1 Ingegneria tissutale

Ingegneria tissutale è una disciplina basata sui principi della biologia e della ingegneria biomedica per la ricerca e lo sviluppo dei biomateriali che possono sostituire, rigenerare, riparare e migliorare le funzioni dei tessuti danneggiati [1]. La chiave fondamentale dell'ingegneria tissutale è la creazione di una struttura tridimensionale composta da veicoli delle cellule. Questa struttura tridimensionale fornisce alle cellule un luogo dove si verificano l'accesso dei nutrienti, scambio dei gas, escrezione dei rifiuti, metabolismo e permette le cellule di proliferare e differenziare e quindi di formare tessuti rigenerativi e/o persino organi che godono funzione e morfologia. Lo scaffold biologico è ovviamente diventato una scelta affidabile per realizzare queste funzioni, in questo campo vengono utilizzati principalmente tre tipi di scaffold, sono matrici cellulare derivati da tecniche di decellularizzazione, polimeri naturali o polimeri sintetici [2]. I biomateriali polimerici naturali presentano numerosi di vantaggi, per esempio buona biocompatibilità e bioidentificazione, non tossicità ecc. Tra cui gli idrogel polimerici naturali sono stati utilizzati ampiamente in biomedicale [3] [4] [5] [6], recentemente sono stati studiati come scaffold biologico nell'ingegneria tissutale [7] [8] [9] [10]. In generale, i polimeri naturali comunemente usati sono collagene, alginato, fibroina di seta ecc., nel lavoro presente in questa tesina usiamo idrogel di alginato come scaffold biologico per la ricerca perché lo scaffold a base di alginato presenta notevoli vantaggi: buona biocompatibilità, biodegradabilità, porosità, omogeneità, basso costo e soprattutto hanno una struttura simile alla matrice extracellulare. Negli ultimi anni, molti ricercatori hanno studiato loro microstruttura, proprietà meccaniche e biomediche [14] [15] [16] [17] [18], tuttavia, solo pochi studi si sono focalizzati a loro proprietà elettriche, nel lavoro presente in questa tesina stiamo per esplorarle.

1.2 Realizzazione dello scaffold a base di alginato

Il lavoro svolto in questa tesi utilizza reagenti in seguente per realizzare scaffold: GDL, alginato, CaCO_3 , NaCl, acqua sterilizzata.

L'alginato è un polimero lineare polisaccaridico naturale, di solito viene estratto dalle alghe brune marine [11] [12], è composto da due blocchi di acido: uronico α -(1-4) linked L-guluronic acid(G) e β -(1,4) linked D-mannuronicacid(M). Una catena di alginato contiene tre tipi di combinazione e di diverse quantità dei blocchi G ed M [21][22], è in grado di formare idrogel stabile e forte. Nella soluzione acquosa, in presenza di alginato e cationi come Ca^{2+} , Fe^{2+} , Ba^{2+} , a causa principale del blocco G, si verifica il fenomeno di cross-linking [13] [23], formando una grande molecola locale detta 'egg-box' [24] [25] [26].

Nel lavoro presente in questa tesi, usiamo CaCO_3 come risorse of Ca^{2+} per alcuni motivi. Innanzitutto Ca^{2+} esiste già nel nostro corpo, quindi è completamente non tossico, attualmente nessuna segnalazione dice che Ca^{2+} può causare danni all'uomo o influenza la vitalità delle cellule. Infatti, il calcio è molto preferito nel tessuto osseo, perché è un componente importante dello scaffold degli osteoblasti, coinvolto in molte attività cellulare per esempio la proliferazione, lo studio e la memoria ecc. [27] [28]. Poi il calcio è molto comune quindi facile da ottenere e meno costoso.

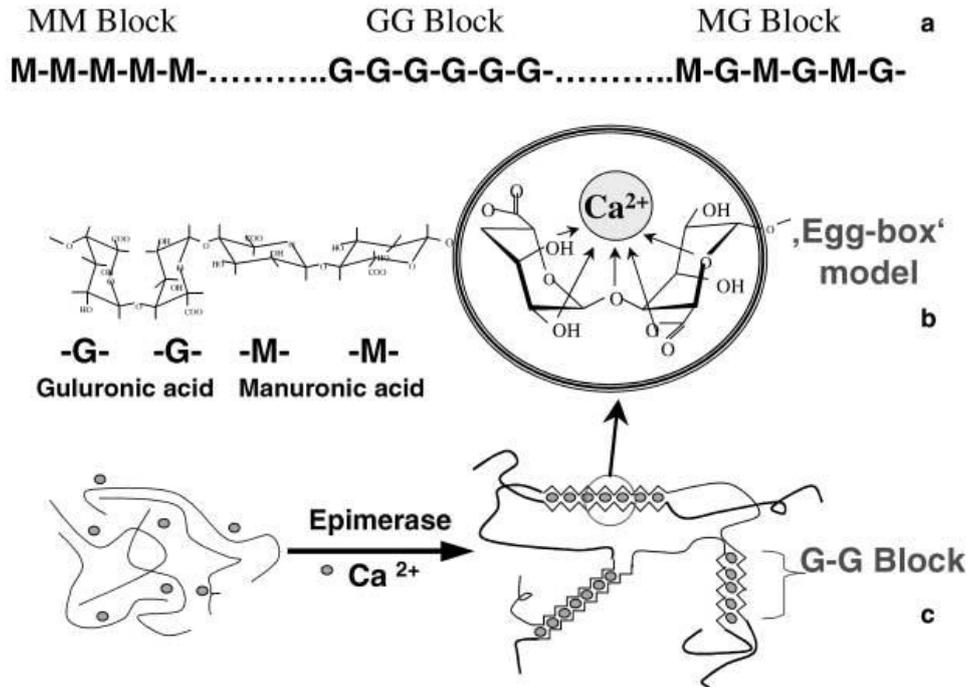


Figura 1-1 a. catena di alginato; b. egg-box; c. cross-linking tra alginato e Ca^{2+} , formando catena più grande crea la struttura porosa.

Come mostrato nella figura 1-1, diverse quantità e diverse proporzioni dei blocchi G ed M formano catene polimeriche che effettuano cross-linking con cationi di calcio Ca^{2+} , attorno al ciascun Ca^{2+} formano un 'egg-box', molti 'egg-box' sono anche collegati assieme formando una rete, cioè la struttura porosa dello scaffold a base di alginato. Pertanto possiamo concludere che la concentrazione di ioni di calcio e quella di alginato possono influenzare le proprietà dello scaffold. Avendo studiato le proprietà fisiche e meccaniche sappiamo che la concentrazione di alginato e di Ca^{2+} influenzano la porosità [29], elasticità, omogeneità ecc. Ad esempio, l'alginato ad alta G produce idrogel forte ma fragile, invece l'alginato a alta M produce idrogel morbide ma elastico [30]. L'alta concentrazione di ioni di calcio rende cross-linking più veloce ma difficile da controllare, c'è rischio di non omogeneità, invece bassa concentrazione di ioni di calcio rende cross-linking più facile da controllare, più omogeneo ma c'è il rischio di mal polimerizzazione [31].

A parte della concentrazione di alginato e della concentrazione di Ca^{2+} , le caratteristiche dello scaffold sono influenzate anche dal metodo di

polimerizzazione. In generale, ci sono due metodi di polimerizzazione: polimerizzazione esterna e polimerizzazione interna, ciascuno ha vantaggi e svantaggi. La polimerizzazione esterna utilizza il metodo di droplets gelation tradizionale come riferimento [32], consente agli Ca^{2+} di diffondere dalla soluzione di sources (per esempio $CaCl_2$) nelle goccioline di alginato, rendendo iniziare il cross-linking tra Ca^{2+} e blocco G. Inoltre, è stato sviluppato anche un metodo di polimerizzazione interna [33], l'idea base è mescola sali di calcio scarsamente solubili (per esempio $CaCO_3$) con soluzione di alginato, emulsionanti in olio, aggiunge acidi solubili per rilasciare gli ioni di calcio liberi nella soluzione mischiata, così inizia la polimerizzazione.

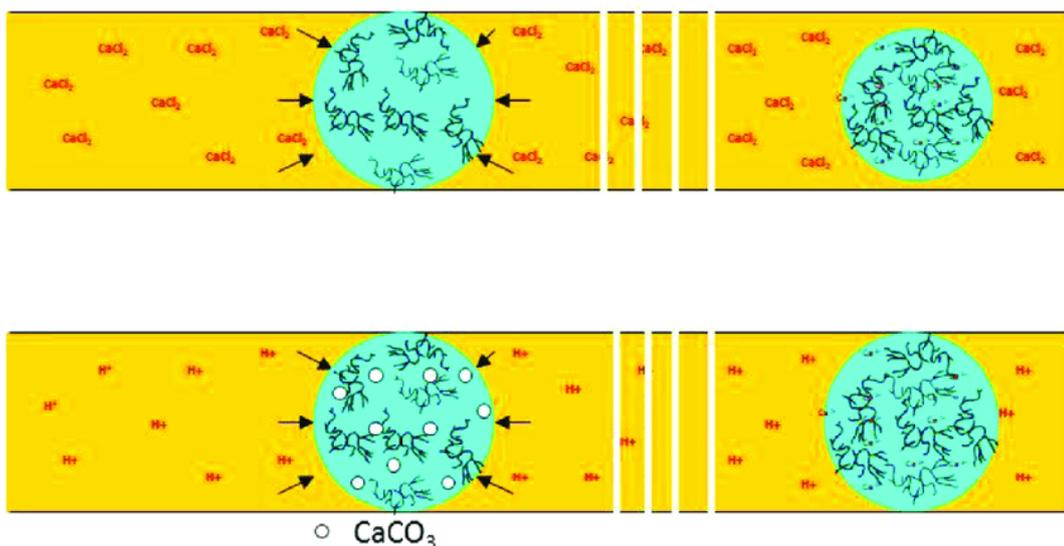


Figura 1-2 a. polimerizzazione esterna b. polimerizzazione interna

Nel lavoro presente in questa tesi, usiamo il metodo di polimerizzazione interna. Perché la polimerizzazione interna è più facile da procedere, poi è più lenta, quindi è facile da controllare, infine l'idrogel ottenuto attraverso polimerizzazione interna ha una notevole omogeneità, buona porosità interna e un elevato grado di cross-linking, è molto utile per coltura cellulare [34]. Invece attraverso polimerizzazione esterna rischia di ottenere un idrogel non omogeneo, ha un forte cross-linking solo sulla superficie, quindi non ha buona

porosità all' interna, è più utile per incapsula e rilascio di farmaco essendo il materiale delle capsule o/e contenitori [35], nel caso cui non consideriamo.

Poiché lo scopo di questo lavoro è studiare le proprietà elettriche dello scaffold, ovvero osservare la variazione dell'impedenza, anziché la fabbricazione dello scaffold, quindi descriviamo la preparazione dello scaffold a base alginato con i passi principali in seguito:

- i. Realizzare con la punta di un saldatore piccoli fori nell'estremità inferiore di un numero appropriato di coni da 0.5 ml.
- ii. Avvolgere il coperchio dei coni forati da 0.5 ml nel parafilm e sterilizzarlo sotto raggi UV per 1 ora.
- iii. Chiudere i coni e dispensare l'alginato attraverso il foro con una siringa da insulina.
- iv. Diluire il CaCO_3 in base alle concentrazioni calcio desiderate e dispensarlo nei coni.
- v. Vortexare per 1 minuto ciascun cono.
- vi. Aggiungere l'appropriata quantità di media e GDL.
- vii. Vortexare touch and go per 3 s.
- viii. Lasciare polimerizzare in incubatore per almeno 16 h.

Per estrarre fuori gli scaffold dai coni da laboratorio, si apre direttamente il coperchio lasciando scivolare lo scaffold, oppure iniettando l'aria o l'acqua da stilata attraverso il foro.

Noto:

- Gli agitatori Vortex vengono utilizzati per la miscelazione e la risospensione dei materiali biologici.

-L'incubatore viene utilizzato per controllare la temperatura (37°C), la pressione parziale di anidride carbonica e l'umidità.

-L'Hepes è una soluzione che mantiene stabile il PH fisiologico.

Il risultato di questa procedura è uno scaffold di forma cilindrica con il diametro 7mm e l'altezza 7mm.

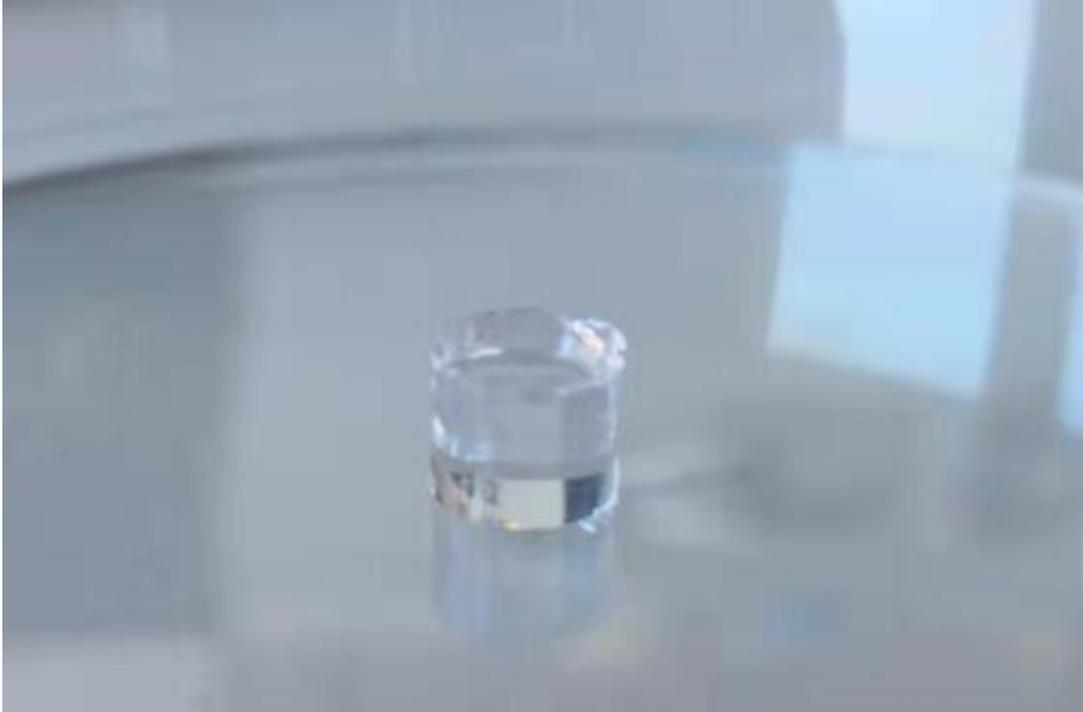


Figura 1-3 Lo scaffold a base di alginato fatto in laboratorio al primo giorno

A seconda del grado di completamento della polimerizzazione, lo scaffold potrebbe presentare diversi gradi di trasparenza, nella figura 1-3 si presenta molto trasparente, ma qualche volta si presenta colore bianco omogeneo (figura 4-1).

1.3 Caratterizzazione dello scaffold

L'Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) è una tecnica elettrochimica che è una misurazione nel dominio delle frequenze. Una reazione elettrochimica può essere equivalente ad una impedenza, immette all'ingresso una piccola perturbazione sinusoidale che può essere una corrente o tensione, in uscita invia informazioni sull'impedenza a diverse frequenze, così esegue un'analisi di circuito equivalente [19]. L'EIS ha ricevuto sempre più attenzione nell'ingegneria biomedica e nell'ingegneria tissutale grazie a suoi eccezionali vantaggi. Innanzitutto, l'EIS è uno strumento molto efficace per monitorare lievi variazioni di carica sulla superficie dell'elettrodo, ed è molto sensibile e rapido, quindi l'EIS è in grado di descrivere e caratterizzare piccole reazioni elettrochimiche. Cambiando la frequenza si può sia monitorare la variazione dell'impedenza in real-time, che osservare per lungo termine, quindi ci dà la buona possibilità di osservare gli esperimenti. Poi, non è necessario di dare marker nel processo di misurazione dell'impedenza, quindi l'EIS viene utilizzato gradualmente per la diagnosi e esami cliniche ad es. rilevazione di tumori e anticorpi. Infine, più importante, a differenza di alcune tecniche di perturbazione grande come cyclic voltammetry e differential pulse voltammetry, le piccole perturbazioni rendono l'EIS una tecnica non distruttiva, quindi non uccide le cellule, perciò viene utilizzata come un metodo non invasivo per valutare e/o testare materiali biomedici o tessuti biologici [20]. In questo lavoro, si spera di sviluppare un metodo di misurazione non distruttivo, quindi proviamo a caratterizzare lo scaffold utilizzando EIS. L'EIS può completamente descrivere le proprietà dello scaffold, ad esempio in [36] si utilizza EIS per studiare la porosità dello scaffold di chitosano nell'ambiente idrico. Dato una piccola perturbazione di corrente, misura impedenza a diverse frequenze, ottiene uno spettro di impedenza su tutta la banda, si può studiare il rapporto tra l'impedenza e il volume di pori analizzando lo spettro. Questo esempio ci dimostra che esiste una dipendenza tra struttura caratteristica dello scaffold e proprietà elettriche. Parte dall'EIS, la tecnica avanzata e electrochemical impedance tomography (EIT), grazie a numerosi elettrodi, è

in grado di ricostruire una mappa di conducibilità o/e altri parametri ad ogni punto di posizione marcata. Questo progresso ci consente di ottenere più informazioni sul terreno di coltura cellulare tridimensionale, permettendo di localizzare le cellule e determinare la distribuzione delle cellule nel terreno. Nel lavoro presente in questa tesi, lo scopo preliminare è scoprire le proprietà elettriche dello scaffold a base di alginato a diverse concentrazioni di Ca^{2+} , basta fare una misurazione globale anziché locale, quindi usiamo solo EIS, non bisogna EIT.

Il lavoro presente in questa tesi è stato proseguito all'università di bologna, in dipartimento di ingegneria dell'energia elettrica e dell'informazione "GUGLIELMO MARCONI" - DEI laboratorio ICM, l'obiettivo è sviluppare un sistema di misurazione non invasivo basato sulla misura di impedenza per caratterizzare gli scaffold biologici a base di alginato e per studiare il comportamento delle popolazioni di cellule in cui vengono coltivati. In particolare, la parte seguente presenta uno studio preliminare della caratterizzazione dello scaffold a base di alginato privo di cellule, utilizzando lo strumento professionale KEYSIGHT Impedance Analyzer E4990A misura le impedenze sotto diverse concentrazioni di Ca^{2+} in una certa banda delle frequenze, risulta una misura di impedenza tale che viene analizzata statisticamente con Matlab per rilevare il circuito equivalente e costruire il modello matematico. Attraverso analisi statistica vogliamo trovare il rapporto tra la concentrazione di Ca^{2+} e le caratteristiche dello scaffold, rendere questo sistema più stabile e completo. Si spera di promuovere la transizione e trasformazione della coltura cellulare 2D alla coltura cellulare 3D tale che nel futuro potrebbe essere applicata anche alla coltura degli organi umani.

Capitolo II: materiali e metodi

2.1 Misura di impedenza

L'impedenza è un parametro importante utilizzata per caratterizzare componenti elettrici, circuiti o/e materiali per produrre componenti elettrici. In generale, l'impedenza viene definita come una opposizione totale che un dispositivo o un circuito offre al flusso di corrente alternata (AC) ad una frequenza determinata [37] [20]. Una impedenza è rappresentata con un numero complesso (Z), include parte reale e immaginaria, la parte reale rappresenta la resistenza (R), invece la parte immaginaria rappresenta la reattanza (X), si può scrivere come:

$$Z = R + jX$$

In cui unità di misura di resistenza e di reattanza è ohm (Ω).

Da punto di vista sperimentale, l'impedenza è il rapporto tra la tensione applicata al circuito e la corrente che circola all'interno:

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

per una resistenza pura,

$$Z = R$$

Per una capacità,

$$Z = \frac{1}{j\omega C}$$

Per una induttanza,

$$Z = j\omega L$$

Due componenti in serie,

$$Z = Z_1 + Z_2$$

Due componenti in parallelo,

$$Z = \left[\frac{1}{\frac{1}{Z_1} + \frac{1}{Z_2}} \right]^{-1}$$

2.2 Idea di misurazione

L'intera reazione elettrochimica può essere espressa come una impedenza. Nel test di EIS, il segnale di ingresso di solito è una piccola corrente sinusoidale alternativa ad un range di frequenza, l'uscita è l'impedenza, analizza il circuito equivalente osservando lo spettro di impedenza. Il segnale di ingresso e uscita hanno tre caratteristiche in comune: ampiezza, frequenza, fase. Siccome l'impedenza è un numero complesso, lo spettro ottenuto viene rappresentato con un piano complesso, in cui l'asse X è la parte reale, l'asse Y è la parte immaginaria convertita, si chiama plot cole-cole.

Un tipico modello fisico di una camera elettrochimica è composto da tre componenti principali: un elettrodo anodico, un elettrodo catodico e una soluzione elettrolitica. A causa della reazione elettrochimica si verificano il trasferimento di carica tra conduttore elettronico e conduttore ionico [38].

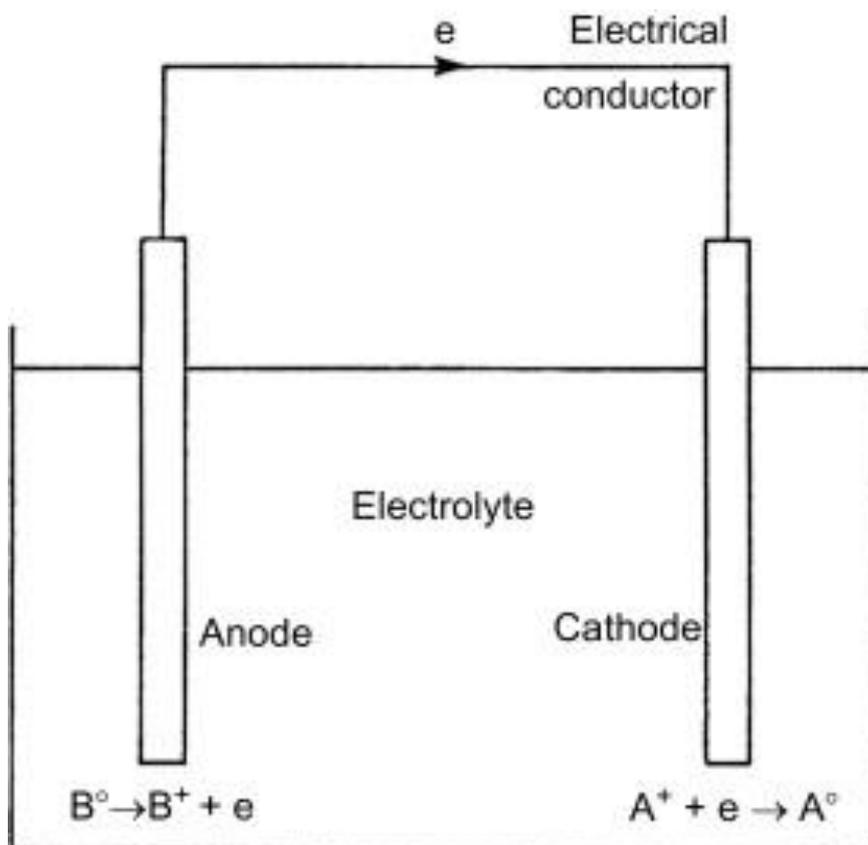


Figura 2-1 Il modello della camera elettrochimica

Una tipica reazione elettrochimica è composta da alcuni processi di base, per esempio double-layer e processo faradaico.

In corrispondenza, tutto il sistema può essere equivalente ad un circuito composto da 3 componenti elettrici: resistenza R_s , la capacità double-layer C_{dl} , l'impedenza faradaica Z_f .

In cui,

- R_s : resistenza della soluzione ed elettrodi.
- C_{dl} : double-layer capacitance. Esiste tra superficie dell'elettrodo e l'elettrolita circostante, è derivata dagli ioni inattivi dell'elettrolita, non c'è reazione chimica, modifica solo la distribuzione di carica, cioè questi ioni inattivi si 'attaccano' alla superficie dell'elettrodo ma non reagisce con nessun componente, la carica dell'elettrodo è separata dagli ioni nell'elettrolita con questo strato di separazione molto piccolo. Il valore della capacità double-layer dipende da molti variabili, ad esempio tensione applicata, concentrazione degli ioni, tipologia di ione, temperatura, rugosità della superficie dell'elettrodo ecc.
- Z_f : impedenza faradaica. Deriva dagli ioni attivi, si verifica reazione chimica, per cui esiste il trasferimento di carica. il trasferimento di carica può essere ulteriormente suddiviso in 2 parti, il singolo trasferimento di carica e il trasferimento di massa, fanno riferimento di una resistenza R_{ct} e di un'impedenza Warburg Z_w .

Modello di Randles:

Considerando tutti i componenti possiamo ottenere un circuito equivalente completo, viene chiamato il modello di Randles di un'interfaccia elettrode/ione tale che è stato considerato di potere descrivere tutti fenomeni fisici verificati in una camera elettrochimica.

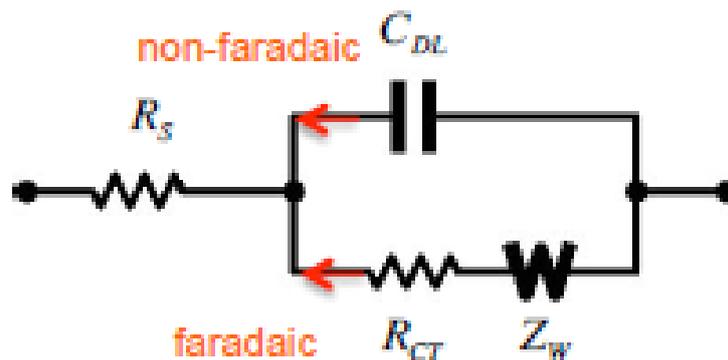


Figura 2-2 Il modello di Randles

in cui,

R_s —resistenza della soluzione

C_{dl} —double layer capacitance

R_{ct} —resistenza di charge transfer

Z_w —impedenza di Warburg

Però in realtà il comportamento di impedenza dell'intero modello è ancora più complicato, sebbene è difficile rappresentare con solo un circuito in serie o in parallelo, tutti i componenti di questo modello possono essere visti come CPE (constant phase element), vuol dire che hanno fase costante, quindi ulteriormente, il modello di Randles viene ancora semplificato con un singolo CPA (constane phase angle element) [44]:

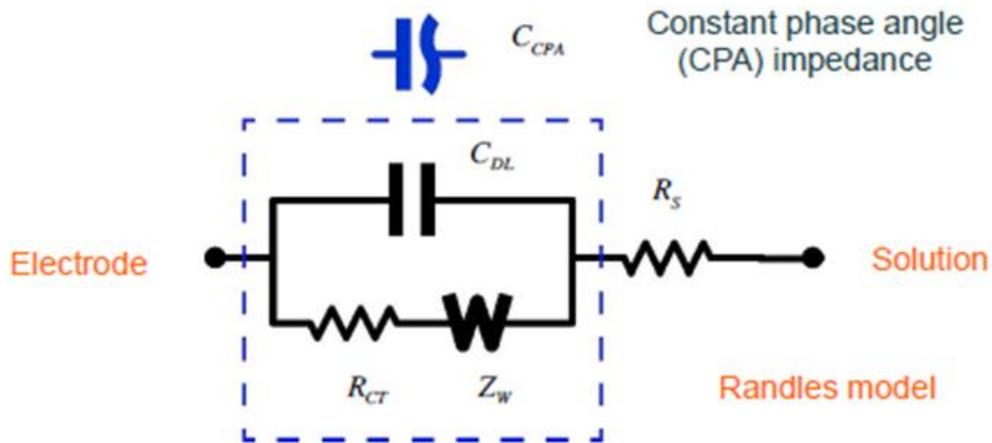


Figura 2-3 modello CPA

$$Z_{CPA} = \frac{A}{(j\omega)^\beta}; A, \beta \text{ costant}$$

$$\beta = 0, Z_{CPA} \rightarrow R$$

$$\beta = 1, Z_{CPA} \rightarrow C$$

Questo modello descrive una relazione empirica tra la frequenza e l'impedenza causata dalla rugosità e dalla disomogeneità della superficie di materiale reale imperfetto.

Si usa Cole-Cole plot per analizzare Z_{CPA} , all'inizio di questa sezione detto che l'impedenza è un numero complesso, quindi si può scrivere in espressione:

$$Z_{CPA} = R + jX$$

Il Cole- Cole non è altro che un plot Nyquist con segno di X invertito. Il segno viene cambiato perché è da punto di vista elettrochimico, non si presenta spesso il modello di induttanza, con il plot Cole- Cole possiamo dimostrare meglio le informazioni nascoste nelle misure sperimentali.

Un grafico di plot Cole-Cole viene inserito cui sotto, i punti misurati a bassa frequenza si presentano a alto destra, invece quelli ad alta frequenza si presentano a basso sinistra.

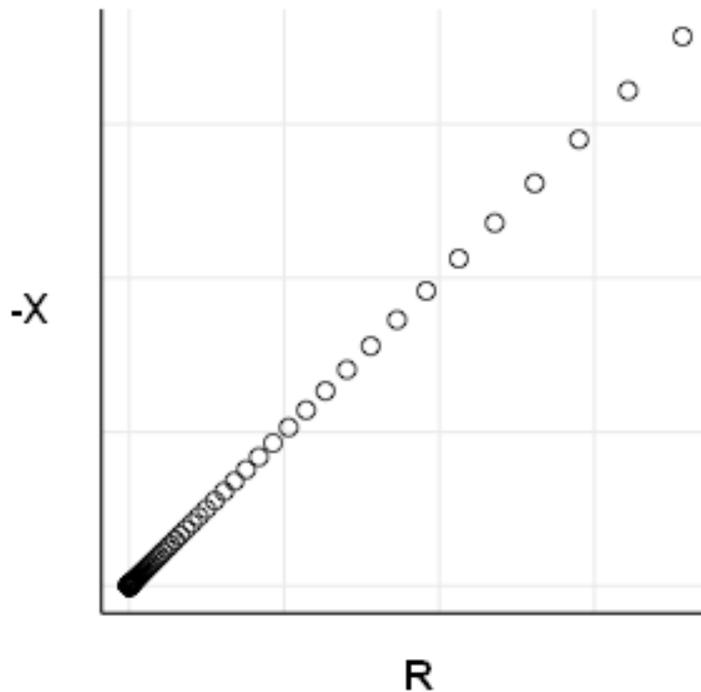


Figura 2-4 Un plot Cole-Cole

La caratterizzazione dello scaffold biologici a base di alginato, possiamo sempre guardare questo modello, perché nel capitolo I abbiamo detto che le caratteristiche dello scaffold sono proporzionale alla concentrazione di Ca^{2+} , può essere equivalente ad un CPA che ha un certo β , variando la concentrazione di Ca^{2+} , varia anche β . Per esempio, la nostra famosa impedenza Warburg è equivalente ad un CPE a bassa frequenza, ha $\beta=0.5$, il suo Cole-Cole è una retta di pendenza 45° . Ma nel nostro caso di scaffold, non è una impedenza di Warburg, quindi β sarà da esplorare attraverso gli esperimenti, è esattamente uno degli obiettivi di questa tesi.

Capitolo III: Misurazione

3.1 Disegno del dispositivo

Il dispositivo della misurazione è composto da quattro parti: impedance analyzer, cavi, elettrodi, PC. L'intero sistema deve essere stabile per rendere esperimenti ripetibili, e deve garantire che ci sarà solo una variabile non è altro che la concentrazione di Ca^{2+} , i risultati ottenuti sarebbero affidabili.

3.1 Impedance Analyzer

Il KESIGHT Impedance Analyzer E4990A è uno strumento professionale per la misura di impedenza complessa elettrica. Ha un range di frequenza da 20Hz a 10MHz, può offrire uno stimolo di corrente da 200 μ A a 20mA, può prendere al massimo 1601 punti di campionamento, visualizza direttamente al massimo 4 tracce di parametri in un canale sullo schermo.

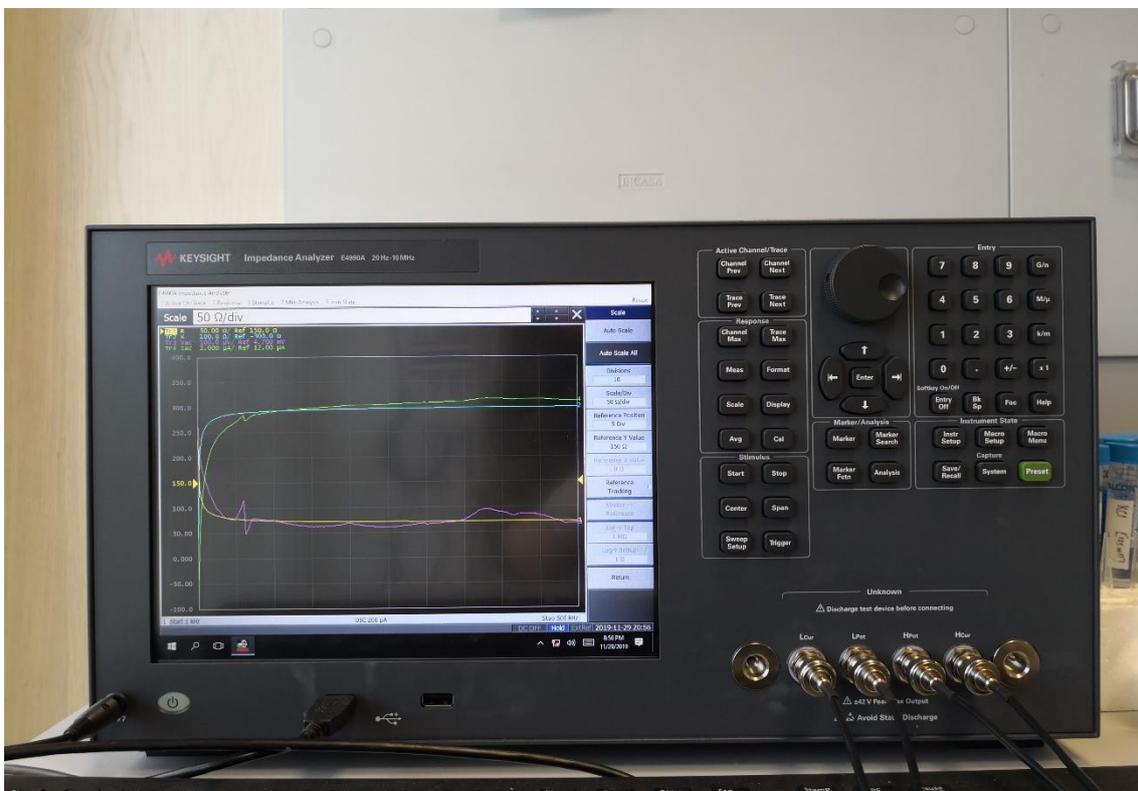


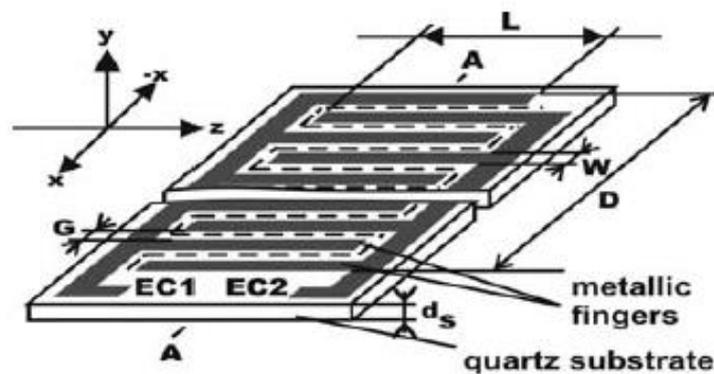
Figura 3-1 KYSIGHT Impedance Analyzer E4990A 20Hz-10MHz

3.2 Scelta degli elettrodi

Gli elettrodi devono soddisfare alcuni requisiti fondamentali: biocompatibilità, non tossicità, facilità da pulire, stabilità.

a) Elettrodo interdigitato

All'inizio considero che l'elettrodo interdigitato può essere fatto d'oro, quindi è molto compatibile e stabile. Poi le dita sono saldate sul un PCB, le posizioni sono già fissi, quindi se si appoggia lo scaffold sull'elettrodo interdigitato, le posizioni dei punti di misura non cambiano mai, rende l'esperimento ripetibile e affidabile [39].



(EC1,EC2)-electric contacts

----- · meander length

d_s - substrate thickness

$A \div A$ cross-section

Figura 3-2 L'elettrodo interdigitato

W: larghezza delle dita.

G: distanza tra due dita.

L: lunghezza dell'area efficace, ovvero la lunghezza sovrapposta delle due dita.

Prima di tutto senza pensare quanto grande è la capacità e come calcola i parametri del materiale, dobbiamo considerare com'è il campo elettrico generato dagli elettrodi interdigitati, perché lo scaffold deve completamente stare in campo elettrico, altrimenti i risultati non hanno senso.

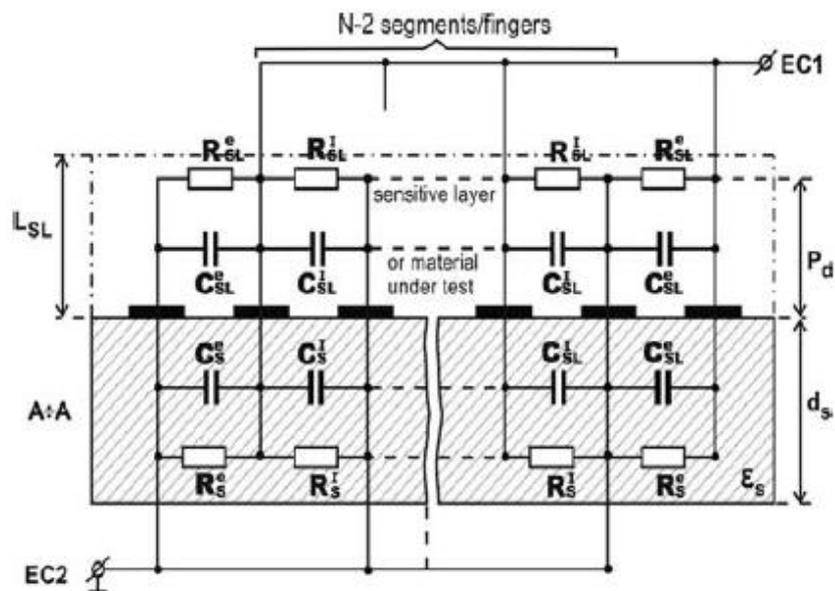


Figura 3-3 Il circuito equivalente dell'elettrodo interdigitato

L_S : spessore di materiale sotto test (sensitive layer)

P_d : spessore di campo elettrico

$$P_d \cong \frac{G + W}{\pi}$$

Sapendo che lo scaffold è un cilindro di altezza 7mm, diametro 7mm, quindi l'elettrodo interdigitato deve avere area efficace minima di $7 \times 7mm^2$. Essendo un elettrodo interdigitato necessita avere al minimo quattro dita, supponendo che le quattro dita sono equidistante, allora ottengo massima G e W:

$$G = W = \frac{7000}{2 \times 2 \times 2} = 875 \mu m$$

Un elettrodo interdigitato come questo può generare un campo elettrico alta circa:

$$P_d \cong \frac{875 + 875}{\pi} \approx 557 \mu m \ll 7 mm$$

Si vede che lo spessore del campo elettrico è molto minore dell'altezza di scaffold, vuol dire che l'elettrodo interdigitato genera solo un campo elettrico superficiale, il campo non riesce a coprire tutto scaffold e la misura non ha senso. Quindi l'elettrodo interdigitato non è la scelta migliore per nostro esperimento, dobbiamo considerare altra tentazione.

b) Elettrodo platino ad ago

Escluso la possibilità di elettrodo interdigitato, riprendiamo la considerazione di elettrodo tradizionale, cioè elettrodo platino ad ago.



Figura 3-4 Il modello di elettrodo platino a forma ad ago

In cui,

a: diametro di elettrodo

l: lunghezza di elettrodo

r: distanza tra due elettrodi

Innanzitutto assumiamo di immergere 2 elettrodi in nostro scaffold se possono generare un campo elettrico sufficiente per coprire tutto scaffold. A seconda l'esempio [40], quando due elettrodi di diametro 0.5mm, vengono immersi in gel possono generare un campo elettrico abbastanza ampio, ci sta dentro il nostro scaffold.

Poi vediamo come si calcola la capacità tra due elettrodi [41][42].

Si fa riferimento della capacità di due conduttori piastre:

$$C = \varepsilon \frac{A}{t}$$

In cui,

ε : permittività dielettrica di materiale sotto test (sensitive layer)

A: area di conduttore

t: spessore di materiale sotto test

Teoricamente, in generale, supponendo di avere n conduttori caricati con carica Q_1, Q_2, \dots, Q_n . Nel caso nostro abbiamo due elettrodi ad ago a seconda della figura 3-3, nella profondità ρ , il potenziale di un punto è:

$$\Phi(\rho) = \frac{q_l}{2\pi\varepsilon} \ln \frac{\rho_0}{\rho}$$

q_l ---carica totale per unità di lunghezza di elettrodo

ρ_0 ---costante

il potenziale di primo elettrodo:

$$\Phi_1 = p_{11}Q_1 + p_{12}Q_2 = \frac{Q_1}{l} \frac{1}{2\pi\epsilon} \ln\left(\frac{\rho_0}{a}\right) + \frac{Q_2}{l} \frac{1}{2\pi\epsilon} \ln\left(\frac{\rho_0}{r-a}\right)$$

In cui $q_l = \frac{Q}{l}$ rispetto la sua definizione.

Per semplicità, ipotizziamo sempre che $Q = Q_1 = -Q_2$, allora i due potenziali dei due elettrodi sono:

$$\Phi_1 = \frac{Q}{l} \frac{1}{2\pi\epsilon} \ln\left(\frac{r-a}{a}\right)$$

$$\Phi_2 = \frac{Q}{l} \frac{1}{2\pi\epsilon} \ln\left(\frac{a}{r-a}\right)$$

Quindi la differenza dei potenziali:

$$\Delta\Phi = \Phi_1 - \Phi_2 = \frac{Q}{l} \frac{1}{\pi\epsilon} \ln\left(\frac{r-a}{a}\right), r > a$$

La capacità tra i due elettrodi risulta:

$$C = \frac{Q}{\Delta\Phi} = \frac{l\pi\epsilon}{\ln\left(\frac{r-a}{a}\right)}$$

Poiché sappiamo che una resistenza di un componente può essere rappresentata come:

$$R = \rho \frac{L}{A} = \frac{L}{\sigma A}$$

ρ ---resistività

σ ---conducibilità

L---lunghezza del materiale

A---area della sezione

Per cui dopo ottenuto lo spettro di impedenza attraverso impedance analyzer, possiamo costruire il circuito equivalente con R e C, e quindi possiamo calcolare le caratteristiche di scaffold come ϵ , ρ , σ e osservare come variano rispetto diverse frequenze. A seconda da come vengono posizionati gli elettrodi modificano le espressioni ma il ragionamento è sempre lo stesso.

$$\epsilon = C \frac{l\pi\epsilon}{\ln\left(\frac{r-a}{a}\right)}$$

$$\rho = \frac{RA}{L}$$

$$\sigma = \frac{L}{RA}$$

Prima di tutto è necessario fare alcuni esperimenti preliminari per verificare se gli elettrodi ad ago sono adeguati a fare misure in nostro lavoro.

Usiamo due elettrodi di platino ad ago prodotto da Shanghai Yueci electrical technology, LLC., Shanghai, Cina, con $a=0.5\text{mm}$, $l=37\text{mm}$. Ognuno è composto da tre parti: ago di platino, rivestimento di PTFE, termine di rame.

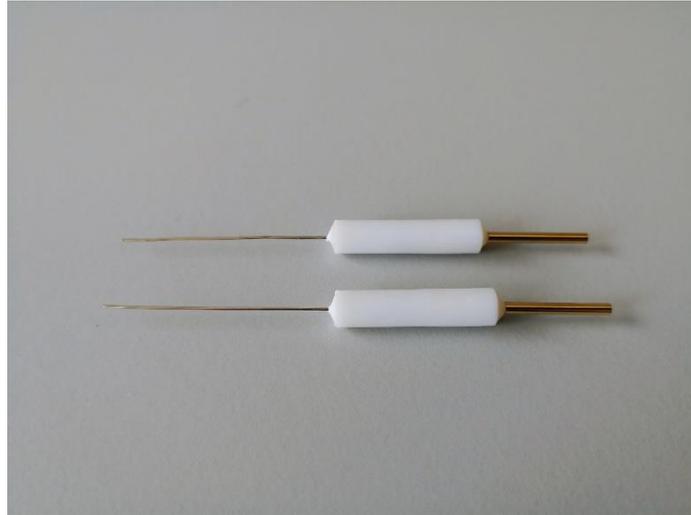


Figura 3-5 Gli elettrodi reali

Per vedere il grado di accuratezza del dispositivo e la fattibilità dell'idea teorica. Innanzitutto, misura impedenze delle soluzioni di NaCl a diverse concentrazioni (0.2M/L, 0.4M/L, 0.6M/L, 0.8M/L, 1M/L), osservando se il risultato corrisponde alla teoria. I due elettrodi vengono immersi in parallelo nella soluzione di NaCl. Il impedance analyzer usa 4 cavi in configurazione di 2T collegando i due termini di rame degli elettrodi con le pinze a coccodrillo. Imporre la corrente di stimolo 10mA, range di frequenza da 20Hz a 1MHz, misura l'impedenza. I risultati sono abbastanza scarsi a causa dello spostamento degli elettrodi quando ogni esperimento su una singola soluzione viene ripetuto più volte, si verifica una variazione della distanza e dell'angolo tra gli elettrodi. Si calcola errore relativo della parte reale R e la parte immaginaria X di impedenza, mediandolo si verifica errori relativi molto alti, per esempio la figura 3-6 mostra errori relativi di R tra i due esperimenti ripetuti sulla soluzione di NaCl a tutte le concentrazioni rispetto alla frequenza.

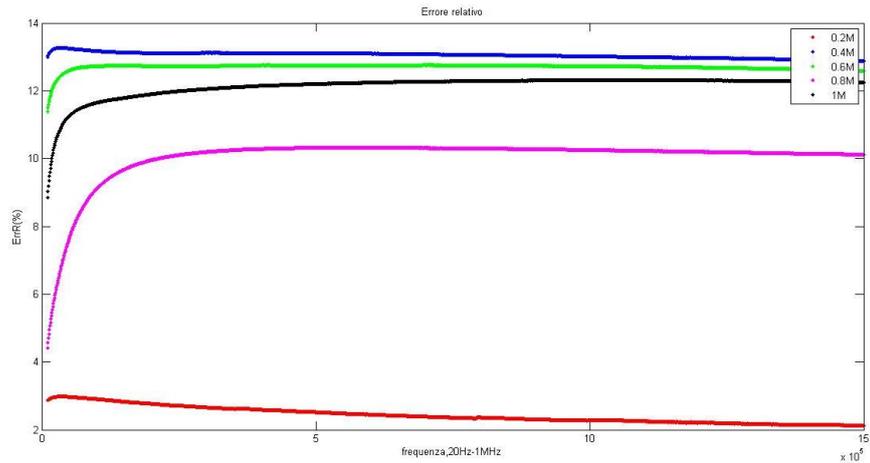


Figura 3-6 Errori relativi tra gli esperimenti su tutte le soluzioni ripetuti scelti casualmente

Ovviamente, errori relativi sono molto grandi, quelli di soluzione a 0.4M e 0.6M superano addirittura anche 12% che è inaccettabile. Ma nota una cosa molto bella che se guarda il plot Cole-Cole di un singolo esperimento su una singola soluzione, è una retta che è esattamente quello presente nel capitolo II, quello di un CPA.

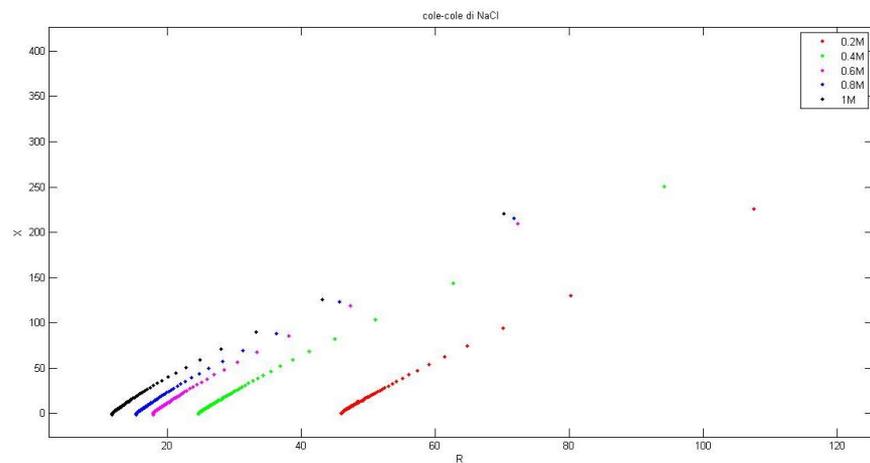


Figura 3-7 cole-cole delle soluzioni a concentrazione di 0.2M, 0.4M,0.6M,0.8M,1M

Si vede bene dalla figura che ogni soluzione di NaCl ha un Cole-Cole di CPA non è altro che una retta, e lo stesso comportamento mostrato nella figura 2-4.

Quindi possiamo sempre utilizzare gli elettrodi a forma ad ago come nostri elettrodi per fare misura di impedenza, ma bisogna

inventare un nuovo setup in cui i quattro elettrodi vengono fissati e ci permette di avere solo una variabile che è la concentrazione di ioni contenuti della soluzione o dello scaffold.

3.3 Descrizione di setup

L'idea è di costruire un setup che contiene almeno una camera elettrochimica, gli elettrodi vengono inseriti nella camera e fissati in qualche modo.

3.3.1 Materiali

- Taglia uno dei due elettrodi platino in 4 pezzi, ognuno lunga 9mm, il diametro è sempre lo stesso 0.5mm.
- Un pozzetto da laboratorio di diametro 15mm, alta 20mm, lo spessore della parete 2mm.
- Un bread board
- Quattro connettori SMA femmine
- Alcuni cavi

I passaggi per costruire il setup sono:

- Salda un tratto di cavo sottili ad uno dei due termini di ogni elettrodo platino
- Fa quattro fori di diametro 0.5mm sulla parete di pozzetto, i quattro fori devono essere equidistanti e simmetrici
- Inserisce i quattro elettrodi nei fori lasciando la stessa lunghezza che circa 3mm dentro il pozzetto, mette colla epossidica per fissarli e per chiudere i fori, lasciandoli asciugare
- Salda i quattro connettori SMA su un bordo di bread board, salda l'anima di ogni connettore ed ogni elettrodo con i cavi sottili (neri)
- Cortocircuita i quattro connettori SMA con i cavi (rossi) per collegare a massa

- Fissa il pozzetto su dietro del bread board per evitare qualsiasi contatto innecessario
- Indica ogni coppia di elettrodo e connettore SMA con lo stesso numero

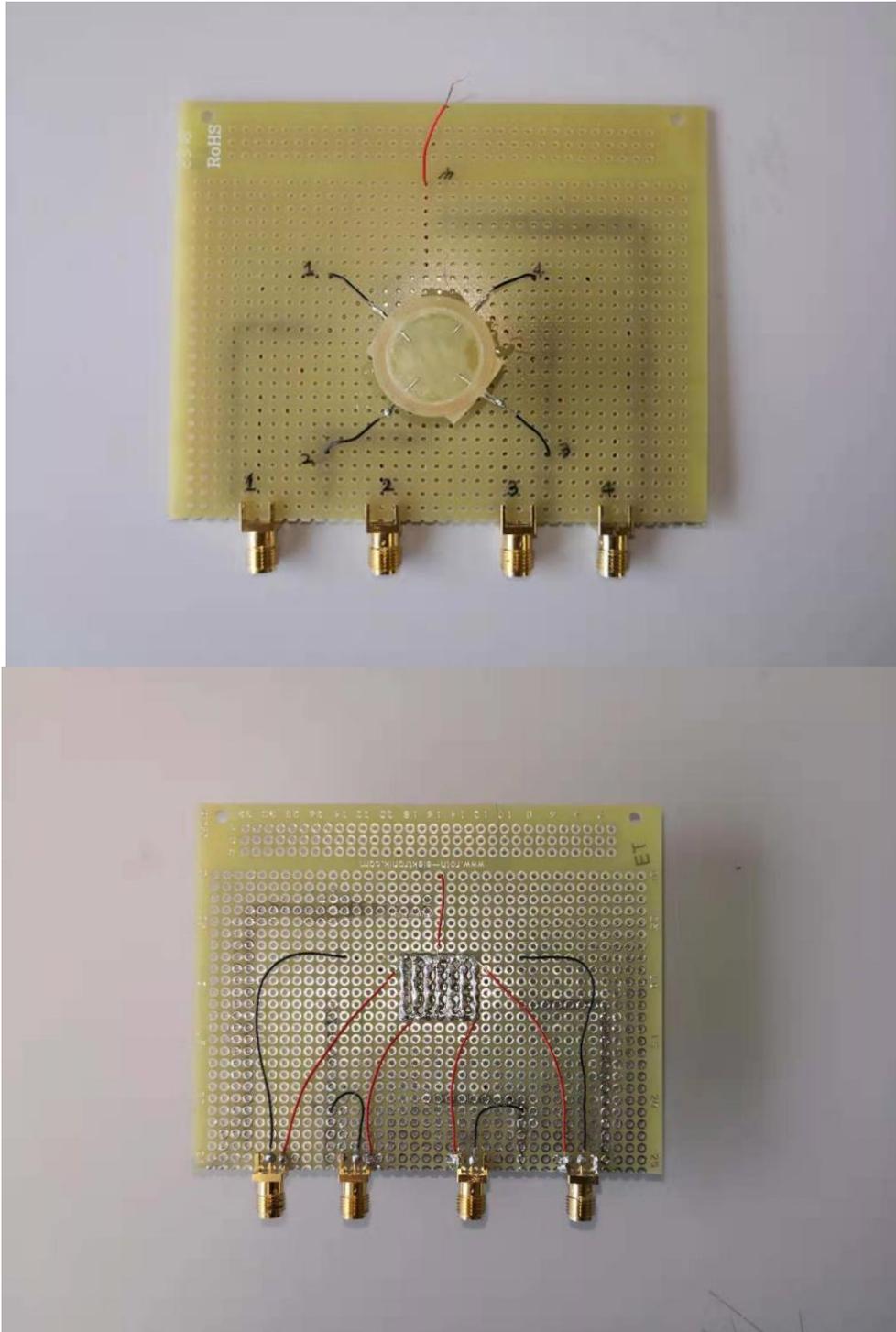


Figura 3-8 Fronte e retro di setup

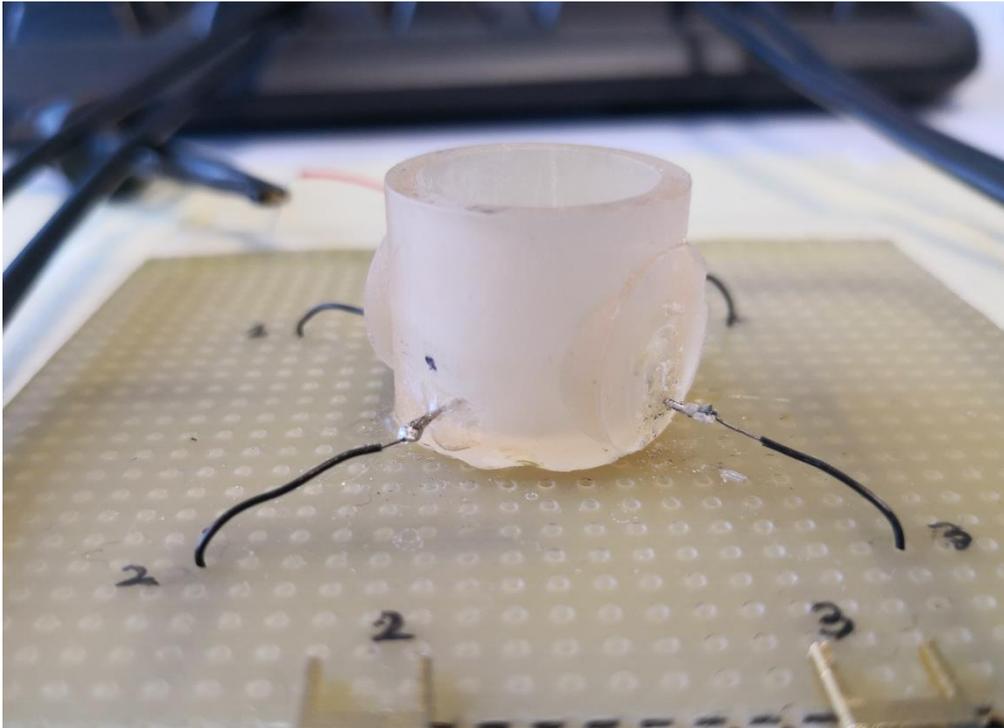


Figura 3-9 Vista laterale di setup

Si usa sempre la configurazione 2T di impedance analyzer, questa volta usiamo due cavi coassiali BNC da due maschi a una femmina per unire i termini L_c e L_p , H_c e H_p , poi ad ogni cavo collega un connettore BNC a SMA maschio a maschio

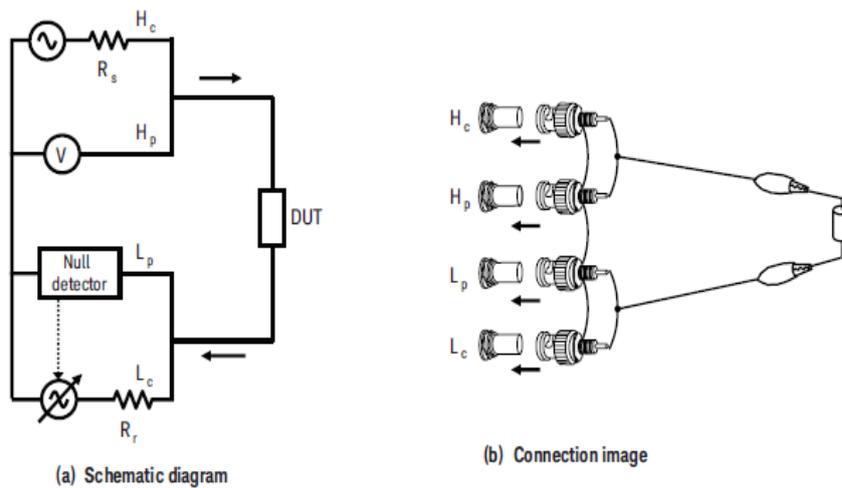


Figura 3-10 Configurazione 2T



Figura 3-11 I cavi e connettori

Collega tutti i componenti insieme:

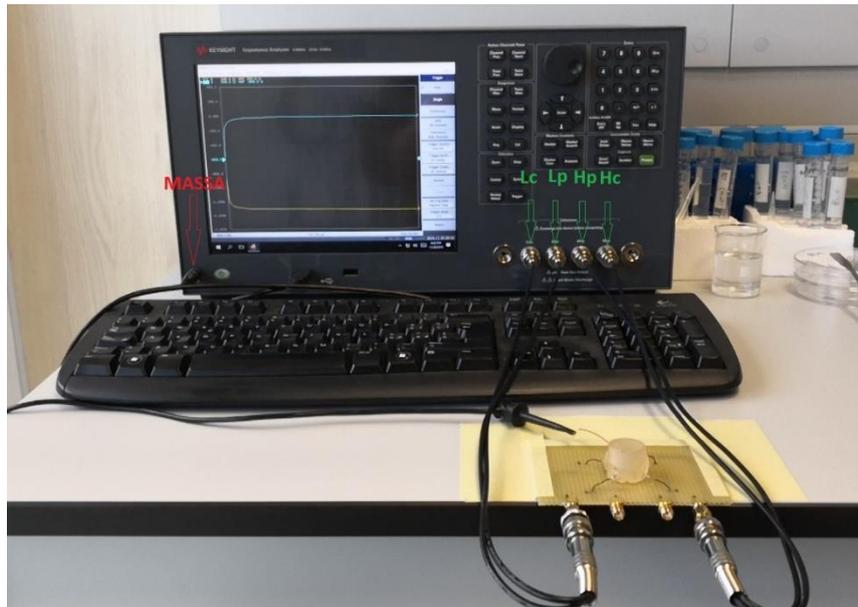


Figura 3-12 L'intero dispositivo della misurazione

Abbiamo quattro elettrodi con indici da 1 a 4, per fare delle misure con la configurazione 2T usiamo solo 2, quindi ci sono 6 combinazioni diversi degli elettrodi che sono 12, 13, 14, 23, 24, 34. Idealmente i quattro elettrodi sono identici, ortogonali alla parete del pozzetto e hanno stessa lunghezza della parte inserita nel pozzetto, quindi il circuito equivalente potrebbe essere una matrice di capacità:

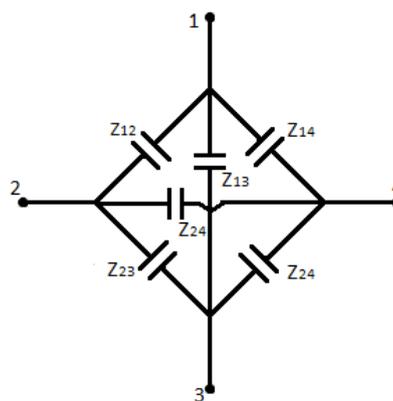


Figura 3-13 Il circuito equivalente

Per esempio, dato uno stimolo di corrente agli elettrodi 12, la corrente entra da 1, esce da 2, lasciando elettrodi 3 e 4 floating, quindi dato lo stesso stimolo, il percorso della corrente è diverso tra le diverse combinazioni degli elettrodi. Ma a seconda il nostro modello elettrico presente nel capitolo II, una CPA ha fase costante, facendo misura dello stesso materiale con tutte le 6 combinazioni degli elettrodi, i loro Cole-Cole verranno simili in parallelo.

Infatti per verificare se l'impostazione dei quattro elettrodi è venuta bene, è necessario fare alcuni esperimenti preliminari, bisogna calcolare sempre gli errori relativi per capire se il setup è stabile e ben fatto.

3.3.2 Esperimenti preliminari sulle soluzioni di KCl

1) Soluzione di KCl a 1M con 6 combinazioni degli elettrodi

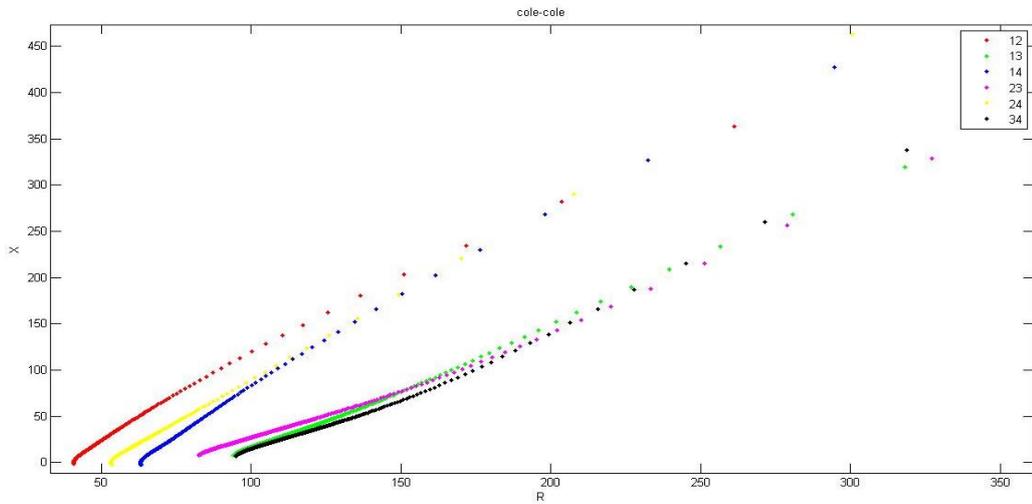


Figura 3-14 Cole-Cole della soluzione di KCl a 1M misurato con gli elettrodi 12, 13, 14, 23, 24, 34

I risultati ottenuti con KEYSIGHT impedance analyzer impostando lo stimolo di corrente 10mA, range di frequenza da 20Hz a 1MHz, numeri di campioni 1601 per ottenere osservazione più ampia. Dalla figura 3-14 si vede che in presenza dell'elettrodo 3, gli andamenti impedenza verificano gran differenza, significa che l'elettrodo 3 non è stato posizionato bene, infatti dagli occhi si può vedere che la parte all'interno del pozzetto è più corto rispetto altri, bisogna aggiustarlo.

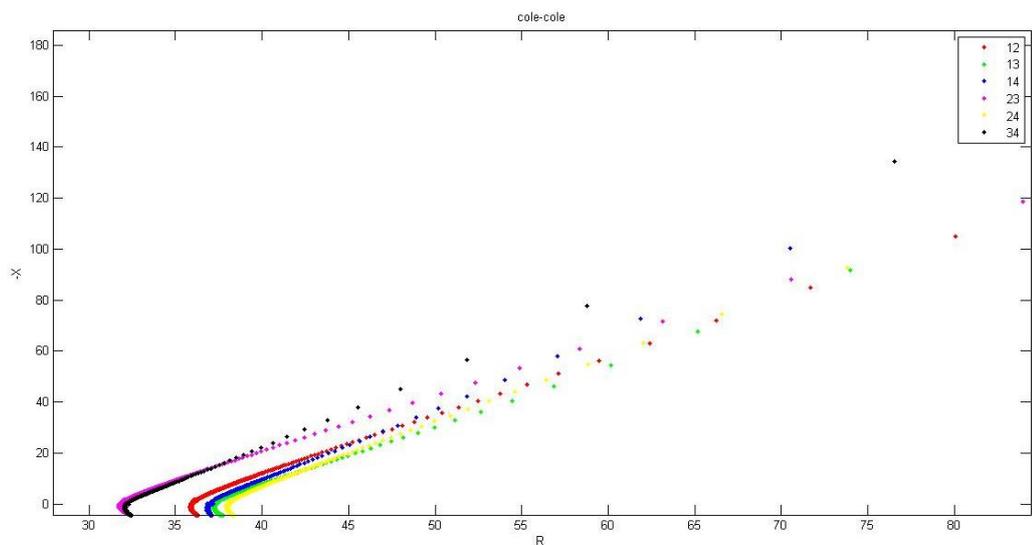


Figura 3-15 Cole-Cole della soluzione di KCl a 1M misurato con gli elettrodi 12, 13, 14, 23, 24, 34 dopo aggiustato l'elettrodo 3

È molto evidente che dopo l'elettrodo 3 è stato aggiustato, gli andamenti impedenza diventato molto simili, nel caso ideale dovrebbero essere paralleli ma a causa degli errori sistematici nel caso cui non sono perfettamente in parallelo. Quindi il passo successivo sarà valutare quanto grande l'errore relativo tra le ripetizioni diversi e se è accettabile, perché ci dice se il nostro setup è affidabile e se l'esperimento è ripetibile.

Errore relativo: soluzione di KCl a 1M:

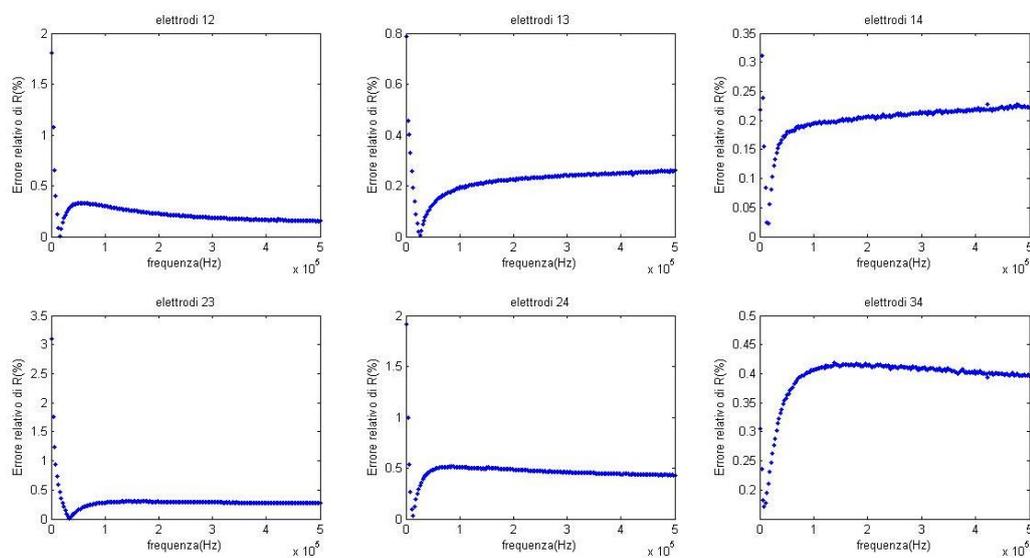


Figura 3-16 Errori relativi di R della soluzione KCl a 1M

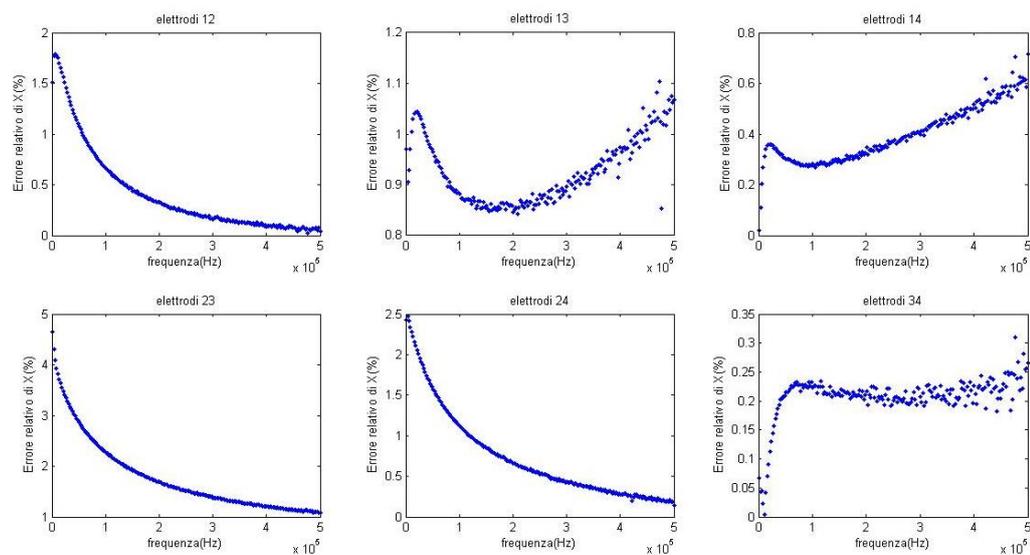


Figura 3-17 Errori relativi di X della soluzione KCl a 1M

La misura sulla soluzione di KCl a 1M viene ripetuto più volte, considerando la condizione fisiologica della coltura cellulare bisogna imporre stimolo più adattativo per le cellule. Questa volta imposta impedance analyzer stimolo di corrente $200\mu\text{A}$, range di frequenza da 1kHz a 500kHz, 201 campioni, per non dare nessun effetto alla vitalità delle cellule.

Gli errori relativi di impedenza vengono calcolati in due parti, calcola separatamente errori relativi della parte reale R e errori relativi della parte immaginaria X. Osservando figura 3-16 e 3-17 si vede che gli errori relativi di R sono molto bassi, a parte nel caso degli elettrodi 12 e 23 presentano errori di circa 2%-3% a bassa frequenza, possiamo dire che gli errori relativi di R mantiene sotto 0.5% è un buon risultato. Invece errori relativi di X sono leggermente più alti, nel caso di utilizzo gli elettrodi 23 si verificano errori di circa 5%, possiamo dire che gli errori relativi di X rimane sotto 2%, sempre buon risultato. Errore relativo accettabile significa che il nostro setup è molto stabile e affidabile, ha una buona ripetibilità.

Finora abbiamo dimostrato che il nostro sistema riesce a misurare impedenza di un materiale contenuto ioni, i risultati soddisfano il modello elettrico di CPA, e ha una buona ripetibilità. Il passo successivo sarà verificare se riesce a discriminare i materiali ovvero scaffold a diverse concentrazioni degli ioni. Prima si fa prova preliminare sempre con le soluzioni di KCl.

2) Soluzione di KCl a 4 concentrazioni

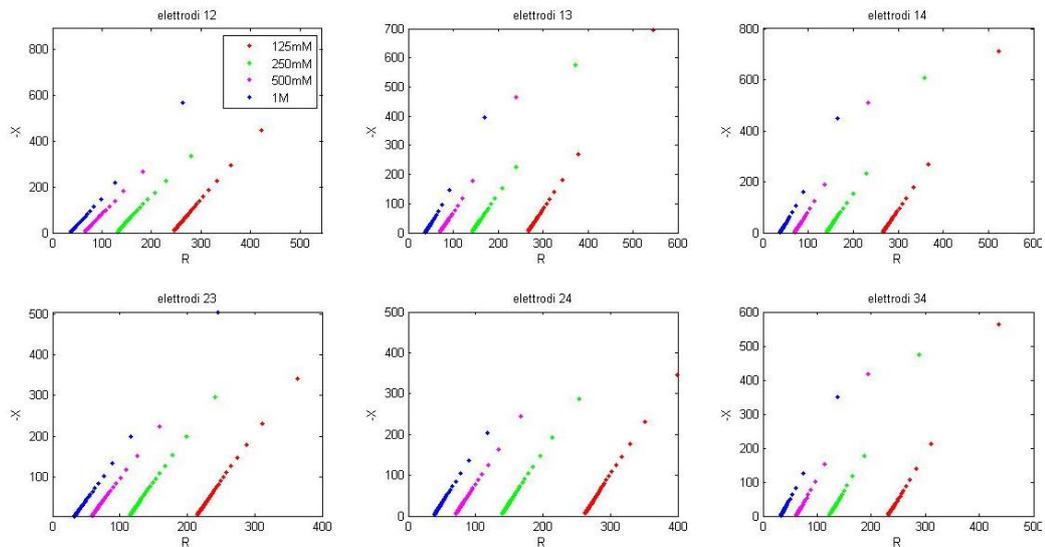


Figura 3-18 Cole-Cole delle soluzioni di KCl a 125mM, 250mM, 500mM, 1M misurati con tutte le combinazioni degli elettrodi

Misura impedenza di 4 soluzioni di KCl che hanno concentrazioni diverse di 125mM, 250mM, 500mM e 1M, con tutte le combinazioni degli elettrodi 12, 13, 14, 23, 24, 34. I risultati vengono misurati sotto lo stimolo di corrente $200\mu\text{A}$, range di frequenza da 1kHz a 500kHz, 201 campioni. La figura 3-18 mostra che il nostro sistema riesce a discriminare molto bene diverse concentrazioni, fissato una certa frequenza all'aumento della concentrazione, vedremmo sia R che $-X$ diminuisce.

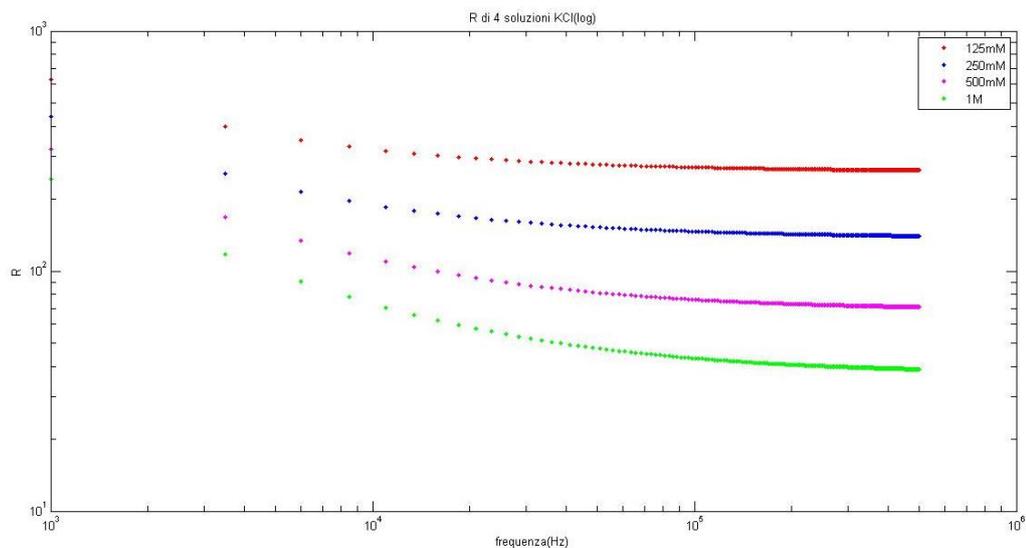


Figura 3-19 R di 4 soluzioni di KCl a concentrazione 125mM, 250mM, 500mM, 1M rispetto alla frequenza in logaritmico

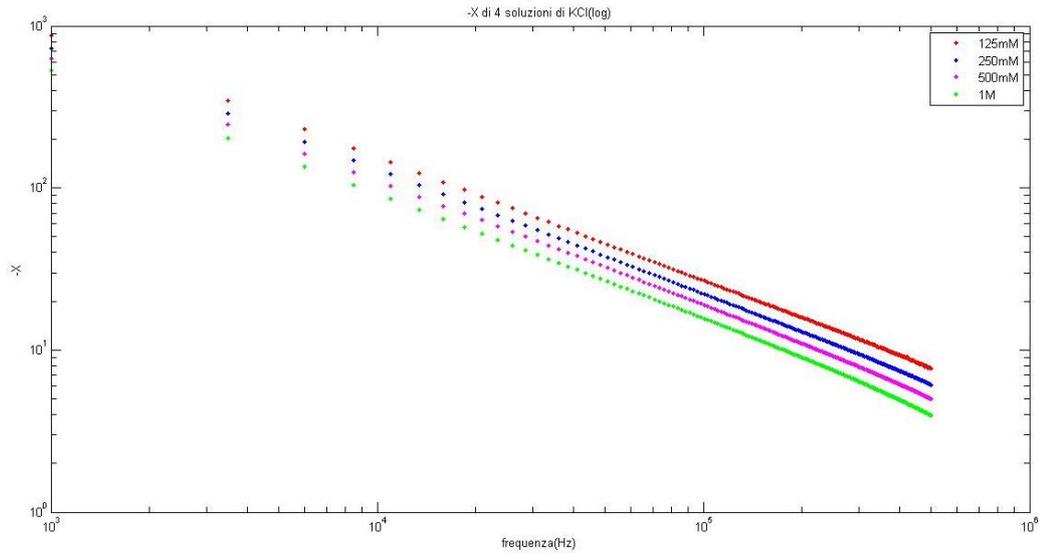


Figura 3-20 -X di 4 soluzioni di KCl a concentrazione 125mM, 250mM, 500mM, 1M rispetto alla frequenza in logaritmico

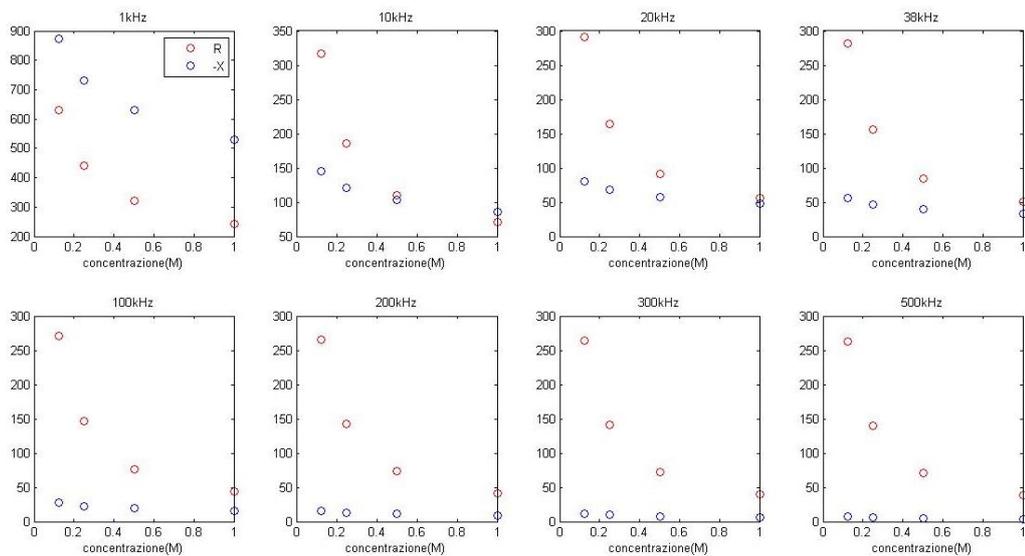


Figura 3-21 Variazione di R e -X al variare della concentrazione di KCl fissata certe frequenze

Per vedere come variano la R e la -X al variare della concentrazione di KCl, plot i valori di R e -X di 4 soluzioni di KCl a 8 certe frequenze: 1kHz, 10kHz, 20kHz, 38kHz, 100kHz, 200kHz, 300kHz, 500kHz in una figura con ascisse di concentrazione. Il risultato è abbastanza evidente che all'aumento della concentrazione degli ioni, diminuisce sia R che -X, perciò il plot Cole-Cole è una retta decrescente da alto destra a basso sinistra. Da punto di vista della conducibilità questo è

dovuto al fatto che gli ioni fuggono da loro portatori di carica all'interno di materiale o soluzione, maggiore è la concentrazione degli ioni, maggiore sarà la capacità di condurre la carica elettrica, quindi minore è l'impedenza.

Dunque considerando tutti gli esperimenti preliminari possiamo dire che il nostro sistema di misurazione funziona bene, il setup è stabile, ripetibile ed affidabile, riesce a discriminare bene i materiali contenuti diversi quantità degli ioni, i risultati coincidono anche al modello teorico. Inoltre dimostrano che il metodo della caratterizzazione dei materiali biologici a base di misura di impedenza elettrica è fattibile.

Capitolo IV Risultati e Discussioni

Avendo fatto una serie di esperimenti preliminari sulle soluzioni KCl, siamo sicuri che il sistema di misurazione lavora bene da punto di vista sia del dispositivo che della teoria. Ora possiamo fare esperimenti sullo scaffold a base di alginato.

4.1 Scaffold a concentrazione di 20mM e 40mM

Si prepara scaffold a due concentrazioni diverse, 20mM e 40mM, imposta a impedance analyzer uno stimolo di corrente $200\mu\text{A}$, range di frequenza da 1kHz a 500kHz, numero di campioni 201.

Si segue i passaggi in seguito:

- Mette uno scaffold di 20mM nel pozzetto cerca di posizionarlo al centro
- Riempì il pozzetto con la soluzione di HEPES (1ml) finché lo scaffold viene tutto immerso nella soluzione, attenzione si deve utilizzare la pipetta per versare l'HEPES lungo la parete del pozzetto
- Dopo uno sweep, salva i dati, cambia elettrodi, ci sono 6 combinazioni quindi questo passaggio bisogna ripetere 6 volte
- Toglie lo scaffold e rimette nel falcon, butta l'HEPES e lava il pozzetto con l'acqua distillata
- Prende uno scaffold di 40mM, ripete tutti i passaggi precedenti

Attenzione che ogni volta ripete esperimento lo scaffold deve stare nella stessa posizione, perché stiamo facendo la misura con due elettrodi quindi un test EIS, ci interessa solo una variabile non è altro che la concentrazione di ioni di calcio, a questo punto viene messa sempre al centro del pozzetto. Nella ricerca futura, si può utilizzare tutti i quattro elettrodi a fare una misura di EIT, consente di visualizzare una mappa di conducibilità per localizzare il cambiamento dello scaffold ad ogni punto, quindi nel test di EIT, la posizione dello scaffold è anche una variabile importante, bisognerebbe procedere la misura anche alla posizione non al centro. Ma in questa tesi, osserviamo solo la posizione al centro come mostra nella figura 4-1 cui sotto,

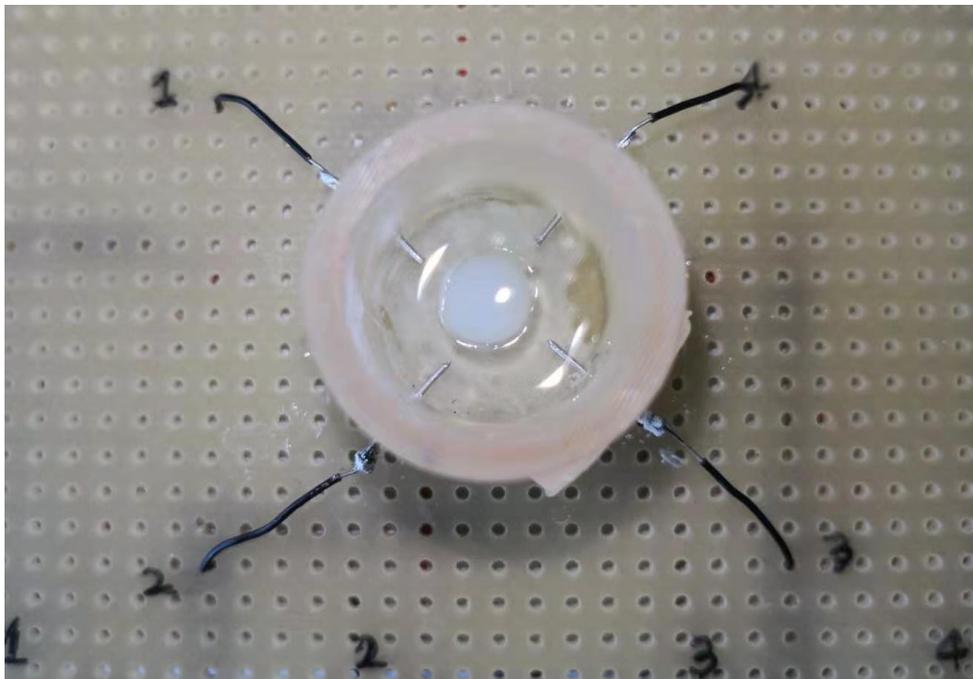


Figura 4-1 Lo scaffold viene messa al centro del pozzetto

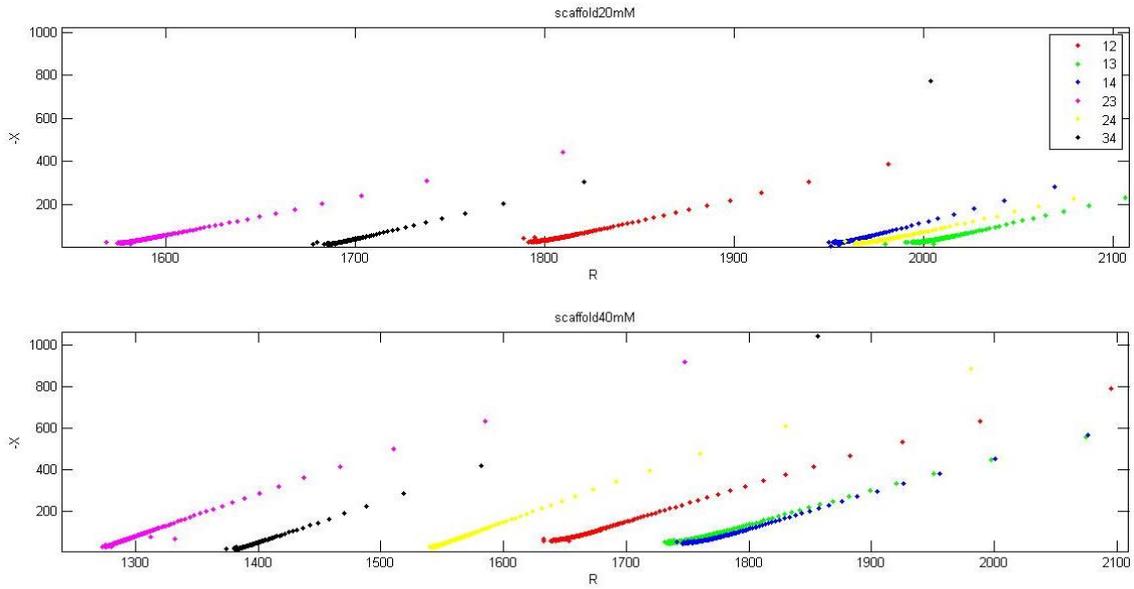


Figura 4-2 Cole-Cole di scaffold a concentrazione di 20mM e 40mM misurati con tutte le combinazioni degli elettrodi

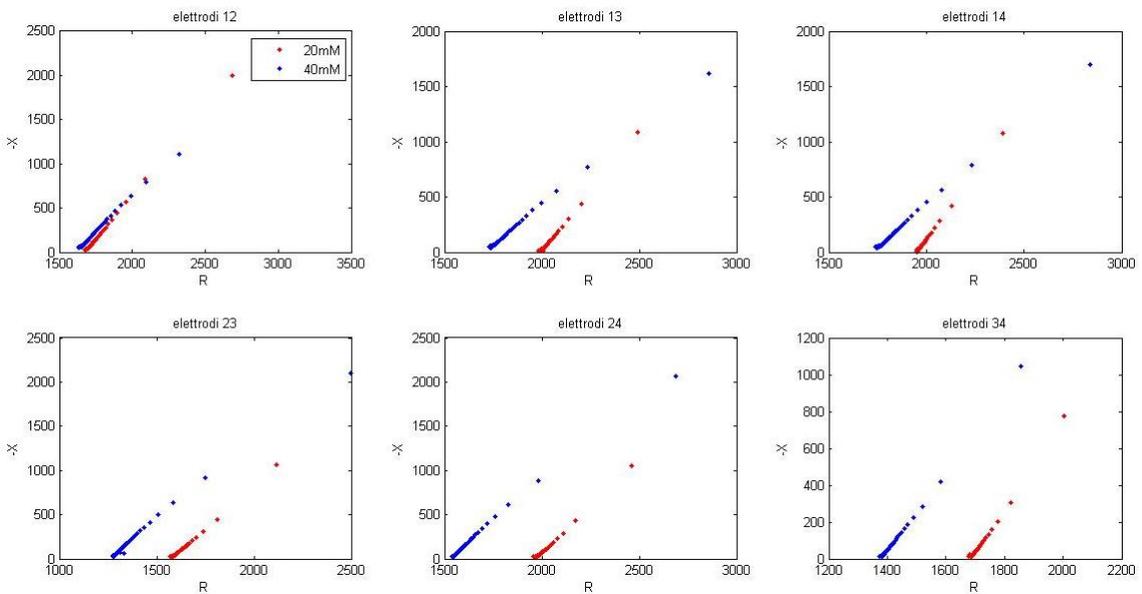


Figura 4-3 Confronta Cole-Cole di scaffold a 20mM e 40mM con la stessa combinazione degli elettrodi

I risultati vengono visualizzati in Cole-Cole, andamenti di impedenza coincidono sempre un CPA che è esattamente una retta. I risultati sono simili a quelli delle soluzioni di KCl, cambiando solo il valore di impedenza. Dunque misura stesso scaffold con tutte le combinazioni degli elettrodi, risultano 6 rette parallele, inoltre confrontando le rette dello stesso colore, la retta dello scaffold 40mM sta più a sinistra di quello di 20mM, per il fatto dimostrato negli esperimenti precedenti che maggiore è la concentrazione, minore è l'impedenza, nota anche la pendenza tra le due rette sono diverse, potrebbe essere provocato dalla variazione della costante β .

4.2 Scaffold a concentrazione di 30mM

Si prepara scaffold a concentrazione di 30mM, e con la stessa impostazione di impedance analyzer, ripete l'esperimento nella sezione 4.1. Possiamo intuire che il Cole-Cole dello scaffold a concentrazione di 30mM dovrebbe essere una retta cade in mezzo tra quella di 20mM e 40mM.

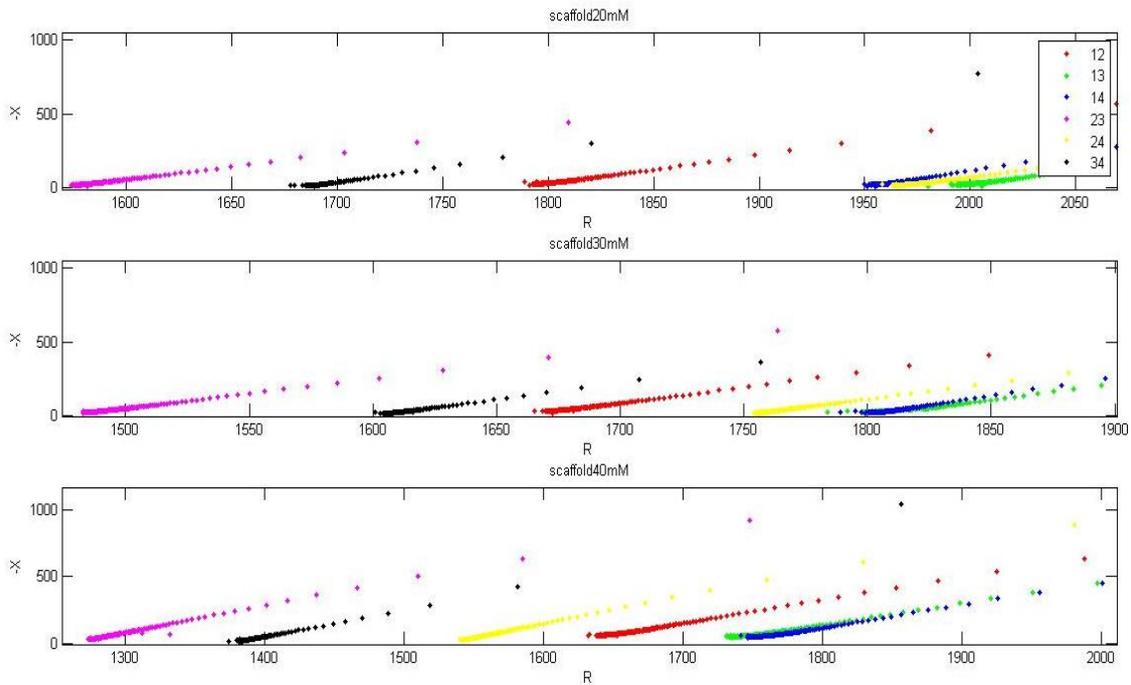


Figura 4-4 Cole-Cole degli scaffold a concentrazione di 20mM, 30mM, 40mM misurati con tutte le combinazioni degli elettrodi

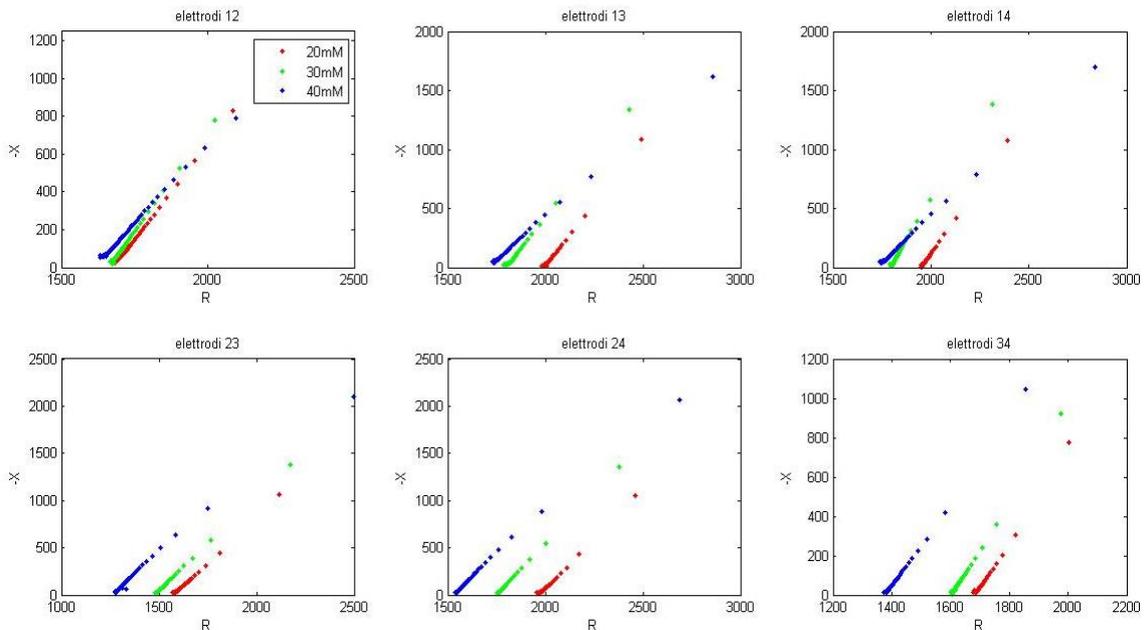


Figura 4-5 Confronta Cole-Cole di scaffold a 20mM, 30mM e 40mM con la stessa combinazione degli elettrodi

I risultati dello scaffold a concentrazione di 30mM soddisfano anche il modello CPA, la sua retta (verde) cade esattamente in mezzo delle rette di scaffold a concentrazione di 20mM e di 40mM, significa che l'intuizione prima è giusta, cioè maggiore è la concentrazione di ioni, minore è impedenza. Facciamo stesso analisi per i risultati degli scaffold, quindi fissato frequenza guarda come variano R e -X al variare della concentrazione di calcio.

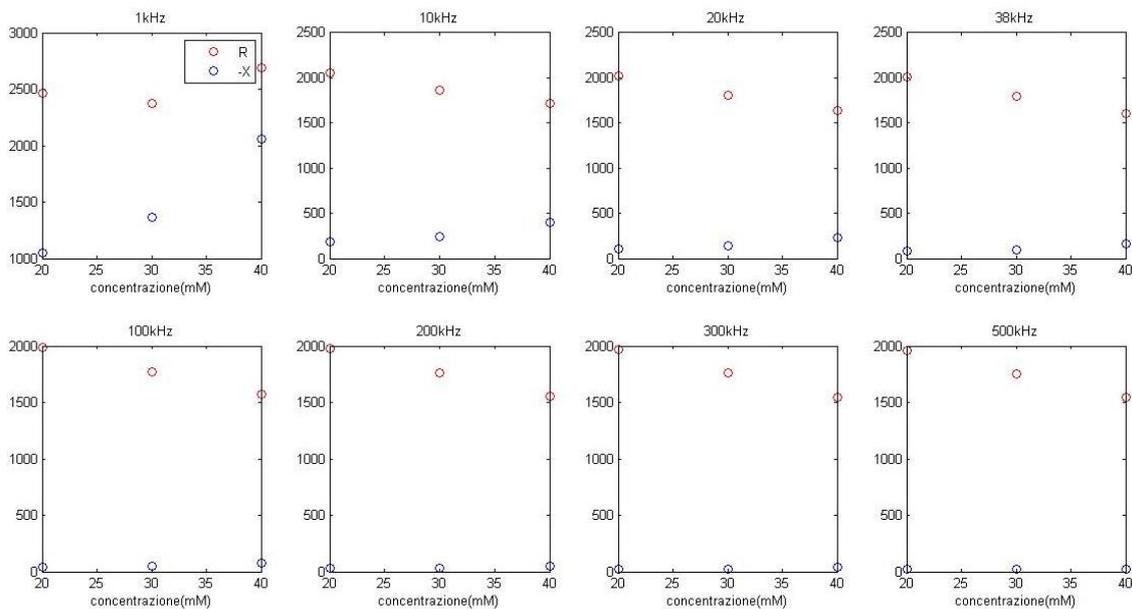


Figura 4-6 Variazione di R e -X al variare della concentrazione di scaffold fissata la frequenza

Dalla figura 4-6 possiamo vedere che la R si comporta come quella dell'esperimento preliminare sulla soluzione di KCl, diminuisce all'aumento della concentrazione di calcio. Ma la -X si comporta in maniera diversa, all'aumento della concentrazione si cresce anche, si vede più evidentemente dalla figura 4-7

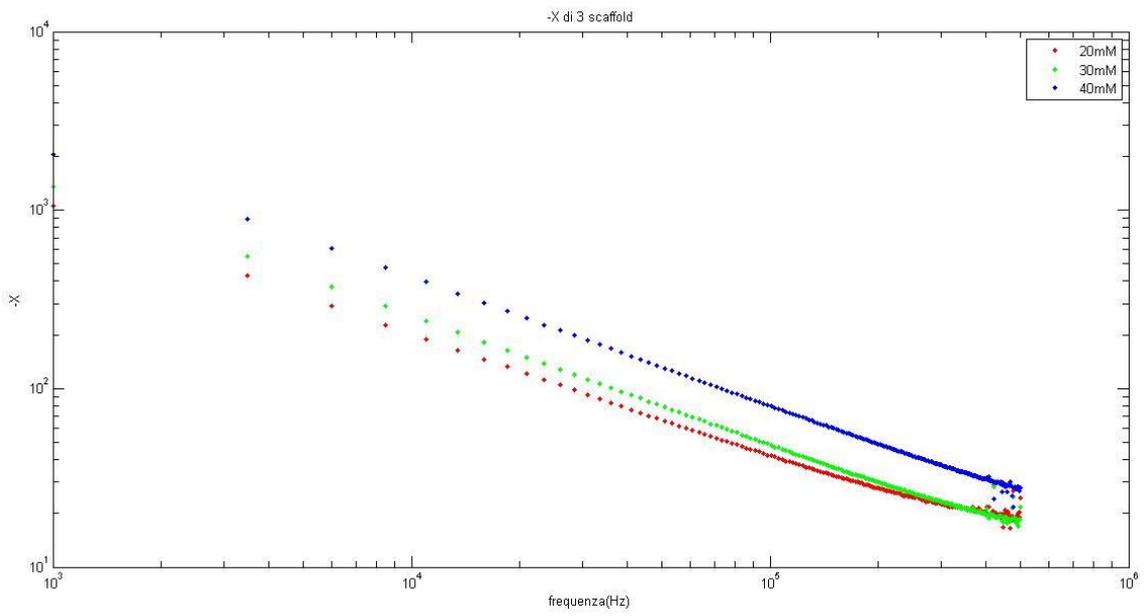


Figura 4-7 -X di 3 scaffold a concentrazione 20mM, 30mM, 40mM rispetto alla frequenza in logaritmico

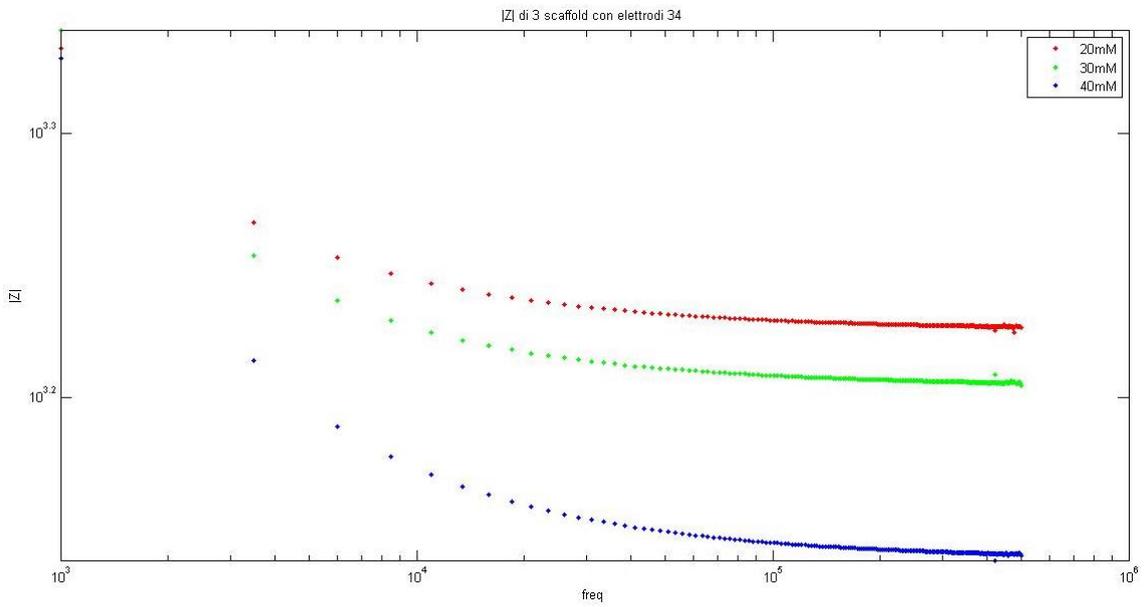


Figura 4-8 Modulo di impedenza di 3 scaffold misurato con elettrodi 34

Loro R e X non hanno rapporto lineare infatti loro pendenza decresce all'aumento della concentrazione di calcio, perciò nella figura 4-4 soprattutto le misure prese dagli elettrodi 12, 13 e 14, loro rette si intrinsecano a bassa frequenza. La causa di questo comportamento crescente della $-X$ non è chiaro potrebbe essere dovuto ad alcune caratteristiche strutturali dello scaffold perché essendo idrogel ha una struttura sicuramente diversa dalla soluzione acquosa, questo sarà un altro argomento da studiare in futuro. Benché la $-X$ cresce all'aumento della concentrazione di ioni, il modulo di impedenza decresce comunque, questo risultato coincide al fatto che maggiore concentrazione di ioni provoca maggiore conducibilità, il materiale sotto test ha maggiore capacità di condurre, quindi ha minore impedenza.

4.3 Discussione e conclusione

Considerando i risultati di tutti gli esperimenti, innanzitutto potremmo dire che il sistema sviluppato in questa tesi per la caratterizzazione di scaffold biologici è stabile, affidabile e ripetibile. L'ultima fase di questo lavoro è costruire una relazione tra la caratteristica di scaffold e l'impedenza elettrica complessa.

Nel capitolo II abbiamo dimostrato che il nostro modello elettrico può essere un CPA, nel caso ideale la sua impedenza è un esponenziale e il suo Cole-Cole è una retta partendo dall'origine (figura 2-4):

$$Z_{CPA} = \frac{A}{(j\omega)^\beta}; \quad A, \beta \text{ costante}$$

$$0 < \beta < 1$$

$$\omega = 2\pi f$$

Sappiamo che l'impedenza è un numero complesso,

$$Z = R + jX$$

Teoricamente A e β di un CPA sono due costanti, è proporzionale dalle caratteristiche di materiale sotto test, quindi dobbiamo trovare una relazione tra loro e le nostre misure, a seconda [43].

$$R = \frac{A \cos \frac{\pi\beta}{2}}{\omega^\beta}$$

$$X = -\frac{A \sin \frac{\pi\beta}{2}}{\omega^\beta}$$

$$\frac{X}{R} = -\frac{\sin \frac{\pi\beta}{2}}{\cos \frac{\pi\beta}{2}} = -\tan \frac{\pi\beta}{2}$$

$$\beta = \frac{2}{\pi} \tan^{-1} \frac{-X}{R}$$

Quindi la costante β dipende dallo slop del plot Cole-Cole.

Tuttavia nel nostro caso sperimentale, la retta di Cole-Cole non parte dall'origine, c'è sempre un offset che è la resistenza della soluzione R_s , questo offset si presenta come l'intersezione dell'asse R, identifica anche la conducibilità (figura4-4 e 4-5) e viene aggiunto nell'equazione di impedenza di CPA:

$$Z_{CPA} = \frac{A}{(j\omega)^\beta} + R_s$$

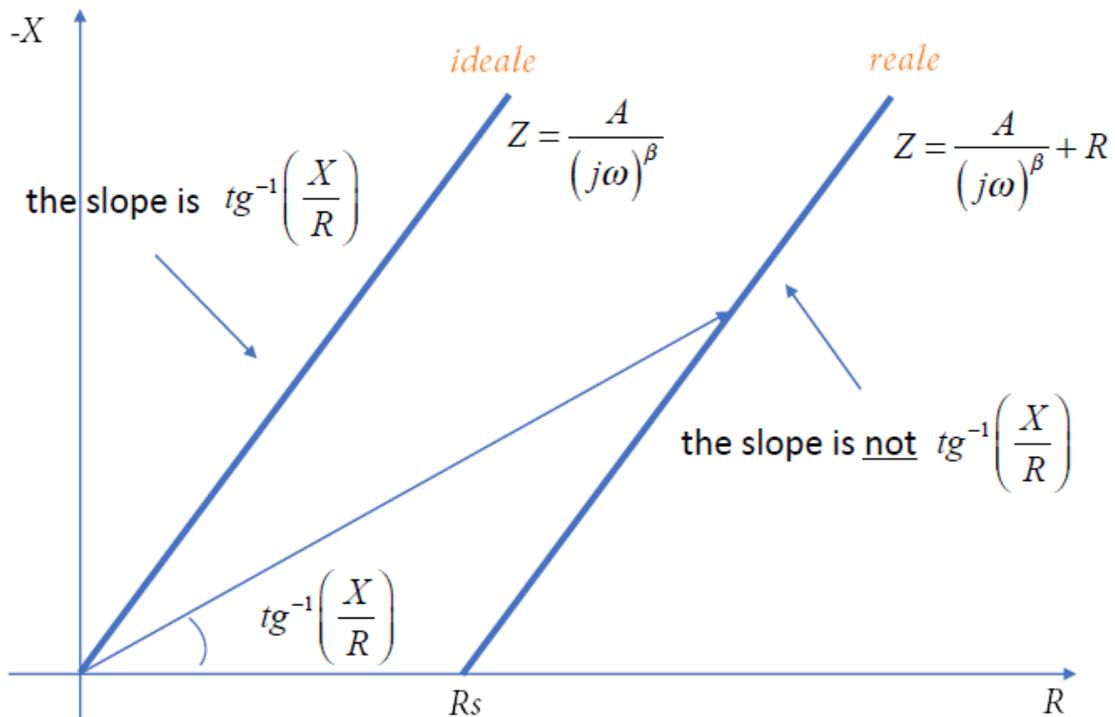


Figura 4-9 Cole-Cole ideale e reale

Osserva figura 4-9, la β dipende sempre dallo slop di plot Cole-Cole, ma nel caso reale, lo slop della retta non è più uguale a $\tan^{-1} \frac{X}{R}$ invece è $\tan^{-1} \frac{\Delta X}{\Delta R}$. Quindi l'equazione di β di caso reale è:

$$\beta = \frac{2}{\pi} \tan^{-1} \frac{\Delta X}{\Delta R}$$

Occorre calcolare β ad ogni punto utilizzando la variazione ΔX e ΔR :

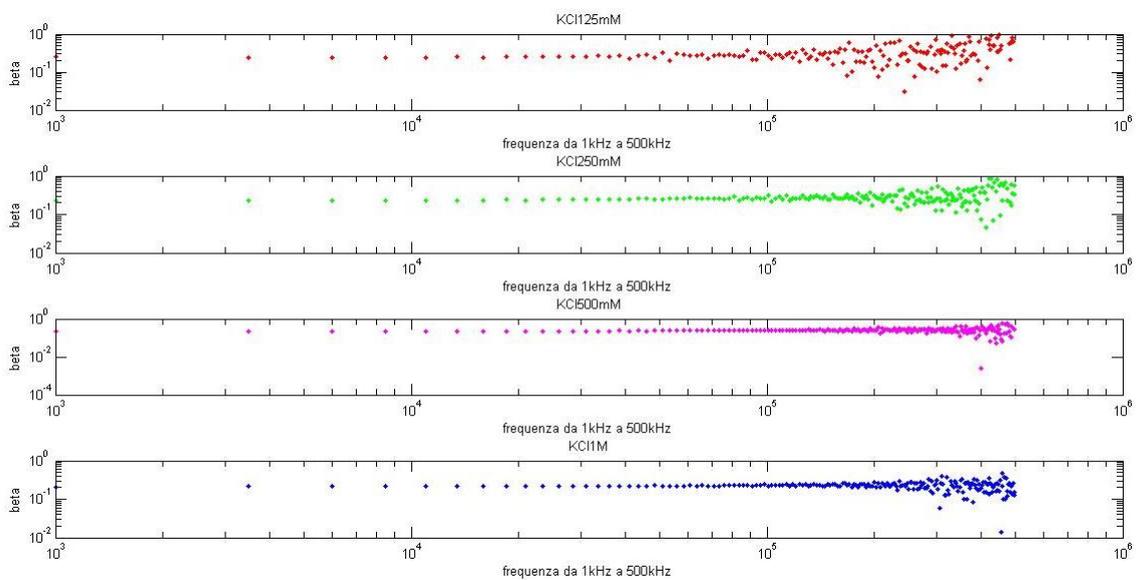


Figura 4-10 Beta di 4 soluzioni di KCl a concentrazione di 125mM, 250mM, 500mM e 1M

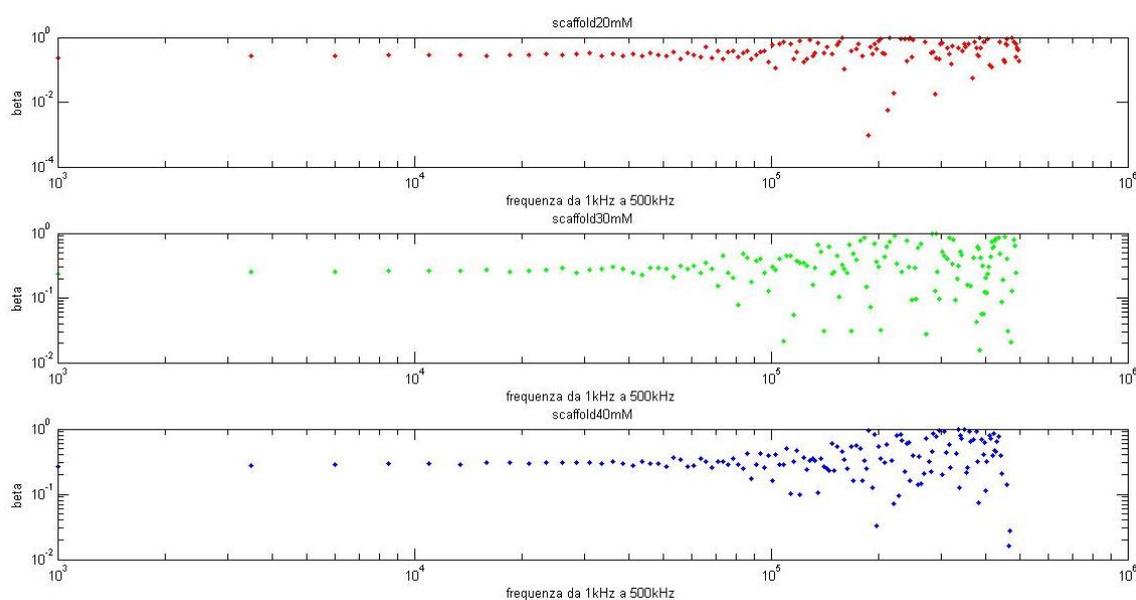


Figura 4-11 Beta di 3 scaffold a concentrazione di 20mM, 30mM e 40mM

Osserva figura 4-10 e 4-11, la β è quasi costante a bassa frequenza, ad alta frequenza si discosta di più, per esempio da 1kHz a circa 100kHz la β di soluzione di KCl è molto stabile invece β di scaffold rimane più stabile nella banda di frequenza da 1kHz a circa 80kHz. Poi nota che maggiore è la concentrazione di ioni, maggiore la banda della frequenza in cui β è circa costante. La notevole varianza di β può essere causata dall'effetto parassite ad alta frequenza, ci serve solo il tratto in cui il valore di β è stabile. Quindi prendiamo la banda della frequenza da 1kHz a 100kHz per le soluzioni di KCl e da 1kHz a 80kHz per gli scaffold, e si calcola media e deviazione standard di ogni materiale sotto test:

Materiale sotto test	Media di β	DS di β
KCl 125mM	0.2662	0.03341
KCl 250mM	0.2514	0.0153
KCl 500mM	0.2361	0.00849
KCl 1M	0.222	0.006667
Scaffold 20mM	0.2915	0.05544
Scaffold 30mM	<u>0.2724</u>	0.04744
Scaffold 40mM	0.2987	0.02501

Tabella 4-1 Media e deviazione standard di beta calcolate in banda 1kHz-100kHz per le soluzioni di KCl e 1kHz-80kHz per gli scaffold

I risultati delle soluzioni di KCl mostrano che maggiore è la concentrazione di ioni, maggiore la media e minore la deviazione di standard, significa che il valore di β è maggiore ed è più stabile. Mentre dai risultati degli scaffold si può capire solo che all'aumento della concentrazione di ioni di calcio, la deviazione standard è minore, il comportamento della media non è chiaro, il motivo potrebbe essere la polimerizzazione imperfetto o la degradazione

degli stessi. Dunque maggiore è la concentrazione di ioni di calcio, il valore di β tende più stabile, è più simile ad una costante. La deviazione standard ci dice quanto stabile la β cioè dove stanno le maggiori informazioni. Questo modello CPA è una semplificazione per la stimolazione del circuito equivalente e per l'analisi dei dati sperimenti, ma in realtà lo scaffold è un sistema molto più completo, non solo da punto di vista della struttura, anche dalla sua proprietà che durante il tempo continua a degradarsi.

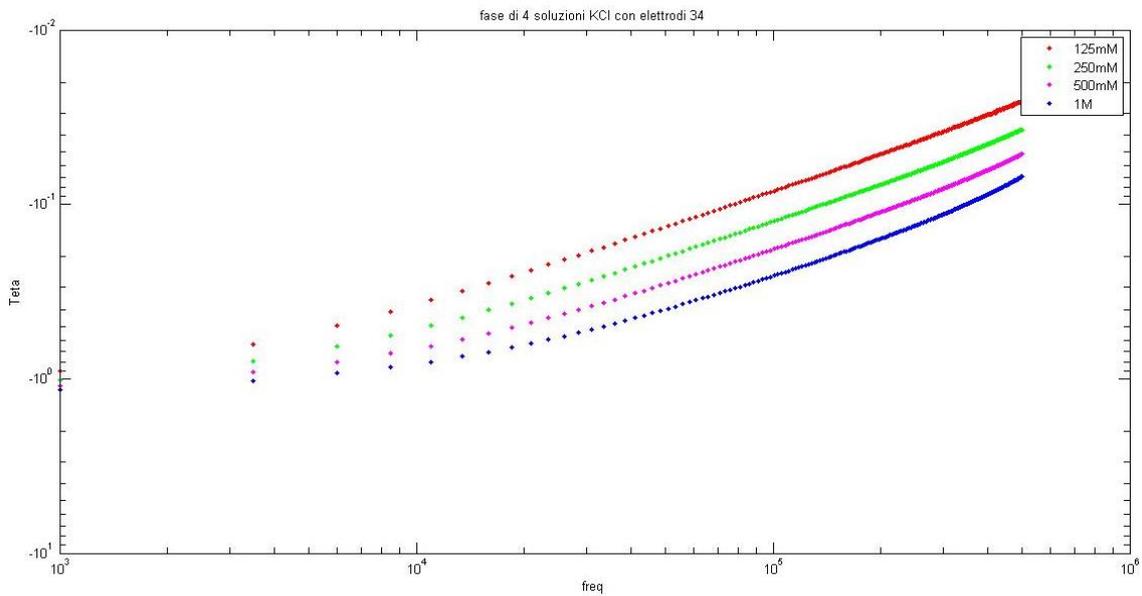


Figura 4-12 Fase di 4 soluzioni di KCl misurata con gli elettrodi 34

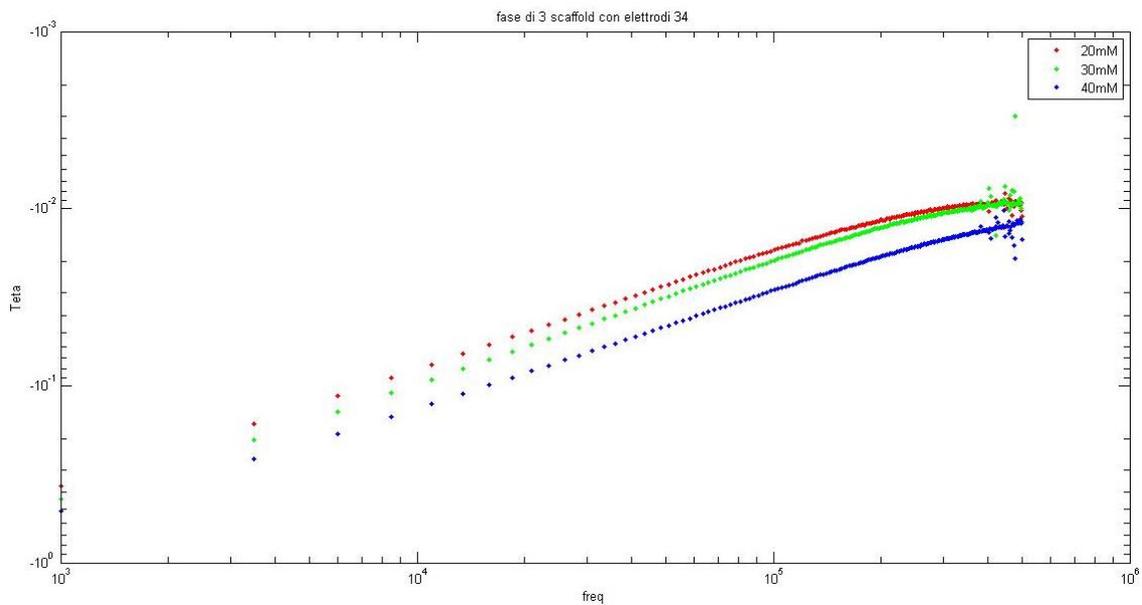


Figura 4-13 Fase di 3 scaffold misurata con gli elettrodi 34

Figura 4-12 e 4-13 mostrano che sia la soluzione di KCl che lo scaffold a base di alginato hanno fase non costante, la fase è proporzionale alla frequenza da punto di vista sperimentale, vuol dire che il modello elettrico equivalente dello scaffold a base di alginato non è solamente un CPA semplice, è un modello elettrico più complicato con la fase crescente alla frequenza. Quindi uno degli scopi della ricerca successivo sarà la esplorazione di modello equivalente completo dello scaffold a base di alginato.

Dunque è molto chiaro che esiste una dipendenza tra la concentrazione di ioni di calcio e la β dello scaffold. Il nostro sistema di misura può discriminare bene la concentrazione di ioni di calcio attraverso la conducibilità perché essa è proporzionale all'intersezione del plot Cole-Cole e l'asse di R (figura 4-5). Può anche determinare in quale regione di frequenza ci sono maggiori informazioni attraverso la varianza e la deviazione standard di β . La β in realtà è una funzione della concentrazione di ioni di calcio $\beta(C)$, la sua variazione presenta nei dati sperimentali sembra di essere proporzionale alla frequenza ma la causa potrebbe essere l'effetto capacitivo parassite o proprio lo scaffold imperfetto, quindi il nostro sistema può anche esaminare se uno scaffold biologico a base di alginato è stato ben fatto.

Conclusione e futuri sviluppati

Il lavoro presente in questa tesi ha sviluppato un approccio non invasivo per la caratterizzazione di scaffold biologici in base alla misura di impedenza elettrica complessa, costruito un nuovo setup gode quattro elettrodi di platino ad ago che ci consente di fare misura sia a due punti che a quattro punti. Il setup è stato dimostrato di essere stabile, affidabile e ripetibile attraverso una serie di esperimenti preliminari sulle soluzioni di KCl a diverse concentrazioni. I risultati ottenuti da questo sistema vengono inseriti e elaborati in MATLAB, dopo calcolato i parametri caratteristici elettrici per esempio modulo, fase, β , si può condurre una analisi qualitativa per eseguire la caratterizzazione di scaffold a base di alginato. Inoltre questo sistema di misura può anche caratterizzare qualitativamente la soluzione di terreno della coltura cellulare, quindi in futuri esperimenti è possibile sottrarre l'effetto della soluzione di terreno dai risultati di misurazioni complessivi, rendendo la caratterizzazione di scaffold più accurata e affidabile.

Gli esperimenti mostrati in questa tesi sono stati tutti misurati con la figurazione di 2T, basata su classico modello di camera elettrochimica ovvero tipico test di EIS con due elettrodi, i risultati ottenuti sono impedenze del materiale sotto test. Nella ricerca futura è possibile fare misura anche con la figurazione di 4T, cioè un test di EIT più semplice. Attraverso la programmazione e la simulazione, è possibile calcolare la conducibilità locale in ogni punto del pozzetto, questi valori di conducibilità vengono inseriti in una mappa ovvero un'immagine in grado di mostrare in maniera più evidente il cambiamento al variare della concentrazione di ioni di calcio dello scaffold biologico, è possibile localizzare anche la posizione dello scaffold attraverso questa immagine.

In realtà questa tesi è il passo preliminare della caratterizzazione di scaffold biologici a base di alginato, lo scopo è sviluppare un metodo ovvero costruire un sistema in grado di discriminare gli scaffold biologici a diverse concentrazioni di ioni di calcio analizzando le misure di impedenza elettrica

nel caso ideale, basando al fatto che maggiore è concentrazione di ioni maggiore sarebbe la conducibilità, faccia riferimento in nostro modello elettrico è il valore di β . Purtroppo nel caso reale è impossibile ottenere una condizione ideale, ci sono molti effetti che portano risultati scarsi, per esempio polimerizzazione incompleta dello scaffold, PH, temperatura e degradazione di sé stesso, inoltre esiste sempre rumore esterno dei cavi connettori e dello strumento. Un'altra conclusione importante è che abbiamo utilizzato il classico modello elettrochimico non è altro che un CPA come nostro modello elettrico dello scaffold, ma gli esperimenti dimostrano che lo scaffold a base di alginato ha un modello elettrico equivalente più complicato a fase variante, nella ricerca successiva bisogna costruire un nuovo modello elettrico adattato per lo scaffold a base di alginato. Tuttavia, il sistema sviluppato in questa tesi è in grado di spiegare la relazione tra fenomeni fisici chimici ed i dati sperimenti robusti ripetibili, poi da punto di vista di hardware il setup può essere ancora migliorato e calibrato, da punto di vista di software si può togliere sempre gli errori sistematici o fare compensazione tramite gli algoritmi. Offre la possibilità e le idee per lo studio futuro dello scaffold biologico a base di alginato.

Questo approccio si può applicare nel progetto di ingegneria biomedica e ingegneria tissutale, è un lavoro preliminare per lo studio della mineralizzazione delle cellule. Essendo un sistema preliminare e non perfetto, bisogna migliorarlo facendo altri esperimenti biologici in-vitro. In futuro è possibile anche monitorare i comportamenti delle cellule in real-time. Dunque la caratterizzazione dello scaffold con misura di impedenza elettrica è la nuova sfida di ingegneria biomedica e ingegneria tissutale, una volta viene superato può aiutare notevolmente la tecnica della coltura cellulare 3D, e quindi promuoverà lo sviluppo di queste discipline, per esempio c'è la maggiore possibilità di realizzare la coltivazione e il trapianto degli organi autologhi, contribuirà alla salute umana.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Langer R, Vacanti J. Tissue engineering. *Science* 1993;260(5110):920-6.
- [2] Caroline Ceccaldi, Raya Bushkalova, Daniel Cussac, Benjamin Duployer, Christophe Tenailleau, Philippe Bourin, Angelo Parini, Brigitte Sallerin, Sophie Girod Fullana. Elaboration and evaluation of alginate foam scaffolds for soft tissue engineering. *International Journal of Pharmaceutics* 524 (2017) 433–442.
- [3] Tseng TC, Tao L, Hsieh FY, Wei Y, Chiu IM, Hsu SH. An Injectable, Self-Healing Hydrogel to Repair the Central Nervous System. *Adv Mater.* 2015 Jun 17;27(23):3518-24. doi: 10.1002/adma.201500762. Epub 2015 May 7.
- [4] Zhou Z, Yi Q, Xia T, Yin W, Kadi AA, Li J, Zhang Y. A photo-degradable supramolecular hydrogel for selective delivery of microRNA into 3D-cultured cells. *Org Biomol Chem.* 2017 Mar 8;15(10):2191-2198. doi: 10.1039/c6ob02667b
- [5] Gjorevski N, Lutolf MP. Synthesis and characterization of well-defined hydrogel matrices and their application to intestinal stem cell and organoid culture. *Nat Protoc.* 2017 Nov;12(11):2263-2274. doi: 10.1038/nprot.2017.095. Epub 2017 Oct 5.
- [6] Prucker O, Brandstetter T, Rhe J. Surface-attached hydrogel coatings via C, H-insertion crosslinking for biomedical and bioanalytical applications (Review). *Biointerphases.* 2017 Dec 8;13(1):010801. doi: 10.1116/1.4999786.
- [7] Gibbs DM, Black CR, Dawson JI, Oreffo RO1. A review of hydrogel uses in fracture healing and bone regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016 Mar;10(3):187-98. doi: 10.1002/term.1968. Epub 2014 Dec 10
- [8] Kinoshita K, Iwase M, Yamada M, Yajima Y, Seki M. Fabrication of multilayered vascular tissues using microfluidic agarose hydrogel platforms. *Biotechnol J.* 2016 Nov;11(11):1415-1423. doi: 10.1002/biot.201600083. Epub 2016 Sep 26.
- [9] Yong Bok Kim and Geun Hyung Kim. PCL/Alginate Composite Scaffolds for Hard Tissue Engineering: Fabrication, Characterization, and Cellular Activities. *ACS Combinatorial Science* 2015, 17, 87–99.

- [10] Ao Zheng, Lingyan Cao, Yang Liu, Jiannan Wu, Deliang Zeng, Longwei Hu, Xiangkai Zhang, Xinquan Jiang. Biocompatible silk/calcium silicate/sodium alginate composite scaffolds for bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers* 199 (2018) 244–255.
- [11] Draget KI, Ostgaard K, Smidsrod O. Homogeneous alginate gels: a technical approach. *Carbohydrate Polym* 1991; 14:159-78.
- [12] Pawar, S. N., and K. J. Edgar. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials* 33:3279–3305, 2012.
- [13] Valente, J. F. A., T. A. M. Valente, P. Alves, P. Ferreira, A. Silva, and I. J. Correia. Alginate based scaffolds for bone tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* 32:2596–2603, 2012.
- [14] Leo Q. Wan, Jie Jiang, Diana E. Arnold, X. Edward Guo, Helen H. Lu, and Van C. Mow. Calcium Concentration Effects on the Mechanical and Biochemical Properties of Chondrocyte-Alginate Constructs. *Cell Mol Bioeng.* 2008 March 1; 1(1): 93–102.
- [15] Stephen J. Florczyk, Forrest M. Kievit, Kui Wang, Ariane E. Erickson, Richard G. Ellenbogen, and Miqin Zhang. 3D Porous Chitosan-Alginate Scaffolds Promote Proliferation and Enrichment of Cancer Stem-Like Cells. *J Mater Chem B Mater Biol Med.* 2016 October 14; 4(38): 6326–6334. doi:10.1039/C6TB01713D.
- [16] Vipra Guneta, Qiu Li Loh, Cleo Choong. Cell-secreted extracellular matrix formation and differentiation of adipose-derived stem cells in 3D alginate scaffolds with tunable properties. *J Biomed Mater Res Part A* 2016:104A:1090–1101.
- [17] Georgia Kaklamani, David Cheneler, Liam M. Grover, Michael J. Adams, James Bowen. Mechanical properties of alginate hydrogels manufactured using external gelation. *Journal of the mechanical behaviour of biomedical materials* 36 (2014) 135-142.
- [18] Silvia Panzavolta, Paola Torricelli, Sonia Casolari, Annapaola Parrilli,

- [19] Sofia Amadori, Milena Fini, Adriana Bigi. Gelatin Porous Scaffolds as Delivery Systems of Calcium Alendronate. *Macromolecular Bioscience*. 2017,17, 1600272.
- [20] MARK E. ORAZEM, BERNARD TRIBOLLET. *Electrochemical Impedance Spectroscopy*. Copyright © 2008 by John Wiley & Sons, Inc.
- [21] Lei Han, Pei Liu, Valery A. Petrenko, Aihua Liu. A Label-Free Electrochemical Impedance Cytosensor Based on Specific Peptide-Fused Phage Selected from Landscape Phage Library. *Scientific Reports* 6:22199.
- [22] Alnaief, M., Alzaitoun, M.A., Garcí'a-Gonzá'lez, C.A., Smirnova, I., 2011. Preparation of biodegradable nanoporous microspherical aerogel based on alginate. *Carbohydr.Polym.* 84, 1011–1018
- [23] Drury, J.L., Dennis, R.G., Mooney, D.J., 2004. The tensile properties of alginate hydrogels. *Biomaterials* 25, 3187–3199
- [24] Olav Smidsr_d, Gudmund Skja, et al. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in biotechnology*, 8:71{78, 1990
- [25] Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., 1973. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Lett.* 32 (1), 195–198.
- [26] Sikorski, P., Mo, F., Skjak-Braek, G., Stokke, B.T., 2007. Evidence for egg-box-compatible interactions in calcium alginate gels from fiber X-ray diffraction. *Biomacromolecules* 8, 2098–2103.
- [27] Simpson, N.E., Stabler, C.L., Simpson, C.P., Sambanis, A., Constantinidis, I., 2004. The role of the CaCl₂-guluronic acid interaction on alginate encapsulated BTC3 cells. *Biomaterials* 25, 2603–2610.
- [28] Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D., 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 11–21
- [29] F. de la Portilla, S. Pereira, M. Molero, F. De Marco, V. Perez-Puyana, A. Guerrero, A. Romero. Microstructural, mechanical, and histological evaluation of modified alginate-based scaffolds. *J Biomed Mater Res Part A* 2016:104A:3107–3114.

- [30] Teresa R. Cuadro, Alejandro A. Erices, José M. Aguilera. Porous matrix of calcium alginate/gelatin with enhanced properties as scaffold for cell culture. *Journal of the mechanical behaviour of biomedical materials* 46 (2015) 331-342
- [31] Catherine K. Kuo, Peter X. Ma. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* 22 (2001) 511-521.
- [32] Hommel, M., Sun, A. M. and Goosen, M. F. A., 1988, Droplets generation. Canadian Patent No.1241598.
- [33] Poncelet, D., Lencki, R., Beaulieu, C., Halle, J. P., Neufeld, R. J. and Fournier, A., 1992, Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, 39±45.
- [34] X. D. LIU, W. Y. YU, Y. ZHANG, W. M. XUE, W. T. YU, Y. XIONG, X. J. MA, Y. CHEN and Q. YUAN. Characterization of structure and diffusion behaviour of Ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources. *j. microencapsulation*, 2002, vol. 19, no. 6, 775±782
- [35] Lai Wah Chan, Huey Ying Lee, Paul W.S. Heng. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydrate Polymers* 63 (2006) 176–187
- [36] Stephanie Tully-Dartez, B.S., Henry E. Cardenas and Ping-Fai Sidney Sit. Pore Characteristics of Chitosan Scaffolds Studied by Electrochemical Impedance Spectroscopy. *TISSUE ENGINEERING: Part C Volume 16, Number 3*, 2010.
- [37] Electrochemical Impedance Spectroscopy Primer. www.gamry.com
- [38] Peter Hayes, in *Treatise on Process Metallurgy: Process Fundamentals*, 2014
- [39] F. Starzyk. Parametrisation of interdigit comb capacitor for dielectric impedance spectroscopy. *International Scientific Journal*, 2008, vol.34, 31-34.
- [40] Davorka ˇ Sel, Serge Mazeret, Justin Teissie, and Damijan Miklavˇciˇc. Finite-Element Modeling of Needle Electrodes in Tissue from the Perspective of Frequent Model Computation. *IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING*, VOL. 50, NO. 11, NOVEMBER 2003.

- [41] Dal-Young Kim. Numerical Estimate of the Capacitance of Needle-Type Electrode-Structured Capacitors. *Journal of the Korean Physical Society*, Vol. 51, No. 2, August 2007, pp. 651_654.
- [42] Dal-Young Kim. Estimation of Capacitance of Multi-Layer Ceramic Capacitors when Needle-Type-Electrode Structure is Adopted. *Journal of the Korean Physical Society*, Vol. 49, December 2006, pp. S509_S513.
- [43] ER@SE/LEPMI J.-P. Diard, B. Le Gorrec, C. Montella. *Handbook of Electrochemical Impedance Spectroscopy, ELECTRICAL CIRCUITS CONTAINING CPEs*. Hosted by Bio-Logic @ www.bio-logic.info. March 29, 2013.
- [44] Piotr Zoltowski. On the electrical capacitance of interfaces exhibiting constant phase element behaviour. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 443(1):149{154, 1998.
- [45] Chiara Canali, Arto Heiskanen, Haseena Bashir Muhammad, Per Høyum, Fred-Johan Pettersen, Mette Hemmingsen, Anders Wolff, Martin Dufva, Ørjan Grøttem Martinsen, Jenny Emnéus. Bioimpedance monitoring of 3D cell culturing—Complementary electrode configurations for enhanced spatial sensitivity. *Biosensors and Bioelectronics* 63 (2015) 72–79

Ringraziamenti

Questa tesi è come una conclusione di questi 4 anni di studio e di vita in Italia, ho imparato molto, come condurre una ricerca accademica, come porre una domanda, come risolvere un problema nello studio e anche come comportare con le persone nella vita e nel lavoro, credo che queste siano esperienze preziose che verranno applicate in futuro. Questa tesi è inseparabile dall'aiuto di molte persone, innanzitutto vorrei ringraziare mio relatore Prof. Marco Tartagni, mi ha offerto un argomento molto bello e interessante, nella fase iniziale mi ha dato un gran incoraggiamento, è stato sempre disponibile con maggiore pazienza nonostante ho la difficoltà del linguaggio, seguiva anche gli esperimenti e faceva discussione dei risultati, la sua approvazione è uno dei motivi per continuare questo lavoro. Poi vorrei ringraziare i miei correlatori Prof. Marco Crescentini e Dott. Joseph Lovecchio, sono stati sempre disponibili a rispondere le mie domande e richieste, mi hanno offerto gran supporto sia per esperimenti che per teoria. Poi vorrei ringraziare anche il correlatore Prof. Emanuele Giordano che mi ha offerto la possibilità di studiare in laboratorio.

Vorrei ringraziare la mia famiglia. Grazie a mia madre che sei stata gran supporto quando ho deciso di venire in Italia. Poi grazie a mio padre italiano Fortunato Caruso, grazie a te che mi tratti come tua figlia. Grazie a mio padre cinese, sei in Cina ma mi hai dato sempre incoraggiamento. Grazie a tutti, senza di voi non posso finire questa avventura dura.

Grazie a mia migliore amica cinese Yi Yuanfeng, siamo venute in Italia insieme, grazie il tuo accompagnamento nei miei momenti assurdi.

Grazie a me stessa per essere così coraggiosa e studiosa.

Grazie a Xiaozan e Yibo, mi avete dato il coraggio di inseguire la luce.

望八荒霓虹变换，逐光等待安年，并肩于雪山之巅。

你们即是光，谢谢你们给了我追逐光的勇气。

Grazie a tutto.

Siqi