



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE**

**SVILUPPO DI UN BIOPOLIMERO PER APPLICAZIONI
FARMACEUTICHE: UN APPROCCIO DOE**

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Bice Conti

Correlatore:

Dott.ssa Mariella Rosalia

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di

Leon Lekaj

Anno Accademico 2023/2024

Indice

1. Introduzione	1
1.1 <i>Poliglicerol sebacato</i>	1
1.2 <i>Sintesi del PGS</i>	4
1.3 <i>DOE</i>	8
2. Scopo del lavoro.....	11
3. Materiali e Metodi	12
3.1 <i>Materiali</i>	12
3.2 <i>Metodi</i>	12
3.2.1 <i>DOE</i>	12
3.2.2 <i>Sintesi</i>	16
3.2.3 <i>Purificazione</i>	16
3.2.4 <i>Caratterizzazione</i>	18
4. Risultati e Discussione	20
4.1 <i>Caratterizzazione del polimero</i>	20
4.2 <i>Analisi dati DOE</i>	27
5. Conclusioni	39
6. Bibliografia.....	41

1. Introduzione

1.1 Poliglicerol sebacato

Il poliglicerol sebacato (PGS) è un poliesteri biodegradabile preparato mediante policondensazione di glicerolo e acido sebacico, come mostrato in Figura 1.

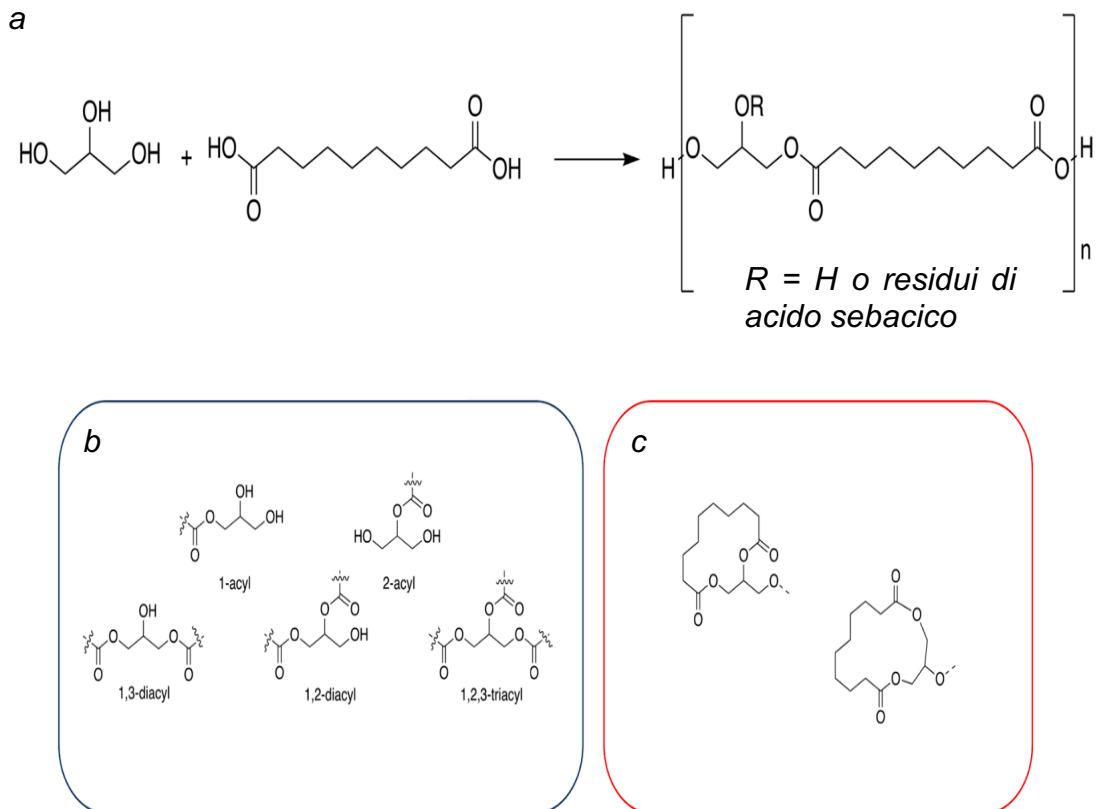


Figura 1. Reazione di pre-polimerizzazione tra glicerolo e acido sebacico e struttura chimica dei pre-PGS (a). Il polimero ottenuto è costituito da gliceridi lineari (b) e in minor quantità da gliceridi ciclizzati (c). Fonte immagine: (5).

I prodotti di degradazione del PGS sono metabolizzati naturalmente nel corpo, i due monomeri che compongono il polimero sono atossici, facilmente

metabolizzabili nell'organismo e inoltre sono stati approvati dalla FDA per l'uso in applicazioni mediche. Il glicerolo è un polialcol e un componente fondamentale di grassi come trigliceridi e fosfolipidi; è anche coinvolto nei processi di glicolisi e gluconeogenesi. L'acido sebacico è un acido dicarbossilico che può essere convertito in acetil-CoA e partecipare al ciclo di Krebs. Il PGS fa parte della famiglia degli elastomeri, è dunque un polimero flessibile in grado di supportare senza rottura grandi deformazioni meccaniche e, in seguito, recuperare quasi completamente la sua forma iniziale. Il polimero è biorassorbibile, quando introdotto nell'organismo umano va incontro a scissione idrolitica dei legami esterei, che ne determina la graduale riduzione di massa con conseguente riduzione progressiva della sua resistenza meccanica (1). Grazie alla sua natura flessibile ed elastomerica il PGS è stato studiato per applicazione nell'ingegneria dei tessuti, in particolare quello cardiovascolare, nervoso, cartilagineo, osseo e corneale. Il PGS può essere sintetizzato modulando le sue proprietà chimico-fisiche, meccaniche, termiche, di biodegradabilità e di biocompatibilità, rendendolo per tanto rilevante nelle applicazioni biomediche (2).

Dal punto di vista delle proprietà meccaniche, il PGS presenta un comportamento di sollecitazione-deformazione non lineare, tipico dei materiali elastomerici morbidi. La natura elastomerica del polimero è dovuta sia dalle interazioni di reticolazione tra glicerolo e acido sebacico, che formano un reticolo tridimensionale, che dai gruppi idrossilici presenti nella molecola che possono dar origine a dei legami idrogeno mostrando un comportamento elastico con un'elevata capacità di recupero dopo deformazioni significative. Variando i parametri di sintesi, come il rapporto tra i monomeri, la temperatura e il tempo di reticolazione, è possibile ottenere moduli di Young compresi tra 0,01 e 5 MPa, un intervallo significativamente più ampio rispetto ad altri materiali simili. Inoltre, possiede proprietà di shape-memory che lo rendono un candidato ideale per dispositivi impiantabili soggetti a stress meccanici (3).

Considerando le proprietà dello stato solido, il PGS è un polimero semicristallino e pertanto presenta una temperatura di transizione vetrosa (T_g) della fase amorfa e una temperatura di fusione (T_m) della fase cristallina

variabili. Difatti, il grado di cristallizzazione del PGS diminuisce significativamente con l'aumentare del tempo e della temperatura di polimerizzazione, mentre la densità di reticolazione aumenta con l'aumentare del tempo e temperatura di polimerizzazione (4).

Il principale meccanismo di degradazione del PGS è l'idrolisi dei legami esteri in cui subisce una degradazione superficiale che prevede una perdita lenta di resistenza meccanica (proprietà di trazione) rispetto alla perdita di massa (per unità di area originale), poiché la perdita di massa cambia in modo lineare nel tempo, si osserva un rigonfiamento rilevabile e una migliore ritenzione geometrica. Il polimero presenta un angolo di contatto acqua-aria di circa 32°, valore comparabile a quello di film piatti di collagene di tipo I (4).

Gli studi sulla degradazione del PGS hanno dimostrato che è difficile correlare il comportamento di degradazione in vitro e in vivo poiché mostra un tasso di degradazione accelerato in vivo rispetto a in vitro. In vitro, dischi di PGS densi sottoposti a 2 giorni di reticolazione a 120 °C e 40 mTorr hanno mostrato una degradazione del $17 \pm 6\%$ dopo 60 giorni di immersione in soluzione PBS a 37 °C mentre in vivo, la degradazione è accelerata dalla presenza di enzimi che catalizzano l'idrolisi dei legami esterei, portando alla completa dissoluzione del materiale entro 60 giorni in modelli sperimentali (3).

La biocompatibilità di PGS dipende da fattori quali morfologia, porosità superficiale, densità, idrofilicità superficiale, ambiente dove è incorporato e i prodotti di degradazione del materiale. Il PGS non è immunogenico ed è stato dimostrato non citotossico in vitro in quanto provoca una risposta infiammatoria minima (3).

Il PGS viene sempre più utilizzato per produrre scaffold o matrici come supporto nell'ingegneria tissutale. Uno scaffold per ingegneria tissutale fornisce supporto di crescita per le cellule, le quali aderiscono su di esso, e ne deve favorirne la crescita, consentendo un'efficace diffusione dei nutrienti e rilascio dei rifiuti. Inoltre, lo scaffold deve degradarsi in modo controllato e graduale, mano a mano che le cellule si espandono e producono nuova matrice cellulare in sostituzione allo scaffold stesso. Di conseguenza, i prodotti

di degradazione del materiale di cui è costituito lo scaffold devono essere ben tollerati dall'organismo ed essere atossici.

Il PGS è stato studiato per svariate applicazioni di ingegneria tissutale. In ambito cardiovascolare è stato impiegato per la produzione di patch cardiaci in grado di fornire cellule cardiache sane e supporto a regioni che hanno subito infarto, nonché per la fabbricazione di protesi vascolari. A livello articolare è stato studiato per la fabbricazione di scaffold per la rigenerazione della cartilagine. In ambito oftalmico è stato impiegato nello sviluppo di membrane ospitanti cellule progenitrici retiniche, mentre a livello neurologico, per la realizzazione di materiali per la ricostruzione neurale. In ambito otologico per la formazione di tappi in grado di fornire protezione e supporto per la rigenerazione del timpano. Infine, è stato studiato l'uso di elastomeri impiegati in dispositivi impiantabili come gli stent in grado di controllare la cinetica di rilascio dei farmaci, regolando parametri come la densità di reticolazione, l'idrofobicità della matrice polimerica e la concentrazione di eccipienti stabilizzanti, e conformarsi a tessuti sottoposti a significative sollecitazioni meccaniche riducendo il rischio di infiammazioni associato alle perturbazioni meccaniche (2–5).

1.2 Sintesi del PGS

La sintesi di PGS avviene tramite una reazione di policondensazione tra i gruppi ossidrilici del glicerolo e i gruppi carbossilici dell'acido sebacico, generando acqua come sottoprodotto, e non presenta reazioni secondarie indesiderate. La sintesi dell'elastomero avviene tipicamente in due fasi. Nella prima fase, nota come fase di pre-polimerizzazione, si ha la reazione dei singoli monomeri a formare singole catene polimeriche. Durante questa fase, si ha un rapido consumo dei monomeri, mentre l'allungamento delle catene avviene più lentamente, tipico delle reazioni di polimerizzazione a stadi. Inizialmente, la reazione procede con una cinetica di primo ordine, caratterizzato da un'elevata mobilità delle specie reattive e da un tasso di conversione elevato; la velocità di reazione è proporzionale alla concentrazione dei monomeri residui.

Con il progredire della reazione, la frequenza di collisione tra le unità attive si riduce progressivamente, portando a una transizione verso un regime in cui la velocità di reazione è governata dalla diffusione. Questo cambiamento comporta un rapido incremento del peso molecolare del polimero. Durante il processo di pre-polimerizzazione, la progressiva crescita delle catene porta ad un aumento della viscosità del sistema, fino a raggiungere il cosiddetto punto di gelazione, oltre il quale la reazione di policondensazione non può progredire. Questo metodo di polimerizzazione a stadi presenta alcuni limiti, tra cui l'aumento dei tempi di reazione, la formazione casuale delle catene, un indice di polidispersività elevato e la sintesi di polimeri con peso molecolare medio generalmente inferiore a 100 kDa. Successivamente, nella seconda fase di sintesi detta di reticolazione, le catene pre-polimerizzate subiscono un'ulteriore reazione di policondensazione, che induce la formazione di legami esterei intercatena tra le unità polimeriche, detti reticolazioni, portando ad una struttura tridimensionale stabile.

Le condizioni di reazione adottate nelle fasi di pre-polimerizzazione e reticolazione influenzano significativamente la struttura e le proprietà finali del polimero. In genere, il glicerolo e l'acido sebacico vengono combinati in rapporto molare 1:1, sebbene siano documentate variazioni nei rapporti stechiometrici. I monomeri vengono miscelati in assenza di solvente e scaldati tra 110 e 130 °C per un periodo compreso tra 24 e 120 ore, mantenendo un'atmosfera inerte per prevenire l'ossidazione dei reagenti e la perdita di glicerolo volatile. Per ridurre i tempi di reazione, possono essere applicate condizioni di vuoto (10–50 mTorr). Durante questa fase, l'acqua prodotta come sottoprodotto viene eliminata tramite condensazione. Sebbene solitamente la sintesi avvenga in assenza di solventi, alcuni studi suggeriscono l'impiego di toluene per controllare la temperatura del sistema. Nella successiva fase reticolazione, il pre-PGS viene sottoposto a temperature comprese tra 120 e 150 °C per 24–96 ore, in condizioni di vuoto (10–100 mTorr), per favorire la reticolazione e la reattività dei gruppi idrossilici secondari.

Una volta reticolato, l'elastomero ottenuto è insolubile in comuni solventi organici come etanolo, isopropanolo, N, N-dimetilformammide, diossano e tetraidrofurano (THF).

Nonostante i vantaggi del metodo classico di sintesi, che assicura un prodotto con elevate proprietà meccaniche, esso presenta alcune limitazioni, tra cui un'elevata richiesta energetica, tempi di reazione prolungati e la necessità di un rigoroso controllo delle condizioni di reazione. Per ovviare a tali problematiche, sono state proposte strategie alternative per la sintesi del PGS, tra cui l'uso della tecnologia a microonde, il fotoindurimento e la sintesi enzimatica. Queste metodologie emergenti consentono di migliorare l'efficienza del processo, riducendo i tempi di polimerizzazione e ottimizzando le caratteristiche chimico-fisiche del prodotto finale.

Una possibile alternativa alla sintesi classica è la sintesi al microonde. Le microonde sono ampiamente utilizzate in sintesi organica poiché sono in grado di accelerare le reazioni chimiche, riducendo sensibilmente il consumo di risorse e il tempo di sintesi. Le microonde sono radiazioni non ionizzanti che senza alterare la struttura elettronica delle molecole, provocano, attraverso l'oscillazione dipolare e la conduzione ionica, un assorbimento selettivo delle radiazioni elettromagnetiche da parte dei gruppi funzionali polari e dalle specie ioniche generando un riscaldamento localizzato ed efficiente senza dispersioni significative di energia nel mezzo circostante. L'impiego di reattori chiusi ermeticamente consente inoltre di ottenere elevate pressioni, favorendo l'accelerazione delle reazioni organiche e limitando la formazione di sottoprodotti indesiderati. La possibilità di operare senza solventi e con un maggiore controllo delle condizioni di reazione rende la sintesi a microonde una tecnica promettente nella sintesi di polimeri biodegradabili. Diversi approcci sperimentali sono stati esplorati per ottimizzare il processo, considerando il rapporto tra i monomeri, le condizioni di reazione e le tecniche di reticolazione.

Aydin et al. hanno condotto una sintesi preliminare di pre-PGS utilizzando un forno a microonde domestico impostato a 650 W. Glicerolo e acido sebacico sono stati riscaldati per 3 minuti con pause di 10 secondi per evitare il

surriscaldamento e la perdita di solvente. Dopo la pre-polimerizzazione, la reticolazione è stata completata in un forno sottovuoto. Le analisi FTIR e H-NMR hanno evidenziato una significativa perdita di glicerolo dovuta all'uso di un reattore aperto, con un rapporto finale tra acido sebacico e glicerolo di 78:22 rispetto alla miscela iniziale 1:1. Questa variazione ha influito sulle proprietà meccaniche del polimero finale, suggerendo la necessità di un controllo accurato del rapporto monomerico (1).

Li et al. hanno approfondito l'effetto della perdita di glicerolo, dimostrando che un'elevata quantità di glicerolo non reagito evapora rapidamente durante la reticolazione sottovuoto, influenzando il grado di esterificazione (DE) e le transizioni di stato del polimero. Hanno concluso che la caratterizzazione del DE è più indicativa della qualità del materiale rispetto alla semplice valutazione della temperatura o del tempo di reazione (2).

Lau et al. hanno proposto un miglioramento del metodo utilizzando un reattore MW a modalità singola per ottenere un'energia più focalizzata. La reazione è stata condotta in presenza di toluene (punto di ebollizione di 110 °C) e acido solforico come catalizzatore, limitando l'evaporazione del glicerolo (punto di ebollizione di 290 °C) e mantenendo la temperatura massima a 130 °C. L'analisi spettroscopica ha rivelato la formazione di prepolimeri ramificati, dovuta all'attivazione dei gruppi -OH primari e secondari del glicerolo, portando a un DE più elevato e tempi di reticolazione ridotti rispetto alla sintesi convenzionale. Tuttavia, l'aumento della ramificazione ha influenzato la rigidità dell'elastomero finale (6).

Infine, Lee et al. hanno applicato l'irradiazione MW per la reticolazione di pre-PGS sintetizzato classicamente, ottenendo scaffold altamente porosi per applicazioni di ingegneria tissutale. Il pre-polimero è stato dissolto in THF e caricato in stampi tubolari composti da granuli di NaCl. Dopo l'evaporazione del solvente, la reticolazione è stata effettuata per 3 ore in un reattore MW a temperature comprese tra 120 e 170 °C. La successiva lisciviazione del NaCl ha prodotto strutture porose con proprietà meccaniche e biocompatibilità simili a quelle del PGS reticolato in forno sottovuoto a 150 °C per 24 ore (7).

Questi studi sperimentali hanno dimostrato che l'irraggiamento a microonde accelera la pre-polimerizzazione e la reticolazione, favorendo la formazione di polimeri con un grado di esterificazione più elevato e riducendo la perdita di glicerolo durante il processo. Pertanto, un'accurata ottimizzazione delle condizioni di reazione è necessaria per garantire la riproducibilità del processo e ottenere materiali con caratteristiche desiderate (8).

1.3 DOE

Il Design of Experiments (DOE) rappresenta una metodologia statistica avanzata che permette di ottimizzare gli esperimenti, riducendo il numero di prove necessarie e migliorando la qualità dei dati raccolti (9). L'origine del DOE risale agli anni '20 e '30, quando Ronald A. Fisher, analizzando dati sperimentali nel settore agricolo, sviluppò i principi fondamentali della randomizzazione e della replicazione. Oggi, l'approccio DOE è ampiamente utilizzato in molteplici settori, dalla chimica all'industria farmaceutica e alimentare, contribuendo in modo significativo all'ottimizzazione dei processi produttivi e alla ricerca scientifica (10).

Un concetto chiave nel DOE è l'identificazione dei Parametri Critici di Processo (Critical Process Parameters - CPPs) e dei parametri Critici di Qualità (Critical Quality Attributes - CQAs). I CPPs rappresentano le variabili indipendenti che influenzano significativamente l'output di un processo e possono essere quantitativi, come temperatura, concentrazione o portata, oppure qualitativi, come il tipo di polimero o la natura del solvente. Alcuni di questi parametri possono essere controllati direttamente, mentre altri, come la variabilità del lotto di una sostanza chimica, rappresentano fattori di disturbo (Noise Factors, NFs).

Gli Attributi Critici di Qualità (CQAs), invece, rappresentano gli output misurabili del processo, come la dimensione delle particelle, la distribuzione granulometrica o l'efficienza di incapsulamento. L'interpolazione matematica tra CPPs e CQAs avviene tramite modelli statistici, che consentono di predire il comportamento del sistema in base ai parametri di ingresso (11,12).

Principalmente questa metodologia si basa su quattro concetti fondamentali che ne determinano la validità sperimentale: replicazione, randomizzazione, blocco e unità sperimentali.

La replicazione consente di ridurre la variabilità sperimentale e aumentare la precisione statistica. Può avvenire a livello di unità sperimentale, dell'esperimento intero, campionamento o misure ripetute.

La Randomizzazione riduce il rischio di bias distribuendo casualmente gli esperimenti, minimizzando gli effetti di fattori non controllabili.

Il Blocco crea gruppi di unità sperimentali omogenei per migliorare la sensibilità dei test statistici. È utile quando i trattamenti richiedono aree sperimentali diverse.

Le Unità sperimentali definiscono la scala dell'esperimento e stabiliscono il livello appropriato di replicazione per garantire risultati affidabili.

Quindi una corretta applicazione di questi principi è essenziale per ottenere dati significativi e migliorare la qualità delle analisi sperimentali (13).

In pratica l'esecuzione di un esperimento DOE segue un percorso ben strutturato.

Inizialmente, si definiscono il problema e gli obiettivi, individuando i parametri di processo (CPPs) e di qualità (CQAs) da analizzare. Successivamente si procede alla selezione del disegno sperimentale, fase cruciale perché determina la qualità delle informazioni ottenibili, optando per disegni fattoriali completi, frazionari, Response Surface Methodology (RSM) o piani ottimali a seconda del numero di variabili e delle risorse disponibili.

La fase di blocking e randomizzazione, per minimizzare gli effetti di disturbo, gli esperimenti vengono randomizzati e, se necessario, suddivisi in blocchi per mantenere l'omogeneità del campione riducendo gli effetti del rumore sperimentale.

Gli esperimenti vengono poi condotti secondo protocolli standardizzati per assicurare riproducibilità e precisione nei dati raccolti, documentando eventuali anomalie o discrepanze nei risultati.

Dopo l'acquisizione dei dati, vengono applicate tecniche statistiche per modellizzare l'effetto dei parametri di processo sui parametri di qualità. Infine,

attraverso la fase di ottimizzazione e validazione, sulla base dei modelli ottenuti, si determinano le condizioni ottimali per il processo e si eseguono esperimenti di conferma per validare i risultati. Questa fase consente di adattare il modello alle condizioni reali di produzione (12).

Grazie a questa metodologia, è possibile quindi identificare rapidamente i parametri più influenti e determinare la loro significatività, garantendo così una maggiore efficienza nella ricerca e sviluppo di nuovi prodotti e processi. L'applicazione del DOE inoltre consente di eseguire studi di screening, caratterizzazione, ottimizzazione e validazione dei test, migliorando la comprensione dei fenomeni studiati e facilitando decisioni basate su dati statistici solidi e affermandosi quindi come uno strumento indispensabile per migliorare l'efficienza della ricerca, ridurre i costi e garantire una maggiore riproducibilità degli esperimenti (9).

2. Scopo del lavoro

Lo scopo di questa tesi sperimentale è la sintesi di un biopolimero innovativo a base di poliglicerol sebacato (PGS) da impiegare in ambito farmaceutico, costituito da acido sebacico e da polialcoli come estensori di catena. L'obiettivo principale è quello di applicare la sintesi una tecnologia di sintesi a microonde e di ottimizzarla attraverso un approccio statistico basato sul Design of Experiments (DOE), che permette di valutare al contempo l'effetto di parametri critici di processo quali temperatura, tempo di reazione, rapporto molare tra i reagenti e tipologia di polialcol. L'impiego del DOE permette di identificare in maniera efficiente i parametri che influenzano significativamente le proprietà del polimero. La caratterizzazione mediante GPC ha permesso di valutare l'efficacia della sintesi e l'influenza dei parametri sperimentali sulla struttura del polimero. In definitiva, l'obiettivo è quello di individuare le condizioni operative ottimali per ottenere un biopolimero con proprietà controllate, potenzialmente impiegabile per la fabbricazione di dispositivi biomedici.

3. Materiali e Metodi

3.1 Materiali

Acido dodecanoico (acido sebacico CAS 111-20-6 Fluorochem Hadfield UK), polietilenglicole (PEG CAS 25322-68-3 Thermo Scientific Kandel Germany), pluronic_L31 o PEG-PPG-PEG (Poli(etilenglicole)-block-poli(propilenglicole)-block-poli(etilenglicole) CAS 9003-11-6 Sigma Aldrich St. Louis USA), politetraidrofurano (PTMEG CAS 25190-06-1 Sigma Aldrich Schnelldorf Germany).

Tetraidrofurano stabilizzato BHT (THF CAS 109-99-9 Carlo Erba Val De Reuil Cedex France) come fase mobile nelle analisi GPC. Come solvente per la reazione di sintesi, è stato utilizzato THF non stabilizzato ridistillato.

Mentre solfato di sodio anidro (Na_2SO_4 CAS 7757-82-6 Sigma Aldrich St. Louis USA), cloruro di sodio (NaCl) acido cloridrico 37% (HCl CAS 7647-01-0 Carlo Erba Val De Reuil France) e bicarbonato di sodio (NaHCO_3 CAS 144-55-8 Sigma Aldrich St. Louis USA) per il processo di purificazione del prodotto.

Infine, acido Solforico 95-97% (H_2SO_4 CAS 7664-93-9 Sigma Aldrich Milano IT) come catalizzatore della reazione di sintesi.

3.2 Metodi

3.2.1 DOE

Per la selezione degli estensori di catena più adatti alla sintesi del polimero (Figura 2), è stata condotta una ricerca bibliografica approfondita al fine di identificare una serie di polialcoli con le proprietà più adeguate.

Per ottimizzare il processo di selezione e ridurre il numero di esperimenti necessari, sia in termini di tempo che di costi, è stato impiegato il Design of Experiments (DOE), consentendo di pianificare gli esperimenti in modo efficiente e sistematico, riducendo al minimo la variabilità e migliorando la comprensione dell'effetto dei diversi parametri sperimentali.

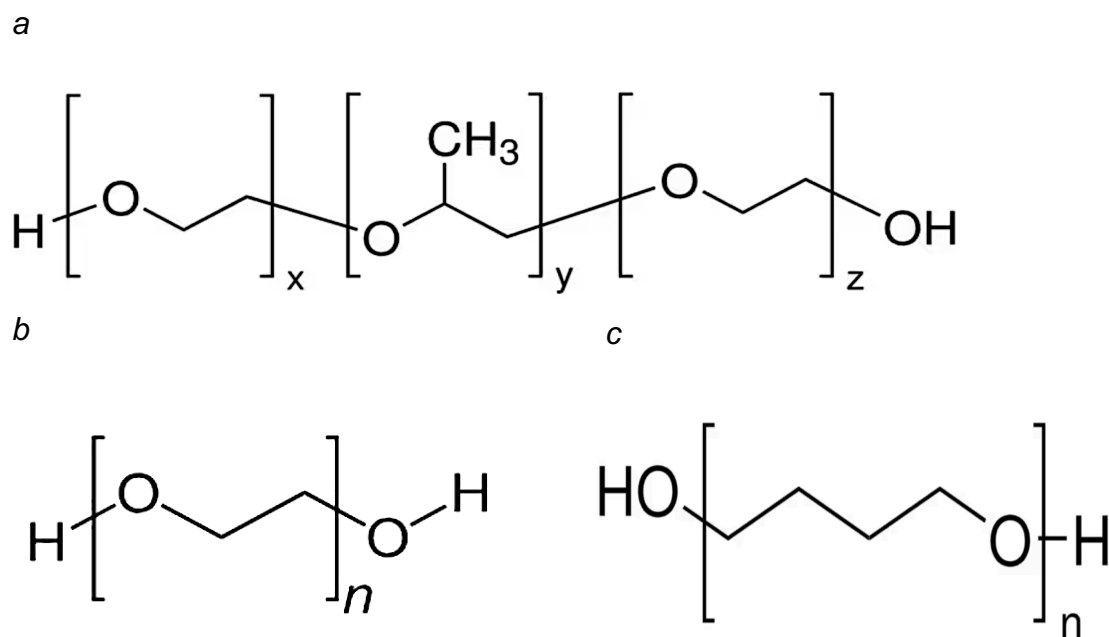


Figura 2. Polialcol presi in esame per il design of experiment (DOE):
a) Pluronic_L31 (PEG-PPG-PEG); b) PEG (Polietilenglicole);
c) PTMEG (Politetraidrofurano).

Il software utilizzato per la messa a punto del DOE e l'analisi statistica è stato Statgraphics 19 Centurions (Statgraphics Technologies, Inc. Virginia USA), attraverso l'applicazione di un modello matematico quadratico adatto sia a procedure di screening, che di ottimizzazione (14). Questo approccio ha permesso di valutare simultaneamente più variabili sperimentali e di individuare la combinazione ottimale di parametri per massimizzare le proprietà desiderate del polimero.

Nella prima fase, sono state definite le risposte sperimentali, ovvero le caratteristiche chiave del polimero da ottimizzare. In particolare, si è fatto riferimento alla massa molecolare (MW) e all'indice di polidispersività (PDI), e per ciascuna di esse, sono stati stabiliti specifici intervalli di riferimento con limiti massimi e minimi, in modo da poter confrontare i risultati sperimentali con valori target ben definiti. Successivamente, nella seconda fase, sono stati selezionati i fattori sperimentali, ossia le variabili indipendenti in grado di influenzare la sintesi del polimero. Tra questi, la temperatura di reazione è stata impostata in un intervallo compreso tra 120°C e 180°C, il tempo di

reazione è stato impostato tra un minimo di 10 e un massimo di 60 minuti, mentre il rapporto molare tra il polialcol e l'acido sebacico è stato regolato tra 0,5 e 1 ed infine la scelta del tipo di polialcol utilizzato come estensore di catena. Sono stati selezionati tre diversi polialcoli, tra cui il politetraidrofurano (PTMEG) con MW di 3096 Da, MN di 1882 Da e PDI di 1,65, il Pluronic_L31 con MW di 1659 Da, MN di 1579 Da e PDI di 1,05, infine il polietilenglicole (PEG) con MW di 1239 Da, MN di 1174 Da e PDI di 1,06.

Dopo aver definito questi parametri e i loro limiti massimi e minimi, siccome il modello utilizzato è il Response surface methodology (RSM), il sistema identifica automaticamente tre livelli (-1; 0; +1) e con l'aggiunta di tre punti centrali otteniamo una stima più precisa della variabilità del sistema, permettendo di verificare la riproducibilità dell'esperimento e migliorando l'accuratezza nella determinazione degli effetti quadratici. In questo modo, il modello ottenuto non solo descrive meglio il comportamento del sistema, ma permette anche di identificare le condizioni ottimali con maggior attendibilità, evitando errori derivanti da un'errata interpretazione dei dati sperimentali (11). Il software dopodiché genera automaticamente una tabella sperimentale, come mostrato nella Figura 3, contenente un set di condizioni operative distribuite in modo casuale. La randomizzazione permette di minimizzare gli effetti sistematici e di ottenere un'analisi statistica più affidabile, riducendo al minimo eventuali bias sperimentali (13). Trattandosi di un DOE di screening, è stato possibile effettuare un'unica replica sperimentale, perché il suo obiettivo principale è identificare rapidamente i fattori più influenti senza la necessità di modellare nel dettaglio tutte le possibili interazioni permettendo una riduzione degli esperimenti, una semplificazione del modello e l'applicazione di strumenti statistici avanzati, che permettono di ottenere risultati affidabili con il minimo dispendio di risorse (10,11). Una volta completata l'esecuzione degli esperimenti, i dati ottenuti sono stati inseriti nel foglio di lavoro del software per consentire la modellazione statistica dei risultati.

Esperimento n.	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Molar ratio (X:S)	Diol type
1	180	60	0,5	PTMEG
2	150	35	0,75	Pluronic-L31
3	180	10	1	Pluronic-L31
4	120	60	0,5	Pluronic-L31
5	180	35	0,5	Pluronic-L31
6	150	35	0,75	PTMEG
7	120	60	0,75	PTMEG
8	150	60	1	Pluronic-L31
9	120	60	1	PEG
10	120	60	0,5	PEG
11	120	10	0,75	Pluronic-L31
12	120	10	0,5	PTMEG
13	180	10	0,75	PTMEG
14	120	60	0,5	Pluronic-L31
15	150	35	0,75	PEG
16	135	10	1	PEG
17	180	35	1	PEG
18	180	60	1	PTMEG
19	180	60	0,75	Pluronic-L31
20	180	60	1	PTMEG
21	120	10	1	PTMEG
22	120	35	1	Pluronic-L31
23	120	10	0,5	PEG
24	180	10	1	Pluronic-L31
25	180	60	0,5	PEG
26	180	10	0,5	PEG
27	150	10	0,5	Pluronic-L31

Figura 3. Tabella degli esperimenti da effettuare generata dal DOE.

L'analisi dei dati ha permesso di identificare il miglior set di condizioni sperimentali per la sintesi del biopolimero, fornendo indicazioni precise su quale fosse l'approccio più efficace per ottenere il materiale con le proprietà desiderate. Per effettuare questo tipo di analisi è stata effettuata la lettura del diagramma di Pareto (Pareto chart), per individuare i parametri statisticamente

significativi in un esperimento, e del diagramma delle risposte superficiali (Response Surface chart) per rappresentare come la risposta varia al variare dei livelli dei parametri, facilitando l'identificazione delle condizioni ottimali per la risposta desiderata (15).

3.2.2 Sintesi

Per la sintesi del polimero, i reagenti principali sono stati il polialcol come estensore di catena e l'acido sebacico per la formazione del legame polimerico. L'acido sebacico (MW 202,25 Da) è stato pesato con una bilancia analitica (Entris, Sartorius, Otto-Brenner-Straße 20 37079 Göttingen, Germany) all'interno di un vial di vetro e, successivamente, il polialcol è stato pesato nello stesso vial, rispettando il rapporto molare stabilito dal Design of Experiment (DOE). Per migliorare la loro miscelazione, i due componenti sono stati portati alla loro temperatura di fusione mediante una pistola termica e omogeneizzati allo stato fuso tramite agitazione con vortex. Infine, il vial è stato sigillato ermeticamente per garantire delle condizioni di reazione controllate durante l'andamento della reazione.

Successivamente, il vial sigillato è stato inserito all'interno di un reattore a microonde (Biotage Initiator+), dove sono state impostate le condizioni di temperatura e tempo secondo i parametri definiti dal DOE, consentendo un controllo preciso delle variabili di reazione per ottimizzare il processo di sintesi. Per migliorare l'efficienza della reazione e ottimizzare la resa del prodotto, sono stati preventivamente testati diversi parametri, tra cui l'impiego di acido solforico (H_2SO_4) come catalizzatore per favorire la reazione, e l'utilizzo di tetraidrofurano (THF) come solvente per migliorare l'interazione tra i reagenti e tenere bassa la viscosità della reazione. Questo ha permesso un miglior controllo sulla reazione e sulla resa finale del prodotto sintetizzato.

3.2.3 Purificazione

Una volta terminata la reazione, è stato necessario effettuare un processo di purificazione del campione al fine di eliminare eventuali residui di reagenti e catalizzatore, che potrebbero interferire nelle successive fasi di caratterizzazione del polimero. Per ottenere un prodotto purificato, è stata

impiegata una strategia di estrazione con solvente, metodo ampiamente utilizzato per la separazione selettiva di componenti mediante la loro diversa solubilità tra una fase organica e una fase acquosa.

Il campione è stato trasferito con cura in un imbuto separatore, assicurandosi che l'intero prodotto fosse completamente solubilizzato nella fase organica (THF). L'estrazione è poi stata condotta in più passaggi per garantire la massima efficienza. Nel primo passaggio, è stata aggiunta alla miscela una fase acquosa costituita da acqua basificata, ovvero preparata utilizzando bicarbonato (HCO_3^-) saturato con sodio cloruro (NaCl). Questa prima estrazione ha permesso di neutralizzare eventuali residui acido solforico e di estrarre dalla fase organica acido sebacico non reagito. Dopo aver agitato delicatamente l'imbuto separatore per consentire una buona miscelazione tra le due fasi, il sistema è stato lasciato decantare per permettere una chiara separazione tra la fase acquosa e quella organica nell'imbuto separatore, dopodiché la fase acquosa è stata rimossa con cura.

Successivamente, è stata effettuata una seconda estrazione con una soluzione di acido cloridrico (HCl 0.1M) saturato con NaCl . Questo passaggio ha avuto lo scopo di desalificare gruppi carbossilici liberi del polimero. Anche in questo caso, l'imbuto separatore è stato agitato con attenzione per garantire un'adequata interazione tra le fasi prima di procedere alla separazione. Come terzo e ultimo passaggio, è stata impiegata una soluzione satura di NaCl per rimuovere i residui di HCl eventualmente rimasti nella fase organica e migliorare ulteriormente la separazione tra le due fasi per il recupero del prodotto desiderato.

Una volta completata l'estrazione, la fase organica contenente il prodotto principale è stata raccolta in un becher ed è stato aggiunto solfato di sodio anidro (Na_2SO_4), in grado di legare e trattenere l'acqua residua presente nella soluzione.

La miscela è stata lasciata a riposo per alcuni minuti, assicurandosi che il sale assorbisse completamente l'acqua, dopodiché la soluzione è stata sottoposta a filtrazione mediante carta da filtro per separare il sale dal prodotto finale. Il filtrato così ottenuto è stato raccolto in un pallone e sottoposto a evaporazione

del solvente utilizzando un rotavapor (Laborota 4000-efficient Heidolph), permettendo la rimozione del solvente sotto pressione ridotta e favorendo l'ottenimento di un prodotto purificato e privo di residui di solvente.

Tuttavia, questa tecnica di purificazione è stata applicata unicamente ai campioni contenenti Pluronic_L31 e PTMEG, poiché nel caso del PEG si è riscontrato un problema relativo alla sua distribuzione tra le fasi, con una tendenza del prodotto a passare dalla fase organica nella fase acquosa, compromettendo l'efficacia del metodo di estrazione con solvente. Per ovviare a questa problematica, è stata adottata una strategia alternativa basata sull'arresto della reazione (quenching). Questa procedura ha previsto l'aggiunta di idrossido di potassio in polvere (KOH), con lo scopo di neutralizzare i residui di acido solforico e favorire la precipitazione selettiva dell'acido sebacico sotto forma di sale insolubile nella fase organica. In questo modo il polimero è stato isolato eliminando efficacemente il monomero non reagito. La fase organica è stata poi sottoposta a filtrazione ed evaporazione del solvente mediante rotavapor.

3.2.4 Caratterizzazione

Dopo la purificazione del prodotto, la caratterizzazione è stata eseguita mediante cromatografia ad esclusione sterica (Gel Permeation Chromatography, GPC). Questo metodo consente l'analisi delle macromolecole separandole in base alle loro dimensioni, piuttosto che in base alle loro interazioni chimiche con la fase stazionaria. La GPC è ampiamente utilizzata per determinare parametri fondamentali dei polimeri, tra cui la massa molare media numerale (M_n), la massa molare media ponderale (M_w) e l'indice di polidispersività (PDI), parametri cruciali per comprendere la distribuzione delle dimensioni delle catene polimeriche (16).

L'analisi GPC è stata effettuata utilizzando un sistema cromatografico Agilent Infinity (Agilent Technologies Italia S.p.a., Milano, Italia), configurato con una precolonna (C18, Phenomenex A8KJ 04282) e quattro colonne a porosità crescente (Shodex KF-802.5, Agilent PLGEL 500 Å 5µm, Agilent PLGEL 10³ Å 5µm, Phenomenex PHENOGEL 10⁴ Å 5µm), con un flusso costante della fase mobile pari a 0,8 mL/min. La rivelazione è stata effettuata mediante un

rivelatore IR. La fase mobile utilizzata è stata il tetraidrofurano (THF), selezionato per la sua capacità di solubilizzare efficacemente un'ampia gamma di polimeri e garantire una buona separazione cromatografica.

Prima di procedere con l'analisi del campione, è stata costruita una curva di taratura polinomiale di terzo grado utilizzando una serie di standard (Std) in polistirene a massa molare nota: Std 1 (Mw 162 Da Polymer Standards Service), Std 2 (Mw 266 Da Polymer Standards Service), Std 3 (Mw 1430 Da Polymer Laboratories), Std 4 (Mw 2090 Da Polymer Standards Service), Std 5 (Mw 2350 Da Polymer Laboratories), Std 6 (Mw 4460 Da Polymer Laboratories) e Std 7 (Mw 8400 Da Polymer Laboratories). Questi standard sono stati analizzati per ottenere un grafico che correla i tempi di ritenzione con le masse molari di riferimento, cosicché una volta ottenuta la curva di taratura, è stato possibile determinare i parametri caratteristici del campione incognito interpolando i tempi di ritenzione con la curva.

Per garantire un'analisi accurata e riproducibile, il campione purificato è stato solubilizzato in THF ad una concentrazione di 10 mg/mL e filtrato con filtro a siringa a 0,22 μm di porosità.

L'iniezione del campione nella colonna è stata eseguita utilizzando una microsiringa in vetro con punta piatta, assicurandosi che il volume prelevato fosse di almeno 100 μL , ovvero cinque volte superiore al volume del loop di iniezione (20 μL), così da garantire un riempimento completo del loop e prevenire fenomeni di diluizione del campione all'interno del sistema.

Il cromatogramma risultante è stato elaborato e analizzato con il software Cirrus GPC/Multi Detector Software, che ci ha permesso il calcolo dei parametri di interesse, tra cui Mn, Mw e PDI, fondamentali per la caratterizzazione della distribuzione delle masse molecolari del polimero sintetizzato.

4. Risultati e Discussione

4.1 Caratterizzazione del polimero

La cromatografia di permeazione su gel è stata eseguita sulle soluzioni polimeriche ottenute per poter indagare sui parametri come massa molare media numerale (Mn), massa molare media ponderale (Mw) e l'indice di polidispersività (PDI).

L'elaborazione dei dati mediante il software Agilent Cirrus ha permesso di identificare i picchi presenti nel cromatogramma e di assegnare i valori di Mw, Mn e PDI in funzione del tempo di ritenzione.

K 14.1000 Alpha 0.7000

Curve Fit Coefficients: $\text{LogM} = 3.082 + 0.2334 X^1 - 0.008348 X^2 + 6.581e-005 X^3$

Curve Fit Statistics

Residual Sum of Squares: 0.000930004 Corrected Sum of Squares: 2.337

Coefficient of Determination: 0.999602 Standard Y Error Estimate: 0.0176069

Linear Correlation Coefficient: -0.999745

Calibration Details

	RT Corrected [min]	RT Actual [min]	MW	Log MW	Point in Use?	Percent Error	Source Chromatogram	Assigned by User?	Concentration (mg/ml)	Polymer Type	Supplier	Batch Name	User	Residual	Percentage Weight
1	34.3365	34.3365	8400	3.9243	✓	1.0640	imported-011	✓	<Not Set>				GPC	0.00484077	0.000
2	36.6912	36.6912	4460	3.6463	✓	-2.4383	imported-012	✓	<Not Set>				GPC	-0.0104623	0.000
3	39.0016	39.0016	2300	3.3711	✓	-2.9044	imported-011	✓	<Not Set>				GPC	-0.0124041	0.000
4	39.8232	39.8232	2090	3.3201	✓	5.3809	imported-012	✓	<Not Set>				GPC	0.0240007	0.000
5	40.9824	40.9824	1430	3.1553	✓	-0.7046	imported-011	✓	<Not Set>				GPC	-0.00334948	0.000
6	47.1312	47.1312	260	2.4149	✓	-1.4975	imported-011	✓	<Not Set>				GPC	-0.00645541	0.000
7	49.1320	49.1320	162	2.2066	✓	0.8426	imported-012	✓	<Not Set>				GPC	0.00367470	0.000

Details Points

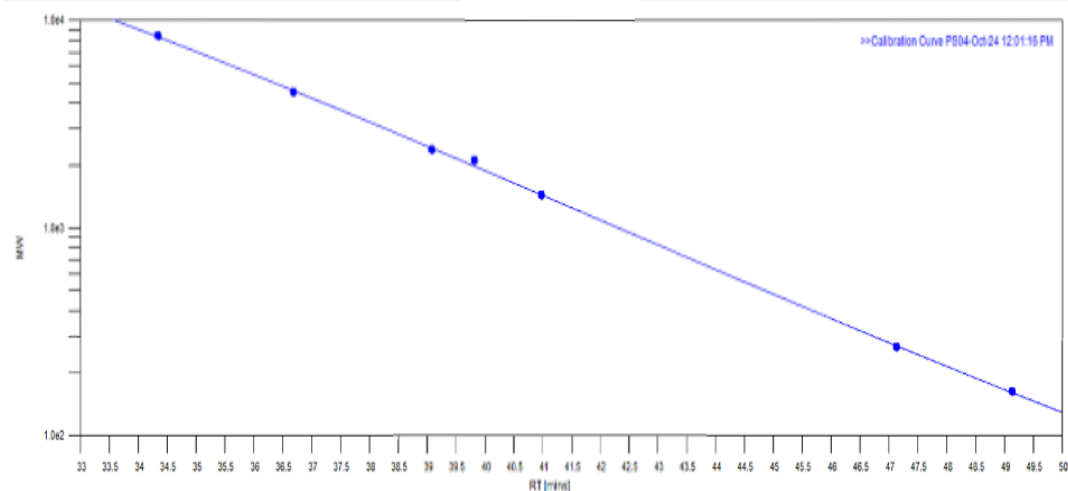


Figura 4. Curva di calibrazione utilizzata in analisi GPC.

Nella Figura 4 viene mostrata la curva di calibrazione generata per le analisi in GPC per stabilire la relazione tra il tempo di ritenzione (RT) e la massa molare (MW) dei polimeri, permettendo di determinare la distribuzione delle masse molari di un campione. Nel grafico, questa relazione è descritta da un'equazione polinomiale di terzo grado, evidenziando che le molecole più grandi eluiscono prima, mentre quelle più piccole vengono trattenute più a lungo nella colonna.

I dati mostrano un'eccellente correlazione tra il tempo di ritenzione e la massa molare, con un coefficiente di determinazione (R^2) pari a 0.9996, segno che il modello di calibrazione è altamente affidabile. Il metodo GPC sfrutta questa calibrazione per convertire i tempi di ritenzione dei campioni analizzati in valori di massa molare, consentendo di calcolare parametri fondamentali come la massa molare media in peso (M_w) e in numero (M_n), oltre alla distribuzione delle masse molari.

La Figura 5a dell'acido Sebacico mostra un singolo picco ben definito con un tempo di ritenzione di 45.67 minuti. I dati ottenuti dalla curva di calibrazione indicano un M_n di 373 Da e un M_w di 380 Da, con un PDI di 1.02.

La Figura 5b del Pluronic-L31 presenta un picco principale con un tempo di ritenzione di 40.49 minuti. L'analisi mostra un M_n di 1576 Da e un M_w di 1656 Da, con un PDI di 1.05.

La Figura 5c del PEG registra un picco principale con un tempo di ritenzione massimo di 41.24 minuti. L'analisi ha fornito un M_n di 1174 Da e un M_w di 1239 Da, con un PDI di 1.0554.

Infine, la Figura 5d del PTMEG presenta un picco principale con un tempo di ritenzione massimo di 38.60 minuti. Dai dati elaborati tramite la curva di calibrazione, si ottiene un M_n di 1888 Da e un M_w di 3113 Da, con un PDI di 1.65, indica una distribuzione più ampia della massa molare rispetto agli altri campioni analizzati, suggerendo una maggiore eterogeneità della popolazione molecolare.

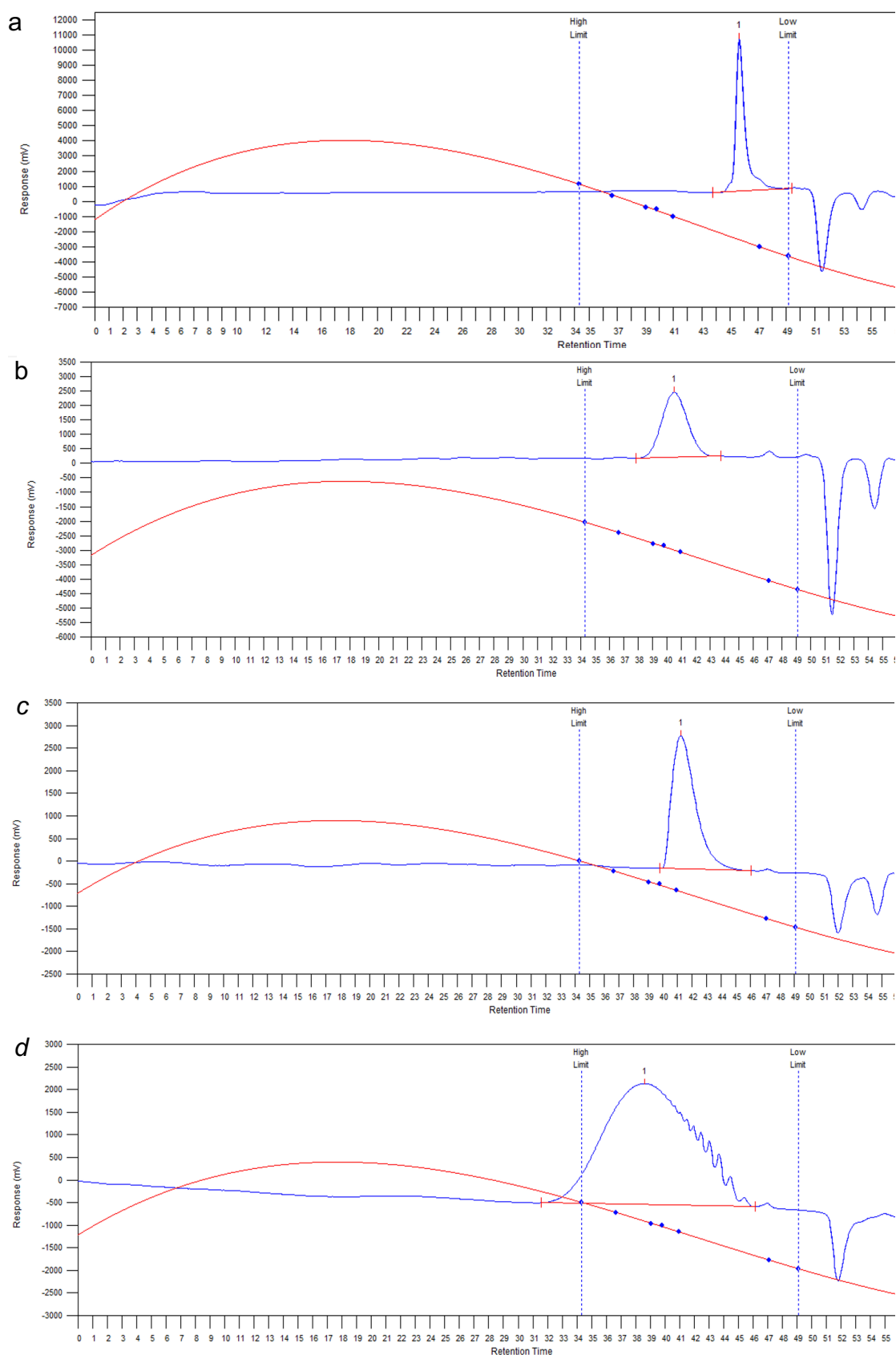


Figura 2. Cromatogrammi dei reagenti utilizzati nel processo di sintesi analizzati mediante GPC ovvero: a) acido sebacico; b) Pluronic_L31; c) PEG; d) PTMEG.

Nella Figura 6a e 6b vengono mostrati degli esempi di cromatogrammi derivanti dalla reazione di acido sebacico con PEG e Pluronic-L31 e che sono risultati in un prodotto. Gli esperimenti che hanno dato un prodotto sono il numero 25 per il PEG e 19 per il Pluronic_L31.

L'analisi del cromatogramma della Figura 6a inerente al PEG mostra la presenza di due distinti segnali cromatografici, indicando la coesistenza di due specie molecolari con differenti tempi di ritenzione. Il primo picco, con un tempo di ritenzione di 37.61 minuti, corrisponde a una frazione molecolare che interagisce meno con la fase stazionaria della colonna cromatografica, suggerendo una dimensione maggiore. Il secondo picco, caratterizzato da un tempo di ritenzione di 40,09 minuti, indica invece una specie di dimensione inferiore, che viene trattenuta più a lungo nella matrice porosa della colonna prima di essere rilevata.

Anche nel cromatogramma della Figura 6b inerente al Pluronic_L31, emergono due segnali distinti, suggerendo la presenza di due specie molecolari con differenti tempi di ritenzione. Il primo picco, con un tempo di ritenzione di 37.07 minuti, rappresenta la frazione molecolare di dimensioni maggiori, con minore interazione con la fase stazionaria. Il secondo picco, con un tempo di ritenzione di 39,85 minuti, corrisponde invece a una specie più piccola, che viene trattenuta più a lungo nella colonna prima di essere rivelata. Dai dati elaborati tramite la curva di calibrazione, si è ottenuto per l'esperimento 25 un valore di M_n di 3876 Da, M_w di 4019 Da e PDI di 1.04, mentre per l'esperimento 19 si è ottenuto un valore di M_n di 4321 Da, M_w di 4433 Da e PDI di 1.03.

L'indice di polidispersività ottenuto in entrambi gli esperimenti si è rivelato prossimo a 1, pur non raggiungendo esattamente tale valore confermando che all'interno di ogni frazione esistono catene polimeriche con leggere variazioni nella massa molare, suggerendo un certo grado di eterogeneità molecolare nel materiale ottenuto (17).

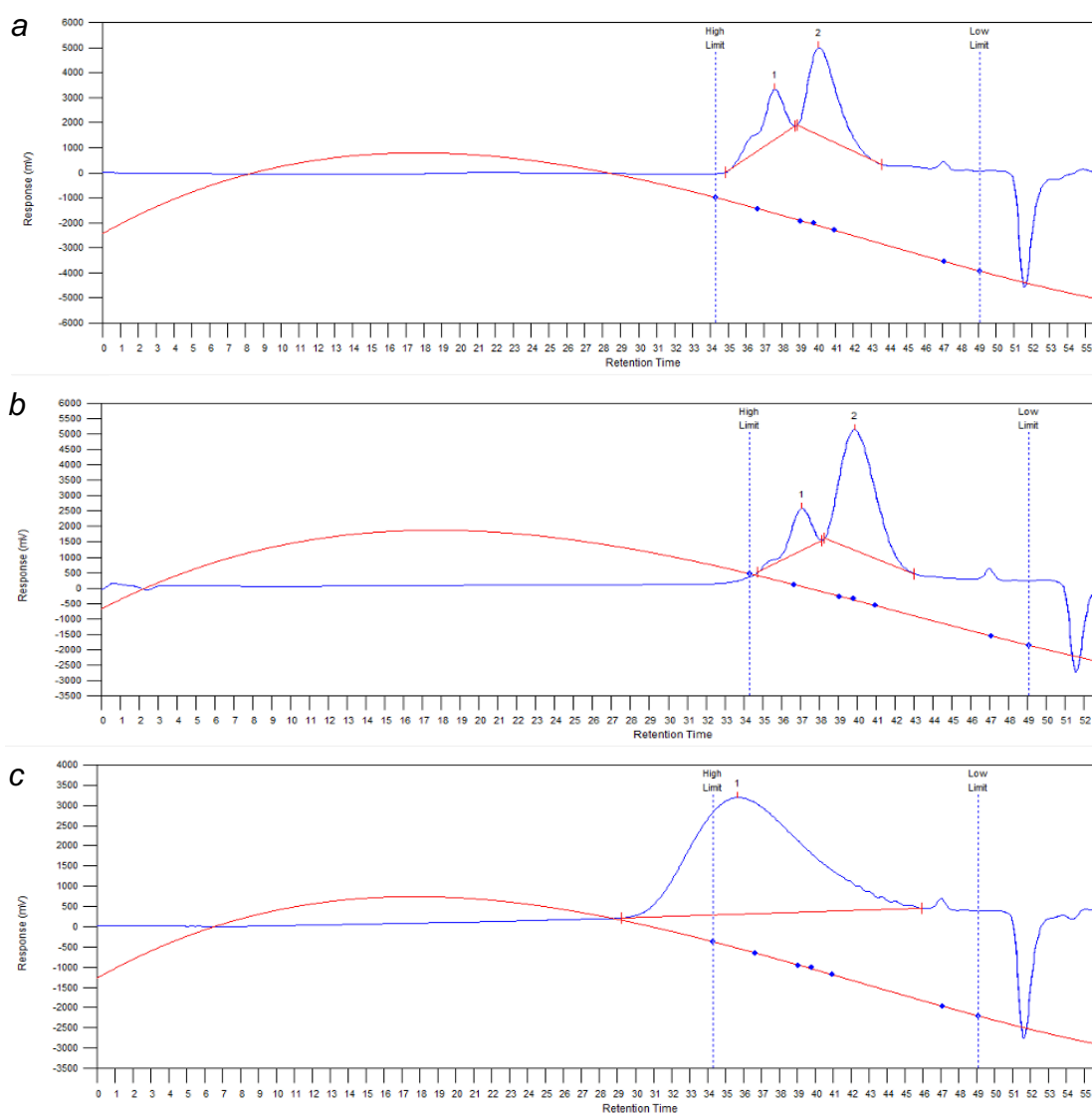


Figura 6. Cromatogrammi degli esperimenti che hanno reagito generato un prodotto: a) PEG EXP 25; b) Pluronic_L31 EXP 19; c) PTMEG EXP 18.

L'analisi sperimentale supporta l'ipotesi che il primo picco osservato nel cromatogramma corrisponda alla nuova struttura polimerica formata in seguito alla reazione tra il polialcol e l'acido sebacico. Tale assegnazione è stata convalidata dal confronto dei tempi di ritenzione con quelli dei reattivi di partenza, i cui cromatogrammi di riferimento sono stati acquisiti separatamente. Per ottenere una caratterizzazione più precisa, i tempi di ritenzione misurati sono stati convertiti in valori di massa molecolare mediante la curva di calibrazione, consentendo di determinare con maggiore affidabilità la distribuzione delle specie molecolari nei campioni analizzati, confermando

la formazione del prodotto polimerico atteso e la presenza di frazioni non completamente reagite.

Il confronto tra le percentuali delle aree dei due segnali evidenzia che la componente relativa ai reagenti è ancora dominante, indicando che la conversione del materiale di partenza nel polimero finale non è ancora completa o che la purificazione del prodotto non ha rimosso completamente i residui della reazione. Questa evidenza sperimentale suggerisce che le condizioni di reazione adottate possano necessitare di ulteriori ottimizzazioni per garantire una maggiore efficienza nella formazione del prodotto desiderato.

Nella Figura 6c viene mostrato l'esempio di un cromatogramma derivante dalla reazione di acido sebacoico con PTMEG come polialcol e che ha dato un prodotto nell'esperimento 18. Qui si evidenzia un unico picco con un tempo di ritenzione a 35.66 minuti. I dati ottenuti ed elaborati mediante la curva di calibrazione, hanno evidenziato un M_n di 3346 Da, un M_w di 5986 Da e un PDI di 1.79. L'assenza di una chiara separazione tra più picchi indica che il sistema cromatografico non è riuscito a discriminare nettamente tra eventuali sottopopolazioni presenti nel campione. Tuttavia, il fatto che l'analisi mostri un singolo picco e non una chiara separazione tra il prodotto di reazione e il reagente residuo lascia spazio a due possibili interpretazioni. La prima possibilità è che la reazione abbia generato un polimero con una distribuzione di pesi molecolari relativamente ampia, che si sovrappone parzialmente alla distribuzione del reagente, portando così a una risposta cromatografica che appare come un singolo segnale piuttosto che due picchi distinti. La seconda possibilità è che la separazione ottenuta dalla colonna non sia stata sufficiente a distinguere completamente il prodotto di reazione dai residui del reagente, generando un picco unico che rappresenta una media delle specie presenti. Dalle analisi dell'esperimento 18 risulta che il tempo di ritenzione più basso rispetto al reagente puro è coerente con la formazione di una struttura polimerica, che avendo un peso molecolare maggiore e quindi una minore capacità di diffondersi nei pori della colonna, eluisce prima, le masse molecolari mostrano valori significativamente più alti rispetto a quelli attesi per

il reagente puro, rafforzando l'ipotesi della formazione del polimero e la polidispersività relativamente elevata rispetto ai precedenti cromatogrammi suggerisce inoltre che il campione non sia costituito da un'unica specie ben definita, ma piuttosto da una miscela di strutture con differenti pesi molecolari.

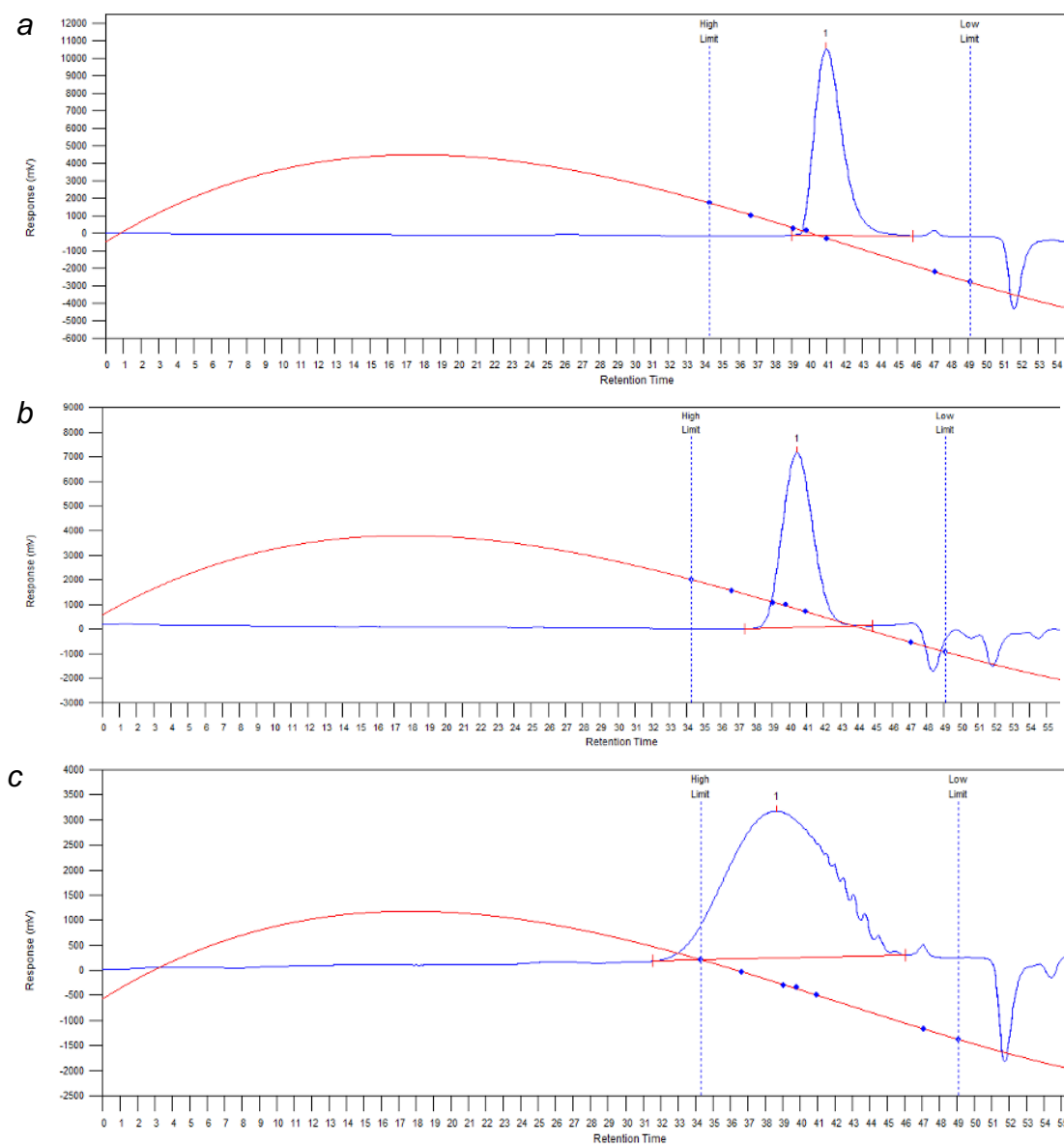


Figura 7. Cromatogrammi degli esperimenti che non hanno generato un prodotto: a) PEG EXP 16; b) Pluronic_L31 EXP 4; c) PTMEG EXP 12.

L'interpretazione complessiva dei dati suggerisce che il sistema stia effettivamente contenendo una frazione polimerica, ma che la separazione

cromatografica ottenuta non sia sufficientemente risolutiva per distinguere con chiarezza il prodotto dal reagente residuo. Questo implica che, pur avendo ottenuto una reazione di polimerizzazione, è necessario ottimizzare ulteriormente le condizioni di analisi per migliorare la separazione e poter caratterizzare con maggiore precisione il campione.

Mentre nella Figura 7 vengono mostrati i cromatogrammi degli esperimenti che non hanno portato ad alcun prodotto reazione, tra cui l'esperimento 16 per il PEG, l'esperimento 4 per il Pluronic_L31 e l'esperimento 12 per il PTMEG. Qui possiamo notare che vi è l'eluizione di un'unica specie e questa non presenta alcuna variazione nel tempo di ritenzione rispetto ai polialcoli di partenza, indicando che di fatto le condizioni sperimentali applicate nei suddetti esperimenti non hanno portato ad alcun prodotto.

4.2 Analisi dati DOE

I valori di MW, Mn e PDI ottenuti per ciascun esperimento sono stati caricati nel software Statgraphics per consentirne l'analisi statistica e la loro modellazione secondo il modello quadratico applicato per configurare il DOE. Al termine dell'analisi sono stati ottenuti per ciascuna risposta studiata due grafici, il diagramma di Pareto e il diagramma delle superfici di risposta (Response Surface Chart).

Il diagramma di Pareto rappresenta uno strumento fondamentale per l'analisi dell'influenza delle CPP su una determinata risposta sperimentale, fornendo una chiara visualizzazione della loro importanza relativa. L'obiettivo principale di questo tipo di rappresentazione è identificare le CPP che contribuiscono maggiormente alla CPP del sistema, consentendo di focalizzare l'attenzione su quelle più critiche (15).

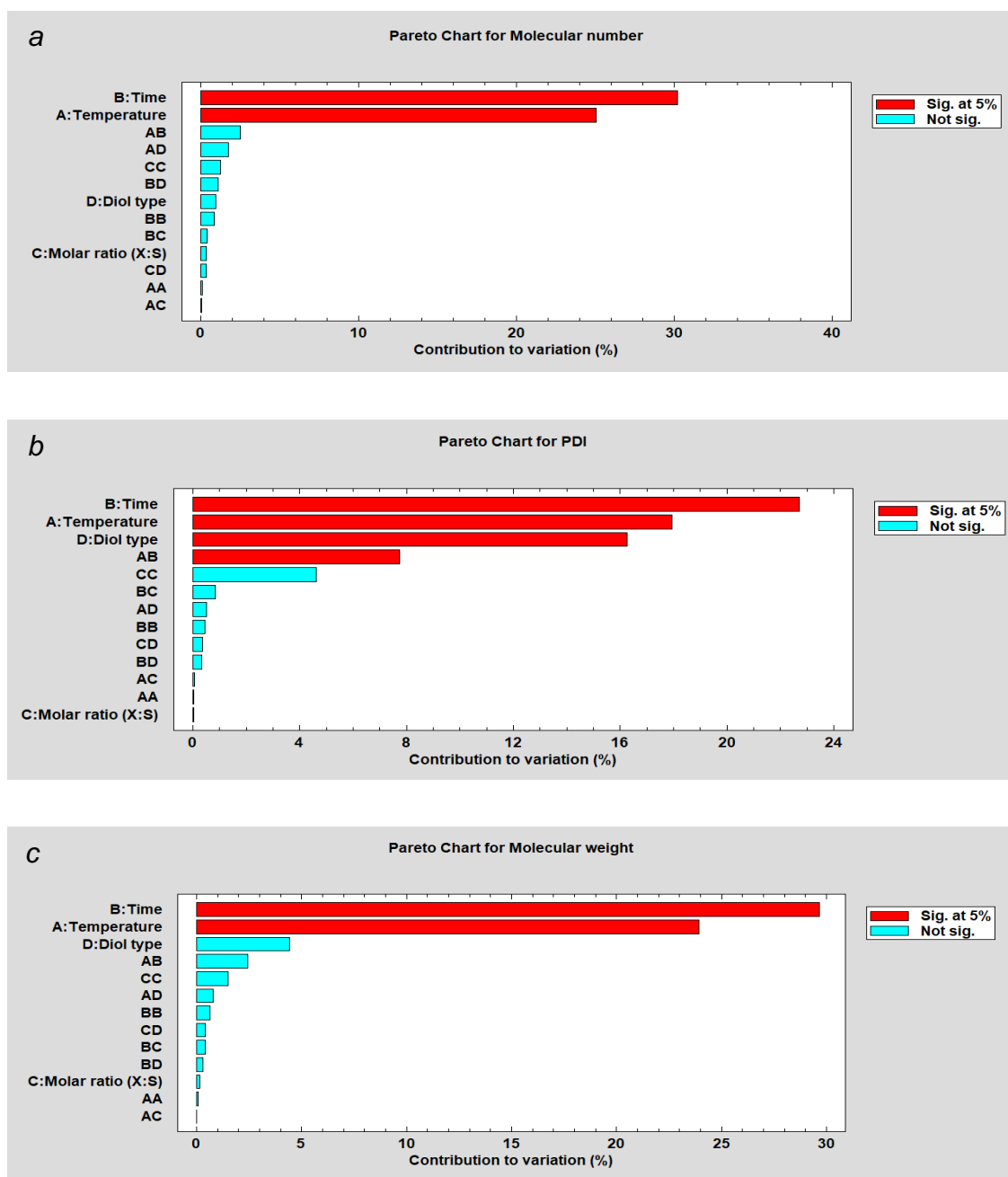


Figura 8. Diagrammi di Pareto indicanti i parametri significativi al 5% (in rosso) e non significativi (in azzurro) relativi a: a) Massa molecolare media numerale (M_n); b) Indice di polidispersività (PDI); c) Massa molecolare media (M_w).

Nella Figura 8 vengono mostrati i tre diagrammi di Pareto relative ai CQAs studiati, ovvero M_n , M_w e PDI. La disposizione decrescente delle barre mostra il peso relativo di ciascuna variabile sulla risposta misurata, mentre la

distinzione cromatica tra le barre evidenzia quali parametri abbiano un effetto statisticamente significativo al 5% e quali, invece, abbiano un impatto marginale o trascurabile.

Dalla Figura 8a relativo alla massa molecolare media numerale (M_n), emerge che il tempo di reazione e la temperatura sono gli unici due CPP con un impatto statisticamente significativo al 5%, e quindi modificazioni in questi parametri influenzano in modo determinante il valore dell' M_n misurato tramite GPC. Il tempo di reazione è il fattore predominante, con il contributo più elevato alla variabilità del sistema. Un aumento del tempo consente una maggiore estensione della polimerizzazione, favorendo la crescita delle catene polimeriche e, di conseguenza, un incremento dell' M_n (18). Tuttavia, tempi eccessivamente lunghi possono portare a fenomeni di degradazione o reticolazione indesiderata, che possono influenzare negativamente la distribuzione dei pesi molecolari (18). La temperatura di reazione rappresenta la seconda variabile più influente. Di fatto essa influenza direttamente la cinetica della reazione e la mobilità delle specie reattive. Un aumento della temperatura accelera il processo di polimerizzazione, portando a una maggiore conversione dei monomeri e a un aumento della lunghezza media delle catene (18). Tuttavia, temperature troppo elevate possono indurre la decomposizione termica di alcune componenti, alterando la distribuzione dei pesi molecolari e portando a una riduzione della selettività della reazione (18). Oltre al tempo e alla temperatura, il diagramma di Pareto mostra anche l'effetto delle altre CPP ovvero rapporto tra i reattivi e tipo di polialcol, sebbene esse siano trascurabili sulla risposta sperimentale M_n . Inoltre, non sono emerse interazioni tra CPP significativamente favorevoli alla risposta studiata.

Nella Figura 8b viene riportato il diagramma di Pareto relativo al PDI, da cui emerge che il tempo di reazione, la temperatura e il tipo di diolo utilizzato nella sintesi sono i CPP predominanti che risultano statisticamente significativi al 5% nel determinare la variazione il PDI.

Il tempo di reazione ha il contributo più elevato alla variazione del PDI, suggerendo che una polimerizzazione più lunga tenda ad ampliare la distribuzione dei pesi molecolari.

La temperatura è il secondo CPP più influente e ha un impatto diretto sulla cinetica della reazione. Un aumento della temperatura accelera il processo di polimerizzazione, portando a una maggiore variabilità nella crescita delle catene polimeriche e, di conseguenza, a un incremento del PDI.

Invece il tipo di diolo utilizzato nella sintesi emerge come un altro CPP significativo che influenza direttamente la reattività del sistema e la capacità del polimero di formare una struttura con una distribuzione di pesi molecolari controllata. Alcuni polialcoli possono promuovere una crescita più uniforme delle catene polimeriche, riducendo la polidispersività, mentre altri possono portare a una distribuzione più ampia, incrementando il PDI.

Un altro aspetto rilevante dell'analisi è la presenza di una combinazione di CPP statisticamente significativa, in particolare l'interazione AB, che rappresenta l'effetto combinato del tempo di reazione e della temperatura. Questo risultato suggerisce che, a differenza delle altre risposte analizzate, la variazione del PDI non è semplicemente determinata dall'azione indipendente di ciascun CPP, ma che esiste un'interazione tra tempo e temperatura che amplifica o modifica l'effetto sulla polidispersività. Perciò la regolazione di tempo e temperatura non può essere effettuata in modo indipendente, ma deve considerare il loro effetto combinato per garantire un controllo efficace sulla distribuzione delle masse molecolari. Invece l'analisi delle altre combinazioni di parametri mostra che queste interazioni hanno un contributo minore e non risultano statisticamente significative.

L'integrazione di questi dati con le analisi GPC fornisce un quadro chiaro dei parametri responsabili delle variazioni osservate nella distribuzione delle masse molecolari. Il fatto che il PDI sia influenzato in modo significativo sia dai CPP (tempo, temperatura, tipo di diolo) sia dalla loro combinazione (AB) implica che il controllo della polidispersività richiede un approccio bilanciato, in cui le condizioni sperimentali devono essere regolate tenendo conto non solo degli effetti individuali ma anche delle interazioni tra i parametri chiave.

Infine, nella Figura 8c è riportato il diagramma di Pareto relativo al CQA massa molecolare media (M_w). Dall'analisi del diagramma emerge che, anche in questo caso, il tempo di reazione e la temperatura risultano statisticamente

significative al 5%, con il tempo di reazione che dimostra l'impatto più importante, mentre la temperatura rappresenta la seconda variabile più influente. Oltre a questi due CPP, il diagramma di Pareto evidenzia anche l'influenza del tipo di polialcol e il rapporto molare utilizzato nella reazione. Sebbene questi CPP non siano altrettanto impattanti quanto il tempo o la temperatura, essi mostrano comunque un effetto misurabile sulla distribuzione delle masse molecolari.

Il diagramma di Pareto mostra inoltre che altri CPP, come il rapporto molare tra i reagenti, ha un impatto molto ridotto sulla variazione del Mw. Ciò indica che, all'interno dell'intervallo di valori sperimentati, questo CPP non rappresenta un fattore determinante per il controllo del peso molecolare, sebbene possa avere un effetto più evidente su altre proprietà del polimero come la polidispersività. Anche in questo caso nessuna tra le combinazioni dei vari CPP è stata statisticamente significativa.

Il diagramma delle superfici di risposta (Response Surface Chart) invece, è una tecnica statistica avanzata utilizzata nell'ottimizzazione dei processi per modellare e analizzare le relazioni tra CPP e una CQAs osservata.

Questa metodologia permette di rappresentare graficamente le interazioni tra i parametri e la risposta. Questa rappresentazione tridimensionale consente di identificare la presenza di curvature, suggerendo che esiste un punto ottimale all'interno dello spazio sperimentale. Infatti, la risposta del sistema non varia semplicemente in modo lineare rispetto ai parametri, ma può mostrare un comportamento più complesso, con effetti combinati che non sarebbero rilevabili tramite un'analisi univariata tradizionale (19).

La forma della superficie fornisce informazioni cruciali sulla natura della relazione tra CPP: una superficie concava con un massimo o un minimo ben definito indica la presenza di condizioni ottimali, mentre una superficie piatta suggerisce che i CPP indipendenti hanno un effetto limitato sulla risposta osservata. Inoltre, il gradiente della risposta è un indicatore della sensibilità del sistema rispetto alle variazioni dei parametri sperimentali.

Infatti, aree con una pendenza ripida indicano che piccoli cambiamenti nei parametri producono variazioni significative nella risposta, mentre zone più piatte suggeriscono una maggiore stabilità del sistema (15,20).

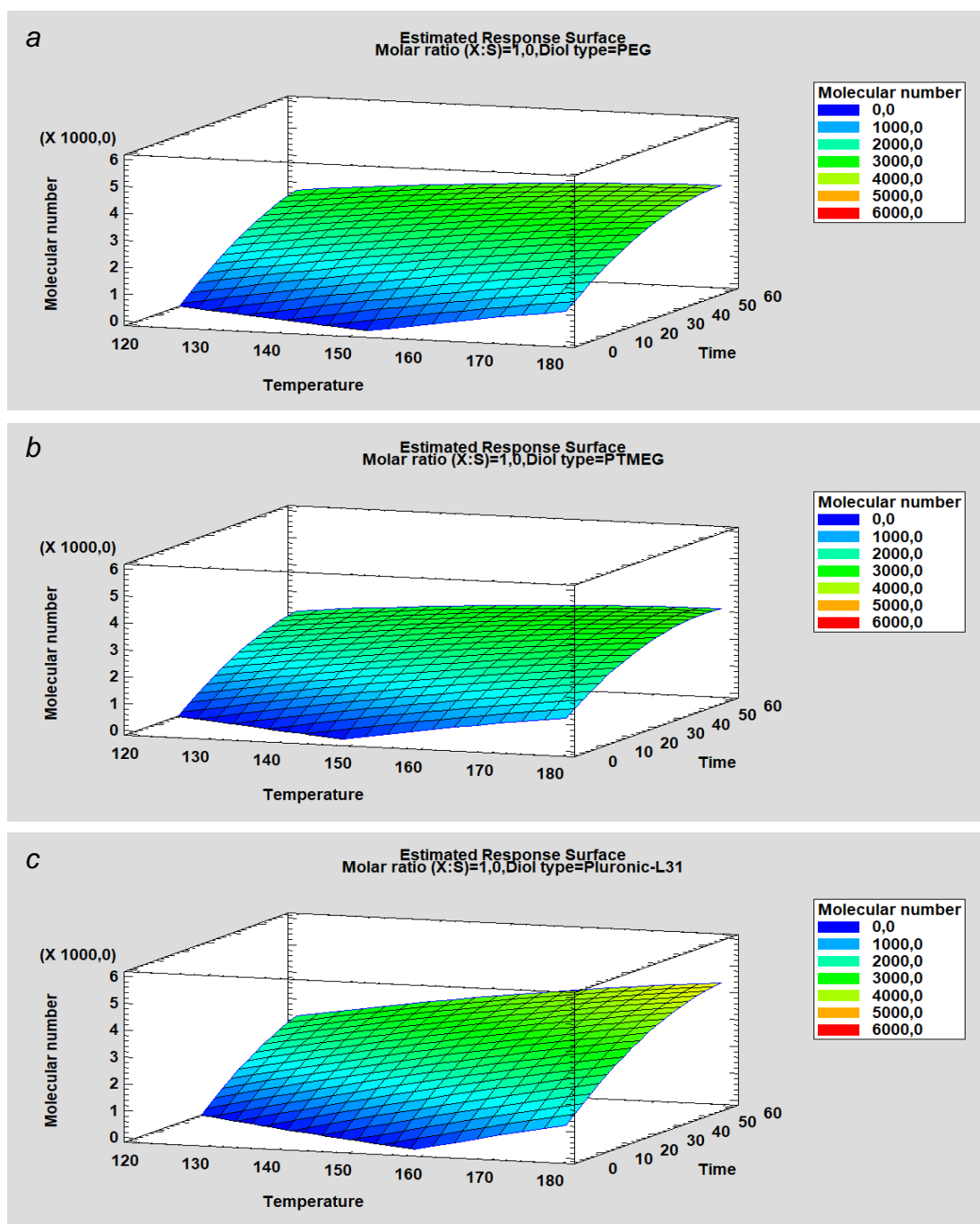


Figura 9. Diagrammi di Response Surface Charts relativi alla risposta massa molecolare numerale (Mn), per un rapporto tra reagenti fissato a 1:1, e relativi all'impiego dei seguenti polialcoli: a) PEG; b) PTMEG; c) Pluronic_L31.

Questi grafici tridimensionali forniscono una rappresentazione chiara delle relazioni tra le CPP sperimentali e la CQAs analizzata, in questo caso la massa molecolare media numerale (M_n). L'asse x rappresenta la temperatura, l'asse z il tempo di reazione, mentre l'asse y indica il valore di M_n , M_w o PDI ottenuto. Il colore delle superfici aiuta a evidenziare l'incremento della risposta sperimentale, con tonalità più fredde (blu-verde) che indicano valori più bassi e tonalità più calde (giallo-arancio) che rappresentano valori più elevati. L'interpretazione di questi grafici permette di comprendere come i diversi parametri influenzino la crescita delle catene polimeriche e come le condizioni sperimentali possano essere ottimizzate per ottenere il prodotto desiderato. In ciascuna delle Figure 9, 10 e 11 vengono prese in esame una CQAs differente, ripetitivamente il M_n , M_w e il PDI. A sua volta, ciascuna delle suddette Figure è composta da tre grafici; ciascuno di essi è associato all'impiego di diverse tipologie di polialcol (PTMEG, Pluronic-L31 e PEG), mantenendo costante il rapporto molare X:S = 1,0. L'analisi comparativa tra queste superfici di risposta consente di valutare il comportamento dei diversi polialcoli e il loro effetto sui parametri inerenti a M_n , M_w e PDI ottenuti.

Il grafico in Figura 9b mostra l'andamento di M_n in funzione del tempo e della temperatura, quando il polialcol impiegato è il PTMEG. Si osserva che l'incremento di M_n è più evidente all'aumentare del tempo, con una crescita progressiva che si stabilizza verso i valori più alti di temperatura, raggiungendo un massimo di 3510 Da. Questo suggerisce che il PTMEG consenta un incremento della polimerizzazione più graduale e controllato, con una dipendenza dal tempo più marcata rispetto alla temperatura. A temperature più basse, M_n risulta sensibilmente ridotto, indicando che una temperatura insufficiente non permette una corretta propagazione della reazione. Tuttavia, l'aumento della temperatura oltre un certo limite non sembra determinare un incremento significativo, suggerendo che il sistema potrebbe raggiungere un equilibrio oltre il quale l'efficienza della polimerizzazione si riduce.

Il grafico in Figura 9c rappresenta il comportamento di M_n in relazione all'impiego di Pluronic-L31. Rispetto al PTMEG, si nota una risposta leggermente differente, con una crescita di M_n più marcata sia con

l'incremento del tempo che con l'aumento della temperatura, fino a raggiungere un valore di 4321 Da. Questo suggerisce il Pluronic-L31 possa una reattività maggiore se confrontato con il PTMEG (18), mostrando una maggiore dipendenza dal parametro termico. M_n cresce progressivamente, con una transizione più evidente verso i valori più elevati della scala cromatica, indicando che per questo polialcol il contributo del tempo è importante, ma la temperatura gioca un ruolo altrettanto rilevante nel determinare la lunghezza delle catene polimeriche. Infine, nel grafico in Figura 9a è riportato il M_n inerente al PEG, che mostra un comportamento simile agli altri due polialcoli, ma con una crescita più uniforme e meno brusca all'aumentare della temperatura e del tempo di reazione, fino a raggiungere un valore di 3635 Da. Questo suggerisce che il PEG abbia una reattività più stabile rispetto ai precedenti polialcol, con una polimerizzazione meno sensibile alle variazioni di temperatura e tempo. Si osserva comunque una tendenza in cui M_n aumenta gradualmente con il tempo di reazione e si stabilizza alle temperature più alte. Questo comportamento potrebbe indicare che il PEG richieda tempi di reazione più lunghi per ottenere una crescita delle catene significativa, rendendolo meno sensibile agli effetti immediati della temperatura (18).

In Figura 10 sono riportati i grafici relativi all'andamento di M_w (massa molecolare media ponderata) in funzione della temperatura e del tempo di reazione, mantenendo costante il rapporto molare X:S = 1,0.

Il grafico in Figura 10b mostra l'andamento di M_w in funzione del tempo e della temperatura per il PTMEG. Si osserva una crescita progressiva di M_w , con un incremento più evidente con l'aumento del tempo di reazione, che raggiunge i 5998 Da. Tuttavia, la temperatura mostra un'influenza significativa, suggerendo che un riscaldamento adeguato favorisca la propagazione della polimerizzazione. Nei primi intervalli di temperatura, M_w è basso, mentre aumenta sensibilmente con l'incremento della temperatura e del tempo di reazione. Questo suggerisce che il PTMEG consenta una crescita delle catene polimeriche controllata, ma con una dipendenza più marcata dai parametri sperimentali, indicando che sia necessario un equilibrio tra tempo e temperatura per ottenere un M_w ottimale.

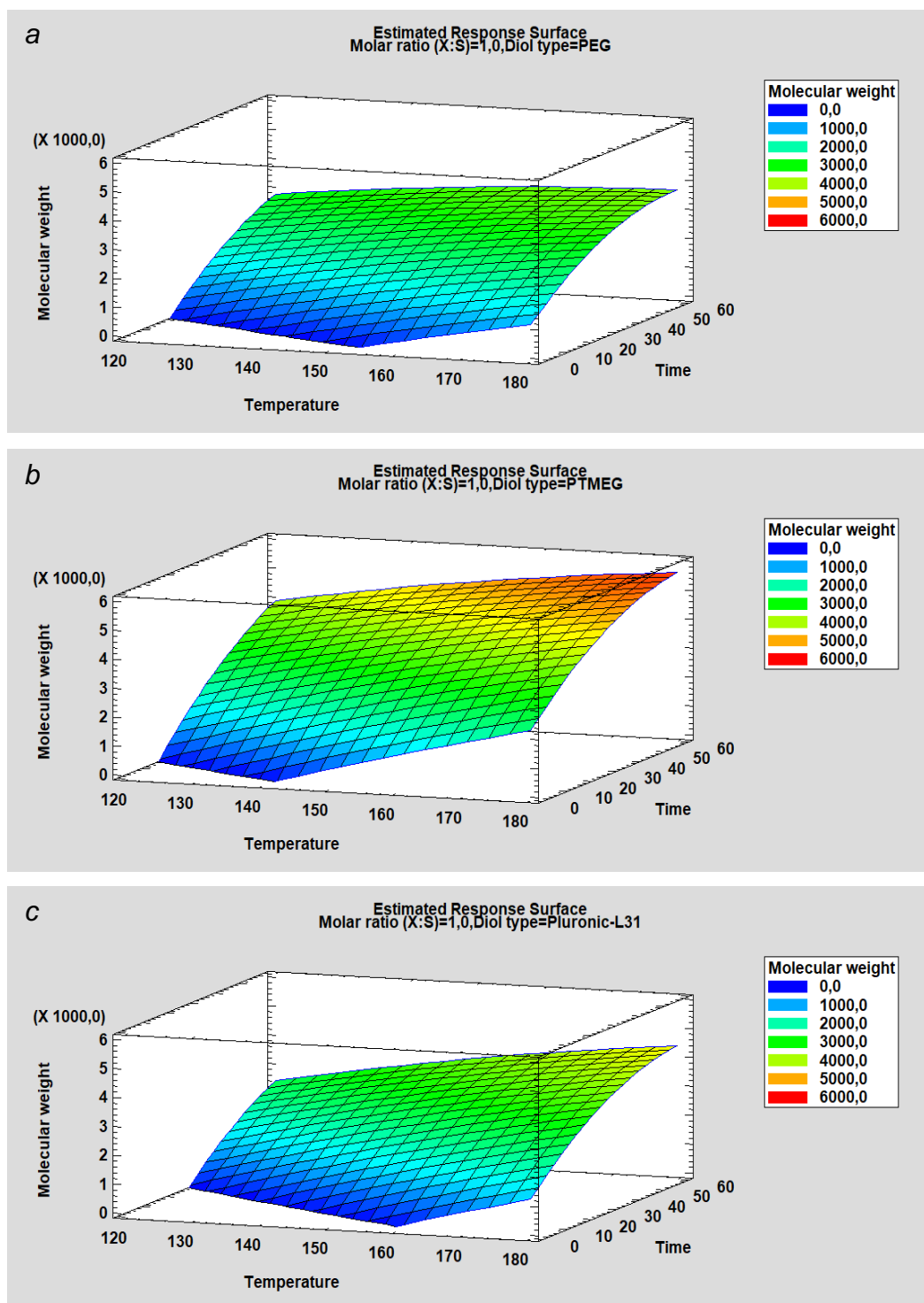


Figura 10. Diagramma di Response Surface Charts relativi alla risposta massa molecolare media ponderale, per un rapporto tra reagenti fissato a 1:1, e relativi all'impiego dei seguenti polialcoli: a) PEG; b) PTMEG; c) Pluronic_L31.

Il grafico in Figura 10c mostra il comportamento di Mw per il Pluronic-L31. Rispetto al PTMEG, si nota una crescita più uniforme e progressiva di Mw sia

con il tempo che con la temperatura, suggerendo che questo reagente abbia una risposta più bilanciata alle variazioni sperimentali. L'incremento di M_w è evidente lungo tutta la superficie di risposta, con una transizione netta portandolo ad un valore massimo di 4350 Da, il che indica che sia il tempo di reazione che la temperatura giocano un ruolo rilevante. Questo comportamento suggerisce che il Pluronic-L31 abbia una maggiore sensibilità alle condizioni sperimentali rispetto al PTMEG, consentendo un incremento più stabile del peso molecolare.

Infine, il grafico in Figura 10a mostra l'andamento di M_w con il PEG. Rispetto agli altri due sistemi, si nota che la crescita di M_w è meno accentuata e più graduale, suggerendo che il PEG sia meno sensibile alle variazioni di temperatura e tempo. Tuttavia, anche in questo caso si osserva un incremento progressivo di M_w con il tempo e la temperatura, con una crescita più omogenea rispetto agli altri polialcol, con valori massimi di M_w pari a 3770 Da. La superficie di risposta mostra una transizione cromatica meno netta rispetto agli altri grafici, il che indica una polimerizzazione più controllata e meno dipendente da variazioni improvvise dei parametri sperimentali. Questo comportamento suggerisce che il PEG abbia una maggiore stabilità nel processo di polimerizzazione e che le condizioni operative possano essere ottimizzate per ottenere una distribuzione delle masse molecolari più prevedibile.

I grafici riportati in Figura 11 forniscono una rappresentazione tridimensionale dell'andamento della polidispersività (PDI) in funzione della temperatura e del tempo di reazione, consentendo di osservare come questi due parametri influenzino la distribuzione delle masse molecolari nel sistema polimerico, mantenendo costante il rapporto molare $X:S = 1,0$.

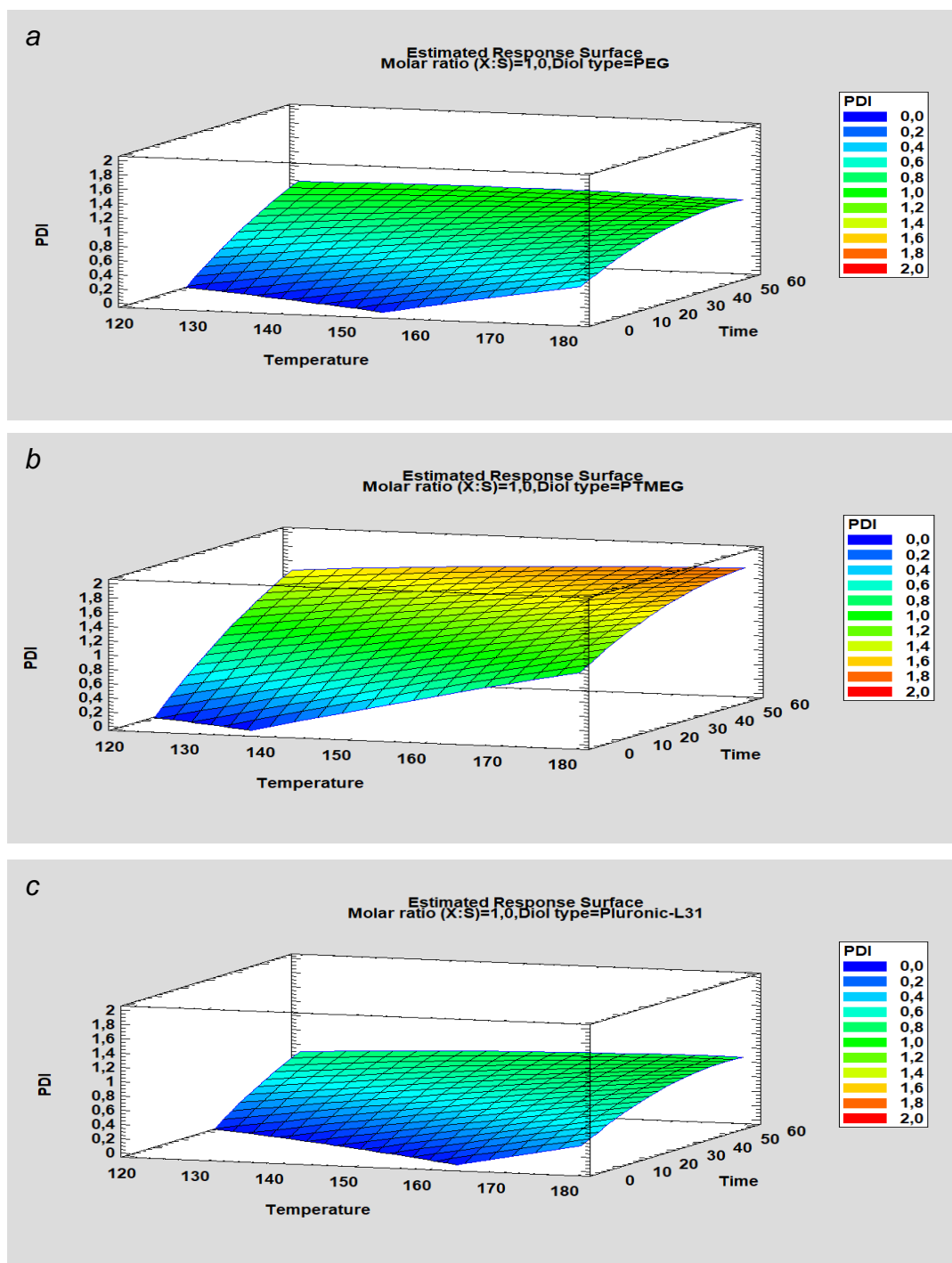


Figura 11. Diagrammi di Response Surface Charts relativi all'indice di polidispersività, per un rapporto tra reagenti fissato a 1:1, e relativi all'impiego dei seguenti polialcoli: a) PEG; b) PTMEG; c) Pluronic_L31.

Il grafico in Figura 11b evidenzia l'andamento del PDI in funzione della temperatura e del tempo di reazione per il sistema basato su PTMEG. Si osserva una crescita progressiva del PDI, con un incremento particolarmente

marcato all'aumentare del tempo di reazione. Ciò suggerisce che una polimerizzazione prolungata favorisca una maggiore dispersione delle masse molecolari, portando a una distribuzione più ampia delle lunghezze di catena. Anche la temperatura ha un impatto significativo: a temperature più basse, il PDI rimane contenuto, mentre un incremento della temperatura, soprattutto combinato con tempi lunghi, porta a valori di PDI massimi di 1,77. Questo comportamento indica che nel sistema PTMEG il controllo del PDI deve essere effettuato regolando con attenzione entrambi i parametri, al fine di evitare un'eccessiva dispersione delle masse molecolari.

Il grafico in Figura 11c mostra il comportamento del PDI nel caso del Pluronic-L31. Rispetto al PTMEG, si nota una minore variazione del PDI con l'aumento della temperatura e del tempo, suggerendo una maggiore stabilità nella distribuzione delle masse molecolari. Sebbene anche in questo caso si osservi un leggero incremento del PDI con l'aumento del tempo, la crescita risulta più contenuta e meno brusca rispetto al sistema precedente raggiungendo un valore massimo di 1,03. Ciò indica che il Pluronic-L31 permette una polimerizzazione più controllata, limitando la dispersione dei pesi molecolari e garantendo una maggiore uniformità nella distribuzione delle catene polimeriche. Questo comportamento potrebbe rendere il Pluronic-L31 un candidato più adatto per ottenere polimeri con una distribuzione più ristretta delle masse molecolari.

Infine, il grafico in Figura 11a mostra l'andamento del PDI per il sistema basato sul PEG. Si osserva un comportamento simile a quello del Pluronic-L31, con una crescita della PDI fino ad un valore massimo di 1,04 che risulta più graduale e meno accentuata rispetto al PTMEG. Tuttavia, in questo caso il PDI risulta mediamente più bassa lungo tutto il range di temperatura e tempo, suggerendo che il PEG favorisca una distribuzione delle catene polimeriche più omogenea rispetto agli altri due sistemi. L'assenza di un incremento brusco della PDI con il variare dei parametri suggerisce che il PEG conferisca una maggiore stabilità alla distribuzione delle masse molecolari, rendendo il sistema meno sensibile alle variazioni delle condizioni operative.

5. Conclusioni

Il lavoro sperimentale condotto ha permesso di esplorare la sintesi e la caratterizzazione di nuovi elastomeri a base di acido sebacico e differenti polialcoli, sfruttando l'approccio del Design of Experiment (DOE) e l'impiego della tecnologia a microonde. L'obiettivo è stato ottimizzare i parametri di sintesi per ottenere materiali con proprietà chimico-fisiche controllate, in particolare in termini di massa molecolare e polidispersività, fondamentali per applicazioni in ambito biomedico.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che tra i polialcoli testati, il Pluronic_L31 consente una maggiore efficienza nella formazione di polimeri con caratteristiche favorevoli, mostrando valori elevati di massa molecolare (M_w fino a 4433 Da) e un indice di polidispersività contenuto ($PDI \approx 1,03$), sinonimo di buona uniformità delle catene polimeriche. Il PEG ha dato prodotti con tendenza a una distribuzione molecolare più stabile ma con un grado di conversione molto basso, mentre il PTMEG, seppur capace di generare strutture con un maggiore peso molecolare (fino a 5986 Da), ha evidenziato una maggiore polidispersività nei prodotti ($PDI > 1,7$), mostrando una distribuzione meno omogenea rispetto ai PEG e Pluronic_L31.

Da questi risultati, è stato possibile approfondire anche l'analisi dei CPP più rilevanti nella sintesi del polimero. L'analisi dei diagrammi di Pareto ha evidenziato che tempo di reazione e temperatura sono i CPP con il maggiore impatto sulle CQAs M_n e M_w . In particolare, l'aumento del tempo ha favorito l'estensione della polimerizzazione, mentre l'incremento della temperatura ha migliorato la cinetica del processo, contribuendo a una maggiore conversione dei monomeri.

Il PDI, altra CQA fondamentale, è risultato influenzato da entrambi questi CPP, ma anche dal tipo di polialcol utilizzato e soprattutto dalla combinazione dei CPP tempo e temperatura, evidenziando l'importanza di considerare anche le interazioni tra CPP e non solo i loro effetti singoli.

Inoltre, anche il rapporto molare tra polialcol e acido sebacico, pur non essendo tra i CPP con influenza significativa, ha mostrato un effetto non trascurabile.

Dal punto di vista metodologico, l'integrazione del DOE ha fornito un solido modello predittivo, evidenziando il ruolo critico della temperatura e del tempo di reazione, sia come fattori singoli che in interazione. Questa impostazione ha permesso di ridurre il numero di esperimenti, limitare il consumo di reagenti e ottimizzare il processo decisionale nella selezione delle condizioni operative più performanti. Inoltre, l'utilizzo della sintesi a microonde ha dimostrato di essere una valida alternativa ai metodi convenzionali, consentendo una significativa riduzione dei tempi di reazione e un miglior controllo delle variabili critiche, pur richiedendo ulteriori miglioramenti nei sistemi di separazione e purificazione.

Complessivamente, i risultati confermano il potenziale di questa metodologia per lo sviluppo di biomateriali personalizzabili, aprendo la strada a future applicazioni in ambito biomedico, dove è fondamentale modulare con precisione le proprietà chimico-fisiche del materiale in funzione del contesto clinico di impiego.

La caratterizzazione biologica sarà il prossimo passo nella valutazione dell'applicabilità di questi materiali in ambito biomedico/farmaceutico.

6. Bibliografia

1. Aydin HM, Salimi K, Rzayev ZMO, Pişkin E. Microwave-assisted rapid synthesis of poly(glycerol-sebacate) elastomers. *Biomater Sci.* 2013;1(5):503.
2. Li X, Hong ATL, Naskar N, Chung HJ. Criteria for Quick and Consistent Synthesis of Poly (glycerol sebacate) for Tailored Mechanical Properties. *Biomacromolecules.* 11 maggio 2015;16(5):1525–33.
3. Vogt L, Ruther F, Salehi S, Boccaccini AR. Poly (Glycerol Sebacate) in Biomedical Applications—A Review of the Recent Literature. *Adv Healthc Mater.* maggio 2021;10(9):2002026.
4. Rai R, Tallawi M, Grigore A, Boccaccini AR. Synthesis, properties and biomedical applications of poly (glycerol sebacate) (PGS): A review. *Prog Polym Sci.* agosto 2012;37(8):1051–78.
5. Bettinger CJ. Synthetic biodegradable elastomers for drug delivery and tissue engineering. *Pure Appl Chem.* 10 novembre 2010;83(1):9–24.
6. Lau CC, Bayazit MK, Knowles JC, Tang J. Tailoring degree of esterification and branching of poly (glycerol sebacate) by energy efficient microwave irradiation. *Polym Chem.* 2017;8(26):3937–47.
7. Lee KW, Gade PS, Dong L, Zhang Z, Aral AM, Gao J, et al. A biodegradable synthetic graft for small arteries matches the performance of autologous vein in rat carotid arteries. *Biomaterials.* ottobre 2018; 181:67–80.
8. Rosalia M, Rubes D, Serra M, Genta I, Dorati R, Conti B. Polyglycerol Sebacate Elastomer: A Critical Overview of Synthetic Methods and Characterisation Techniques. *Polymers.* 15 maggio 2024;16(10):1405.

9. Onyeogaziri FC, Papaneophytou C. A General Guide for the Optimization of Enzyme Assay Conditions Using the Design of Experiments Approach. *SLAS Discov.* giugno 2019;24(5):587–96.
10. Jacyna J, Kordalewska M, Markuszewski MJ. Design of Experiments in metabolomics-related studies: An overview. *J Pharm Biomed Anal.* febbraio 2019; 164:598–606.
11. Tavares Luiz M, Santos Rosa Viegas J, Palma Abriata J, Viegas F, Testa Moura De Carvalho Vicentini F, Lopes Badra Bentley MV, et al. Design of experiments (DoE) to develop and to optimize nanoparticles as drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm.* agosto 2021; 165:127–48.
12. Rampado R, Peer D. Design of experiments in the optimization of nanoparticle-based drug delivery systems. *J Controlled Release.* giugno 2023; 358:398–419.
13. Casler MD. Fundamentals of Experimental Design: Guidelines for Designing Successful Experiments. *Agron J.* marzo 2015;107(2):692–705.
14. Inc ST. Visual Analytics Software | Graphical Visualization Of Data [Internet]. [citato 26 marzo 2025]. Disponibile su: <https://www.statgraphics.com/product>
15. Giglio A, Bellotti M, Conti B, E-Hasnat N, Auricchio F, Genta I, et al. Experimental and Numerical Integrated Strategy for the Optimization of Microfluidic Parameters for Eudragit L100 Nanoparticles and Microparticles. *Mol Pharm.* 4 novembre 2024;21(11):5842–53.
16. Papp D, Carlström G, Nylander T, Sandahl M, Turner C. A Complementary Multitechnique Approach to Assess the Bias in Molecular Weight Determination of Lignin by Derivatization-Free Gel Permeation Chromatography. *Anal Chem.* 2 luglio 2024;96(26):10612–9.
17. Tanzi MC, Farè S, Candiani G. Organization, Structure, and Properties of Materials. In: *Foundations of Biomaterials Engineering* [Internet].

Elsevier; 2019 [citato 26 marzo 2025]. p. 3–103. Disponibile su:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081010341000013>

18. Tsaih ML, Chen RH. The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. *J Appl Polym Sci*. 24 giugno 2003;88(13):2917–23.
19. Olawale F, Ariatti M, Singh M. Biogenic Synthesis of Silver-Core Selenium-Shell Nanoparticles Using *Ocimum tenuiflorum* L.: Response Surface Methodology-Based Optimization and Biological Activity. *Nanomaterials*. 27 settembre 2021;11(10):2516.
20. Bagewadi ZK, Yaraguppi DA, Mulla SI, Deshpande SH. Response Surface Methodology Based Optimization, Partial Purification and Characterization of Alkaline Phosphatase Isolated from *Pseudomonas asiatica* Strain ZKB1 and its Application in Plant Growth Promotion. *Mol Biotechnol*. settembre 2022;64(9):984–1002.