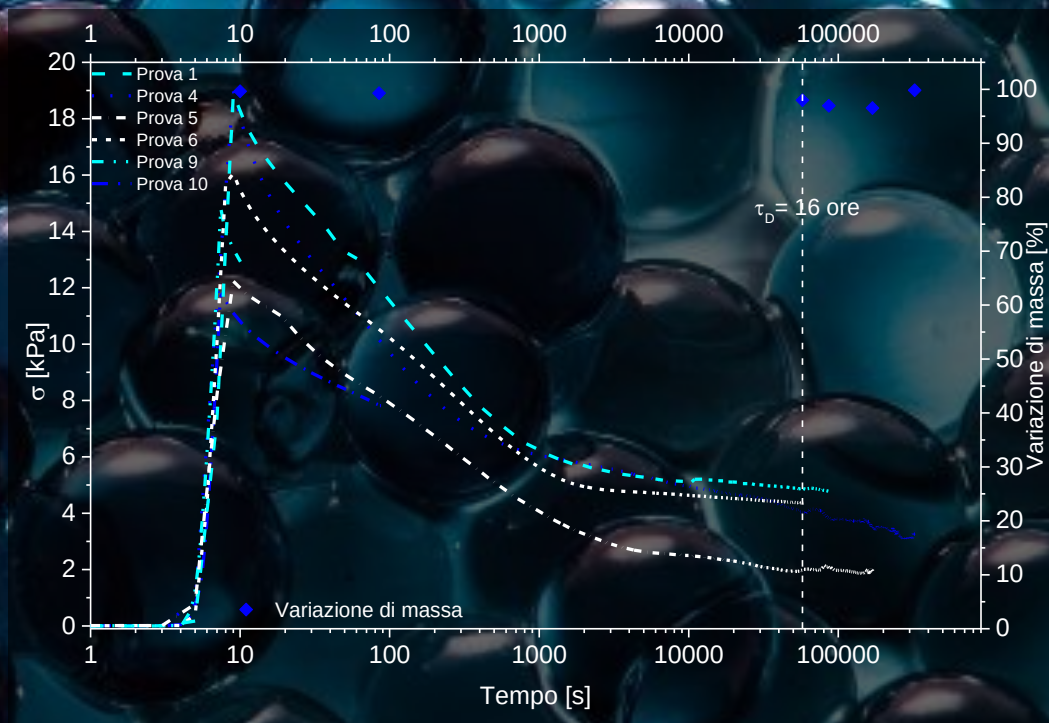


Caratterizzazione di idrogel a base di agarosio puri e caricati con teofillina

Caratterizzazione di idrogel a base di agarosio puri e caricati con teofillina

Pasquale De Feo



Pasquale De Feo



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea in Ingegneria Chimica

**Caratterizzazione di idrogel
a base di agarosio puri e caricati con teofillina**

Tesi in

Principi di Ingegneria Chimica

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Ing. Sara Cascone

Ing. Diego Caccavo

Candidato:

Pasquale De Feo

matricola 0612200659

Anno Accademico 2016/2017

*A chi non teme i muri perché sa di
poterli abbattere.*

Questo testo è stato stampato in proprio, in Times New Roman.
La data prevista per la discussione della tesi è il 21/02/2018
Fisciano, 13/02/2018

Sommario

Sommario	I
Indice delle figure	V
Indice delle tabelle	VII
Introduzione.....	11
1.1 Idrogel	12
1.1.1 Struttura e proprietà degli idrogel	13
1.1.2 Meccanismo di swelling	15
1.1.3 Meccanismo di gelificazione	18
1.1.4 Meccanismo di diffusione	19
1.2 Applicazioni degli idrogel	20
1.2.1 Sistemi per il rilascio controllato di farmaci	20
1.2.2 Sistemi di rilascio a base di idrogel	21
1.3 Caratterizzazione del comportamento meccanico di Idrogel	22
1.3.1 Prove di compressione non confinata	22
1.3.2 Prove di compressione confinata	23
1.3.3 Prove di compressione non confinata.	23
1.3.4 Test di indentazione	24
1.4 Obiettivi	25
Materiali e metodi	27
2.1 Materiali	28

2.1.1 Agarosio	28
2.1.2 Meccanismo di gelificazione agarosio	29
2.1.3 Teofillina	31
2.2 Apparecchiature	31
2.2.1 Texture Analyzer	31
2.2.2 Spettrofotometro	32
2.3 Metodi	35
2.3.1 Preparazione della soluzione di agarosio e agarosio teofillina.	35
2.3.2 Preparazione degli idrogel	35
2.3.3 Test di idratazione	36
2.3.4 Determinazione del polimero eroso tramite analisi colorimetrica	36
2.3.5 Determinazione del rilascio di teofillina	39
2.3.6 Test di stress-relaxation	41
2.3.7 Calcolo del modulo elastico	43
2.3.8 Calcolo del peso molecolare tra due cross-link	48
Risultati e discussione	51
3.1 Gel di agarosio al 2%	52
3.1.1 Test di idratazione	52
3.1.2 Test di stress-relaxation	56
3.1.3 Modello di Hooke	59
3.1.4 Maxwell Generalizzato	59
3.1.5 Confronto moduli elastici	60
3.1.6 Calcolo del peso molecolare tra due punti di cross-link	61
3.2 Gel di agarosio al 2% caricati al 2% in teofillina	62
3.2.1 Test di idratazione	62
3.2.2 Test di stress-relaxation	66
3.2.3 Modello di Hooke	67
3.2.4 Maxwell Generalizzato	68
3.2.5 Confronto moduli elastici	69

Conclusioni.....	71
-------------------------	-----------

Bibliografia.....	75
--------------------------	-----------

Indice delle figure

Figura 1. Struttura di un idrogel con specie ioniche [1].	12
Figura 2. Differenza di idrogel idratato in confronto a idrogel secco [3].	13
Figura 3. Struttura idrogel [3].	13
Figura 4. Proprietà intermedie tra la “bound water” e la “free water” [3].	16
Figura 5. Grado di swelling a seconda della densità di cross-link [3].	17
Figura 6. Meccanismo di formazione di un gel di un polisaccaride in acqua [6].	19
Figura 7. Schema di apparecchiatura per trazione [9].	22
Figura 8. Texture Analyzer [10].	24
Figura 9. Schema indentazione [2].	24
Figura 10. Schema indentazione [2].	25
Figura 11. Molecola di Agarosio.	28
Figura 12. Microstruttura del gel ottenuta dal SEM [11].	29
Figura 13. Meccanismo di gelificazione [11].	30
Figura 14. Molecola di teofillina.	31
Figura 15. Texture Analyzer.	32
Figura 16. Schema lunghezze d'onda [12].	32
Figura 17. Assorbimento di una radiazione [12].	33
Figura 18. Schema spettrofotometro [12].	34
Figura 19. Soluzione di agarosio e acqua deionizzata prima e dopo.	35
Figura 20. Stampi utilizzati per la realizzazione dei gel.	36
Figura 21. Molecola di furfurale [14].	37
Figura 22. Spettri assorbimento agarosio.	38
Figura 23. Retta taratura Agarosio.	39
Figura 24. Spettri assorbimento teofillina.	40

Figura 25. Retta taratura teofillina.	41
Figura 26 Schema sistema di compressione	42
Figura 27. Esempio grafico stress-relaxation.....	44
Figura 28. Calcolo del modulo elastico tramite regressione lineare.	45
Figura 29. Elemento di Maxwell [17].....	46
Figura 30. Schematizzazione di un modello di Solid Linear Standard (SLS) [15]...	47
Figura 31. Schematizzazione di un modello di Maxwell generalizzato.....	47
Figura 32. Analisi gravimetrica sui gel di agarosio al 2% w/w.	52
Figura 33. Percentuale di erosione del polimero rispetto al polimero secco.....	54
Figura 34. Moduli elastici in funzione del tempo di idratazione per gel di agarosio al 2%.	55
Figura 35. Grafico stress-relaxation per gel di agarosio al 2%.	56
Figura 36. Percentuale di acqua persa durante la compressione.....	58
Figura 37. Analisi gravimetrica del gel al 2% di polimero e al 2% di farmaco.	62
Figura 38. Rilascio di teofillina.	63
Figura 39. Confronto tra il rilascio di farmaco con compressione e quello senza. ...	64
Figura 40. Erosione polimero.	65
Figura 41. Prove di stress-relaxation.	66

Indice delle tabelle

Tabella 1. Assorbanza delle soluzioni di agarosio per la retta di taratura.	38
Tabella 2. Assorbanza delle soluzioni di teofillina utilizzate per la taratura.	40
Tabella 3. Variazione di massa gel di agarosio al 2% w/w.	53
Tabella 4. Erosione polimero dei gel al 2% w/w, la massa teorica di polimero iniziale è 71 mg.	54
Tabella 5. Nomenclatura prove.	56
Tabella 6. Forza massima delle prove.	57
Tabella 7. Variazione di massa prima e dopo la prova al texture.	58
Tabella 8. Moduli elastici ottenuti tramite modello di Hooke.	59
Tabella 9. Moduli elastici ricavati con Maxwell generalizzato.	60
Tabella 10. Tempi di rilassamento ottenuti con Maxwell generalizzato.	60
Tabella 11. Confronto moduli elastici dei gel non rilassati.	61
Tabella 12. Confronto moduli elastici.	61
Tabella 13. Confronto tra variazione di massa del gel e farmaco rilasciato.	63
Tabella 14. Erosione polimero gel caricati con teofillina.	65
Tabella 15. Nomenclatura prove con teofillina.	66
Tabella 16. Forza e stress di picco per le varie prove.	67
Tabella 17. Moduli elastici ottenuti tramite modello di Hooke dei gel con teofillina.	67
Tabella 18. Moduli elastici ricavati con Maxwell generalizzato.	68
Tabella 19. Tempi di rilassamento ottenuti con Maxwell generalizzato.	68
Tabella 20. Confronto moduli elastici dei gel non rilassati.	69

Abstract

Hydrogels are particular macromolecules, characterized by the presence of a polymeric matrix, an interstitial fluid and eventually ionic species. The evaluation of the mechanical properties of hydrogels is important for optimizing applications in various fields, such as, for example, pharmacokinetics, for controlled drug delivery, and tissue engineering. In this thesis, the poro-visco-elastic behavior of pure agarose gel and gel loaded with theophylline was analyzed.

Hydration tests were conducted to evaluate the transport of water in pure agarose gels. The hydration tests were carried out immersing samples in water and monitoring their weight (gravimetric tests). The result have shown that pure agarose gels absorb/release negligible amounts of water. Furthermore, the erosion of the polymer network was evaluated, using a colorimetric method carried out on the hydration water (external medium). The results have shown a minimal amount of polymer present in the outer medium, and therefore eroded, showing that erosion in pure agarose gels is a marginal phenomenon.

Stress-relaxation tests were conducted to analyze the mechanical response of these gels to mechanical stimuli. The stress-relaxation tests were performed using a Texture-Analyzer and a device optimized for working with gels immersed in water. The mechanical response in terms of stress/time and the potential mass variation of the samples were monitored. Although there was a slight loss of weight (after 16 h) attributable to a poroelastic behavior, there was no significant variation in the stress state of the gel. This made it possible to consider the poroelastic relaxation to be negligible compared to the viscoelastic relaxation and therefore to describe the stress-relaxation test by means of a purely viscoelastic model. In particular, a "generalized Maxwell" model was used to describe the relaxation phase and the number of Maxwell elements was optimized by the Akaike method. The viscoelastic model provided relaxation times for agarose gels and their respective elastic moduli. The sum of the latter, which represents the elastic modulus of the unrelaxed gel, was compared with the elastic modulus obtained from Hooke's law used to describe the compression phase, obtaining a good agreement.

The analysis was also carried out on gels loaded with theophylline to evaluate the transport of water and drug both in the absence and in the presence of mechanical stresses. The gel loaded at 2% w/w with theophylline were subjected to hydration tests: the gravimetric results showed a decrease in terms of mass comparable to the amount of drug released (determined by spectrophotometric method). Therefore, even in the case of drug-loaded agarose gel the absorption/release of water was negligible. The erosion of the polymer was greater than that of pure gels and, although it is still a few percentage points compared to the total mass of polymer present, it highlights the disturbance caused by the presence of the drug in the formation of a compact polymeric network. The drug release was evaluated both in the absence and in the presence of a mechanical stimulus (axial compression): it was seen that there is no difference in terms of release, confirming the predominantly viscoelastic behavior of the gel. Stress-relaxation tests conducted on loaded gels showed a lower stress state (and therefore smaller elastic moduli) of these samples compared to pure gels, confirming the disturbing effect caused by the presence of the drug in the formation of the polymeric network.

In conclusion, pure agarose gels loaded with theophylline are scarcely affected by solvent transport and, in the analyzed times (200 h), show a negligible erosion of the polymeric network. The poor mobility of the solvent is also reflected on the mechanical characteristics, which can be well described by means of viscoelastic solid models (i.e. by a generalized Maxwell model). The presence of different molecules other than polymer and/or solvent, in this case theophylline, interferes with the formation of the polymer network (hindering the formation of the cross-links) generating less rigid gels. Furthermore, the release of these molecules is not influenced by the presence or absence of mechanical stimuli.

Bibliografia

1. Li, H., "Smart Hydrogel Modelling", Springer Science & Business Media (2010)
2. J. A. Guardiani, Messa a punto di un protocollo sperimentale per lo studio del effetto della rigidità della matrice, Tesi di laurea in Ingegneria dei Sistemi, 2009.
3. URL: <http://www.ing.unitn.it/~luttero/materialinnovativi/idrogeli.pdf>, consultato l'08/02/2018.
4. F. Radelli, M. Sorbona, F. Rossi, "Synthesis and processing of hydrogels for medical applications", Politecnico di Milano, 2015
5. Kharkar, P.M., Kiick, K.L., Kloxin, A.M., "Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments", Chem. Soc. Rev. (2013).
6. B. Jeong, S.W. KIM, Y. H. Bae, Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels, *Advanced Drug Delivery Review*, 54, **2002**: p. 37-51
7. Santoro M., Marchetti, P. Rossi, F. Perale, G. Castiglione, F. Mele, A. Masi, "A smart approach to evaluate drug diffusivity in agar e carbomer hydrogels for drug delivery", J.Phys. Chem. B 115, 2503-2510, 2011.
8. Peppas N. A., Narasimhan B., "Mathematical models in drug delivery: how modelling has shaped the way we design new drug delivery systems", J. Control. Release 190, 2014, 75-81.
9. B. Johnson, J. M. Bauer, D. J. Niedermaler, W. C. Crone, D. J. Beebe, Experimental Techniques for Mechanical Characterization of Hydrogels at the Microscale, *Society for Experimental Mechanics*, 44(1), **2004**: p. 21-28
10. J. Mc Cloyd et al, Material properties in unconfined compression of human nucleus pulposus, injectable hyaluronic acid-based hydrogels and tissue engineering scaffold, *European Spine Journal*, 16, **2007**: p. 1892-1898.
11. Jun-Yinh Xiong, J. Narayanan, XY. Liu, TK. Chong, Topology Evolution and Gelation Mechanism of Agarose Gel, *Journal of Physics, Chemistry and Biology*, 109(12), **2005**: p. 5638-5643
12. URL: http://omero.farm.unipi.it/matdidFarm/116/G_GCMS.pdf consultato l'08/0/2018.
13. A. Cavallaro, Caratterizzazione meccanica di idrogel a base di alginato, Tesi di laurea in Ing. Chimica, 2017.

14. S. Suzanne Nielsen, Compositional Analysis of Foods, *Food Analysis*, 4th Edition, 10th chapter.
 15. David Posada Thomas, R. Buckley, et al., Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches Over Likelihood Ratio Tests, *Systematic Biology*, Volume 53 (5), 79308, 1 October 2004
 16. URL:
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c8/Zener_m_rheological_model.svg/440px-Zener_m_rheological_model.svg.png
consultato l'08/02/2018.
 17. URL:
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/db/Maxwell_diagram.svg/800px-Maxwell_diagram.svg.png
consultato l'08/02/2018.
 18. Quinn, T. M. e Grodzinsky, A. J., "Longitudinal modulus and hydraulic permeability of poly (methacrylic acid) gels: effects of charge density and solvent content". *Macromolecules* 26, 1993.
 19. M. L. Oyen, *International Materials Reviews*, 2014, **59**, 44 -59.
 20. S. Cascone, D. Caccavo, G. Lamberti and A. Barba, Hydrogels: experimental characterization and mathematical modelling of their mechanical and diffusive behavior, *Chemical Society Reviews*.
 21. D. Caccavo, S. Cascone, S. Poto, G. Lamberti e A. Barba, Mechanics and transport phenomena in agarose-based hydrogels studied by compression-relaxation tests, *Carbohydrate Polymers* 167, 2017, 136-144.
-

Vorrei esprimere innanzitutto la mia immensa riconoscenza e stima al professore Lamberti e vorrei ringraziarlo per avermi concesso di lavorare con il suo gruppo di ricerca.

Vorrei ringraziare Sara e Diego per avermi insegnato tanto, con tanta pazienza e disponibilità.

Vorrei ringraziare la mia famiglia per avermi sempre sostenuto e incoraggiato. Grazie per i vostri sacrifici senza i quali non avrei raggiunto questo traguardo.

Vorrei ringraziare i miei amici, sia di laboratorio che di studio: Peppe, Manuela, Michele, Teresa, Dario, Pietro e tanti altri, che per molto tempo ho visto più della mia famiglia e che hanno reso meno tetre le giornate infinite e i momenti di disperazione. Grazie per le risate i consigli e tanto altro.

Vorrei ringraziare Peppe per tutte le volte che mi ha riaccompagnato a casa e per non avermi fatto morire nel tragitto. Per tutte le serate iniziate con “adesso ti vengo a prendere un'oretta e torniamo a casa” e poi siamo tornati con il sole o con il carro attrezzi.

Vorrei ringraziare Pietro compagno di innumerevoli battaglie (esami), con il quale ho affrontato questi anni lunghi e difficili. Per essere stato sempre presente e pronto a tirarmi su di morale.

Vorrei ringraziare mio cugino Giovanni, per i continui aiuti, gli incoraggiamenti e le lezioni private che hanno reso possibile questo giorno. Grazie.

Vorrei ringraziare Anna per essermi stata vicino sempre, in tutti i momenti che hanno caratterizzato questi mesi, dai momenti più belli a quelli di più completa disperazione.

Vorrei ringraziare i miei fratelli Veronica e Angelo, punti di riferimento importanti e modelli da seguire.

