POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale

in

Ingegneria dei Materiali

Tesi di Laurea Magistrale

Idrogel in poli(vinil imidazolo) come tamponi insolubili per il trattamento di acidosi metabolica



Relatore prof. Marco Sangermano Candidato Domenico Laurenza

Anno Accademico 2019/2020

"... Tutto quanto per i buoni è cattivo deve convenire insieme, affinché possa nascere una sola verità: fratelli miei, siete voi anche abbastanza cattivi per questa verità? L'audacia spericolata, la lunga diffidenza, il no crudele, il disgusto, la vivisezione – com'è raro che tutto ciò convenga insieme! Ma da questi semi è – generata la verità! Fino ad oggi ogni scienza crebbe accanto alla cattiva coscienza! Spezzate, spezzate, ve ne prego, le antiche tavole, uomini della conoscenza!" (Friedrich Nietzsche, Così parlò Zarathustra)

Sommario

1	Intr	oduzione	1
2	Elet	trofisiologia cellulare	7
	2.1	Condizione di riposo, non di equilibrio	10
	2.2	Equazione di Goldman	12
	2.3	Permeabilità ed equazione di Ussing	14
	2.4	Pompe attive e stabilità del potenziale di membrana	16
	2.4.2	Gli altri elementi attivi	17
	2.5	Il potenziale d'azione nelle cellule contrattili del miocardio	19
	2.5.2	Cellule contrattili	20
	2.5.2	2 Cellule pacemaker	23
	2.5.3	3 Il battito cardiaco	24
3	Con	dizioni patologiche	27
	3.1	Squilibri acido/base	
	3.1.2	Effetto sull'elettrofisiologia cellulare	
4	Poli	meri sensibili agli stimoli	35
	4.1	Teoria della soluzione di Flory-Huggins	
	4.1.1	Separazione di fase	43
	4.1.2	2 Comportamento reale	
	4.2	Polimeri sensibili al pH	
	4.2.2	Proprietà acido-base dei polimeri sensibili al pH	56
5	Idro	geli sensibili al pH	63
	5.1	Idrogeli in soluzione	70

	5.1.1	Rigonfiamento degli idrogeli sensibili al pH 7	'3	
	5.2	Idrogeli come tampone insolubile7	8	
6	Scelt	a del polimero e sperimentazione8	35	
	6.1	Flow-chart dell'esperimento	37	
	6.1.1	Produzione dei nanogel8	37	
	6.1.2	Valutazione dimensionale8	37	
	6.1.3	Valutazione effetto tamponante8	8	
7	Conc	clusione)1	
B	Bibliografia9			

1 INTRODUZIONE

Le cellule all'interno del nostro organismo sono i mattoni sui quali si basano tutte le funzioni fisiologiche, siano esse di base o meno; il loro corretto funzionamento è fondamentale e anche piccole variazioni all'interno dello stesso possono produrre modifiche sostanziali nel loro comportamento; modifiche capaci di innescare un "effetto domino" con conseguenze spesso gravi.

All'interno di questo panorama l'utilizzo di nuove tecnologie e dell'approccio ingegneristico permette di proporre alternative sempre più affidabili e performanti, grazie alle quali sarà possibile semplificare le pratiche mediche, oltre che migliorare il benessere del paziente.

Dal punto di vista applicativo, i polimeri coprono un ruolo di rilievo nei nuovi sistemi progettati per implementare le capacità terapeutiche, diagnostiche o analitiche dei dispositivi del settore biomedicale. In questo senso, uno degli esempi più comuni sono i Drug Delivery Systems (DDS), sistemi polimerici utilizzati per il trasporto di farmaco in vivo, al fine di ridurre le concentrazioni dello stesso necessarie per avere un'azione sufficiente, così come ridurre i "danni collaterali" che alcuni farmaci potrebbero causare all'organismo; ovviamente questo è solo un esempio, saranno possibili altri sbocchi applicativi, che non saranno però trattati in questa tesi.

Cosa si intende quando si parla di polimeri sensibili agli stimoli (stimuli-responsive polymers)? Si intende quella classe di materiali polimerici capaci di rispondere ad uno stimolo esterno e di modificare la loro morfologia o la loro funzionalità in risposta al suddetto stimolo; per queste motivazioni sono molto utilizzati in settori biomedicali: proprio perché sono in grado di agire in maniera intelligente, ossia svolgere la loro funzione solo nel momento in cui si presentano le condizioni, piuttosto che agire in maniera indiscriminata. Come si può intuire da questa prima descrizione, i materiali sensibili agli stimoli presentano potenziali applicabilità in ogni campo, dalla sensoristica allo sviluppo di tecniche di laboratorio, così come sono inclini allo sviluppo di nuove tecnologie e dispositivi. L'obiettivo di questa tesi è proprio quello utilizzare questa classe di polimeri per sviluppare un sistema di tamponamento insolubile, capace di riequilibrare gli squilibri acidobase, conseguenza di diverse patologie; in particolare si tratterà l'ambito cardiaco; più nello specifico: si discuteranno le ripercussioni dell'acidosi metabolica sulla attività cardiaca. L'acidosi metabolica può essere associata a diverse patologie e non è compito di questa tesi quello di descrivere nel dettaglio le caratteristiche alla base delle stesse; qui ci si concentrerà principalmente sulla descrizione delle modifiche elettrofisiologiche attuate dalla suddetta problematica, così come sul comportamento della cellula nelle condizioni acide, al di là della causa scatenante le suddette: malattie renali croniche o acidosi lattica che sia. Si cercherà quindi di osservare la cellula il più



Figura 1.1. Rappresentazione schematica del cuore e delle sue componenti. [115]

possibile dal punto di vista funzionale, cercando così di descrivere in maniera adeguata un modello utile al bilancio di tali squilibri e le prove necessarie per la verifica.



Figura 1.2. Raffigurazione del sistema circolatorio del corpo umano. all'interno della figura si schematizza il cuore nelle sue componenti principali: atrio destro (definito "RA" in figura); atrio sinistro (definito "LA" in figura); ventricolo destro (definito "RV" in figura); ventricolo sinistro (definito "LV" in figura). il sangue viene rappresentato secondo una scala di grigi, in questo modo: chiaro corrisponde al sangue de-ossigenato; scuro corrisponde al sangue ossigento. come si evince dalla figura, il sangue si ossigena nel passaggio attraverso la circolazione polmonare (pulmonary circulation) e si de-ossigena nel passaggio attraverso quella sistemica (systemic circulation). In ogni punto di confluenza (le vene: vena cava, in figura venae cavae, e vena polmonare, in figura pulmonary veins) e di defluenza (le arterie: aorta, in figura aorta, e arteria polmonare, in figura pulmonary arteriae) sono indicati i versi del flusso. *[1]*

(a) Relaxed muscle



(b) Contracted muscle



Figura 1.3 (a) Viene rappresentato il muscolo rilassato (relaxed muscle), per il quale la sovrapposizione tra le fibre di miosina, componenti la banda A (a band) e quelle di actina, componenti la banda i (i band) sono sovrapposte in minima parte. il sarcomero (sarcomere) è indicato come lo spazio compreso tra una linea z e l'altra (z line), definita come linea di giunzione fatta da tessuto connettivo, che lega un sarcomero all'altro. (b) Muscolo contratto (contracted muscle), in cui si creano dei ponti incrociati (cross bridges) ossia delle interazioni tra la miosina componente la banda a e l'actina componente la banda i, capaci di causare la contrazione del muscolo cardiaco. Si noti come la linea m (m line) rappresenti la quantità, in ogni situazione il punto mediano del sarcomero. [4]

Vista la complessità del muscolo cardiaco e di tutti gli elementi che sono contenuti all'interno dello stesso, si propone ora una breve introduzione sulle componenti, così da permettere una più agevole trattazione dei fenomeni cellulari descritti nel capitolo successivo.

Il cuore è l'organo (del quale è fornita una descrizione con i riferimenti in italiano in Figura 1.1) responsabile della circolazione del sangue all'interno dell'organismo; la circolazione del sangue è fondamentale per poter garantire la sopravvivenza delle cellule contenute all'interno dell'organismo e per garantire il normale funzionamento delle attività fisiologiche. Il sangue si fa portatore di ossigeno mediante un complesso sistema di circolazione rappresentato in Figura 1.2: il sangue de-ossigenato (ovvero privo di ossigeno) viene raccolto dalla circolazione sistemica all'interno dell'atrio destro (RA in Figura 1.2) via il sistema venoso (vena cava superiore, Figura 1.2); l'atrio accoglie il sangue e lo immette all'interno del ventricolo destro (RV in Figura 1.2), che si occupa di far continuare la circolazione del sangue verso i polmoni (circolazione polmonare, via arteria polmonare). Il sistema è così predisposto per due motivazioni: (1) quella di fornire un'adeguata capacità di pompa per reintrodurre il sangue in circolazione mediante l'arteria polmonare; (2) per direzionare il flusso del sangue (processo garantito dalla presenza della valvola tricuspide tra atrio e



Figura 1.4. Rappresentazione della fibra (cellula) muscolare, composta dalle sue miofibrille contenute all'interno del sarcolemma (qui non indicato), nel quale è contenuto anche il nucleo della cellula. [124]

ventricolo destro e da quella polmonare, presente tra il ventricolo destro e l'arteria polmonare: Figura 1.2). [1, 2, 3]

Durante la circolazione polmonare il sangue si ossigena e ritorna al cuore, che, questa volta, lo accoglie nell'atrio sinistro (LA in Figura 1.2); il processo visto per la parte destra si ripete per la parte sinistra: l'atrio sinistro accoglie il sangue ossigenato dalla circolazione polmonare per mezzo della vena polmonare (Figura 1.2), questo lo spinge all'interno del ventricolo sinistro (LV in Figura 1.2), il quale è responsabile della spinta necessaria per re-immettere il sangue (adesso ossigenato) nella circolazione sistemica, per mezzo dell'aorta (Figura 1.2). Anche in questo caso, delle valvole impediscono il reflusso del sangue; nello specifico, e con riferimento a Figura 1.1, si parla di valvola mitrale (che separa l'atrio sinistro dal ventricolo sinistro) e valvola aortica (che separa il ventricolo sinistro dall'arteria). [1, 2, 3]

Il cuore può essere definito come un organo muscolare; le sue componenti sono due: miocardio e pericardio. Il primo, componente circa il 70% dell'organo, è l'elemento muscolare in sé e l'elemento d'interesse in questa analisi; il secondo, invece agisce come una membrana, con funzioni difensive e strutturali. [2, 1]

Come il muscolo scheletrico, il miocardio è un muscolo striato e ha una struttura estremamente simile al primo, con il quale presenta comunque notevoli differenze, che trovano la loro origine nella membrana, ossia quando si va a considerare la cellula dal punto di vista elettrochimico. [4, 2, 3]

Per quanto riguarda l'organizzazione della cellula miocardica, si può costruire il discorso partendo dalla descrizione delle cellule del muscolo scheletrico. Le cellule del muscolo scheletrico sono composte da fasci di miofibrille, ovvero componenti proteici descrivibili con la ripetizione di una unità fondamentale, definita sarcomero (Figura 1.3); il suddetto è a sua volta categorizzabile in due regioni: una scura (banda A), formata da miosina e di lunghezza costante, e una chiara (banda I), formata da actina e di lunghezza variabile. Le miofibrille sono inserite in un sistema di tubuli che prende il nome di reticolo sarcoplasmatico, il cui scopo è quello controllare la quantità di ioni Calcio (Ca²⁺) presenti nella cellula muscolare: fondamentale per la contrazione. Il sistema così definito è racchiuso all'interno del sarcolemma (ossia la membrana cellulare delle cellule muscolari), in corrispondenza della quale sarà presente anche il nucleo della cellula (Figura 1.4). [2, 4]

La differenza tra le cellule muscolari del muscolo scheletrico e quelle del miocardio può essere definita in tre punti. [3, 2, 4, 1]

1. Le cellule miocardiche sono cellule la cui contrazione è miogenica, ossia lo stimolo necessario per causare la contrazione del muscolo è originato all'interno del muscolo stesso



Figura 1.5. Rappresentazione dei canali (gap junction: gap junction channel in membrane of cell 1 e gap junction gap junction channel in membrane of cell 2), inserite all'interno delle membrane cellulari delle due cellule miocardiche (plasma membrane of cell 1 e plasma membrane of cell 2); collegano due cellule miocardiche (interior of cell 1 e inerior of cell 2) tra loro, consentendo una rapida comunicazione tra le stesse, senza che questi debbano attraversare lo spazio extracellulare (extracellular space). *[4]*

ed avviene in maniera involontaria; a differenza delle cellule muscolari del muscolo scheletrico, che sono attivate volontariamente e, per questo, vengono definite neurogeniche.

- 2. Le cellule miocardiche non sono indipendenti l'una dall'altra, ma comunicano direttamente per mezzo delle giunzioni comunicanti (gap junction, Figura 1.5); di conseguenza: l'eccitazione di una singola cellula miocardica è in grado di viaggiare ed essere trasmessa a tutte le cellule vicine. Diversamente, le cellule muscolari del muscolo scheletrico sono isolate le une dalle altre.
- 3. Infine, le cellule miocardiche non consentono una contrazione regolabile, a differenza delle cellule muscolari del muscolo scheletrico, ma presentano una risposta tutto-o-nulla, una volta raggiunto uno stimolo tale da provocare un potenziale di azione.

Alla luce di quanto detto è necessario aggiungere solo una piccola postilla: tutte le cellule muscolari del miocardio differiscono elettrochimicamente dalle cellule muscolari del muscolo scheletrico, ma non tutte ne differiscono allo stesso modo; inoltre, queste differiranno anche tra di loro a seconda della zona nella quale saranno inserite (Tabella 1-1 a pagina successiva).

Ovviamente, questo è uno schema semplificativo, le differenze sono figlie di diverse relazioni elettrochimiche contenute all'interno delle cellule; relazioni spiegate nel capitolo di *Elettrofisiologia cellulare*

	Potenziale della membrana a riposo(mV)
Cellula ventricolare	E _m ∈ [-85; -78]mV
Cellule atriali	$E_m \in [-85; -78]mV$
Cellule del nodo seno-atriale (SA)	$E_{m} \in [-60; -50] mV$
Cellule del nodo atrio-ventricolare (AV)	$E_{m} \in [-70; -60]mV$
Fibre di Purkinje	$E_{m} \in [-95; -90]mV$
Cellule del muscolo vascolare liscio	$E_m \sim -55 mV$

Tabella 1-1. Potenziali di membrana a riposo per diverse cellule appartenenti al cuore. [5]

L'equilibrio biochimico raggiunto dal nostro organismo riesce quindi a controllare, nella maggior parte dei casi, le difficoltà postegli davanti; tuttavia in altri sarà necessario coadiuvare i meccanismi di regolazione ben oliati nel corso dell'evoluzione, così da risolvere problematiche di rilievo. Per questo, nei capitoli successi, come già accennato prima, ci si concentrerà sulla descrizione dei polimeri sensibili agli stimoli e, successivamente, si approfondirà l'analisi, per vedere se questi possano essere utilizzati come tamponi insolubili al fine di risolvere le problematiche cardiache correlate all'acidosi metabolica.

2 ELETTROFISIOLOGIA CELLULARE¹

Come anticipato nel capitolo *Introduzione*, la descrizione della fisiologia cellulare e la sua caratterizzazione dal punto di vista elettrochimico risulta fondamentale, perché quelle sono le fondamenta sulle quali le cellule basano le loro funzioni, e. g. la contrazione di una cellula miocardica è fortemente influenzata dalla differenza di potenziale tra l'interno e l'esterno della cellula. Risulta evidente come la descrizione di tali parametri diventi incredibilmente difficile senza la descrizione delle varie componenti del corpo cellulare; ovviamente, in questo lavoro non si approfondirà la cellula nella sua interezza, per quello si rimanda a testi di biologia o al qui citato Stanfield [2]; in questa sede si tratterà la cellula principalmente nelle sue componenti di membrana; in altre parole: distinguendo ciò che si trova all'esterno e ciò che si trova all'esterno della stessa e come questa suddivisione influenzi il comportamento della cellula e delle sue funzionalità, con particolare interesse, come già accennato, alle cellule cardiache.



Figura 2.1. Rappresentazione schematica della membrana cellulare (plasma membrane), caratterizzata dalla presenza di un doppio strato fosfolipidico; nella figura sono inoltre raffigurate le proteine (protein) responsabili dei trasferimenti ionici, che garantiscono il passaggio degli ioni (specie idrofiliche) attraverso la membrana. [4]

¹ [8, 4, 2]



Figura 2.2. Rappresentazione di una membrana elastica semipermeabile, che separa due soluzioni a diverse molarità di zucchero (glucosio). (a) situazione iniziale di sbilancio osmotico. (b) Condizione di completa permeabilità della membrana alla specie zuccherina. (c) Condizioni, più simile a quelle della cellula reale, di permeabilità al solo solvente e impermeabilità agli zuccheri. [4]

Prima di discutere degli equilibri nei quali si trova il liquido extracellulare e quello intracellulare nelle condizioni fisiologiche e nel passaggio a quelle patologiche, è necessario concentrarsi sull'ente che separa questi due liquidi: la membrana cellulare. Una rappresentazione di tale membrana è data da Figura 2.1 ed è descrivibile come un doppio strato fosfolipidico dello spessore di $s_m \in [50; 70]$ Å e, inseriti in questo doppio strato, in maniera transmembranale o meno, si trovano delle proteine responsabili del passaggio specie di varia natura, sia idrofiliche che idrofobiche, per le quali il passaggio attraverso la membrana può essere ostacolato o meno. In sintesi: possiamo dire che coadiuvano il trasporto delle specie attraverso la membrana.

La descrizione della membrana cellulare è importante, in quanto sarà questa che controllerà le caratteristiche di accoppiamento eccitazione-contrazione della cellula, ovvero le sue proprietà elettromeccaniche. La membrana è semi-permeabile, il che rende possibile il passaggio solo di alcune specie; inoltre, essendo il fluido intracellulare (ICF) e quello extracellulare (ECF) delle soluzioni elettrolitiche, l'equilibrio sarà definibile in seguito al bilancio della pressione osmotica (indotta dalla differenza di concentrazione delle diverse specie ioniche) e della differenza di potenziale (indotta dalle differenze nella densità di carica attraverso la membrana).

Si parta dalla discussione riguardante il bilancio osmotico. Immaginando una cellula semplicemente come una membrana, allora sarà logico aspettarsi che, nel caso si avessero due soluzioni con diverse concentrazioni, Figura 2.2a, queste tenderanno a bilanciarsi; tuttavia, gli esiti di tale bilanciamento varieranno a seconda delle condizioni della membrana e, più precisamente, a seconda della permeabilità della suddetta membrana alle specie in esame. Nel caso in Figura 2.2 si presenta il glucosio, ovvero una specie zuccherina che tipicamente non è in grado di attraversare la membrana cellulare; questa informazione è importante perché l'impossibilità di tale specie di attraversare la membrana impedisce alla suddetta di ribilanciarsi dal punto di vista osmotico, come avviene in Figura 2.2b, e costringe il solvente a spostarsi per diluire e concentrare le specie contenute nei due compartimenti, Figura 2.2c.

Ovviamente, all'interno del meccanismo cellulare, non ci saranno solo queste specie ad influenzare il bilancio osmotico; infatti, anche gli ioni presenti all'interno del sistema contribuiscono



Figura 2.3. Rappresentazione della membrana cellulare e delle specie presenti all'interno del liquido extracellulare (outside) ed intracellulare (inside). Come è possibile osservare, la membrana sarà semipermeabile e si opporrà al passaggio non solo delle specie non cariche (P), ma anche di alcune specie cariche (Na^+). (a) La condizione iniziale di squilibrio. (b) Condizione di equilibrio: sia quello osmotico che quello elettrico. [4]

attivamente all'aumento o alla diminuzione della pressione osmotica. Per esprimere in maniera più chiara il fenomeno facciamo riferimento alla Figura 2.3, dalla quale si osserva chiaramente come ogni specie contribuisca alla pressione osmotica e che l'equilibrio potrà verificarsi solo nel momento in cui le osmolarità espresse ai lati della membrana si equipareranno. Tuttavia, nell'immagine qui proposta, non è stato preso in considerazione unicamente l'equilibrio osmotico, bensì anche l'equilibrio elettrico; ma, perché questa necessità? perché tra le specie in grado di oltrepassare la membrana cellulare ci sono specie cariche, la cui raccolta da un lato della membrana causa un accumulo, responsabile della nascita di una differenza di potenziale attraverso tra l'interno e l'esterno della stessa.

Se la membrana fosse permeabile ad un'unica specie ionica per volta, gli ioni in questione diffonderebbero attraverso la suddetta fino ad una situazione di equilibrio; ovvero una condizione nella quale la forza chimica, dovuta al gradiente di concentrazione di quello specifico ione, sarà perfettamente controbilanciata da un potenziale elettrico ottenuto dalla differenza della densità di carica del suddetto attraverso la membrana (Figura 2.3b). Tale condizione è individuabile dalla legge di Nernst.

$$E_X = \left(\frac{RT}{zF}\right) \ln\left(\frac{[X]_{ECF}}{[X]_{ICF}}\right)$$
(2.1)

dove z è la valenza della specie carica, $[X]_{ICF}$ è la concentrazione della specie X in ICF, $[X]_{ECF}$ è la concentrazione della specie X in ECF; infine, T è la temperatura assoluta misurata in K (Kelvin), R è la costante dei gas in $J/(mol \cdot K)$ e F è la costante di Faraday, che indica la quantità totale di carica elettrica compresa in una mole di cariche elementari, misurata in C/mol.

Le specie cariche che prenderanno parte a questo equilibrio saranno diverse, le più importanti sono: gli ioni Sodio, Na^+ , gli ioni Potassio, K^+ , gli ioni Calcio, Ca^{2+} , e, infine, gli ioni Cloro, Cl^- ; vista la differenza, sia in termini di carica, che in termini di funzione all'interno della cellula, la concentrazione di equilibrio di queste specie sarà diversa, tuttavia il valore di equilibrio assegnato

alla membrana cellulare è unico ($E_m \sim -80mV$), ottenibile con la legge di Nernst, per la cui dimostrazione di consiglia di consultare lo Stanfield [2].

2.1 CONDIZIONE DI RIPOSO, NON DI EQUILIBRIO

La differenza di potenziale (ddp) così definita potrebbe indurre in errore se si facesse il confronto con le componenti tipiche dell'elettrotecnica; infatti, si potrebbe pensare che sulla parte interna della membrana cellulare ci sia un accumulo di cariche negative, mentre all'esterno della stessa ci sia un accumulo di cariche positive; infatti, ciò è vero finché si farà riferimento al liquido, intracellulare o extracellulare che sia (ICF è caratterizzato da un accumulo di specie anioniche – ioni negativi, mentre ECF da un accumulo di cationi – ioni positivi), ma non sarà vero in riferimento alla superficie della membrana cellulare in sé, la quale sarà sempre caratterizzata da una carica negativa, associabile alla natura dei lipidi che la compongono, i quali, in contatto con il liquido leggermente basico, sia all'interno della cellula ($pH_{ICF} = 7.2$) che all'esterno della stessa ($pH_{ICF} = 7.4$), si deprotoneranno, acquisendo così una carica negativa, che resterà fissa sulla superficie, esterna ed interna. Perché questa valutazione è importante? Perché la presenza di cariche fisse sulla membrana modifica l'effettiva ddp presente attraverso la membrana; così come rappresentato in Figura 2.4. La presenza delle cariche superficiali rende la membrana influenzabile dall'esterno non solo per via delle diverse concentrazioni delle specie, quindi non solo relativamente a considerazioni elettrochimiche prima definite mediante la legge di Nernst ma anche relativamente a considerazioni di natura puramente elettronica; infatti, l'accumulo di cariche positive sulla superficie interna o esterna della membrana contribuisce a modificare la differenza di potenziale effettiva presente attraverso di essa (E_m') ; rispettivamente: se la differenza di potenziale effettiva sarà maggiore rispetto a quella calcolata tramite la legge di Nernst $(E'_m > E_m)$, ciò corrisponderà con un accumulo di cariche positive sulla superficie esterna della membrana; viceversa $(E'_m < E_m)$, descriverà la situazione opposta, ossia di accumulo di cariche positive all'interno della membrana.

Secondo il ragionamento appena fatto si potrebbe pensare che, all'equilibrio, tutte le differenze di potenziale debbano essere le stesse; così procedendo dovremmo avere l'eguaglianza tra le leggi di Nernst (Equazione 2.1) di ogni ione; tale condizione è definita: equilibrio Donnan-Gibbs, o, più comunemente, equilibrio di Donnan, per il quale si propone un esempio nel caso in cui la membrana fosse attraversabile da due sole specie ioniche.



Figura 2.4. Effettivo potenziale di membrana (E'_m), raffigurato in relazione al potenziale di membrana calcolato precedentemente mediante la legge di Nernst (E_m). [8]

$$E_{Cl} = \left(\frac{RT}{z_{Cl}-F}\right) \ln\left(\frac{[Cl^-]_{ECF}}{[Cl^-]_{ICF}}\right) = E_K = \left(\frac{RT}{z_{K}+F}\right) \ln\left(\frac{[K^+]_{ECF}}{[K^+]_{ICF}}\right)$$
(2.2)

alla quale possiamo semplificare il fattore RT/F e sostituire il valore numerico della valenza ($z_{Cl^-} = -1$; $z_{K^+} = +1$) per ottenere:

$$-\ln\left(\frac{[Cl^-]_{ECF}}{[Cl^-]_{ICF}}\right) = \ln\left(\frac{[K^+]_{ECF}}{[K^+]_{ICF}}\right)$$
(2.3)

dunque, portando all'interno del logaritmo il segno negativo espresso in seguito alla sostituzione della valenza col suo valore numerico, si può capovolgere l'argomento della funzione:

$$\ln\left(\frac{[Cl^{-}]_{ICF}}{[Cl^{-}]_{ECF}}\right) = \ln\left(\frac{[K^{+}]_{ECF}}{[K^{+}]_{ICF}}\right)$$
(2.4)

infine, note le regole dei logaritmi, è possibile risolvere tale eguaglianza utilizzando gli argomenti della funzione, ottenendo così l'equazione che descrive l'equilibrio di Donnan-Gibbs per due specie cariche capaci di attraversare una membrana (esprimibile sia nella forma proposta da Equazione 2.5 sia in quella proposta da Equazione 2.6).

$$\frac{[Cl^{-}]_{ICF}}{[Cl^{-}]_{ECF}} = \frac{[K^{+}]_{ECF}}{[K^{+}]_{ICF}}$$
(2.5)

Tabella 2-1. Tabella rappresentante in valori di concentrazione degli ioni di maggior rilievo in ICF, $[X]_{ICF}$, e ECF, $[X]_{ECF}$; i corrispettivi potenziali di equilibrio E_X e le driving forces corrispondenti $E_m - E_X$. I valori qui riportati sono quelli specifici per le cellule ventricolari del miocardio, ottenuti da Sperelakis et al. (2001) [8].

$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		$[X]_{ICF}$	$[X]_{ECF}$	E_X	$E_m - E_x$
$= -\frac{61mV}{z} \log_{10} \frac{[X]_{ICF}}{[X]_{ECF}} = -(+60mV)$ $= +60mV$ $Cl^{-} 5mM = 103mM = E_{Cl} = -\frac{61mV}{z} \log_{10} \frac{[X]_{ICF}}{[X]_{ECF}} = -80mV$ $= -\frac{61mV}{z} \log_{10} \frac{[X]_{ICF}}{[X]_{ECF}} = 0mV$	Na ⁺	15mM	145mM	E _{Na}	-80mV
$ \frac{Cl^{-}}{Cl^{-}} 5mM = -140mV = -60mV = -60mV = -60mV = -\frac{61mV}{z} \log_{10} \frac{[X]_{ECF}}{[X]_{ECF}} = -\frac{80mV}{z} = 0mV = 0mV $				$=-\frac{61mV}{\log}\log \frac{[X]_{ICF}}{\log}$	-(+60mV)
$Cl^{-} \qquad 5mM \qquad 103mM \qquad E_{Cl} \qquad -80mV$ $= -\frac{61mV}{z} \log_{10} \frac{[X]_{ICF}}{[X]_{ECF}} \qquad -(-80mV)$ $\cong -80mV$				$=$ z $\log_{10} [X]_{ECF}$	= -140 mV
$Cl^{-} \qquad 5mM \qquad 103mM \qquad E_{Cl} \qquad -80mV$ $= -\frac{61mV}{z} \log_{10} \frac{[X]_{ICF}}{[X]_{ECF}} \qquad -(-80mV)$ $\cong 0mV$ $\cong -80mV$				=+60mV	
$= -\frac{61mV}{z}\log_{10}\frac{[X]_{ICF}}{[X]_{ECF}} \qquad \begin{array}{l} -(-80mV)\\ \cong 0mV\\ \end{array}$	Cl-	5mM	103mM	E _{Cl}	-80mV
$= -\frac{1}{z} \log_{10} \frac{1}{[X]_{ECF}} \cong 0mV$ $\cong -80mV$				$61mV$, $[X]_{ICF}$	-(-80mV)
$\simeq -80mV$				$= -\frac{\log_{10} \frac{1}{[X]_{\text{rec}}}}{Z}$	$\cong 0mV$
				$\simeq -80mV$	
Ca^{2+} 10 ⁻⁷ mM 1,8mM E_{Ca} -80mV	Ca ²⁺	$10^{-7} mM$	1,8mM	Eca	-80mV
$61mV$, $[X]_{ICF}$ - (+130mV)				$61mV$, $[X]_{ICF}$	-(+130mV)
$= -\frac{1}{z} \log_{10} \frac{1}{[X]_{FCF}} = -210 mV$				$= -\frac{1}{Z} \log_{10} \frac{1}{[X]_{FCF}}$	= -210mV
= +130mV				= +130mV	
K^+ 155mM 4,5mM E_K -80mV	<i>K</i> ⁺	155mM	4,5 <i>mM</i>	E _K	-80mV
$61mV$, $[X]_{ICF}$ - (-94mV)				$61mV$, $[X]_{ICF}$	-(-94mV)
$=-\frac{1}{Z}\log_{10}\frac{1}{[X]_{FCF}}$ $=+14mV$				$= - \frac{1}{Z} \log_{10} \frac{1}{[X]_{FCF}}$	= +14mV
=-94mV				=-94mV	

NOTA: quando la $E_m - E_x$ è negativa vuol dire che il flusso netto è verso l'interno della cellula; viceversa quando è positiva.

$$[K^+]_{ECF} \cdot [Cl^-]_{ECF} = [K^+]_{ICF} \cdot [Cl^-]_{ICF}$$
(2.6)

In Tabella 2-1 vengono forniti i vari potenziali all'equilibrio per le specie ioniche più importanti presenti nelle cellule del miocardio; inoltre, vengono anche mostrate le tipiche concentrazioni nel liquido intracellulare, $[X]_{ICF}$, e in quello extracellulare, $[X]_{ECF}$. Eseguendo i calcoli per ogni specie ionica, utilizzando i valori di concentrazione misurati (Tabella 2-1) e confrontando i risultati delle equazioni finora descritte con il potenziale di membrana a riposo, si nota che, nelle condizioni reali, la maggior parte degli ioni non soddisferà l'equilibrio. Questa disparità genera una forza motrice responsabile del movimento di ioni, il che è in netto contrasto con la condizione di equilibrio della quale si è discusso finora; infatti, all'interno delle cellule animali, il potenziale di riposo della cellula. Il perché di potenziale di riposo e la sua importanza verranno discussi successivamente nel corso del capitolo, per il momento si discutano le conseguenze legate alla nascita della forza motrice responsabile del movimento dei suddetti ioni e sulle modalità mediante le quali si assegna il tipico valore di potenziale a riposo prima riportato.

La differenza di potenziale a riposo sarà diversa rispetto a quella dei singoli ioni per una motivazione già latentemente espressa nella descrizione del modello in Figura 2.3, dove lo ione Sodio è incapace di attraversare la membrana cellulare, cosa ovviamente falsa all'interno di una tipica cellula animale; in realtà, infatti, il suddetto ione è in grado di passare la membrana cellulare, solo che non con la stessa semplicità degli altri ioni già discussi, particolarmente lo ione Potassio e lo ione Cloro. Allora perché il potenziale di equilibrio per lo ione Sodio, date le concentrazioni fisiologiche, è così lontano da quello di equilibrio? Perché, finora si è preso in considerazione il cieco passaggio attraverso la membrana, il che è una semplificazione che è stata necessaria per descrivere le fondamenta delle condizioni elettrochimiche alla base delle cellule animali, però, nelle condizioni reali, ogni ione sarà caratterizzato da una certa permeabilità alla membrana; dunque sarà necessario inserire il suddetto parametro all'interno delle equazioni descriventi il fenomeno.

2.2 EQUAZIONE DI GOLDMAN

Ogni ione possiede una certa permeabilità, diversa da quella associata ad un'altra specie; nel caso specifico, facendo riferimento ai due ioni positivi principalmente discussi finora (Sodio e Potassio), nelle condizioni di riposo (successivamente si vedrà bene il perché di tutte queste precisazioni) la permeabilità della membrana allo ione Potassio è nettamente maggiore di quella al Sodio, tanto da spingere alla precedente approssimazione (sbagliata) per il suddetto ione (Figura 2.3). Dal punto di vista analitico, tale relazione è definibile per mezzo della equazione di Goldman, nella quale si utilizzano i valori di permeabilità di ogni ione (P_i) per esprimere il peso specifico di ogni concentrazione, sottolineando anche come la differenza di potenziale sarà definita dalla totalità delle specie prese in esame.

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_K[K^+]_{ECF} + P_{Na}[Na^+]_{ECF} + P_{Cl}[Cl^-]_{ICF}}{P_K[K^+]_{ICF} + P_{Na}[Na^+]_{ICF} + P_{Cl}[Cl^-]_{ECF}} \right)$$
(2.7)

Proprio relativamente alle specie considerate, si osservi come, all'interno di una cellula reale saranno presenti altri ioni, come, e. g. gli ioni Calcio e gli ioni Magnesio; tuttavia, non considerare queste specie induce un errore di calcolo altamente trascurabile, in quanto sono gli ioni Potassio, Cloro e Sodio, i responsabili dei contributi maggiori; anzi, nel descrivere le cellule che non sono di tipo muscolare, l'Equazione 2.7 può essere ulteriormente semplificata, non prendendo in considerazione lo ione Cloro.



Figura 2.5. Andamento del potenziale di membrana nelle condizioni di riposo descritto dalla equazione di Goldman (Equazione 2.7; linea continua) e della equazione di Nernst (Equazione 2.1; linea tratteggiata) in funzione della concentrazione dello ione Potassio nel liquido extracellulare, qui indicato con $[K^+]_o$. [4]

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_K [K^+]_{ECF} + P_{Na} [Na^+]_{ECF}}{P_K [K^+]_{ICF} + P_{Na} [Na^+]_{ICF}} \right)$$
(2.8)

Questa discussione ci permette anche di rispondere al quesito che prima era stato evitato: perché parliamo di potenziale di riposo e non di potenziale di equilibrio? Perché si avrà un costante movimento degli ioni attraverso la membrana, che sarà più o meno importante a seconda della permeabilità della stessa; ciò nonostante, nelle condizioni di riposo, ciò che definisce questa condizione come "condizione di riposo" è il bilancio tra le correnti ioniche, che garantiranno uno stato stazionario, descritto con l'Equazione 2.9.

$$i_{Na} + i_K + i_{Cl} = 0 (2.9)$$

In riferimento ai valori riportati in Tabella 2-1, nelle condizioni di riposo, si avrà un flusso di ioni Potassio verso l'esterno della cellula ($i_K > 0$, perché è un flusso di ioni positivi verso l'interno della cellula), un flusso di ioni Sodio verso l'interno della stessa ($i_{Na} < 0$, perché è un flusso di ioni positivi verso l'esterno della cellula) ed uno di ioni Cloro approssimativamente nullo; dunque, alla luce di quanto appena detto: nelle condizioni di riposo, la corrente generata dagli ioni Potassio sarà in valore assoluto uguale a quella generata dagli ioni Sodio, cosa possibile grazie alle diverse permeabilità dei due elementi.

Il moto delle cariche attraverso la membrana può essere descritto mediante la legge di Fick, tramite la quale è possibile identificare la corrente *i* generata dal moto di una determinata specie ionica.

$$\frac{dn}{dt} = -D \cdot A \cdot \frac{dC}{dx} \tag{2.10}$$

dove dn/dt è la variazione di moli nel tempo indotta dal movimento della specie ionica; specie che si diffonderà secondo il suo gradiente di concentrazione dC/dx, con un determinato coefficiente di diffusione *D*. Tuttavia, visto che lo spessore della membrana può essere approssimato come

costante ($dx \sim s_m = cost$) e che risulta difficile definire la sezione di passaggio A, conviene fare i calcoli rispetto alla densità di flusso j e sfruttando il valore di permabilità (P = D/dx) piuttosto che quello della diffusività: Equazione 2.11.

$$j = -P \cdot dC$$
, $[j] = \frac{mol}{s \cdot cm^2} = \frac{cm^2}{s} \cdot \frac{mol/cm^3}{cm}$ (2.11)

Flusso che è correlabile direttamente con la densità di corrente, I, in scorrimento attraverso la membrana, moltiplicando il valore della densità di flusso appena ottenuto per la costante di Faraday (F) e la valenza delle specie in movimento (z).

$$I = j \cdot z \cdot F \quad , \qquad [I] = \frac{mol}{s \cdot cm^2} \cdot \frac{C}{mol} = \frac{C}{s \cdot cm^2} = \frac{A}{cm^2}$$
(2.12)

2.3 PERMEABILITÀ ED EQUAZIONE DI USSING

Determinare la permeabilità di una specie ionica è molto difficile, anche perché tale valore è variabile, come si evince da Figura 2.5; per questo motivo, è spesso utile rappresentare il valore di permeabilità in maniera relativa, modificando l'equazione di Goldman Equazione 2.7 riferendo ogni valore di permeabilità al valore del Potassio, per cui: $b = P_{Na}/P_K$ e $c = P_{Cl}/P_K$.

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln\left(\frac{[K^+]_{ECF} + b[Na^+]_{ECF} + c[Cl^-]_{ICF}}{[K^+]_{ICF} + b[Na^+]_{ICF} + c[Cl^-]_{ECF}}\right)$$
(2.13)

Per dare un'idea di quanto detto prima riguardo alla bassa permeabilità del Sodio, soprattutto rispetto a quella del Potassio, osserviamo che per le cellule del sistema nervoso si ha $b \cong 0.02$, ossia: $P_K \cong 50 \cdot P_{Na}$. Come già detto, il valore della permeabilità non è costante, il che modifica il comportamento della curva descritta in Figura 2.5, così come viene rappresentato in Figura 2.6. Da Figura 2.6 si osserva, definite le concentrazioni interne degli ioni Potassio e Sodio, che l'aumento della permeabilità allo ione Potassio e/o la diminuzione della permeabilità allo ione Sodio consistono in un appiattimento della curva calcolata secondo l'equazione di Goldman (Equazione 2.7) verso i valori previsti con quella di Nernst (Equazione 2.1).

In maniera simile a quanto appena visto per l'equazione di Goldman modificata, la permeabilità relativa è descritta dall'equazione di Ussing (Equazione 2.14); tuttavia, in questo caso, non si sfrutteranno dei rapporti di permeabilità, anzi, si cercherà di eliminare questo valore; sarà infatti possibile esprimere il rapporto di flusso delle specie cariche.

$$\frac{j_{influx}}{j_{efflux}} = \frac{[X]_{ECF}}{[X]_{ICF}} \exp\left(-\frac{E_m \cdot F}{RT}\right)$$
(2.14)

Si ricorda che: E_m è il potenziale di membrana a riposo; R è la costante universale dei gas; T è la temperatura assoluta; e F è la costante di Faraday, che viene espressa in C/mol. Queste tre costanti (possiamo considerare anche la temperatura perché, nel corpo si trova ad un valore medio di $37^{\circ}C$) consegnano un valore di 26mV rispetto al quale viene confrontato il valore del potenziale di membrana E_m ; anche in questo caso, l'effetto del diverso potenziale di equilibrio dello ione rispetto a quello di riposo membrana è rappresentato dal rapporto tra le concentrazioni, così come avveniva con la legge di Nernst (Equazione 2.1). L'argomento dell'esponenziale è quindi adimensionale, il che

è in linea con quanto affermato prima: il fine della equazione di Ussing è quello di fornire una relazione tra la corrente in ingresso alla cellula (j_{influx}) e quella in uscita dalla stessa (j_{efflux}) ; un esempio di calcolo qui fornito è quello dello ione Sodio in una cellula miocardica ventricolare.

$$\frac{j_{influx}}{j_{efflux}} = \frac{[Na^+]_{ECF}}{[Na^+]_{ICF}} \exp\left(-\frac{E_m \cdot F}{RT}\right) = \frac{150mM}{15mM} \exp\left(-\frac{80mV}{26mV}\right) = 217$$
(2.15)

Alternativamente, l'equazione di Ussing (Equazione 2.14) può essere anche espressa facendo direttamente riferimento al potenziale di equilibrio degli ioni, esprimibile con la legge di Nernst (Equazione 2.1), senza alterare i risultati ottenuti (Equazione 2.16).

$$\frac{j_{influx}^{Na}}{j_{efflux}^{P}} = \exp\left(\frac{E_{Na} \cdot F}{RT}\right) \cdot \exp\left(-\frac{E_m \cdot F}{RT}\right) = \exp\left[-(E_m - E_{Na})\frac{F}{RT}\right]$$
(2.16)
= 217

Nel caso specifico si osserva come il rapporto superi l'unità, il che descrive una prevalenza di influsso degli ioni Sodio: la corrente degli ioni Sodio in ingresso nella cellula è 217 volte maggiore della corrente degli ioni Sodio in uscita dalla stessa. Identico è il discorso nel caso in cui prevalesse il flusso in uscita dalla cellula, e. g. nel caso del Potassio, solo che, adesso, avremo valori del rapporto minori dell'unità, interpretabili in maniera opposta rispetto a quanto appena fatto per il caso del Sodio.

I valori così calcolati mediante l'equazione di Ussing (Equazione 2.14) non rispettano i parametri sperimentali proprio perché l'informazione relativa alla permeabilità della membrana è stata



Figura 2.6. Andamento del potenziale della membrana a riposo in funzione della concentrazione del Potassio extracellulare, $[K^+]_o$, definiti i valori di intracellulari per Sodio e lo stesso Potassio $([Na^+]_i = 15mM; [K^+]_i = 150mM)$ ed effettuando i calcoli considerando la somma tra il potassio e il sodio extracellulari come costanti $([K^+]_o + [Na^+]_o = 154mM)$, tale da ottenere, con l'aumento del potassio extracellulare una diminuzione del sodio extracellulare in modo da verificare la relazione. si osserva la variazione della curva valutata per diverse permeabilità relative dei suddetti ioni; nello specifico si osserva un appiattimento verso i valori calcolati da Nernst (Equazione 2.1) per rapporti P_{Na}/P_K sempre più piccoli, in figura: $P_{Na}/P_K = 0.2$; $P_{Na}/P_K = 0.1$; $P_{Na}/P_K = 0.05$; $P_{Na}/P_K = 0.01$; $P_{Na}/P_K = 0.001$. [8]

completamente omessa; per questa motivazione sarà necessario aggiungere un fattore $N \in [2.5; 4]$ all'argomento dell'esponenziale, così da inserire l'informazione relativa alla membrana sotto analisi.

$$\frac{j_{influx}}{j_{efflux}} = \frac{[X]_{ECF}}{[X]_{ICF}} \exp\left(-\frac{E_m \cdot F}{RT} \cdot N\right) = \exp\left[-(E_m - E_{Na})\frac{F}{RT} \cdot N\right]$$
(2.17)

2.4 POMPE ATTIVE E STABILITÀ DEL POTENZIALE DI MEMBRANA

Prima è stato detto che, nelle condizioni di riposo avremo un continuo flusso di corrente attraverso la membrana cellulare; più nello specifico, ci sarà una fuoriuscita di ioni Potassio e l'ingresso di ioni Sodio; questa variazione però porterà con sé una depolarizzazione della membrana cellulare (ossia il passaggio a valori di ddp meno negativi); ciò nonostante, il valore di riposo resta sempre attorno ai -80mV, come mai? Perché la cellula utilizza la propria energia, ottenuta dall'idrolisi dell'ATP in ADP, per poter trasportare gli ioni contro il loro gradiente (contributo attivo).

Possiamo discutere tale processo definendo due valori: E_m che è il potenziale di membrana a riposo; E_{ion} che è il potenziale di membrana nelle condizioni di riposo dovuto al solo contributo ionico. Partendo da questi parametri, possiamo dire che il valore del potenziale di membrana resta costante, perché è il valore di riferimento al quale la cellula punta; invece, E_{ion} sarà in evoluzione visto, come detto prima, che le condizioni elettrochimiche saranno di stato stazionario e non di equilibrio. In particolare, durante la modifica di E_{ion} osserviamo la fuoriuscita degli ioni Potassio e l'ingresso degli ioni Sodio, il che è responsabile della depolarizzazione della membrana, quindi del raggiungimento di valori più bassi in valore assoluto di E_{ion} ; inoltre, associato a questa variazione, si osserva il rigonfiamento della cellula. [5]

Da queste osservazioni possiamo concludere che: se il potenziale di membrana della cellula si basasse unicamente sulle condizioni di bilancio elettrochimico non si riuscirebbe a garantire una condizione di stabilità; dunque, affinché vengano garantite tali condizioni si dovranno prendere in considerazione i contributi attivi, il più importante dei quali è rappresentato dalla pompa Sodio-Potassio.

La pompa Sodio-Potassio si occupa di bilanciare le condizioni osmotiche e di differenza di potenziale sbilanciate dalla porzione elettrochimica (E_{ion}). La precisazione di entrambi i contributi la si definisce in relazione al rapporto di funzionamento di tale pompa: $3Na^+$ verranno portati fuori dalla cellula (ossia contro il gradiente di concentrazione dello ione in questione), e $2K^+$ verranno tirati dentro alla stessa (nelle stesse condizioni); ora, visto che il transito di queste specie avviene contro il loro gradiente di concentrazione, come detto prima, sarà necessario fornire dell'energia per permetterne il passaggio, cosa che definisce la pompa in questione come $Na^+/K^+ - ATPase$.

Come è stato appena accennato, lo sbilancio tra il numero di ioni in ingresso (tre) e il numero di ioni in uscita (due) è dovuto alle condizioni osmotiche; infatti l'effetto diretto di tale pompa sul potenziale di membrana è piccolo in condizioni fisiologiche, mentre è alto in presenza di concentrazioni anomale, come, e. g., alti $[Na^+]_{ICF}$ e $[K^+]_{ECF}$.

Proprio la dipendenza della pompa dalle concentrazioni di Sodio intracellulare e Potassio extracellulare evidenzia la natura elettrogenica della stessa, la cui attivazione è sottomessa alla presenza di un'adeguata differenza di potenziale. La differenza di potenziale alla quale ci si sta riferendo è quella che si origina tra E_m ed E_{ion} : ΔV_p necessario per attivarla; infatti si osserva come la velocità della pompa aumenti con l'aumento di $[Na^+]_{ICF}$ e/o di $[K^+]_{ECF}$, entrambi contributi responsabili della depolarizzazione della membrana. La prova ultima viene fornita proprio dalle misurazioni in condizione di iperpolarizzazione; infatti, in queste condizioni, si osserva l'inibizione della pompa Sodio-Potassio, perché il gradiente contro il quale il Sodio dovrà essere spinto sarà ancora più elevato di quello che avevamo in condizioni fisiologiche, fino ad arrivare a completa



Figura 2.7. Rappresentazione schematica della pompa $Na^+/K^+ - ATPase$. Viene raffigurato il passaggio all'esterno dei tre ioni Sodio e quello all'interno dei due ioni Potassio; passaggio effettuato grazie all'energia guadagnata dalla idrolisi dell'ATP in ADP. [130]

inibizione per valori di riposo del potenziale di -140mV. Questa condizione può essere interpretata anche in relazione alla permeabilità della membrana e non solo in relazione alla differenza di potenziale che si origina all'interfaccia; più nello specifico: l'aumento della permeabilità farà diminuire l'azione della pompa, questo perché il percorso mostrato dalla membrana sarà più favorevole rispetto a quello proposto dalla proteina che compone la pompa Sodio-Potassio.

Si può quindi concludere come la pompa $Na^+/K^+ - ATPase$ presenti una dipendenza sia dal potenziale di equilibrio della membrana sia dalla permeabilità della stessa.

2.4.1 Gli altri elementi attivi

Sono presenti diversi altri elementi attivi all'interno della cellula; quelli sui quali ci concentreremo saranno però le pompe del Calcio, che rivestono un ruolo di rilievo nelle cellule del miocardio; tra queste differenziamo: pompa $Ca^{2+} - ATPase$ e pompa $Ca^{2+} - Na^+$.

Come si è potuto notare, il Calcio presente all'interno del liquido intracellulare è in bassissima concentrazione, si parla infatti di $10^{-7}mM$; tuttavia, questa quantità fa riferimento ai soli ioni liberi; all'interno della cellula sarà presente una ingente quantità di Calcio, che complessivamente raggiunge valori di circa 2mM/kg, ma si troverà legato alle proteine oppure all'interno di compartimenti cellulari (e. g. reticolo sarcoplasmatico, descritto in *Introduzione*, oppure nei mitocondri). Tuttavia, la quantità "vista" dal sistema, responsabile del gradiente elettrochimico è quella presente come ioni liberi. La pompa $Ca^{2+} - ATPase$ viene inserita per riequilibrare le concentrazioni, oltre che svolgere la sua funzione durante il rilassamento muscolare; sarà quindi presente sia sulla membrana del reticolo sarcoplasmatico, sia sulla membrana cellulare e si attiverà in seguito all'aumento della concentrazione degli ioni Calcio nel liquido intracellulare, $[Ca^{2+}]_{ICF}$;quando la loro concentrazione raggiungerà valori elevati, la pompa si attiverà e li espellerà dalla cellula. Così come già fatto per la notazione dura della $Na^+/K^+ - ATPase$, la nomenclatura biochimica ci permette di identificare la pompa come una pompa a consumo di energia metabolica: ATP.

L'altra pompa, presente per le stesse motivazioni descritte per la $Ca^{2+} - ATPase$, è la pompa Ca^{2+}/Na^+ . Questa pompa, così come visto per la precedente $(Na^+/K^+ - ATPase)$ scambia degli ioni tra l'interno e l'esterno della cellula; in particolare, si avrà l'efflusso (fuori dalla cellula) di uno ione Ca^{2+} e l'afflusso (all'interno della cellula) di tre ioni Na^+ . Tuttavia, è interessante notare come, a differenza della già citata pompa $Na^+/K^+ - ATPase$, la pompa Ca^{2+}/Na^+ non necessiti di energia metabolica per lo scambio, visto che sfrutta la forza motrice indotta elettrochimicamente; da cui è



Figura 2.8. (A) Dipendenza del rapporto $3\Delta G_{Ca}/\Delta G_{Na}$ dal potenziale d'azione E_m riportato per diversi valori di concentrazione interna di ioni Calcio, $[Ca]_i$, ad una data concentrazione di ioni Sodio, $[Na]_i = 15mM$. $[Ca]_i = 0.03\mu M$ (quadrati bianchi); $[Ca]_i = 0.1\mu M$ (cerchi neri); $[Ca]_i = 1.0\mu M$ (triangoli bianchi); $[Ca]_i = 3.0\mu M$ (triangoli neri). (B) Variazione del potenziale di riposo della pompa, $E_{Na/Ca}$, al variare della concentrazione interna degli ioni Calcio, $[Ca]_i$ (espressa in scala semilogaritmica); le curve rappresentano le evoluzioni per diverse concentrazioni di ioni Sodio: $[Na]_i = 10mM$ (triangoli bianchi); $[Na]_i = 15mM$ (quadrati bianchi); $[Na]_i = 20mM$ (cerchi bianchi). [8]

anche possibile calcolare il rapporto di scambio da essa fornito (Equazione 2.18), in riferimento ai valori riportati in Tabella 2-1.

$$\frac{\Delta G_{Ca} = zF(E_m - E_{Ca})}{\Delta G_{Na} = zF(E_m - E_{Na})} \rightarrow \frac{3\Delta G_{Ca}}{\Delta G_{Na}} = 1$$
(2.18)

Risulta quindi evidente come tale pompa dipenda fortemente dalla concentrazione interna di Sodio e Calcio; in particolare, si nota come al variare delle concentrazioni (o del potenziale di membrana a riposo, E_m) si potrà avere anche un flusso opposto: è il caso descritto come modalità inversa e si presenta fisiologicamente nelle condizioni di plateau durante il potenziale d'azione della cellula contrattile (riferimento al sotto-paragrafo *Cellule contrattili*).

È quindi possibile determinare una relazione tra le due forze motrici, tramite la quale è possibile discernere tra un afflusso (moto verso l'interno della cellula) o un efflusso (moto verso l'esterno della stessa) di ioni Calcio; esprimibile analiticamente come in Equazione 2.19 e graficamente, sia al variare del potenziale della membrana a riposo Figura 2.8a, sia della concentrazione del Calcio intracellulare in Figura 2.8b (espresso come $[Ca]_i$ piuttosto che $[Ca^{2+}]_{ICF}$).

$$\frac{3\Delta G_{Ca}}{\Delta G_{Na}} \begin{cases}> 1 \rightarrow efflusso \ di \ Ca^{2+} \\< 1 \rightarrow afflusso \ di \ Ca^{2+} \end{cases}$$
(2.19)

2.5 IL POTENZIALE D'AZIONE NELLE CELLULE CONTRATTILI DEL MIOCARDIO²

La descrizione portata avanti finora cerca di porre l'attenzione sulle diverse componenti che vanno a formare in generale una cellula; nello specifico, per una cellula miocardica, è disponibile uno schema riassuntivo in Figura 2.9, con la precisazione del funzionamento delle pompe attive in Tabella 2-2.

Come si può notare dalla Figura 2.9, le uniche pompe rappresentate sono quelle che sono state descritte finora; tuttavia, come già accennato, quelle presenti all'interno di una cellula sono molte di più e con le funzioni più disparate. È molto importante in questo senso la trattazione del potenziale d'azione all'interno delle cellule del miocardio, in quanto, in riferimento a quanto detto per il cuore, saranno presenti diverse cellule, alle quali sono associati diversi comportamenti e diverse eccitabilità, responsabili del complesso funzionamento dell'organo, che permette ai nostri cuori di contrarsi e pompare il sangue necessario per la sopravvivenza del nostro organismo.

Per semplicità possiamo distinguere le cellule del miocardio in due tipologie: cellula pacemaker e cellule contrattili. Come si evince dal nome, le cellule pacemaker sono le cellule responsabili del battito cardiaco, ossia le responsabili e le determinanti del ritmo cardiaco; invece, quelle contrattili sono quelle cellule direttamente responsabili dell'azione di pompa del cuore.

Prima di iniziare la descrizione di queste cellule è importante definire la relazione tra la velocità massima di depolarizzazione, $(dV/dt)_{max}$ e il potenziale di membrana a riposo, E_m ; questa è la relazione fondamentale alla base del potenziale d'azione, in particolare, della diversa durata degli stessi.

La relazione tra il potenziale di membrana a riposo e la velocità massima di depolarizzazione sono ottenibili dal grafico $h_{\infty} - E_m$; dove h è la variabile di inattivazione, $h \in [0; 1]$, ovvero un parametro probabilistico che si propone di descrivere il comportamento dei canali ionici; in cui $h_{\infty} \in [0,9; 1]$ corrisponde con l'apertura del canale; h = 0 corrisponde alla chiusura (inattivazione) del suddetto. Tale parametro è funzione di E_m e del tempo, t; in particolare, nelle cellule del miocardio, per potenziali di membrana corrispondenti con quelli delle condizioni di riposo ($E_m = -80mV$) si avrà $h = h_{\infty}$, associabili a tempi alti (teoricamente $t \to +\infty$; praticamente per t > 20ms: schematizzanti



Figura 2.9. Raffigurazione dei gradienti elettrochimici e delle pompe ioniche in funzione, con le relative intensità ed entità degli scambi. [8]

² [1, 4, 2, 125]



Figura 2.10. Curve $h_{\infty} - E_m$ dei canali volaggio-dipendenti del Sodio (fast Na^+ channels) e del Potassio (slow Ca_L channels). [8]

una condizione di riposo); mentre, al proseguire della depolarizzazione si avrà una diminuzione del fattore di inattivazione h, fino a che non verranno raggiunti valori di h = 0 per $E_m = -50 mV$. Questo perché man mano che la depolarizzazione si completa i canali si chiudono.

Come anticipato sopra, in questo caso prenderemo in considerazione i canali voltaggiodipendenti, si descriva quindi il processo facendo riferimento ai due canali di maggiore interesse: i canali Sodio voltaggio-dipendenti e i canali Calcio voltaggio-dipendenti, che saranno i canali di maggiore interesse nella descrizione del potenziale d'azione. I primi presentano una cinetica più veloce rispetto ai secondi, il che sarà dovuto ad una conduttanza minore, corrispondente con una minore pendenza della curva $h_{\infty} - E_m$; inoltre, si ha una diversa dipendenza con E_m , infatti la curva sarà spostata verso destra, così che l'inattivazione inizi a circa -45mV e finisca a 0mV; effetto ricollegabile con valori di soglia minori: -35mV rispetto ai -55mV dei canali voltaggio-dipendenti del Sodio. Tali valutazioni sono riportate in Figura 2.10.

2.5.1 Cellule contrattili

Prima di poter parlare in maniera più specifica delle cellule contrattili del miocardio è necessario introdurre il concetto di potenziale d'azione. In riferimento a Equazione 2.7 si è visto come il potenziale della membrana a riposo possa essere determinato in relazione alla permeabilità relativa tra uno ione e l'altro, in particolare, nel caso delle cellule considerate fino ad ora, la permeabilità risultava più vicina al valore di potenziale di riposo del Potassio vista la maggiore permeabilità del suddetto elemento alla membrana nelle condizioni precedentemente descritte. Il potenziale d'azione può essere facilmente sintetizzato come la modifica dei rapporti nelle permeabilità (Equazione 2.13).

	Attivazione	Flussi ionici	
		IN	OUT
$Na^+ - K^+$	ATP	2K+	$3Na^+$
$Ca^{2+} - ATP$	ATP	/	2Ca ²⁺
$Ca^{2+} - Na^+$	gradiente elettrochimico	$3Na^+$	Ca ²⁺

Tabella 2-2. Tabella riassuntiva delle pompe utilizzate per mantenere le condizioni di riposo nella cellula. *[8]*



Figura 2.11. Raffigurazione del potenziale d'azione di una cellula contrattile del miocardio. Nello schema vengono anche raffigurati gli andamenti delle permeabilità della membrana cellulare agli ioni Sodio (p_{Na}), Potassio (p_K) e Calcio (p_{Ca}) in corrispondenza delle varie fasi della depolarizzazione. [2, 125, 4]

Il potenziale d'azione è una depolarizzazione della membrana stimolata dall'esterno mediante un impulso elettrico, oppure, in condizioni fisiologiche, da uno spostamento di ioni tale da causare un fenomeno di depolarizzazione abbastanza importante, in modo da raggiungere quello che viene definito "valore di soglia". Ma, da cosa precisamente è causata la depolarizzazione? Come si può osservare in Figura 2.11, in corrispondenza della depolarizzazione si innescano tre fenomeni:

- (1) l'aumento della permeabilità agli ioni Sodio;
- (2) la diminuzione della permeabilità agli ioni Potassio;
- (3) l'aumento della permeabilità agli ioni Calcio.

Tuttavia, sia la diminuzione della permeabilità agli ioni Potassio, sia l'aumento a quella degli ioni Calcio sono fenomeni molto lenti, che non sono in grado di iniziare un fenomeno così repentino come quello mostrato nella Figura 2.11; possiamo quindi concludere come la depolarizzazione sia causata principalmente dall'aumento della permeabilità agli ioni Sodio, responsabile di un netto aumento del flusso in ingresso della suddetta specie all'interno della cellula, causa, come definito nel paragrafo *Equazione di Goldman*, della depolarizzazione.





Tabella 2-3. Tabella riassuntiva delle fasi della depolarizzazione di una cellula contrattile del miocardio. [/	2]
---	----

Fase del potenziale d'azione nelle cellule contrattili	<u>Gating</u> dei canali ionici	Movimenti ionici
0 – depolarizzazione rapida	Apertura dei canali per il Sodio	Ingresso ioni Sodio
1 – iniziale lieve ripolarizzazione	Inattivazione dei canali per il Sodio	Diminuzione dell'ingresso degli ioni Sodio
2 – plateau	Chiusura dei canali rettificanti per il Potassio; Apertura dei canali di tipo L per il Calcio	Diminuzione dell'uscita degli ioni Potassio; Ingresso degli ioni Calcio
3 – ripolarizzazione	Apertura dei canali per il Potassio rettificanti tardivi; Chiusura dei canali di tipo L per il Calcio	Fuoriuscita degli ioni Potassio; Diminuzione dell'ingresso degli ioni Calcio
4 – potenziale di riposo	Apertura dei canali per il Potassio (di entrambi i tipi); Canali per il Sodio e per il Calcio ancora chiusi	Fuoriuscita degli ioni Potassio; Assenza dell'ingresso degli ioni Sodio e degli ioni Potassio

Prima si è parlato di valore di soglia, cosa vuol dire? Il valore di soglia è quel valore oltre il quale il flusso in ingresso degli ioni Sodio non riesce più ad essere controbilanciato dal flusso in uscita degli ioni Potassio, che, benché risentano di una diminuzione nella permeabilità, continueranno a subire dell'effetto del potenziale della membrana e si sposteranno di conseguenza: nel caso specifico, uscendo dalla cellula. Una volta raggiunto il valore soglia, che tipicamente si trova al di sopra del potenziale di riposo della membrana di $\Delta V_{dep} \in (10; 20)mV$, si ha un netto ingresso di ioni Sodio (valore soglia $E_{soglia} \sim -70mV$), tale da causare una depolarizzazione del potenziale di membrana fino a +30mV. La risposta della cellula al raggiungimento del potenziale di soglia è definita come risposta tutto-o-nulla, il che indica l'impossibilità della cellula a depolarizzarsi completamente se non si raggiungerà tale valore (per le motivazioni descritte sopra) e a depolarizzarsi del tutto se lo raggiungerà, visto che, nelle condizioni appena descritte, l'ingresso degli ioni Sodio sovrasterà qualunque altro contributo e si arresterà solo quando il potenziale di membrana raggiungerà valori tali da inibire i canali del Sodio.

Il processo di depolarizzazione appena descritto viene comunemente indicato nella trattazione della fisiologia cardiaca come fase 0, in corrispondenza della quale inizierà la contrazione del muscolo cardiaco (Figura 2.12).

Raggiunti gli alti valori di potenziale di membrana, come appena spiegato, diminuirà la permeabilità della membrana agli ioni Sodio, causando una lieve ripolarizzazione (fase 1). La suddetta però non riporterà il potenziale a valori estremamente bassi per via dei canali Calcio, che, come visto in Figura 2.11, raggiungeranno solo in un secondo momento il grado massimo di permeabilità, responsabile del mantenimento del potenziale di membrana a valori tali da preservare la contrazione del muscolo cardiaco. Proprio questo ritardo nella risposta definisce i suddetti canali come canali di tipo L, ossia canali lenti. Il plateau raggiunto (Figura 2.11) corrisponde con la fase 2.

Contemporaneamente al raggiungimento della massima permeabilità agli ioni Calcio, per gli stessi ragionamenti esposti finora, si raggiunge anche il minimo della permeabilità degli ioni Potassio; ma, in queste condizioni, i canali tardivi dello stesso ione inizieranno a rispondere alle condizioni di potenziale imposte dalle fasi precedenti. Così facendo, la permeabilità della membrana allo ione



Figura 2.13. Potenziale d'azione della cellula pacemaker in funzione del tempo. [125]

Potassio aumenterà, garantendo una fuoriuscita degli stessi, necessaria per ripolarizzare la cellula. infine, la ripolarizzazione induce anche la chiusura dei canali Calcio di tipo L, con conseguente diminuzione del loro ingresso nella cellula. Queste modifiche prendono il nome di fase 3.

La ripolarizzazione consente anche di far riaprire i canali del Potassio attivi al potenziale di riposo della membrana (definiti appropriatamente come canali rettificanti), consentendo un ulteriore fuoruuscita di ioni Potassio, capace di riportare il potenziale ai valori di riposo (fase 4).

Tutto il processo è stato efficacemente descritto da Stanfield [2], la cui tabella riassuntiva viene qui riportata: Tabella 2-3.

2.5.2 Cellule pacemaker

Nel cuore sono presenti delle cellule con un comportamento singolare, diverso da quello mostrato tipicamente dalle cellule contrattili; infatti, nonostante il potenziale d'azione delle cellule contrattili del miocardio sia diverso da quello delle cellule contrattili del muscolo scheletrico, il principio della depolarizzazione resta sempre lo stesso: uno stimolo esterno. Ci sono però cellule dotate della capacità depolarizzarsi spontaneamente; le cellule alle quali si fa riferimento sono chiamate cellule pacemaker, il cui andamento del potenziale d'azione viene rappresentato in Figura 2.13.

Il motivo alla base del comportamento "anomalo" di queste cellule è la diversa permeabilità della membrana ai diversi ioni; in particolare, si avrà una maggiore permeabilità agli ioni che erano responsabili della depolarizzazione, ossia al Sodio e al Calcio; in aggiunta, si osserva una minore permeabilità della membrana agli ioni Potassio, per i quali risultano bloccati i canali rettificanti, descritti nel paragrafo precedente (*Cellule contrattili*). Proprio la chiusura dei canali rettificanti del Potassio è la responsabile di un valore di riferimento più alto rispetto a quello visto per le cellule contrattili, coerentemente con quelli descritti in Tabella 1-1, $E_m \in [-75; -55]mV$.

In questo caso, la maggiore permeabilità agli ioni Sodio e Calcio causa un costante aumento del valore del potenziale di membrana, che, in queste condizioni, non può essere descritto con il termine "a riposo", proprio perché, come già detto, questi si ripeteranno con una determinata frequenza.

Facendo riferimento a Figura 2.13, possiamo analizzare il potenziale d'azione di una cellula pacemaker in relazione a quello delle tipiche cellule contrattili del miocardio (Figura 2.11). Innanzitutto, si osserva come, visti anche i valori di riferimento dai quali si parte (tipicamente -55mV per le cellule pacemaker, rispetto ai -90mV delle cellule contrattili del miocardio), il valore di soglia per il quale si avrà il potenziale d'azione sarà maggiore rispetto ai valori precedentemente presentati; infatti, in questo caso parliamo di circa -40mV. Il comportamento, dal punto di vista ionico è sostanzialmente lo stesso della fase 0 vista per le cellule contrattili (Tabella 2-3); tuttavia, in



Figura 2.14. Canali di conduzione elettrica presenti all'interno del muscolo cardiaco. [132]

questo caso, gli ioni Sodio avranno una minore influenza rispetto agli ioni Calcio, che potranno dirsi gli ioni controllanti la depolarizzazione. La conseguenza di questa maggiore dipendenza dagli ioni Calcio consiste in un maggiore tempo complessivo di potenziale, visto che la velocità di depolarizzazione dei canali del Calcio è minore rispetto a quella dei canali per il Sodio.

L'irrilevanza della corrente del Sodio e la quasi assenza della corrente rettificante del Potassio fanno collassare la fase 1 e la fase 2 descritte nel paragrafo precedente (Tabella 2-3) ad un piccolo intervallo di tempo, in modo tale da non riuscire ad apprezzare un plateau rilevante.

Da qui in poi, ossia, la restante fase 3 e fase 4, procedono come già descritto, senza sostanziali modifiche; in particolare, in questo caso, la fase 4, può essere indicata come un semplice riferimento e non come un valore di riposo, viste le considerazioni già fatte sopra.

2.5.3 Il battito cardiaco

In Figura 2.14 sono rappresentati i percorsi di conduzione presenti nel muscolo cardiaco. Ci si potrebbe chiedere, alla luce di quanto detto precedentemente nel descrivere la differenza tra le cellule del muscolo scheletrico e quelle del muscolo cardiaco, perché si crea la necessità di avere dei percorsi preferenziali per la trasmissione dell'impulso? La risposta viene dedotta dallo studio delle velocità di conduzione; nello specifico, si osservano velocità di conduzione $v \in [0.3; 0.5]m/s$ nella maggior parte delle cellule contrattili del muscolo cardiaco; invece per le fibre specializzate, come fibre internodali, fascio atrioventricolare (fascio di His) e fibre di Purkinje, le velocità di conduzione superano i 4 m/s. La presenza di queste fibre garantisce un innesco veloce delle cellule contrattili, in modo tale da garantire una contrazione il più sincrona possibile, così da ottenere il massimo potere di pompaggio del quale è capace l'organo.

Sempre con riferimento a Figura 2.14, i nodi che si presentano lungo il percorso conduttivo sono i punti nei quali sono maggiormente concentrate le cellule del pacemaker all'interno del cuore. Benché in entrambi i punti si raccolgano cellule pacemaker, queste avranno caratteristiche diverse: le cellule pacemaker del nodo senoatriale hanno una frequenza di contrazione maggiore rispetto a quelle del nodo atrioventricolare, il che fa di loro le artefici del ritmo cardiaco; inoltre, la velocità di conduzione nelle cellule del nodo SA sarà maggiore di quella presentata nel nodo AV: fenomeno necessario ai fini della corretta contrazione del muscolo.

Possiamo quindi definire la sequenza degli eventi che si susseguono nel cuore per avere un corretto funzionamento.

- (1) Dal nodo SA si origina il potenziale di pacemaker.
- (2) Le vie internodali conducono il segnale al nodo AV.

- (3) Nel nodo AV, a causa della minore velocità di conduzione si registra un ritardo nella conduzione di circa 0.1*s*, necessario perché la contrazione degli atri risulti sincrona.
- (4) Il potenziale viene condotto attraverso il fascio di His ai ventricoli.
- (5) Il potenziale si propaga attraverso le fibre di Purkinje per poter garantire una sollecitazione sincrona dei ventricoli.

3 CONDIZIONI PATOLOGICHE

Per avere un'idea di come si diffonde il segnale all'interno del muscolo cardiaco si potrà fare riferimento alla registrazione dell'attività elettrica del cuore, ovvero l'elettrocardiogramma (ECG): diagramma che registra gli eventi di contrazione del muscolo cardiaco, mostrato in Figura 3.1. Alterazioni all'interno di questo tracciato possono rivelare la presenza di patologie, come: tachicardie, bradicardie, extrasistole, fibrillazioni correlate a eventi di contrazione asincrona, eccetera.



Figura 3.1. Raffigurazione del tipico tracciato ECG e identificazione dei suoi componenti, con indicazione dei suoi valori tipici. [126]

Il blocco cardiaco corrisponde ad un ritardo nella conduzione del segnale elettrico all'interno del cuore; ritardo che può accumularsi negli atri, in particolare nella trasmissione del segnale dal nodo SA alle cellule componenti queste camere, oppure al nodo AV, ovvero quando il segnale passa dagli atri ai ventricoli. Nel primo caso si parla di blocco senoatriale; per il secondo si parla invece di blocco atrioventricolare. [6, 2]

Da qui è necessario però approfondire la questione, in quanto un blocco cardiaco può causare un semplice ritardo nella conduzione cardiaca (blocco cardiaco di primo grado), ma può peggiorare fino ad impedire completamente la conduzione elettrica (blocco cardiaco di terzo grado). [6, 2]

Di particolare interesse è il blocco atrioventricolare, che, nei casi più severi, viene comunemente trattato con l'inserimento di un pacemaker [7, 6]; il blocco può essere individuato misurando la durata dell'intervallo P-Q (t_{PQ}) dell'ECG, che stima il tempo trascorso dalla contrazione degli atri (onda P) alla contrazione dei ventricoli (complesso QRS), ovvero il tempo di conduzione attraverso il nodo AV; in un cuore in condizioni fisiologiche è di circa 0,1*s*, mentre nel caso di un blocco atrioventricolare i tempi necessari saranno maggiori. [6, 7, 2]

Le cause del blocco cardiaco sono le più svariare: è infatti possibile osservare l'insorgenza del blocco atrioventricolare per semplici varianti fisiologiche (e. g. negli atleti), per ischemia, squilibri elettrolitici, così come infarti miocardici o problematiche post-operatorie, oppure causati da utilizzo di farmaci inibitori. Questi sono solo alcuni esempi, per una panoramica più completa si suggerisce di leggere il lavoro di Kashou et al. (2019). [6]

In questa tesi ci si concentra sugli squilibri elettrolitici, che oltre al blocco atrioventricolare possono anche indurre fibrillazioni, rendendo asincrona la contrazione delle cellule. [8, 9]

3.1 SQUILIBRI ACIDO/BASE³

Il sistema cardiaco si è evoluto attorno a precisi equilibri acido/base, responsabili del corretto funzionamento delle cellule cardiache; il muscolo cardiaco può diventare acido (e. g. acidosi), a causa di un aumento della concentrazione di $[H^+]_{ECF}$ e la diminuzione di $[HCO_3^-]_{ECF}$ [10] o basico (e. g. ipercaliemie), a causa un aumento di $[K^+]_{ECF}$ [11], con conseguente modifica delle condizioni fisiologiche di contrazione, che possono anche causare la morte. [9, 11, 12, 13] In questa sede ci si concentrerà sul fenomeno di acidosi e, più precisamente, sulle condizioni indotte da acidosi metabolica (incremento di $[H^+]$ o diminuzione di $[HCO_3^-]$) in quanto risulta la più comune eventualità patologica rispetto alla acidosi respiratoria, con la quale, tuttavia, ne condivide le caratteristiche. [14, 10, 12]

Il muscolo cardiaco può diventare acido per una serie di condizioni patologiche; ad ogni modo, l'acidosi ha due effetti principali sull'organismo: diminuzione della forza contrattile delle cellule cardiache e induzione di aritmie. L'aritmia stessa può essere indotta in modi diversi da questa patologia; infatti, si potrà incorrere in aritmie sia per il prolungamento della durata del potenziale d'azione (che alimenta la stimolazione del muscolo), sia per diminuzione della suddetta (che riduce i tempi refrattari del cuore, portando a contrazioni premature). [12]

In generale, l'acidosi metabolica risulta comune nei pazienti che hanno subito un arresto cardiaco, analizzato seguendo la metodologia Stewart–Figge da Makino et al. (2005) [15]; i risultati sono riassumibili per mezzo delle due tabelle proposte in Figura 3.2 e Figura 3.3. In particolare, Figura 3.2 mostra graficamente come la diminuzione di pH (da valori di circa 7,39 a valori di circa 6,90) sia data dalla sovrapposizione di diverse componenti, non solo quelle che implementano l'acidosi, come – e. g. – la concentrazione dello ione lattato (risulta responsabile solo al 50% del fenomeno), ma anche dalla presenza di altre alterazioni metaboliche opposte, che compensano in parte la deriva acida: e. g. ipercaliemia.

³ [17]


Figura 3.2. Impatto di ciascuna variabile nell'equilibrio acido/base in pazienti dimessi in seguito ad arresto cardiaco. [15]

Bailey (2005) riassume lo studio dei colleghi Makino et al. (2005), sottolineando, anche grazie all'analisi della letteratura, come risulti elevata la corrispondenza tra acidosi e alte percentuali di ioni non misurati (circa il 92% dei pazienti). [16] Come descritto dallo studio nipponico [15] elevati valori di SIG (strong ion gap) corrispondono a pazienti che hanno subito un arresto cardiaco; in particolare, dagli studi su pazienti che hanno subito un danno cardiaco, si troverà un'alta mortalità per *SIG* > 5, rendendolo così un indicatore. [16, 15]

I valori di SIG sono facilmente misurabili come differenza tra: SID_a (Strong Ion Difference), che prende in considerazione l'effetto delle proteine nel sangue; e SID_e (Effective Strong Ion Difference), che prende in considerazione anche il contributo degli acidi deboli nel plasma (e. g. il contributo dell'anidride carbonica). Adesso, se la differenza tra questi due valori, ossia lo Strong Ion Gap ($SIG = SID_a - SID_e$) sarà nulla, vorrà dire che non ci saranno anioni sfuggiti al conteggio; fisiologicamente, tale valore, come affermato prima, deve trovarsi al di sotto di 5. Tuttavia, possiamo utilizzare anche un altro fattore per avere un'idea delle condizioni fisiologiche: Anion Gap; tale valore è quello che veniva utilizzato tradizionalmente e consente comunque di avere un'informazione importante,

Variable	Cardiac arrest	Minor injury	P
pH	6.90 ± 0.21	7.39 ± 0.08	0.0001
P _{CO2} (Torr)	78.3 ± 42.8	39.2 ± 9.1	0.0001
Bicarbonate (mmol/l)	13.8 ± 5.4	22.8 ± 3.5	0.0001
Standard base excess (mmol/l)	-19.1 ± 6.2	-1.5 ± 3.6	0.0001
Sodium (mmol/l)	140.4 ± 5.9	139.6 ± 2.8	0.49
Potassium (mmol/l)	7.3 ± 2.6	3.6 ± 0.4	0.0001
Ionized calcium (mmol/I)	1.31 ± 0.12	1.17 ± 0.08	0.0001
Total magnesium (mmol/l)	1.17 ± 0.27	0.86 ± 0.14	0.0001
Chloride (mmol/l)	98.6 ± 5.9	103.0 ± 4.6	0.0002
Lactate (mmol/l)	14.3 ± 5.8	2.5 ± 1.8	0.0001
Albumin (g/dl)	3.4 ± 0.7	3.9 ± 0.5	0.0002
Phosphate (mmol/l)	2.95 ± 1.07	1.06 ± 0.36	0.0001
Anion gap (meq/I)	20.1 ± 7.4	11.0 ± 3.5	0.0001
SID _a (meq/l)	38.9 ± 4.6	41.0 ± 2.9	0.22
SID _e (meq/l)	26.5 ± 6.1	35.9 ± 4.0	0.0001
Strong ion gap (meq/l)	12.4 ± 6.0	5.1 ± 3.6	0.0001

acid-base variables in patients with cardiac arrest and with minor injuries

P_{CO2}, partial pressure of CO₂; SID_a, apparent strong ion difference; SID_e, effective strong ion difference.

Figura 3.3. Tabella riportante gli intervalli dei valori misurati in pazienti che hanno subito arresto cardiaco, messi a confronto con pazienti affetti dalle stesse problematiche di acidosi metabolica, senza che si incorra in arresto cardiaco. [15]



Figura 3.4. Raffigurazione degli estrusori di acidi (NHE e NBC) e dei caricatori di acidi (CBE E CHE). Nella figura vengono indicati gli spostamenti ionici causati dalle suddette pompe. [9]

magari utile per una modellizzazione numerica, visto che anch'esso cresce oltre un valore soglia nel passaggio alle condizioni patologiche, nelle quali possiede valori ben precisi $AG \in [12; 20] mol/l$.

Le cellule miocardiche presentano un fisiologico meccanismo di regolazione dell'acidità, la quale viene alterata dalle condizioni di pH intracellulare; nello specifico, nelle condizioni acide, si avrà una tendenza da parte della cellula a spingere verso l'esterno gli ioni H^+ ; viceversa, in condizioni basiche si accoglieranno più H^+ . Tali meccanismi sono influenzati da diversi altri fattori, come: il pH extracellulare, il potenziale di membrana, specifici recettori di membrana e ligandi endogeni. Nonostante queste caratteristiche, ci sono altri meccanismi di difesa per cercare di tamponare gli eccessi di H^+ , come: proteine trasportatrici (e. g. istidina), oppure introducendo livelli fisiologici di CO_2/HCO_3^- , via acetazolamide. [9]

Di particolare interesse è l'effetto del *pH* del liquido extracellulare (pH_{ECF}); infatti, si osserva come una variazione di circa un'unità nel pH_{ECF} (e. g. da $pH_{ECF} = 7,4$ a $pH_{ECF} = 6,5$) corrisponda una diminuzione di circa 0,5unità del *pH* intracellulare (pH_{ICF}); cambio che raggiunge lo stato stazionario nell'arco di 3min [12]; sottolineando come un cambiamento nel pH_{ECF} possa efficacemente compensare cadute di *pH* intracellulare nel giro di pochi minuti. [9]

È noto come l'acidosi influenzi l'ambiente intracellulare, che viene principalmente regolato da quattro proteine trasportatrici, divisibili in: estrusori acidi – NHE ed NBC, entrambe responsabili di un influsso di ioni Sodio; caricatori acidi – CHE e CBE, entrambe responsabili dell'influsso degli ioni Cloro. La loro attività non è sempre costante, ma si evolve in relazione alla variazione del pH_{ICF} , come



Figura 3.5. Rappresentazione, in funzione del pH intracellulare (qui rappresentato pH_i) della velocità di scambio delle pompe acido-estrusori (NHE e NBC) e acido-caricatori (CBE E CHE), descritte come concentrazione estrusa (o caricata) al minuto. [9]



Figura 3.6. Variazione della capacità contrattile del muscolo in relazione alla variazione del pH intracellulare, qui indicato come pH_i . [9]

mostrato in Figura 3.4 e Figura 3.5: gli estrusori acidi si attiveranno quando si andrà verso valori acidi; viceversa i caricatori acidi si attiveranno quando il pH_{ICF} andrà verso valori basici; tali determinazioni sono ovviamente relative. [9, 17]

La caduta del pH_{ECF} causa l'attivazione dei caricatori acidi, responsabili della caduta di pH_{ICF} (gli estrusori sono inibiti in queste condizioni); da qui si innescheranno una serie di operazioni a cascata che cercheranno di tamponare l'aumento di concentrazione di H^+ e la diminuzione di HCO_3^- , indotti dalla diminuzione di pH_{ICF} [10, 9], stimolando l'ingresso degli ioni Na^+ e HCO_3^- all'interno della cellula, in scambio con la fuoriuscita di H^+ [9]. Questi scambi influenzeranno il funzionamento degli altri canali ionici; effetti efficacemente riassunti da Vaughan-Jones et al. (2009), e qui riproposto in Figura 3.7.

Quanto riportato in Figura 3.7 è il processo completo che si instaura all'interno dell'organismo in seguito all'acidosi, ossia, esso comprende sia l'effetto patologico (caduta del *pH* intracellulare), sia il tentativo di compensazione da parte dell'organismo. In particolare, l'effetto di compensazione si attiva perché l'eccessiva presenza di ioni H^+ all'interno della cellula disturba l'interazione tra lo ione Calcio e la troponina; quest'ultima, non descritta nel capitolo introduttivo, è una componente del filamento di actina, responsabile della contrazione: la troponina influenza la configurazione di un altro componente molecolare dell'actina: la tropomiosina, che funge da sito di ancoraggio per la miosina nel processo di contrazione. Come accennato in *Introduzione*, gli ioni Calcio influenzano la contrazione muscolare; in particolare, un aumento considerevole della concentrazione dei suddetti nell'ambiente intracellulare (ottenuto grazie alla stimolazione esterna) causa la contrazione del muscolo; ciò accade perché gli ioni Calcio liberano la tropomiosina dalla troponina, aumentando così il numero di siti disponibili per l'ancoraggio della miosina all'actina. Come detto sopra, l'eccessiva concentrazione di H^+ disturba la suddetta interazione, impedendo un'efficace contrazione; ciò spinge la cellula ad applicare tutte le contromisure descritte in Figura 3.7. Questa maggiore

$\downarrow pH_i \text{ NHE, NBC} \uparrow [Na^+]_i \text{ NCX} \uparrow [Ca^{2+}]_i \text{ SERCA} \uparrow [Ca^{2+}]_{SR} \text{ SR release} \uparrow Ca^{2+}_i \text{ signalling}$

Figura 3.7. La diminuzione del pH_{ICF} (qui, pH_i) fa aumentare la concentrazione intracellulare di Sodio, $[Na^+]_i$, mediante le pompe NHE e NBC; l'aumento del suddetto ione ha un effetto diretto sulle pompe Sodio-Calcio presenti sul reticolo sarcoplasmatico (NCX), che iniziano a scambiare gli ioni Sodio presenti nel liquido intracellulare con gli ioni Calcio presenti all'interno del reticolo sarcoplasmatico; in questo modo, la concentrazione di calcio intracellulare, $[Ca^{2+}]_i$, aumenta. Questo aumento stimola le pompe metaboliche (SERCA) sul reticolo sarcoplasmatico, che alimentano l'immissione del Calcio nella cellula, con il risultato complessivo di un aumento considerevole della sua concentrazione alla diminuzione del pH intracellulare. [9]

concentrazione di ioni Calcio all'interno della cellula ha anche effetto sulle correnti ioniche che possono essere originate durante i fenomeni di stimolazione; nello specifico: diminuiscono, con un immediato effetto sulla capacità contrattile del muscolo (Figura 3.6), con conseguente riduzione della pressione cardiaca e successivi problemi ischemici [9, 14, 8].



Figura 3.8. (a) Viene rappresenta una schematizzazione del meccanismo di conduzione passivo per giunzioni comunicanti e una descrizione della capacità tamponante, espressa come l'evoluzione della permeabilità della giunzione in funzione del *pH* intracellulare. Si osservi come nella rappresentazione si raffiguri il protone in movimento legato a "Mob": "Mob" indica una generica proteina alla quale il protone si è attaccato; l'affermazione è confermata andando a studiare il flusso dello ione (J_{junc}), che corrisponde a quello di una specie con peso molecolare di ~200*Da*. (b) La rappresentazione del flusso garantito dai due meccanismi: attivo J_{sarc} e passivo (J_{junc}), dal quale si riconferma il tipico andamento a campana del sistema passivo e il progressivo passaggio in termini di flusso controllante: per valori sempre più acidi si avrà prevalenza del contributo attivo; viceversa nel caso di *pH* vicini alle condizioni fisiologiche. Si precisi che in b si parla di miocita (myocyte), che altri non è che la cellula muscolare descritta nel capitolo introduttivo. [9]

Gli effetti qui descritti sono sottolineati da quanto osservato in Figura 3.3, dalla quale non si nota una sostanziale variazione nella concentrazione degli ioni Calcio al variare delle condizioni: $1,31 \pm 0,12mmol/l$ nei casi di arresto cardiaco, a fronte dei $1,17 \pm 0,08mmol/l$ nei caso di danni minori. [15]

ll punto espresso in Figura 3.6 deve essere precisato, perché è importantissimo sottolineare come ci siano più fattori che influenzano la $[Ca^{2+}]_{ICF}$; l'azione effettuata dai trasportatori (appena descritta) è quella che modulerà principalmente la quantità di Calcio sistolico (ovvero presente in corrispondenza della contrazione del cuore); mentre, la regolazione del Calcio durante la diastole (condizione di rilassamento delle cellule cardiache) avverrà in base alla distribuzione delle concentrazioni, indotta dalle fluttuazioni di pH_{ICF} e alla conseguente formazione di microdomini di pH, responsabili della possibile asincronia della contrazione cardiaca, in quanto non tutte le cellule saranno esposte alle stesse condizioni. [9, 18]

È tuttavia necessario evidenziare come i microdomini appena definiti siano influenzati anche dai trasportatori e che la loro nascita dipende dalla sovrapposizione degli effetti, sintetizzabile come: [9, 18]

- o contributo attivo: trasportatori NBC e NHE (il principale);
- contributo passivo: diffusione degli ioni H⁺ attraverso le giunzioni comunicanti per alleggerire la carica acida.

Le condizioni appena esposte sono molto esclusive, ovvero: l'azione dell'uno o dell'altro meccanismo sarà specifica e dipenderà dall'intervallo di *pH* nel quale ci si troverà.

L'analisi del flusso dei due contributi (Figura 3.8) consente di delineare le aree di azione degli stessi. Notiamo innanzitutto come il contributo passivo sia particolarmente efficiente nell'intorno delle condizioni fisiologiche ma diventi trascurabile in condizioni particolarmente acide; di contro, i meccanismi attivi si comportano in maniera del tutto opposta. Perché questa differenza? Perché, nelle condizioni lievemente acide, l'organismo cerca di dissipare la carica acida distribuendola in tutte le cellule adiacenti, così da:

- (1) ottenere una carica acida locale minore;
- (2) rendere le condizioni di lavoro delle cellule uniformi.

Tuttavia, quando si creano condizioni troppo acide, avremo una inibizione del suddetto contributo e un incremento di quello attivo; dipendenza che non contraddice quanto espresso in Figura 3.4; infatti, si nota da Figura 3.8 come i valori assoluti del flusso si equiparino; l'inibizione del contributo passivo e la promozione di quello attivo rappresenta una "decisione" ben precisa per la cellula, ossia: la carica acida espressa dalle cellule vicine è troppo alta, dunque, piuttosto che aspirare la situazione patologica, si preferisce espellerla verso il comparto extracellulare (sarcolemma). Ai meccanismi tamponanti descritti finora, va aggiunto anche il contributo del sistema di tamponamento catalizzato



Figura 3.9. Meccanismo di azione dell'enzima carbonato deidrasi. [9]

dall'enzima carbonato deidrasi (CA), che permette di completare il controllo spaziale del *pH* intracellulare catalizzando la relazione di equilibrio (Equazione 3.1). [9, 17, 18]

$$CO_2 \leftrightarrows H^+ + HCO_3^- \tag{3.1}$$

Il fine di questo meccanismo di tamponamento è quello di convertire H^+ presente all'interno della cellula così da poter sfruttare le capacità diffusive di CO_2 per consentire l'eliminazione della carica acida in eccesso (Figura 3.9). [9, 17] Questo comportamento è ritrovabile nei dati ottenuti dallo studio di Makino e colleghi [15] in Figura 3.3; infatti, notiamo come, nelle condizioni di arresto cardiaco, si registrino concentrazioni di anidride carbonica oltre la norma e concentrazioni di bicarbonato inferiori a quelle normali, il che sottolinea l'entrata in funzione dei meccanismi tamponanti fisiologici.

3.1.1 Effetto sull'elettrofisiologia cellulare

Come appena analizzato nel paragrafo *Il potenziale d'azione nelle cellule contrattili del miocardio*, la modifica del *pH* induce sia una variazione della durata del potenziale d'azione, sia del potenziale di membrana a riposo. [8] In questo caso, si osserva come la condizione di acidosi porti con sé la depolarizzazione della membrana cellulare [12, 13], che riduce la velocità massima di depolarizzazione. [8]

Per quanto riguarda la durata del potenziale d'azione c'è un'inconsistenza tra gli studi, come sottolineato dai lavori di Komukai et al. (2002) [12, 13]; tuttavia si è concordi sull'importanza delle correnti ioniche del Potassio in questo senso, in particolare della corrente di efflusso del Potassio allo stato stazionario (" I_{SS} – steady-state outward K^+ current"), affermazione riconfermata anche da Putnam (2012) [17]; effetti principalmente dipendenti dalla conduttanza della membrana [8, 17]. Ciò nonostante, il potenziale di membrana sembra non essere suscettibile alla variazione delle correnti cationiche ($I_{Na/Ca}$, I_{Ca} , I_K , $I_{Na/K}$), piuttosto, la lieve depolarizzazione, di circa 3mV, sembra essere dovuta alle correnti rettificanti del Cloro, I_{Cl,ir} [12, 13, 19]. Vista la complessità del discorso, si riassumono i punti salienti, che serviranno poi per riferimento nella sperimentazione (Valutazione effetto tamponante): la diminuzione del pH intracellulare causa una lieve, ma importantissima, depolarizzazione della membrana cellulare, indotta probabilmente dall'effetto delle correnti rettificanti del Cloro; tuttavia, l'effetto interessante è l'aumento della concentrazione degli ioni Potassio nell'ambiente extracellulare, che ha come conseguenza l'aumento della durata del potenziale d'azione; quindi, forti dei valori riportati dal Makino et al. (2005) [15] (Figura 3.3), e dello studio di Speralakis e colleghi [8] sulla genesi del potenziale di membrana, possiamo dire che le condizioni di acidosi sono principalmente determinate dalla depolarizzazione della membrana (al di là dello specifico contributo responsabile di tale modifica) e dall'aumento di $[K^+]_{ECF}$.

4 POLIMERI SENSIBILI AGLI STIMOLI⁴

I materiali utili per lo specifico sistema e che andremo a trattare nel corso dei successivi capitoli sono i polimeri sensibili agli stimoli esterni; più nello specifico, definiamo un materiale come sensibile ad uno stimolo esterno quando il suddetto sarà in grado di subire delle modifiche, siano esse morfologiche, di fase, o di altro tipo, indotte sia per via chimica (e. g. modifica del *pH*) che fisica (e. g. modifica della temperatura). I materiali di questo tipo vengono tipicamente definiti come materiali smart, ossia intelligenti; questo perché sono in grado di rispondere in maniera specifica ad un determinato stimolo; ad esempio, si può avere una risposta solo in presenza di un campo elettrico esterno. Proprio questa caratteristica rende l'applicabilità di questi materiali molto ampia.



Figura 4.1. (a) Stimoli tipicamente presenti in diverse applicazioni del genere biomedicale. (b) Risposte progettabili: di tipo booleano (boolean-type response) o non-booleano (non-boolean-type response). [20]

4 [20, 85, 22, 65]



Figura 4.2. Rappresentazione di diverse tipologie di polimeri YES gate. [20]

Ovviamente, nel corso di questa tesi ci occuperemo solo dei materiali polimerici, vista la specifica applicazione e la versatilità degli stessi in questo ambito, come sottolineato anche dagli studi in riferimento al capitolo, ma non si commetta l'errore di pensare che solo questa tipologia di materiali possegga questa qualità, si pensi, e. g., al polimorfismo della zirconia.

Come già accennato, i polimeri sensibili agli stimoli hanno molteplici possibilità applicative; di particolare interesse è il settore biomedicale; infatti, si trovano spesso alla base dei sistemi di trasporto farmaco (Drug Delivery Systems, DDS), oppure di sensori specifici per proteine, acidi nucleici, enzimi, molecole, eccetera (e. g. si pensi alla possibilità di utilizzare l'acido boronico per l'individuazione della molecola di glucosio) [20, 21, 22]. Dai lavori utilizzati in riferimento a questo capitolo, Dai et al. (2008), Reyes-Ortega (2014), Kocak et al. (2016), Badeau&DeForest (2019), si può notare come l'interesse negli anni sia cresciuto per questa tipologia di materiale, il che sottolinea le vaste possibilità applicative, non solo nel settore biomedicale.

Badeau e DeForest hanno efficacemente esposto il comportamento di un polimero sensibile agli stimoli, sfruttando il linguaggio tipico della logica: la logica Booleana. Secondo questo schema, che viene qui riproposto in Figura 4.1, un polimero può rispondere alla presenza dello stimolo, seguendo

il comportamento della porta logica YES: per cui la variazione, sia conformazionale o di altra natura, avviene, gradualmente o meno, nel momento in cui si verifica tale condizione; questo comportamento è comune a molte specie, di cui due esempi possono essere: i polimeri sensibili al pH e i polimeri sensibili alle variazioni di temperatura. La risposta può però anche non essere così specifica, infatti è possibile prevedere lo stesso comportamento per diversi stimoli: è il caso della porta logica OR; infatti, in questo caso, diversi stimoli possono causare la stessa modifica, come mostrato nella Figura 4.1. Infine, è possibile progettare una risposta associabile alla porta logica AND; ossia: per avere la risposta saranno necessari più stimoli diversi che agiscono contemporaneamente sul polimero d'interesse.

Sempre in riferimento a Figura 4.1 si osserva come la risposta può essere progettata diversamente da una tipica logica booleana; si noti infatti come siano possibili altre tre possibili risposte, che non rientrano nella suddetta categoria: la risposta sequenziale, cumulativa e complessa.

Quando si parla di risposta sequenziale, si prevede la presenza di uno stato intermedio, definito x_a in Figura 4.1b, attraverso il quale è necessario far passare il sistema prima di poter raggiungere la configurazione finale; ovviamente, gli stimoli necessari per le due trasformazioni non sono gli stessi; questo tipo di risposta può infatti essere utile per poter "attivare" la sensibilità del polimero. La risposta viene invece definita cumulativa quando sono necessarie diverse condizioni, diversamente da quanto definito prima: in riferimento a Figura 4.1b, la risposta cumulativa può essere vista come la necessità di raggiungere diversi stati x_a e x_b , non sequenziali tra loro, per far rispondere il polimero. Infine, la risposta di tipo complesso è una risposta che racchiude in sé una progettazione che prescinde da tutte le precedenti e che può comprenderle o no tutte quante.

Come già sottolineato più volte, nel corso di questa tesi si andranno ad esaminare i polimeri sensibili ad un unico stimolo e che soddisfino questa unica condizione senza il passaggio attraverso stadi intermedi; in poche parole: tratteremo polimeri con risposta del tipo YES gate. Ovviamente, esistono diverse tipologie di polimero, ognuna capace di rispondere secondo questo schema a diversi stimoli esterni, di cui una efficace descrizione viene fornita, ancora una volta, dalla review di Badeau e DeForest [20], Figura 4.2.

Come si può notare dalla figura appena citata, la flessibilità di questa tipologia di polimeri è ampissima; noi, ci concentreremo sui polimeri sensibili al *pH*.

4.1 TEORIA DELLA SOLUZIONE DI FLORY-HUGGINS⁵

Per descrivere le modifiche di un polimero sensibile alle variazioni di pH si descriva innanzitutto il comportamento di un polimero in soluzione, facendo riferimento alla teoria della soluzione di Flory-Huggins.

Un polimero entra in soluzione nel momento in cui interviene un solvente che presenta una buona interazione col suddetto e ne permette il conseguente "rilassamento", ossia l'apertura, delle macromolecole; se non saremo in presenza di un buon solvente, il polimero tenderà a chiudersi su sé stesso, ossia a collassare. Nel caso di un polimero reticolato (non solubile), il rilassamento conseguente all'interazione con un buon solvente permetterà un'espansione volumetrica dello stesso, causando il rigonfiamento del polimero; in particolare, maggiore sarà il numero dei legami intercatena (quindi maggiore sarà la reticolazione) e minore sarà la possibilità di espansione del suddetto.

Un buon solvente dovrebbe essere in grado di isolare ogni singola catena dalle altre; questo dipenderà dalle sue specifiche, soprattutto definite in relazione allo specifico polimero con il quale interagisce. Definiamo un buon solvente, almeno al livello ideale, in maniera molto semplice: seguendo la regola del simile scioglie simile. La similarità chimica fra polimero e solvente è una buona indicazione per la solubilità (e. g. solventi polari scioglieranno polimeri polari).

⁵ [127, 72]



Figura 4.3. Modello per una soluzione polimerica definito da Flory; i siti grigi rappresentano il polimero (polymer) e quelli bianchi il solvente (solvent). [127]

Ovviamente, a queste considerazioni se ne assoceranno altre, tra le quali possiamo annoverare il peso molecolare: per un dato solvente ad una data temperatura, la solubilità di un polimero diminuirà all'aumentare del peso molecolare.

La possibilità che si abbia solubilizzazione è definita su base termodinamica. Si prenda in esame il calcolo dell'energia libera di Gibbs della miscela polimero-solvente:

$$\Delta G_M = G_{12} - (G_1 + G_2) \tag{4.1}$$

dove il pedice M indica la miscela; mentre i pedici 1 e 2 indicano i componenti puri. Se il valore di ΔG_M risulta minore di zero allora sarà possibile la miscelazione delle due specie e tale miscelazione sarà spontanea; viceversa, ovviamente, per valori di $\Delta G_M > 0$.

Richiamiamo un'altra equazione della termodinamica, la quale permette di esprimere il valore dell'energia libera di Gibbs in base al calore di miscelazione (contributo entalpico ΔH_M) e delle variazioni conformazionali (contributo entropico ΔS_M), considerando temperatura e pressione costanti:

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T \Delta S_M \tag{4.2}$$

Per descrivere il contributo entropico del sistema si fa riferimento al reticolo di Flory (Figura 4.3). L'inserimento del solvente nel polimero fa variare il numero di conformazioni possibili del reticolo; tale valore permette di quantificare l'entropia riferendosi alla equazione di Boltzman:

$$S = k \ln \Omega \Longrightarrow \Delta S_M = k_B [\ln \Omega_{12} - (\ln \Omega_1 + \ln \Omega_2)]$$
(4.3)

dove Ω_{12} è il numero totale di disposizioni di uguale energia nella miscela ideale, Ω_1 numero totale di disposizioni di uguale energia nel solvente puro, Ω_2 numero totale di disposizioni di uguale energia nel polimero puro; infine k_B è la costante di Boltzman.

Il valore così descritto può essere espresso in funzione del numero di molecole componenti le due specie (N_1 – numero di molecole del solvente; N_2 – numero di molecole del polimero, ossia le macromolecole), che, grazie all'approssimazione di Stirling, riescono ad esprimere in maniera concisa la variazione di entropia in seguito alla miscelazione (Equazione 4.4).



Figura 4.4. Andamento del contributo entropico di miscelazione, calcolato rispetto al numero n_{site} di siti disponibili, espresso in relazione alla frazione volumetrica di polimero (ϕ) presente nel volume totale. i numeri riportati accanto alle curve rappresentano il grado di polimerizzazione; nel caso mostrato si ha: 1; 3; 10;100. [127]

$$\Delta S_M = -k_B \left(N_1 \ln \frac{N_1}{N_1 + N_2} + N_2 \ln \frac{N_1}{N_1 + N_2} \right)$$
(4.4)

Tuttavia, visto che le dimensioni delle molecole delle due specie sono molto diverse, non ci sarà una buona corrispondenza tra i dati sperimentali ed Equazione 4.4; sarà quindi meglio effettuare le valutazioni in relazione al numero delle unità monomeriche che compongono la macromolecola, n_p . Inoltre, il suddetto parametro è facilmente inseribile all'interno della relazione per via di un fattore facilmente misurabile: la frazione volumetrica del polimero in soluzione, ϕ_2 ; valore al quale sono riferibili anche le informazioni relative al solvente, tanto da poter scrivere: $\phi_2 \equiv \phi \ e \ \phi_1 = 1 - \phi$.

In questo contesto possiamo definire le grandezze utilizzate finora in relazione alla frazione volumetrica occupata dal polimero (ϕ) e al numero totale di siti disponibili nel reticolo $n_{site} = n_p + n_s$; dove n_s è il numero delle molecole di solvente.

$$\phi \cdot n_{site} = n_p \cdot N$$
, $(1 - \phi) \cdot n_{site} = n_s$ (4.5)

dove *N* definisce la dimensione di una macromolecola polimerica; identificabile come il numero di siti che vengono occupati da una macromolecola; a volte approssimabile come lunghezza di catena o grado di polimerizzazione, anche se non è questo il suo significato fisico. In queste condizioni si può modificare nuovamente l'equazione dell'entropia di miscelazione Equazione 4.4, riferendo il calcolo al numero totale di siti disponibili nel reticolo, n_{site} .

$$-\frac{\Delta S_M}{k_B \cdot n_{site}} = \frac{\phi}{N} \ln \phi + (1 - \phi) \ln(1 - \phi)$$
(4.6)

L'andamento di Equazione 4.6 può efficacemente essere illustrato da Figura 4.4, dove risulta chiaro l'effetto del parametro N, che, a questo punto del discorso, può essere approssimato come il grado di polimerizzazione. È facile notare come l'aumento del grado di polimerizzazione del polimero consista in un abbassamento del contributo entropico di miscelazione, assunti stessi valori di frazione volumetrica, ϕ .

Nel caso ideale potremmo già calcolare ΔG_M , perché $\Delta H_M = 0$; ma, nel caso reale, ci sarà una certa interazione tra il polimero e il solvente, dunque $\Delta H_M \neq 0$. L'entalpia di miscelazione (ΔH_M) è

Dimensioni	Geometria	Z	
2	Quadrata	4	Figura 4.6
2	Triangolare	6	Figura 4.7
3	Cubica	6	Figura 4.8
3	Diamante	4	Figura 4.9

Tabella 4-1. Valori del "lattice coordinate" Z in relazione alla geometria a disposizione [127]



Figura 4.5. Posizioni reticolari occupate completamente dal polimero (polymer) e dal solvente (solvent), che quando separate presentano solo una tipologia di interazione alla quale è associata l'energia corrispondente ($\varepsilon_{1,1}$ o $\varepsilon_{2,2}$, rispettivamente), miscelate presentano ora interazioni miste ($\varepsilon_{1,1}$, $\varepsilon_{2,2}$, $\varepsilon_{1,2}$). [127]

correlabile alle stesse quantità appena definite per il contributo entropico (Equazione 4.6) mediante il parametro di Flory-Huggins χ_{FH} (Equazione 4.7).

$$\Delta H_M = \chi_{FH} \phi_1 \phi_2 \tag{4.7}$$

Si noti che è stata usata la nomenclatura definita inizialmente: con ϕ_1 e ϕ_2 che rappresentano le frazioni in volume del solvente (1) e del polimero (2). Il parametro χ_{FH} è esprimibile in relazione alla differenza tra l'energia necessaria per creare l'interfaccia tra il solvente e il polimero ($\varepsilon_{1,2}$) e l'energia necessaria per rompere l'interazione tra le molecole del polimero ($\varepsilon_{2,2}$) e quelle del solvente ($\varepsilon_{1,1}$), Figura 4.5; inoltre, è un parametro dipendente dalla temperatura, oltre che dallo spazio disponibile, identificabile con *Z* ("lattice coordinate"), ossia ciò che identifica la geometria del reticolo nel quale si identifica lo spazio (Tabella 4-1).



Figura 4.6. Reticolo a geometria quadrata. [127]



Figura 4.7. Reticolo a geometria triangolare. [127]



Figura 4.8. Reticolo a geometria cubica. [127]



Figura 4.9. Reticolo a geometria diamante. [127]

$$\chi_{FH} = Z \frac{\varepsilon_{1,2} - \frac{\varepsilon_{1,1} + \varepsilon_{2,2}}{2}}{k_B T}$$
(4.8)

Si può osservare come per valori del parametro di Flory-Huggins negativi ($\chi_{FH} < 0$) si avrà una preferenza per l'interazione polimero-solvente; viceversa, per valori positivi ($\chi_{FH} > 0$), saranno preferite le interazioni polimero-polimero e solvente-solvente.

Ovviamente, anche in questo caso, la relazione può essere espressa in relazione dei parametri di maggiore interesse, come già fatto per il contributo entropico (Equazione 4.6).

$$\frac{\Delta H_M}{k_B T \cdot n_{site}} = \chi_{FH} \cdot \phi(1 - \phi) \tag{4.9}$$

In Figura 4.10 si può apprezzare l'andamento dell'entalpia in funzione della frazione volumetrica ϕ ; inoltre, si nota come sia stata rappresentata l'energia interna al posto dell'entalpia: considerare l'eguaglianza tra entalpia e l'energia interna è un'approssimazione che non induce errori nelle condizioni che si sono prese qui in considerazione, ovvero di pressione costante.

Noti entrambi i contributi (Equazione 4.6 ed Equazione 4.9), possiamo inserirli all'interno della relazione dell'energia libera di Gibbs (Equazione 4.2).



Figura 4.10. Rappresentazione dell'andamento del contributo entalpico in funzione della frazione volumetrica di polimero ϕ . si nota come, sulle ordinate sia indicato il valore di energia libera, ma, in condizioni di pressione costante, come quelle che stiamo considerando adesso, l'approssimazione $\Delta H_M \approx \Delta U_M$ è eseguibile. [127]



Figura 4.11. Rappresentazione della differenza di potenziale chimico tra il polimero fuso e il polimero in soluzione, espressa in funzione della frazione volumetrica del polimero. In figura sono anche indicati gli spostamenti in relazione al variare del parametro di Flory-Huggins (χ_{FH}) e della lunghezza di catena (N). [127]

$$\frac{\Delta G_M}{k_B T \cdot n_{site}} = \frac{\phi}{N} \ln \phi + (1 - \phi) \ln(1 - \phi) + \chi_{FH} \cdot \phi(1 - \phi)$$
(4.10)

Equazione definibile anche in maniera più generale esprimendo n_{site} (Equazione 4.5).

$$\frac{\Delta G_M}{k_B T} = n_p \ln \phi + n_s \ln(1 - \phi) + \chi_{FH} n_s \phi \tag{4.11}$$

La teoria di Flory-Huggins fin qui espressa non prende in considerazione diversi parametri, come, e. g. la rigidità di catena, l'ingombro sterico, o anche la tipologia di connessione tra le molecole; ciò nonostante permette di prevedere la solubilità di un polimero all'interno di un certo solvente. Questo è governato dal ΔG_M , ma per la descrizione del processo si preferisce far riferimento alla differenza di potenziale chimico tra il polimero fuso e la soluzione polimerica, $\Delta \mu_p$ (Equazione 4.12).

$$\frac{\Delta\mu_p}{k_BT} = \left(\frac{\partial}{\partial n_p}\frac{\Delta G_M}{k_BT}\right)_{T,p,n_s} = \ln\phi + N[\chi_{FH} - 1 + (1 - 2\chi_{FH})\phi + \chi_{FH}(\phi)^2] \quad (4.12)$$

Da Equazione 4.12, si nota la presenza di due termini a destra dell'equazione: il primo, $\ln \phi$, è il termine corrispondente alla soluzione ideale; il secondo contiene in sé l'informazione della nonidealità, più precisamente: il contributo $N[(1 - 2\chi_{FH})\phi + \chi_{FH}(\phi)^2]$, visto che $N[\chi_{FH} - 1]$ è un valore che non influenza sostanzialmente il processo. La variazione della differenza di potenziale chimico $\Delta \mu_p$ viene rappresentata in Figura 4.11; come si nota dalla figura appena citata, la curva è influenzata sia dalla frazione volumetrica del polimero (ϕ), sia dal parametro di Flory-Huggins (χ_{FH}) e sia dalla lunghezza della catena (N); ciò nonostante, l'osservazione di maggiore interesse è quella che evidenzia l'elevata corrispondenza tra il caso ideale e l' Equazione 4.12 valutata per $\chi_{FH} = 1/2$.

È stato sottolineato il contributo del parametro di Flory-Huggins piuttosto che quello della lunghezza di catena per una semplice motivazione: la lunghezza di catena ha l'unico effetto di amplificare la deviazione del suddetto parametro dall'idealità; ovvero, osservando il contributo di non-idealità $N[(1 - 2\chi_{FH})\phi + \chi_{FH}(\phi)^2]$, si può notare come il fattore tra parentesi quadre cresca, definita una certa frazione volumetrica di polimero, al crescere del primo addendo, dato che $\chi_{FH}(\phi)^2$ può essere considerato trascurabile per via del fattore al quadrato. Ecco perché per $\chi_{FH} = 1/2$



Figura 4.12. Rappresentazione del contributo di rapporto del potenziale chimico del sistema polimero solvente, di una determinata lunghezza di catena (*N*), espresso per diversi valori del parametro di Flory-Huggins χ : $\chi = 0.595$; $\chi = 0.605$; $\chi = 0.615$. Si osservi che per $\chi = 0.605$ si ha un punto stangnante ($\phi = \phi_c$). [127]

abbiamo, soprattutto per basse frazioni volumetriche, una variabilità minima dall'idealità, anche al crescere di *N*.

Analizzando più da vicino quanto appena detto, ci si rende conto che le condizioni che rasentano l'idealità si trovano per valori positivi di χ_{FH} , ovvero per valori del parametro di Flory-Huggins tali per cui l'entalpia di miscelazione (Equazione 4.9) è positiva, dunque l'interazione tra polimero e solvente sarà sfavorita. In particolare, si osserva come la tipologia di variazione favorisca l'uno o l'altro contributo dell'energia libera e, di conseguenza, della differenza di potenziale (Equazione 4.12); in altre parole:

- per $\chi_{FH} < 1/2$, l'interazione repellente tra polimero e solvente è abbastanza debole da permettere una separazione efficace;
- per $\chi_{FH} > 1/2$, l'interazione repellente tra polimero e solvente è talmente forte che non si riesce ad isolarli.

Ovviamente, per valori negativi del suddetto parametro, avremo un'interazione costruttiva tra le componenti del sistema; tuttavia, un'interazione di questo tipo è molto poco comune per i polimeri.

4.1.1 Separazione di fase

Ora, visto che l'interazione tra una specifica coppia polimero-solvente è associabile ad un preciso valore di χ_{FH} , in condizioni ambientali e di produzione impostate (pressione e temperatura noti, così come la lunghezza di catena del polimero), quale sarà l'unico altro parametro agente? La frazione volumetrica del polimero, ϕ , mediante la quale sarà possibile determinare gli intervalli di miscibilità e immiscibilità tra le due fasi (Figura 4.13).

Per farlo è necessario valutare la differenza di potenziale chimico di spostamento, $\Delta \mu_{rep}$; ossia, la variazione del potenziale chimico del polimero, $\Delta \mu_p$, valutata in relazione alla variazione del potenziale chimico del solvente ($\Delta \mu_s$), che, costretto a riorganizzarsi in seguito all'inserimento del polimero con lunghezza di catena N, assume il valore di $N\Delta \mu_s$; variante, in funzione di ϕ , come indicato nella Figura 4.14.

$$\Delta\mu_{rep} \equiv \Delta\mu_p - N\Delta\mu_s$$

$$\Rightarrow \frac{\Delta\mu_{rep}}{k_B T} = \ln\phi + 1 - N - N\ln(1-\phi) + \chi_{FH}N(1-\phi)$$
(4.13)

È importante analizzare Figura 4.14 in relazione alla variazione di $\Delta \mu_{rep}$ rispetto a ϕ , in quanto, con riferimento a Figura 4.11, si osserva come il contributo delle energie chimiche aumenti



Figura 4.13. Raffigurazione della linea spinodale, identificante l'intervallo di immiscibilità tra $\phi_A e \phi_B$. inoltre, nella figura si rappresenta anche il parametro critico ϕ_c , ovvero un valore del parametro di Flory-Huggins (qui indicato con χ) al quale corrisponderà un unico punto di instabilità e non un intervallo come al solito. [127]

all'aumento della frazione volumetrica del polimero, per ogni intervallo di ϕ ; dunque, una flessione di $\Delta \mu_{rep}$ può unicamente essere identificata con una variazione nel parametro di Flory-Huggins, visto che, come abbiamo detto, gli altri parametri (e. g. la temperatura) saranno costanti. Quanto appena detto può essere interpretato in questo modo: per una diminuzione del potenziale chimico di spostamento si avrà immiscibilità; e viceversa per un aumento dello stesso. Date queste condizioni possiamo calcolare l'intervallo di miscibilità calcolando i punti in cui ci sarà tale variazione.

$$\frac{\partial}{\partial \phi} \left(\frac{\Delta \mu_{rep}}{k_B T} \right) = 0 \Rightarrow \frac{1}{\phi} + \frac{N}{1 - \phi} = 2\chi_{FH} N \tag{4.14}$$

L' Equazione 4.14 può essere utilizzata per descrivere la linea spinodale, ossia il termine che separa la regione di stabilità dalla regione di instabilità, come descritto in Figura 4.13. In questa curva si osserva anche il parametro critico χ_c , identificabile come il fattore di compatibilità tra polimero e solvente per il quale si avrà un unico punto di instabilità: ϕ_c .

Quando il sistema polimero-solvente si troverà all'interno della zona d'instabilità presentata in Figura 4.14, subirà una separazione di fase; separazione che darà origine a due fasi ($\phi_1 e \phi_2$), di frazione volumetrica del polimero diverse $\phi_1 < \phi_A e \phi_2 > \phi_B$. Si precisi che in questi punti saranno presenti entrambe le fasi (sia il solvente, sia il polimero), ognuna con il proprio potenziale chimico.

Ora, nel caso in cui ci trovassimo con un polimero di frazione volumetrica compresa fra gli estremi appena descritti ($\phi_1 < \phi < \phi_A$, oppure $\phi_B < \phi < \phi_2$); in particolare, risulta evidente dall'andamento di Figura 4.11, come per qualunque valore di ϕ compreso tra ϕ_1 e ϕ_A la variazione



Figura 4.14. Intervallo di immiscibilità, identificato via frazioni volumetriche limite del polimero: $\phi_A e \phi_B$. [127]



Figura 4.15. Raffigurazione della linea spinodale, identificante l'intervallo di immiscibilità tra ϕ_A e ϕ_B (unstable) e di metastabilità (metastable) tra ϕ_1 e ϕ_A e ϕ_B e ϕ_2 . Sono rappresentate le curve di separazione: linea spinodale (spinodal line) e quella di coesistenza (coexistence line). Inoltre, anche in questo caso, si rappresenta il parametro critico ϕ_c . [127]

di potenziale del polimero associato sia sempre maggiore di quella presente nella condizione di smiscelamento ($\phi_1 e \phi_2$):

$$\Delta \mu_p(\phi) > \Delta \mu_p(\phi_1) \tag{4.15}$$

ciò vuol dire che, benché ci troviamo nell'intervallo di miscibilità, i valori di potenziale ad esso corrispondenti non sono quelli di equilibrio, dunque la miscela sarà in condizioni metastabili, facilmente mutabili dall'esterno. Stesso discorso per ϕ compreso tra ϕ_B e ϕ_2 , nel quale però si dovrà tenere in considerazione la variazione di $\Delta \mu_s(\phi)$, che segue, logicamente, l'andamento opposto di quello di Figura 4.11.

Il diagramma completo è rappresentato in Figura 4.15; nella quale si evidenzia anche la cosiddetta curva binodale (o curva di coesistenza), data dall'insieme dei punti di ϕ_1 e ϕ_2 nelle diverse condizioni entalpiche (per diversi χ_{FH}).

È interessante osservare lo spostamento delle curve espresse da Equazione 4.14 per diverse lunghezze di catena, *N*; infatti, osservando la suddetta equazione si può concludere come all'aumento della lunghezza delle catene i valori di frazione volumetrica del polimero ϕ che rispettano



Figura 4.16. Spostamento della linea spinodale (a) e della linea di coesistenza (b) in funzione di diversi valori di lunghezza di catena N: N = 32; N = 100; N = 316; N = 1000. La curva tratteggiata e i pallini vuoti raffigurano l'andamento del punto critico. [127]

l'equazione saranno sempre più bassi, Figura 4.16a; inoltre, da Figura 4.16b, si vede come anche la linea di coesistenza vari con la modifica della lunghezza di catena.

In entrambi i casi di Figura 4.16 si osserva come il valore critico tenda ad un limite, coerente tra la linea spinodale e quella binodale, identificabile come condizione θ e verificabile nel caso di catena infinita $(N \rightarrow +\infty)$, ovvero quando la catena raggiungerà lunghezze tali da poter collassare su se stessa, escludendo completamente il solvente e tornando ad occupare un unico sito come previsto dalle condizioni ideali.

$$\chi_c = \frac{1}{2} , \qquad \phi_c = 0$$
(4.16)

Data l'Equazione 4.16 sembra che queste condizioni non siano rilevanti, visto che potremo verificarle solo per $\phi = 0$, ma è importante notare come la condizione θ rappresenti, in generale, le condizioni necessarie affinché il sistema polimero-solvente possa considerarsi pseudo-ideale: $\chi_{FH} = 1/2$. Per dimostrarlo dobbiamo evidenziare la dipendenza del parametro di Flory-Huggins anche da altri parametri; quello di maggior interesse e che rientra anche nelle condizioni ideali è la temperatura.

Flory osservò come il parametro da loro definito avesse due componenti: una entalpica e una entropica. [23]

$$\chi_{FH} = \chi_S + \left(\frac{\chi_H}{T}\right) \tag{4.17}$$

dove χ_H e χ_S sono costanti unicamente dipendenti dallo specifico sistema polimero-solvente. Quindi, come prima avevamo la condizione di compatibilità chimica per la quale un solvente possa definirsi solvente θ , adesso abbiamo la temperatura, che ci permette di determinare le condizioni θ in maniera distaccata da quelle critiche (T_{θ}).

$$\chi_{FH} = \frac{1}{2} \to \frac{1}{2} = \chi_S + \left(\frac{\chi_H}{T_{\theta}}\right) \tag{4.18}$$



Figura 4.17. Diagramma di separazione di fase espresso in relazione alla temperatura. (a) Diagramma di tipo UCST; (b) diagramma tipo LCST. [127]



Figura 4.18. (a) Diagramma di tipo UCST con rappresentazione della temperatura teta, T_{θ} ; (b) diagramma di tipo LCST con rappresentazione della temperatura teta, T_{θ} . [127]

$$\chi_S = \frac{1}{2} - \left(\frac{\chi_H}{T_{\theta}}\right) \tag{4.19}$$

$$\chi_{FH} = \chi_S + \left(\frac{\chi_H}{T}\right) = \frac{1}{2} - \chi_H \left(\frac{1}{T_\theta} - \frac{1}{T}\right)$$
(4.20)

Si noti come Equazione 4.20 soddisfi quanto precedentemente descritto da Equazione 4.8, ossia: $\chi_{FH} \propto T^{-1}$; proporzione che ci permette di rappresentare il diagramma di Figura 4.15 rispetto alla temperatura piuttosto che al parametro di Flory-Huggins: Figura 4.17. I diagrammi ottenibili sono due: diagramma UCST (Upper Critical Solution Temperature) e LCST (Lower Critical Solution Temperature).

In Figura 4.17a viene presentato il diagramma di fase più comune per i polimeri, ossia un diagramma di fase UCST (Upper Critical Solution Temperature); qui, viene rispettata l'analogia appena descritta tra il parametro di Flory-Huggins e la temperatura, infatti, se in Figura 4.15 si osserva completa miscibilità per χ_{FH} al di sotto della linea di coesistenza, adesso si avrà immiscibilità per valori di temperatura maggiori. Inoltre, anche in questo caso, come visto prima, avremo un valore di temperatura critico, ossia un valore nel quale tutte le frazioni volumetriche garantiranno miscibilità eccetto quella di ϕ_c ; la temperatura alla quale si verificano queste condizioni viene detta temperatura UCST.

Nel solubilizzare polimeri polari in solventi polari (e. g. l'acqua) si osserva un comportamento inusuale con una diminuzione della solubilità all'aumentare della temperatura; infatti, in questo caso, la temperatura critica di solubilità è posta nel minimo della curva (LCST, Lower Critical Solution Temperature). Questo fenomeno è il risultato dell'instaurarsi, a bassa temperatura, di legami a Idrogeno tra il polimero e il solvente, che, vista la labilità termica del legame, si romperanno all'aumento della stessa.

Il comportamento appena descritto non contraddice quanto detto finora rispetto alla relazione tra parametro di Flory-Huggins e temperatura, perché, in questo caso, dovremo prendere in considerazione un contributo entalpico negativo in Equazione 4.20 ($\chi_H < 0$); [23] dunque: all'aumento della temperatura avremo un'influenza sempre minore del contributo entalpico (cosi come succedeva anche in UCST), solo che, in questo caso, la sua progressiva assenza corrisponde con un aumento del valore complessivo del parametro di Flory-Huggins.

Per la temperatura, il corrispettivo della lunghezza di catena N è il peso molecolare, responsabile dello spostamento della curva di coesistenza. La variazione della temperatura critica con il peso molecolare ha un andamento simile a quello osservato in Figura 4.16, alla luce di $\chi_{FH} \propto T^{-1}$: all'aumento del peso molecolare, la temperatura critica sarà sempre maggiore e verrà raggiunta a frazioni volumetriche sempre minori. Inoltre, anche in questo caso, nelle condizioni limite (pesi molecolari infiniti) avremo un comportamento del sistema associabile all'idealità; tuttavia, il parallelo termico permette una più facile valutazione, effettuata sperimentalmente, delle condizioni θ per un determinato sistema polimero-solvente, la quale sottolinea la corrispondenza tra le condizioni critiche e quelle θ nel caso limite, ma evidenzia anche una variazione trascurabile di T_{θ} con il peso molecolare. Così facendo avremo sempre $T_{\theta} \ge T_c$ (Figura 4.18).

Il valore A_2 rappresentato in Figura 4.18 è uno dei coefficienti viriali, che in questa trattazione non verrà approfondito; si dica solo che è un fattore utilizzato per avvicinare i dati sperimentali a quelli previsti da quelli analitici, e che la sua positività o negatività è correlabile alle informazioni già definite per il parametro di Flory-Huggins, come graficamente mostrato in Figura 4.19.

4.1.2 Comportamento reale

Per quanto ci si sforzi di rappresentare le condizioni reali, ci saranno sempre delle differenze tra i valori analitici e quelli sperimentali, che per essere limate hanno bisogno di diverse specificazioni.

Una prima specificazione è quella riguardante la lunghezza di catena, N; l'utilizzo di questo valore consente una buona approssimazione finché ci si troverà in condizioni di una miscela omopolimerica, ossia con tutte le catene della stessa lunghezza; all'aumento della polidispersità, infatti, si avrà un progressivo allontanamento dai valori ottenuti dalle equazioni sovrastanti. Ciò nonostante, se si sostituisse N con $\langle N \rangle$, ossia la media numerica delle diverse lunghezze di catena N_i , si riuscirà ad avere una buona approssimazione dei dati reali.

$$\langle N \rangle = \frac{\sum_{i} \phi_{i}}{\sum_{i} \frac{\phi_{i}}{N_{i}}} = \frac{\sum_{i} N_{i} \cdot n_{i}}{\sum_{i} n_{i}}$$
(4.21)

dove n_i , $N_i \in \phi_i$, mantengono gli stessi significati espressi nelle equazioni precedenti (Equazione 4.4 e Equazione 4.5), solo che espressi per la specie i-esima.

Un'altra cosa da tenere in considerazione quando si cerca di approssimare il comportamento reale è la dipendenza del parametro di Flory-Huggins in relazione alla concentrazione del polimero in



Figura 4.19. Diagramma di miscibilità riportato in relazione al parametro di Flory-Huggins (χ), al quale viene correlato il secondo coefficiente viriale (A_2). [127]

soluzione; in particolare, da Equazione 4.22, si può osservare come il suddetto parametro venga maggiorato sempre più all'aumento della concentrazione del polimero in soluzione, espressa con il coefficiente (σ).

$$\chi_{FH} = \chi_{FH}^{diluite} + \sigma \cdot \phi \tag{4.22}$$

Questa valutazione è molto importante perché, nelle condizioni di Flory-Huggins utilizzate finora, la soluzione è diluita.

4.2 POLIMERI SENSIBILI AL pH^6

Come già detto ad inizio capitolo, i polimeri sensibili al pH fanno parte della macro-famiglia dei polimeri "stimuli-responsive"; ovvero delle specie che sono in grado di variare le loro proprietà e/o le loro caratteristiche morfologiche in seguito ad uno stimolo esterno. Tra gli stimoli possiamo discernere tra quelli fisici (e. g. temperatura) e quelli chimici (e. g. pH).

I polimeri sensibili al pH sono polielettroliti acidi o basici (rispettivamente: poli-acidi e poli-basi), che presentano una costante di dissociazione apparente (K_a , per gli acidi, o K_b , per le basi) molto dipendente dalle caratteristiche di catena, che rende difficile la completa ionizzazione di tali materiali. La dissociazione è possibile grazie alla presenza di gruppi funzionali leggermente acidi o leggermente basici; tuttavia, l'entità di tale dissociazione sarà variabile a seconda di diversi fattori. Esempi di poliacidi e polibasi sono mostrati in Figura 4.21 e Figura 4.20.

Ora, sebbene gli acidi e le basi debbano essere trattati in riferimento alle loro rispettive costanti di dissociazione apparente, spesso si tende ad utilizzare solo quella acida, grazie ad una possibilità espressa delle equazioni di equilibrio: non essendo direzionali (e. g. come la dissociazione in acqua di cloruro di Sodio, NaCl), possono anche essere lette nel verso opposto, ossia leggendola come l'equilibrio per la deprotonazione dell'acido coniugato. [24, 25, 26, 27] La modifica non crea difficoltà interpretative, anzi permette anche di osservare meglio il comportamento delle diverse specie a seconda della modifica di pH, come efficacemente riassunto da Figura 4.22.

Dalla Figura 4.22 possiamo osservare il comportamento dei polimeri di diversa natura e categorizzarlo in questo modo:

- i poliacidi (ossia polimeri contenenti gruppi funzionali acidi) si deprotonano per $pH > pK_a$;
- le polibasi (ossia polimeri contenenti gruppi funzionali basici) si protonano per $pH < pK_b$.

In relazione a quanto detto prima, si noti che, se avessimo considerato l'acido coniugato della base, avremmo dovuto dire: le polibasi si deprotonano per $pH > pK_a$, cosa vera ma che non terrebbe conto del comportamento specifico; infatti, nel caso volessimo esprimerlo in relazione agli acidi coniugati delle polibasi piuttosto che ad esse, sarebbe più efficace una definizione che si concentra sulla presenza della carica:

- i poliacidi (ossia polimeri contenenti gruppi funzionali acidi) sono carichi negativamente per pH > pK_a e neutri per pH < pK_a;
- le polibasi (ossia polimeri contenenti gruppi funzionali basici) sono cariche positivamente per $pH < pK_a$ e neutre per $pH > pK_a$.

Quello descritto da in Figura 4.22 (a pagina 52) riassume efficacemente il comportamento di una YES gate descritta ad inizio capitolo, il che raffigura il tipico comportamento dei polimeri sensibili al *pH*; ora, come visto dalla discussione relativa ai diagramma di fase nel sotto-paragrafo *Separazione di fase*, al variare della compatibilità chimica di un determinato polimero si potranno avere delle modifiche di fase risultanti anche in un comportamento più complesso, come l'auto-aggregazione. Nel caso dei polimeri sensibili al *pH*, si ha una modifica sostanziale della catena polimerica, in seguito

⁶ [85, 65, 22, 20]



Figura 4.20. Esempi di poliacidi. [22]

alla nascita delle cariche lungo di essa, che può essere ben descritto da Figura 4.23 (a pagina 52), nella quale si rappresenta il comportamento di un polimero in un solvente polare.

La bibliografia citata per questo paragrafo addebita il passaggio dallo stato espanso allo stato collassato semplicemente ad un contributo elettrico; ossia: la nascita della carica permette una repulsione tale da far staccare le catene tra loro; viceversa, nel caso di assenza di carica, le forze idrofobiche prevarranno e si avrà aggregazione. Tale descrizione è una valutazione specifica rispetto alle considerazioni di natura più generale espresse nel paragrafo precedente (*Teoria della soluzione di Flory-Huggins*); nel momento in cui si avranno delle interazioni favorevoli tra il polimero e il solvente, ossia quando il polimero, caricatosi elettricamente, interagirà in maniera meno repellente con le molecole polari della soluzione, il contributo entalpico non riuscirà a prevalere su quello entropico e le molecole del solvente riusciranno ad interporsi tra le catene, con l'espansione come





Figura 4.21. Esempi di polibasi. [22]

risultato macroscopico; viceversa nel caso in cui il polimero non sarà carico: prevarrà il contributo entalpico e il sistema cercherà di minimizzare la superficie di interazione con il solvente, per cui le sue molecole non riusciranno a penetrare la catena polimerica e il contributo macroscopico sarà il collasso di catena. Valutazione riconfermata dal lavoro di Sakurai et al. (1994) [28], che mostra la diminuzione di χ_{FH} all'aumento del grado di ionizzazione α : Figura 4.24 (a pagina 53).



Figura 4.22. (a) Reazione di un poliacido, che si deprotona (e si carica negativamente) in soluzione basica $(+OH^{-})$; (b) reazione di una polibase, che si deprotona (e perde la sua carica positiva) in soluzione acida $(+H^{+})$. [65]

La descrizione che addebita tutto alla presenza o meno di una carica elettrica capace far separare le macromolecole è estremamente utile per descrivere efficacemente e senza errori il comportamento del sistema; tuttavia, come appena precisato, non si deve cedere alla tentazione di considerare quelli come gli unici contributi, soprattutto quando si parla di polimeri. Infatti, l'autoassemblaggio è generalmente definito come "processo mediante il quale le molecole o parte delle molecole formano spontaneamente delle strutture ordinate, senza la necessità di uno stimolo esterno, spinte da interazioni specifiche di natura non-covalente.", al quale si deve aggiungere che "anche se possono presentarsi strutture organizzate come la cristallizzazione, l'auto-assemblaggio è caratterizzato da un'organizzazione spontanea e reversibile delle componenti molecolari." [29]; tuttavia, quando si parla di polimeri, non si andranno a prendere in considerazione solo le interazioni tra le molecole, ma anche la morfologia della catena all'interno della quale la suddetta sarà inserita. Per questo motivo, l'auto-assemblaggio di un polimero risente del comportamento competitivo tra le varie forze in gioco. [29]

• Le *interazioni elettrostatiche* sono forze a lungo raggio che possono essere sia di natura attrattiva sia di natura repulsiva; la loro azione dipende dal mezzo nel quale le molecole sono inserite, in particolare dalla sua costante dielettrica; infatti, le suddette forze, possono essere schermate dall'aggiunta di sali in soluzione, perché si interporranno tra le molecole e ne perturberanno il campo di forza. Proprio quest'ultimo scenario è descrivibile mediante la distanza di Debye, κ^{-1} ; nello specifico: se la distanza tra le molecole sarà molto minore della



Figura 4.23. Raffigurazione del comportamento delle polibasi in una soluzione polare; si osserva come una variazione di pH verso valori acidi causi un collasso della catena (folded state) dalla sua condizione espansa (expanded state). [65]

distanza di Debye, $d \ll \kappa^{-1}$, allora l'effetto schermante potrà essere trascurato; viceversa, nel caso di $d \gg \kappa^{-1}$, per cui sarà l'interazione elettrostatica a poter essere ignorata.

- Le forze di Van del Waals comprendono diverse tipologie di interazioni, che esistono anche tra le molecole non cariche elettricamente; tuttavia, le più importanti sono quelle che comprendono le interazioni dipolari, siano i dipoli permanenti o meno. Queste interazioni sono sempre di natura attrattiva e seguono un andamento $U_{VdW} \propto r^{-6}$; a cui si aggiunge un comportamento lievemente direzionale, compreso nel termine di proporzionalità, non espresso nella relazione precedente.
- Il *legame a Idrogeno* è un legame di natura elettrostatica e direzionale, il quale agisce a corto raggio ed è fortemente dipendente dalla distanza presente tra l'Idrogeno e l'elemento in questione, e. g. l'Ossigeno dell'acqua, così come dall'angolo che essi formano. In sostanza, è possibile definire il legame a Idrogeno di natura sia covalente che elettrostatica. Il suddetto legame non è forte, ma, allo stesso tempo, non è così debole come si potrebbe pensare; infatti, dal puto di vista analitico si attesta con entità di $U_H \in [10; 40]kJ/mol$; e, dal punto di vista esperienziale, si ricordi che i legami che tengono insieme le catene di DNA nel nostro corpo sono legami a Idrogeno [30, 2].
- Le *forze di idratazione* sono interazioni di natura elettrostatica che si manifestano tra le specie cariche all'interno di un mezzo polare; un esempio esemplificativo è quello dello ione Sodio, *Na*⁺, in acqua. Lo ione sarà circondato da molecole di acqua, a causa della presenza della polarità negativa sulla stessa e ciò porterà alla nascita di gusci con carica superficiale positiva (quella degli Idrogeni dell'acqua), che daranno vita a interazioni repulsive a corto raggio. Solo quando l'interazione tra due ioni di segno opposto sarà abbastanza forte, i gusci verranno rotti.

La definizione di auto-assemblaggio va a determinare quelli che sono i principali responsabili della risposta del polimero; tuttavia, la tipologia di risposta che si origina in seguito all'instaurarsi delle suddette forze non dipende unicamente dall'entità delle stesse, ma è anche strettamente legata all'architettura macromolecolare.

In Figura 4.25 viene raffigurato uno schema riassuntivo, nel quale vengono presentate le diverse architetture e le loro risposte in relazione alla variazione di pH. Dalla figura risulta chiaro come l'architettura influenzi il tipo di comportamento in soluzione. Per una descrizione efficace evitiamo di definire il passaggio da acido a base o viceversa, ma definiamo generalmente un passaggio da solvofobico a solvofilico.

a) Si osserva il comportamento dei copolimeri a blocchi, associabile con quello delle molecole anfifiliche. Per descrivere in maniera più pertinente l'autoassemblaggio delle molecole



Figura 4.24. Andamento della costante di Flory-Huggins, k', in relazione del grado di ionizzazione α per diversi polimeri: (quadrati bianchi) PMA; (cerchi neri) PVI; (cerchi bianchi) PAA. [28]



wetting surface, ionic surface or thick layer

non-wetting surface, non-ionic surface or thin layer

Figura 4.25. Diverse architetture dei polimeri sensibili al pH e loro comportamento al variare del pH. (a) Copolimeri a blocchi che si auto-assemblano in micelle per via di una porzione di catena che diventa solvofobica e l'altra solvofilica. (b) Sistemi micellari che cambiano configurazione al passaggio di pH, perché le molecole solvofobiche in essi contenute diventano solvofiliche in seguito al passaggio, e viceversa per le molecole solvofiliche. (c) Idrogeli che si rigonfiano quando i gruppi presenti al loro interno diventano solvofilici. (d) Sistema micellare vuoto, anche definibile liposoma: stesso comportamento visto per i sistemi micellari semplici. (e) Architettura dendrimerica che presenta lo stesso comportamento appena presentato per gli idrogeli. (f) Polimeri ultra-ramificati che mostrano un comportamento analogo a quello appena presentato per i dendrimeri. (g) Copolimeri a stella, che, per via della loro possibilità assemblativa, consentono più forme di auto-assemblaggio, che diventano più o meno favorite a seconda delle condizioni di pH. (h) Spazzole polimeriche (polymer brushes) che si trovano in condizione distena nel momento in cui la catena è solvofilica e collassata nel momento in cui la stessa sarà solvofobica. [22]

anfifiliche, anche in relazione alle condizioni esterne (e. g. la presenza dei sali), è possibile definire il parametro di impaccamento critico (Critical Packing Parameter – CPP), definito

analiticamente come presentato in Equazione 4.23; dove V è il volume della porzione apolare della molecola; l è la lunghezza della porzione a-polare; a è la superficie ottimizzata della porzione polare all'interfaccia con l'a-polare, sezione che diminuisce con il diminuire delle interazioni repulsive.

$$CPP = \frac{V}{a \cdot l} \tag{4.23}$$

In generale è possibile tracciare delle 'thumb rules': vengono formate strutture sferiche per CPP = 1/3, e. g. micelle sferiche; strutture cilindriche per CPP = 1/2, e. g. micelle cilindriche; strutture piane per CPP = 1, e. g. lamelle bistrato. Ciò nonostante, si avrà autoassemblaggio in una struttura morfologicamente definita solo se la concentrazione del polimero supererà la concentrazione micellare critica (CMC).

- b) La presentazione appena fatta per i copolimeri a blocchi può essere facilmente trasposta in questa condizione; a differenza rispetto al caso precedente sono le caratteristiche dei blocchi compresi. Infatti, nel caso specifico, il comportamento solvofobico e solvofilico delle diverse specie risulta antagonista: quando una specie è solvofobica, l'altra sarà solvofilica; e viceversa al variare del *pH*; il che ha come conseguenza sempre una morfologia micellare.
- c) Gli idrogeli non permettono tutti i passaggi morfologici descritti finora, in quanto saranno caratterizzati dalla presenza di nodi, che impediscono alle catene di fluire. La descrizione di questa architettura verrà approfondita nel prossimo capitolo; per il momento, se ne descrive il comportamento in sintesi: nel passaggio da solvofobico a solvofilico, il gel si rigonfia; viceversa nel passaggio a solvofobico. Questo accade perché, come detto già nella descrizione generale dei polimeri sensibili al *pH*, nelle condizioni solvofiliche, il solvente riuscirà ad interporsi tra le macromolecole, separandole; ma, in questo caso, l'impossibilità di scorrimento relativo tra le stesse risulterà in un effetto di rigonfiamento.
- d) In questo caso parliamo di un'organizzazione a micella vuota, ossia a vescicole. Il comportamento è lo stesso appena visto per le micelle reversibili (in b); l'unica differenza è che, in questo caso, la morfologia che stabilizzerà l'architettura è quella vescicolare (polimorsomiche 'polisomes'), ossia quando CPP è compreso tra 1/2 e 1.
- e) I dendrimeri sono una classe di polimeri molto interessante, vista la possibilità di controllare precisamente le caratteristiche del manufatto finale (e. g. polidispersità e peso molecolare); ciò nonostante, presentano alcune problematiche in termini dimensionali, ossia: è difficile produrli con diametri molto piccoli (d < 15nm). Il loro comportamento in soluzione è lo stesso osservato per gli idrogeli (punto d): si rigonfiano quando diventano solvofili.
- f) Sono i polimeri ultra-ramificati, che presentano lo stesso comportamento dei dendrimeri, ma, vista la loro imprecisione nella struttura, non permettono di avere un controllo comparabile sulle caratteristiche morfologiche.
- g) I co-polimeri a stella (star copolymer) sono dei polimeri esteticamente molto vicini ai "semplici" copolimeri a blocchi visti nel punto a; infatti, le modalità della variazione di fase non sono dissimili. Ciò nonostante, i copolimeri a stella, vista la loro architettura più complessa sono in grado di formare diverse morfologie, oltre a quelle già presentate per i copolimeri a blocchi; infatti, con i copolimeri a stella si riescono ad ottenere anche gli idrogeli, anzi, l'utilizzo di questa morfologia come punto di partenza si è rivelato molto utile per la loro preparazione [31].
- h) Le spazzole polimeriche (polymer brushes) presentano lo stesso comportamento delle macromolecole libere in soluzione: passano da una disposizione collassata quando sono solvofobiche ad una disposizione espansa quando solvofiliche; la differenza è che, in questo caso, saranno ancorate per un'estremità ad una superficie.



Figura 4.26. Effetto del peso molecolare (M_w) e lunghezze di catena (N) sul valore della costante di dissociazione acida (pK_a) di un poliacido (PAA): (quadrati bianchi) N = 25; (cerchi bianchi)N = 70; (triangoli bianchi) N = 700. La linea continua è quella che corrisponde al comportamento del monomero (acido acrilico) [32]

4.2.1 Proprietà acido-base dei polimeri sensibili al pH

Di seguito si sottolineano più precisamente i parametri compresi nella definizione delle proprietà del polielettrolita, evidenziandone le diversità con i relativi gruppi funzionali, acidi o basi che siano. Ovviamente, si dovrà tener bene a mente che le caratteristiche peculiari di ogni polielettrolita ne influenzeranno notevolmente le proprietà.

Gli effetti possono essere valutati in relazione alle curve di titolazione [32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41] [42, 43, 44, 45, 46, 28], grazie alle quali, si potranno definire gli attori principali influenzanti il comportamento del polielettrolita.

Il primo parametro sul quale ci si concentrerà sarà il peso molecolare. Si osserva come pesi molecolari maggiori (i. e. maggiore lunghezza delle catene polimeriche) presentino una maggiore difficoltà di ionizzazione, a causa dell'aumento del potenziale elettrostatico presente in ciascun monomero. I risultati sono mostrati in Figura 4.26; dalla quale è anche possibile osservare il diverso comportamento dell'acido acrilico, i. e. del monomero, rispetto a quello del polimero corrispondente (acido poliacrilico – PAA), sottolineando come l'effetto delle cariche vicinali renda più difficile la ionizzazione della catena di PAA (grado di ionizzazione, α , cresce più lentamente nel polimero rispetto a quanto faceva nel monomero), confermando tuttavia l'andamento del suddetto in relazione al *pH*. A livello matematico si può esprimere questa differenza nella costante di dissociazione apparente, *K_a*, che può essere espressa in scala logaritmica (*pK*) con l'equazione di Henderson-Hasselbach (Equazione 4.24). [27, 26, 47] Si evidenzi come il comportamento ottenuto dal sistema di simulazione di Laguecir et al. (2006) trovi buona approssimazione con i dati sperimentali. [32].

$$\Delta pK = \underbrace{pK}_{\substack{\text{costante di dissociazione apparente del polimero}\\ = pH - pK_0 - \frac{\alpha}{1 - \alpha}} - \underbrace{pK_0}_{\substack{\text{costante di dissociazione apparente del monomero}\\ (4.24)}$$

L'effetto del peso molecolare può essere studiato in maniera più approfondita facendo riferimento a Figura 4.27 [32], la quale studia il raggio giroscopico, $\langle R_g^2 \rangle$, in funzione della variazione di *pH*; questo parametro riesce a dare un'idea del rigonfiamento del polielettrolita, evidenziando l'effetto del suddetto parametro sulla distensione di catena. L'aumento del peso molecolare porta con sé una modifica di *pK*_a e α , che, come si vede da Figura 4.27a e Figura 4.27b, influenza l'innesto del rigonfiamento: pesi molecolari maggiori corrispondono con costanti di dissociazioni acide (*pK*_a) più



Figura 4.27. Andamento di $\langle R_g^2 \rangle$ in funzione del pH (a) e del grado di ionizzazione α (b). Andamento della densità di carica volumetrica ρ in relazione del grado di ionizzazione α (c). Andamento della diffusività all'aumento del pH (d). Tutti valutati per catene di diversa lunghezza di catena N: (quadrati bianchi) N = 25; (cerchi bianchi)N = 70; (triangoli bianchi) N = 700. [32]

elevate, quindi ad acidi più deboli [27, 26, 25], il che vuole anche dire che rigonfiamenti rilevanti saranno visibili solo per gradi di ionizzazione elevati, ossia a pH molto lontani da quelli del pK_a . Un'altra modifica è sull'entità del rigonfiamento; infatti, polimeri più pesanti (pesi molecolari maggiori) mostreranno un rigonfiamento minore in valore assoluto rispetto a quelli più leggeri.

In aggiunta, risulta interessante osservare come la densità volumetrica di carica (ρ) presenti un andamento crescente fino ad un certo grado di ionizzazione (α), comune qualunque sia il peso molecolare, oltre al quale la densità di carica sarà costante, dimostrando come la conformazione della catena sia continuamente in aggiornamento al variare delle condizioni (Figura 4.27c). Si precisi che benché l'aumento del peso molecolare non abbia effetto sul grado di ionizzazione oltre il quale si assesterà il plateau, esso influenzerà il valore assoluto della densità di carica raggiunta, che diminuisce all'aumentare del suddetto. L'entità di tale effetto è in qualche modo dimostrabile anche andando a studiare la stabilità di una sospensione colloidale fornita da rivestimenti in PAA [48], per la quale si evidenzia una sempre maggiore stabilizzazione all'aumento del *pH*; effetto sempre più marcato all'aumento della lunghezza della catena, visto che con essa aumenteranno i gruppi ionizzati.

Infine, si osserva l'effetto della forza ionica *C_i* sulla catena polimerica. In generale, l'aumento della forza ionica ha due effetti: [32]

 aumenta il grado di ionizzazione α per un determinato pH, perché se aumenta l'effetto schermante degli ioni dispersi in soluzione diminuisce la mutua relazione tra i gruppi carichi presenti lungo la catena (Figura 4.28a);



Figura 4.28. Effetto della forza ionica (*log C_i*) sul grado di ionizzazione α (a), su $\langle R_g^2 \rangle$ (b) e sulla diffusività (c). comportamento valutato per campioni di PAA a diversa lunghezza di catena: (cerchi bianchi)N = 70; (triangoli bianchi) N = 700. [32]

- riduce la lunghezza di Debye, aumentando la capacità schermante della soluzione rispetto alle cariche dei polielettroliti, causando collasso della catena (Figura 4.28b).

In aggiunta a queste valutazioni, si osserva l'evoluzione di tale effetto in correlazione al peso molecolare del polimero, espresso ancora una volta per mezzo dell'informazione sulla lunghezza della catena cinetica: per PAA a basso peso molecolare (i. e. catena corta) si ha un effetto trascurabile della forza ionica; viceversa, per PAA ad alto peso molecolare (i. e. catena lunga). In relazione con quanto visto in Figura 4.28b, si precisi che avere una maggiore ionizzazione ad un determinato valore di *pH* (Figura 4.28a) non porti necessariamente con sé un rigonfiamento; infatti, preso un certo valore di *pH*, l'aumento della forza ionica causa un collasso del polimero dovuto alla modifica della lunghezza di Debye appena descritta. Questo comportamento è osservabile anche dall'aumento della diffusività (Figura 4.28c), che evidenzia anche come la rilevanza di tale effetto si esprima principalmente per lunghezze di catena maggiori (i. e. del peso molecolare).

Qualcosa di simile si osserva con l'esperimento proposto nello studio di Jaquet et al. (2013) [48]: due polimeri con diverso numero di gruppi carichi (tali per cui $n_1 > n_2$) garantiranno lo stesso grado di stabilizzazione della sospensione colloidale solo se la concentrazione di sali rispetterà uno stesso andamento: $[NaCl]_1 > [NaCl]_2$ (Figura 4.29). Dallo studio si evidenzia anche che l'effetto tende a scomparire per forze ioniche troppo elevate; ciò può essere dimostrato ricollegandosi a Figura 4.27c; forze ioniche troppo elevate andranno ad appianare le differenze tra i plateau di densità di carica raggiunti dai vari polimeri.



Figura 4.29. Andamento dello spessore delle setole polimeriche legate alla superficie (δ) in funzione della concentrazione di sali in soluzione C_{NaCl} , per due condizioni esterne: (quadrati neri) pH = 11.0: (cerchi rossi) pH = 9.1. [48]

Il fenomeno diventa esplicabile analiticamente studiando la variazione del parametro di Flory-Huggins (Figura 4.30); infatti all'aumento della forza ionica si osserverà una diminuzione di χ_{FH} , esplicabile, in linea con quanto detto prima, con il fenomeno di salting-in [39, 49].

I risultati ottenuti riguardo all'interazione tra forza ionica e la configurazione del materiale sono in accordo con quelli ottenuti da Adamczyk et al. (2006) [50]; in particolare, proprio il differente comportamento per alti e bassi gradi di ionizzazione sugella quanto affermato precedentemente: in generale si osserva un collasso della catena, ma a bassi gradi di ionizzazione l'effetto dei sali diventa minore, soprattutto a causa della presenza di altri fattori, rivelatisi più influenti sulla conformazione del polielettrolita; infatti, da Figura 4.31, si nota come la variazione della viscosità intrinseca e la velocità della suddetta variazione (coefficiente angolare della retta) vari in relazione alla frazione volumetrica di PAA inserita (ϕ), per cui ad un grado di ionizzazione massimo ($\alpha = 1 e pH = 9$) si osserva una maggiore crescita e una variazione della velocità di crescita più marcata rispetto agli stessi parametri osservati per un grado di ionizzazione minimo ($\alpha = 0,22 e pH = 4$), dimostrando come in questo caso sia più rilevante l'effetto dell'idratazione.

A supportare le conclusioni fatte finora si hanno anche altri lavori, tra i quali, e. g. quelli di Markovitz et al. (1950) [51], Reith et al. (2002) [52].

Si evidenzi anche l'effetto specifico ottenuto dai diversi ioni in soluzione: maggiore è la carica degli ioni, maggiore sarà l'effetto schermante degli stessi, chiaramente mostrato in Figura 4.32 [53], anche



Figura 4.30. Variazione del parametro di Flory-Huggins (χ) in funzione della forza ionica espressa da una soluzione acquosa (μ), valutata a diversi *pH*. (quadrati neri) *pH* = 4; (cerchi rossi) *pH* = 5; (triangoli verdi) *pH* = 6; (triangolo blu) *pH* = 6; (rombi celesti) *pH* = 10; (triangoli rossi) *pH* = 12. [39]



Figura 4.31. Dipendenza della viscosità intrinseca η dalla frazione volumetrica di PAA ϕ_v per diverse concentrazioni di sali in soluzione a T = 293K: (1) $10^{-3}M$, (2) $5 \times 10^{-3}M$, (3) $10^{-2}M$, (4) 0,15*M*. A sinistra è mostra il comportamento a pH = 9 ($\alpha = 1$) e la figura a destra quello a pH = 4 ($\alpha = 0,22$). [50]

se tale effetto dipenderà dalla concentrazione; infatti, solo per alte concentrazioni di sali si avranno effetti rilevanti (Figura 4.32a). Tutto questo è ulteriormente complicato nel caso dei polianfoliti, che presentano l'alternarsi sia di gruppi cationici che anionici [33, 35, 54]; per i quali le valutazioni



Figura 4.32. Effetto della valenza dei contro-ioni e della concentrazione sulla costante di dissociazione apparente del polimero, espressa in relazione al grado di ionizzazione α . (a) Concentrazione di sali di $C_i = 1 * 10^{-4}M$. (b) Concentrazione di sali di $C_i = 1 * 10^{-3}M$. (c) Concentrazione di sali di $C_i = 4 * 10^{-3}M$. [53]



Figura 4.33. Andamento del grado di ionizzazione in relazione *pH* per campioni di *PVI* dello stesso peso molecolare e inseriti nella stessa concentrazione, ma in condizioni di temperatura e di soluzione diverse: (cerchi neri) $T = 25^{\circ}C$ in una soluzione acquosa priva di sali; (quadrati bianchi) $T = 25^{\circ}C$ in una soluzione acquosa con C = 0.2M di *NaNO*₃; (cerchi bianchi) $T = 5^{\circ}C$ in una soluzione acquosa con C = 0.2M di *NaNO*₃; (triangoli bianchi) $T = 45^{\circ}C$ in una soluzione acquosa con C = 0.2M di *NaNO*₃; (triangoli bianchi) $T = 45^{\circ}C$ in una soluzione acquosa con C = 0.2M di *NaNO*₃; (triangoli bianchi) $T = 45^{\circ}C$ in una soluzione acquosa con C = 0.2M di *NaNO*₃; (triangoli bianchi) $T = 45^{\circ}C$ in una soluzione acquosa con C = 0.2M di *NaNO*₃; (triangoli bianchi) $T = 45^{\circ}C$ in una soluzione acquosa con C = 0.2M di *NaNO*₃.

appena effettuate saranno complicate dalla sequenza di carica, oltre che (come avveniva anche per i polielettroliti) dalla rigidità della catena. [54, 53]

Tutto ciò che è appena stato discusso risulta ben sintetizzato dal lavoro di Dobrynin (2008) [35]. Ciò nonostante, non è stato discusso l'effetto della temperatura; infatti, tutti gli esempi proposti sono stati eseguiti a temperatura ambiente $(25^{\circ}C)$. Un buon esempio relativamente al comportamento delle soluzioni di polielettroliti in temperatura lo dà lo studio di Sakurai e colleghi [28], che, sempre mediante curve di titolazione, valutano l'effetto antagonista tra temperatura e forza ionica di una polibase. Come si può osservare da Figura 4.33 l'aumento della temperatura, considerata la stessa concentrazione di sali in soluzione, corrisponde, per una polibase, ad uno spostamento della curva di titolazione verso *pH* minori; ciò vuol dire che la polibase presa in considerazione sarà sempre più debole, quindi difficile da ionizzare. Il discorso si trova in corrispondenza con quanto precedentemente definito per un polimero con una curva di tipo LCST (Figura 4.18), ossia: l'aumento della temperatura porta con sé un aumento del parametro di Flory-Huggins, in relazione all' Equazione 4.17. Questa relazione, esplicabile mediante la van't Hoff [55], può più genericamente essere riassunta così: a temperature più alte le specie più stabili saranno quelle neutre, per cui al fine di ottenere un buon grado ionizzazione dovremo spostarci verso condizioni più "aggressive".

Un'ultima considerazione, particolarmente importante per i copolimeri, è il contributo della componente solvofobica in catena; in altre parole: qual è il rapporto tra la componente solvofobica e la componente solvofilica all'interno della macromolecola? Se il rapporto si sposta verso la componente solvofobica, prevarrà la suddetta componente, il che renderà più difficile l'interazione della porzione solvofilica con il solvente e una più difficile ionizzazione, a parità di condizioni esterne; viceversa, nel caso prevalesse la componente solvofilica. [56]

Tornando adesso al lavoro previsto per questa tesi; in riferimento a Figura 4.33, il confronto tra le curve alla stessa temperatura ma con forze ioniche diverse evidenzia quanto finora discusso: l'aumento della forza ionica rende la catena più facilmente ionizzabile, sottolineando il già citato effetto antagonista dei due parametri, che ci porta a concludere che, nelle condizioni previste per questo lavoro di tesi ($T = 37^{\circ}C$, in soluzione salina), [2] il comportamento del polielettrolita non differirà in maniera troppo sostanziale da quello presentato in una soluzione libera di sali e a

temperatura ambiente. Tuttavia, si dovrà tenere in conto che, come già detto nel corso del paragrafo, che la modifica dell'architettura avrà un impatto sulle proprietà del materiale; per questo motivo, adesso, ci si dedicherà al trattamento delle caratteristiche dei materiali d'elezione per la suddetta applicazione: gli idrogeli.

5 IDROGELI SENSIBILI AL pH^7

In questo capitolo si introdurranno gli idrogeli, puntando a descriverne le diverse tipologie disponibili; inoltre, si delineeranno le caratteristiche richieste per lo specifico sistema in questione.

Gli idrogeli possono essere definiti come "reticoli polimerici idrofilici che possono assorbire acqua dal 10% fino a centinaia di volte il loro peso" [57].

Ci si concentri sul primo punto della definizione: il reticolo. Questa specifica fa capire come, al fine di ottenere un idrogelo sia necessario far sì che le catene non scorrano relativamente tra loro; affinché tale condizione sia rispettabile, dovranno introdursi tra le catene dei nodi. I nodi ai quali si sta facendo riferimento non hanno una precisa identificazione, in quanto possono essere ottenuti nelle modalità più disparate, così come mostrato efficacemente nelle immagini proposte nel capitolo (Figura 5.1, Figura 5.2, Figura 5.3, Figura 5.4).

Il modo più comune per poter ottenere un idrogelo è quello mostrato in Figura 5.1, ossia quando si sfrutta una semplice reazione chimica di reticolazione, la quale può avvenire partendo da diversi



Figura 5.1. Presentazione di diverse possibilità di formazione di un reticolo polimerico via agente reticolante. [57]

⁷ [57, 65, 22, 58, 59, 63, 62]



Figura 5.2. Presentazione di diverse possibilità di formazione di un reticolo polimerico quando l'agente reticolante è presente sulla macromolecola. [57]

reagenti, tra i quali dovrà essere sempre presente quello che viene definito come agente reticolate, sia esso fornito in forma monomerica (caso di Figura 5.1) sia come gruppo funzionale presente sulle catene polimeriche già esistenti (caso di Figura 5.2). Come si vede da Figura 5.1, infatti, si può ottenere un idrogelo partendo dal monomero della specie d'interesse, ossia della specie della quale si vorrà andare a comporre l'idrogelo, e dal monomero dell'agente reticolante; tuttavia, è possibile anche far agire l'agente reticolante direttamente su una macromolecola già formata, la quale, come presente in Figura 5.1 non dovrà necessariamente essere separata dalla fase della soluzione.

Però, il reticolo non è necessariamente unico; ovvero, come mostrato in Figura 5.1, potranno esistere più reticoli compenetranti (IPNs – Inter Penetrating Networks), ottenibili facendo avvenire la reticolazione all'interno di un reticolo già formato.

Figura 5.3 e Figura 5.4 mostrano invece altri modi per poter ottenere il reticolo; in entrambi non viene utilizzata alcuna specie come agente reticolante; qui, infatti, vengono sfruttate altre tipologie di interazioni: idrofobiche e ioniche. Le interazioni idrofobiche (Figura 5.3) si originano dalla presenza all'interno della molecola di due porzioni: una idrofila e una idrofoba; così come avevamo visto nel sotto-paragrafo *Separazione di fase*, il polimero cercherà di limitare la superficie di contatto con il solvente (nel caso in esame: l'acqua) vista la sua spiccata incompatibilità chimica con lo stesso; in una condizione in cui sulle catene saranno presenti sia le porzioni compatibili con il solvente (in Figura 5.3 i gruppi funzionali polari) sia queste porzioni incompatibili con lo stesso (in Figura 5.3 la



Figura 5.3. Presentazione di diverse possibilità di formazione di un reticolo polimerico sfruttando i gruppi polari presenti sulla catena; è evidenziata la possibilità di perseguire sia una via chimica che una fisica. [57]


Figura 5.4. Presentazione di diverse possibilità di formazione di un reticolo polimerico via agente complessante. [57]

catena principale), le macromolecole si ripiegheranno su se stesse e tra loro, andando a formare dei nodi fisici, noti come entanglements.

Il collasso della catena idrofobica può anche essere indotto dalla risposta ad uno stimolo, infatti possiamo pensare di sintetizzare un polimero solubile a temperatura ambiente e sfruttare il suo valore di LCST per indurgli una transizione di fase sol-gel una volta inserito all'interno del corpo umano, che si trova a circa $37^{\circ}C$ [2]; tale sistema è utile perché permette di ottenere delle nanoparticelle di dimensioni comprese tra 20nm e 100nm direttamente in vivo, senza la necessità di sintetizzarle. [58, 59]

Si osservi come i gruppi polari presenti in Figura 5.3 possano essere anche utilizzati come punti di reticolazione mediante un'agente reticolante, ricollegandoci a quanto si è già detto per la reticolazione di questo tipo.

Infine, in Figura 5.4 si otterranno gli idrogeli sfruttando quelle che sono le interazioni elettroniche presenti tra le catene o tra le catene e gli agenti complessanti, che, a differenza degli agenti reticolanti, non formano legami chimici insolubili tra le macormolecole. Questi agenti potranno essere dei cationi multivalenti, in grado di creare un ponte elettrico tra le macromolecole, complessandole e formando così un nodo; oppure, come già detto, l'agente complessante può essere una porzione della macromolecola, che, nelle condizioni espresse si trova ad esprimere una carica sulla superficie. In questo caso, si precisa però la modalità di ottenimento via nomenclatura; infatti, definiremo gli idrogeli ottenuti mediante cationi multivalenti come idrogeli "ionotropici" e quelli ottenuti tra polielettroliti carichi come complessi poli-ionici (o coacervati).

Proprio nella descrizione di Figura 5.4 si è introdotto un concetto fondamentale, che diversifica le diverse tipologie di reticolo ottenibili: il fatto di formare o meno legami chimici tra le macromolecole; possiamo infatti distinguere gli idrogeli chimici da quelli fisici, ossia quelli che formano il reticolo per mezzo di legami covalenti, che sono permanenti, oppure per mezzo di interazioni di natura elettrostatica (e. g. gli "ionotropic") e termodinamica (e. g. interazioni idrofobiche), che sono reversibili. Qual è la differenza in termini di risposta all'ambiente nel quale sono inseriti? Quelli chimici, in seguito a stimoli esterni, non possono tornare allo stato precedente a quello di formazione del reticolo, vengono appunto detti permanenti; viceversa, nei fisici l'applicazione di una sollecitazione esterna può anche arrivare a rompere il reticolo.

All'inizio del capitolo è stata sottolineata la capacità degli idrogeli di assorbire acqua; questa capacità risulta particolarmente importante ai nostri occhi per due motivazioni: (1) la possibilità di assorbire la soluzione circostante è particolarmente utile nella determinazione delle capacità di assorbimento [60, 61], necessarie per le caratteristiche tampone; e (2) nella determinazione della biocompatibilità, vista la grande percentuale che la suddetta occupa all'interno del corpo.



Figura 5.5. Formula di struttura degli amminoacidi. [136]



Figura 5.6. Formula di struttura di una unità saccaridica; in particolare, si è preso in considerazione un monosaccaride: il glucosio. [137]

L'applicabilità in ambito biomedicale ha spesso rappresentato un ostacolo per alcune tipologie di polimeri, viste le possibili ripercussioni da questo punto di vista; in quest'ambito si è quindi spesso cercato un compromesso tra le ottime e altamente controllabili proprietà dei polimeri sintetici e l'eccezionale biocompatibilità dei polimeri di origine naturale.

Gli idrogeli naturali possono essere suddivisi in due classi, secondo il lavoro di Chai e colleghi [58], che li distinguono in base all'unità ripetitiva che li compone: si distinguono polipeptidi e polisaccaridi. I polipeptidi sono formati da amminoacidi (Figura 5.5), che, mediante un legame peptidico, ossia policondensazione tra il gruppo carbossilico di un amminoacido e il gruppo amminico di un altro, formano la catena polipeptidica; nell'ambito degli idrogeli, possiamo ottenere idrogeli con polipeptidi quali albumina (Figura 5.7c) e gelatina (Figura 5.7d). Invece, i polisaccaridi hanno come unità ripetitiva i saccaridi, detti anche idrati di Carbonio, ossia carboidrati, $C_m(H_2O)_n$ (Figura 5.6); di nuovo, nell'ambito degli idrogeli, quelli utilizzabili possono essere quelli a base di chitosano (Figura 5.7a) e albumina (Figura 5.7b). [58, 62, 30]

Tra i polimeri sintetici che vengono utilizzati per l'ottenimento di idrogeli in applicazioni biomedicali si utilizzano principalmente quelli rappresentati in Figura 5.8: Pluronic F127 (PF127); poli(N-isopropil acrilammide) (PNIPAAm); poli(etilen glicole) (PEG); acido poli(acrilico) (PAA); poli(N,N-dimetil amminoetil metacrilato) (PDMAEMA) e il poli(N,N-dietil amminoetil metacrilato) (PDEAEMA). Tuttavia, solo alcuni di quelli citati risulteranno utili nelle applicazioni in cui viene richiesta sensibilità al pH, gli altri, a meno di funzionalizzazioni, presentano solo dipendenza in temperatura; infatti, solo PEG, PAA e PDMAEMA/PDEAEMA risultano candidabili tal quali. Ovviamente, la lista di polimeri disponibili per ottenere idrogeli cationici sensibili al pH sarà più lunga, però, per il momento, si presentano giusto alcuni esempi proposti nella review di Deen&Loh



Figura 5.7. Formule di struttura di: chitosano (a); cellulosa (b); albumina (C); gelatina (d). [62]



Figura 5.8. Formule di struttura dei principali polimeri sintetici utilizzati nella sintesi degli idrogeli: (A) PF127; (B) PNIPAAm; (c) PEG; (d) PAA; (e) PDMAEMA; (f) PDEAEMA. [62]

[63] (Figura 5.9): PDMAEMA; PDEAEMA; poli(N-etil pirrolidin metacrilato) (PEP); poli(N-etil piperazin-N'-acrilato) (PAcrNEP).

Al di là dello specifico polimero scelto, i metodi utilizzati per la produzione degli idrogeli sensibili alle variazioni del *pH* in forma di nanoparticelle sono diversi e vanno dai tipici metodi per evaporazione del solvente o di emulsione, ai metodi che sfruttano l'assemblaggio fisico, come la gelazione ionotropica, fino ai quelli più sofisticati, che sfruttano la polimerizzazione controllata, come RAFT (reversible addition fragmentation chain transfer) o ATRP (atom transfer radical polymerization). [64, 65, 22] Tuttavia, nonostante la presenza di diverse tecniche, la tecnica più utilizzata è la polimerizzazione radicalica effettuata in emulsione, soprattutto per la preparazione di polimeri vinilici. [65, 46, 66, 67, 68, 69]

Questa flessibilità, ottenibile e già presentata per diversi idrogeli [58, 62, 63, 22, 65], spinge verso la scelta di un metodo di produzione che permetta di ottenere particelle di dimensione specifica e con grande precisione. In questo senso, il metodo di produzione per emulsione risulta utile; in



Figura 5.9. Rappresentazione di alcuni idrogeli cationici sensibili al *pH*; da sinistra a destra: poli(N,N-dimetil amminoetil metacrilato) (PDMAEMA); poli(N,N-dietil amminoetil metacrilato) (PDEAEMA); poli(N-etil piprolidin metacrilato) (PEP); poli(N-etil piperazin-N'-acrilato) (PAcrNEP). *[63]*



Figura 5.10. Distribuzione delle nanoparticelle in base alla loro dimensione (colonna a sinistra) e in base alla presenza o meno di una carica (colonna a destra). [131]

particolare, in riferimento al lavoro di Li Quadri [70], che indica la dimensione necessaria per garantire la maggiore emivita possibile alle nanoparticelle è $d \in [10; 100]nm$ (Figura 5.10). Risulta d'obbligo sottolineare come il lavoro appena citato faccia riferimento a nanoparticelle in circolo nell'organismo, quindi i meccanismi di identificazione ed eliminazione ai quali si fa riferimento sono quelli di clearance; questi sono identificabili in quello del sistema reticoloendoteliale (RES), attribuibile principalmente a fegato e milza, e quello di clearance renale, attribuibile, ovviamente, all'azione dei reni. Ciò nonostante, la valutazione viene mantenuta, vista la flessibilità dei sistemi nanoparticellari e la problematica sistemica dell'acidosi metabolica; inoltre, vista l'appliazione originale proposta nel presente lavoro, che, in base all'analisi della letteratura da me effettuata, non sembra esser stata ancora presentata, non risulta definita la precisa modalità d'innesto, il che pone, innanzitutto, l'attenzione sulla verifica del sistema ideato.

Il metodo di emulsione permette di ottenere una distribuzione delle dimensioni molto controllata, aggiunta ad una dimensione media nello stesso ordine di grandezza richiesto. La polimerizzazione per emulsione è un tipo di polimerizzazione a catena radicalica in cui l'ambiente di reazione è inizialmente costituito da un monomero, un solvente (in genere acqua) e un tensioattivo. Il tensioattivo ha lo scopo di stabilizzare la formazione di piccole gocce di monomero, che costituiscono la fase dispersa del sistema, mentre il solvente acquoso costituisce la fase continua. Il monomero non è solubile in acqua, ma lo è l'iniziatore; come si può facilmente intuire, il tensioattivo e minore sarà la dimensione delle particelle: maggiore sarà la quantità di tensioattivo e minore sarà la dimensione delle particelle; nello specifico, per poter ottenere particelle con dimensioni $d \in [10; 100]nm$ dovremo ricorrere alla micro-emulsione. [65, 71, 46]

La micro-emusione si differenzia dalla semplice emulsione sostanzialmente per la quantità di tensioattivo utilizzato; questa modifica, che potrebbe sembrare banale, porta con sé conseguenze importantissime: l'inserimento di elevate quantità di tensioattivo permettono una stabilizzazione al livello termodinamico dell'emulsione; quindi non cinetico, come avveniva nel caso dell'emulsione classica; inoltre, l'elevata quantità di tensioattivo permette di creare un'elevata area interfacciale tra le due fasi (il soluto – fase discontinua; il solvente – fase continua), che è la responsabile delle elevate velocità di polimerizzazione, caratterizzanti questo metodo di sintesi. L'importanza della percentuale di tensioattivo inserito viene efficacemente spiegata dalla Figura 5.11, nella quale si sottolinea anche la variabilità di morfologie ottenibili: micelle (o/w), goccie (w/o), fino a cristalli liquidi o morfologie bi-continue ("bicontinuous microstructure"). [65, 71, 46].

Possono inoltre essere presenti degli agenti emulsificanti o stabilizzanti, quali alcool polivinilici oppure idrossietilcellulosa, che vengono inseriti per evitare la coagulazione dell'emulsione. [72, 46, 65]



Figura 5.11. Diagramma ternario della miscela acqua-olio-tensioattivo. [71]

La polimerizzazione avviene quindi all'interno di queste "camere di reazione" ottenute dall'utilizzo del tensioattivo, come mostrato nella Figura 5.12. All'interno della suddetta si possono trovare sia il monomero, sia un agente reticolante; quindi, all'ingresso dell'iniziatore nella camera inizierà la polimerizzazione. [73]

Raccogliamo qui i vantaggi (\checkmark) e gli svantaggi (\varkappa) di questo metodo di polimerizzazione.

- ✓ Viscosità ridotta.
- ✓ Nella polimerizzazione in emulsione si hanno elevate velocità di polimerizzazione e si ottengono molecole ad elevato peso molecolare.
- ✓ La presenza dell'acqua come solvente assicura una rimozione del calore di reazione piuttosto efficiente.
- ✓ Siccome il polimero viene circondato dal tensioattivo, la viscosità del sistema non si discosta molto da quella dell'acqua e in questa maniera non si va incontro all'effetto gel.
- ✓ Nel caso in cui il prodotto finale sia l'emulsione stessa, non si ha bisogno di ulteriori operazioni di separazione.
- ✓ Non si ha la formazione di composti organici volatili.
- ✗ Il tensioattivo e gli altri additivi aggiunti durante il processo di polimerizzazione non sono facilmente separabili dal prodotto finale.



Figura 5.12. (a) Raffigurazione della copolimerizzazione di un monomero solubile in acqua (1), in presenza di un agente reticolante (2), mantenuto in emulsione acqua/olio (w/o) dal tensioattivo (3). (b) Copolimerizzazione di un monomero insolubile in acqua, in presenza di un agente reticolante, mantenuto in emulsione olio/acqua (o/w) dal tensioattivo. [73]



Figura 5.13. Comportamento in rigonfiamento di diverse tipologie di idrogeli. si vede come gli idrogeli basici (basic Hydrogel) si carichino positivamente quando il pH della soluzione sarà acido (acid pH), con conseguente rigonfiamento; viceversa accade per gli idrogeli acidi (acid hydrogel). Infine, gli idrogeli anfoteri (amphoteric hydrogel) subiscono rigonfiamento sia per pH acidi sia per pH basici, e saranno in forma collassata solo nell'intervallo del punto isoelettrico (IEP). [22]

 Nel caso in cui il prodotto finale sia il polimero solido, è necessario fornire una elevata quantità di calore per allontanare l'acqua dall'emulsione.

5.1 IDROGELI IN SOLUZIONE⁸

Quando si inserisce un idrogelo in un solvente, il comportamento è diverso da quello presentato precedentemente dalla teoria di Flory-Huggins (*Teoria della soluzione di Flory-Huggins*), in quanto gli idrogeli hanno un'architettura a rete, ciò che prima avevamo definito come reticolo (o network). Per questa motivazione, questi materiali non potranno separarsi allo stesso modo di come era stato presentato in Figura 4.23, ma la presenza dei nodi causerà il rigonfiamento dell'idrogelo, così come presentato in Figura 5.13. Il rigonfiamento dell'idrogelo può essere descritto fisicamente ricollegandosi nuovamente alla teoria di Flory-Huggins; tuttavia, vista l'architettura del sistema, la suddetta teoria non basterà per descrivere il comportamento della specie; per questo si dovranno tenere in considerazione altri due contributi: quello elastico, addebitabile all'azione dei vincoli meccanici presenti nell'architettura (i nodi), e quello osmotico, visto che saranno identificabili una parte interna ed una esterna al sistema, con diversi volumi, il che influenzerà le concentrazioni degli ioni mobili, secondo un ragionamento molto simile a quello già visto per la cellula (in *Elettrofisiologia cellulare*). Questi contributi sono stati definiti analiticamente dalla teoria di Flory-Rehener e la teoria di Donnan, rispettivamente.

⁸ [133, 77, 128, 81, 129, 41, 39]



Figura 5.14. Evoluzione del parametro non-gaussiano β in funzione della capacità di rigonfiamento $(1/v_2)$, per diverse concentrazioni percentuali di agente reticolante (PVI40(2) < PVI40(15)) e per diversi contro-ioni (Cl^- e SO_4^{2-}). (quadrati neri) PVI40(2) con HCl; (cerchi bianchi) PVI40(2) con H_2SO_4 ; (triangoli neri) PVI40(15) con HCl; (quadrati bianchi) PVI40(15) con H_2SO_4 . [38]

La sovrapposizione di questi contributi può essere espressa analiticamente dall'Equazione 5.1.

$$\Delta G = \Delta G_{mix} + \Delta G_{el} + \Delta G_{ion} \tag{5.1}$$

La teoria di Flory-Renher espande ciò che era stato considerato della teoria di Flory-Huggins, concludendo come un gel sarà all'equilibrio solo quando il potenziale chimico della soluzione sarà uguale tra l'interno e l'esterno dello stesso, ossia: quando non sarà presente alcuna pressione osmotica tra le due aree. Questa assunzione ridefinisce l'Equazione 5.1, esprimendola in relazione alla pressione osmotica di ogni contributo.

$$\pi = \pi_{mix} + \pi_{el} + \pi_{ion} \tag{5.2}$$

Di conseguenze, per avere equilibrio si dovrà avere $\pi = 0$; ossia: tutti i contributi che collaboreranno al rigonfiamento dovranno bilanciarsi. Analizzando più da vicino i vari contributi, ci si rende conto innanzitutto che quello di miscelazione, π_{mix} , resta invariato rispetto a quanto calcolato dalla teoria di Flory-Huggins.

$$\pi_{mix} = -\frac{RT}{\bar{V}_s} [\phi + \ln(1 - \phi) + \chi_{FH} \phi^2]$$
(5.3)

In cui $\overline{V_s}$ è il volume molare del solvente, *R* è la costante universale dei gas.

Per quanto riguarda il contributo elastico, π_{el} : si tratta di un contributo puramente entropico, definibile secondo Flory-Rehner, in relazione al rapporto di rigonfiamento (q). Il rapporto di rigonfiamento è determinabile dal rapporto tra il volume che il gel ha inizialmente (V_0) e il volume che ha all'equilibrio (V); tuttavia, piuttosto che esprimere questo parametro rispetto al volume, per facilitare la relazione con gli altri contributi, si preferisce esprimerlo in relazione alle frazioni molari del polimero: il valore a riposo (ϕ_0) e all'equilibrio (ϕ).

$$q = \left(\frac{V}{V_0}\right)^{\frac{1}{3}} = \left(\frac{\phi_0}{\phi}\right)^{\frac{1}{3}}$$
(5.4)

Da qui è determinabile il contributo elastico:

$$\pi_{el} = -RTv_e \left(\phi^{\frac{1}{3}} \cdot \phi_0^{\frac{2}{3}} - \frac{2\phi}{x} \right) \beta$$
 (5.5)

dove v_e è la densità di reticolazione ed x è la funzionalità dell'agente reticolare, che permette di esprimere la funzionalità dei nodi che si formano nella catena. Infine, β è il parametro non-gaussiano; è una misura della deviazione della lunghezza delle catene dalla distribuzione gaussiana; più nello specifico, nel caso in cui si considerasse $\beta = 1$, si considererà implicitamente che tutte le catene presenti arriveranno a tensione più o meno nello stesso momento, cosa che può sussistere per idrogeli neutri con catene molto lunghe tra un nodo e l'altro, ma, man mano che si aumenta la reticolazione, questa approssimazione sarà sempre meno applicabile ($\beta > 1$); in aggiunta, quando si andranno a considerare dei gel ionici, si dovrà tenere in considerazione che la comparsa delle cariche lungo le catene influenzerà la rigidità di catena, facendola aumentare. L'effetto di questo parametro è molto ben raffigurato in Figura 5.14.

Infine, per quanto riguarda il contributo ionico, π_{ion} , questo può essere determinato in relazione alla pressione osmotica generata dai contro-ioni mobili presenti nelle due aree, in particolare alla differenza tra le concentrazioni all'interno e l'esterno dell'idrogelo.

$$\pi_{ion} = RT\Delta C_{mob} \tag{5.6}$$

In Equazione 5.6 viene utilizzato il termine ΔC_{mob} per indicare la differenza tra le concentrazioni dei contro-ioni mobili, presenti all'interno (C_i^{gel}) e all'esterno (C_i^{sol}) dell'idrogelo; il termine è lasciato così generico proprio perché, a seconda delle condizioni, la relazione che lo andrà a descrivere sarà diversa. Più nello specifico, possiamo osservare come il contributo ionico risulti associabile alla carica espressa dallo stesso idrogelo nelle condizioni di bassa forza ionica della soluzione $(I = 0, 5 \cdot \sum_i C_i \cdot z_i^2)$, dove C_i è la concentrazione dell'i-esima specie e z_i è la valenza della stessa), ossia quando una soluzione è completamente priva di sali oppure quando la forza in questione è ben minore della carica espressa dall'idrogelo (C_{fix}) .

$$\Delta C_{mob} = \frac{C_{fix}}{z} = \frac{\frac{f \cdot \rho_{gel} \cdot \phi}{M_0}}{z}$$
(5.7)

Nell'Equazione 5.7 il valore di *z* rappresenta la carica di contro-ioni, *f* è la frazione carica del polimero (in altre parole: quante unità monometriche si sono ionizzate), mentre $M_0 e \rho_{gel}$ sono rispettivamente il peso molecolare dell'unità monomerica e la densità del polimero. Però, se ci trovassimo nelle condizioni in cui la forza ionica della soluzione è maggiore, o comunque comparabile, rispetto alla concentrazione delle cariche fisse, si dovrà utilizzare l'equazione più generale che esprime la differenza osmotica come prima descritta, alla quale sarà necessario aggiungere le condizioni al contorno dettate dall'equilibrio di Donnan e dal principio di elettroneutralità.

$$\pi_{ion} = RT\left[\sum_{i} C_{i}^{gel} - \sum_{i} C_{i}^{sol}\right]$$
(5.8)

Alla luce di quanto espresso, l'unico parametro che resta, in qualche modo, sospeso è quello della frazione carica del polimero, *f* ; si potrebbe pensare: non dovrebbe essere associabile con il grado di



Figura 5.15. (a) Rigonfiamento di un polimero di PNIPAAm-AA in soluzione acquosa al variare del *pH*; (a') rigonfiamento di un polimero di PNIPAAm-AA in soluzione acquosa al variare del *pH*. [34]

ionizzazione α ? La risposta è: non sempre, in quanto, per alti valori di densità di carica nel polimero, avverrà il fenomeno definito come condensazione di Manning (oppure: condensazione dei controioni). Tale fenomeno prevede la riduzione della densità di carica presente nel polimero, da non confondere con la carica in sé; infatti, non bisogna pensare a questa condensazione come ad una diminuzione di carica presente sulla catena, ma come ad una diminuzione della distribuzione della stessa nel volume del gel, per via della grande attrazione che la prima effettua sui contro-ioni, che, addensandosi (condensandosi), schermano la carica espressa dalle specie cariche. Dal punto di vista analitico si può esprimere tale fenomeno modificando il valore di *f*, valutando la densità di carica presente sulla catena, mediante il parametro adimensionale ξ : Equazione 5.9.

$$f = \begin{cases} \alpha , & per \xi < 1\\ \alpha \cdot \frac{1}{\xi} , & per \xi > 1 \end{cases}$$
(5.9)

5.1.1 Rigonfiamento degli idrogeli sensibili al *pH*

Come appena descritto, gli idrogeli, quando si trovano inseriti in soluzione, sono soggetti a rigonfiamento o collasso. Per la descrizione si consideri di inserire un idrogelo sensibile al pH all'interno di una soluzione nella quale non sarà solubile. Come si può osservare da Figura 5.15, nella quale è rappresentato il comportamento in soluzione del poliacido PNIPAAm-AA; si avrà un rilevante rigonfiamento all'aumentare del pH, ossia quando si sposta verso valori più basici; inoltre, è riportata anche la variazione del potenziale ζ , aumentata in valore assoluto, in seguito alla nascita delle specie cariche sulla catena. [34]

Analizzando il precedente comportamento in relazione a quello che è stato affermato in *Idrogeli in soluzione*, si può addebitare tale rigonfiamento all'aumento del contributo ionico, responsabile della pressione osmotica in ingresso all'idrogelo, che ne causerà il rigonfiamento. Tuttavia, facendo riferimento a Equazione 5.2, si ricorda che il rigonfiamento corrisponde alla condizione di equilibrio, la quale sarà dipendente dagli altri due contributi: π_{mix} e π_{el} ; entrambi strettamente legati alle caratteristiche del polimero.

Le caratteristiche di maggiore interesse del polimero diventano due: $\phi e v_e$; di studi empirici relativi all'influenza di queste percentuali sul rigonfiamento ce ne sono diversi [46, 44, 45, 43, 38, 39, 40, 40, 42], sia che studino il problema in maniera diretta, sia che lo facciano indirettamente, e. g. verificando i sistemi di rilascio del farmaco [74, 75, 66, 76]. Dal punto vista analitico, l'analisi del comportamento della densità di reticolazione è abbastanza semplice (Figura 5.16): l'aumento della densità di reticolazione fa diminuire il rigonfiamento, visto l'effetto sul contributo elastico



Figura 5.16. Evoluzione del raggio idrodinamico R_h in funzione del grado di ionizzazione del polimero α della soluzione, per idrogeli con percentuali in peso variabili di agente reticolante. Triangoli neri: 1%*wt* di agente reticolante; cerchi bianchi: 2%*wt* di agente reticolante; quadrati neri: 3%*wt* di agente reticolante; rombi bianchi: 1%*wt* di agente reticolante. [44]

(Equazione 5.5). Tale condizione può anche essere osservata facendo riferimento ad altri parametri; ad esempio, Kurnia e colleghi [77], evidenziano la relazione tra l'aumento dimensionale dell'idrogelo e le sue proprietà meccaniche: l'aumento del modulo di Young è ricollegabile ad un aumento della percentuale in peso di agente reticolante; e, all'aumento del modulo di Young diminuirà l'entità del rigonfiamento (Figura 5.17). Si vede quindi come il contributo elastico rappresenti un contributo di collasso, ossia, in riferimento ad Equazione 5.2, assumerà sempre un valore negativo.

In tutto ciò deve però esser tenuto a mente che la densità di reticolazione non sarà influenzata solo dalla concentrazione di reticolante (C_{RA}), ma anche dalla quantità di comonomero (C_T) inserita; infatti, dallo studio di Pacios e colleghi [42], si può determinare una relazione tra la densità di reticolazione e questi parametri: Equazione 5.10.

$$v_e \sim C_T^{0.81} \cdot C_{RA}^{1.04} \tag{5.10}$$

Da Equazione 5.10 si evince come l'aumento di entrambe le concentrazioni porti ad un aumento della densità di reticolazione; tuttavia, è chiaro come il contributo dell'agente reticolante risulti preponderante (anche se di poco) rispetto a quello del monomero.

Determinare l'effetto della frazione volumetrica del polimero all'equilibrio ϕ è più complesso, visto che non agirà soltanto su un parametro, come appena visto per la densità di reticolazione v_e , ma influenzerà sia il contributo elastico (Equazione 5.5) che quello di miscelazione (Equazione 5.3);



Figura 5.17. Variazione del diametro dell'idrogelo (d) in relazione del pH determinato per idrogeli a modulo di Young crescente (\mathcal{E}). [77]

in particolare, sempre seguendo il lavoro di Pacios e colleghi [42], si può osservare come i parametri che andranno ad influenzare la frazione volumetrica saranno gli stessi utilizzati per Equazione 5.10, anche se, in questo caso la proporzione sarà modificata a seconda del solvente (acqua deionizzata: Equazione 5.11; etanolo: Equazione 5.12; metanolo: Equazione 5.13).

$$\phi \sim v_e^{-0.41 \pm 0.04}$$
, in $H_2 0$ (5.11)

$$\phi \sim v_e^{-0.40 \pm 0.03}$$
, in $C_2 H_5 OH$ (5.12)

$$\phi \sim v_e^{-0.48 \pm 0.04}$$
, in CH₃OH (5.13)

Come si può notare, è quindi facile concludere come il comportamento risulti diverso anche a seconda degli altri parametri che saranno compresi all'interno dell'equilibrio (Equazione 5.2). Ovviamente, l'attenzione sarà puntata sul parametro di Flory-Huggins (χ_{FH}), che, come già sottolineato da Equazione 4.22, dipende dalla frazione di polimero disponibile; ma, il suddetto parametro non subirà sostanziali variazioni rispetto a quanto era già stato discusso in *Proprietà acido-base dei polimeri sensibili al pH*. Nel lavoro di Molina e colleghi [38], in Figura 5.18, si cerca di limitare tutti gli altri parametri che influenzano χ_{FH} , in modo tale da rendere il suo contributo esprimibile principalmente attraverso ϕ ; da qui si osserva come l'aumento della quantità di polimero, quindi della concentrazione totale del comonomero (C_T) e della percentuale in peso dell'agente reticolante (%*C*), causi una diminuzione del grado di rigonfiamento, sottolineando come, in condizioni neutre, al di là del solvente utilizzato, l'aumento della frazione volumetrica del polimero rigonfio ϕ farà prevalere il contributo elastico (responsabile del collasso) su quello di miscelazione (in questo caso responsabile del rigonfiamento), ottenendo così un collasso delle catene.



Figura 5.18. Grado di rigonfiamento (*S*) espresso in funzione della concentrazione totale di comonomero (C_T) e la percentuale in peso occupata dall'agente reticolante (%*C*), quando è in soluzione di acqua (a), etanolo (b), metanolo (c). [38]



Figura 5.19. Variazione del diametro dell'idrogelo (d) in relazione del pH determinato per idrogeli con concentrazione di cariche fisse (c_f^0) crescenti. [77]

Ciò nonostante, quanto appena detto descrive il comportamento di un polimero neutro, il che non è una condizione sempre verificata nel caso dei polimeri che presentano gruppi carichi; infatti, in questo caso, si dovrà considerare anche la componente polimerica "attiva", ossia la carica fissa all'interno dell'idrogelo. In riferimento ad Equazione 5.7 ed Equazione 5.8 si osserva come anche il contributo ionico dipenderà da ϕ , evidenziando come maggiori gradi di rigonfiamento corrispondano con un maggior numero di cariche fisse (Figura 5.19). [77] Quindi, quanto detto prima era incompleto: ϕ contribuirà in maniera molto rilevante anche in π_{ion} .

Da qui in avanti, le considerazioni saranno molto simi a quelle già fatte nel caso dei polielettroliti in soluzione, in quanto andremo ancora a considerare: l'effetto del solvente – esprimibile mediante le considerazioni sul parametro di Flory-Huggins; l'effetto della pK_a – la cui variazione è già stata discussa, sia in relazione alla temperatura (Figura 4.33) che alla variazione della forza ionica (Figura 4.32); sia gli effetti della forza ionica (Figura 4.30) in sé. Quindi, anche nel caso degli idrogeli osserviamo che l'inserimento di concentrazioni crescenti di un solvente non compatibile con il soluto, causi l'aumento delle forze repulsive (analiticamente: l'aumento del contributo di miscelazione), Figura 5.20. [34]. Allo stesso tempo si riconferma l'andamento della sigmoide per diversi valori di pK_a , e la relativa modifica della stessa all'aumento della temperatura, Figura 5.21 [77].

Infine, l'effetto della forza ionica viene efficacemente presentato da diversi lavori [45, 34, 41, 40, 39, 78, 43, 46]; questi sottolineano che l'aumento della concentrazione di un determinato sale porta



Figura 5.20. Grado di rigonfiamento (R_h/R_0) in funzione della percentuale in volume di etanolo inserita per polibasi, testate a diversi *pH*: (rombi neri) *pH* = 4.0; (triangoli neri) *pH* = 7.5. [34]



Figura 5.21. (a) Variazione del diametro dell'idrogelo (d) in relazione del pH determinato per idrogeli con costanti di dissociazioni acide (pK_a) diverse. (b) Variazione del diametro dell'idrogelo (d) in relazione del pH determinato per idrogeli a temperature diverse. [77]

ad un rigonfiamento sempre minore, visto che, proprio la presenza del sale, agirà da schermante delle cariche ionizzate, fisse all'interno dell'idrogelo, riducendo così il contributo ionico dell'equazione termodinamica precedente presentata (Figura 5.22).

Si osservi come in Figura 5.22 non vengano prese in considerazione le valutazioni fatte precedentemente riguardo alla condensazione di Manning (Equazione 5.9), le quali trovano una buona rappresentazione in Figura 5.23; dalla quale si osserva il netto collasso per valori di pH molto acidi. Un'altra importante informazione dalla figura è quella relativa al comportamento a pH neutri,



Figura 5.22. Raggio idrodinamico (R_h) descritto in relazione del grado di ionizzazione (α) per idrogeli immersi in soluzioni con diversa forza ionica: (triangoli neri) 0.1mM; (cerchi bianchi) 1mM; (quadrati neri) 10mM; (rombi bianchi) 100mM. [44]



Figura 5.23. Rigonfiamento in funzione del pH della soluzione all'interno del quale viene inserito uno xerogel cationico (pH_i), il cui andamento è rappresentato per diverse forze ioniche, per diversi sali ($NaCl \in CaCl_2$). Ad ogni modo: (quadrati neri) 0M; (cerchi rossi) 0.01M; (triangoli verdi) 0.05M; (triangoli blu) 0.10M; (rombi celesti su linea celeste) 0.30M; (triangoli viola su linea tratteggiata viola) 0.50M; (triangoli rossi su linea gialla) 0.80M; (cerchi bianchi su linea nera) 1M. [39]

per i quali si osserva un rigonfiamento all'aumento della forza ionica, esplicabile, anche questa volta (Figura 4.30), con il fenomeno di salting-in. In più, come è chiaro dai grafici, maggiori forze ioniche spostano il picco di rigonfiamento verso valori più acidi, questo perché, dato l'effetto schermante degli ioni, sarà necessaria una maggiore acidità della soluzione per ottenere una spinta sufficiente a raggiungere un grado di rigonfiamento rilevante. [39, 40, 41, 36, 53, 35, 79, 49, 56]

5.2 IDROGELI COME TAMPONE INSOLUBILE

L'utilizzo di idrogeli per la modifica del *pH* e il loro utilizzo come sistemi tampone insolubili non è stato particolarmente approfondito in letteratura, almeno in relazione a ciò che è stato trovato; questa affermazione viene alimentata dai riferimenti utilizzati in uno studio del 2018 da Crespi e colleghi [80], nel quale si utilizzano come riferimento due articoli molto datati, che testimonia il mancato interesse in questo campo da parte della ricerca. Gli articoli trovati da Crespi e colleghi sono del gruppo di Kazakov e di Horta, due gruppi di ricerca che hanno approfondito lo studio degli idrogeli come sistemi tampone di soluzioni acide, utilizzando la base imidazolo per ottenere il suddetto risultato.

Crespi e colleghi [80] hanno ideato un idrogelo caricato con una soluzione organica, nella quale sarà presente una base (L) capace di agire come tampone; il problema di questo dispositivo è la necessità di effettuare uno scambio ionico con la soluzione esterna per far entrare i protoni nel sistema. Tuttavia, nonostante questa problematica, particolarmente avversa nel caso di sistemi di sensing [81, 82, 80], essi permettono un controllo particolarmente avanzato del grado di



Figura 5.24. Raffigurazione del processo di tamponamento eseguito da un idrogelo in agarosio contenente una soluzione organica formata dallo scambiatore ionico (K^+R^-) e dalla base responsabile del tamponamento (L). [80]

tamponamento garantito; infatti, si potrà modulare la risposta in relazione alla tipologia e alla concentrazione dello scambiatore presente (K^+R^-), e alla concentrazione e la basicità della base utilizzata. In Figura 5.24 si riassume il suo comportamento, ma si osserva che, per quanto tale sistema possa essere performate si dovrà scartare come possibile configurazione vista la necessità di scambio ionico e la sensibilità delle cellule alle suddette variazioni (*Condizioni patologiche*).

Proprio le problematiche espresse dal precedente sistema ci spingono a scegliere un dispositivo che lavori il più passivamente possibile: per questo si sceglie di utilizzare un idrogelo non caricato e di sfruttare le sole condizioni osmotiche per poter eseguire l'azione tamponante, sfruttando la capacità di accumulatore ionico del suddetto. Il comportamento così descritto è quello seguito dagli studi di Kazakov e Horta [83, 36], possibile grazie alle caratteristiche di rigonfiamento descritte precedentemente (*Rigonfiamento degli idrogeli sensibili al pH*).

Iniziamo l'analisi del comportamento tamponante partendo dal lavoro di Horta e colleghi [36, 37], che sfrutta un idrogelo in poli(N-vinil imidazolo) (PVI) per tamponare il pH di una soluzione acquosa acida a temperatura ambiente; le prove proposte nei due studi sono state indirizzate all'analisi del sistema sia in acqua de-ionizzata, sia in una soluzione elettrolitica. Il merito di tale ricerca è quello di andare ad identificare la differenza tra la concentrazione dei gruppi protonabili all'interno della soluzione, C^{tot} , e quelli presenti all'interno dell'idrogelo, C^{gel} , così determinabile: la concentrazione



Figura 5.25. *pH* della soluzione acquosa de-ionizzata dopo aver ragiunto l'equilibrio (*pH_s*), partente da un *pH* iniziale (*pH_i*) presentata per diverse concentrazioni totali di idrogelo in soluzione (*C*): (triangoli veri) C = 0.01M; (quadrati neri) C = 0.1M. [36]



Figura 5.26. Grado di ionizzazione α in funzione del *pH* iniziale (*pH_i*) della soluzione acquosa de-ionizzata, valutato per diverse concentrazioni totali (*C*) dell'idrogelo in soluzione: (quadrati neri) *C* = 0.01*M*; (cerchi rossi) *C* = 0.1*M*. [36]

nell'intera soluzione valuta la quantità di gruppi imidazolo dispersi nel volume della soluzione V_{tot} ; tuttavia, la presenza dell'altro parametro C^{gel} è fondamentale, in quanto descrive come queste basi siano distribuite: in quanto la concentrazione effettiva delle stesse sarà data dal numero di esse presenti nel solo volume dell'idrogelo. Perché questa situazione risulta più vantaggiosa rispetto a quella ottenibile con una soluzione polimerica? Perché, in questo caso, saremo in grado di ottenere un livello di tamponamento maggiore rispetto a quello ottenuto senza idrogeli. [36]

Grazie a quanto detto, è possibile ottenere un effetto tamponante parecchio elevato; infatti, da Figura 5.25, osserviamo valori di pH all'equilibrio (pH_s) maggiori rispetto a quelli iniziali (pH_i); effetto circa costante per intervalli di pH_i parecchio elevati (c. a. $pH \ge 4$) per entrambe le concentrazioni totali di idrogelo inserite. Adesso, si studi proprio il contributo della concentrazione totale di idrogelo, per la quale, il modo migliore di essere esaminata è quello di analizzare l'evoluzione del grado di ionizzazione (α) in funzione del pH iniziale della soluzione (pH_i) per diverse concentrazioni totali C^{tot} : Figura 5.26. Dalla figura si osserva come le minori concentrazioni causino un maggior grado di ionizzazione del polimero, visto che saranno presenti meno gruppi ionizzabili, quindi riusciranno ad essere tutti protonati nell'arrivo a bassi valori di pH_i ; mentre, nel caso di alte



Figura 5.27. Grado di ionizzazione α in funzione del *pH* iniziale (*pH_i*) della soluzione salina, valutato per diverse concentrazioni di sali in soluzione: (quadrati neri) [*NaCl*] = 0*M*; (cerchi rossi) [*NaCl*] = 0.01*M*; (triangoli verdi) [*NaCl*] = 0.10*M*; (triangoli blu) [*NaCl*] = 0.50*M*; (rombi viola) [*NaCl*] = 0.80*M*. [37]



Figura 5.28. *pH* della soluzione salina dopo aver ragiunto l'equilibrio (*pH_s*), partente da un *pH* iniziale (*pH_i*) presentata per diverse concentrazioni di sali in soluzione: (quadrati neri) [*NaCl*] = 0*M*; (cerchi rossi) [*NaCl*] = 0.01*M*; (triangoli verdi) [*NaCl*] = 0.10*M*; (triangoli blu) [*NaCl*] = 0.50*M*; (rombi viola) [*NaCl*] = 0.80*M*. [37]

concentrazioni, il massimo grado di ionizzazione del polimero sarà minore, in quanto saranno presenti meno protoni per più gruppi funzionali. Questa differenza è anche quella che permette a queste concentrazioni di conservare la capacità tamponante fino a *pH* molto acidi ($pH_i = 1$, in Figura 5.25). Si precisi che il grado di ionizzazione α è stato calcolato utilizzando Equazione 5.14. [78, 36, 37, 38, 40, 39]

$$\alpha = \frac{10^{-pH_i} - 10^{-pH_s}}{C} \tag{5.14}$$

Però, nella discussione in corso non si sono prese in considerazione le condizioni saline, che, nel caso in questione diventano estremamente importanti; infatti, partendo proprio dal grado di ionizzazione, si può osservare, da Figura 5.27, come all'aumento della forza ionica si abbia una modifica della sigmoide, con un progressivo appiattimento dalla suddetta forma; questo è ricollegabile a quanto detto in *Rigonfiamento degli idrogeli sensibili al pH*, ovvero: l'aumento della forza ionica rende più semplice la protonazione della base in questione, il che porta alla crescita del



Figura 5.29. Andamento del *pH* nel tempo per idrogeli a base di alginato: (quadrati bianchi) l'idrogelo contiene un agente tamponante, $Mg(OH_2)$; (cerchi neri) l'idrogelo non contiene il suddetto agente reticolante. [84]



Figura 5.30. Andamento del pH di una soluzione acquosa de-ionizzata in funzione della concentrazione di agente reticolante inserita nella mescola dell'idrogelo: (quadrati neri) 2%wt di agente reticolante; (quadrati bianchi) 3%wt di agente reticolante; (cerchi neri) 10%wt di agente reticolante. [40]

grado di ionizzazione misurato per un determinato pH della soluzione iniziale (pH_i). Ovviamente, questa modifica avrà un certo effetto sulla capacità tamponante dell'idrogelo, che, per il resto, mantiene lo stesso andamento già presentato in Figura 5.25, così come mostrato in Figura 5.28.

L'affidabilità di questi risultati, ossia l'effettivo ingresso dei protoni all'interno dell'idrogelo, è verificata dall'analisi per fluorescenza di Zhang e colleghi [84], che hanno misurato il diverso pH_i tra idrogeli con e senza carica tamponante, mediante mappatura confocale e a fluorescenza: Figura 5.29. Il pH dell'idrogelo caricato è maggiore, il che vuol dire che l'agente tamponante è potuto entrare in azione; viceversa, il pH dell'idrogelo non caricato: non essendoci l'agente tamponante, il pH si è velocemente spostato verso valori acidi.

Gli idrogeli considerati finora sono stati degli idrogeli massivi, con la stessa formulazione, ossia quella di un idrogelo di PVI, con circa 20 g/dl di specie comonomerica (vinil imidazolo, VI) e, sulla quantità totale, il 2%wt in peso di agente reticolante (nello specifico: N,N'-metilen-bis-acrilammide, o BIS). Se modificassimo le variabili, in riferimento al lavoro di Molina e colleghi [39], si potrebbe osservare una significativa variazione della cinetica di equilibrio nelle curve che rappresentano il pH della soluzione nel tempo. Come mostrato in Figura 5.30 e Figura 5.31, si ha una diminuzione della



Figura 5.31. Andamento del pH di una soluzione acquosa de-ionizzata in funzione della concentrazione totale di comonomero inserita nella mescola dell'idrogelo: (quadrati neri) 30 g/dl; (quadrati bianchi) 20 g/dl. [40]

velocità di tamponamento sia all'aumento della quantità totale di comonomero inserito, ossia all'aumento della concentrazione dei gruppi ionizzabili in catena, sia all'aumento della concentrazione dell'agente reticolante, quindi alla riduzione del rigonfiamento possibile; per quanto tali risultati possano sembrare contrastanti, si pensi a quello che è stato detto finora riguardo al passaggio da una soluzione polimerica ad un nanomateriale: l'aumento dei gruppi ionizzabili rende più difficile la ionizzazione, verificato anche poco fa con Figura 5.26; ionizzazione che sarà influenzata principalmente dal punto di vista cinetico, in quanto la lieve variazione degli stati di equilibrio sembra suggerire la presenza di un maximum tamponabile dall'idrogelo, indipendente dalle caratteristiche del polimero. Ad ogni modo, i valori di equilibrio sembrano favorire le configurazioni che si rigonfiano più facilmente (minore quantità di agente reticolante, Figura 5.30) e che raggiungono un maggior grado di ionizzazione (minore quantità totale di comonomero, Figura 5.31); quanto appena detto sembra essere ricollegabile con le equazioni di equilibrio (Equazione 5.2): una maggiore quantità di agente reticolante rende più difficile il rigonfiamento, quindi anche la quantità di ioni mobili che riuscirà ad entrare nell'idrogelo sarà minore, risultando in un effetto tamponante leggermente minore; allo stesso modo, una maggiore concentrazione totale di comonomero potrebbe anche portare con sé ad una maggiore carica interna, quindi anche ad un maggiore rigonfiamento, ma l'elevata carica interna positiva potrebbe influenzare in maniera non trascurabile il principio di elettroneutralità, causando un minore ingresso di specie cationiche (tra le quali anche H^+), con un conseguente minor effetto tampone.

Un altro elemento che influenzerà la cinetica, senza però toccare il valore di equilibrio raggiungibile è la dimensione dell'idrogelo. Negli studi appena presentati si è sempre parlato di idrogeli massivi; lo studio di Kazakov e colleghi [83] lavora su idrogeli in forma di particelle di diverse dimensioni: macro; micro e nano. Ora, oltre a confermare la capacità tamponante degli idrogeli (Figura 5.32), ha anche sottolineato come l'unica variazione apprezzabile tra le diverse specie sia quella cinetica (Figura 5.33); infatti: la diminuzione della dimensione ha l'effetto di velocizzare il processo di equilibrio. Di particolare interesse è Figura 5.33, nella quale si riesce a fornire un'indicazione sul tempo per il raggiungimento dell'equilibrio, sia l'efficacia delle particelle utilizzate: infatti si osserva come al diminuire della dimensione delle particelle si abbia una diminuzione anche del picco della concentrazione di H^+ che si raccoglierà nella soluzione prima di essere tamponato, fenomeno esplicabile con l'implementata efficacia dei processi di superficie per particelle di piccole dimensioni. [83]



Figura 5.32. (a) Rigonfiamento $\langle d \rangle$ dell'idrogelo in PNIPAAm-VI in funzione del *pH* della soluzione. (b) Curva di titolazione ottenuta dall'aggiunta di *HCl* e *NaOH* ad una soluzione acquosa de-ionizzata, caricata con una dispersione di particelle di PNIPAAm-VI, rappresentata con cerchi neri. le freccie e la curva continua rappresentano la curva di titolazione dell'acqua *[83]*



Figura 5.33. Variazione del *pH* nel tempo all'aggiunta, in t = 0s, dell'acido in una soluzione acquosa deionizzata, contenente una dispersione di (1) macrogel, (2) microgel, (3) nanogel. (4) è la soluzione acquosa tal quale. [83]

Il comportamento in temperatura non è stato evidenziato dai suddetti studi, che, come già accennato, effettuano le prove in soluzioni a temperatura ambiente; proprio per questo nelle prove che seguiranno (*Scelta del polimero e sperimentazione*) verrà posta l'attenzione sull'applicabilità di un sistema di questo tipo in condizioni termiche più aggressive, oltre che la già citata valutazione dell'effetto delle biomolecole sul tampone.

6 SCELTA DEL POLIMERO E SPERIMENTAZIONE

Scegliere un polimero che riesca a ad agire nella maniera desiderata nelle condizioni previste ($T = 37^{\circ}C$ e risposta rilevante nell'intervallo compreso approssimativamente tra pH = 6.5 e pH = 7.5) è arduo, a causa della variabilità dei parametri. Il sistema più vicino a quello pensato per questa applicazione sono i sistemi DDS; tuttavia, tali sistemi sono spesso impostati in modo tale da garantire una risposta moderata alle condizioni lievemente acide, visto che devono permettere un rilascio più controllato del farmaco [63, 22, 65, 85, 57, 85, 20, 86, 87, 74] [75], oppure per poter penetrare all'interno della cellula e raggiungere le condizioni di rilascio solo all'interno della stessa [22, 65, 88]. Le dimensioni sono già state determinate, $d \in [10; 100]nm$, per cui ci si concentrerà principalmente sulla scelta del polimero in termini di pK_a e di possibili ripercussioni dal punto di vista della citotossicità; ad ogni modo si ricordi come il fine di questa tesi non sia quello di provare un impianto definito, ma quello di verificarne la fattibilità.

Facendo riferimento alle basi sintetiche proposte in Figura 5.9, per queste si osservano diversi gradi di basicità: la pirrolidina e la piperazina sembrano molto promettenti visti i loro valori di costante di dissociazione basica, rispettivamente: $pK_b = 2.73$ [89] e $pK_b = 4.3$ [90]. Invece, per quanto riguarda le basi comunemente utilizzate nei sistemi DDS, risulta infatti iconico il comportamento di tre idrogeli polimerici: poli(2-vinil piridina) (P2VP), poli(2-N-etil morfolin metacrilato) (PMEMA) e PEG-chitosano. P2VP non può essere preso in considerazione, vista la pK_a troppo bassa (già per il polimero lineare, $pK_a \sim 4.7$), che, con la reticolazione, raggiunge sempre valori minori [91]; simile è il discorso per PMEMA [92] e per il PEG-chitosano, per il quale la copolimerizzazione porta anzi ad un ulteriore abbassamento della costante di dissociazione acida del gruppo amminico ($-NH_2$), che già non era utile per l'applicazione in questione (~ 6.7). [75]



Figura 6.1. Reazione di ionizzazione del poli(N-vinil imidazolo), in ambiente acido. [40]



Figura 6.2. Analisi DLS su una dispersione di nanogel, effettuata a diverse temperature: (a) $T = 25^{\circ}C$; (a) $T = 35^{\circ}C$; (a) $T = 45^{\circ}C$. [95]

Questo spinge a volgere lo sguardo verso basi più forti, come la pirrolidina e la piperazina; ciò nonostante, per la pirrolidina, gli studi effettuati su di un idrogelo reticolato di PEP da Gonzalez riporta valori di costante di dissociazione acida dell'acido coniugato di $pK_a = 5$, associando la diminuzione della basicità alla presenza della reticolazione. [93]

L'unica base che permette di ricoprire adeguatamente l'intervallo di *pH* richiesto nella seguente applicazione è l'imidazolo, che possiede una $pK_a \sim 7$ [94]; non solo: infatti, mantiene pressocché invariato il proprio valore in seguito alla polimerizzazione e alla successiva reticolazione, nel processo di ottenimento dell'idrogelo [80, 34, 83, 95, 96, 39, 40, 41, 36, 37]. La sua costanza nelle caratteristiche acido-base, anche in seguito all'inserimento di una matrice di idrogelo, come quella di PNIPAAm [83, 95, 96], del chitosano [61], o copolimerizzandolo come reticolo semi-interpenetrante (semi-IPNs) con acrilammide (AA) e polietilenglicole (PEG) [97], lo rendono un'ottima scelta per la suddetta applicazione. In aggiunta, il PVI (Figura 6.1) è spesso stato utilizzato in diversi campi biomedicali [22], come: terapie geniche [98, 99, 100, 101] e DDS [102]; non solo: è anche utile nel settore di rimozione di inquinanti, ossia come assorbimento selettivo [60, 61, 103, 104, 105].

Perché non usare direttamente la copolimerizzazione con in PNIPAAm, come mostrato da Kazakov e colleghi [83, 95, 96]? Perché il PNIPAAm, benché sia uno tra i polimeri con una grande bibliografia a disposizione [20] [83, 95, 96, 106, 34, 46], e con diverse possibili applicazioni biomedicali [22, 19, 107] presenta delle complicazioni nella specifica applicazione. Il riferimento non è alla lieve citotossicità dello stesso, che ha spesso spinto la ricerca verso biopolimeri, come, ad esempio, polipeptidi simil-elastina [20], cosa che, tuttavia, trova delle contrapposizioni, visto che, in alcuni studi viene anche classificato come un polimero a citotossicità "non significante" [108]; bensì, ci si riferisce al diverso comportamento in soluzione che lo stesso potrebbe presentare nell'intervallo di temperature fisiologiche, rispetto ai lavori del gruppo di Kazakov [83, 95, 96], ottenuti a temperatura ambiente, data la LCST di circa $32^{\circ}C$ [34, 109, 110]; infatti, dal lavoro di Kazakov e colleghi [95] si evidenzia la possibilità di aggregazione dei nanogel preparati con questo polimero quando le temperature raggiungono valori $T \ge 35^{\circ}C$, il che potrebbe rappresentare un problema in termini applicativi, Figura 6.2.

Infine, la scelta per l'utilizzo dell'imidazolo è già stata effettuata dall'organismo; infatti l'istidina è una proteina contenente la base di imidazolo che viene utilizzata come shuttle di protoni per la regolazione del *pH* fisiologico. [111]

6.1 FLOW-CHART DELL'ESPERIMENTO

6.1.1 Produzione dei nanogel

La produzione del nanogel può avvenire mediante il processo di micro-emulsione, descritto in *Idrogeli sensibili al pH* e utilizzato come metodologia di produzione in diversi studi riguardanti l'ottenimento di idrogeli di poli(N-vinil imidazolo), PVI [60, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 102, 49, 112] [83, 95, 96, 42]. Negli studi qui citati, la formulazione dell'idrogelo rimane sempre la stessa, a parte nei lavori nei quali si sfrutta la copolimerizzazione, e. g. con poli(N-isopropil acrilammide) (PNIPAAm) [83, 95, 96], oppure inserendo come reticolo semi-interpenetrante (semi-IPNs) con acido poliacrilico (PAA) e alcool polivinilico (PVA) [102]. Gli idrogeli che verranno prodotti per l'esperimento avranno le composizioni indicate dal lavoro di Pacios e colleghi [42], con: N-vinil imidazolo (VI) e N,N'-metilen-bis-acrilammide (o BIS) in soluzione acquosa, con $6 \times 10^{-3}M$ di 2-2'-azobisisobutirronitrile (AIBN), come iniziatore; dove, le composizioni del comonomero (VI) e dell'agente reticolante (BIS) saranno variabili, secondo quando determinato nella Tabella 6-1.

Per ottenere i nanogel dobbiamo utilizzare la micro-emulsione; per fare ciò è necessario far riferimento al lavoro di Tan e colleghi [46, 45, 44, 43], che, mediante emulsione riescono ad ottenere particelle con $d \in (30; 70)nm$. Ovviamente, i lavori appena citati si basano sull'utilizzo di altri polimeri (HASE), il processo si reputa ripetibile viste le similitudini in termini di iniziatori utilizzati (sempre termici) e di temperature ($T = 80^{\circ}C$ per HASE e $T = 90^{\circ}C$ per PVI), oltre che per i tempi previsti ($t \sim 3h$ per HASE e $t \sim 2h$ per PVI).

6.1.2 Valutazione dimensionale

La dimensione media dei nanogel può essere determinata mediante DLS (Dynamic light scattering) [46, 45, 44, 43] [83, 95, 96], effettuate similmente a quanto fatto da Kazakov e colleghi [95]. Le misure saranno fatte a $T = 37^{\circ}C$ e in diverse condizioni di pH, tenendo conto delle condizioni fisiologiche espresse in *Squilibri acido/base*: pH = 6.5; pH = 7; pH = 7.5.

Il metodo DLS viene scelto per la capacità di individuare le dimensioni delle particelle in intervalli che comprendono anche dimensioni inferiori all'unità del nanometro (d < 1nm), a differenza delle tecniche per sedimentazione, che, oltre a necessitare tempistiche maggiori rispetto a quelle proposte

Tabella 6-1. Composizione dei campioni da testare; si osservi come il codice campione contenga al suo interno l'informazione relativa al peso di comonomero inserito per volume (g/dl), indicato con C_m , espressa in mol/l nella tabella, e quella della percentuale in peso di agente reticolante inserito nella miscela, C_r , espresso nuovamente in mol/l nella tabella: *PVI* C_m (C_r). [42]

Codice campione	[VI] mol/l	[BIS] mol/l
PVI20(2)	2.08	0.029
PVI20(3)	2.06	0.041
PVI20(4)	2.03	0.055
PVI20(6)	1.99	0.084
PVI20(10)	1.89	0.146
PVI40(2)	4.16	0.054
PVI40(3)	4.12	0.080
PVI40(4)	4.07	0.109
PVI40(6)	3.98	0.166
PVI30(2)	3.12	0.040
PVI50(2)	5.20	0.067
PVI60(2)	6.24	0.080
PVI30(4)	3.06	0.079
PVI50(4)	5.09	0.136

per la DLS ($t \in [1; 2]min$), impedisce la misura di particelle di dimensioni troppo piccole (dimensione minima misurabile $d \ge 0.1 \mu m$ per sedimentazione centrifuga). [113, 114]

In alternativa è possibile effettuare la misura seguendo metodi di microscopia, tipicamente utilizzata per la caratterizzazione morfologica di un polimero (forma, dimensione, fino all'ottenimento di informazioni relative alla disposizione delle macromolecole all'interno del campione). Queste tecniche si differenziano in base alla sorgente utilizzata; in particolare, si può utilizzare la luce (microscopi ottici), così come nel DLS, che, in questo caso, permette la rivelazione di particelle di dimensioni minime dell'ordine dei micrometri; ma, l'utilizzo di sorgenti elettroniche (microscopi elettronici: a trasmissione, TEM; o a scansione, SEM) consente di raggiungere anche dimensioni inferiori ($\sim 1nm$); tuttavia, le difficoltà nella preparazione del campione, che deve essere rappresentativo del lotto, rendono questa tipologia di analisi più complessa della DLS. In aggiunta a queste valutazioni, il metodo DLS può essere utilizzato direttamente sull'emulsione, a differenza dei metodi microscopici, che prevedono l'evaporazione del solvente nel quale si disperdono le particelle. [114, 72, 113]

Infine, il metodo DLS è molto utilizzato per emulsioni olio in acqua e in ambito biologico, proprio grazie alla sua affidabilità e alla sua velocità di esecuzione. [115, 116, 117]

Quindi, alla luce di quanto appena discusso, si propone di utilizzare, per la misura, l'apparato presentato da Kazakov e colleghi [83, 95, 96], mediante il quale si può estrapolare il raggio idrodinamico delle nanoparticelle, grazie al correlatore digitale presente nelle tipiche macchine DLS, che converte le fluttuazioni dell'intensità della luce in misure delle proprietà degli oggetti diffondenti (scattering).

6.1.3 Valutazione effetto tamponante

Seguendo il protocollo prescritto da Kazakov e colleghi [83, 95, 96], si effettua la titolazione potenziometrica sulla soluzione. La titolazione potenziometrica presenta una serie di vantaggi [24] in relazione alle altre tecniche; in particolare: rispetto alla tipica titolazione umida (wet titration), nella quale si utilizzano degli indicatori, in questo caso si sfrutterà una differenza di potenziale che si andrà a creare tra gli elettrodi, staccando quindi la misura dalle quantità di indicatori inseriti; inoltre, rispetto ad altre tecniche di misura elettrochimiche, come la titolazione amperometrica, non sarà distruttiva, ossia non consumerà le specie presenti nella soluzione. Quindi, questo metodo permette di ottenere la maggior precisione dei metodi elettrochimici, senza contaminare la soluzione in analisi, e, allo stesso tempo, eliminare l'errore umano relativo all'identificazione del colore dell'indicatore.

Tuttavia, trasponendo quanto fatto nello studio, per tenere in considerazione l'effetto delle molecole biochimiche (come taurina e creatina) e degli zuccheri (glucosio), oltre che degli agenti tamponanti (HEPES), utilizzati per mimare il comportamento fisiologico, si utilizzerà una soluzione di riferimento priva di sali ma sempre alla temperatura fisiologica ($37^{\circ}C$). Quella utilizzata sarà la soluzione tipicamente considerata per simulare l'acidosi, ossia quella vista nei lavori di Komukai e colleghi [12, 13]: Tabella 6-2; la quale sarà aggiustata ai *pH* di interesse mediante l'aggiunta di *NaOH* e *HCl*.

Tale metodologia (misura potenziometrica) è utilizzata anche in biochimica per la misura delle concentrazioni elettrolitiche [24, 118]. Quindi, potrà essere effettuata utilizzando un elettrodo di riferimento in Ag/AgCl, molto utilizzato in ambito biochimico [24, 118] e già utilizzato per le misure effettuate con il metodo "voltage-clamp" utilizzato per studiare la differenza di potenziale attraverso la membrana cellulare. [12, 13, 4, 119] Per osservare bene le differenze indotte dalla presenza dell'idrogelo, si procede come già fatto da Kazakov e colleghi [83, 95, 96], effettuando due misure, al fine di minimizzare l'effetto dei sali, entrambe a $T = 37^{\circ}C$: una come in tabella senza l'idrogelo e l'altra con la stessa soluzione.

Tabella 6-2. Composizione della soluzione fisiologica. [12, 13]

	Concentrazione		
	(mol/l)		
NaCl	130		
KCl	5.4		
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1.4		
NaH_2PO_4	0.4		
Creatina	10		
Taurina	20		
HEPES	5		
Glucosio	10		

L'applicazione in temperatura risulta agevole grazie alla calibrazione eseguita secondo lo standard IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) [120, 121] Infine, per una misura della concentrazione degli ioni Potassio, si utilizzano elettrodi sensibili a

questo ione, così come quelli utilizzati da Tan e colleghi [44], per i quali sono stati trovati dei riferimento che però effettuano la misura a temperatura ambiente; ora, visto che la concentrazione della soluzione è una conseguenza dell'equilibrio, una volta che questo sarà raggiunto, si potrà prelevare un campione della soluzione e analizzarla con la procedura a temperatura ambiente determinata dalla Gurdensen Health System[®] [122][.]

7 CONCLUSIONE

Il progetto così presentato si propone quindi di risolvere una problematica metabolica, compresa in una moltitudine di patologie; infatti una conseguenza come questa può presentarsi per diverse cause, e. g. acidosi lattica o chetonica (dovuto, ad esempio, ad avvelenamento da alcolici o diabete). Visto il suo effetto sistemico, inoltre, saranno possibili altre ripercussioni oltre a quella già trattata della difficoltà contrattile del muscolo cardiaco; infatti, l'acidosi può influenzare diversi eventi cellulari, come il metabolismo della cellula, come anche la sua crescita e riproduzione. Quindi, in questi termini, l'applicabilità di sistemi di questo tipo diventa assolutamente orizzontale e molto promettente in termini di futuri sviluppi. [17, 2, 10]

L'orizzontalità dell'applicabilità è conclamata, visto che, non essendo compresi medicinali, si potrebbe ottenere un risultato scevro da qualunque problematica in termini di assuefazione al medicinale, oltre che di allergie allo stesso; infine, benché la patologia in questione sia già trattabile agevolmente dal punto di vista farmacologico, l'applicazione di un sistema del genere, se ulteriormente sviluppato, potrebbe permettere un tamponamento costante, che, nei casi cronici, eviterebbe la somministrazione di farmaci a vita. In alternativa, si potrebbe reimpostare adeguatamente il sistema tampone impostato da Crespi e colleghi [80], modulando lo scambio ionico in modo tale da ottenere una duplice azione: (1) tamponare una carica acida o basica che sia; (2) rifornire il sistema delle specie ioniche delle quali è in difetto.

Nel caso trattato, si è indagato il possibile utilizzo del poli(N-vinil imidazolo) come tampone insolubile da inserire all'interno dell'ambiente patologico, con l'obiettivo di alleggerire la carica acida presente nello stesso, nelle condizioni di acidosi metabolica. La biocompatibilità del polimero e la sua capacità di agire nell'intervallo richiesto e nelle modalità ricercate, già discusse da altri studi, rendono questo sistema particolarmente promettente e ne fanno un ottimo candidato per questa applicazione. Ciò non toglie, vista la natura dell'istidina, che tale possibile applicazione sia ampliabile anche ad altre forme che comprendono tale base: e. g. il poli(4-vinil imidazolo), che, con una configurazione ancora più simile all'istidina e con una spiccata biocompatibilità, potrebbe essere in grado di assolvere lo stesso ruolo. [123]

In aggiunta, un sistema del genere potrebbe risultare utile anche per quanto riguarda altre pratiche mediche, come, ad esempio, quella della dialisi: portando il processo, adesso effettuato mediante macchinari esterni, ad essere integrato all'interno dell'organismo, migliorando la qualità della vita del paziente e rendendo il processo più economico e sostenibile, in termini di gestione in ambito ospedaliero.

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. M. Katz, Physiology of the Heart, V a cura di, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- [2] C. L. Stanfield, Fisiologia, IV a cura di, Napoli: Edises, 2012.
- [3] J. M. Downey e G. Heusch, «Sequence of Cardiac Activation and Ventricular Mechanics,» in *Heart Physiology and Pathophysiology*, Academic Press, 2001, pp. 3-18.
- [4] G. G. Matthews, Cellular Physiology of Nerve and Muscle, Malden, MA USA: Blackwell Publishing Ltd., 2013.
- [5] A. Pivovarov, F. Calahorro e R. Walker, «Na + /K + -pump and neurotransmitter membrane receptors,» *Invertebrate Neuroscience*, vol. 19, n. 1, pp. 1-16, 2019.
- [6] A. H. Kashou, A. Goyal, T. Nguyen e L. Chhabra, «Atrioventricular Block,» 08 luglio
 2020. [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459147/.
 [Consultato il giorno 24 settembre 2020].
- [7] C. Statescu, R. A. Sascau, V. Maciuc e C. Arsenescu Georgescu, «Programming an optimal atrioventricular interval in a dual chamber pacemaker regional population,» *Maedica*, vol. 6, n. 4, pp. 272-6, ottobre 2011.
- [8] N. Sperelakis, M. Sunagawa e M. Nakamura, «Electrogenesis of the Resting Potential,» in *Heart Physiology and Pathophysiology*, Academic Press, 2001, pp. 175-198.
- [9] R. D. Vaughan-Jones, K. W. Spitzer e P. Swietach, «Intracellular pH regulation in heart,» *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 46, n. 3, pp. 318-331, 2009.
- [10] K. S. Kamel e M. L. Halperin, «Metabolic acidosis,» in *Nephrology Secrets*, Philadelphia, Mosby, Inc., 2012, pp. 571-594.
- A. Lehnhardt e M. J. Kemper, «Pathogenesis, diagnosis and management of hyperkalemia,» 22 dicembre 2010. [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3061004/. [Consultato il giorno 24 settembre 2020].

- [12] K. Komucai, F. Brette e C. H. Orchard, «Electrophysiological response of rat atrial myocytes to acidosis,» *American Journal of Physiology*, vol. 283, n. 2, pp. H715-H724, 2002.
- [13] K. Komukai, F. Brette, C. Pascarel e O. C. H., «Electrophysiological response of rat ventricular myocytes to acidosis,» *American Journal of Physiology*, vol. 283, n. 1, pp. H412-H422, 2002.
- [14] C. Steenbergen, G. Deleeuw, T. Rich e W. J. R., «Effects of acidosis and ischemia on contractility and intracellular pH of rat heart.,» *Circulation research*, vol. 41, n. 6, pp. 849-858, dicembre 1977.
- [15] J. Makino, S. Uchino, H. Morimatsu e R. Bellomo, «A quantitative analysis of the acidosis of cardiac arrest: a prospective observational study.,» *Critical Care*, vol. 9, n. 4, pp. R357-R362, 2005.
- [16] H. Bailey, «Quantitative physico-chemical analysis of the acidosis of cardiac arrest.,» *Critical Care,* vol. 9, n. 4, pp. 347-348, 22 luglio 2005.
- [17] R. W. Putnam, «Intracellular pH Regulation,» in *Cell Physiology Source Book: Essentials of Membrane Biophysics*, Elsevier Inc., 2012, pp. 303-321.
- [18] P. Swietach e R. D. Vaughan-Jones, «Spatial Regulation of Intracellular pH in the Ventricular Myocyte.,» Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 1047, n. 1, pp. 271-282, giugno 2005.
- [19] D. Duan, L. Ye, F. Britton, B. Horowitz e J. R. Hume, «A Novel Anionic Inward Rectifier in Native Cardiac Myocytes,» *Circulation Research*, vol. 86, n. 4, pp. e63-e71, 03 marzo 2000.
- [20] B. A. Badeau e C. A. DeForest, «Programming Stimuli-Responsive Behavior into Biomaterials,» *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 21, pp. 241-265, 2019.
- [21] J. Hu e S. Liu, «Responsive Polymers for Detection and Sensing Applications: Current Status and Future Developments,» *Macromolecules*, vol. 43, n. 20, pp. 8315-8330, 26 ottobre 2010.
- [22] G. Kocak, C. Tuncer e V. Bütün, «pH-Responsive polymers,» *Polymer Chemistry*, vol. 8, n. 1, pp. 144-176, 2017.
- [23] T. S. Rushing e R. D. Hester, «Intrinsic viscosity dependence on polymer molecular weight and fluid temperature,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 89, n. 10, pp. 2831-2835, 06 settembre 2003.
- [24] S. Higson, Analytical Chemistry, Oxford: University Press, 2004.
- [25] G. Malucelli e N. Penazzi, Elementi di chimica per l'ingegneria, Torino: Levrotto&Bella, 2002.
- [26] G. K. Mcmillan e R. A. Cameron, «Titration Curves,» in *Advanced pH Measurement and Control*, III a cura di, ISA, 2005, pp. 55-73.
- [27] B. M. Tissue, «Buffer Solutions and Polyprotic Acids,» in *Basics of Analytical Chemistry* and Chemical Equilibria, Reactions that do not go to "Completion." Equilibria in Aqueous Solutions, Chapter 6, p., Hoboken, NJ, USA, John Wiley & Sons, Inc., 2013, pp. 221-244.
- [28] M. Sakurai, I. Takateru, F. Yamashita, K. Nakamura e T. Komatsu, «Temperature Dependence of Viscosities and Potentiometric Titration Behaviour of Poly(Nvinylimidazole) in Acqueous Solutions,» *Polymer Journal*, vol. 26, n. 6, pp. 658-664, 1994.

- [29] P. Sundararajan, Physical Aspects of Polymer Self-Assembly, John Wiley & Sons, Inc., 2016.
- [30] M. Alloisio, Biopolimeri, Nuova Cultura, 2013.
- [31] Y. Li, Y. Tang, R. Narain, A. L. Lewis e S. P. Armes, «Biomimetic stimulus-responsive star diblock gelators,» *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, vol. 21, n. 22, pp. 9946-54, 25 ottobre 2005.
- [32] A. Laguecir, S. Ulrich, J. Labille, N. Fatin-Rouge, S. Stoll e J. Buffle, «Size and pH effect on electrical and conformational behavior of poly(acrylic acid): Simulation and experiment,» *European Polymer Journal*, vol. 42, n. 5, pp. 1135-1144, 2006.
- [33] E. Su e O. Okay, «Polyampholyte hydrogels formed via electrostatic and hydrophobic interactions,» *European Polymer Journal*, vol. 88, pp. 191-204, marzo 2017.
- [34] M. Das e E. Kumacheva, «From polyelectrolyte to polyampholyte microgels: comparison of swelling properties,» *Colloid and Polymer Science*, vol. 284, n. 10, pp. 1073-1084, 2006.
- [35] A. V. Dobrynin, «Theory and simulations of charged polymers: From solution properties to polymeric nanomaterials,» *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 13, n. 6, pp. 376-388, 2008.
- [36] A. Horta, M. J. Molina, M. R. Gómez-Antón e I. F. Piérola, «The pH Inside a Swollen Polyelectrolyte Gel: Poly(N-Vinylimidazole),» *The journal of physical chemistry. B,* vol. 112, n. 33, pp. 10123-10129, 21 agosto 2008.
- [37] A. Horta, M. J. Molina, R. Gómez-Antón e I. F. Piérola, «The pH Inside a pH-Sensitive Gel Swollen in Aqueous Salt Solutions: Poly(N-vinylimidazole),» *Macromolecules*, vol. 42, n. 4, pp. 1285-1292, 02 febbraio 2009.
- [38] M. J. Molina, I. F. Piérola e M. R. Gómez-Antón, «Swelling properties of Poly(Nvinylimidazole) hydrogels,» *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials,* vol. 51, n. 6, pp. 477-484, 01 gennaio 2002.
- [39] M. J. Molina, M. R. Gómez-Antón e I. F. Piérola, «Determination of the Parameters Controlling Swelling of Chemically Cross-Linked pH-Sensitive Poly(N-vinylimidazole) Hydrogels,» *The journal of physical chemistry. B*, vol. 111, n. 42, pp. 12066-12074, 25 ottobre 2007.
- [40] M. J. Molina, M. R. Gómez-Antón e I. F. Piérola, «Factors Driving the Protonation of Poly(N-vinylimidazole) Hydrogels,» *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, vol. 42, n. 12, p. 2294–2307, 15 giugno 2004.
- [41] M. J. Molina, M. R. Gómez-Antón e I. F. Piérola, «pH-Dependence of the Swelling Capacity of Poly(N-vinylimidazole) Hydrogels,» *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 203, n. 14, pp. 2075-2082, ottobre 2002.
- [42] I. E. Pacios, M. J. Molina, M. R. Gómez-Antón e I. F. Piérola, «Correlation of swelling and crosslinking density with the composition of the reacting mixture employed in radical crosslinking copolymerization,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 103, n. 1, pp. 263-269, 05 gennaio 2007.
- [43] B. H. Tan, K. C. Tam, Y. C. Lam e T. C. B., «A semi-empirical approach for modeling charged soft microgel particles,» *Journal of Rheology*, vol. 48, n. 915, 2004.
- [44] B. H. Tan, K. C. Tam, Y. C. Lama e C. B. Tan, «Microstructure and Rheology of Stimuli-Responsive Nanocolloidal Systems-Effect of Ionic Strength,» *Langmuir*, vol. 20, n. 26, pp. 11380-6, 21 dicembre 2004.

- [45] B. H. Tan, K. C. Tam, Y. C. Lama e C. B. Tan, «Microstructure and rheology of stimuliresponsive microgel systems—effect of cross-linked density,» *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 113, n. 2, pp. 111-120, 2005.
- [46] B. H. Tan, J. P. K. Tan e K. C. Tam, «pH-Responsive Nanogels: Synthesis and Physical Properties,» in *Hydrogel Micro and Nanoparticles*, Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012, pp. 81-115.
- [47] M. Ullner, B. Jönsson e P. Widmark, «Conformational properties and apparent dissociation constants of titrating polyelectrolytes: Monte Carlo simulation and scaling arguments,» *The Journal of Chemical Physics*, vol. 100, n. 4, p. 3365, 1994.
- [48] B. Jaquet, D. Wei, B. Reck, F. Rainhold, X. Zhang, H. Wu e M. Morbidelli, «Stabilization of polymer colloid dispersions with pH-sensitive poly-acrylic acid brushes,» *Colloid Polymer Science*, vol. 291, n. 7, pp. 1659-1667, 2013.
- [49] C. Renamayor, A. Pastoriza, C. Usma e I. Pierola, «Salting-in effect of ionic liquids on poly(N -vinylimidazole) hydrogels,» *Colloid and Polymer Science*, vol. 291, n. 8, pp. 2017-2021, 2013.
- [50] Z. Adamczyk, A. Bratek, B. Jachimska, T. Jasiński e P. Warszyński, «Structure of poly(acrylic acid) in electrolyte solutions determined from simulations and viscosity measurements,» *The journal of physical chemistry. B*, vol. 110, n. 45, pp. 22426-22435, 16 novembre 2006.
- [51] H. Markovitz e G. E. Kimball, «The effect of salts on the viscosity of solutions of polyacrylic acid,» *Journal of Colloid Science*, vol. 5, n. 2, pp. 115-139, 1950.
- [52] D. Reith, B. Müller, F. Müller-Plathe e S. Wiegand, «How does the chain extension of poly (acrylic acid) scale in aqueous solution? A combined study with light scattering and computer simulation,» *The Journal of Chemical Physics*, vol. 116, n. 20, pp. 9100-9106, 22 maggio 2002.
- [53] F. Carnal e S. Stoll, «Chain stiffness, salt valency, and concentration influences on titration curves of polyelectrolytes: Monte Carlo simulations,» *The Journal of Chemical Physics*, vol. 134, n. 4, 28 gennaio 2011.
- [54] Q. Cao e H. You, «Morphologies of spherical polyampholyte brushes: Effects of counterion valence and charged monomer sequence,» *Polymer*, vol. 113, pp. 233-246, 24 marzo 2017.
- [55] C. M. Burba e C. V. Rice, «Temperature-Dependent, High-Resolution Magic-Angle-Spinning (HRMAS) NMR Studies of Poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic Acid),» Molecular Crystals and Liquid Crystals: Proceedings of the 11th International Conference on Frontiers of Polymers and Advanced Materials (ICFPAM 2011), vol. 555, n. 1, pp. 280-294, 05 aprile 2012.
- [56] S. Kudaibergenov, J. Koetz e N. Nuraje, «Nanostructured hydrophobic polyampholytes: self-assembly, stimuli-sensitivity, and application,» *Advanced Composites and Hybrid Materials*, vol. 1, pp. 649-684, dicembre 2018.
- [57] A. S. Hoffman, «Hydrogels for biomedical applications,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, pp. 18-23, dicembre 2012.
- [58] Q. Chai, Y. Jiao e X. Yu, «Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them,» *Gels,* vol. 3, n. 1, p. 6, 01 gennaio 2017.
- [59] T. R. Hoare e D. S. Kohane, «Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges,» *Polymer (Guilford),* vol. 49, n. 8, pp. 1993-2007, 15 aprile 2008.

- [60] F. Genç, C. Uzun e O. Güven, «Quaternized poly(1-vinylimidazole) hydrogel for anion adsorption,» *Polymer Bulletin*, vol. 73, n. 1, pp. 179-190, 2016.
- [61] M. N. Islam, M. N. Khan, A. K. Mallik e M. M. Rahman, «Preparation of bio-inspired trimethoxysilyl group terminated poly(1-vinylimidazole)-modified-chitosan composite for adsorption of chromium (VI) ions,» *Journal of Hazardous Materials*, vol. 379, 05 novembre 2019.
- [62] S. Chatterjee e P. C.-L. Hui, «Review of Stimuli-Responsive Polymers in Drug Delivery and Textile Application,» *Molecules*, vol. 24, n. 14, p. 2547, 01 luglio 2019.
- [63] G. R. Deen e X. J. Loh, «Stimuli-Responsive Cationic Hydrogels in Drug Delivery Applications,» *Gels*, vol. 4, n. 1, p. 13, 01 febbraio 2018.
- [64] M. D. Green, M. H. Allen, J. M. Dennis, D. S.-d. L. Cruz, R. Gao, K. I. Winey e T. E. Long, «Tailoring macromolecular architecture with imidazole functionality: A perspective for controlled polymerization processes,» *European polymer journal*, vol. 47, n. 4, pp. 486-496, aprile 2011.
- [65] F. Reyes-Ortega, «pH-responsive polymers: properties, synthesis and applications,» in *Smart Polymers and their Applications*, Elsevier Ltd, 2014, pp. 45-92.
- [66] D. Dupin, S. Fujii, S. P. Armes, P. Reeve e S. M. Baxter, «Efficient synthesis of sterically stabilized pH-responsive microgels of controllable particle diameter by emulsion polymerization,» *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, vol. 22, n. 7, pp. 3381-7, 28 marzo 2006.
- [67] B. R. Saunders, H. M. Crowther e B. Vincent, «Poly[(methyl methacrylate)- co -(methacrylic acid)] Microgel Particles: Swelling Control Using pH, Cononsolvency, and Osmotic Deswelling,» *Macromolecules*, vol. 30, n. 3, pp. 482-487, febbraio 1997.
- [68] S. R. Deka, A. Quarta, R. Di Corato, A. Falqui, L. Manna, R. Cingolani e T. Pellegrino, «Acidic pH-responsive nanogels as smart cargo systems for the simultaneous loading and release of short oligonucleotides and magnetic nanoparticles,» *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, vol. 26, n. 12, pp. 10315-24, 15 giugno 2010.
- [69] W. B. Liechty, R. L. Scheuerle e N. A. Peppas, «Tunable, responsive nanogels containing t-butyl methacrylate and 2-(t-butylamino)ethyl methacrylate,» *Polymer* (*Guilford*), vol. 54, n. 15, pp. 3784-3795, 08 luglio 2013.
- [70] T. Li Quadri, E. Verné e M. Miola, «Sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle magnetoplasmoniche per applicazioni biomediche,» luglio 2019. [Online]. Available: https://webthesis.biblio.polito.it/11378/1/tesi.pdf. [Consultato il giorno 24 settembre 2020].
- [71] «MICROEMULSION POLYMERIZATION,» [Online]. Available: http://polymerdatabase.com/polymer%20chemistry/Microemulsion%20Polymerizati on.html. [Consultato il giorno 13 settembre 2020].
- [72] S. Fakirov, Fundamentals of Polymer Science for Engineers., Newark: John Wiley & Sons, Incorporated, 2017.
- [73] A. V. Kabanov e S. V. Vinogradov, «Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities,» *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 48, n. 30, pp. 5418-5429, 13 luglio 2009.
- [74] G. Nikravan, V. Haddadi-Asl e M. Salami-Kalajahi, «Stimuli-responsive DOX release behavior of cross-linked poly(acrylic acid) nanoparticles,» *e-Polymers*, vol. 19, n. 1, 29 maggio 2019.

- [75] T. Zhou, C. Xiao, J. Fan, S. Chen, J. Shen, W. Wu e S. Zhou, «A nanogel of on-site tunable pH-response for efficient anticancer drug delivery,» *Acta Biomaterialia*, vol. 9, n. 1, pp. 4546-4557, gennaio 2013.
- [76] J. Gu, F. Xia, Y. Wu, X. Qu, Z. Yang e L. Jiang, «Programmable delivery of hydrophilic drug using dually responsive hydrogel cages,» *Journal of Controlled Release*, vol. 117, n. 3, pp. 396-402, 26 febbraio 2007.
- [77] J. C. Kurnia, E. Birgersson e A. S. Mujumdar, «Analysis of a model for pH-sensitive hydrogels,» *Polymer (Guilford),* vol. 53, n. 2, pp. 613-622, 2012.
- [78] A. Horta e I. F. Piérola, «Poly(N-vinylimidazole) Gels as Insoluble Buffers that Neutralize Acid Solutions without Dissolving,» *The journal of physical chemistry. B*, vol. 113, n. 13, pp. 4226-31, aprile 02 2009.
- [79] H. J. Kwon, Y. Osada e J. P. Gong, «Polyelectrolyte Gels-Fundamentals and Applications,» *Polymer Journal*, vol. 38, n. 12, p. 1211, 2006.
- [80] M. C. Crespi, G. A. Crespo, X. Xiec, R. Touillouxa, M. Tercier-Waeber e E. Bakeer, «Agarose hydrogel containing immobilized pH buffer microemulsion without increasing permselectivity,» *Talanta (Oxford)*, vol. 177, pp. 191-196, 15 gennaio 2018.
- [81] H. P. Adler, K.-F. Arndt, J. Lienig, S. Klatt, G. Paschew e A. Richter, «Review on Hydrogel-based pH Sensors and Microsensors,» Sensors (Basel, Switzerland), vol. 8, n. 1, pp. 561-581, 01 gennaio 2008.
- [82] J. Tavakoli e Y. Tang, «Hydrogel Based Sensors for Biomedical Applications: An Updated Review,» *Polymers*, vol. 9, n. 8, 16 agosto 2017.
- [83] S. Kazakov, M. Kaholek, I. Gazaryan, B. Krasnikov, K. Miller e K. Levon, «Ion Concentration of External Solution as a Characteristic of Micro- and Nanogel Ionic Reservoirs,» *The journal of physical chemistry. B*, vol. 110, n. 31, pp. 15107-16, 10 agosto 2006.
- [84] Z. Zhang, R. Zhang, Q. Sun, Y. Park e D. J. Mcclements, «Confocal fluorescence mapping of pH profile inside hydrogel beads (microgels) with controllable internal pH values,» *Food hydrocolloids*, vol. 65, pp. 198-205, aprile 2017.
- [85] S. Dai, P. Ravi e K. C. Tam, «pH-Responsive polymers: synthesis, properties and applications,» *Soft Matter*, vol. 4, n. 3, pp. 435-449, 2008.
- [86] C. Zhao, X. Zhuang, P. He, C. Xiao, C. He, J. Sun, X. Chen e X. Jing, «Synthesis of biodegradable thermo- and pH-responsive hydrogels for controlled drug release,» *Polymer (Guilford)*, vol. 50, n. 18, pp. 4308-4316, 26 agosto 2009.
- [87] Y. Qiu e K. Park, «Environment-sensitive hydrogels for drug delivery,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, pp. 49-60, dicembre 2012.
- [88] G. J. Ye, D. Almeda, J.-O. You e D. T. Auguste, «Bioresponsive matrices in drug delivery,» *Journal of biological engineering*, vol. 4, n. 1, p. 15, 01 novembre 2010.
- [89] H. K. J. Hall, «Correlation of Base Strengths of Amines,» *J. Am. Chem.*, vol. 79, n. 20, pp. 5441-5444, 1957.
- [90] «Piperazine,» Institute for Health and Consumer Protection, 2005. [Online].
 Available: https://web.archive.org/web/20070221154326/http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Existin g-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/SUMMARY/piperazinesum324.pdf. [Consultato il giorno 24 settembre 2020].

- [91] D. Dupin, S. Fujii, S. P. Armes, P. Reeve e S. M. Baxter, «Efficient synthesis of sterically stabilized pH-responsive microgels of controllable particle diameter by emulsion polymerization,» *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids,* 28 marzo 2006.
- [92] C. Tuncer, Y. Samav, D. Ülker, S. B. Baker e V. Bütün, «Multi-responsive microgel of a water-soluble monomer via emulsion polymerization,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 132, n. 24, 20 giugno 2015.
- [93] N. González, C. Elvira e J. S. Román, «Novel Dual-Stimuli-Responsive Polymers Derived from Ethylpyrrolidine,» *Macromolecules*, vol. 38, n. 22, pp. 9298-9303, novembre 2005.
- [94] H. Walba e R. Isansee, «Acidity Constants of Some Arylimidazoles and Their Cations,» *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 26, n. 8, p. 2789–2791, 1961.
- [95] S. V. Kazakov, M. Kaholek e K. Levon, «Nanometer scale ionic reservoir based on ionresponsive hydrogels,» *Proceedings of SPIE*, vol. 4695, n. 1, pp. 42-51, 10 luglio 2002.
- [96] S. Kazakov, M. Kaholek, D. Kudasheva, I. Teraoka, M. K. Cowman e K. Levon, «Poly(Nisopropylacrylamide- c o -1-vinylimidazole) Hydrogel Nanoparticles Prepared and Hydrophobically Modified in Liposome Reactors: Atomic Force Microscopy and Dynamic Light Scattering Study,» *Langmuir*, vol. 19, n. 19, pp. 8086-8093, novembre 2003.
- [97] Ö. B. Üzüm e E. Karadağ, «Swelling characterization of novel ternary semi-IPNs: acrylamide/1-vinylimidazole/PEG hydrogels,» *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 18, n. 6, pp. 483-489, giugno 2007.
- [98] E. N. Danilovtseva, S. N. Zelinskiy, V. A. Pal'shin, G. Kandasamy, U. M. Krishnan e V. V. Annenkov, «Poly(1-vinylimidazole) Prospects in Gene Delivery,» *Chinese Journal of Polymer Science*, vol. 37, n. 7, pp. 637-645, luglio 2019.
- [99] S. Asayama, T. Sekine, H. Kawakami e S. Nagaoka, «Design of aminated poly(1vinylimidazole) for a new pH-sensitive polycation to enhance cell-specific gene delivery,» *Bioconjugate chemistry*, vol. 18, n. 5, pp. 1662-7, 2007.
- [100] S. Asayama, T. Hakamatani e H. Kawakami, «Synthesis and characterization of alkylated poly(1-vinylimidazole) to control the stability of its DNA polyion complexes for gene delivery,» *Bioconjugate chemistry*, vol. 21, n. 4, pp. 646-52, 21 aprile 2010.
- [101] S. Asayama, T. Hakamatani e H. Kawakami, «Tuning of the methylimidazolium/imidazole balance in polycations for gene carrier,» *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 25, n. 8, pp. 823-826, agosto 2014.
- [102] S. Indermun, Y. E. Choonara, P. Kumar, L. C. Du Toit, G. Modi, R. Luttge e V. Pillay, «An interfacially plasticized electro-responsive hydrogel for transdermal electro-activated and modulated (TEAM) drug delivery,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 462, n. 1-2, pp. 52-65, 28 febbraio 2014.
- [103] C. Shan, Z. Ma, M. Tong e J. Ni, «Removal of Hg(II) by poly(1-vinylimidazole)-grafted Fe3O4@SiO2 magnetic nanoparticles,» *Water Research (Oxford)*, vol. 69, pp. 252-260, 01 febbraio 2015.
- [104] W. Feng, W. Gu, L. Zhang, X. Tantai, B. Jiang, H. Yang e H. Zhang, «pH-Responsive and Buffering Macromolecule Aqueous Absorbent and Mathematic Model-Based Feasibility Evaluation for SO 2 Capture,» *Transactions of Tianjin University*, vol. 25, n. 3, pp. 226-236, 2019.
- [105] M. Erdem, Ö. Dikişler e B. Erdem, «Removal of Orange II from Aqueous Solutions Using N-Vinyl Imidazole-based Hydrogels as Adsorbents,» *Chemical Engineering Communications*, vol. 203, n. 10, pp. 1403-1412, 02 ottobre 2016.
- [106] H. Senff e W. Richtering, «Temperature sensitive microgel suspensions: Colloidal phase behavior and rheology of soft spheres,» *The Journal of Chemical Physics*, vol. 111, n. 4, pp. 1705-1711, 22 luglio 1999.
- [107] Y.-J. Kim e Y. Matsunaga, «Thermo-responsive polymers and their application as smart biomaterials,» *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 5, n. 23, pp. 4307-4321, 2017.
- [108] C. Duan, D. Zhang, F. Wang, D. Zheng, L. Jia, F. Feng, Y. Liu, Y. Wang, K. Tian, F. Wang e Q. Zhang, «Chitosan- g-poly(N-isopropylacrylamide) based nanogels for tumor extracellular targeting,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 409, n. 1, pp. 252-259, 2011.
- [109] Y. Zhang, S. Furyk, L. B. Sagle, Y. Cho, D. E. Bergbreiter e P. S. Cremer, «Effects of Hofmeister Anions on the LCST of PNIPAM as a Function of Molecular Weight,» *The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces,* vol. 111, n. 25, pp. 8916-8924, 2007.
- [110] K. Jain, R. Vedarajan, M. Watanabe, Ishikiriyama, M. e N. Matsumi, «Tunable LCST behavior of poly(N-isopropylacrylamide/ionic liquid) copolymers,» *Polymer Chemistry*, vol. 6, n. 38, pp. 6819-6825, 2015.
- [111] P. W. Hochachka e G. N. Somero, Biochemical Adaptation : Mechanism and Process in Physiological Evolution, New York: Oxford University Press, USA, 2002.
- [112] J. Valencia, J. Baselga e I. F. Pierola, «Compression elastic modulus of neutral, ionic, and amphoteric hydrogels based on N -vinylimidazole,» *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, vol. 47, n. 11, pp. 1078-1087, 01 giugno 2009.
- [113] N. Jose, G. P. Deshmukh e M. R. Ravindra, «Dynamic Light Scattering: Advantages and Applications,» *Acta Scientific Nutritional Health*, vol. 3, n. 3, pp. 50-52, 2019.
- [114] M. N. Rahaman, Ceramic processing, Taylor&Francis Group, LLC, 2017.
- [115] S. S. Jena, H. M. Joshi, K. Sabareesh, B. Tata e T. Rao, «Dynamics of Deinococcus radiodurans under Controlled Growth Conditions,» *Biophysical journal*, vol. 91, n. 7, pp. 2699-2707, 2006.
- [116] K. P. V. Sabareesh, S. S. Jena e B. V. R. Tata, «Dynamic Light Scattering Studies on Photo Polymerized and Chemically Cross-linked Polyacrylamide Hydrogels,» *AIP Conference Proceedings*, vol. 832, n. 1, pp. 307-310, 2006.
- [117] J. Stetefeld, S. McKenna e T. Patel, «Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences,» *Biophysical Reviews*, vol. 8, n. 4, pp. 409-427, 2016.
- [118] S. R. Cortón e E. Mikkelsen, Bioanalytical Chemistry, Wiley, 2016.
- [119] J. M. Berman e M. S. Awayda, «Redox artifacts in electrophysiological recordings,» *The American Physiological Society*, vol. 304, n. 7, p. C604–C613, 23 gennaio 2013.
- [120] Schumann, Bonora, Ceriotti, Férard, Ferrero, Franck, Gella, Hoelzel, Jørgensen, Kanno, Kessner, Kristiansen, Lessinger, Linsinger, Misaki, Panteghini, Pauwels, Schiele, Schimmel, Weidemann e Siekmann, «IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37°C Part 6. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Concentration of gamma-Glutamyltransferase,» *Clin Chem Lab Med*, vol. 7, n. 734-738, p. 40, 2002.

- [121] W. Lang e R. Zander, «Physiological HEPES Buffer Proposed as a Calibrator for pH Measurement in Human Blood,» *Clin Chem Lab Med*, vol. 37, n. 5, p. 563–571, maggio 1999.
- [122] G. H. S. (R), «Sodium, Potassium, Chloride (ISE) Cobas c501: Lab-4007,» 12 settembre 2018. [Online]. Available: https://www.gundersenhealth.org/app/files/public/6693/Lab-Policies-Sodium-Potassium-Chloride-ISE---Cobas-c501-Lab-4007.pdf. [Consultato il giorno 21 settembre 2020].
- [123] A. Piloni, C. Cao, C. J. Garvey, A. Walther e M. H. Stenzel, «Poly(4-vinyl imidazole): A pH-Responsive Trigger for Hierarchical Self-Assembly of Multicompartment Micelles Based upon Triblock Terpolymers,» *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 220, n. 20, ottobre 2019.
- [124] [Online]. Available: https://www.google.com/search?q=fibra+muscolare&tbm=isch&ved=2ahUKEwjdiK-VydLrAhUCkaQKHWrCBKEQ2cCegQIABAA&oq=fibra+muscolare&gs_lcp=CgNpbWcQAzICCAAyAggAMgIIADICCAAyAg gAMgIIADICCAAyAggAMgIIADICCAA6BAgjECc6BAgAEEM6CAgAELEDEIMBOgUIABCxA 1Cv5QJY2_ICYLv6AmgAcA. [Consultato il giorno 05 settembre 2020].
- [125] G. H. Wahler, «Cardiac Action Potentials,» in *Heart Physiology and Pathophysiology*, Academic Press, 2001, pp. 199-211.
- [126] [Online]. Available: https://www.zuniv.net/physiology/book/chapter11.html. [Consultato il giorno 06 settembre 2020].
- [127] I. Teraoka, Polymer solutions: An introduction to physical properties, New York: John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- [128] J. Ricka e T. Tanaka, «Swelling of ionic gels: quantitative performance of the Donnan theory,» *Macromolecules*, vol. 17, n. 12, pp. 2916-2921, 1984.
- [129] E. Vasheghani-Farahani, J. H. Vera, D. G. Cooper e M. E. Weber, «Swelling of Ionic Gels in Electrolyte Solutions,» *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 29, n. 4, pp. 554-560, 1990.
- [130] W. contributors, «Na+/K+-ATPase,» Wikipedia, The Free Encyclopedia., 29 agosto 2020. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Na%2B/K%2B-ATPase&oldid=975604778. [Consultato il giorno 18 settembre 2020].
- [131] E. Blanco, H. Shen e M. Ferrari, «Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery,» *Nature biotechnology*, vol. 33, n. 9, pp. 941-51, 2015.
- [132] c. d. Wikipedia, «Sistema di conduzione del cuore,» Wikipedia, L'enciclopedia libera.,
 04 gennaio 2018. [Online]. Available:
 //it.wikipedia.org/w/index.php?title=Sistema_di_conduzione_del_cuore&oldid=936431
 12. [Consultato il giorno 06 settembre 2020].
- [133] M. Quesada-Pérez, J. A. Maroto-Centeno, J. Forcada e R. Hidalgo-Alvarezc, «Gel swelling theories: The classical formalism and recent approaches,» *Soft Matter*, vol. 7, n. 22, pp. 10536-10547, 2011.
- [134] A. Kyrychenko, M. M. Blazhynska, M. V. Slavgorodska e O. N. Kalugin, «Stimuliresponsive adsorption of poly(acrylic acid) onto silver nanoparticles: Role of polymer chain length and degree of ionization,» *Journal of Molecular Liquids*, vol. 276, pp. 243-254, 15 febbraio 2019.

- [135] G. Nikravan, V. Haddadi-Asl e M. Salami-Kalajahi, «Synthesis of dual temperature and pH-responsive yolk-shell nanoparticles by conventional etching and new deswelling approaches: DOX release behavior,» *Colloids and surfaces, B, Biointerfaces,* vol. 165, pp. 1-8, 01 maggio 2018.
- [136] c. d. Wikipedia, «Amminoacido,» Wikipedia, L'enciclopedia libera, 12 settembre
 2020. [Online]. Available:
 //it.wikipedia.org/w/index.php?title=Amminoacido&oldid=115480621. [Consultato il giorno 24 settembre 2020].
- [137] c. d. Wikipedia, «Glucosio,» Wikipedia, L'enciclopedia libera, 26 aprile 2020. [Online].
 Available: //it.wikipedia.org/w/index.php?title=Glucosio&oldid=112479761.
 [Consultato il giorno 24 settembre 2020].