

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede Amministrativa del Dottorato

XX Ciclo del Dottorato di ricerca in
SCIENZE DEL FARMACO
SSD - Farmaceutico Tecnologico Applicativo

Messa a punto e validazione delle caratteristiche tecnologiche e farmaco-biologiche di materiali polimerici per uso medicale

Dottoranda:
Dr.ssa Anna Chiara Maghetti

Coordinatore
Chiar.mo Prof. Maurizio Prato
Università degli Studi di Trieste

Tutore e Relatore
Dr. Guglielmo Zingone
Università degli Studi di Trieste

INTRODUZIONE

L'attività di ricerca dal titolo "Messa a punto e validazione delle caratteristiche tecnologiche e farmaco-biologiche di materiali polimerici per uso medicale" si è svolta nell'ambito della convenzione tra il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Trieste e la S.I.F.RA. EST SpA.

L'obiettivo era quello di mettere a punto un nuovo materiale plastico (registrato con il nome di Smart Flat[®]) per uso medicale a base di Polivinilcloruro (PVC) per la produzione di sacche da raccolta impiegate in sistemi per dialisi peritoneale. Le richieste del mercato prevedevano che tale materiale dovesse essere gofrato in modo da facilitare l'apertura al momento dell'utilizzo e che potesse essere sterilizzato in autoclave mediante calore umido senza collabire su sé stesso anche se vuoto; la sacca doveva inoltre essere dotato di una speciale finestra trasparente che permettesse in ogni momento l'ispezione della soluzione in esso contenuta, facilitando quindi il lavoro di medici ed infermieri.

Poiché la contemporanea presenza nella sacca di una parte plastica opaca e della finestra trasparente rappresentava un'assoluta innovazione nel settore di film di PVC morbido prodotto per estrusione, sono state condotte delle prove preliminari che hanno messo in evidenza le ottime caratteristiche di resistenza alla trazione e alla rottura di tale materiale plastico sia in fase di test che di produzione. Oltre che della messa a punto di tale tipo di contenitore, in questo lavoro ci si è occupati della sua caratterizzazione chimico-fisica, di studiarne la biocompatibilità e della stabilità.

Gli utilizzi del PVC sono innumerevoli; per aggiunta di prodotti plastificanti può essere modellato per stampaggio a caldo nelle forme desiderate. Può essere ridotto a film oppure a liquido con cui vengono spalmati tessuti o rivestite superfici, serbatoi, valvole, rubinetti, vasche e fibre tessili artificiali: in termini applicativi, il PVC è la materia plastica più versatile conosciuta. Le applicazioni più rilevanti sono la produzione di tubi per edilizia (ad esempio grondaie e tubi per acqua potabile) profili per finestra, pavimenti vinilici, film rigido e plastificato per imballi e

cartotecnica. Nella figura seguente si può osservare come è ripartito il mercato del PVC in base agli utilizzi.

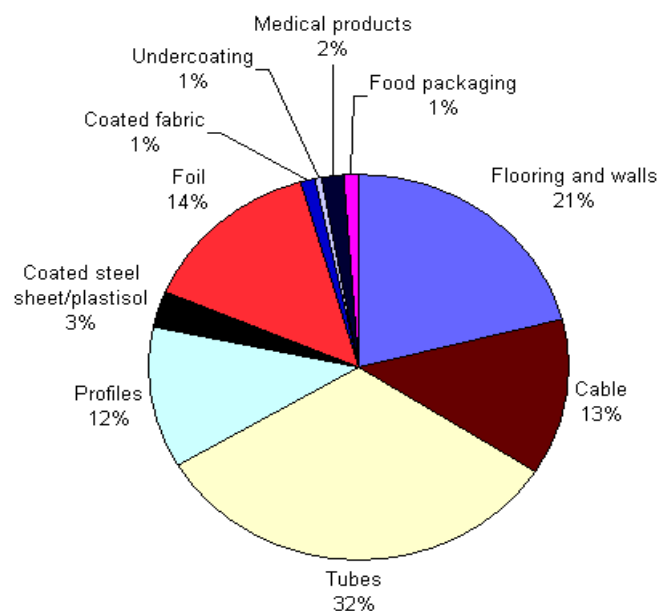


Figura 1: settori di utilizzo del PVC

Il PVC è stato una delle prime materie plastiche ad essere prodotta e utilizzata su larghissima scala e ancora oggi mantiene posizioni d'avanguardia in molti settori applicativi anche in quelli che, a prima vista, sembrerebbero richiedere l'impiego di prodotti chimicamente più avanzati. Così è, ad esempio, per il settore medicale, che, come è facilmente intuibile, richiede materiali in grado di soddisfare stringenti normative di qualità e funzionalità.

L'introduzione dei materiali plastici nel settore medicale rappresenta uno dei più rilevanti progressi scientifici del secolo scorso: ad esempio, l'utilizzo di presidi medico chirurgici in materiale plastico ha ridotto l'utilizzo del vetro, eliminando il rischio di contaminazione o infezioni e inoltre ha eliminato il problema relativo alla ri-sterilizzazione ⁽¹⁾.

Originariamente il PVC ha trovato impiego per sostituire i flaconi in vetro per infusione e successivamente è stato impiegato anche per la conservazione del sangue umano e delle sue frazioni: attualmente l'impiego del PVC nel settore medico si estende dalla produzione di manufatti per dialisi, all'infusione e alla trasfusione.

Il PVC non viene usato come resina tal quale, ma come "compound" o granulo, addizionato con particolari sostanze che conferiscono caratteristiche di flessibilità tali da renderlo adatto a essere lavorato mediante estrusione o stampaggio a iniezione. Proprio nella possibilità di essere facilmente modificato in funzione del prodotto finale che si vuole ottenere sta il maggior vantaggio del PVC rispetto a materiali concorrenti: per esempio, l'ABS è opaco e utilizzato solo per lo stampaggio di piccoli pezzi rigidi, le poli-olefine ed il polistirene hanno limiti di durezza, il PMMA ha un prezzo elevato ed è quindi usato solo per applicazioni particolari (in cardiocirurgia, negli apparati per la filtrazione del sangue) ⁽²⁾. Così, sia sotto l'aspetto tecnico che applicativo, le prospettive del PVC nel settore medico continuano ad essere buone. Anzi, per i produttori di materie prime e di manufatti si stanno aprendo opportunità commerciali in tutto il mondo, ma soprattutto nei paesi in via di sviluppo, che stanno facendo molti progressi in fatto di assistenza sanitaria pubblica. Peraltro, anche in questi paesi sono oggi in atto normative piuttosto severe sulla qualità e la funzionalità dei prodotti. È quindi sul terreno della qualità, prima che in quello immediato dei prezzi, che si gioca la partita tra i diversi produttori di PVC e dei relativi manufatti.

Fra gli additivi di principale importanza, le sostanze plastificanti modificano le caratteristiche di lavorabilità del PVC. In commercio sono presenti numerosi plastificanti di varia natura che vengono scelti in base al costo e all'applicazione a cui il prodotto finale è destinato. Generalmente i derivati dell'anidride ftalica sono la scelta di preferenza per molti settori poiché possiedono il miglior rapporto prezzo-attività plastificante.

In generale globalmente più di 8 milioni di tonnellate di ftalati vengono utilizzate ogni anno e più di 2 milioni di tonnellate sono di di-2-etilesil-ftalato (comunemente definito DEHP) ⁽³⁾ (Figura 2).

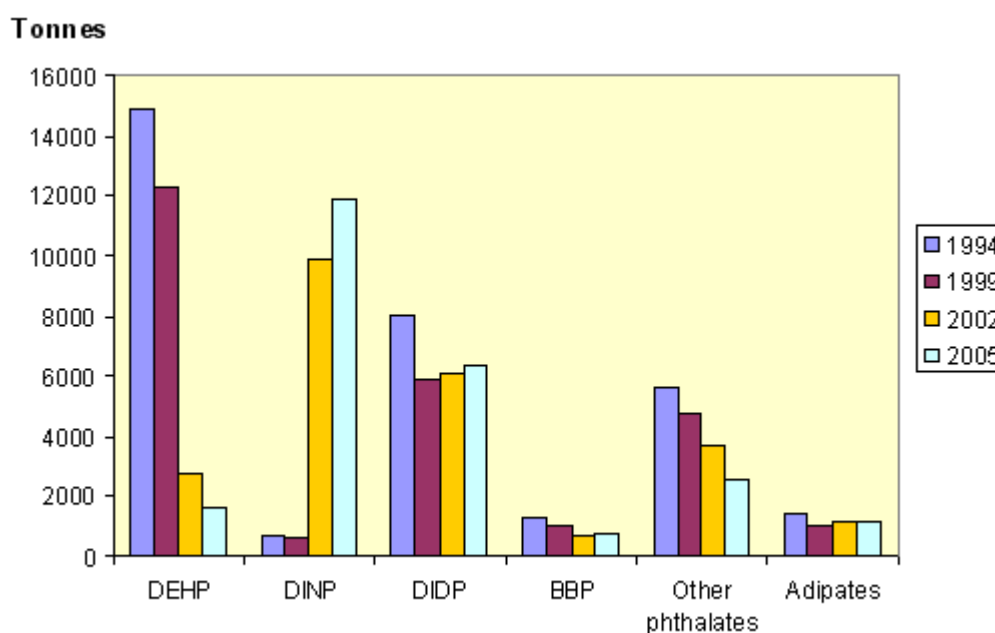


Figura 2: *Quantità e tipo di plastificanti utilizzati negli anni 1994-2005*

Altri ftalati importanti per la produzione e le applicazioni sono il dietilftalato (DEP), dibutilftalato (DBP), di-iso-benzilftalato (BBzP), di-isononilftalato (DiNP) e il di-n-ottilftalato (DnOP) ⁽⁴⁾.

Dato il largo utilizzo, la tossicità derivante dall'esposizione a questi composti che comunemente avviene attraverso inalazione, ingestione, assorbimento cutaneo e che può durare per tutta la vita, sin dalla nascita è stata sede di molti studi ⁽⁵⁾. In particolare, grande attenzione nel corso degli anni è stata posta sulla potenziale tossicità del plastificante DEHP (di-2-etilesil-ftalato); la migrazione dalle sacche in PVC alla soluzione in esse contenute e il relativo potenziale pericolo hanno sollevato molti dubbi riguardo la possibilità del suo utilizzo nel settore medicale ⁽⁶⁾. Tuttavia, la presenza di suoi metaboliti nei fluidi corporei non significa di per sé che gli ftalati siano necessariamente tossici e ci sono molti dubbi sui recenti dati epidemiologici. Non vi è un'opinione univoca riguardo la tossicità degli ftalati e in alcuni casi è stato dimostrato che vi è una bassa tossicità acuta se somministrati per via orale o endovenosa e non è stato possibile trovare tossicità specifica nei confronti degli esseri umani ⁽⁷⁾. Uno studio indipendente è stato svolto anche per verificare la potenziale cancerogenicità su pazienti regolarmente sottoposti a

dialisi peritoneale e quindi a contatto prolungato con DEHP. Tale studio ha dimostrato che il rischio di cancro non risulta aumentato anche in caso di esposizioni per tempi prolungati ⁽⁸⁾. In letteratura sono riportati anche studi relativi a come varia l'espressione di alcuni geni (crescita, riproduzione, mortalità) di *Caenorhabditis elegans* in relazione alla concentrazione di DEHP somministrato e si è visto che effettivamente il comportamento fisiologico varia in relazione alla quantità di DEHP tanto che si è valutata la possibilità di utilizzare *C. elegans* come biomarker per verificare l'inquinamento del suolo ⁽⁹⁾; altri studi hanno dimostrato effetti cancerogeni su animali in seguito ad esposizione prolungata ⁽¹⁰⁾, atrofia testicolare in topi e ratti ⁽¹¹⁾; in un altro studio la migrazione di DEHP dai presidi medico chirurgici nel mezzo in essi contenuto ha dato segni di tossicità ⁽¹²⁾, in altri casi è stata trovata una possibile interferenza con il sistema endocrino che è responsabile della crescita, dello sviluppo sessuale e di molte altre indispensabili funzioni fisiologiche sia negli uomini che nelle donne ⁽¹³⁻¹⁴⁾, effetti sullo sviluppo e sugli effetti sulla riproduzione, che sembrano mostrarsi in ratti femmina di età più avanzata rispetto a ratti maschi, sono ancora in fase di studio ⁽¹⁵⁾. DEHP e il suo principale metabolita MEHP sembrano avere il medesimo target sulle cellule testicolari e ovariche: in particolare la tossicità a livello dei testicoli sembra essere mediata dall'inibizione del segnale di traduzione dell'ormone follicolo stimolante (FSH) ⁽¹⁶⁾.

La possibile pericolosità degli ftalati è di difficile valutazione poiché ancora non è stato trovato un metodo analitico univoco per misurare la presenza di queste sostanze o dei loro metaboliti nei fluidi corporei: le prime matrici sono urina e sangue, ma altre possibilità sono le vie escretive cioè aria espirata, saliva, sudore e latte materno, oltre al tessuto adiposo e alle ossa ⁽¹⁷⁾. Comunemente vengono considerate due vie per monitorare l'esposizione a ftalati: o misurando l'esposizione esterna (monitoraggio ambientale) e/o l'esposizione interna (monitoraggio biologico). Con quest'ultimo termine si intende la determinazione degli ftalati e dei loro metaboliti in fluidi corporei. Questa è una grandezza non ambigua che permette di quantificare l'esposizione individuale di ciascun soggetto, indipendentemente dalle variabili dell'esposizione esterna ⁽¹⁸⁾.

E' quindi argomento molto delicato e di massimo interesse valutare le cessioni e le possibili interazioni di tale materiale con contenitori per infusione e varie tipologie di soluzioni: in particolare in questo studio sono state prese in considerazione

quelle che normalmente vengono utilizzate per l'infusione e per la conservazione del sangue umano e che quindi potrebbero veicolare questo composto potenzialmente tossico.

Nel 1999, negli Stati Uniti, i cittadini si sono riuniti in una petizione per chiedere l'eliminazione del DEHP dai presidi medico chirurgici, chiedendo che venisse iniziato uno studio per cercare un'efficace alternativa a questo plastificante⁽¹⁹⁾. Attualmente, però, nessun organo legislativo ufficiale ha indicato una possibile valida alternativa al PVC plastificato. Si è visto che la maggior parte del DEHP ingerito proviene proprio dal cibo e questa quantità varia da 3 a 30 µg/kg/gg⁽²⁰⁾. Questo valore supera già i limiti di esposizione cronica ritenuti tollerabili dalla maggior parte della popolazione. Limiti preventivi sono stati posti da vari paesi come ad esempio la dose di riferimento (RfD) della U.S: Environmental Protection Agency fissata a 20 µg/kg/gg⁽²¹⁾ o come la quantità tollerabile giornaliera (TDI) dell'Unione Europea fissata a 37 µg/kg/gg⁽²²⁾, mentre in Giappone, il Ministero della Salute ha fissato come limite ingeribile ogni giorno 40-140 µg/kg/giorno; inoltre sempre in Giappone l'uso di DEHP come plastificante è stato regolato in modo tale che non possa venir usato nella manifattura di giocattoli per bambini e guanti di plastica per maneggiare cibi.

Proprio in virtù di ciò, molti scienziati hanno cercato materiali plastici alternativi per la conservazione del sangue umano, come ad esempio gli studi fatti tra gli anni '60 e '70 presso la Fenwal Laboratories⁽²³⁾, ove hanno ricercato un materiale che potesse essere processato come il PVC, con le stesse macchine, con sistemi analoghi di assemblaggio in modo da rendere il passaggio da PVC ad un materiale diverso il più semplice, economico e veloce possibile. Tra i vari materiali presi in esame dagli scienziati nel corso degli anni, ci sono stati anche polimeri termoplastici come il poliuretano⁽²⁴⁾, copolimeri di EVA (etil-vinil-acetato)⁽²⁵⁾, poliestere flessibile e vari copolimeri di miscele di poliolefine e materiali termoplastici⁽²⁶⁾. I risultati ottenuti comunque non hanno ancora eguagliato la duttilità del PVC.

In un recente studio, si è cercato di minimizzare la quantità di DEHP che migra in soluzione mediante una parziale sostituzione del comune plastificante con un plastificante polimerico (in particolare si tratta di gomma acrilonitrile-butadiene NBR): l'effetto di questa parziale sostituzione sulla quantità di DEHP migrato in soluzione è stata valutata a diverse temperature di 10, 25 e 40°C. Lo studio ha

dimostrato che l'incorporazione di NBR riduce la velocità di migrazione di DEHP, in particolare a basse temperature. Questo studio ha inoltre dimostrato che anche la permeabilità ai gas (ossigeno e anidride carbonica) viene ridotta dall'aggiunta di NBR; al contrario la permeabilità al vapor d'acqua è risultata maggiore ⁽²⁷⁾.

Le caratteristiche fondamentali che una sacca per infusione deve possedere sono:

- ✓ la possibilità di essere sterilizzata a vapore a 121°C,
- ✓ la flessibilità,
- ✓ la forza e la trasparenza,
- ✓ bassa tossicità acuta
- ✓ un rapporto costo/performance favorevole ⁽²⁸⁾.

In base a quanto detto sino ad ora, tra gli studi più interessanti che vengono eseguiti sui contenitori di PVC plastificato rientrano certamente l'identificazione e la quantificazione dei componenti rilasciati in soluzione. Recentemente, uno studio sulla quantità di plastificante DEHP rilasciata da vari tipi di materiali (PVC, PE, coestrusi di PVC-PE, e triestrusi di PVC-EVA-PE) utilizzati per la produzione di tubi da drenaggio messi a contatto con soluzioni infusionali ha dimostrato che la quantità di plastificante rilasciato è sempre paragonabile, indipendentemente dalla natura materiale scelto per la produzione del tubo ⁽²⁹⁾.

Già negli anni '70 è risultato chiaro come il controllo della contaminazione particellare fosse un parametro da monitorare accuratamente poiché sembra che il plastificante e gli altri additivi aggiunti alla resina di PVC tendano ad emulsionarsi quando sterilizzati con calore umido andando a formare particelle a basso peso molecolare ⁽³⁰⁾. Anche il cambio morfologico del materiale plastico, quando esposto ad alte temperature quali quelle necessarie per il processo di sterilizzazione con calore umido, deve essere analizzato proprio per valutare la formazione di queste particelle che possono restare in soluzione creando pericolo per la salute del paziente.

Proprio lo studio della cessione particellare da una sacca prodotta utilizzando Smart Flat[®] è stato il primo obiettivo di questo lavoro insieme con le eventuali variazioni morfologiche della superficie interna della sacca a contatto con il liquido in essa contenuta. Inoltre, è stato verificato il possibile uso di tali sacche non solo come contenitore di soluzioni infusionali ma anche quale contenitore di sangue

umano e sue frazioni per cui sono state valutate anche le sue caratteristiche di biocompatibilità e citotossicità.

I contenitori per il sangue umano sono stati lungamente studiati al fine di prolungare il più possibile la vita cellulare senza arrecare danno ai pazienti. Sono normalmente sacche di materiale plastico in poli-vinil cloruro e/o poli-olefine le cui caratteristiche salienti sono la resistenza alla centrifugazione, la permeabilità agli scambi gassosi e la resistenza alle temperature di congelamento di plasma fresco. Inoltre, il materiale scelto non deve alterare la funzionalità delle cellule ematiche e delle proteine plasmatiche. Tuttavia, la letteratura recente segnala alcune influenze negative che i materiali plastici attualmente in uso hanno sulla funzionalità delle cellule ematiche e delle proteine plasmatiche conservate a fini trasfusionali. Tra questi bisogna ricordare il cambiamento della struttura della membrana eritrocitaria a cui si associano la riduzione dell'emivita post-trasfusionale della cellula, l'adesione di cellule mononucleate al materiale plastico con il conseguente rilascio di citochine responsabili di reazioni febbrili non emolitiche e la proteolisi dei fattori dell'emostasi nel plasma.

1. COMPOSIZIONE DI SMART-FLAT

1.1. Polivinilcloruro

Il Poli-vinil Cloruro (PVC) è il polimero più importante della serie di quelli ottenuti da monomeri vinilici ed è una delle materie plastiche di maggior consumo al mondo.

Il monomero di vinile deriva dal cloruro di sodio (circa 57%) e dal gas liquido naturale (43%) proveniente dal mare del Nord. Il processo produttivo trasforma il gas liquido in etilene e propilene a cui viene aggiunto del cloruro. Il PVC viene quindi ottenuto attraverso una reazione di polimerizzazione del cloruro di vinile che porta alla formazione di lunghe molecole lineari (Figura 3).

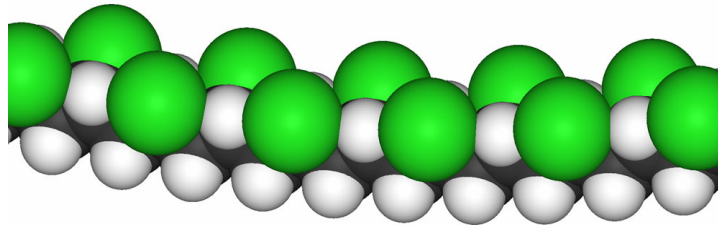
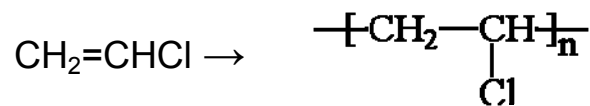


Figura 3: *Rappresentazione di una molecola di PVC*

Tale reazione viene innescata dall'aggiunta di un *iniziatore*, ovvero un composto capace di generare radicali liberi (ad esempio, il perossido di benzoile o l'acqua ossigenata). La reazione è tale da privilegiare un abbinamento *testa-coda* delle molecole di cloruro di vinile, ovvero con gruppi alternati $-\text{CH}_2-$ e $-\text{CHCl}-$ lungo la catena.

La reazione di polimerizzazione è esotermica pertanto la temperatura all'interno del reattore deve essere controllata in modo da impedire il surriscaldamento della massa di reazione, che potrebbe portare anche ad una reazione esplosiva. Per tale ragione la sintesi del PVC viene raramente condotta *in massa*, ovvero aggiungendo l'iniziatore ad una massa di cloruro di vinile. Anche quando la reazione in massa viene mantenuta sotto controllo, si possono originare dei locali surriscaldamenti che alterano sensibilmente le proprietà meccaniche e l'aspetto del polimero ottenuto.

Normalmente, per disperdere il calore di reazione, la reazione viene condotta in soluzione, in emulsione o in sospensione; in questo modo il mezzo liquido (un solvente o l'acqua) asporta il calore evaporando; i vapori vengono quindi condensati e riciclati nel reattore.

- **in soluzione:** il cloruro di vinile viene disperso in un solvente organico in cui il polimero sia insolubile, in questo modo la reazione procede in condizioni controllate ed il polimero viene purificato per semplice filtrazione. Pur ottenendo un polimero molto puro e dalle caratteristiche omogenee, il metodo trova applicazione solo su scala di laboratorio o di impianto pilota, dati i rischi ambientali e di sicurezza che pone l'utilizzo in grandi quantità di solventi organici.
- **in emulsione:** il cloruro di vinile, liquefatto per azione della pressione, viene emulsionato in acqua con aggiunta di sostanze che stabilizzano l'emulsione; al termine della reazione si ottiene un lattice dal quale il polimero viene separato per asciugatura con aria calda o per precipitazione. Il PVC ottenuto per emulsione presenta una migliore attitudine alla lavorazione perché per aggiunta di plastificanti risulta più fluido e facile da stampare, è tuttavia poco indicato per applicazioni speciali, data la sua maggiore igroscopicità rispetto al PVC ottenuto con altri processi e le peggiori proprietà elettriche, dovute alla presenza di residui dei prodotti necessari per stabilizzare l'emulsione e coagularla successivamente.
- **in sospensione:** è il processo più diffuso e consiste nel mantenere il cloruro di vinile disperso in acqua tramite agitazione e presenza di sostanze tensioattive; con l'aggiunta dell'iniziatore, ogni goccia di monomero

polimerizza separatamente e si trasforma in una piccola sfera di polimero, recuperata per filtrazione e asciugatura ⁽³¹⁾.

Molti produttori, specialmente in Europa, non usano il peso molecolare per indicare i diversi tipi di catene polimeriche disponibili, ma preferiscono utilizzare la grandezza **K**: un parametro correlabile alla viscosità. Il **parametro K** viene misurato per via empirica preparando soluzioni di PVC allo 0,2% in peso in cicloesano a 30° (normativa ASTM 1243) oppure allo 0,5% in peso in cicloesano (normativa ISO174-1974).

L'equazione empirica da applicare è la seguente:

$$\log \eta_{rel} = \frac{(75K^2 \times 10^6)}{1 + (1,5 Kc \times 10^{-3})} + K \times 10^{-3}$$

Il valore del parametro K incide sia sulla possibilità di additivazione della resina stessa, sia sulla lavorabilità del granulo. In genere, prodotti con elevati valori di K (cioè superiore a 70) sono destinati all'estrusione, quelli con K medio (62-63) allo stampaggio a iniezione, mentre quelli con valore minore risultano destinati ad applicazioni per materiale rigido. Naturalmente, il peso molecolare va regolato a monte, in fase di polimerizzazione; il produttore di granulo si limita quindi a scegliere, in rapporto al sistema di additivazione e alle caratteristiche che vuole conferire al prodotto finale, il taglio in resina avente il peso molecolare medio, o per meglio dire, il valore K più adatto ai suoi scopi⁽³²⁾.

1.2. Plastificante

Con il termine “plastificante” si intende generalmente una sostanza che incorporata in un materiale plastico ne aumenti la flessibilità, la lavorabilità e la capacità di estensione. Un plastificante può inoltre ridurre la viscosità del materiale fuso, può abbassare la temperatura di transizione di secondo ordine o può abbassare il modulo elastico del materiale fuso ⁽³³⁾.

Il PVC puro, è un materiale rigido; deve la sua versatilità applicativa alla possibilità di essere miscelato anche in proporzioni elevate a prodotti plastificanti⁽³⁴⁾.

Le proprietà richieste ad un plastificante includono la buona compatibilità con le resine di PVC, la non volatilità, la non infiammabilità, buona stabilità alla luce ed al calore, buona performance a basse temperature e, ovviamente, che non sia tossico. Purtroppo, però, nessun plastificante soddisfa tutte queste caratteristiche contemporaneamente e molti sono gli sforzi delle industrie chimiche volte alla ricerca di un prodotto che possieda tutti i requisiti citati.

Il meccanismo secondo cui un agente plastificante esplica la sua funzione non è ancora stato del tutto chiarito e al momento due sono le teorie più accreditate:

1. la prima teoria prevede che il plastificante agisca come un lubrificante che favorisce lo scivolamento delle catene di polimero le une sulle altre, facilitando la deformazione e riducendo la frizione intermolecolare.
2. La seconda teoria, meglio nota come “*Gel Theory*”, prevede che la resistenza alla deformazione di polimeri amorfi sia dovuta alla formazione di una debole struttura tridimensionale a nido d’ape in cui i collegamenti siano originati da centri attivi lungo le catene polimeriche⁽³⁵⁾. Questi centri attivi si legano e si slegano continuamente tra loro in un equilibrio di associazione-dissociazione. Sembra che nel caso del PVC questi centri possano essere i dipoli nella catena polimerica anche se pare probabile che il meccanismo di interazione tra PVC e plastificante sia complesso e dipenda da varie interazioni che coinvolgono l’energia e la variazione di entropia data dalla ridistribuzione delle catene polimeriche.

La plastificazione avviene in passaggi successivi, non necessariamente chiaramente identificabili:

1. assorbimento irreversibile del plastificante da parte dei pori della resina. In questa fase si verifica un generale diminuzione del volume totale
2. diffusione del plastificante tra le molecole di polimero. In questa fase non si ha variazione di volume ma vengono coinvolte energie di attivazione.

I plastificanti possono avere varia natura ma i più utilizzati sono ad esempio gli esteri dell'acido ftalico (DEHP), gli esteri alchilici dell'acido adipico (DOA), gli esteri dell'aldeide trimellitica (TOTM).

Come già detto, ogni plastificante possiede caratteristiche diverse e diversamente influenza le proprietà del materiale. Diversi studi sono stati fatti proprio per valutare l'azione dei vari tipi di plastificanti sulle caratteristiche fisiche del materiale plastificato e si è visto che a parità di quantità di plastificante impiegato, i valori variano significativamente in base alla natura del plastificante scelto (Tabella 1).

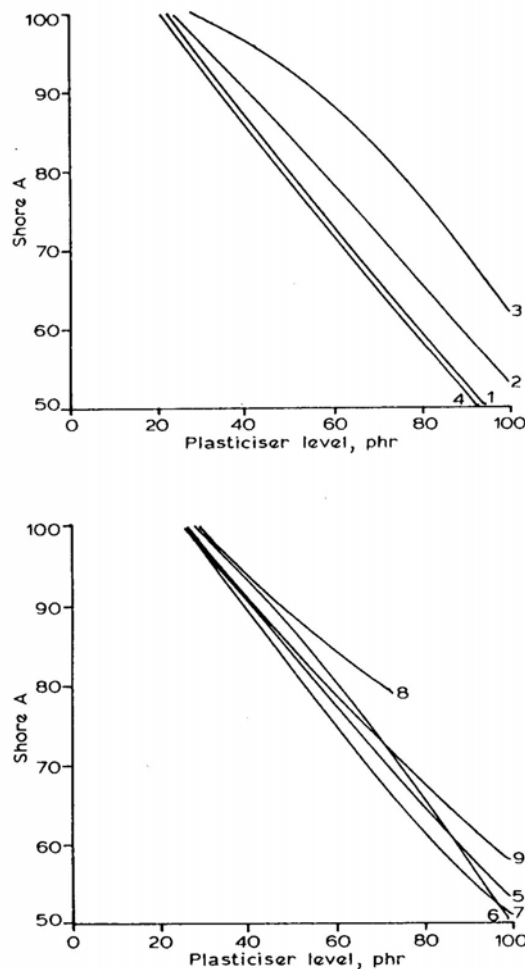
Efficiency^a of Common Plasticisers Relative to DOP	
<i>Plasticiser</i>	<i>Relative efficiency</i>
Epoxidised soyabean oil	1.06
Tricresyl phosphate	1.13
Trixylyl phosphate	1.20
Dibutyl phthalate	0.86
Diisobutyl phthalate	1.00
Diocetyl phthalate	1.00
Diisooctyl phthalate	1.02
Di- <i>Alphanol 79</i> phthalate	0.94
Dinonyl phthalate	1.10
Diisodecyl phthalate	1.06
Ditridecyl phthalate	1.18
Diisooctyl adipate	0.84
Diisooctyl azelate	0.89
Dibutyl sebacate	0.72

^a The efficiency factor of a plasticiser is the number of parts by weight of that plasticiser per 100 parts by weight of PVC required to give a compound with a modulus, at 100% elongation at 23°C, of 1100 lbf in⁻² (7.6 MN m⁻²) divided by 62.8, the corresponding value for dioctyl phthalate (DOP).

Tabella 1

Poiché i plastificanti vengono proprio giudicati in base alla loro efficienza o al grado in cui riescono ad ammorbidire il PVC, proprio la morbidezza è un parametro da tenere in considerazione nella valutazione della scelta del plastificante.

Tradizionalmente nell'industria della gomma, la morbidezza viene espressa con la durezza Shore che normalmente viene determinata con il metodo ASTM D 2240-75: questa scala va da 0 a 100 ove più rigido è il compound, più alto è il valore ad esso associato. Esistono due scale di durezza shore: **shore A**, applicabile per PVC flessibile, e **shore D** applicabile per i materiali più rigidi. Nella seguente Figura 4 si può chiaramente osservare l'efficienza di nove diversi plastificanti messi a confronto.



Effect of plasticiser level on Shore A hardness. 1, DOP; 2, DIDP; 3, DTDP; 4, DOA; 5, Reofos 65; 6, TOTM; 7, ESO; 8, PPA; 9, PPA alcohol endstopped.

Figura 4: effetto del livello di plastificante sulla durezza del materiale plastico

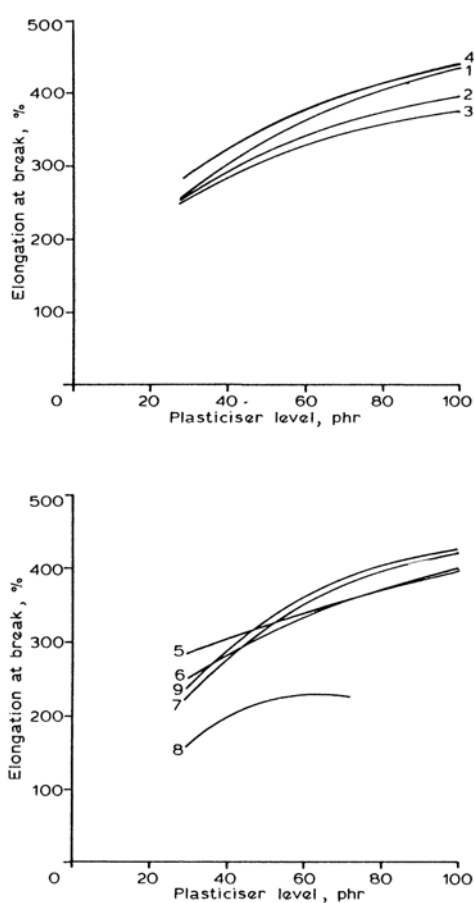
Le misure sono state fatte a 23 °C. E' bene infatti ricordare sempre che la temperatura influenza grandemente la morbidezza del materiale.

Poiché anche la variazione di morbidezza in base alla temperatura viene influenzata dalla natura del plastificante, scegliendo il tipo di plastificante è

possibile regolare la morbidezza del materiale alla temperatura di normale utilizzo⁽³⁶⁾.

I parametri chimico-fisici che caratterizzano i compound vinilici destinati alla produzione di articoli in campo medico sono principalmente due: la "durezza" (allungamento) ed il peso molecolare. Il primo, espresso dal valore shore A, è un fattore che dipende, come si è visto, essenzialmente dal tipo e dalla quantità di plastificante inserito nel compound. È un fattore determinante soprattutto ai fini della lavorabilità dei granuli e della resistenza alle basse temperature: in generale, più il materiale è duro meno è lavorabile e minore è la resistenza alle basse temperature⁽³⁷⁾.

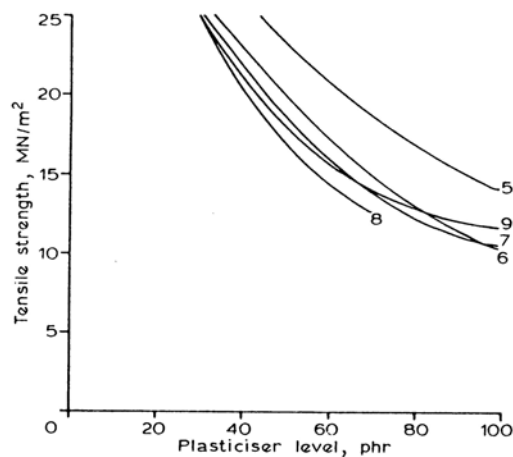
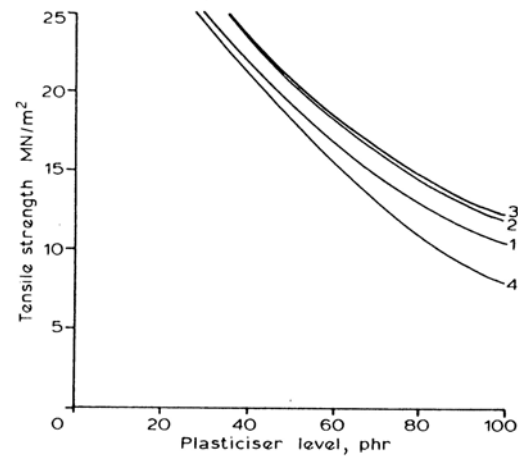
Il carico alla rottura (cioè la massima sollecitazione lungo un asse che un materiale può sostenere prima di subire la rottura) aumenta progressivamente in base alla quantità di plastificante utilizzato, ma è anche influenzata dalla natura del plastificante stesso, come si può osservare nella seguente Figura 5⁽³⁸⁾:



Effect of plasticiser level on elongation at break. 1, DOP; 2, DIDP; 3, DTDP; 4, DOA; 5, Reofos 65; 6, TOTM; 7, ESO; 8, PPA; 9, PPA alcohol endstopped.

Figura 5: effetto della quantità di plastificante sulla capacità di allungamento

Anche l'allungamento fino a rottura (cioè la massima estensione che un materiale può raggiungere prima di rompersi) varia in relazione al plastificante scelto, come si può osservare nella Figura 6. All'aumentare della quantità di plastificante diminuisce il valore di allungamento a rottura



Effect of plasticiser level on tensile strength. 1, DOP; 2, DIDP; 3, DTDP; 4, DOA; 5, Reofos 65; 6, TOTM; 7, ESO; 8, PPA; 9, PPA alcohol endstopped.

Figura 6: *variazione del carico a rottura in base alla quantità del plastificante*

Tra tutti i tipi di plastificanti disponibili in commercio, solo il di-2-etilesifalato (DEHP, Figura 7) è ammesso in una quantità non superiore al 40% dalla Farmacopea Europea per contenitori e tubi di PVC per soluzione acquosa per infusione endovenosa e per sangue umano e sue frazioni.

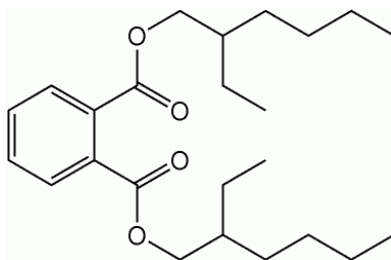


Figura 7: Molecola di DEHP

Il DEHP, a temperatura ambiente, è un liquido con una viscosità simile a quella dell'olio vegetale. In virtù della sua lipofilicità e poiché non si lega chimicamente al PVC, DEHP si dissolve nei fluidi contenenti lipidi e soluzioni come la saliva, il plasma e il sangue, ma non è solubile in acqua ⁽³⁹⁾, anche se la quantità di DEHP rilasciato in soluzione dipende molto dalle condizioni di utilizzo del presidio medico⁽⁴⁰⁾. Inoltre è stato dimostrato che la quantità di DEHP che migra nel tempo in una soluzione farmaceutica, viene ridotto di quasi il 50% se il PVC viene irradiato con una luce UV, seppure la quantità di plastificante contenuta del PVC non ha subito modifiche rilevanti ⁽⁴¹⁾.

Il DEHP viene rapidamente metabolizzato nell'organismo umano grazie alla biotrasformazione idrolitica nel suo monoestere (mono-2-etilesifalato o MEHP) che viene ulteriormente metabolizzato in sottoprodotti ossidati eliminabili con urine e feci dopo essere stati coniugati con glucoronide ⁽⁴²⁾.

1.3. Lubrificanti o "processing aids"

Oltre ad un'adeguata plastificazione, nella lavorazione del PVC ha notevole importanza anche l'aggiunta di un adatto agente lubrificante. Lo scopo dei lubrificanti è quello di diminuire gli attriti nel processo di trasformazione. Il meccanismo consiste nell'interporre fra le catene di PVC una molecola con una certa polarità che diminuisca le forze di attrazione fra catene di PVC (infatti proprio la polarità degli atomi di cloro e idrogeno è la causa della rigidità del materiale) sostituendole con forze più deboli che si stabiliscono fra polimero e lubrificante. Come conseguenza le catene polimeriche possono scorrere più facilmente le une rispetto alle altre riducendo il pericolo di surriscaldamento dovuto a fenomeni di attrito; inoltre il calore risulta più uniformemente distribuito nella massa. Quanto maggiore è la polarità della molecola tanto più verrà ridotta la viscosità del PVC allo stato fuso.

A questo punto è bene distinguere tra i lubrificanti interni ed esterni: i lubrificanti interni hanno buona polarità e quindi compatibilità con il PVC per cui riducono la viscosità allo stato fuso. Alcuni esempi sono gli eteri degli acidi grassi, l'acido stearico; i lubrificanti esterni invece hanno bassa polarità e quindi non essendo compatibili col PVC migrano verso l'esterno diminuendo la superficie di contatto tra il polimero fuso e la superficie metallica della macchina trasformatrice.

1.4 Stabilizzanti

Il PVC durante il processo tende a degradarsi qualora non venga adeguatamente stabilizzato: questa degradazione ha un impatto sia sul colore che sul comportamento meccanico⁽⁴³⁾.

Lo stabilizzante deve essere compatibile con il PVC, non deve interferire con il colore del materiale finito, non deve essere volatile o sviluppare odori. Normalmente sono utilizzati sali inorganici di metalli.

Il meccanismo di azione è basato su reazioni acido-base ed ha una duplice funzione: da un lato eliminare l'acido cloridrico che si forma nel corso della degradazione del PVC, dall'altro sostituire nella catena polimerica atomi di cloro con gruppi metallici più stabili. E' infatti stato dimostrato che lo ione metallico agisce da accettore dell'acido cloridrico e si formano così dei cloruri metallici

mentre la parte acida viene trasferita al polimero, interrompendo così il processo di formazione di doppi legami coniugati ⁽⁴⁴⁾.

Inoltre sono stati evidenziati effetti sinergici quando sono presenti miscele di stearati di zinco e calcio: infatti lo ione zinco aumenta il tempo di resistenza ad alte temperature garantendo il mantenimento del colore bianco ed impedendo la degradazione del materiale. Lo ione calcio invece conferisce stabilità termica ad alte temperature, permettendo la lavorazione del materiale anche a temperature più elevate di quelle a cui il materiale normalmente si degrada.

1.5 Composti epossidati

Gli oli epossidati sono un coadiuvante nella plastificazione e servono inoltre come lubrificante in fase di estrusione: il loro utilizzo limita perciò la quantità di plastificante utilizzato e quindi anche la potenziale pericolosità del materiale.

Per uso medicale sono ammessi l'olio di soia epossidato o l'olio di lino epossidato, o una miscela dei due.

1.6. Pigmenti e coloranti

A scopo puramente estetico, in fase di miscelazione, può essere aggiunto un pigmento il quale, non avendo affinità ed essendo insolubile nel mezzo, colora il prodotto senza modificarne sensibilmente le caratteristiche ⁽⁴⁵⁾.

Per uso farmaceutico, l'unico colorante ammesso è il blu oltremare.

1.7. Formulazioni ad uso farmaceutico

Nel caso di materiali ad uso farmaceutico la tipologia e la quantità degli additivi sopra citati è chiaramente espressa al capitolo 3.1.14 della Farmacopea Europea.

Materiale	Quantità	Funzione
Resina di PVC		E' il supporto che conferirà la struttura al materiale finito
Additivo		
DEHP	< 40%	E' il plastificante; in base alla quantità determina il grado di morbidezza del materiale poiché penetra nella matrice polimerica della resina, facilitando i movimenti delle macromolecole, abbassando gli attriti interni, dissolvendo formazioni cristalline ed abbassando il punto di transizione vetrosa.
Ca/Zn Stearato	< 1%	E' uno stabilizzante;
N,N- diaciletilendia mmina	< 1%	E' un lubrificante esterno che favorisce lo scorrimento del materiale durante l'estrusione.
Olio epossidato (normalmente di soia)	< 10%	E' un coadiuvante nella plastificazione e serve inoltre come lubrificante in fase di estrusione.

NB: Nessun antiossidante può essere aggiunto al polimero.

2. PROCESSO di PRODUZIONE

Sulle caratteristiche del prodotto finale influiscono, oltre che le diverse formulazioni dei reagenti, le condizioni fisiche della miscelazione: temperatura, pressione, velocità di rotazione dell'agitatore, tempo di permanenza nel reattore. Si tratta di parametri la cui influenza sul prodotto finale è difficilmente determinabile a priori, ma valutabile solo attraverso una lunga esperienza operativa. E sono questi i "segreti dell'arte" che spesso determinano differenze di comportamento e di qualità tra i vari compound in commercio. Al termine del trattamento di miscelazione e assorbimento del plastificante, il compound viene trasferito in un estrusore e quindi granulato.

2.1 Miscelazione

Costituisce la prima fase fondamentale per il buon esito della preparazione.

Per questa fase ci si avvale di un turbo miscelatore in cui convergono tutti i vari componenti previamente pesati.

Il tempo di miscelazione è di circa 15 minuti, e vengono applicate tre diverse velocità di rotazione alla pala in modo che anche la temperatura dei componenti aumenti. L'aumento di temperatura è fondamentale per l'assorbimento dei vari componenti da parte della resina.

1. Durata 60 secondi; l'impeller ha una velocità di circa 1100 rpm; la temperatura raggiunge circa i 50°C.
2. Durata 60 secondi; l'impeller raggiunge una velocità di 1800 rpm; la temperatura raggiunge i 100°C
3. Durata 300 secondi; la velocità dell'impeller scende a 1400 rpm; la temperatura rimane attorno ai 100°C per favorire l'assorbimento dei componenti da parte della resina senza che questa si scaldi troppo deteriorandosi

Il composto così ottenuto, dalla consistenza di sabbia bagnata, viene denominato dry-blend.

Dopo lo scarico, una camicia raffreddante provvede a far tornare la temperatura attorno ai 40°C in modo da far partire immediatamente un ciclo successivo.

2.2. Granulazione

Il corpo principale della macchina impiegata in questo processo, detta trafila o estrusore, è costituito da un cilindro entro il quale ruota una vite senza fine (Figura 8)

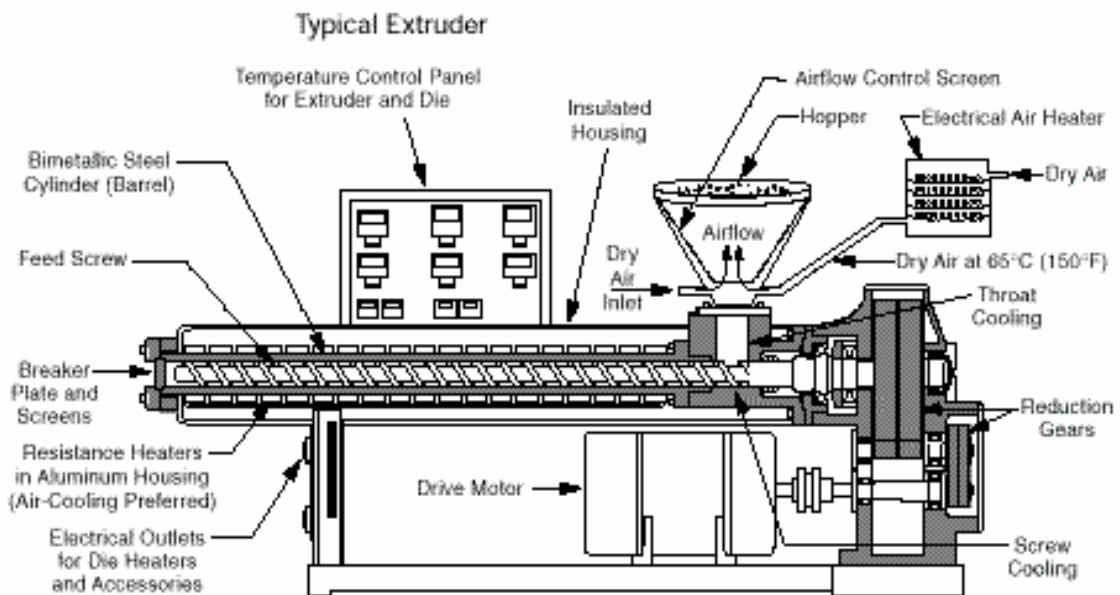


Figura 8: Tipico esempio di estrusore monovite

Il dry-blend, attraverso una tramoggia di carico forzata, viene portato nel cilindro verso le due viti antiorotanti dell'estrusore: il movimento impartito dalle viti e la temperatura attorno ai 180°C fanno sì che il materiale venga ulteriormente miscelato e inizi il processo di fusione.

Attraverso i vari segmenti di estrusione, il materiale fuso viene spinto attraverso una filiera o matrice che ne determina la caratteristica forma filiforme.

Una lama tagliente provvede ad affettare in segmenti uguali il materiale ormai rappreso che quindi assume una forma tondeggiante.

Il risultato di questo processo viene chiamato *granulo* o *compound*.

2.3. Estrusione

Dopo raffreddamento ed un tempo di riposo di circa 48 ore, il granulo viene nuovamente estruso. In questo caso l'estrusore è a vite singola e ci sono ben 11 diversi segmenti di estrusione in cui i parametri di temperatura e pressione sono leggermente diversi tra loro.

Anche in questo caso il materiale viene fuso e spinto verso la testa di estrusione (Figura 9) che in questo caso sarà costituita da un maschio e da una femmina: il materiale quindi assumerà una forma cilindrica e sarà tenuto gonfio da aria filtrata che viene insufflata (Figura 10).

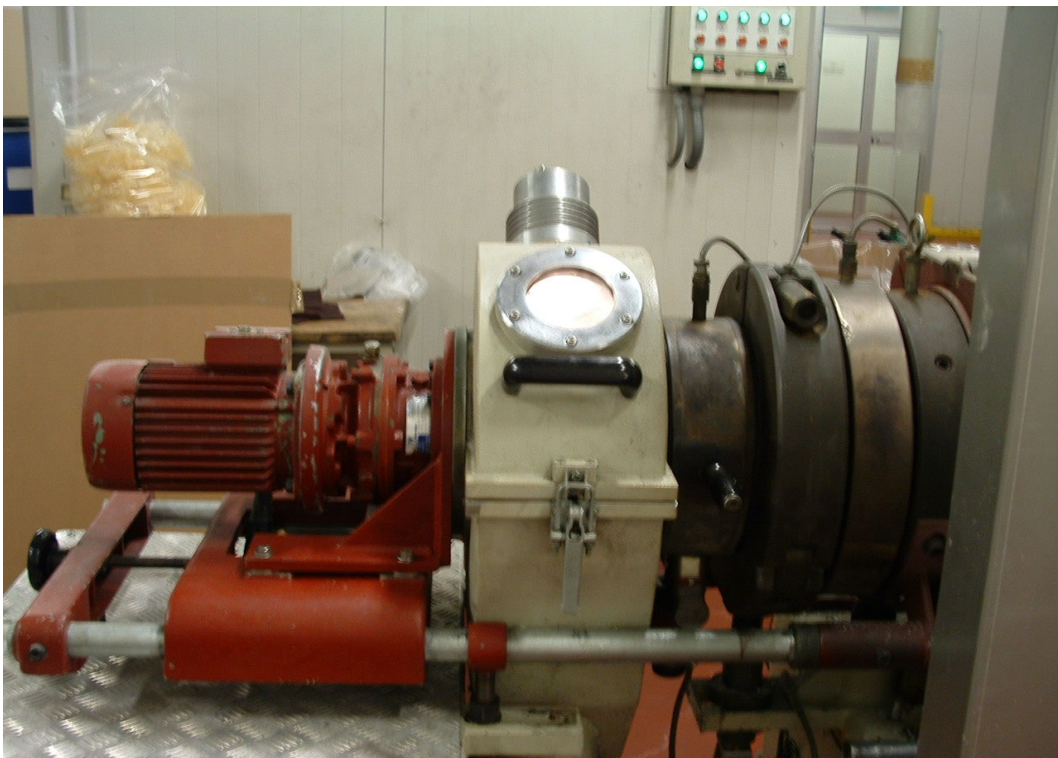


Figura 9: *Fotografia della testa di estrusione di un granulatore*

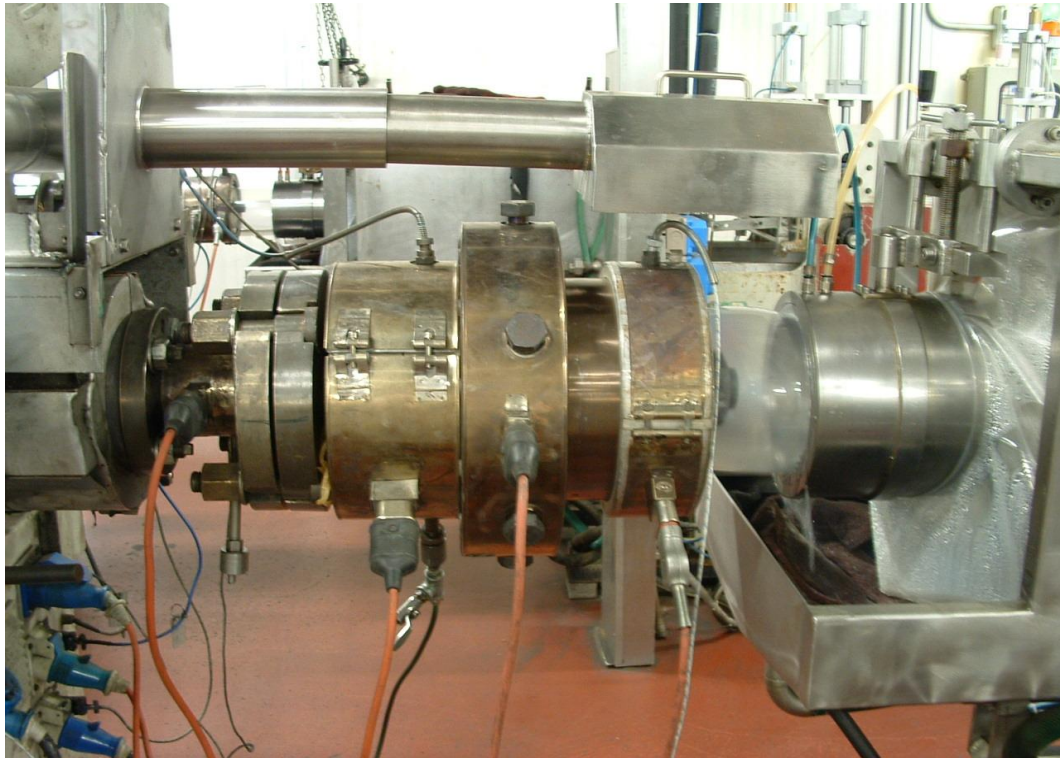


Figura 10: *Testa di estrusione per tubolare con chiaramente visibile la bolla di materiale fuso e tenuto gonfio da aria insufflata*

Dopo raffreddamento con una doccia di acqua a 4°C il materiale viene fatto passare attraverso una calandra (cioè due dischi che ruotano in senso contrario ad una distanza molto ravvicinata) che lo schiaccia appiattendolo.

Successivamente un bobinatore automatico (cioè una speciale macchina che provvede all'avvolgimento della bobina tenendo conto anche della velocità radiale che varia via via che il diametro della bobina aumenta) provvede ad avvolgere il materiale nel modo più opportuno per evitarne il danneggiamento a causa del suo stesso peso.

2.4. Formatura sacca

Il materiale viene srotolato da uno speciale “traino” (*indexer*) che provvede a tirare e quindi tagliare solo la parte di materiale necessaria per formare la sacca.

Questo spezzone di materiale viene quindi automaticamente portato, attraverso un tavolo rotante, alla stazione successiva ove uno speciale stampo in ottone imprime la forma posteriore alla sacca e la salda mediante radio-frequenza.

Una successiva rotazione del tavolo, fa sì che la sacca così parzialmente finita arrivi ad una stazione dove vengono inseriti i tubetti necessari e dove viene effettuata la saldatura della parte anteriore.

3. CENNI SUL PROCESSO DI STERILIZZAZIONE

La sterilizzazione consiste in qualsiasi processo chimico o fisico che porti all'eliminazione di ogni forma microbica vivente, sia patogena che non, comprese le spore e i funghi. Un materiale è considerato sterile se il LAS (livello di sicurezza di sterilità) è inferiore a 10^{-6} ; ovvero quando la probabilità di trovarvi un microrganismo è inferiore ad uno su un milione.

I vari processi distruggono i microrganismi provocando l'alterazione letale di alcune loro componenti essenziali; in particolare la sterilizzazione determina la denaturazione delle proteine e degli acidi nucleici e la degradazione di componenti della membrana e parete cellulare.

3.1 Sterilizzazione mediante sistemi chimici

3.1.1. Ossido di etilene

L'unico mezzo chimico ancora in uso per sterilizzare è l'Ossido di etilene (EtO). È un metodo usato soprattutto in ambito ospedaliero data la sua pericolosità: è infatti un gas esplosivo e infiammabile. L'etossido ha, inoltre, la caratteristica di impregnare a lungo gli oggetti trattati; per evitare danni all'organismo, dunque,

prima di usare questi oggetti è necessario riporli in ambienti aerati o in armadi ventilati fino alla completa eliminazione dello sterilizzante.

3.2 Sterilizzazione mediante sistemi fisici

I sistemi a radiazioni si dividono in sistemi a radiazioni ionizzanti e non ionizzanti.

3.2.1. Radiazioni ultraviolette:

Sistema non ionizzante. I sistemi a raggi ultravioletti non possono essere considerati sterilizzanti, hanno principalmente una azione batteriostatica, mantenimento di sterilità (antisettico fisico). Sono utilizzate soprattutto per la batteriostaticità dei piani di lavoro o dell'aria sotto cappa. Non hanno grande capacità di penetrazione per questo sono efficaci solo su oggetti non troppo spessi o su liquidi fatti passare attraverso recipienti sottili. Devono essere utilizzate con cautela e a distanza dagli operatori, essendo agenti mutageni ed estremamente dannosi per gli occhi. Sono prodotte da lampade a vapori di mercurio.

3.2.2. Raggi γ

Sistema ionizzante. Sono utilizzati prevalentemente in ambito industriale avendo un'ottima capacità di penetrazione e avendo la possibilità di trattare contemporaneamente grandi quantità di oggetti.

3.2.3 Microonde

Tecnica utilizzata in vari ambiti data la sua praticità d'uso è il basso costo. L'azione dei sistemi a microonde si basa su i due principi, termico e non termico. L'effetto termico deriva dalla capacità di generare rapidissime vibrazioni molecolari determinando un aumento della temperatura alterando le capacità vitali e funzionali dei microrganismi. L'effetto non termico è dovuto all'energia trasportata dalle onde elettromagnetiche che viene trasferita alla materia colpita. Si ha così la trasformazione di alcuni amminoacidi, trasporto di ioni che influenzano il metabolismo, modifica di segnali elettrici, accelerazione della sintesi del DNA

alterandone la trascrizione a RNA con conseguenti aberrazioni cromosomiche. Questo effetto è molto importante, si è visto infatti che la riduzione microbica è maggiore se alla stessa temperatura raggiunta sussiste anche un effetto non termico. È compatibile con tutti i materiali, metallo, vetro, plastica, ceramica, gomma, senza alterarne le qualità. Questo è dovuto al fatto che strumenti metallici raggiungano al massimo la temperatura di 74°C. L'azione sterilizzante si esplica in tempi brevissimi 90-150 sec. Ma la sicurezza è con cicli da 4 minuti.

3.2.4. Calore Secco

La sterilizzazione avviene attraverso il contatto dell'oggetto con aria calda che agisce per ossidazione dei componenti cellulari; sono utilizzate la stufa a secco o il forno Pasteur. In media, per una sterilizzazione completa è necessario che sia raggiunta una temperatura di 160° per un'ora o di 180° per 30 minuti. A questi tempi si devono aggiungere poi i tempi di riscaldamento e raffreddamento che portano un ciclo a 180-240 minuti. È comune uso lasciare aperto lo sportello dell'apparecchio per la sterilizzazione fino a temperature di 80/100°: in questo modo si permette la fuoriuscita dell'eventuale vapore acqueo che si potrebbe creare e che andrebbe a ridurre l'efficienza del processo. È comunque una tecnica ormai in disuso e soppiantata dalla sterilizzazione a vapore, avendo lo svantaggio, a causa delle temperature molto alte, di non poter utilizzare molti materiali termosensibili. Oltre al difetto di tempi tanto lunghi per una routine di sterilizzazione va aggiunto l'impossibilità di verificare l'avvenuta sterilizzazione e il mantenimento nel tempo del risultato raggiunto fino al momento dell'utilizzazione dello stesso.

3.2.5. Calore umido (sterilizzazione in autoclave)

Questo sistema elimina i microrganismi mediante denaturazione di loro proteine e altre biomolecole. La sterilizzazione mediante autoclave è quella più diffusa essendo poco costosa e non tossica e data la sua buona capacità di penetrazione. L'autoclave (Figura 11) è una caldaia all'interno della quale si produce vapore sotto pressione per raggiungere alte temperature con lo scopo di eliminare i germi.

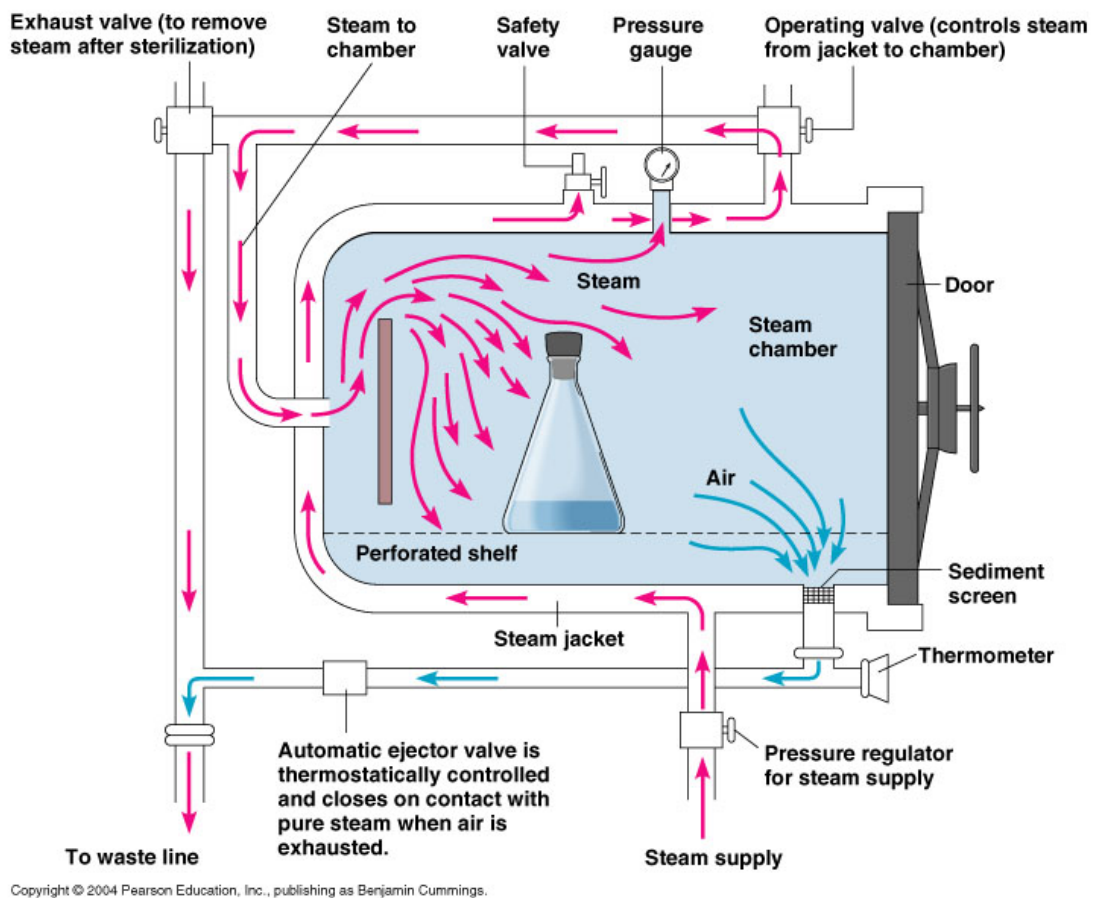
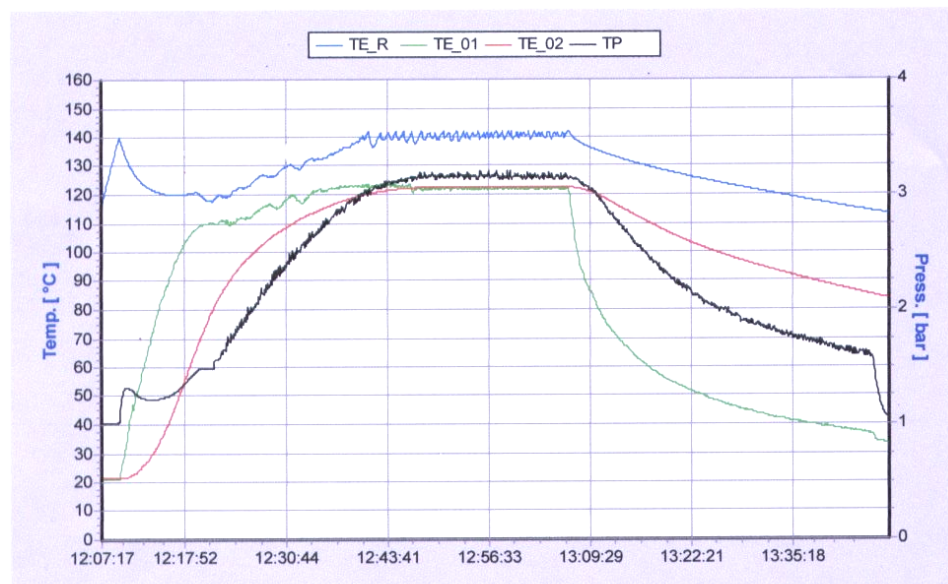


Figura 11: Schema di un'autoclave

Si inizia con una fase di riscaldamento in cui si verifica un progressivo aumento della temperatura sia della camera che del prodotto; giunti ad una temperatura di 121° (temperatura necessaria per rendere inattivi i processi vitali di ogni tipo di cellula), questa viene mantenuta per almeno 20 min (*plateaux*) dopodiché inizia la fase di raffreddamento che deve avvenire in modo molto lento e graduale in modo da non compromettere le caratteristiche del prodotto.

Nella Figura 12 viene riportato un grafico tipo di un ciclo di sterilizzazione: le autoclavi moderne registrano ogni singolo ciclo e monitorizzano sia la temperatura della camera, che la temperatura del campione, che, ovviamente, la pressione che viene applicata in camera.



ID sterilizzatore n.f. 2926
 Societa' Sifra
 Via Caboto 19_8
 Citta' TRIESTE
 Utente :
 07/01/2008 13:10:35 Inizio ciclo
 07/01/2008 14:50:54 Fine ciclo
 Ciclo corretto

Cycle step by step description :

SACCHEL2.cyc
 Tempo stampa Sec 60
 Temp. generatore 'C 141.000
 Riscaldamento 'C 123.000
 T minima risc. 'C 1.000
 Attesa risc. Sec 60
 Temp. reg. ster. 'C 122.000
 Sterilizzazione 'C 122.000
 T massima ster. 'C 3.000
 T minima ster. 'C 1.000
 Sterilizzazione Sec 1200
 Fattore letalita' 0
 F0 coefficiente Z 10
 Min temp control 'C 20.000
 Delta pressione bar 1.000
 Temperatura raff.'C 85.000
 Max attesa set Min 120

Cycle completed with NO ALARMS

Executed Phases :

13:10:35 FASE Risc. generatore
 13:12:54 FINE Risc. generatore
 13:12:54 FASE Riscaldamento camera
 13:48:58 FINE Riscaldamento camera
 13:48:58 FASE Attesa riscaldamento
 13:49:59 FINE Attesa riscaldamento
 13:49:59 FASE Sterilizzazione
 14:09:59 FINE Sterilizzazione
 14:09:59 FASE Raffreddamento
 14:48:48 FINE Raffreddamento
 14:48:48 FASE Ritorno in atmosfera
 14:50:54 FINE Ritorno in atmosfera

Figura 12: temperatura e pressione durante un ciclo di sterilizzazione in autoclave

Il vapore deve essere saturo (cioè vapore acqueo in presenza del suo liquido) e pertanto tutta l'aria all'interno dell'autoclave deve essere rimossa.

3.2.5.1. Regolazione del processo di sterilizzazione mediante la funzione F_0

Introdotta nel 1976 dalla F.D.A. (Food and Drug Administration) Americana nel settore farmaceutico, il calcolo tramite la funzione F_0 (o Fattore di letalità) rappresenta il sistema di gestione e di controllo di un ciclo di sterilizzazione a vapore ad acqua con calore umido.

Esse esegue infatti il calcolo matematico dell'abbattimento della carica batterica di un prodotto da sterilizzare in autoclave.

Esiste infatti una relazione tra il tempo e la temperatura di sterilizzazione: tale relazione può essere espressa dalla formula:

$$F_0 = \tau \times 10^{(T-121/10)}$$

dove: F_0 è il tempo di letalità

τ è il tempo di permanenza ad una data temperatura

T è la temperatura

Il calcolo di F_0 può essere effettuato a partire da temperature superiori ai 100°C poiché al di sotto di tale temperatura l'inattivazione della carica batterica è pressoché insignificante.

Il valore di F_0 di ciclo di sterilizzazione completo sarà quindi calcolato come la sommatoria dei singoli valori di F_0 relativi ad ogni temperatura superiore ai 100°C e al tempo in cui questa è stata mantenuta.

4. LA DIALISI PERITONEALE

La dialisi peritoneale è una forma di dialisi utilizzata per rimuovere i prodotti di eliminazione e l'acqua in eccesso.

Sfrutta lo stesso principio dell'emodialisi con la differenza che il sangue viene ripulito direttamente all'interno del corpo e da una macchina esterna ad esso: all'interno dell'addome vi è una zona denominata cavità peritoneale foderata da una sottile membrana, il peritoneo, che avvolge tutti gli organi interni e l'intestino.

Durante la dialisi peritoneale, la cavità viene riempita con una soluzione dialitica con la quella entrano in contatto i vasi sanguigni. Il peritoneo funziona come un filtro, facendo migrare per pressione osmotica le sostanze tossiche e l'acqua in eccesso verso la soluzione dialitica.

Normalmente la soluzione dialitica è una soluzione di destrosio, disponibile in varie concentrazioni: le più comuni sono 1,5%, 2,5% e 4,25% dove le concentrazioni più elevate vengono utilizzate in particolare per eliminare il ristagno d'acqua. La soluzione dialitica viene introdotta nel paziente attraverso un tubo in PVC atossico, chiamato catetere, che viene inserito nel paziente (Figura 13) attraverso un intervento chirurgico con anestesia locale. Tale soluzione viene mantenuta nell'addome del paziente per alcune ore in modo da dare il tempo alle sostanze tossiche di migrare all'esterno del peritoneo, dopodiché viene scaricata e sostituita con della soluzione nuova.

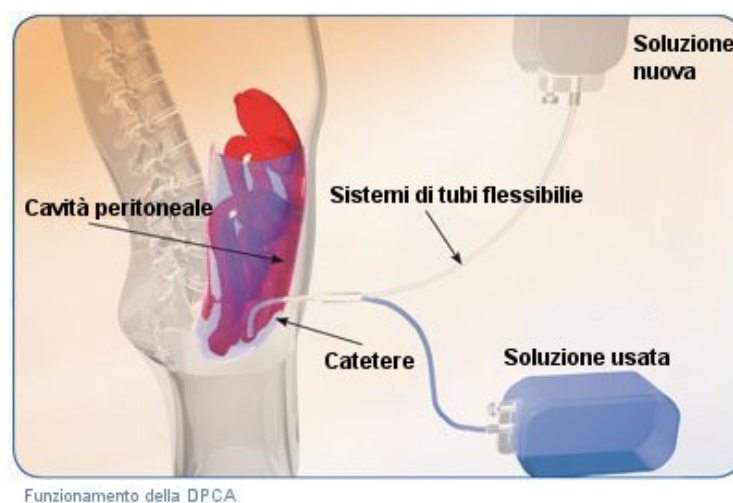


Figura 13: Schema di funzionamento di un sistema per dialisi peritoneale

Questo sistema di purificazione del sangue presenta numerosi vantaggi:

- Attenua i sintomi dell'uremia
- Ha ripercussioni meno pesanti sull'organismo poiché la dialisi viene eseguita di continuo e non solo un paio di volte alla settimana, ed è quindi un processo più fisiologico
- Permette di seguire una dieta meno rigida
- Può essere eseguito a casa, liberando il paziente dalla presenza in ospedale poiché consente una maggior flessibilità di trattamento

In sostanza, la dialisi peritoneale migliora la qualità della vita di pazienti con insufficienza renale. Per questo motivo molti studi vengono rivolti all'ottimizzazione di questo processo e sempre maggior attenzione è rivolta alla potenziale tossicità di additivi aggiunti ai materiali.

Tra i vari polimeri utilizzabili per le sacche utilizzate in questo processo, il PVC viene normalmente preferito poiché ha gli stessi vantaggi già citati per le sacche per infusione, ma a causa della permeabilità al vapor acqueo, la concentrazione della soluzione all'interno della sacca potrebbe variare nel tempo a causa dell'evaporazione dell'acqua: per questo motivo i sistemi per dialisi peritoneale vengono normalmente confezionati con un film che blocca la permeabilità al vapor d'acqua ⁽⁴⁶⁾.

5. CENNI SULLA TRASFUSIONE DEL SANGUE

Da secoli l'uomo è consapevole dell'elevata importanza del sangue e ha cercato – a lungo invano – di riuscire a trasferire il sangue da una persona sana a una malata. Solo con la scoperta dei gruppi sanguigni, ormai oltre un secolo fa, fu aperta la strada alla trasfusione del sangue, la cui composizione è schematizzata nella Figura 14, con risultati positivi.

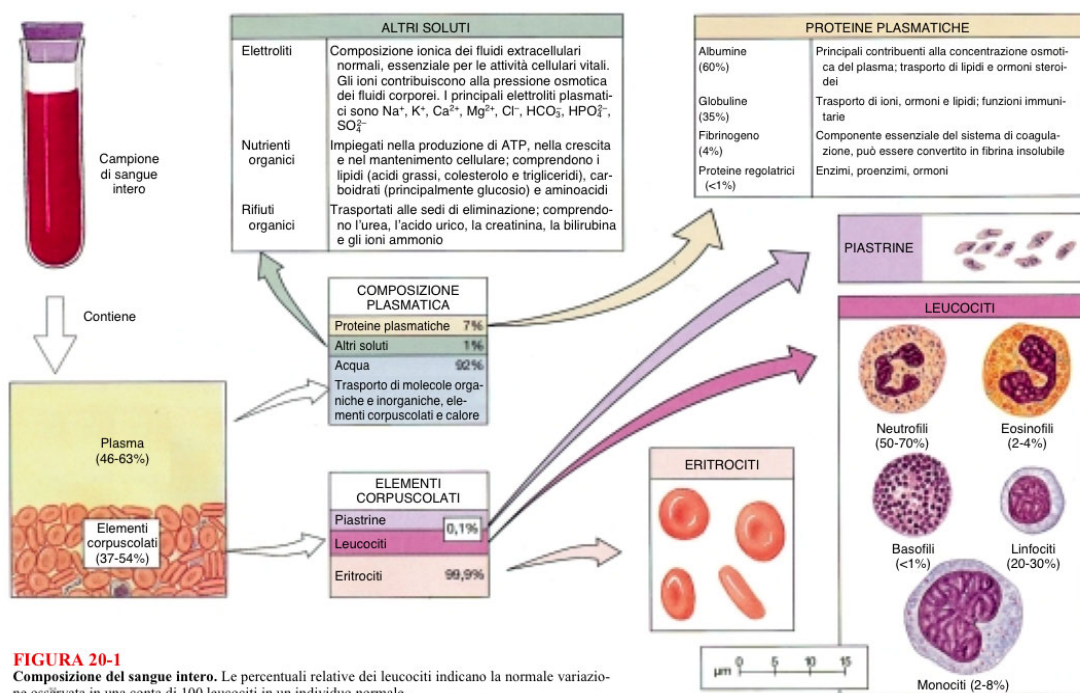


Figura 14: Schema relativo alla composizione del sangue

La reintegrazione completa della massa ematica o di alcuni suoi componenti (globuli rossi, piastrine, fattori della coagulazione) è utile, anzi indispensabile in molte condizioni patologiche e chirurgiche.

Il sangue è una sostanza complessa composta da elementi cellulari e da plasma, a sua volta contenente proteine, in cui ogni elemento costitutivo ha una sua specifica funzione. Pertanto, anche grazie ai progressi fatti in campo emo-

trasfusionale, oggi è possibile trasfondere oltre che il sangue intero anche i suoi costituenti separati. È possibile trasfondere:

- Sangue intero fresco: difficile da reperire, non ha indicazioni specifiche tranne che in casi di emorragie complicate.
- Sangue intero conservato: viene adoperato nelle emorragie gravi.
- Globuli Rossi concentrati: per le emorragie importanti ma inferiori al 50% e con anemia grave.
- Piastrine concentrate: indicate in casi di piastrinopenie gravi
- Plasma Conservato: utile nelle emorragie caratterizzate da perdita di fattori della coagulazione o in caso di perdite plasmatiche (ustioni, occlusione intestinale grave)
- Plasma fresco: emorragie da coagulopatie, coagulazione intravascolare disseminata (CID)
- Fattori concentrati della coagulazione

Prima di qualsiasi utilizzo, ogni campione di sangue viene analizzato in laboratorio per verificare il gruppo sanguigno ed escludere le trasmissioni di malattie infettive. Dopo ogni donazione, il donatore riceve il risultato delle analisi e può agevolmente tenere sotto controllo il suo stato di salute.

Alla prima donazione vengono determinati:

- AB0, Fenotipo RH completo, Kell
- Ricerca di anticorpi irregolari Anti-eritrociti

Le analisi includono:

- esame emocromocitometrico completo
- transaminasi ALT con metodo ottimizzato
- sierodiagnosi per la lue
- HIVAb 1-2 (per l'AIDS)
- HBsAg (per l'epatite B)
- HCVA b e costituenti virali (per l'epatite C)
- HCV NAT
- Conferma del gruppo sanguigno (A, B, AB, 0) e del Fattore RH

I campioni vengono in seguito centrifugati e separati in sacche di globuli rossi, globuli bianchi e *buffy-coat* (leucociti e piastrine).

Il sangue delle donazioni viene usato in svariati campi medici e chirurgici, tra cui la cura di leucemie, tumori, intossicazioni da farmaci, anemie, emorragie, malattie emorragiche, ustioni, tumori del fegato, emofilia A e B, operazioni di primo soccorso, trapianti di organi e altro ancora.

Le condizioni necessarie per poter essere donatore sono:

- *età*: compresa tra i 18 e i 65 anni; in Italia si può donare prima della maggiore età solo in situazioni particolari, dopo parere medico e autorizzazione da parte di chi esercita la patria potestà sul minore
- *peso*: più di 50 chili
- *pulsazioni*: comprese tra 50-100 battiti/min
- *pressione arteriosa*: tra 110 e 180 mm di mercurio (sistolica o massima), tra 60 e 100 mm di mercurio (diastolica o minima)
- avere un buono stato di salute (non essere affetto da gravi malattie/patologie croniche; non aver avuto malattie o assunto antibiotici nei 15 giorni precedenti il prelievo; non aver subito estrazioni dentarie nei 7 giorni precedenti la donazione; non aver subito interventi chirurgici o endoscopie nei 4 mesi precedenti il prelievo)
- non seguire comportamenti a rischio (non essere stato esposto al rischio di malattie trasmissibili (non aver effettuato tatuaggi/piercing negli ultimi 4 mesi) non fare uso di droghe pesanti né uso continuato di droghe leggere; non avere soggiornato per oltre sei mesi nel Regno Unito nel periodo dal 1980 al 1996)

La donazione, inoltre, è sconsigliata a chi ha deficit di vista particolarmente forti.

Per separare il sangue nei suoi vari componenti, raccolti in sacche diverse (Figura 15), si sfrutta il loro differente peso molecolare: quindi, dopo il prelievo, il sangue intero raccolto in una sacca sterile di materiale plastico (*Primary Bag*) contenente una soluzione anti-coagulante e conservante (citrato di sodio) viene centrifugato (15 min a 3900rpm).



Figura 15: Sistema per la raccolta del sangue

Dopo centrifugazione, sul fondo della sacca si portano tutti i globuli rossi, mentre in alto resta il plasma (Figura 16). Tra globuli rossi e plasma, si forma uno strato ricco di piastrine e globuli bianchi. A questo punto è possibile dividere i vari componenti del sangue utilizzando uno strumento apposito (*spremi-sacca*) che provvede ad applicare una pressione costante longitudinalmente alla sacca in modo da far fluire attraverso gli appositi tubicini solo la parte superiore (cioè il plasma). Un lettore ottico controlla e blocca il processo quando la soluzione non è più cristallina, segno che la porzione di plasma è già stata interamente trasferita.

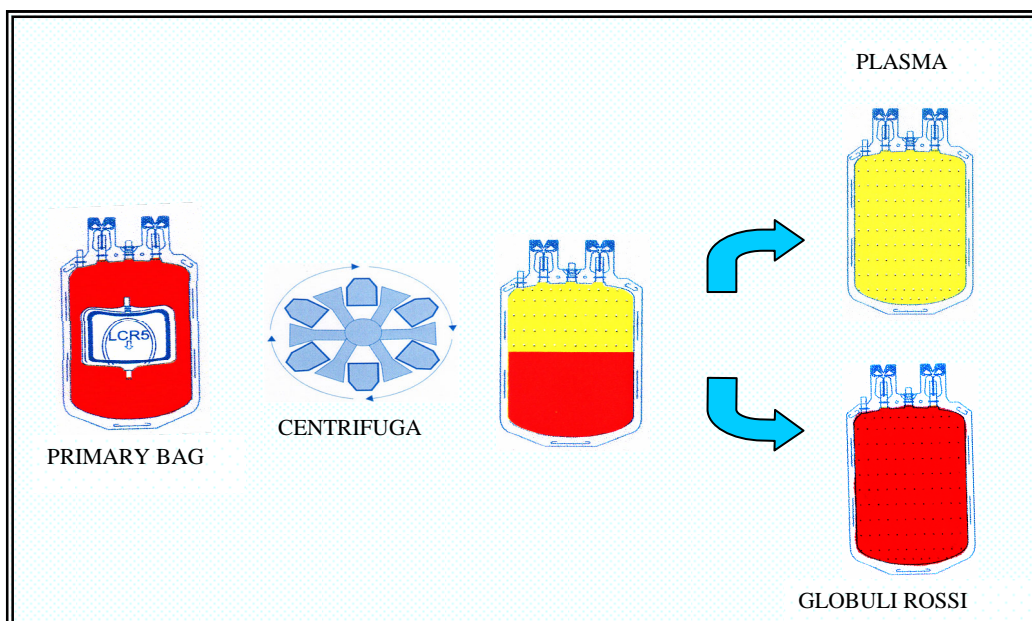


Figura 16: schema di raccolta di frazioni da sangue intero

Una volta separati, i componenti del sangue possono essere conservati in frigorifero (figura 17) in condizioni diverse a seconda della loro natura:

- Il plasma viene conservato a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ anche per un anno, dopo del quale inizia la degradazione delle proteine
- I globuli rossi possono essere conservati a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Le piastrine vengono conservate a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 5-7 giorni sotto agitazione. Normalmente vengono conservate in contenitori di materiale poli-olefinico in modo da aumentare la permeabilità dell'ossigeno.



Figura 17: *Frigoriferi per la conservazione del sangue*

PARTE SPERIMENTALE

PARTE PRIMA

MESSA A PUNTO del MATERIALE *Smart Flat*[®]

Lo scopo iniziale della ricerca era trovare un materiale che fosse estrudibile in bolla ma che possedesse anche una goffratura tale da impedire il collabimento in fase di sterilizzazione con calore umido anche in assenza di soluzione all'interno del contenitore.

Per ottenere l'effetto goffrato si è andati a lavorare sulle proprietà reologiche del PVC fuso, modificando le pressioni e le temperature della testa di estrusione in modo da stressare tanto il materiale da farlo risultare opaco e rugoso.

Poiché nell'uso farmaceutico è indispensabile poter ispezionare la soluzione contenuta nelle sacche, e considerato che questo materiale proprio per la goffratura ottenuta rendeva impossibile l'ispezione del liquido interno, è stata inserita una finestra trasparente: questo è stato possibile grazie alla tecnologia di coestrusione, schematizzata nella Figura 1.1, normalmente utilizzata per inserire piccole righe colorate all'interno di tubi per trasporto di sangue venoso (blu) ed arterioso (rosso). Questa tecnologia si avvale dell'uso simultaneo di due estrusori, posti con angolazioni diverse a seconda del prodotto che si vuole ottenere, ciascuno dei quali è caricato con un materiale diverso: il prodotto che si ottiene è quindi un materiale con inserito all'interno un altro materiale (sia questo colorato o, come nel nostro caso, trasparente).

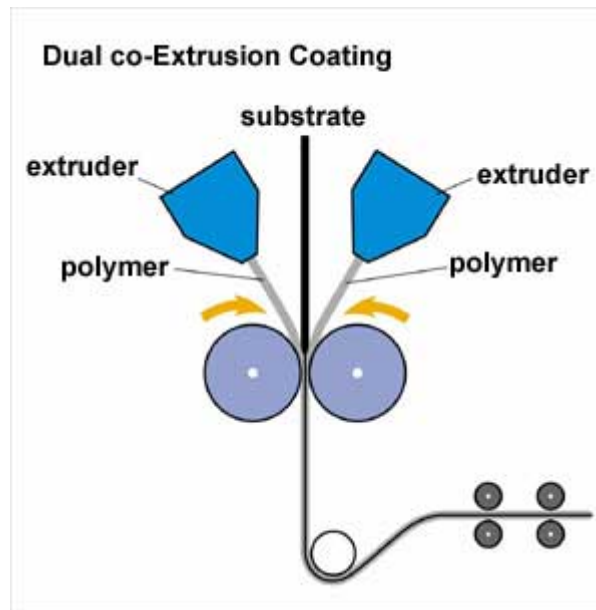


Figura 1.1: schema di un sistema di coestruzione

Già dalle prime produzioni si è osservato come il grado di goffratura influenzi enormemente le caratteristiche meccaniche del materiale.

1. METODI

1.1. Test di collabimento

E' il primo test preliminare per decidere il grado di satinatura necessario per prevenire il collabimento del materiale durante un ciclo di sterilizzazione.

Sono stati valutati diversi campioni costituiti con *Smart Flat*[®] prodotto con diversi gradi di satinatura.

Mediante saldatura a radiofrequenza si preparano 10 sacche da 3000 ml per ogni grado di satinatura del materiale *Smart Flat*[®]. Tali sacche sono state sterilizzate vuote in autoclave con calore umido a 121°C per 25 minuti poste sotto ad un peso di 2 kg, ottenuto con una sacca di PVC da 2000 ml riempita con acqua per preparazioni iniettabili (acqua ppi).

Dopo raffreddamento, la sacca da 2000 ml viene posta ad un'altezza di 1,0 metri e viene collegata alla sacca di *Smart Flat*[®] attraverso delle tubature in PVC. Si lascia

fluire l'acqua e si misura il tempo necessario per il completo trasferimento dalla sacca da 2000 ml a quella di *Smart Flat*[®].

Non vi sono limiti previsti da letteratura, ma viene generalmente accettato un tempo inferiore ai 4 minuti.

1.2. Drop-test

E' un test necessario per valutare la saldabilità del materiale mediante radiofrequenza.

Sono state preparate numerose sacche da 500 ml, 1000 ml, 3000 ml con il materiale *Smart Flat*[®], tutte riempite con acqua ppi. Alcune di queste sacche sono state sterilizzate a 121°C per 25 minuti in autoclave con calore umido che, dopo raffreddamento, sono state lasciate cadere da un'altezza di 1,5 metri. È stata determinata la percentuale di sacche in cui la saldatura non tiene all'impatto provocando fuoriuscita del liquido.

1.3 Trazione alla rottura

Strisce di 2,5 cm di lunghezza e 1,0 cm di larghezza di materiale plastico sono state tirate mediante uno speciale strumento costruito in casa, dotato di una cella di carico in grado di misurare la forza (in newton) necessaria per rompere in due il materiale.

Al fine di poter meglio valutare le caratteristiche di elasticità dal materiale, sono stati esaminati campioni con diversi gradi di satinatura (4%, 6% e 8%) e di diverso spessore (300 μm, 350 μm e 400 μm). Successivamente sono stati esaminati campioni di spessore uguale, ma di durezza shore A diversa.

1.4 Misurazioni dello stato geometrico della superficie

Per verificare lo stato geometrico delle superfici è stato utilizzato un profilometro laser UMB Microfocus, il cui schema di funzionamento è rappresentato nella figura 1.2.

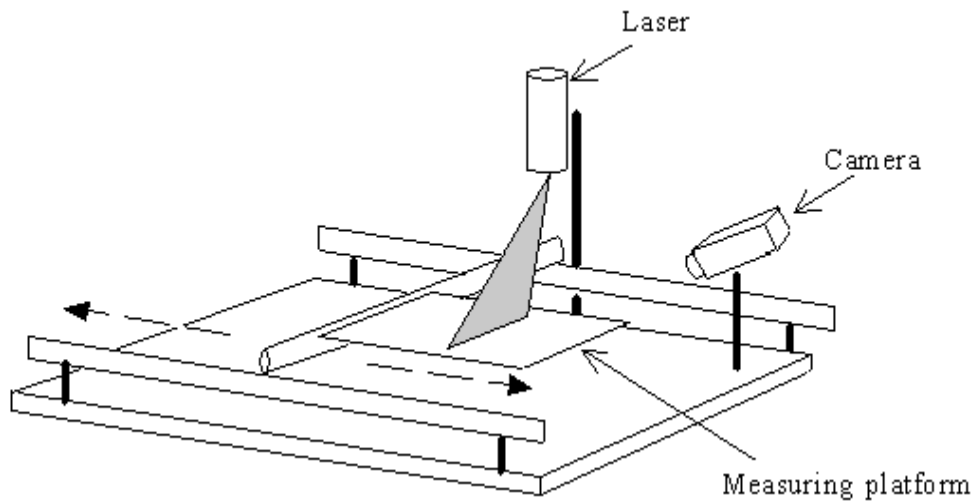


Figura 1.2: *Schema di funzionamento di un profilometro laser*

Data l'elevata trasparenza del materiale, quindi non compatibile con le modalità ottiche dello strumento, è stata applicata in via preliminare una doratura delle superfici mediante deposizione di ion-sputtering.

Per ogni campione sono state effettuate misurazioni della superficie interna e in direzione longitudinale rispetto all'asse del tubolare. La lunghezza del campionamento è stata fissata in 1,25 mm con densità di lettura di 1400 punti/mm. Tra i parametri disponibili per la caratterizzazione delle superfici, sono riportate le medie e le deviazioni standard relativi ai parametri ritenuti più significativi, e cioè:

R_a : media aritmetica dei valori assoluti di tutti i punti di profilo, può essere interpretato come un indice dell'altezza delle asperità.

R_z DIN: media aritmetica delle massime distanze tra i picchi e valli rilevata sulle sezioni consecutive di eguale lunghezza del profilo considerato.

2. RISULTATI

2.1. Test di collabimento

Nella Figura 2.1 e nella corrispondente Tabella 2.1 sono riportati i risultati relativi a questo test.

Grado satinatura	tempo di trasferimento soluzione										Media
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	
2%	>4min	>4min	>4min	>4min	>4min	>4min	>4min	>4min	>4min	>4min	>4min
4%	3,57	3,49	3,12	>4min	3,26	3,58	>4min	3,18	3,32	3,18	3,34
6%	2,46	3,1	2,4	2,48	3,08	2,37	3,21	2,54	2,49	3,12	2,73
8%	2,3	2,18	2,27	2,45	2,38	2,56	2,49	2,22	2,35	2,37	2,36
15%	2,2	2,17	2,36	2,06	2,18	2,22	2,36	2,27	2,15	2,42	2,24

Tabella 2.1 tempi di riempimento di sacche in relazione al grado di satinatura del materiale

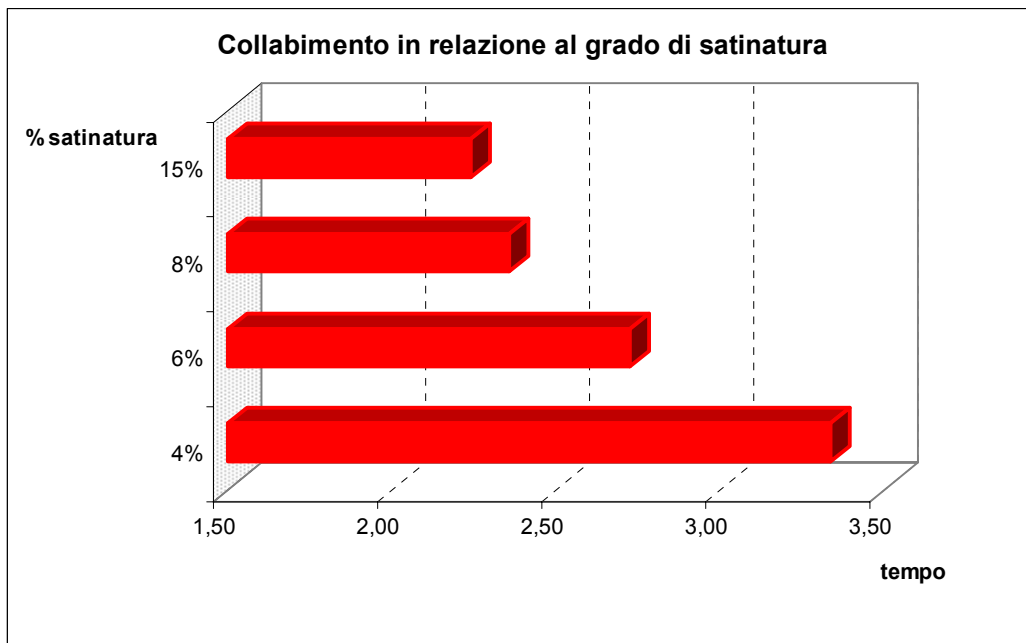


Figura 2.1: collabimento delle sacche in funzione della goffratura

Come è possibile osservare, la satinatura al 2% ha dimostrato essere totalmente insufficiente poiché i tempi di svuotamento hanno di gran lunga superato i 4 minuti previsti come limite massimo per questo test.

La satinatura al 4% ha dato risultati migliori, ma pur sempre troppo alti, soprattutto considerando che in alcuni casi sono stati comunque superati i 4 minuti.

La satinatura al 15% e al 8% ha dato risultati simili: si può quindi dedurre che oltre un certo limite la satinatura non previene più il collabimento: poiché il procedimento per ottenere il materiale satinato è molto costoso e ha rese produttive molto basse, si è scelto di proseguire gli esperimenti basandosi su un materiale con grado di satinatura 6% poiché è risultato essere quello con grado di collabimento minore in relazione al costo e alla resa produttiva.

2.2. Drop-test

Nelle Tabelle seguenti sono stati riportati i risultati riguardanti le sacche danneggiate in questo test in funzione del volume delle sacche stesse.

Tabella 2.2: *Sacche da 500 ml*

	Pezzi testati	Pezzi danneggiati	% Successo
Prima di sterilizzazione	10	0	100%
Dopo sterilizzazione	10	0	100%

Tabella 2.3: *Sacche da 1000 ml*

	Pezzi testati	Pezzi danneggiati	% Successo
Prima di sterilizzazione	10	1	90%
Dopo sterilizzazione	10	0	100%

Tabella 2.4: *Sacche da 3000 ml*

	Pezzi testati	Pezzi danneggiati	% Successo
Prima di sterilizzazione	10	6	40%
Dopo sterilizzazione	10	4	60%

Come ci si aspettava, minore è il volume della sacca minore è la probabilità che essa si rompa in seguito alla caduta e quindi maggiore è la percentuale di successi. È stato però interessante notare che il processo di sterilizzazione aumentava la percentuale di successo dell'esperimento, cioè aumentava la resistenza alla rottura delle sacche.

Si evince quindi che le sacche si rompono a causa del "colpo d'ariete" dato dall'acqua al momento dell'impatto con il suolo: sacche più grandi, pesano di più e quindi maggiore è il colpo che ricevono quando toccano il terreno.

Con l'obiettivo di aumentare la percentuale di successo, questo test è stato ripetuto con sacche di volume identico ma con grado di satinatura diverso, dato che il grado di satinatura influenza l'elasticità della sacca. I risultati sono riportati nelle tabelle seguenti.

Tabella 2.5: *Sacche da 3000 ml, satinatura 4%*

	Pezzi testati	Pezzi danneggiati	% Successo
Prima di sterilizzazione	10	3	70%
Dopo sterilizzazione	10	1	90%

Tabella 2.6: *Sacche da 3000 ml, satinatura 6%*

	Pezzi testati	Pezzi danneggiati	% Successo
Prima di sterilizzazione	10	3	70%
Dopo sterilizzazione	10	2	80%

Tabella 2.7: *Sacche da 3000 ml, satinatura 8%*

	Pezzi testati	Pezzi danneggiati	% Successo
Prima di sterilizzazione	10	5	50%
Dopo sterilizzazione	10	4	60%

Dai risultati ottenuti si può concludere come all'aumentare del grado di satinatura, il materiale risulti meno elastico e quindi tenda maggiormente a rompersi in seguito all'impatto con il suolo.

2.3 Trazione alla rottura

È stata studiata la forza da applicare per ottenere la rottura del materiale plastico in funzione dello spessore della plastica e della sua goffatura. I risultati (in Newton) sono riportati nella seguente Tabella 2.8 e nella corrispondente Figura 2.2.

Tabella 2.8: forza da applicare per ottenere la rottura del materiale plastico

Spessore	Grado satinatura	C 1	C 2	C 3	C4	C 5	media	Dev. Stand.
300 μm	8%	83,0	88,0	90,5	90,0	86,5	87,9	3,029
350 μm	8%	92,5	91,5	98,0	95,5	97,5	91,0	2,915
400 μm	8%	110,0	110,5	111,5	106,5	112,0	112,2	2,162
300 μm	6%	92,5	92,0	84,5	84,5	88,0	88,3	3,883
350 μm	6%	98,5	99,0	95,7	94,0	97,5	97,1	2,072
400 μm	6%	109,0	118,2	113,5	115,5	117,5	114,7	3,696
300 μm	4%	92,0	94,0	92,0	91,5	87,5	87,0	2,382
350 μm	4%	107,5	99,5	98,5	99,0	106,5	102,2	4,410
400 μm	4%	118,2	121,5	120,3	118,7	117,5	119,2	1,630

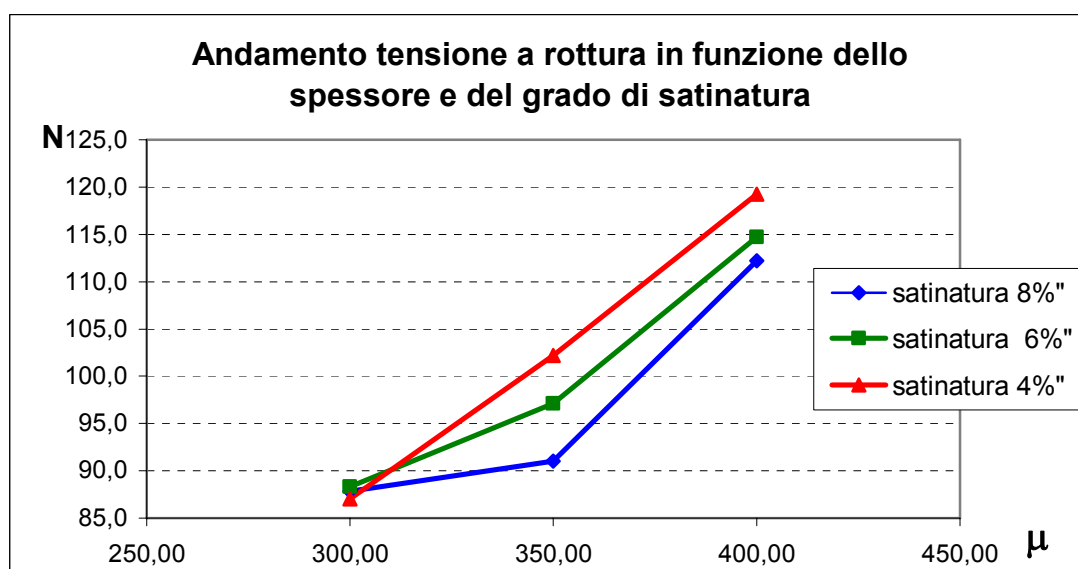


Figura 2.2: andamento del carico a rottura in funzione dello spessore e del grado di satinatura

Dai dati ottenuti si conclude che all'aumentare dello spessore aumenta anche la forza necessaria per portare a rottura il campione mediante trazione

Come ci si aspettava in base a quanto visto nei precedenti esperimenti, anche il grado di satinatura influenzava l'entità della forza necessaria per ottenere la rottura della plastica, data la sua influenza sull'elasticità del materiale.

Poiché, come osservato precedentemente, una satinatura al 4% era insufficiente per garantire totalmente il collabimento in fase di sterilizzazione ma si voleva comunque aumentare l'elasticità del materiale plastico, si è pensato di mantenere costante il grado di satinatura al 6%, visto che è risultato essere quello con miglior rapporto resa produttiva-resistenza al collabimento, e di andare ad incrementare la quantità di olio di soia presente nella formulazione. Infatti la quantità di olio di soia epossidato, come accennato nell'introduzione, ha proprietà co-plastificanti e quindi modifica la durezza shore A. Lo spessore è stato mantenuto a 300 μm . per utilizzare una minor quantità di prodotto in modo da mantenere quanto più contenuti possibile i costi di produzione.

Con queste condizioni si sono ottenuti i risultati riportati nella Tabella 2.9 e nella corrispondente Figura 2.3.

Tabella 2.9: *forza di rottura in funzione della quantità di coplastificante nella formulazione*

Spessore	Grado satinatura	ShA	C 1	C 2	C 3	C4	C 5	media	dev stand
300 μm	6%	84	88,5	98,5	101,3	99,0	103,5	98,2	5,756
300 μm	6%	82	112,5	102,5	99,5	100,5	105,0	104,0	5,196
300 μm	6%	80	102	108,5	100,5	110	114,4	107,0	5,884

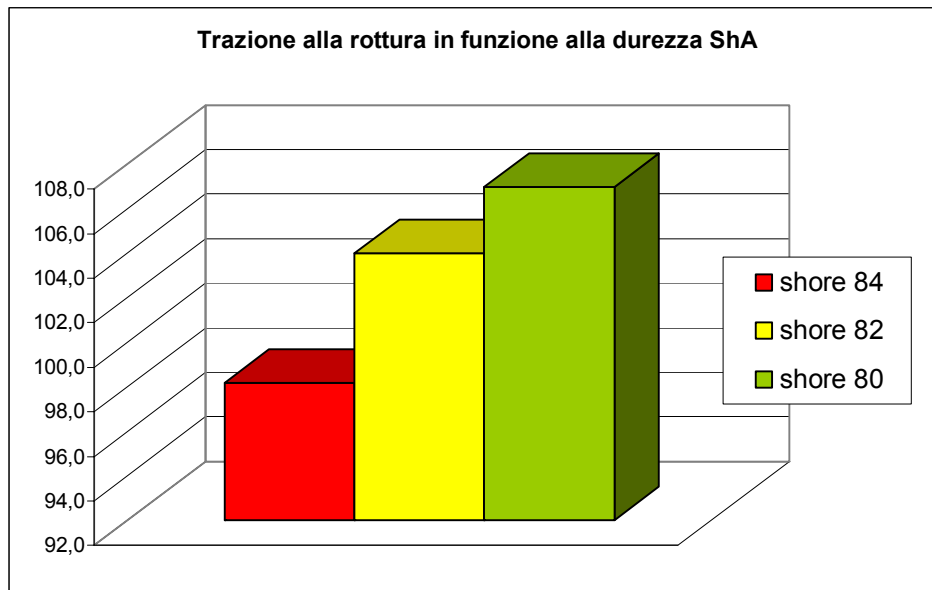


Figura 2.3: *trazione alla rottura in funzione della durezza espressa come Shore A*

Si osserva come, diminuendo la durezza shore, sia necessaria una maggior forza per rompere i campioni prova che è stata aumentata l'elasticità del materiale.

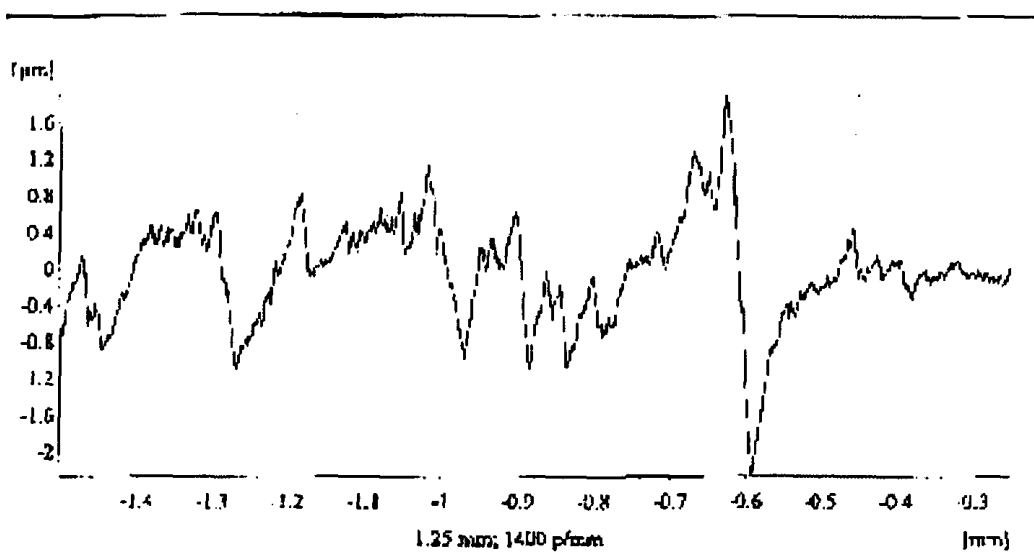
Inoltre, in fase di test, è stato anche chiaramente osservabile come il materiale più morbido si allungasse molto di più prima di rompersi indicando nuovamente un aumento di elasticità della mescola.

I risultati sono stati valutati soddisfacenti soprattutto in considerazione del fatto che lo spessore della plastica è stato mantenuto minimo e il grado di satinatura al 6%, condizioni che sono decisamente preferibili dal punto di vista strettamente produttivo.

2.4 Misurazioni dello stato geometrico della superficie

Sono stati misurati diversi campioni con diversi gradi di satinatura.

Di seguito vengono riportati i grafici più significativi che dimostrano come all'aumentare del grado di satinatura, aumenti anche l'altezza; la frequenza dei picchi invece è molto superiore nei campioni con un grado di satinatura inferiore.



Measurement file: 13-3.UB2

Project:

Filter parameters:

Traverse:	1.75 mm	Filter type:	RC
Eval. length:	1.25 mm	Cut off wavelength:	0.25 mm
Point density:	1400 Points/mm	Damping:	75 %
		Crack suppression:	no
		Filter according to DIN 4768:	yes

Measurement results:

Rt,Ry	4.181 µm	Rmax	4.181 µm	Rp	1.917 µm
Rpm	0.971 µm	Ra	0.410 µm	ST	0.060
RzDin	2.086 µm	Rz100	3.350 µm	R3z	1.609 µm
R3zm	3.226 µm	lt	4.347 µm	Wt	2.767 µm
Lo	1.255 mm	Lr	1.004	Mean	-0.018 µm
Sk	-0.313	K	4.730	NR,S	31.982 µm
Sm	0.313 mm	D	4.000	Rk	1.147 µm
Rpk	0.717 µm	Rvk	0.709 µm	Mr1	9.138 %
Mr2	84.180 %	Rq	0.557 µm		

Figura 2.4: Campione satinato al 8%

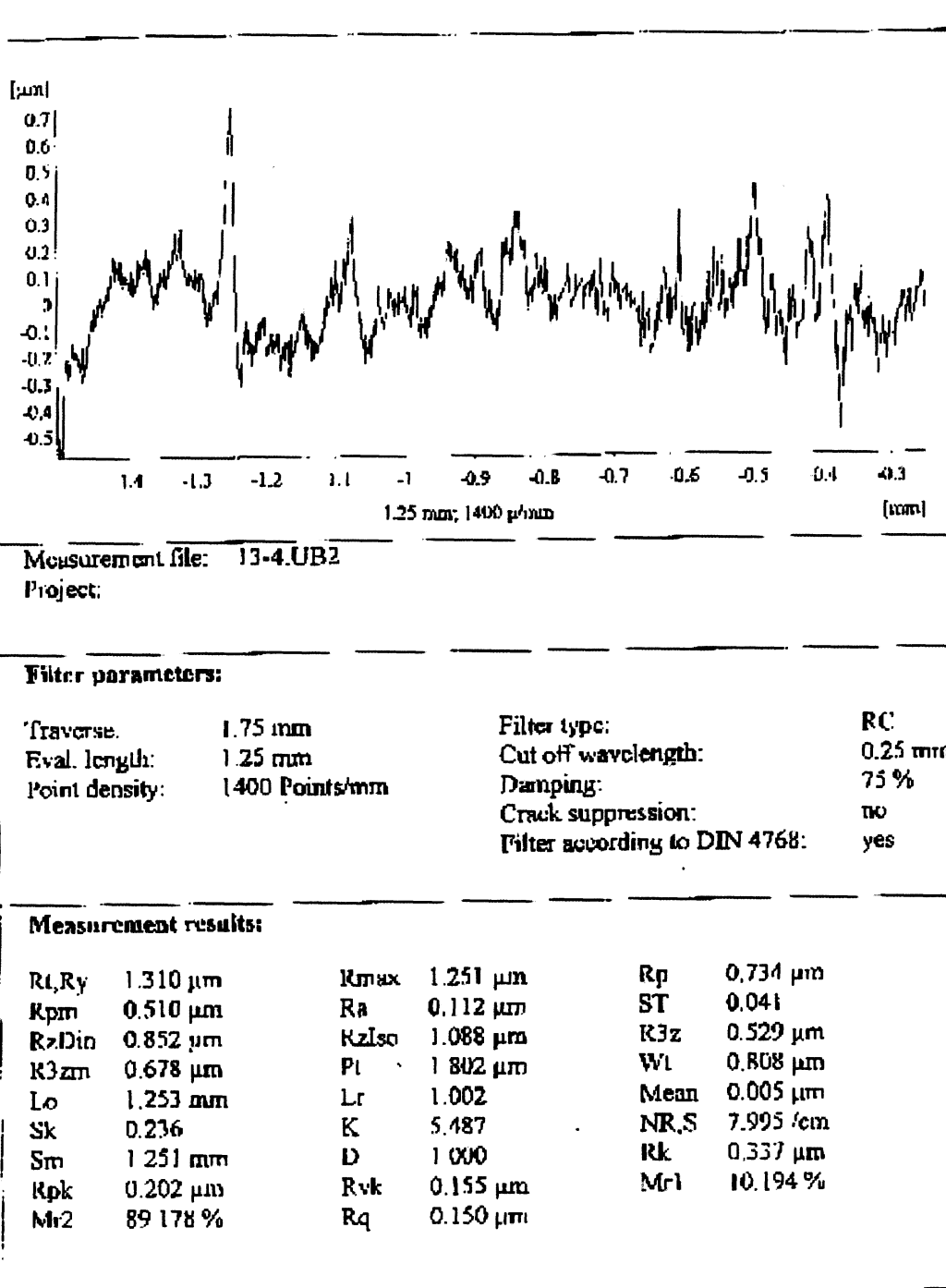


Figura 2.5: Campione satinato al 6%

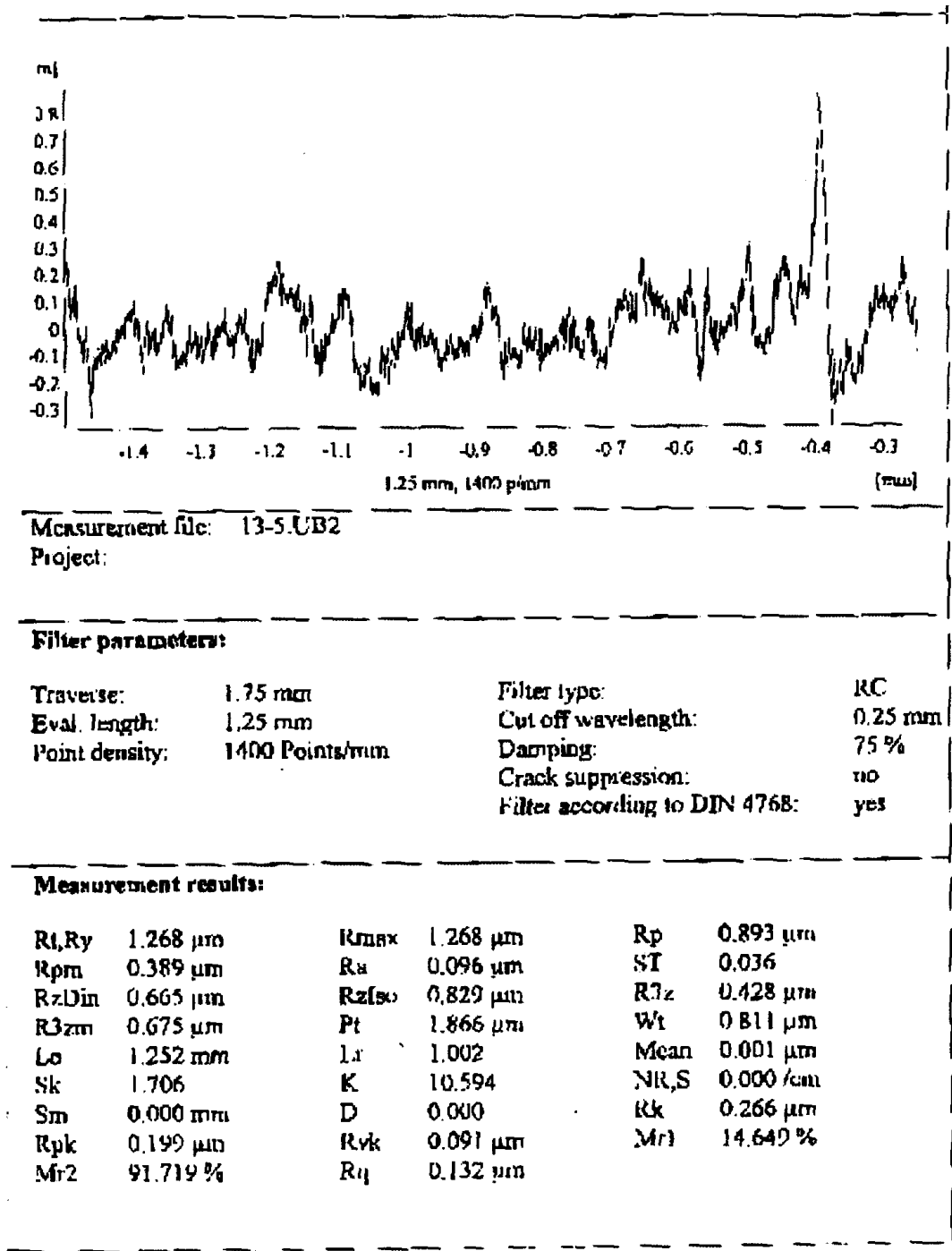


Figura 2.6: Campione satinato al 4%

PARTE SECONDA

VALUTAZIONE delle CARATTERISTICHE CHIMICHE

1. METODI

1.1 Riempimento

A seconda del test che si intende eseguire, relativo a test previsti da Farmacopea o per valutare la stabilità del materiale con soluzioni anticoagulanti destinate alla conservazione del sangue, le sacche sono state riempite con:

- Acqua ppi,
- Soluzione Fisiologica (NaCl 0.9%),
- Soluzione Anticoagulante CPD (Sodio Citrato 26,3 g, Acido Citrico Monoidrato 3,27 g, Glucosio Monoidrato: 25,5 g; Fosfato di Sodio di-idrato 2,51 g in 1000 ml Acqua ppi),
- Soluzione SAG-Mannitolo (soluzione additiva per globuli rossi che garantisce soprattutto una riserva di adenina per la produzione di nucleotidi adenilici; NaCl 8,77 g, Adenina 0,169 g, Glucosio Monoidrato 9,00 g, Mannitolo 5,25 g in 1000 ml Acqua ppi)
- Soluzione T-Sol (soluzione additiva per piastrine, che ne ricavano fosfati da utilizzare nei processi metabolici; Sodio Citrato di-idrato 2,94 g; Sodio Acetato tri-idrato :4,08 g, Sodio Cloruro 6,75 g in 1000 ml Acqua ppi, pH 7,2)

Nella fase di riempimento è stata posta la massima cura per evitare contaminazioni esterne. Per questo sono stati impiegati filtri sterilizzanti (0,2 µm) posizionati tra l'imbuto e il tubo utilizzato per il riempimento.

1.2 Sterilizzazione

Per valutare il comportamento del materiale in relazione allo stress termico prodotto durante un ciclo di sterilizzazione, i campioni sono stati sterilizzati con diverse autoclavi, tempi e temperature.

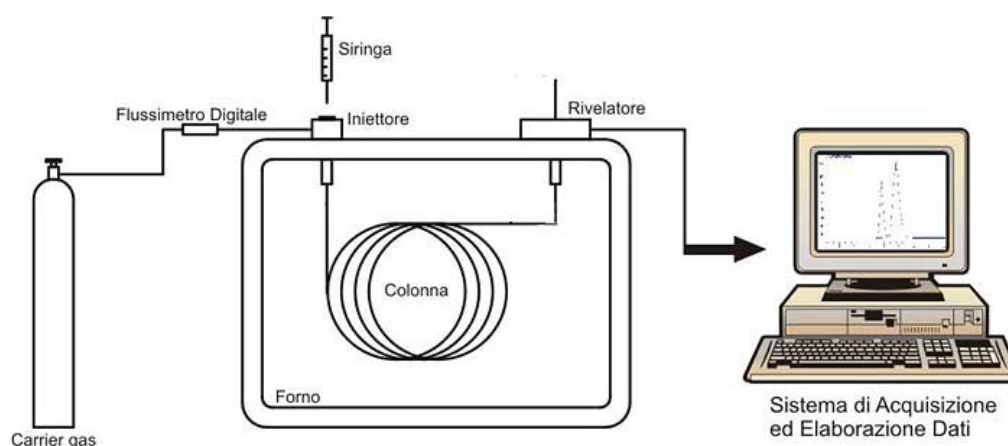
Inoltre i campioni sono stati sottoposti ad un ciclo di sterilizzazione sia esponendo direttamente il materiale all'azione termica che dopo averlo avvolto in speciali film di polietilene, detti *copri-sacca*, ed avendo fatto il vuoto tra i campioni e il copri-sacca. In questo modo, non solo viene garantita la sterilità anche della superficie esterna del campione, ma anche il PVC stesso risulta in un certo modo "protetto" dallo stress termico della fase di sterilizzazione e quindi subirà un processo di degradazione diverso.

Nella Tabella seguente sono riportati i parametri di sterilizzazione adottati.

Sterilizzazione	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pressione (bar)	Apertura camera (°C)
Sifra Est	118	50	1.4	80
Galenica "A"	118	18	2.9	60
Galenica "B"	121	17	2.9	60
Ipra	119	50	2.3	70

1.3 Gas-Cromatografia

Questo sistema analitico è stato scelto per la sua affidabilità nel separare i composti nei loro vari componenti e quindi per trarre informazioni utili non solo sulla presenza di plastificante all'interno delle soluzioni, ma anche informazioni riguardo la concentrazione del plastificante stesso e dei sottoprodotti in cui potrebbe degradarsi.



Schema di un gas-cromatografo

Apparecchio: GC/MS con colonna DB-5 (30m x 0.25mm, 0.25 μ m film)

- Temperatura iniettore: 260°C
- Programma di temperatura: 40-300°C (4 min. hold time, total time 11 min) con velocità costante di 40°C/min
- Volume iniettato (campioni e standard): 1 μ l

Materiali:

- Campioni di acqua ppi contenuti in sacche di PVC plastificato da 500 ml sono sterilizzati nelle condizioni precedentemente riportate in modo da poter valutare il grado di degradazione del materiale e quindi di plastificante rilasciato in soluzione.

Inoltre sono stati messi a confronto campioni sterilizzati senza copri-sacca con campioni in cui invece il copri-sacca era presente in modo da poter valutare come la presenza di copri-sacca possa proteggere il materiale dall'aggressione termica.

- Campione di plastificante DEHP
- N-esano (95%)
- Acetonitrile (CH₃CN, 99.8%)
- Soluzione satura di NaCl

Analisi e preparazione di soluzioni standard e campioni: la soluzione acquosa di 500 ml contenuta nella sacche di PVC soggette a sterilizzazione viene divisa in due parti uguali (250 ml cadauna); queste vengono travasate negli imbuti separatori. Vengono quindi aggiunti 30 ml di CH₃CN e 20 ml di soluzione satura di NaCl.

La miscela viene estratta con 50 ml di esano per 30 min.

L'estrazione viene ripetuta due volte e la fase organica viene portata a secco e sciolta in 0.5 ml di esano prima dell'analisi.

Cinque diverse soluzioni a concentrazione nota di DEHP sono state utilizzate per simulare le condizioni dei campioni e per costruire la retta di taratura mettendo in relazione la concentrazione (C, µg/ml) di DEHP in esano con l'area (A) sottesa al picco del cromatogramma.

1.4 Preparazione *soluzione S* (secondo Farmacopea)

Un contenitore viene riempito con un volume nominale di acqua PPI e chiuso utilizzando lo stesso sistema di chiusura impiegato normalmente. La sacca viene quindi sottoposta ad un ciclo di sterilizzazione in autoclave tale per cui la temperatura di 121 +/- 2°C viene raggiunta in un tempo compreso tra i 20 ed i 30 minuti e viene mantenuta per 30 minuti

Bianco: preparare un bianco scaldando dell'acqua PPI in una beuta di vetro borosilicato chiusa con un foglio di alluminio per un tempo ed ad una temperatura pari a quella utilizzata per la preparazione della *soluzione S*.

1.5. Aspetto della Soluzione (secondo Farmacopea)

1.5.1 Limpidezza e grado di opalescenza

In tubi da saggio identici di vetro neutro, trasparente, incolore a fondo piatto ed un diametro interno di 15-25 mm, si mette a confronto il liquido da esaminare con una sospensione di riferimento preparata sul momento dell'uso data dalla diluizione della sospensione primaria di opalescenza, per uno spessore di 40 mm.

Confrontare i liquidi dopo 5 minuti dalla preparazione della sospensione di riferimento, osservando verticalmente lungo l'asse del tubo contro un fondo nero alla luce diffusa del giorno. La diffusione della luce deve essere tale da permettere di differenziare facilmente la sospensione di riferimento I dall'acqua R e la soluzione di riferimento II dalla sospensione di riferimento I.

Un liquido è considerato limpido se la sua limpidezza è la stessa di quella dell'acqua R o del solvente utilizzato se esaminato secondo le condizioni descritte di seguito, o se la sua opalescenza non è più pronunciata di quella della sospensione di riferimento I.

Sospensione primaria di opalescenza: aggiungere 25,0 ml di idrazina solfato soluzione nella beuta contenente soluzione di esametilentetrammina. Mescolare e lasciare a riposo a 24 ore. Questa sospensione è stabile per 2 mesi avendo cura che sia conservata in un recipiente di vetro a pareti perfettamente lisce. La sospensione non deve aderire al vetro e deve essere mescolata con cura prima dell'uso.

Standard di opalescenza: diluire 15,0 ml di sospensione primaria di opalescenza a 1000,0 ml con acqua R. Questa sospensione è preparata al momento dell'uso e può essere conservata al massimo 24 ore.

Sospensioni di riferimento: preparare le sospensioni di riferimento secondo la seguente tabella. Mescolare ed agitare prima dell'uso.

Sospensioni di riferimento	I	II	II	IV
Standard di opalescenza (acqua fino ad arrivare a 100ml)	5,0ml	10,0ml	30,0ml	50,0ml

1.5.2 Grado di colorazione dei liquidi

Per apprezzare il grado di colorazione dei liquidi nelle sfumature bruno-giallo-rosso si effettua uno dei seguenti metodi.

Nel nostro caso, una soluzione si dice incolore se ha l'aspetto dell'acqua R.

Metodo I: in tubi da saggio identici, di vetro neutro, incolore, trasparenti ed aventi un diametro esterno di 12 mm, confrontare 2,0 ml della soluzione in esame con 2,0 ml di acqua R. I colori vengono confrontati osservando orizzontalmente per trasparenza contro fondo bianco alla luce diffusa del giorno.

Metodo II: in tubi da saggio identici di vetro neutro, incolore, trasparenti ed aventi un diametro esterno compreso tra 15 e 25 mm ed a fondo piatto, confrontare la soluzione in esame con acqua R. Confrontare i colori osservando verticalmente per trasparenza contro fondo bianco alla luce diffusa del giorno.

1.6. Acidità

Secondo Farmacopea Europea 3.2.2.1 – ad un volume di soluzione S corrispondente al 4% del capacità nominale del contenitore preso in esame aggiungere 0.1 ml di fenoftaleina soluzione R.

La soluzione così ottenuta è incolore.

Aggiungere goccia a goccia 0.4 ml di soluzione di Idrossido di sodio 0.1M.

La soluzione diventa rosa.

1.7 Alcalinità

Secondo Farmacopea Europea 3.2.2.1 – alla soluzione precedentemente ottenuta, aggiungere 0.8 ml di soluzione di Acido Cloridrico 0.1 M e 0.1 ml di metilarancio soluzione R.

La soluzione diventa arancio-rossa o rossa.

1.8. Sostanze riducenti

Secondo Farmacopea Europea 3.2.2.1 – a 20.0 ml di soluzione S aggiungere 1 ml di acido solforico diluito R e 20.0 ml di potassio permanganato 0.002M.

Bollire per 3 minuti.

Raffreddare immediatamente.

Aggiungere 1 g di Ioduro di potassio R e titolare immediatamente con sodio-tiosolfato 0.01M, usando come indicatore 0.25 ml di soluzione di salda d'amido.

Eeguire una ulteriore titolazione utilizzando 20.0 ml di bianco.

La differenza tra i volumi di titolazione non è maggiore di 1.5 ml.

1.9. Assorbanza UV Visibile

Secondo Farmacopea Europea 3.2.2.1 – misurare l'assorbanza della soluzione S da 230nm a 360nm utilizzando il bianco come liquido di compensazione.

A queste lunghezze d'onda, l'assorbanza non è maggiore di 0.20.

1.10. Leakage test

Le sacche del materiale, che si intendeva analizzare, sono state riempite con acqua PPI , sono state quindi sterilizzate con un ciclo di sterilizzazione secondo Farmacopea Europea (121°C per 25 minuti). Dopo raffreddamento, sono state poste sotto una pressa avvolte in carta assorbente azzurra per evidenziare eventuali perdite d'acqua.

Mediante apposite piastre, è stata applicata una pressione tale per cui la pressione interna fosse 67 KPa.

Tale pressione è stata raggiunta in 1 minuto ed è stata mantenuta per 5 minuti.

1.11. Stabilità accelerata

Ogni volta che viene studiato un nuovo materiale (di qualsiasi tipologia) da utilizzare per il confezionamento primario di farmaci, la Normativa Nazionale ed Internazionale, in ottemperanza alla CPMP/QWP/556/96 relativa alla conduzione di studi di stabilità sul prodotto finito, prevede che vengano fatti dei test sul contenuto nel tempo.

Detta stabilità può essere effettuata in maniera naturale a temperatura ambiente per un periodo di 36 mesi, o in maniera più rapida, per seguire i ritmi del mercato, mediante “stabilità accelerata” che si basa sul Federal Standard n° 1018, n° 4007 E N° 4047.

La stabilità accelerata si basa su una tipica reazione chimica legata all'incremento della temperatura: il calcolo di relazione tempo/temperatura è espresso dalla seguente formula:

$$T = t/2 (2^{x/10})$$

dove T = temperatura

t e il tempo

x temperatura ambiente

Le sacche del materiale sono state riempite con acqua PPI e con soluzione NaCl 0,9%, sono state quindi sterilizzate con un ciclo di sterilizzazione secondo Farmacopea Europea (121°C per 25 minuti).

Dopo raffreddamento, è stato valutato il calo di pH della soluzione fisiologica.

Le sacche sono state quindi poste in una stufa termostatica ad una temperatura di 45°C e con un'umidità relativa pari al 65%.

Questo tipo di trattamento mima il naturale processo di invecchiamento dei materiali e quindi il loro naturale processo di degradazione. Una stabilità accelerata di questo tipo è paragonabile alla degradazione che si verificherebbe se il materiale fosse conservato per tre anni nelle normali condizioni ambientali.

A distanza di 1, 2 e 3 mesi vengono ripetute tutte le analisi previste da Farmacopea e si valuta il calo di peso e di pH confrontandoli con quelli di partenza.

1.12. Contaminazione particellare

Apparecchio: Coulter Counter Multisizer IIe con capillare da 70 μm – campo di misurazione: 1.4 -42 μm

Calibrazione: alcune gocce di lattice vengono sospese in una soluzione elettrolitica di NaCl 0,9% filtrata 2 volte attraverso una membrana filtrante da 0,2 μm . La sospensione, così ottenuta, viene fatta fluire attraverso il capillare registrando la distribuzione dimensionale delle microsfele in sospensione.

Preparazione del bianco: una soluzione di NaCl 0,9% viene filtrata 2 volte attraverso una membrana 0,2 μm . Tale soluzione sarà utilizzata quale bianco e per diluire le varie soluzioni contenute nelle sacche che si intende analizzare.

Preparazione del campione: diverse sacche in PVC prodotte con materiale Smart Flat[®] vengono riempite con acqua PPI e vengono quindi sterilizzate sia in presenza che in assenza di copri-sacca utilizzando diverse tipologie di autoclavi e di cicli di sterilizzazione per valutare come la temperatura ed il tempo di esposizione al calore possano influenzare la cessione particellare.

Altre sacche sono state invece riempite con diverse soluzioni per la conservazione del sangue umano e sue frazioni (soluzione CPD; soluzione T-Sol e soluzione SAG-Mannitolo). Sono state sterilizzate sia con che senza copri sacca ma utilizzando un unico ciclo di sterilizzazione. Sono state quindi conservate per periodi variabili (da 1 a 3 mesi) al buio a temperatura ambiente per valutare l'eventuale cessione particellare.

Un volume noto di soluzione così ottenuta viene quindi prelevato dalle sacche ed addizionata ad un quantitativo di soluzione NaCl 0,9% precedentemente filtrata con una membrana filtrante da 0,2 μm .

Il campione così preparato viene sottoposto a leggera agitazione e quindi lasciato a riposo per alcuni minuti per favorire l'allontanamento di eventuali bolle d'aria che potrebbero interferire con il risultato.

Si analizzano 2 ml del campione e si sottrae il bianco precedentemente determinato.

1.13. Determinazione della quantità di DEHP estraibile (metodi basati sulle indicazioni della Eur. Pharm.V Ed 3.2.4)

Solvente per l'estrazione:

- I prova: 67,5% EtOH e 32,5% H₂O
- II prova: 46,2% EtOH e 53,8% H₂O

Soluzione madre: si dissolvono 0,100 g di DEHP nel solvente per l'estrazione e diluire a 100,0 ml con lo stesso solvente

Soluzioni standard:

- a) Diluire 20,0ml di soluzione madre in 100,0 ml di solvente
- b) Diluire 10,0ml di soluzione madre in 100,0 ml di solvente
- c) Diluire 5,0ml di soluzione madre in 100,0 ml di solvente
- d) Diluire 2,0ml di soluzione madre in 100,0 ml di solvente
- e) Diluire 1,0ml di soluzione madre in 100,0 ml di solvente

Si misura l'assorbanza delle soluzioni standard ad una lunghezza d'onda di 272 nm, usando il solvente per l'estrazione come liquido di compensazione e si traccia un grafico dell'assorbanza contro la concentrazione di DEHP (curva di calibrazione).

Procedura di estrazione: Utilizzando un ago o un adattatore, è stato riempito il contenitore vuoto con un volume uguale alla metà del volume nominale con il solvente per l'estrazione, precedentemente scaldato a 37°C. L'aria viene completamente tolta e si tappa il tubo. Il contenitore riempito viene posto in posizione orizzontale in un bagno d'acqua mantenuto a 37 +/-1°C per 60 +/- 1 min senza agitare.

Il contenitore viene rimosso dal bagno, viene fatto ruotare delicatamente dieci volte e il contenuto viene trasferito in un contenitore di vetro. Si misura immediatamente l'assorbanza a 272nm utilizzando il solvente per l'estrazione come liquido di compensazione (bianco).

Si determina la concentrazione di DEHP in milligrammi per 100ml di estratto dalla curva di calibrazione.

1.14. Microscopia a forza atomica (AFM)

La misurazione della AFM è basata su una punta di ceramica e di un materiale semiconduttore che scorre sul campione, più o meno come una puntina legge un disco. La punta è posizionata alla fine di un braccio. Come la punta è respinta o attratta dalla superficie, il braccio si muove di conseguenza. L'ampiezza di questo movimento è catturata da un raggio laser che riflette con un angolo obliquo a partire dalla parte terminale del braccio (Figura 1.1).

Un grafico della deflessione del laser contro la posizione della punta fornisce la risoluzione dei picchi e delle valli che costituiscono la topografia della superficie. La AFM può lavorare sia con la punta che tocca il campione (modalità a contatto) oppure la punta può sfiorare la superficie.

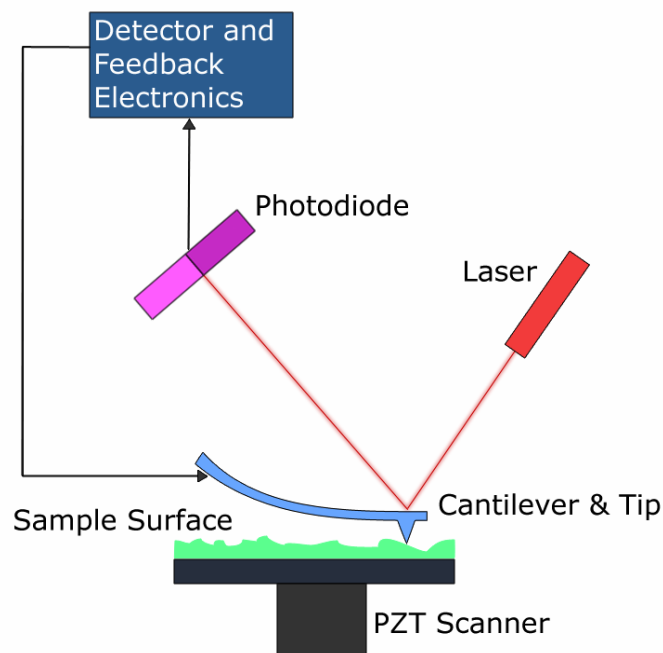


Figura 1.1: Schema di funzionamento un microscopio AFM

Procedura: I campioni vengono preparati tagliando dei pezzi di materiale plastico di circa 10 x 10 mm dalla zona centrale della sacca. I campioni vengono quindi sciacquati con circa 10 ml di acqua distillata, filtrata a 100 µm, ed asciugati con flusso di N₂ gassoso. Le aree di scansione AFM sono state di 50 x 50 µm, 20 x 20 µm, 10 x 10 µm e 5 x 5 µm.

1.15. Indagine tensiometrica

Strumentazione: Tensiometro G40 (Kruss GmbH, Hamburg), equipaggiato con una microcamera g1041, un dosimetro manuale per le misure delle tensioni di superficie ed interfaccia, un dosimetro manuale per l'angolo di contatto, un dosimetro automatico G1023 per l'angolo di contatto dinamico, un monitor per la temperatura TD-211 con una siringa Hamilton 1750TLL.

Procedimento: 4 campioni (75mmx 25mm) sono stati presi da zone diverse del materiale da testare e sono stati lavati con acqua distillata per preparazioni iniettabili e quindi asciugati.

La superficie esterna è stata fatta aderire al vetro del microscopio.

Acqua e di-iodometano sono stati utilizzati come liquidi standard.

Una goccia di liquido standard è stata posta sulla superficie dei campioni e gli angoli di contatto sono stati misurati.

La misura degli angoli così determinati sono stati elaborati utilizzando l'equazione di **Wu** e **Brzozowsky** in modo da ottenere la componente polare (**CP**) e la componente dispersa (**CD**), la somma delle quali dà indicazioni riguardo l'energia libera di superficie (**ELS**).

$$\gamma_L(1-\cos\theta) = 4 \frac{\gamma_s^p \gamma_L^p}{\gamma_s^p + \gamma_L^p} + 4 \left(\frac{\gamma_s^d \gamma_L^d}{\gamma_s^d + \gamma_L^d} \right)$$

γ_L è l'energia libera di superficie del liquido testato

γ_s è l'energia libera di superficie del materiale

p è la componente polare

d è la componente dispersa

θ è l'angolo di contatto materiale – liquido

Per ottenere le due incognite γ_s^p e γ_s^d , si misurano gli angoli di contatto della superficie polimerica utilizzando due liquidi (acqua e di-iodometano) di cui è nota la componente polare e la componente dispersa.

In questo caso, l'indagine tensiometrica è stata eseguita su campioni di materiali con formulazioni leggermente diverse in modo da valutare l'influenza della quantità di plastificante sulle proprietà del materiale.

In particolare è stato prodotto un materiale contenente un nuovo plastificante privo di ftalati (DINCH), inoltre sono state proposte tre versioni di Smart Flat® con quantità crescenti di plastificante DEHP. Tutti i campioni sono stati analizzati sia prima che dopo sterilizzazione.

2. RISULTATI

2.1 Analisi Gas-cromatografica

In questa prima parte dello studio sul processo di degradazione di PVC plastificato, si è preso in considerazione la presenza in soluzione di uno dei componenti presenti in percentuale maggiore all'interno della formulazione: il DEHP. Nella Figura 2.1 viene riportato un cromatogramma relativo ad un campione di acqua contenuto all'interno di una sacca sotto indagine

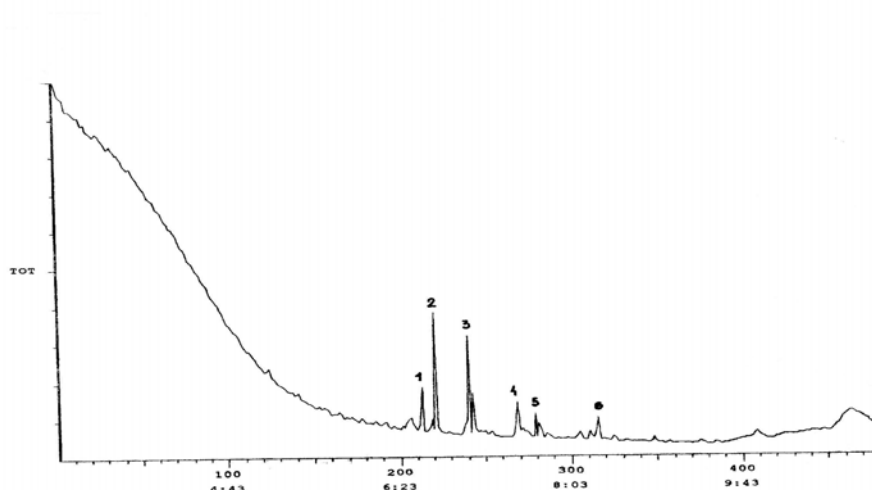


Figura 2.1: *Cromatogramma relativo all'estratto della soluzione contenuta in una sacca di PVC*

Si possono osservare diversi picchi relativi a vari contaminanti. In particolare, il picco numero 6, con tempo di ritenzione, t_r , di 8 min. e 19 sec è relativo al DEHP. L'identificazione del picco corrispondente a DEHP è stata resa possibile mediante spettrometria di massa (EI/MS) (Figura 2.2). Questa tecnica analitica, grazie alla ionizzazione e frammentazione delle molecole mediante impatto elettronico (EI), consente la loro separazione e caratterizzazione in spettri di massa. Dalla comparazione degli spettri di massa ottenuti con quelli presenti nelle banche dati (libreria di spettri) è possibile identificare esattamente i composti.

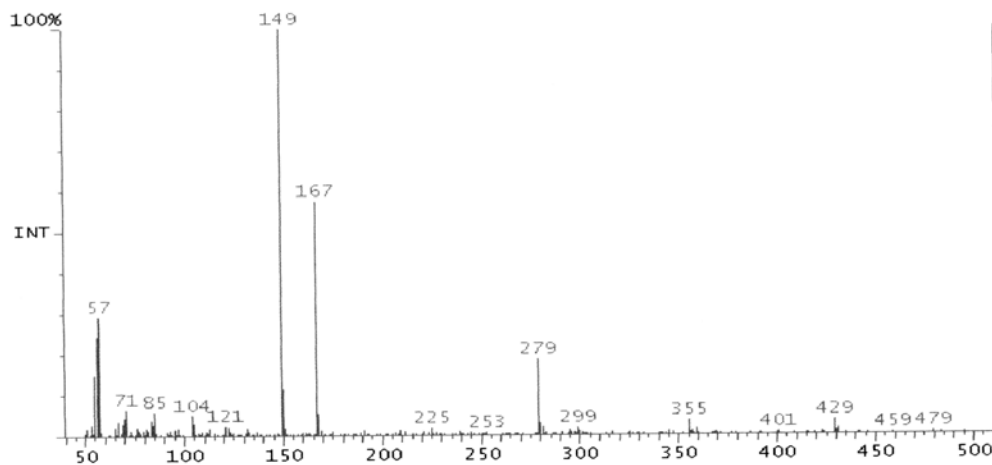


Figura 2.2: Spettro di massa di DEHP

Nello spettro di massa (EI/MS) di DEHP è possibile vedere frammenti caratteristici:

- $m/z = 279$ (M-111, 30%); tale frammento è dovuto alla perdita del residuo alifatico C_8H_{17} nella molecola di DEHP
- $m/z = 167$ (M-223, 58%); tale frammento corrisponde alla perdita dei due residui alifatici presenti nella molecola di DEHP
- $m/z = 149$ (M-241, 100%); tale frammento corrisponde alla perdita di una molecola di H_2O

Nella Figura 2.3 viene riportato un possibile meccanismo di frammentazione del DEHP

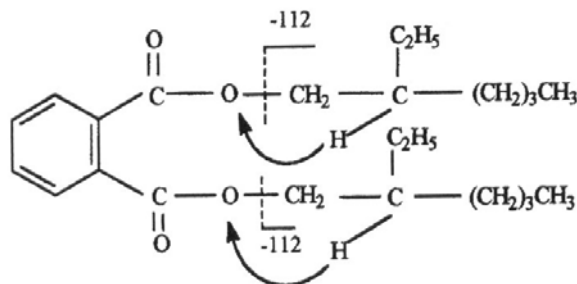


Figura 2.3: Meccanismo di frammentazione di una molecola di DEHP

L'analisi ES/MS è una tecnica analitica di caratterizzazione di composti in soluzione ottenuta mediante elettronebulizzazione (ES).

2.1.1. Risultati dell'analisi gas-cromatografica

Per la preparazione di soluzioni standard, per la costruzione della curva di calibrazione e per la preparazione dei campioni per l'estrazione sono stati usati una soluzione satura di NaCl (per favorire la separazione delle fasi) e acetonitrile (per ottimizzare l'estrazione con esano).

L'errore sperimentale imputabile all'estrazione è 2%.

Dall'equazione della retta di taratura:

$$A = 7.70 \times C + 1.79$$

In cui: A = area sottesa al picco (espressa in 10^4)

C = concentrazione (espressa in $\mu\text{g/ml}$) di DEHP in esano

sono state calcolate le varie concentrazioni di DEHP dei campioni in esame.

Per ogni sacca sono state effettuate due prove con 250 ml.

Per ogni prova sono state eseguite 3 analisi GC/MS e la media delle 6 prove è stata presa come risultato finale.

Nella tabella seguente e nella Figura 2.4 vengono messi a confronto i risultati di campioni sterilizzati in modo diverso, con e senza copri-sacca.

Tabella 2.1: livelli di DEHP presenti nel contenuto delle sacche di PVC

Sterilizzazione	Copri-sacca		A (area sottesa al picco)	DEHP $\mu\text{g/l}$
No sterilizzazione			62.2944 \pm 0.5724	13.56 \pm 0.03
Sifra Est	Si		13.1742 \pm 0.7551	2.96 \pm 0.05
		no	20.3388 \pm 2.9781	4.80 \pm 0.19
Galenica "A"	Si		11.3596 \pm 2.7981	2.48 \pm 0.18
		no	64.7975 \pm 11.7371	15.6 \pm 0.65
Galenica "B"	Si		23.5713 \pm 4.7454	5.64 \pm 0.31
		no	67.6028 \pm 1.387	17.08 \pm 0.08
Ipra	Si		16.1633 \pm 2.1233	3.72 \pm 0.13
		no	24.3928 \pm 1.8422	5.84 \pm 0.11

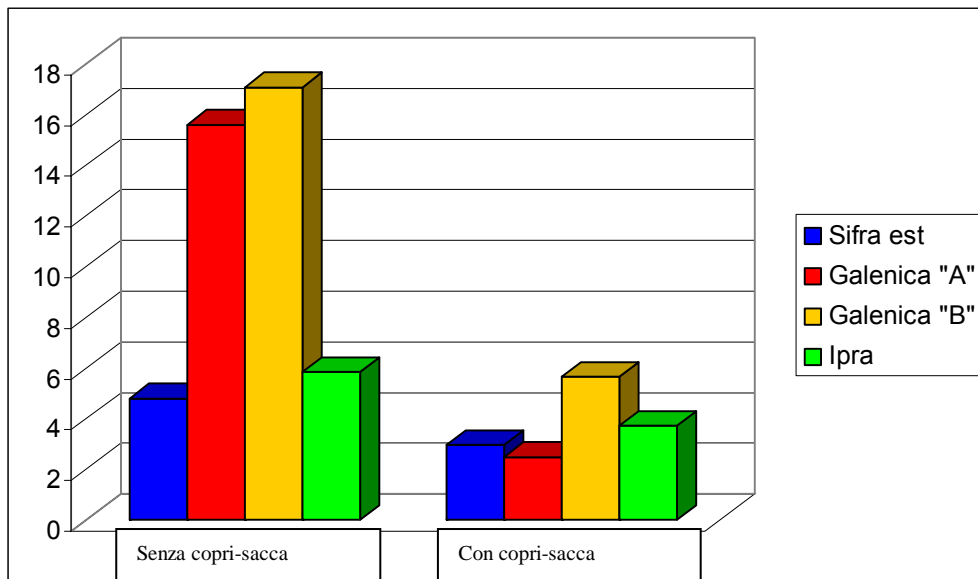


Figura 2.4: Migrazione di DEHP in sacche di PVC sottoposte a diversi cicli di sterilizzazione

Come è possibile vedere dal grafico e dalla tabella, il posizionamento del coprisacca è fondamentale per limitare la migrazione di DEHP nella soluzione. Inoltre è possibile notare anche che le sacche sterilizzate a temperature più alte (Galenica "B") hanno rilasciato una maggior quantità di plastificante.

2.2. Analisi chimiche

In questo caso si è voluto mettere a confronto sacche di PVC plastificato di formulazione "tradizionale" con sacche prodotte con materiale speciale Smart Flat®.

Tabella 2.2

	Limiti	Risultato	
		PVC tradizionale	Smart-Flat
Acidità	0.4 ml	0.2	0.3
Alcalinità	0.8 ml	0.3	0.3
Sostanze riducenti	1.5 ml	0.4	0.5
Assorbanza UV	0.20	0.04	0.03

Dalla Tabella 2.2 risulta evidente come tutti i parametri di tipo chimico rientrano nei limiti previsti dalla Farmacopea Europea 5 Ed. per quanto riguarda il materiale Smart Flat[®] che risulta di pari livello rispetto a una sacca di PVC tradizionale.

2.3. Leakage test

Anche in questo caso, come risulta evidente dai dati riportati nella Tabella 2.3, Smart Flat[®] presenta risultati paragonabili al PVC tradizionale prodotto dall'azienda Sifra Est: ciò significa che la saldabilità di Smart Flat[®] e quindi la sua resistenza alla pressione sono perlomeno uguali a quelle di un PVC plastificato tradizionale.

Tabella 2.3

	Limiti	Risultato	
		PVC tradizionale	Smart-Flat
Campione 1	Nessuna perdita di soluzione	Positivo	Positivo
Campione 2	Nessuna perdita di soluzione	Positivo	Positivo
Campione 3	Nessuna perdita di soluzione	Positivo	Positivo
Campione 4	Nessuna perdita di soluzione	Positivo	Positivo
Campione 5	Nessuna perdita di soluzione	Positivo	Positivo

2.4. Stabilità accelerata

2.4.1 pH

	inizio	1 mese	2 mesi	3 mesi
pH	5,84	4,78	4,65	4,50
Δ pH	/	1,06	1,19	1,34

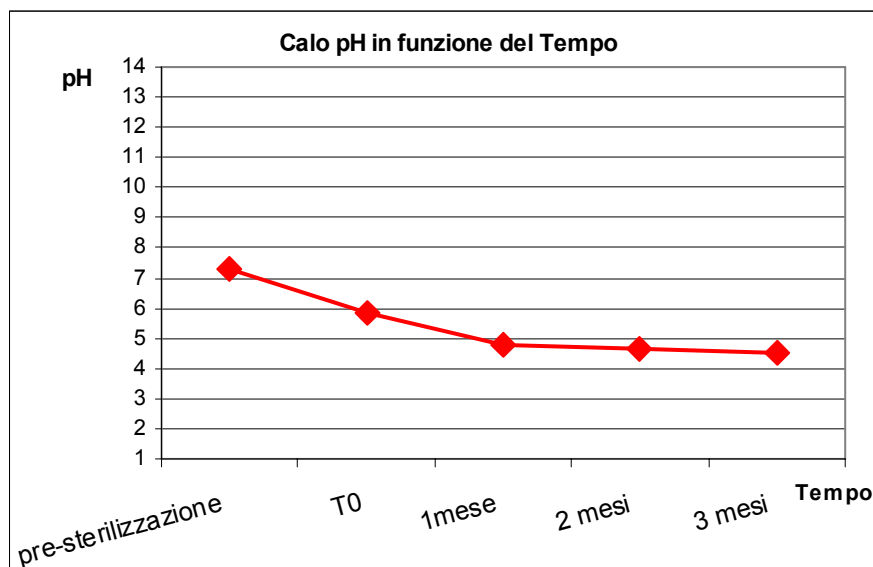


Figura 2.5: stabilità del pH

Dopo un iniziale brusco calo dovuto al processo di sterilizzazione, ritenuto comunque fisiologico quando si considera materiali a base di PVC, il pH tende a stabilizzarsi.

Poiché non esistono limiti specifici che regolamentino il calo di pH accettabile, buona regola è evitare che il pH perda in fase di sterilizzazione più di 2 unità logaritmiche.

Con tale limite, le sacche prodotte con Smart Flat[®] possono essere utilizzate al pari di altri contenitori per uso infusionale.

2.4.2 Calo peso (in grammi)

Inizio	500,72	499,97	500,84	Calo %
1 mese	495.73	/	/	-1.0%
2 mesi	/	492,47	/	-1.5%
3 mesi	/		493,34	-1.8%

Poiché non esistono limiti specifici che regolamentino la percentuale in peso che un contenitore infusionale possa perdere nel tempo, normalmente si adotta un limite posto a 3.0%. In base a tale limite, le sacche prodotte con Smart Flat[®] possono essere utilizzate come normali contenitori infusionali.

2.5. Contaminazione particellare

Vengono qui di seguito messi a confronto i risultati di campioni sterilizzati in modo diverso, con e senza copri-sacca.

		N° Particelle		
Sterilizzazione	Copri-sacca	> 2 μm	> 5 μm	> 10 μm
No sterilizzazione		321.5	11.5	1
Sifra Est	si	557.95	22.91	0.5
	no	402.25	12.25	0
Galenica "A"	si	275.25	10.75	0
	no	348.00	12.08	1
Galenica "B"	si	1012.25	29.25	0
	no	684.00	40.00	0.5
Ipra	si	320.5	9.75	0.8
	no	439.80	11.75	0.3

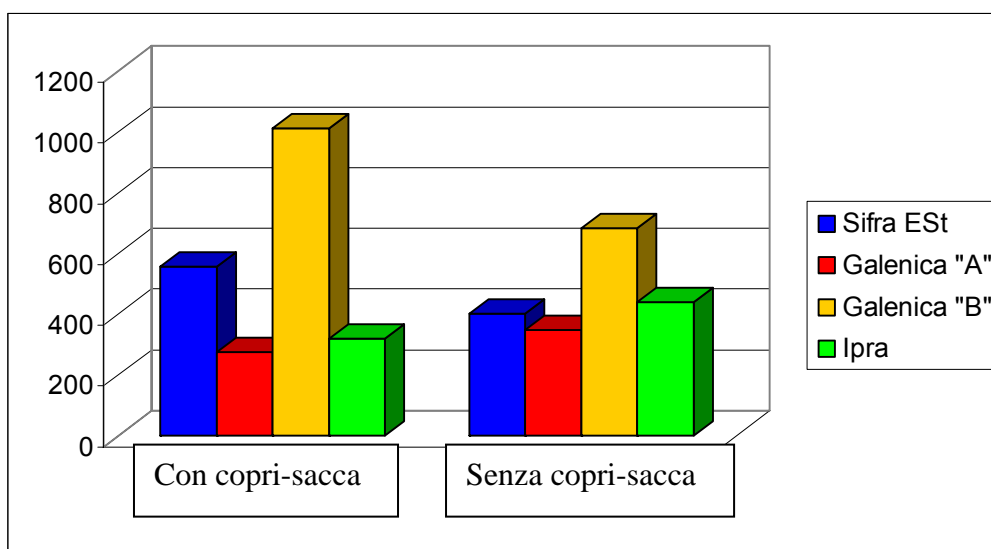


Figura 2.6: livelli di contaminazione di particelle di dimensioni >2 μm

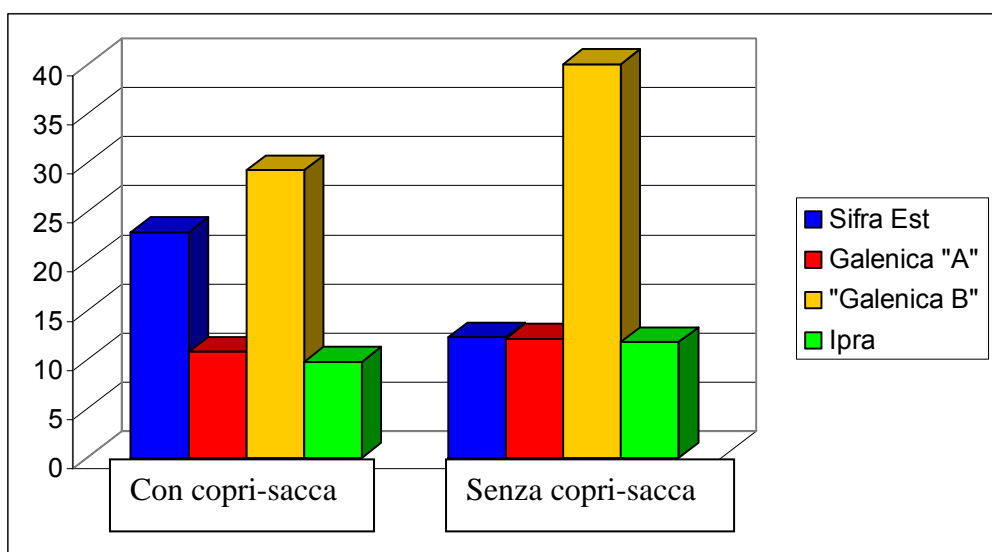


Figura 2.7: livelli di contaminazione di particelle di dimensioni >5 μm

Si è ricercato anche quali potessero essere le interazioni tra il materiale Smart Flat® e soluzioni per la conservazione del sangue umano e sue frazioni.

In questo caso, le sacche, dopo essere state riempite con le diverse soluzioni nei volumi di normale utilizzo, sono state sterilizzate tutte con il medesimo ciclo di sterilizzazione adottato da Sifra Est, sia con che senza copri-sacca. Le analisi sono state ripetute a distanza di uno, due e tre mesi.

I grafici, in scala semilogaritmica, riportati in Figura 2.8 e 2.9 mostrano l'andamento della contaminazione particellare nel tempo.

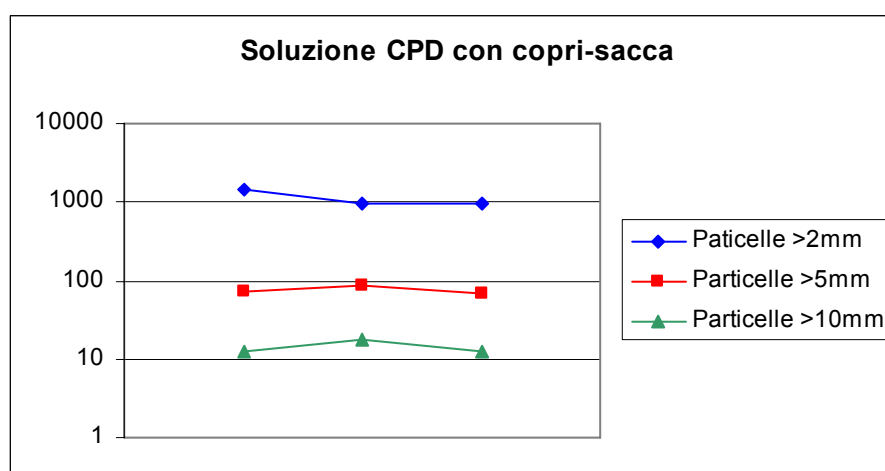


Figura 2.8: contaminazione particellare in soluzione anticoagulante contenuta in sacche sterilizzate con copri-sacca

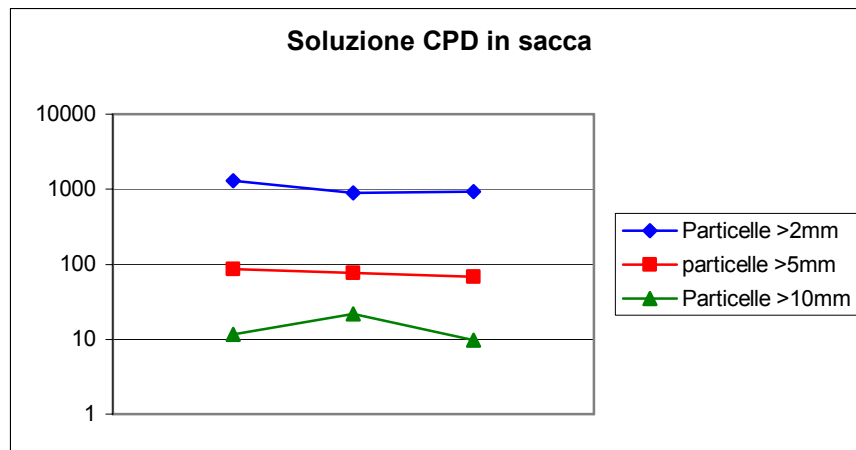


Figura 2.9: *contaminazione particellare in soluzione anticoagulante contenuta in sacche sterilizzate senza copri-sacca*

E' possibile notare come in entrambi i casi le particelle di 10 μm tendano ad aumentare al secondo mese per poi ridiscendere al terzo; cosa analoga si osserva anche con particelle di 5 μm .

Al contrario le particelle di diametro maggiore ai 2 μm , calano progressivamente col passare del tempo.

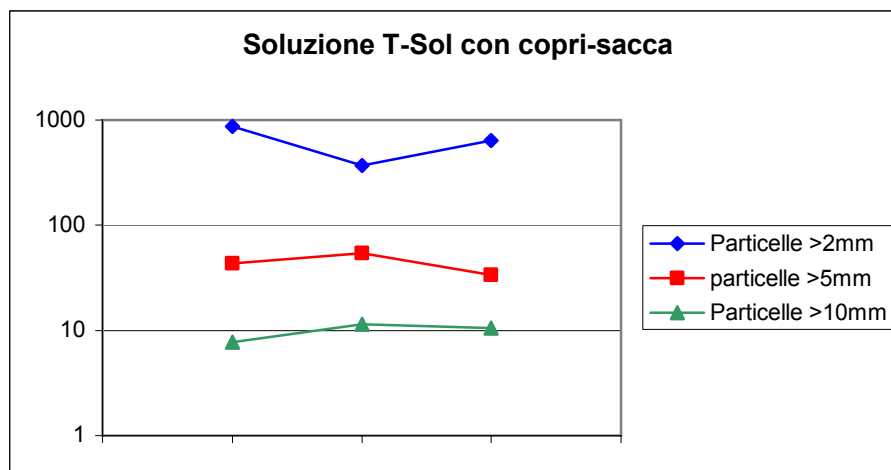


Figura 2.10: *Andamento particellare in sacche sterilizzate con copri-sacche contenenti soluzione T-Sol*

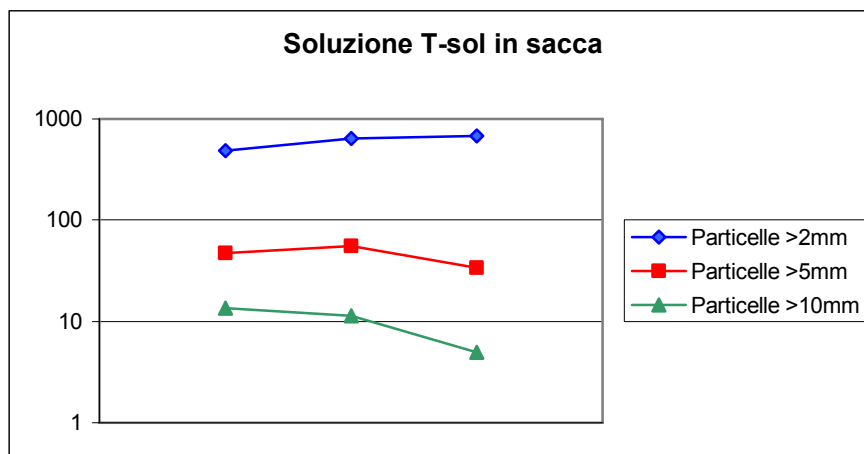


Figura 2.11: *Andamento particellare in sacche sterilizzate senza copri-sacche contenenti soluzione T-Sol*

Anche in questo caso è possibile vedere come particelle più grandi (maggiori di 5 e 10 μm) tendano a scendere con il passare del tempo, mentre si verifica un progressivo aumento di particelle di 2 μm .

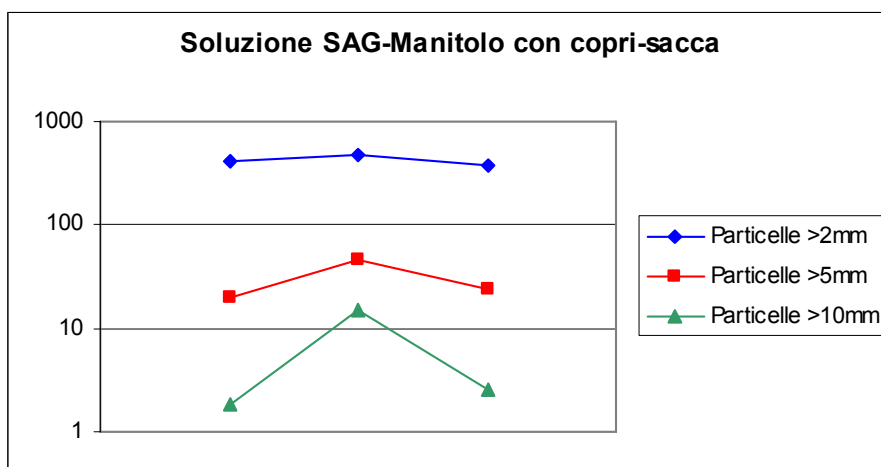


Figura 2.12: *Andamento particellare in sacche sterilizzate con copri-sacca contenenti soluzioni SAG-Mannitolo*

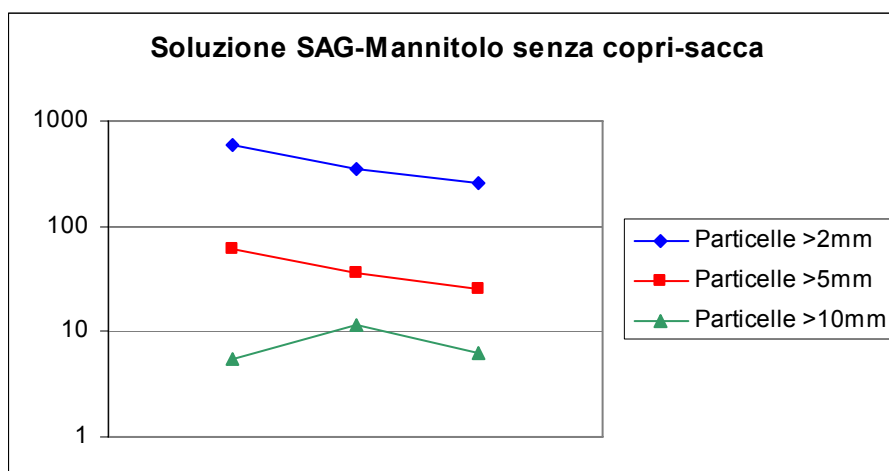


Figura 2.13: *Andamento particellare in sacche sterilizzate senza copri-sacca contenenti soluzioni SAG-Mannitolo*

In questo caso, invece, seppur con un periodo di assestamento attorno al secondo mese notiamo che in generale abbiamo un calo della contaminazione particellare.

2.6. Determinazione della quantità di DEHP estraibile

l prova

Sono state inizialmente preparate delle soluzioni idroalcoliche di DEHP a concentrazione nota (tabella 2.4) per la costruzione della retta di taratura (Figura 2.14), come descritto nel paragrafo 1.13.

Tabella 2.4

Concentrazione (g/100ml)	ASSORBANZA			MEDIA	DEV.STAND
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{media}	
0,01996	0,669	0,674	0,667	0,6700	0,00361
0,00998	0,335	0,339	0,335	0,3363	0,00231
0,00499	0,163	0,161	0,162	0,1620	0,00100
0,001996	0,065	0,065	0,064	0,0647	0,00058
0,000998	0,037	0,036	0,030	0,0343	0,00379

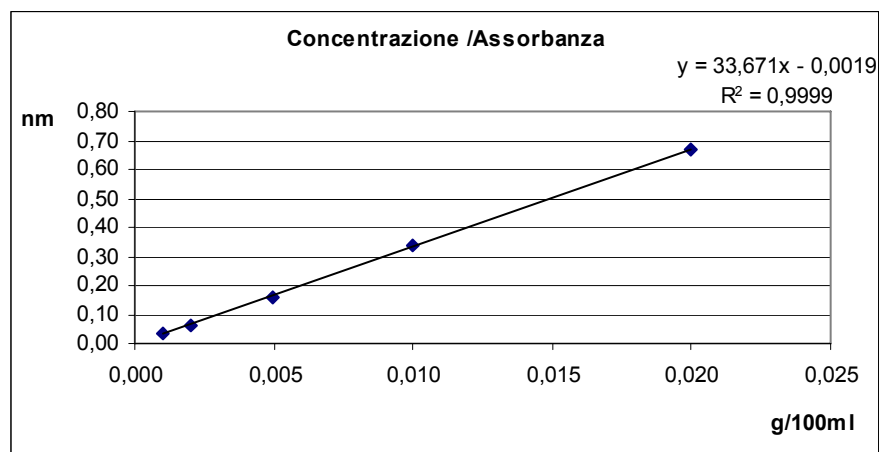


Figura 2.14: retta di taratura per la prima soluzione idroalcolica

Sono state quindi determinate le quantità di DEHP estraibili da sacche di tipo Smart Flat® confrontandole con quelle estraibili da altri due prodotti già in commercio. I risultati sono riportati nella Tabella 2.5 e nella Figura 2.15.

Tabella 2.5

Controllo	A1	A2	A3	Amedia	Dev Stand	C (g/100ml)	Dev Stand.
C1	1,523	1,526	1,519	1,5227	0,0035	0,045	1,61E-04
C2	1,537	1,538	1,54	1,5383	0,0015	0,046	1,02E-04
C3	1,562	1,557	1,558	1,5590	0,0026	0,046	1,35E-04
Siflat							5,64E-05
C1	1,026	1,009	1,008	1,0143	0,0101	0,030	3,57E-04
C2	1,003	1,006	1,009	1,0060	0,0030	0,030	1,46E-04
C3	1,007	1,009	1,001	1,0057	0,0042	0,030	1,80E-04
Smartflat							5,64E-05
C1	1,609	1,616	1,623	1,6160	0,0070	0,048	2,64E-04
C2	1,841	1,846	1,853	1,8467	0,0060	0,055	2,35E-04
C3	1,729	1,741	1,748	1,7393	0,0096	0,052	3,42E-04

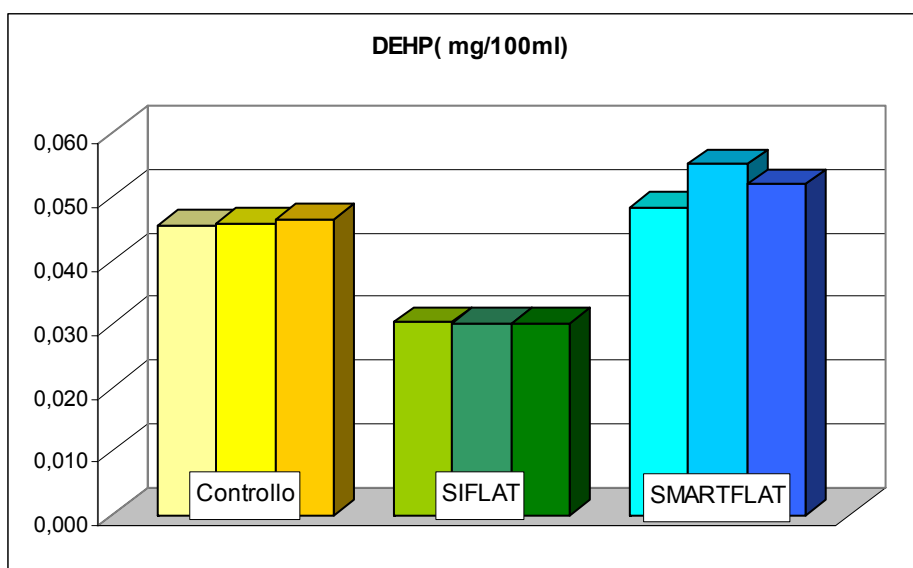


Figura 2.15: *quantità di DEHP rilasciate da diversi tipi di PVC reperibili in commercio*

Sebbene il materiale SmartFlat abbia dimostrato un maggior rilascio di plastificante DEHP in soluzione rispetto al materiale di controllo, rientra comunque nei limiti considerati accettabili.

La prova invece, come risultato inatteso, ha evidenziato come il materiale tradizionalmente prodotto da Sifra Est (Siflat) rilasci significativamente meno plastificante DEHP degli altri due materiali testati.

Il prova

Con lo stesso procedimento precedente è stato determinato il DEHP estratto da una seconda soluzione idroalcolica con concentrazione di alcool minore rispetto alla precedente (come riportato nel paragrafo 1.13).

Tabella 2.6: soluzioni di DEHP per la costruzione della retta di taratura

Concentrazione (g/100ml)	ASSORBANZA			MEDIA	DEV.STAND
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{media}	
0,0202	0,270	0,268	0,269	0,2690	0,00100
0,0101	0,138	0,138	0,144	0,1400	0,00346
0,00505	0,074	0,070	0,071	0,0717	0,00208
0,00202	0,036	0,034	0,034	0,0347	0,00115
0,0010	0,016	0,017	0,018	0,0170	0,00100

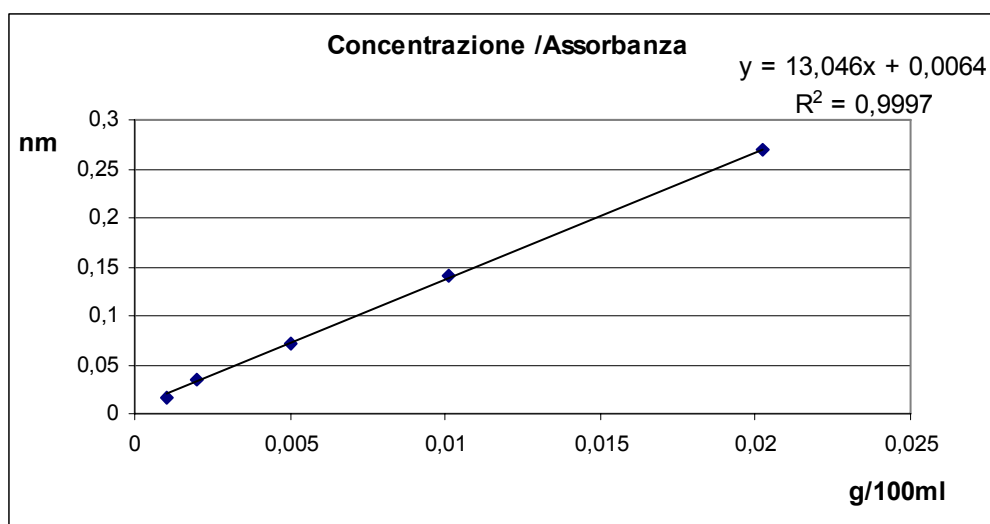


Figura 2.16: retta di taratura per la seconda soluzione idroalcolica

Successivamente sono stati determinati i livelli di DEHP estratti da questa soluzione idroalcolica da sacche di PVC presenti in commercio. I risultati sono riportati nella Tabella 2.7 e nella Figura 2.17.

Tabella 2.7

Controllo	A1	A2	A3	Amedia	Dev stand	g/100ml	Dev Stand
C1	0,14	0,147	0,139	0,1420	0,0044	0,010	-1,56E-04
C2	0,138	0,141	0,144	0,1410	0,0030	0,010	-2,61E-04
C3	0,153	0,154	0,154	0,1537	0,0006	0,011	-4,46E-04
Siflat							
C1	0,174	0,173	0,176	0,1743	0,0015	0,013	-3,73E-04
C2	0,17	0,17	0,171	0,1703	0,0006	0,013	-4,46E-04
C3	0,165	0,164	0,167	0,1653	0,0015	0,012	-3,73E-04
Smartflat							
C1	0,175	0,173	0,176	0,1747	0,0015	0,013	-3,73E-04
C2	0,182	0,181	0,184	0,1823	0,0015	0,013	-3,73E-04
C3	0,198	0,195	0,196	0,1963	0,0015	0,015	-3,73E-04

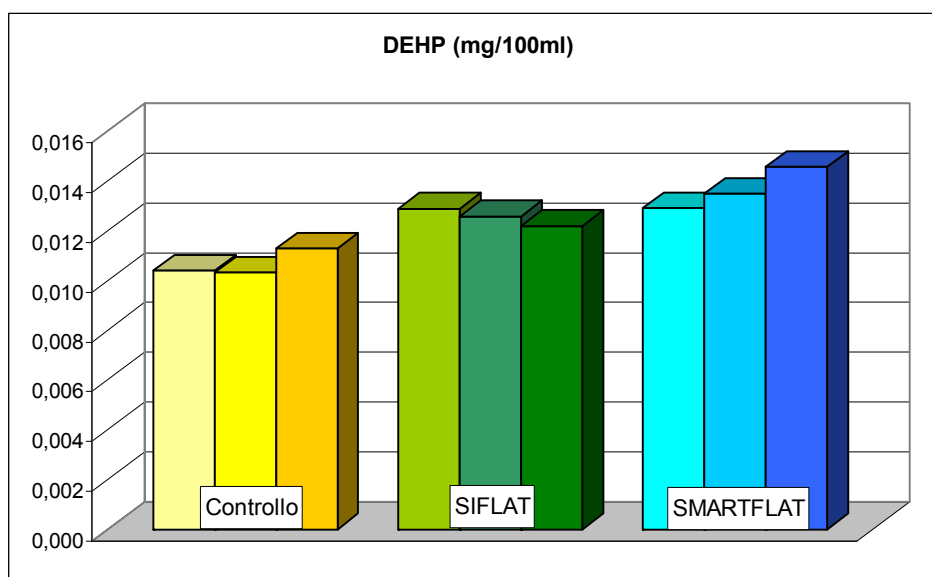


Figura 2.17: quantità di DEHP rilasciate da diversi tipi di PVC reperibili in commercio

In questo caso vediamo che i tre materiali presi in esame non hanno evidenziato significative differenze nella quantità di plastificante rilasciato in soluzione.

2.7 Indagine AFM

L'indagine AFM ha evidenziato una netta differenza di struttura superficiale tra le sacche sterilizzate e quelle non sterilizzate, in tutti i tipi di materiale in esame.

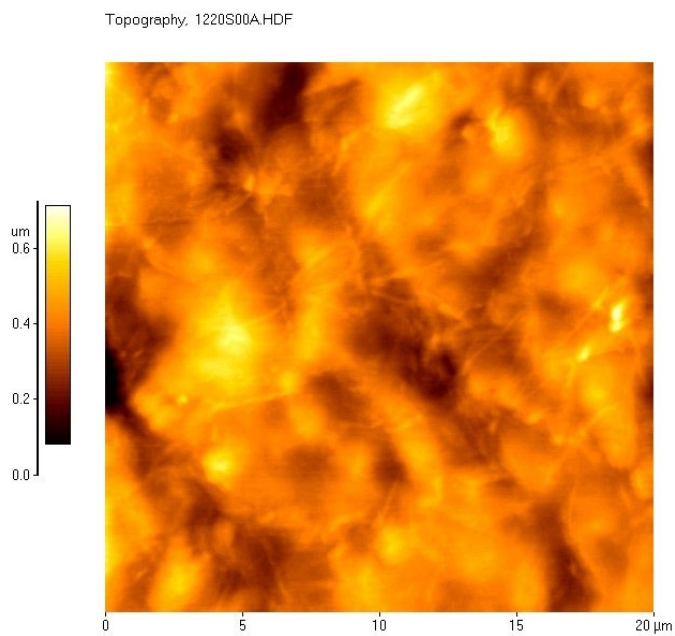


Figura 2.18: immagine AFM di sacche prima della sterilizzazione

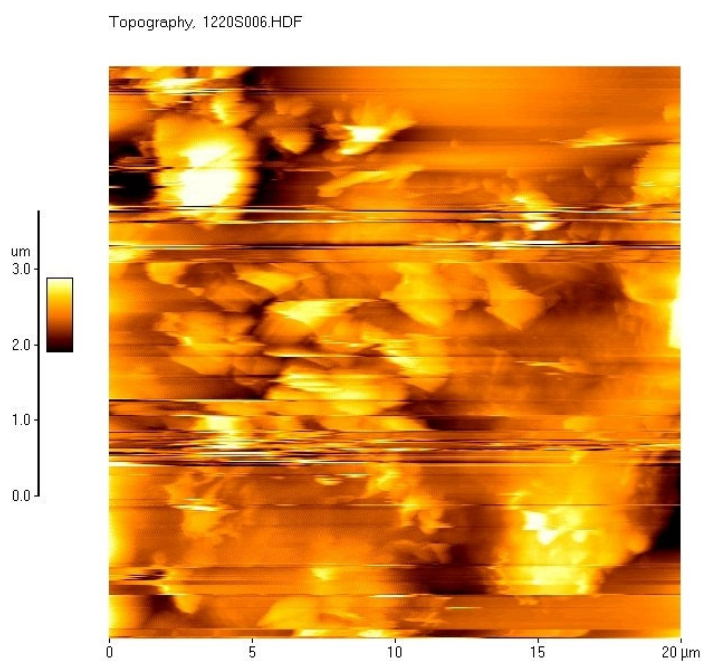


Figura 2.19: immagine AFM di sacche dopo sterilizzazione

Più precisamente, la superficie delle sacche non sterilizzate, caratterizzata da una struttura alquanto omogenea e priva di marcate escursioni avvallamenti-asperità, con fondoscala sull'asse z dell'ordine dei nanometri, diventa una superficie topograficamente molto tormentata, con notevoli escursioni avvallamenti-asperità, con fondoscala sull'asse z dell'ordine dei micron. Addirittura, in alcune zone delle sacche sterilizzate l'alternanza di asperità e depressioni topografiche era tale da superare l'escursione massima (± 3.5 micron) dello scanner, rendendo impossibile l'acquisizione di una immagine topografica. Da un punto di vista qualitativo, la netta diversità della superficie delle sacche sterilizzate rispetto alla superficie delle sacche non sterilizzate è evidente anche ad un esame al microscopio ottico ad elevati ingrandimenti (700x – 1400x): nelle sacche sterilizzate è presente una modifica dell'aspetto superficiale assimilabile visivamente ad una diffusa contaminazione da cristalli "tipo salino" (non eliminabile neanche dopo ripetuti lavaggi con H₂O distillata), assolutamente assente nelle sacche non sterilizzate. E' quindi possibile avanzare l'ipotesi di una marcata differenza tra sacche sterilizzate e non sterilizzate nonostante l'analisi AFM sia stata condotta su un'area limitata (zone massima di scansione di 50 x 50 μ m). Un esame approfondito al microscopio ottico sull'intera area (10 x 10 mm) di ogni campione di sacca analizzato ha confermato tale diversità. Si rende comunque necessaria un'indagine estesa ad un numero più significativo di campioni.

2.8 Indagine tensiometrica

Dall'indagine tensiometrica è apparso che con la sterilizzazione, tutti i tipi di materiali vengono modificati con un aumento della componente polare che è responsabile dell'attivazione di fenomeni di adsorbimento di componenti in soluzione nel liquido introdotto in sacca.

Si nota anche che aumentando la quantità di plastificante DEHP, diminuisce progressivamente l'energia libera di superficie (tabella 2.8 e Figura 2.20).

Tabella 2.8

materiale	CD	CP	ELS
Smartflat DINCH non sterilizzato	26,91	0,63	25,63
Smartflat DINCH sterilizzato	29,99	3,05	32,05
Smartflat DURO non sterilizzato	40,66	1,58	42,24
Smartflat DURO sterilizzato	37,22	3,30	37,92
Smartflat MEDIO non sterilizzato	41,09	0,96	42,05
Smartflat MEDIO sterilizzato	32,34	5,85	31,40
Smartflat MORBIDO non sterilizzato	25,55	0,80	23,67
Smartflat MORBIDO sterilizzato	21,41	5,30	24,51

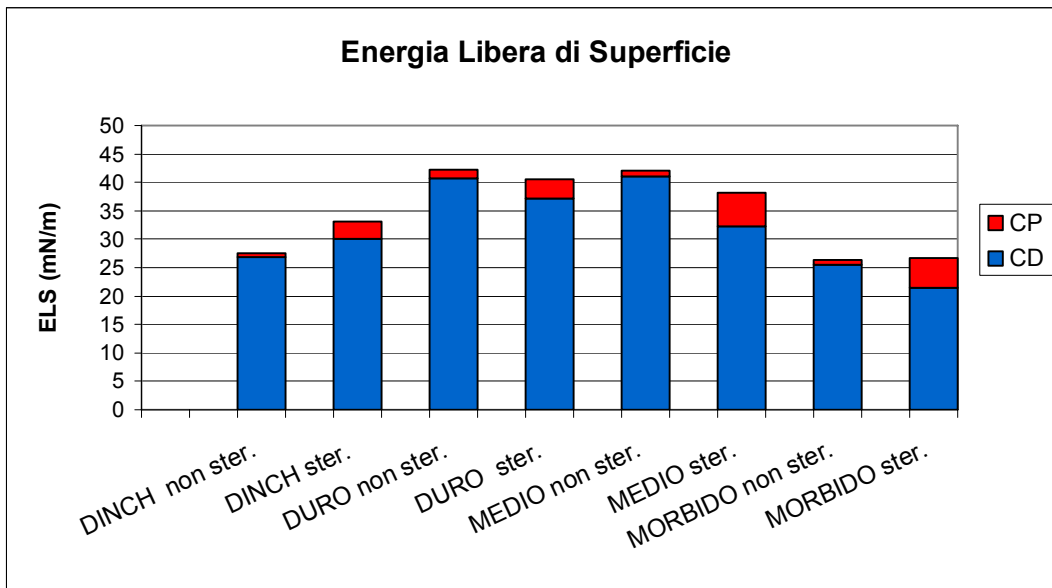


Figura 2.20: Grafico rappresentante l'energia libera di superficie in varie formulazioni di Smartflat

PARTE TERZA

VALIDAZIONE CARATTERISTICHE di BIOCOMPATIBILITA'

1. METODI

1.1 Citotossicità per eluizione (USP XXIV- ISO 10993-5)

Procedimento: delle cellule di tessuto connettivo di topo (BSCL/56 L929) vengono fatte crescere in piastre fino ad ottenere un monostrato quasi confluento. Il terreno è aspirato e sostituito con l'estratto non diluito. Le colture cellulari vengono esaminate dopo 24h di incubazione con l'estratto e viene valutata la presenza/assenza di effetti citotossici prodotti dall'estratto del campione.

Condizioni di estrazione: 60cm² del campione in esame sono stati sottoposti ad estrazione con 20ml di terreno di coltura cellulare MEM a 37+/- 1 °C per 24h.

Reagenti: MEM con sali di Earle's addizionato di siero bovino fetale, L-glutamina e antibiotici.

Controllo positivo: soluzione fenolica 0,5% in fisiologica

Controllo negativo: 4 g di policarbonato trattato come il campione

Incubazione: l'estratto del campione ed i controlli positivi e negativi sono incubati per 48 h a 37 +/- 1 °C in atmosfera al 5% di CO₂ ed esaminati per la valutazione del risultato.

Apparecchiature: termostato a CO₂ (5%), mantenuto a 37 +/- 1 °C;

microscopio ottico a fase inversa;

cappa a flusso laminare sterile; materiali monouso sterili; piastre per culture cellulari

Valutazione degli effetti: esame microscopico delle colture

Interpretazione dei risultati: la citotossicità di estratti liquidi viene misurata mediante esame microscopico delle cellule: vengono valutate la morfologia generale, la presenza di vacuolazione, i distacchi, la lisi cellulare e l'integrità delle membrane. Agli scostamenti rispetto alla morfologia normale viene attribuito un

punteggio da 0 a 4 (Tabella 1.1). Vengono quindi valutate le risposte ottenute dal controllo positivo, dal controllo negativo e dal campione.

Tabella 1.1

Grado	Reattività	Descrizione reattività
0	nessuna	Nessuna cellula danneggiata, discrete granulazione intracellulari, nessuna lisi cellulare
1	bassa	<25% di cellule danneggiate (rotondeggianti, senza granulazioni intracellulari, presenza di lisi cellulare)
2	media	25- 50% cellule danneggiate (rotondeggianti, senza granulazioni intracellulari, presenza di lisi cellulare)
3	moderata	50- 75% cellule danneggiate (rotondeggianti, senza granulazioni intracellulari, presenza di lisi cellulare)
4	forte	75-100% cellule danneggiate (rotondeggianti, senza granulazioni intracellulari, presenza di lisi cellulare)

1.2 Test di impianto muscolare nel coniglio (USP XXIV; ISO 10993-6: test fo local effect after implantation)

Procedimento: in condizioni asettiche sono state eseguite, con un bisturi sterile, 4 incisioni nei muscoli paravertebrali di ciascun coniglio e sono state inserite all'interno le unità del materiale da testare. Sono state eseguite altre 2 incisioni all'interno delle quali sono state poste le unità di controllo negativo. Dopo 7 giorni gli animali sono stati sacrificati con anestetico. E' stata confrontata la reazione tissutale all'impianto del materiale da saggiare con quella dei siti di controllo. Il campione supera la prova se i siti di impianto non presentano emorragia, film o incapsulazione.

Controllo negativo: 10 x 1 mm acciaio inossidabile sterile

Animali: due conigli albini New Zeland del peso di 2,5 kg

1.3 Test di reattività intracutanea nel coniglio (USP XXIV; ISO 10993-10)

Procedimento: 4 estratti liquidi vengono iniettati in un coniglio e gli animali vengono osservati a intervalli regolari per 72h per valutare eritemi, edema e necrosi.

Condizioni di estrazione:

1. 120cm² del campione sono stati estratti con 20ml di una miscela di alcool e soluzione fisiologica salina in rapporto 1 a 20 V/V a 70°C per 24h
2. 120cm² del campione sono stati estratti con 20ml di una miscela di alcool e soluzione fisiologica salina in rapporto 1 a 20 V/V a 70°C per 24h
3. 120cm² del campione sono stati estratti con 20ml di glicole polietilenico 400 a 70°C per 24h
4. 120cm² del campione sono stati estratti con 20ml di olio di sesamo a 70°C per 24h

Controllo Negativo:

1. soluzione fisiologica salina sterile;
2. una miscela di alcool e soluzione fisiologica salina in rapporto 1 a 20 V/V;
3. glicole polietilenico 400;
4. olio di sesamo.

Animali: conigli albini, femmine, tra i 2 e 4 kg, sono stati utilizzati due animali per ogni estratto.

Procedimento: il giorno del test, la pelliccia dell'animale viene pinzata fermamente su entrambe i lati della spina dorsale su un'area sufficientemente larga. Si iniettano in modo intracutaneo 0,2ml di ciascun estratto del campione in 10 siti per ciascuna parte dei due animali. Allo stesso modo, in 5 altri siti di ciascun lato di ciascun coniglio, si iniettano 0,2ml del bianco corrispondente. Si esaminano i siti di iniezione 24, 48, 72 ore dopo l'iniezione e si attribuiscono valori numerici alle osservazioni fatte utilizzando il seguente sistema (Tabella 1.2). Il test viene soddisfatto se la media dei campioni non significativamente maggiore del bianco corrispondente.

Tabella 1.2

Eritema		Edema	
Nessun segno	0	Nessun segno	0
Eritema appena percepibile	1	Edema appena percepibile	1
Eritema ben definito	2	Leggero edema	2
Eritema da moderato a grave	3	Edema moderato (area rigonfia approssimativamente 1mm)	3
Da Eritema grave e leggera formazione di croste	4	Edema grave (area rigonfia più di 1mm ed estesa oltre l'area di iniezione)	4

1.4 Emolisi (ASTM F 756-82; ISO 10993 - 4 Selection of tests for interaction with blood)

Procedimento: il campione in esame viene posto a contatto diretto con un pool di sangue umano intero in condizioni statiche e dinamiche e quindi viene misurato l'aumento dell'emoglobina del plasma mediante la determinazione dell'Indice Emolitico che viene confrontato con un controllo negativo.

Preparazione del campione: 15cm² del campione sono stati posti in contatto diretto col sangue.

1.5 Pirogeni – test per le endotossine batteriche - LAL test

Sostanze pirogene sono endotossine batteriche derivanti da batteri gram-negativi oppure possono avere origine chimica. Il test è concepito per limitare ad un livello accettabile il rischio di reazione febbrile nel paziente in seguito alla somministrazione del prodotto in esame.

Il test si basa sul fatto che batteri Gram positivi provocano la coagulazione per via enzimatica di cellule sanguigne (amebociti) di *Limulus Polyphemus*

Procedimento: il lisato di amebociti di *Limulus* è presente in commercio in fiale monouso; aggiungendo 0,2ml di campione da esaminare ad una fiala monotest: il lisato di amebociti si dissolve completamente dopo circa un minuto e la soluzione viene mescolata bene: a questo punto la fiala viene posta a 37+/-1°C per 60+/-2 minuti. Al termine del periodo di incubazione la provetta viene capovolta di 180°.

Se sul fondo della provetta da saggio si forma un gel, il test è positivo; se invece la soluzione rimane liquida significa che non vi è presenza di endotossine batteriche.

2. RISULTATI

2.1 Citotossicità per eluizione (USP XXIV- ISO 10993-5)

Controllo positivo 1	75-100% cellule danneggiate	4
Controllo positivo 2	75-100% cellule danneggiate	4
Controllo positivo 3	75-100% cellule danneggiate	4
Controllo negativo 1	Nessuna cellula danneggiata	0
Controllo negativo 2	Nessuna cellula danneggiata	0
Controllo negativo 3	Nessuna cellula danneggiata	0
Controllo MEM 1	Nessuna cellula danneggiata	0
Controllo MEM 2	Nessuna cellula danneggiata	0
Controllo MEM 3	Nessuna cellula danneggiata	0
Estratto del campione 1	<25% cellule danneggiate	1
Estratto del campione 2	<25% cellule danneggiate	1
Estratto del campione 3	<25% cellule danneggiate	1
Estratto del campione 4	<25% cellule danneggiate	1
Estratto del campione 5	<25% cellule danneggiate	1

2.2 Test di impianto muscolare nel coniglio (USP XXIV; ISO 10993-6: test for local effect after implantation)

Coniglio	Campione	Reazione all'impianto	Reazione al controllo negativo
1	1	Nessuna reazione	Nessuna reazione
	2	Nessuna reazione	Nessuna reazione
	3	Nessuna reazione	
	4	Nessuna reazione	
2	1	Nessuna reazione	Nessuna reazione
	2	Nessuna reazione	Nessuna reazione
	3	Nessuna reazione	
	4	Nessuna reazione	

Le reazioni del materiale da saggiare non sono state significativamente maggiori rispetto a quelle dei siti di controllo negativo

2.3 Test di reattività intracutanea nel coniglio (USP XXIV; ISO 10993-10)

1) Veicolo di estrazione: soluzione fisiologica salina sterile

tempo	reazione	Siti per il test del campione 1-10	Siti per il controllo 1-5
1h	Eritema	0	0
	Edema	0	0
24h	Eritema	0	0
	edema	0	0
48h	eritema	0	0
	Edema	0	0
72h	Eritema	0	0
	edema	0	0

2) Veicolo di estrazione: soluzione 1 a 20 di alcool in soluzione fisiologica salina sterile

tempo	reazione	Siti per il test del campione 1-10	Siti per il controllo 1-5
1h	Eritema	0	0
	Edema	0	0
24h	Eritema	0	0
	edema	0	0
48h	eritema	0	0
	Edema	0	0
72h	Eritema	0	0
	edema	0	0

3) Veicolo di estrazione: polietilene glicole 400(diluito con 8,3 volumi di sodio cloruro prima dell'iniezione nel coniglio

tempo	reazione	Siti per il test del campione 1-10	Siti per il controllo 1-5
1h	Eritema	0	0
	Edema	0	0
24h	Eritema	0	0
	edema	0	0
48h	eritema	0	0
	Edema	0	0
72h	Eritema	0	0
	edema	0	0

4) Veicolo di estrazione: olio di sesamo

tempo	reazione	Siti per il test del campione 1-10	Siti per il controllo1-5
1h	Eritema	0	0
	Edema	0	0
24h	Eritema	0	0
	edema	0	0
48h	eritema	0	0
	Edema	0	0
72h	Eritema	0	0
	edema	0	0

In condizioni sperimentali il campione incontra i requisiti del test: gli estratti del campione da testare mostrano la stessa reazione del controllo negativo.

2.4 Emolisi (ASTM F 756-82; ISO 10993-4 Selection of tests for interaction with blood)

Contenuto di emoglobina nel pool di sangue: 26,4 mg/ml

	Campione	ABS ⁵⁴⁰ media	Contenuto di emoglobina (mg/ml)	Indice emolitico
Condizioni statiche	Controllo negativo	0,004	0,144	0,547%
	Campione	0,007	0,253	0,957%
Condizioni Dinamiche	Controllo Negativo	0,006	0,217	0,821%
	Campione	0,007	0,2553	0,957%

Il campione è da considerarsi non emolitico in condizioni statiche e dinamiche poiché l'indice emolitico, in entrambi i casi, risulta inferiore al valore limite di 5.

2.5 Pirogeni- test per le endotossine batteriche (USPXXIV)

	Valore limite	Risultato
Controllo negativo		negativo
Controllo positivo		positivo
Controllo inibizione		positivo
Campione	0,2 EU/ml	<0,125IU/ml

Il campione incontra i requisiti del test poiché i valori riscontrati sono risultati essere inferiori ai valori limite previsti.

PARTE QUARTA

VALIDAZIONE COMPATIBILITA' CON IL SANGUE

1. METODI

1.1 Preparazione del plasma

I campioni di plasma utilizzati per questo studio sono stati prelevati da pazienti affetti da policitemia e sottoposti a talasso terapeutico; i concentrati piastrinici sono invece stati ottenuti da donatori sani.

Le unità di plasma sono state ottenute da sangue intero mediante centrifugazione a 3300 rpm per 15 min, senza freno, a 21°C, in centrifuga Hereaus mod Cryofuge 6000i.

Quindi la sacca, prelevata e maneggiata con cura in modo da evitare il rimescolamento delle singole frazioni, è stata alloggiata su uno spremisacca (NPB mod Compomat G4) che comprime il contenitore e invia gli emocomponenti alle sacche satellite normalmente utilizzate per la conservazione. Di qui il plasma viene per metà trasferito alla nuova sacca. Questo procedimento è stato effettuato per 5 prelievi di sangue intero ottenendo così 5 aliquote di plasma conservato in sacche abituali e 5 aliquote conservate in sacche prodotte con Smart Flat®.

1.2 Determinazione dei fattori della coagulazione

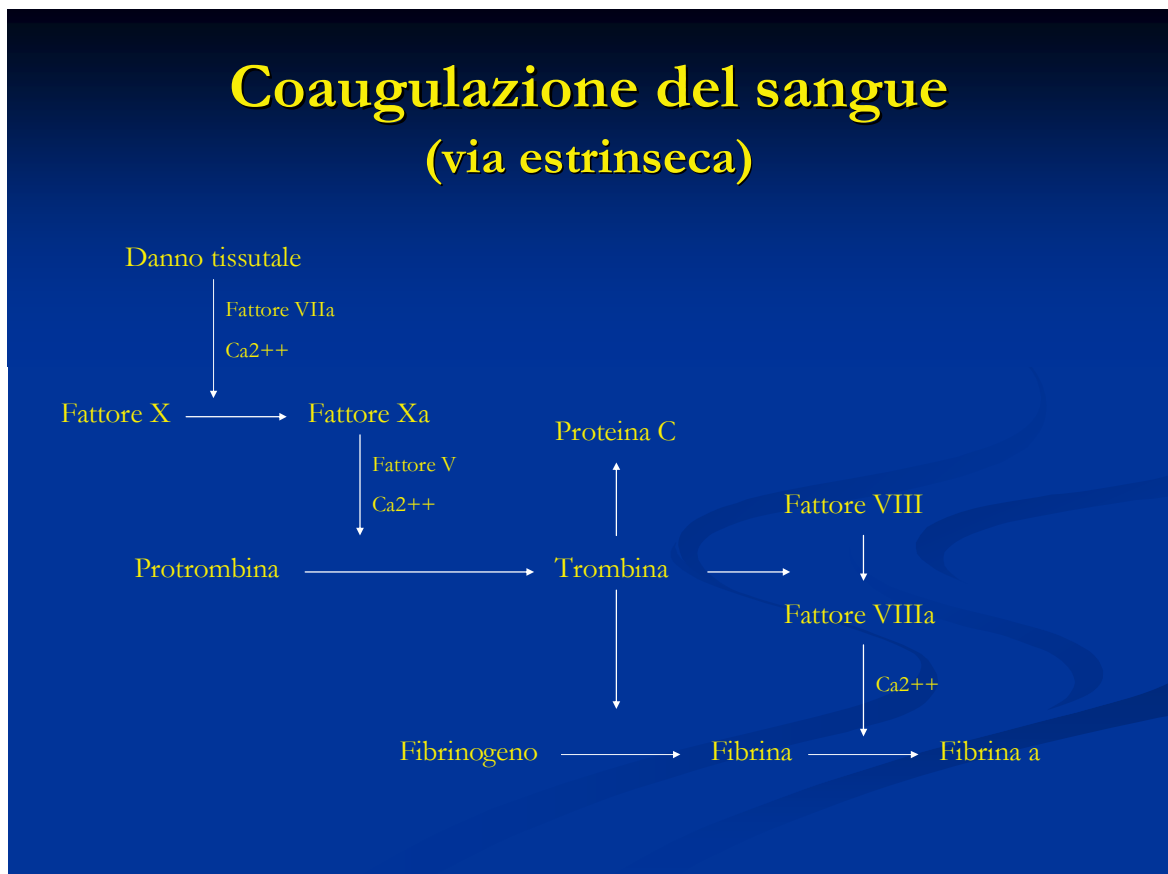


Figura 1.1: Schema della caduta enzimatica per la coagulazione del sangue da cui si evince quali siano i fattori più importanti e quindi quali siano i fattori da monitorare per valutare l'attività coagulativa del sangue conservato.

L'analisi viene effettuata sul plasma appena prelevato e sul plasma conservato sia in sacche tradizionali sia in quelle da testare.

Il dosaggio dei fattori della coagulazione e degli inibitori fisiologici dell'emostasi è stato effettuato con metodica automatizzata sullo strumento Roche Diagnostic, mod Sta-Rack, utilizzando i reattivi STA-Factor II,V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, STA-AT III e LIA-test free protein S.

Il livello di ogni singolo fattore in esame è stato misurato in presenza di un plasma-test depleto dello stesso fattore che si intende esaminare e in costante eccesso degli altri elementi necessari alla coagulazione alla temperatura di 37°C.

Le metodiche usate sfruttano il principio coagulativo ma sono diverse a seconda dei fattori ricercati:

- *Fattori VIII-IX-XI-XII*: il test consiste nella misurazione del tempo di coagulazione in presenza di cefalina e di un attivatore, misurando il tempo di protrombina parziale attivata (aPTT) in presenza di calcio. Il plasma da testare viene diluito ed aggiunto al plasma-test che è carente di uno dei fattori ma in cui tutti gli altri fattori sono presenti in eccesso e le quantità sono note. Il tempo di coagulazione del plasma-test viene quindi "corretto" dalla presenza del plasma da testare in modo proporzionale alla concentrazione (attività %) del fattore in esame nel plasma da testare. L'attività % viene calcolata in riferimento a una curva di taratura di quattro punti diluendo il plasma-test 1:10; 1:20; 1:40; 1:80. Il tempo di coagulazione viene calcolato e i risultati vengono riportati su carta logaritmica dove in ordinata viene riportato il tempo mentre in ascissa viene riportata la corrispondente attività percentuale del fattore. L'attività del fattore in esame viene calcolata estrapolando il tempo di coagulazione sulla curva di calibrazione.
- *Fattori II; V; VII; X*: il test consiste nella misurazione del tempo di coagulazione in presenza di tromboplastina calcica in un sistema formato dalla miscelazione di plasma che si vuol testare con plasma-test in cui sono presenti tutti i fattori coagulativi in eccesso tranne il fattore che si vuol testare. L'aggiunta del plasma da testare al substrato gravemente deficitario di uno dei fattori in esame, corregge la tromboplastina calcica. Il livello dell'attività del fattore nel plasma è direttamente proporzionale alla correzione di tromboplastina calcica. Anche in questo caso, sono state eseguite 4 diluizioni (1:10; 1:20; 1:40; 1:80) per la curva di taratura. Come controlli sono stati utilizzati plasmi liofilizzati del commercio, mentre come riferimento è stato usato un pool congelato di 25 campioni di plasma proveniente da altrettanti donatori sani.
- *Antitrombina*: il campione da testare viene incubato con una quantità in eccesso di trombina, in presenza di eparina. La trombina residua viene quantificata grazie alla sua reazione amidolitica su un substrato cromogenico sintetico che rilascia una para-nitroanilina determinabile colorimetricamente a 405 nm. Poiché la quantità di trombina neutralizzata

nella prima fase di reazione è proporzionale al livello di antitrombina presente nel campione, la trombina residua e inversamente proporzionale al livello di antitrombina del campione.

- *Proteina C*: la proteina C del campione viene attivata con un attivatore specifico da veleno di serpente (Agkistrodon Contortrix). La quantità di proteina C attivata viene determinata con test cinetico, misurando l'aumento dell'estinzione a 405nm, secondo il seguente schema di reazione:



- *Proteina S*: il dosaggio si basa sulla torbidità di una sospensione di microparticelle di lattice sulla cui superficie sono fissati covalentemente degli anticorpi monoclonali specifici in grado di legare la proteina S libera nel plasma da testare. La reazione antigene-anticorpo provoca l'agglutinazione delle microsfele inducendo un aumento della torbidità e quindi aumento di assorbanza del mezzo direttamente proporzionale alla quantità di proteina S libera contenuta nel plasma da testare.

1.3 Preparazione delle piastrine

Attivazione ed adesione piastrinica

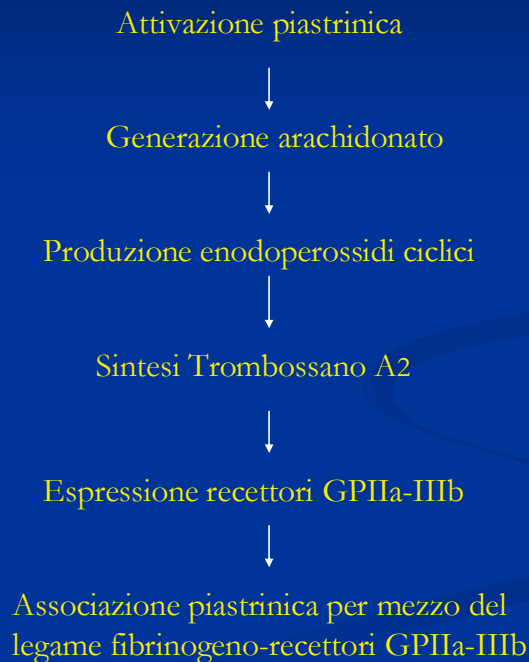


Figura 1.2: *schema riassuntivo del processo di attivazione e adesione piastrinica da cui si evince l'importanza di alcuni recettori di membrana che permettono proprio l'adesione delle piastrine tra loro. Questi recettori di membrana sono molto sensibili e vengono quindi presi come riferimento per valutare la vitalità cellulare.*

I concentrati piastrinici sono stati ottenuti da sangue intero utilizzando uno speciale kit che prevede l'aggiunta di una soluzione conservante additiva T-Sol a base di sodio-citrato, sodio-acetato e sodio-cloruro.

La sacca da raccolta viene posta in centrifuga a 900 rpm per 16min a 20°C, viene quindi alloggiata nello spremi-sacche che consente di trasferire il concentrato attraverso un filtro deleucocitante in modo da separare la sospensione cellulare nelle sacche satellite.

Nel corso di questo studio il concentrato piastrinico è stato diviso in 5 sacche prodotte con il materiale tradizionale e 5 prodotte con Smart Flat®.

Il trasferimento deve avvenire in condizioni di sterilità.

Le sacche vengono conservate in un agitatore a $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

La valutazione della funzionalità piastrinica è stata effettuata il giorno del prelievo, il primo, il terzo e il quinto giorno di conservazione e i parametri rilevati sono stati:

- *Conta piastrinica* mediante contaglobuli automatico
- *Determinazione del pH*
- *Determinazione delle glicoproteine di membrana e del marcatore di attivazione* in citofluorimetria (la sospensione piastrinica fissata per un'ora, viene lavata con 3ml di PBS-EDTA-BSA e quindi centrifugata nuovamente, eliminando il surnatante. Il pellet viene quindi risospeso con PBS in modo da ottenere una conta piastrinica di 100.000 piastrine/ μl . Tale sospensione viene divisa in sei aliquote da 100 μl a cui vengono aggiunti rispettivamente: 3 μl anticorpo isotipico marcato con isocianato di fluorescina diretto contro la porzione GPIIb della GPIIb-IIIa, marcato in verde; 3 μl anticorpo monoclonale murino diretto contro la porzione GPIIIa della GPIIIb-IIIa marcato in rosso; 3 μl di anticorpo monoclonale murino diretto contro la GPIb α marcato in verde; 3 μl di anticorpo monoclonale murino diretto contro la P-selectina marcato in verde. I campioni, dopo incubazione, vengono lavati con PBS-EDTA-BSA e centrifugati; il sedimento viene risospeso con PBS. I campioni così marcati vengono letti da un citofluorimetro.)
- *Dosaggio della glicocalicina* : la glicocalcina è la porzione aminoterminale della GPIIb α piastrinica che viene tagliata da una proteasi plasmatica calcio dipendente – la calpaina – in seguito ad attivazione piastrinica; in questo modo viene generato un frammento di 135 kDa che può essere identificato nel plasma mediante una metodica di tipo E.L.I.S.A. che impiega anticorpi monoclonali di topo specifici per due epitomi sulla proteina.

2. RISULTATI

2.1 Dosaggi sul plasma

I dosaggi dei fattori della coagulazione e degli inibitori fisiologici effettuati sulle sacche di plasma conservate per 30 giorni hanno dato i seguenti risultati:

Analita	Campione basale	Smart Flat®	Materiale tradizionale
Fattore II	115.9 +/- 16.5	108.3 +/- 7.5	115.5 +/- 13.2
Fattore V	125.6 +/- 13.98	119.6 +/- 11.3	122.0 +/- 9.5
Fattore VII	107.7 +/- 12.01	103.0 +/- 24.8	102.5 +/- 19.9
Fattore X	117.0 +/- 28.69	118.2 +/- 31.6	119.0 +/- 33.6

Tabella 2.1: dosaggi su vari fattori plasmatici di sangue contenuto in sacche di materiale tradizionale a confronto con sacche di Smart-Flat

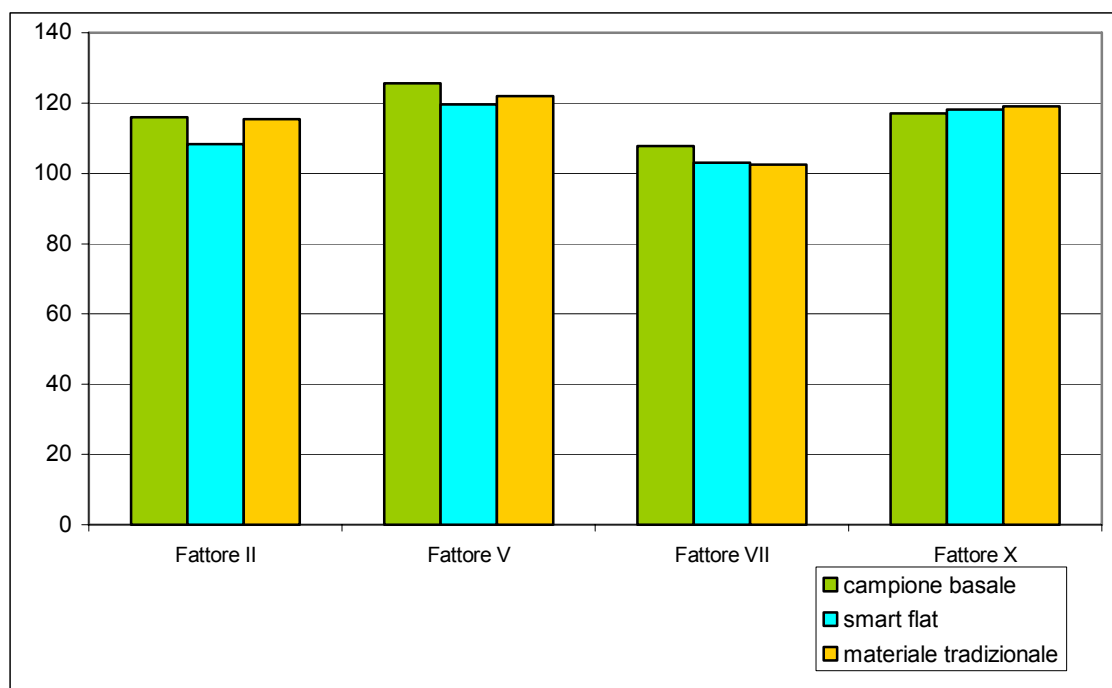


Figura 2.1: andamento dei dosaggi di fattori plasmatici della coagulazione di sangue fresco, conservato in sacche di materiale tradizionale e in sacche Smart-flat

Analita	Campione basale	Smart Flat®	Materiale tradizionale
Fattore VIII	152.8 +/- 20.01	146.4 +/- 12.7	146.5 +/- 15.8
Fattore IX	121.3 +/- 23.58	111.0 +/- 23.6	118.0 +/- 25.1
Fattore XI	101.1 +/- 19.9	98.0 +/- 17.5	83.0 +/- 27.3
Fattore XII	95.3 +/- 9.0	94.8 +/- 15.5	91.6 +/- 13.6

Tabella 2.1: dosaggi su vari fattori plasmatici di sangue contenuto in sacche di materiale tradizionale a confronto con sacche di Smart-Flat

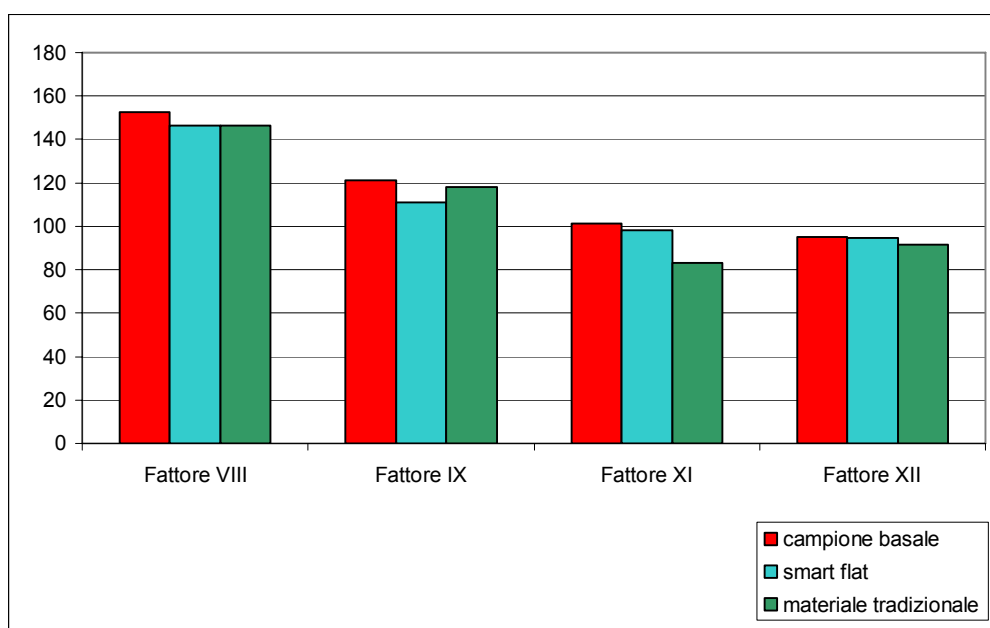


Figura 2.2: andamento dei dosaggi di fattori plasmatici della coagulazione di sangue fresco, conservato in sacche di materiale tradizionale e in sacche Smart-flat

Analita	Campione basale	Smart Flat [®]	Materiale tradizionale
Antitrombina	89.8 +/- 7.62	85.2 +/- 9.1	83.2 +/- 8.5

Tabella 2.3: *dosaggio di antitrombina in sangue fresco, conservato con sacche di materiale tradizionale e conservato con sacche d smart-flat*

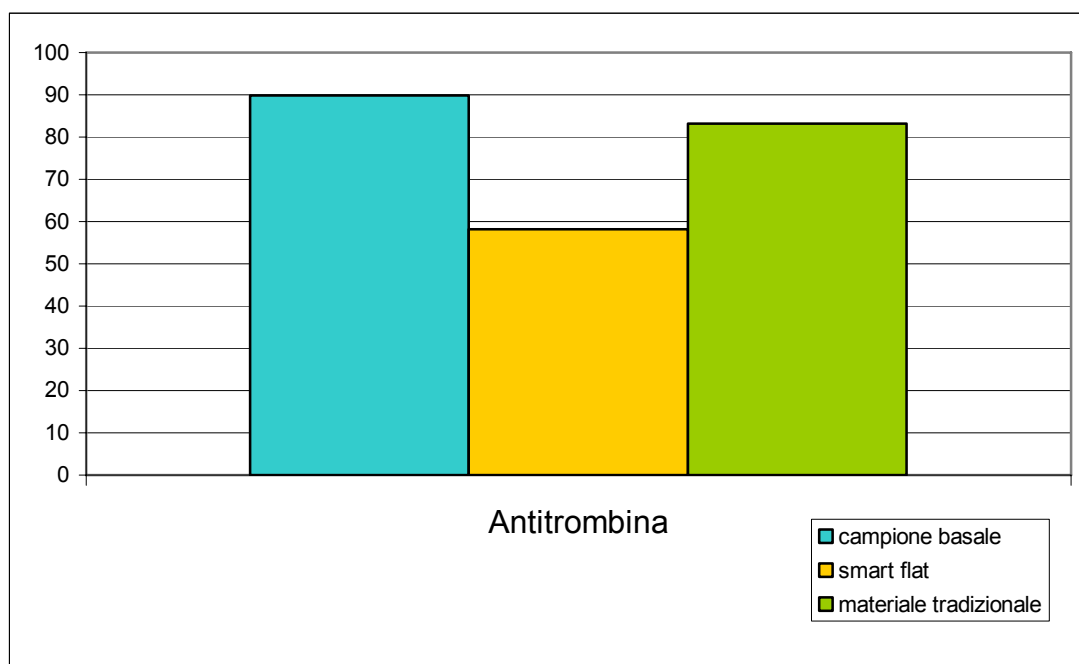


Figura 2.3: *dosaggio di antitrombina in sangue fresco, conservato con sacche di materiale tradizionale e conservato con sacche d smart-flat*

Analita	Campione basale	Smart Flat [®]	Materiale tradizionale
Proteina C	105.3 +/- 19.71	103.0 +/- 14.4	90.0 +/- 19.7

Tabella 2.4 : dosaggio di proteina C in sangue fresco, conservato con sacche di materiale tradizionale e conservato con sacche d smart-flat

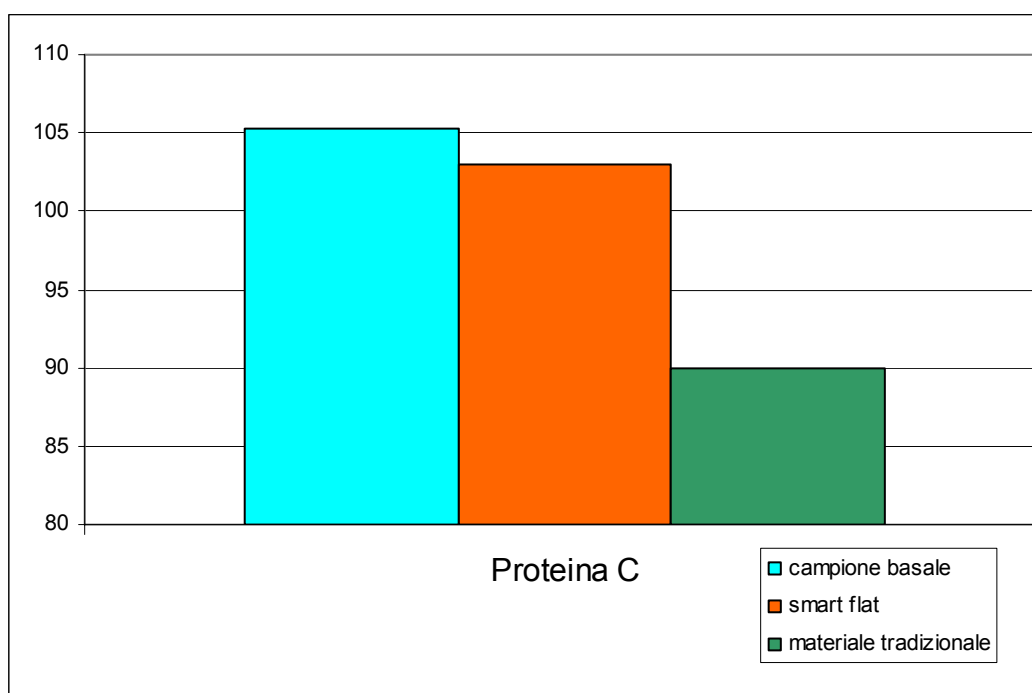


Figura 2.4: dosaggio di proteina C in sangue fresco, conservato con sacche di materiale tradizionale e conservato con sacche d smart-flat

Analita	Campione basale	Smart Flat [®]	Materiale tradizionale
Proteina S	121.5 +/- 21.31	115.4 +/- 32.8	114.2 +/- 30.6

Tabella 2.5 : dosaggio di proteina S in sangue fresco, conservato con sacche di materiale tradizionale e conservato con sacche d smart-flat

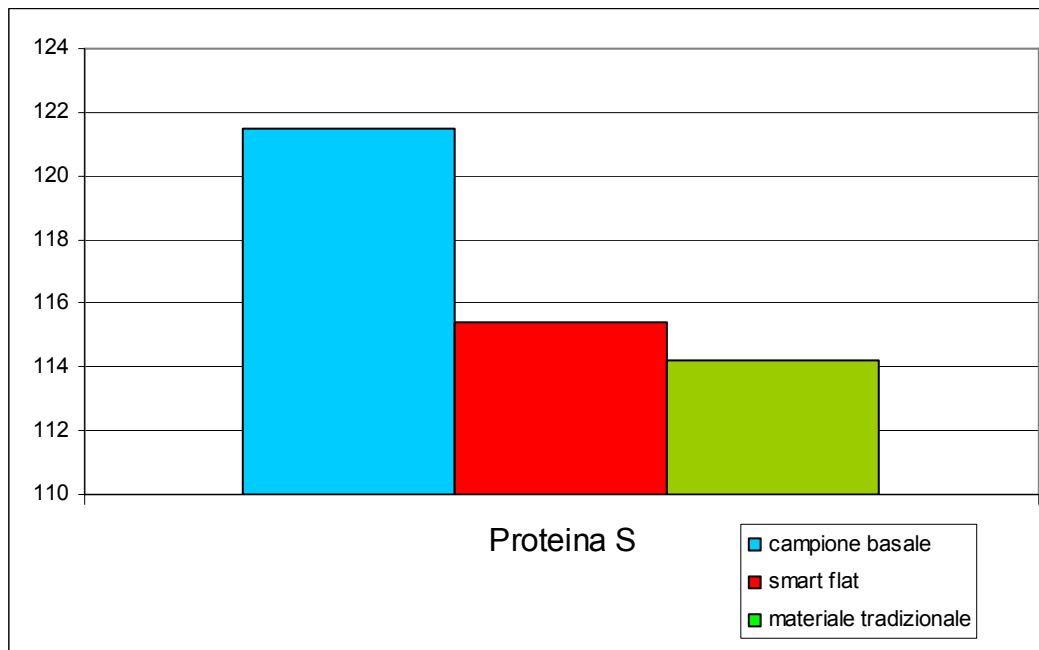


Figura 2.5: dosaggio di proteina C in sangue fresco, conservato con sacche di materiale tradizionale e conservato con sacche d smart-flat

L'analisi effettuata mediante il test τ di Student ha dimostrato che non c'è differenza tra il plasma conservato nelle sacche confezionate con Smart Flat[®] e quello conservato nel materiale tradizionale, sia dal punto di vista delle concentrazioni sia dei singoli fattori che degli inibitori fisiologici della coagulazione.

2.2 Dosaggi sui concentrati piastrinici

2.2.1 Determinazione della conta piastrinica

E' stato determinato il numero di piastrine sul concentrato utilizzato per la suddivisione nelle singole sacche di raccolta e poi sui campioni prelevati da ciascuna sacca ai giorni 1, 3 e 5 di conservazione.

Nel campione basale si è determinato che la conta era 1168×10^3 piastrine/ μl .

I risultati relativi ai concentrati sono espressi come numero medio di piastrine $\times 10^3$ piastrine/ μl +/- deviazione standard e sono riportati nella seguente tabella.

Materiale	1 giorno	3 giorni	5 giorni
Smart Flat®	1132 +/- 57.78	1155 +/- 30.12	892 +/- 105.12
Materiale tradizionale	1118 +/- 122.31	1127 +/- 113.29	849 +/- 212

Tabella 2.6: contenuto piastrinico in sangue conservato per 1,3,5 giorni in materiale tradizionale a confronto con materiale conservato con sacche di Smart-Flat

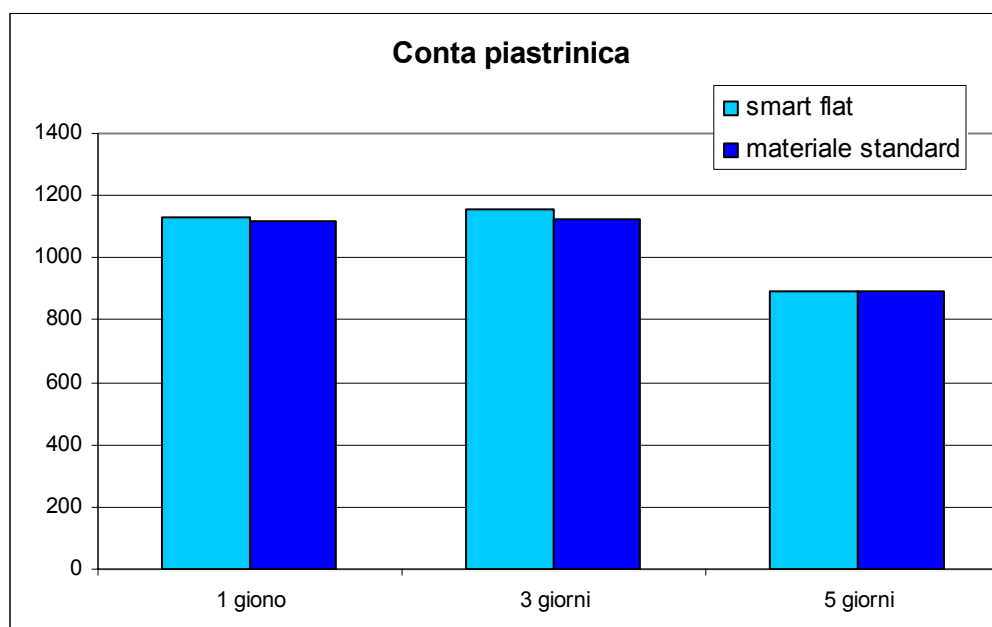


Figura 2.6: conta piastrinica a veri intervalli di tempo di sangue conservato in materiale tradizionale e in Smart-flat

L'analisi statistica effettuata mediante t di Student rivela che non c'è differenza tra i due gruppi di determinazioni.

2.2.2 Determinazione del pH nel surnatante

La misura del pH è stata effettuata con emogasanalisi ed ha dato i seguenti risultati

Materiale	1 giorno	3 giorni	5 giorni
Smart Flat®	7.42 +/- 0.15	7.36 +/- 0.24	7.12 +/- 0.13
Materiale tradizionale	7.24 +/- 0.32	7.21 +/- 0.15	6.94 +/- 0.18

Tabella 2.7: pH del surnatante di sangue conservato per 1,3,5 giorni in sacche di materiale plastico tradizionale a confronto con sangue conservato in sacche di Smart-flat

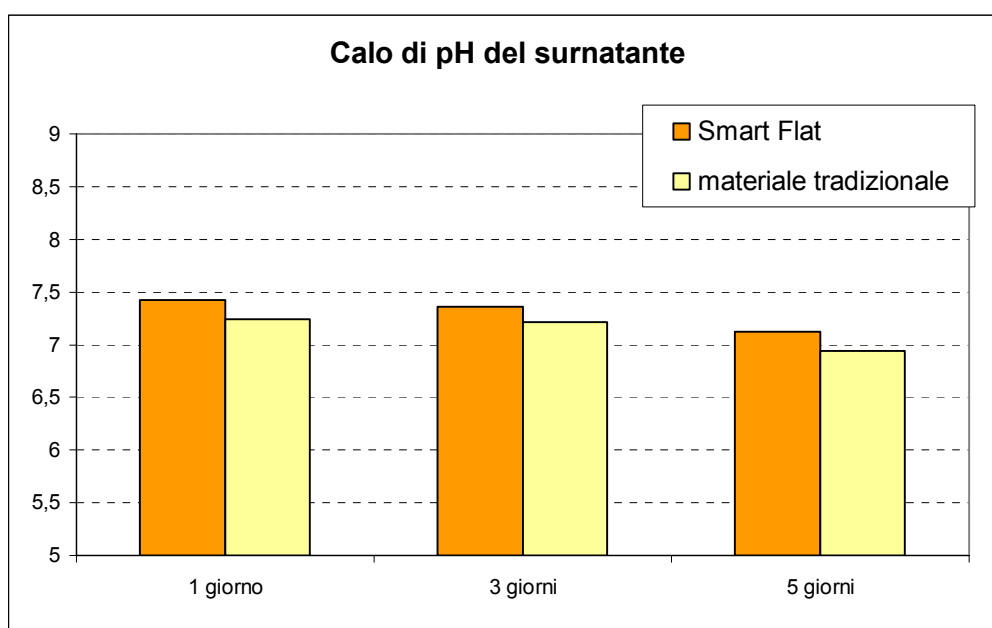


Figura 2.7: pH del surnatante di sangue conservato per 1,3,5 giorni in sacche di materiale plastico tradizionale a confronto con sangue conservato in sacche di Smart-flat

Si nota che il pH delle sospensioni è più elevato e quindi più vicino al valore fisiologico, per le sacche prodotte con Smart Flat® soprattutto quando vengono considerati tempi di concentrazione più lunghi.

L'analisi statistica in questo caso ha indicato un differenza significativa solo al quinto giorno di conservazione.

2.3 Determinazione di proteine di membrana in citometria a flusso

L'analisi a cimometria a flusso è stata rivolta a un marcatore di attivazione piastrinica, la P-selectina, e a due componenti recettoriali di membrana, la glicoproteina GPIb e GPIIb-IIIa che fungono da recettori del fibrinogeno nel processo di adesione piastrinica..

Per ciascun parametro sono stati valutati la percentuale di cellule positive e l'intensità di fluorescenza media.

CD41 PE	1 giorno	3 giorni	5 giorni
Smart Flat®	98.08 +/- 1.51	98.02 +/- 0.73	97.92 +/- 0.36
Materiale tradizionale	97.81 +/- 0.67	96.38 +/-	97.34 +/- 0.87

Tabella 2.8: *valutazione della funzionalità della P selectina dopo 1,3,5 giorni di conservazione in materiale tradizionale e in Smart-Flat*

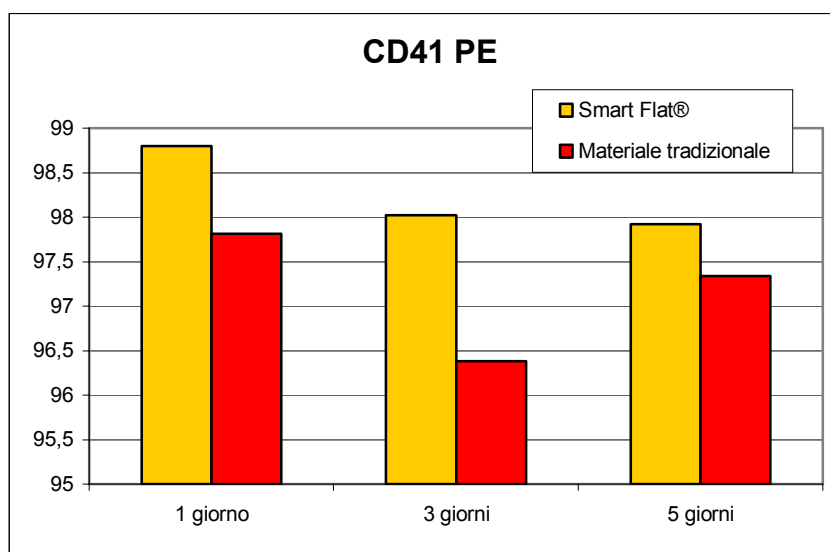


Figura 2.8: *valutazione della funzionalità della P-selectina dopo 1,3,5 giorni di conservazione in materiale tradizionale e in Smart-Flat*

CD42bFITC	1 giorno	3 giorni	5 giorni
Smart Flat®	98.14 +/- 0.34	97.44 +/- 0.27	96.57 +/- 2.00
Materiale tradizionale	96.96 +/- 0.38	97.33 +/- 0.55	97.43 +/- 0.60

Tabella 2.9: *valutazione della funzionalità delle proteine recettoriali di membrana dopo 1,3,5 giorni di conservazione in materiale tradizionale e in Smart-Flat*

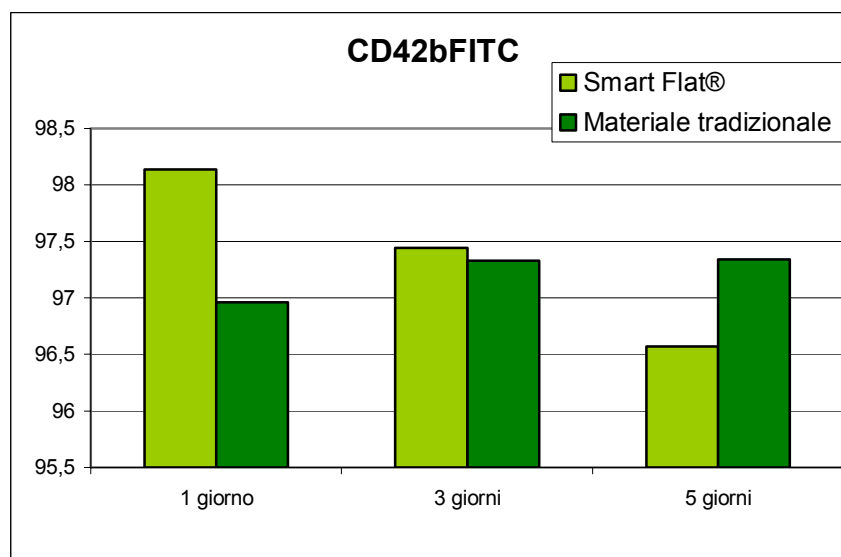


Figura 2.9: *valutazione della funzionalità delle proteine di membrana responsabili della ricezione del fibrinogeno dopo 1,3,5 giorni di conservazione in materiale tradizionale e in Smart-Flat*

CD62 FITC	1 giorno	3 giorni	5 giorni
Smart Flat®	14.14 +/- 2.99	32.26 +/- 6.72	65.26 +/- 8.57
Materiale tradizionale	38.51 +/- 13.45	50.11 +/- 10.49	60.29 +/- 5.86

Tabella 2.10: *valutazione della funzionalità delle proteine recettoriali di membrana dopo 1,3,5 giorni di conservazione in materiale tradizionale e in Smart-Flat*

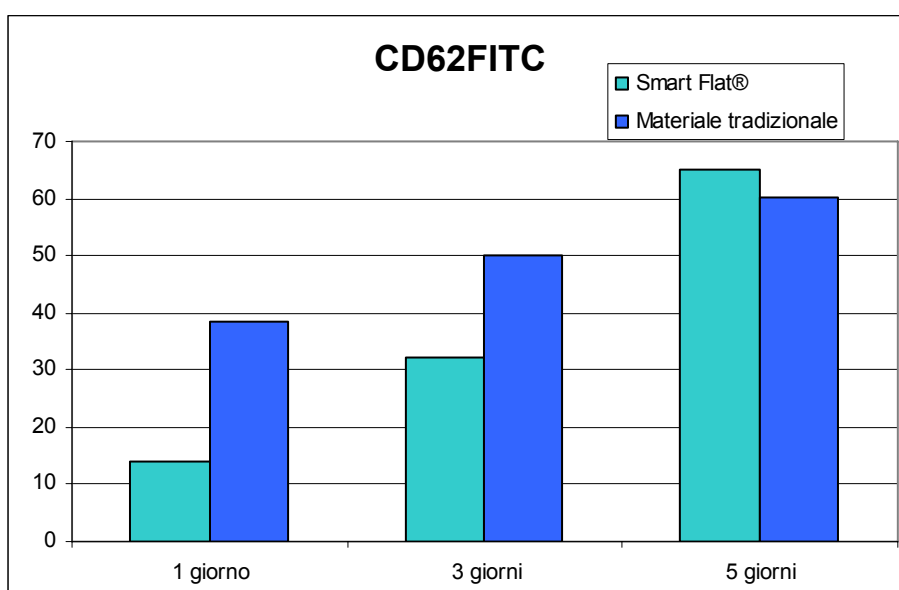


Figura 2.10: *valutazione della funzionalità delle proteine di membrana responsabili della ricezione del fibrinogeno dopo 1,3,5 giorni di conservazione in materiale tradizionale e in Smart-Flat*

L'analisi di questi dati ha rivelato che, mentre l'espressione delle glico-proteine di membrana GPIb e GPIIb-IIIa risulta sovrapponibile in entrambi i tipi di sacca, l'espressione della P-selectina è diversa già al primo giorno di conservazione, continua ad esserlo al terzo e diventa paragonabile solo dopo 5 giorni: ciò sta ad indicare la più pronta attivazione delle piastrine conservate nelle sacche in uso rispetto a quelle contenute nei contenitori prodotti con Smart Flat®.

Questo risultato è correlato con quanto visto per la glicocalcina che risulta incrementato già da subito testimoniando l'attivazione cellulare che porta al rilascio nel surnatante di questo frammento della GPIIb α .

CONCLUSIONI

Scopo di questo studio era l'identificazione di un nuovo materiale plastico destinato all'uso di sacche per sistemi per dialisi peritoneale: tale materiale doveva quindi non collabire anche quando sterilizzato in autoclave mediante calore umido e doveva essere per tanto satinato ma pur sempre dotato di una finestra trasparente che permettesse l'ispezione della soluzione che, a trattamento dialitico terminato, viene raccolta proprio all'interno di queste sacche. Ovviamente data l'applicazione a cui era destinato, il materiale doveva rispondere ai requisiti delle norme vigenti in materia di materiali per uso medico ed avere buone caratteristiche di biocompatibilità.

La messa a punto della formulazione del materiale ha richiesto qualche aggiustamento iniziale sia dal punto di vista del processo che nella percentuale di materie prime impiegate al fine di ottenere il giusto rapporto satinatura-funzionabilità, sempre tenendo sotto controllo la possibilità di una produzione industriale su larga scala e che mantenesse contenuti i costi in modo da rendere questo materiale quanto più utilizzabile possibile.

I vari test relativi alla caratterizzazione fisico-chimica del materiale, si sono svolti secondo il programma prestabilito, confermando la natura di Smart Flat[®] come stabile sia dopo sterilizzazione che con il passare dei mesi (dati ottenuti mediante studi di stabilità accelerata); il rilascio di plastificante è risultato essere paragonabile a quello dei prodotti a base di PVC plastificato già in commercio allontanando quindi ogni possibile dubbio riguardo eventuali tossicità correlate; tutti i test prescritti dalla normativa vigente relativi alla natura chimica del materiale, quali acidità ed alcalinità della soluzione in esso contenuta, sostanze

riducenti e assorbanza UV, rientrano nei limiti previsti ed aprono quindi la via alla vendita del materiale in studio nei settori dell'industria farmaceutica.

Gli studi sulla biocompatibilità come la citotossicità cellulare, l'impianto nei conigli, la reattività intracutanea, hanno dato esiti incoraggianti dimostrando che il materiale risulta inerte nei confronti dei tessuti biologici.

I buoni risultati ottenuti sia sulla caratterizzazione che sull'aspetto estetico di Smart Flat[®] hanno fatto pensare ad un possibile utilizzo di tale materiale per la produzione di sacche destinate alla conservazione del sangue umano e delle sue frazioni: infatti proprio la finestra trasparente di cui è stato dotato rappresenta un elemento di grande innovazione poiché rende la separazione del plasma dalla parte corpuscolata del sangue molto efficace rispetto ai materiali tradizionalmente usati che sono totalmente opachi e quindi non permettono una chiara visione del sangue separato nei suoi vari componenti dopo centrifugazione.

E' stato quindi necessario verificare dapprima eventuali interazioni del materiale con le soluzioni anticoagulanti normalmente impiegate per la conservazione del sangue (SAG manitolo, CPD, T-Sol): a tali test Smart Flat[®] è risultato inerte; si è quindi potuti passare nel terzo anno di studio a test relativi alla funzionalità sanguigna: in particolare si è esaminata la capacità coagulativa del sangue, dopo conservazione e stoccaggio nel nuovo materiale e si è visto che Smart Flat[®] non altera la funzionalità degli enzimi responsabili della coagulazione e in alcuni casi ha dato addirittura dimostrazione di favorire la vitalità cellulare per un tempo più lungo rispetto ai materiali tradizionalmente impiegati.

BIBLIOGRAFIA

1. Latini G., "Monitoring phthalate exposure in humans", *Clinica Chimica Acta* 361; 20-29 , 2005
2. *Materie Plastiche ed Elastomeri* 01/1999- Giuseppe Bonacina
3. Lorz PM, Towae FK, Enke W, Jackh R, Bhargava N, "Phthalic acid and derivatives", *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*, Weinheim: wiley-VCH, 2002
4. Koch HM, Rossbach B, Drexler H, Angerer J., "International exposure of the general population to DEHP and other phthalates determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine", *Environ Res* 2003;93: 177-185
5. Adibi JJ, Perera FP, Jedrychowski W., et Al, "Prenatal exposure to phthalates among women in New oork City and Krakow, Poland", *Environ Health Perspect* 2003; 111; 1719-1722
6. Lakshimi S, Jayakrishnan A. Migration resistant, blood- compatible plasticized PVC for medical and related applications. *Artificial Organs*. 1998;22(3):222-9
7. Singh AR, Lawrence WH, Autian J. "Teratogenicity of phthalate esters in rats", *J Pharm Sci*. 1972;61:51-5
8. Huber, W. W., Grasi-Kraupp, B., Schulte-Hermann, R, "Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications on human risk", *Critical Reviews in Toxicology*, 26 (4), 365-481-1996
9. Roh J.Y., Jung I.H., Lee J. Y., Choi J., "Toxic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on mortality, growth, reproduction and stress-related

gene expression in the soil nematode Caenorhabditis elegans”, Toxicology 237 , 126-133 - 2007

10. Kluwe WM, McConnell EE, Huff JE , et al. “*Carcinogenicity testing of phthalate esters and related compounds by the National Toxicology Program*” Environ Health Perspect. 1982;45:129-33.
11. Peters JW, Cook RM. “*Effect of phthalate esters on reproduction in rats*”, Environ Health Perspect. 1973;3:91-4
12. Tickner J., Schettler T., Guidotti T., Mc Cally M., Rossi M., “*Health risks posed by use of di-2-ethylhexyl phthalate in PVC medical devices: a critical review*”, Am.j.Ind.Med. 39,100-111
13. Lovekamp-Swan T, Davis BJ, “*Mechanism of phthalates esters toxicity in the female reproductive system*” Environ Health Perspect 2003; 111: 139-146
14. Sharpe RM” *Hormones and testis development and the possible adverse effect of environmental chemicals*”, Toxicol Lett 2001; 120; 221-232
15. Hoyer PB, “*Reproductive toxicology: current and future directions*” Biochem. Pharmacol 2001; 62:1557-1564
16. Park JD, Hebeebu SS, Klaassen CD, “*Testicular toxicity of DEHP in young Sprague-dawley rats*”, Toxicology 2002; 171 82-3); 105-115
17. Needham LL; Patterson DG Jr, Barr DB, Grainger J, Calafat AM, “*Uses of speciation techniques in biomonitoring for assessing human exposure to organic environmental chemicals*” Anal. Bio-anal. Chem !2005; 381; 397-404

18. Angerer L. editor, "*Biological monitoring-prospects in occupational and environmental medicine*", Weinheim; Wiley VCH, 2002
19. Dockets Management Branch Food and Drug Administration Department of Health and Human Services, "*Citizen Petition before the United States food and Drug Administration*", 14 June 1999
20. National Toxicology program, center for the Evaluation of Risk to Human Reproduction. NTP-CERHR expert panel Report on di-(2-ethylhexyl)phthalate. Alexandria, VA; Center for the Evaluation of Risk to Human Reproduction , US Department of Health and Human Services, 2000-available at: <http://cerhr.niehs.nih.gov/news/index.html>
21. Koch HM, Drexler H, Angerer J, "*An estimation of the daily intake of DEHP and other phthalates in the general population*", Int J Hyg environ health 2003; 206: 77-83
22. CSTEE (Scientific Committee for toxicity; Ecotoxicity and the Environment); "*Opinion on phthalate migration from soft PVC toys and child-care articles +/-opinion expressed at the 6th CSTEE plenary meeting*", Brussels, 26/27 November 1998
23. Cody T.G., "*Innovating for Health*", Deerfield, IL: Baxter International, 1994
24. Szycher M., "*Biostability of Polyurethane Elastomers: A Critical Review*," Blood Compatible Materials and Devices -Lancaster, PA: Technomic, 1991
25. Boggs D, "*Flexible collapsible blood freezing containers*", U.S. Pat. 4,112,989, 1978
26. Gajewski H., "*Clear, autoclavable plastic formulation free of liquid plasticizers*", U.S. Pat. 4,140,160, 1979

27. Sunny M.C., Ramesh P., George K.E., "*Effect of partial replacement of di-2-ethylhexyl phthalate by a polymeric plasticizer, on the permeability and leaching properties of poly-vinyl chloride*"
28. Van Dooren AA. "*PVC as pharmaceutical packaging material*". Pharmaceutisch Weekblad. Scientific Edition. 1991;13(3):109-18
29. Bagel-Boithas S. ; Sautou-Miranda V. ; Bourdeaux D. ; Tramier V. ; Boyer A. ; Chopineau J , "*Leaching of diethylhexyl phthalate from multilayer tubing into etoposide infusion solutions*", Am. j. health-syst. pharm. 2005, vol. 62, n°2, pp. 182-188
30. Roksvaag P.O, Rydstrom P., Smistad G. waaler T., "*The mechanism of particulate contamination in soft polyvinyl chloride infusion fluid bags*", Acta Pharm Nord 1990;2(5):319-26
31. "*Scopriamo insieme il PVC*", edizioni Tecniche Assoplast- 1988
32. Materie Plastiche ed Elastomeri 01/1999- Giuseppe Bonacina
33. Baccaredda Boy M., "*Materie plastiche ed elastomeri*", Casa Editrice Ambrosiana Milano 1976
34. ATSDR, "*Toxicological profile for di(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP)*", U.S. Departement of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for toxic Substances and Disease Registry, Atlanta , GA 2002
35. Titow W.V. "*PVC Technology*" IV ED, Springer 1984
36. Titow W.V. "*PVC Technology*" IV ED, Springer 1984
37. Materie Plastiche ed Elastomeri 01/1999- Giuseppe Bonacina
38. Wypych G., "*Handbook of plasticizers*", William Andrew Inc, 2004

39. Hanawa T., Muramatsu E., Asakawa K., Suzuki M., Tanaka M., Kawano K., Seki T., Juni K., Nakajima S., "Investigation of the release behaviour of DEHP from polyvinyl-chloride tubing for intravenous administration", *Int. J. Pharm.* 210, 109-115, 2000
40. Ito R., Seshimo F., Haishima Y., Hasegawa C., Isama K., Yagami T., Nakahashi K., Yamazaki H., Inoue K., Yoshimura Y., Saito K., Tsuchiya T., Nakazawa H., "Reducing the migration of di-2-ethylhexyl phthalate from polyvinyl chloride medical devices", *Int. Jour. Pharm.* 303, 104-112, 2005
41. Albro PW, Thomas R, Fishbein L., "Metabolism of DEHP by rats: isolation and characterization of the urinary metabolites" *J. Chromatogr* 1973; 76:321
42. Baccaredda Boy M., "Materie plastiche ed elastomeri", Casa Editrice Ambrosiana Milano 1976
43. Lattimer R.P., Kroenke W.J., "the formation of volatile pyrolyzates from poly-(vinylchloride)", *J Appl Polym Sci* 25, 101-110, 1980
44. Gonzales-Ortiz L., Arellano M., Sanchez-Pena M.J., Mendizabal E., Jassogastinel C.F., "Effects of stearate preheating on the thermal stability of plasticized PVC compounds", *Polymer Degradation and Stability* 91, 2715-2711 (2006)
45. Pearson SD, Trissel LA. "Leaching of DEHP from PVC containers by selected drugs and formulation components", *Am J Hosp Pharm.* 1993;50(7):1405-9
46. Gokal R., Nolph K.D., "Textbook of peritoneal dialysis", Ed Springer, 2000

