

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria dei Processi Industriali
Corso di Laurea in Ingegneria Chimica



SVILUPPO DI NANOPARTICELLE POLIMERICHE PER IL PASSAGGIO DELLA BARRIERA EMATO-ENCEFALICA

Tesi di Laurea di:

Massimiliano Guarnaschelli

Matr. 725224

Relatore Accademico: Prof. Davide Moscatelli

Correlatore: Dott. Mario Salmona

Anno Accademico 2008 / 2009

<<Complicare è facile. Semplificare è difficile>>

Bruno Munari

SOMMARIO

SOMMARIO	2
PREMESSA	4
SCOPO DELLA TESI	5
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	7
Capitolo 1.1: L'uso delle nanoparticelle nella Teranostica	10
Capitolo 1.2: La famiglia delle nanoparticelle	13
Capitolo 1.2.1: Nanoparticelle polimeriche	15
Capitolo 1.3: Utilizzo delle nanoparticelle come vettori di farmaci	17
Elementi di progettazione di addotti polimerici di farmaci	18
Capitolo 1.3.1: Le tetracicline	19
Capitolo 1.4: Il sistema nervoso centrale	21
Capitolo 1.4.1: La Barriera Emato-encefalica e le sue funzioni	22
Capitolo 1.4.2: Sviluppo di terapie farmacologiche innovative per la cura delle malattie del CNS	23
CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI	25
Capitolo 2.1: Selezione dei polimeri	25
Capitolo 2.1.1: Introduzione ai polimeri usati per la preparazione delle nanoparticelle	25
Poliesteri	25
Metacrilati	28
Poli Alchilcianoacrilati	31
Capitolo 2.2: Preparazione delle nanoparticelle	36
Capitolo 2.2.1: Il polimero	36
Capitolo 2.2.2: La fase acquosa	37
Capitolo 2.2.3: Il surfattante	38
Capitolo 2.2.4: I processi sviluppati	40
Processo 1: emulsione di nanoparticelle da polimero già sintetizzato	40
Processo 1 di preparazione delle nanoparticelle da polimero già sintetizzato, con incorporamento di molecole traccianti o farmaco	45
Processo 2: preparazione di nanoparticelle per polimerizzazione in emulsione	46
Processo 2 di preparazione di nanoparticelle per polimerizzazione in emulsione, con incorporamento di molecole traccianti o farmaco	49
Capitolo 2.3: Caratterizzazione delle nanoparticelle	50
Laser-Light Scattering	50
Atomic-Force Microscope	51
Capitolo 2.4: I test biologici	56
Capitolo 2.4.1: Metodi di misura della stabilità	56
Il tracciante fluorescente	57
Il fluorimetro	58
Test di stabilità a diverse temperature	62
Test di stabilità in omogenato	63

Capitolo 2.4.2: Misura del loading di un tracciante e di un farmaco	65
Estrazione del Bodipy dalle nanoparticelle	66
Estrazione della Tetraciclina dalle nanoparticelle	69
Capitolo 2.4.3: Test in vivo	75
Esperimento pilota	76
Esperimento 1: somministrazione iv di nanoparticelle di PMMA e sacrifici a due tempi	76
Esperimento 2: somministrazione iv di nanoparticelle di PMMA di diametro 11 nm e sacrificio a un tempo lungo	77
Esperimento 3: somministrazione iv di nanoparticelle di PMMA a topi con EAE indotta, e sacrifici a due tempi	79
Microscopia Ottica a fluorescenza	81
Estrazione del tracciante fluorescente dall'organo prelevato	82
CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE	84
Capitolo 3.1: Selezione dei polimeri	85
Capitolo 3.2: Preparazione delle nanoparticelle	86
Capitolo 3.3: Caratterizzazione	87
Capitolo 3.4: I test biologici	90
Capitolo 3.4.1: Stabilità delle nanoparticelle polimeriche	91
Effetto delle temperatura sulla stabilità	91
Stabilità delle nanoparticelle in omogenato	94
Capitolo 3.4.2: Misura del loading di un tracciante e di un farmaco	100
Estrazione del Bodipy dalle nanoparticelle	100
Estrazione della Tetraciclina dalle nanoparticelle	103
Capitolo 3.4.3: Test <i>in vivo</i>	110
Esperimento 1	112
Esperimento 2	114
Esperimento 3	116
CAPITOLO 4: CONCLUSIONI	121
BIBLIOGRAFIA	123
RINGRAZIAMENTI	124

PREMESSA

<<L'ingegneria sta laddove non si conoscono le cose>>

Questa tesi nasce dalla collaborazione tra il Politecnico di Milano e l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri. Lo studio fa parte di un progetto più ampio, che prevede lo sviluppo di terapie innovative per la cura delle malattie neurodegenerative.

Questa tesi è anche l'inizio di un lavoro di applicazione di nanoparticelle polimeriche da impiegare per il *targeting* e il *drug delivery* dei farmaci.

<<Gli ingegneri parlano le lingue degli altri>>

Per capire come è stato possibile per un ingegnere lavorare in una realtà non convenzionalmente ingegneristica, è fondamentale scoprire i punti di incontro tra due realtà apparentemente incompatibili, quali l'Ingegneria e la Farmacologia.

Numerose applicazioni industriali se adattate ad ambienti ed esigenze differenti dagli usi tradizionali, risultano di notevole interesse in molti altri settori. Basti pensare alla scienza dei polimeri i cui sviluppi per utilizzi in campo biologico, si trovano ormai da un decennio.

Quantum dots, liposomi, hydrogel, polimeri, nano emulsioni, nascono da processi di produzione industriale, e hanno riscosso notevole successo anche per l'utilizzo in Farmacologia.

Perché fosse attuabile il dialogo tra due realtà diverse è stato inoltre necessario stabilire un linguaggio comune. E' stato intrapreso un lavoro iniziale di introduzione per l'ingegnere nella realtà biologica per capire meglio il progetto, il linguaggio specifico e la comprensione delle esigenze.

SCOPO DELLA TESI

L'utilizzo di nanoparticelle polimeriche in campo farmacologico è stato proposto a partire dalla metà degli Anni Settanta, ma un loro utilizzo sistematico richiede ancora il superamento di diversi problemi, spesso di carattere ingegneristico.

Le caratteristiche delle nanoparticelle polimeriche sono determinate da numerosi parametri tra i quali i principali sono: il polimero utilizzato, il peso molecolare e la sua distribuzione ed il processo scelto per ottenere dal polimero le nanoparticelle. Come primo obiettivo per questo lavoro di tesi ci si è concentrati sulla sintesi di nanoparticelle polimeriche ottenute con tre diverse classi di materiali: un metacrilato, un poliestere e due alchilcianoacrilati. L'obiettivo è stato quello di ottenere delle emulsioni di nanoparticelle con una dimensione caratteristica compresa fra i 30 e i 150 nm. I materiali selezionati posseggono delle caratteristiche peculiari che, oltre a determinare le caratteristiche finali delle nanoparticelle, ne determinano i processi di sintesi. I metacrilati sono polimeri praticamente non-biodegradabili e le relative nanoparticelle vengono prodotte attraverso processi di polimerizzazione radicalica in emulsione. I poliesteri sono i materiali più utilizzati in campo biomedico e farmacologico, sono biodegradabili e le relative nanoparticelle vengono prodotte via emulsione o per nano-precipitazione. I polialchilcianoacrilati sono una classe di polimeri approvati per l'uso in biomedicina e farmacologia, sono biodegradabili e le nanoparticelle vengono ottenute per polimerizzazione anionica in fase acquosa.

Dopo essere state caratterizzate in termini di diametro e distribuzione delle dimensioni attraverso Laser-Light Scattering (LLS) la morfologia è stata determinata con microscopio a forza atomica (Atomic Force Microscope, AFM). Una volta sintetizzate le particelle, ne è stata studiata la stabilità in diversi ambienti biologici. Pertanto le particelle sono state prodotte in soluzioni tampone di PBS e ne è stata studiata l'evoluzione nel tempo al variare della temperatura in diverse condizioni: nella soluzione PBS tal quale (utilizzata come riferimento), nel siero e successivamente in omogenati di organi quali rene, fegato e cervello. Per seguire l'evoluzione delle particelle nel tempo si è proceduto caricando le stesse con un tracciante fluorescente che ha permesso di seguirne l'eventuale degradazione e stabilità. Le relative prove effettuate al fluorimetro hanno permesso di determinare la

diversa stabilità relativa dei materiali, il tempo di degrado, la diffusione del fluoroforo caricato e gli eventuali fenomeni di aggregazione.

L'obiettivo finale di questo lavoro di tesi è quello di riuscire a sintetizzare delle nanoparticelle in grado di attraversare la barriera emato-encefalica (Blood Brain Barrier, BBB). Si tratta di un progetto ambizioso in quanto rendere possibile l'attraversamento della membrana da parte di principi attivi già noti, permetterebbe di trattare farmacologicamente malattie come l'Alzheimer e il Parkinson ad esempio. Per questo motivo nella seconda parte di questo lavoro si è scelto di lavorare con un solo materiale prodotto per verificare il possibile passaggio della BBB. Si è scelto di utilizzare le particelle formate da metacrilato in quanto presentano la stabilità maggiore e permettono quindi di evitare fenomeni di degrado e rilascio anticipato del tracciante che falserebbero le misure sul passaggio della BBB. Le soluzioni di nanoparticelle sono state utilizzate pertanto in test *in vivo* su cavie animali. Le nanoparticelle caricate col fluoroforo sono state somministrate per via endovenosa (iv) determinando successivamente la loro distribuzione nell'organismo a diversi tempi dall'iniezione, in particolare verificandone la presenza nel parenchima degli organi principali quali cervello, fegato, milza e rene.

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

When a pharmaceutical agent is encapsulated within, or attached to, a polymer or lipid, drug safety and efficacy can be greatly improved and new therapies are possible.

This has provided the impetus for active study of the design of degradable materials, intelligent delivery systems and approaches for delivery through different portals in the body.

Robert Langer, Nature 392 “*Drug delivery and targeting*” 1998

Col termine *Nanoparticle Drug Carrier*, anche detto *Nanoparticle* (nanoparticella), si intendono tutte le particelle solide di dimensione caratteristica dell'ordine dei nanometri, generalmente compresa tra 5 e 1000 nm.

Per avere un indice della sensibile crescita di importanza che hanno questi sistemi nella ricerca, è sufficiente osservare quanto l'industria farmaceutica abbia fatturato e pubblicato negli ultimi anni utilizzando le nanoparticelle.

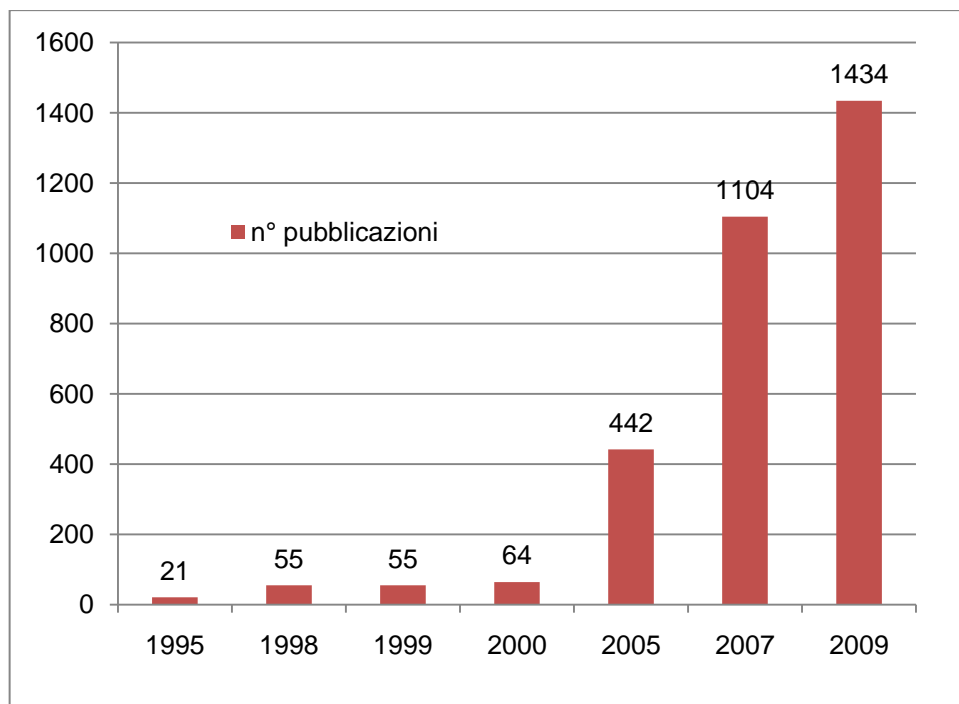


Figura 1-1: evoluzione temporale del numero di pubblicazioni scientifiche sull'utilizzo di nanoparticelle per *drug delivery*. (PubMed - Search terms: 'drug delivery' and 'nanoparticles'. Date of search: feb 2010.)

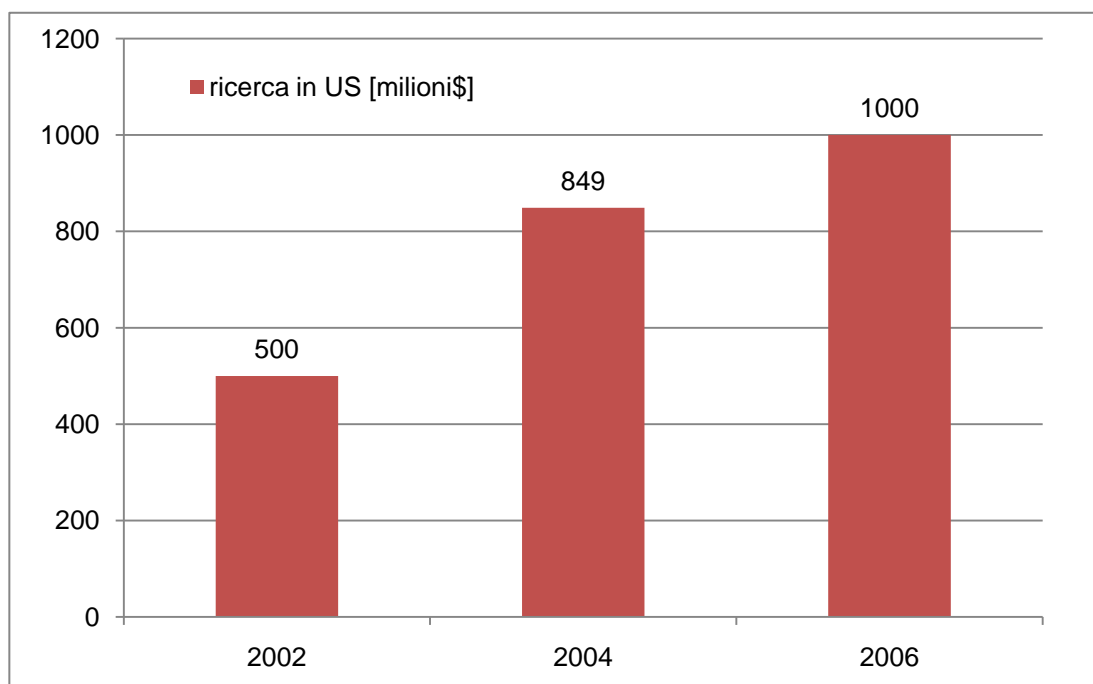


Figura 1-2: evoluzione temporale degli investimenti complessivi delle Venture Companies negli USA (US Federal Funding for Nanotechnology R&D, feb 2010)

Nel 1995 la ricerca di base sulle nanoparticelle costituiva meno dell'1% della ricerca farmacologica a scopo di *drug delivery*, ma in poco più di un decennio è aumentata raggiungendo il 16%. L'interesse in forte crescita lo si evince dall'aumento del numero di pubblicazioni (Figura 1-1) e dall'andamento dell'economia delle Venture Companies per quanto riguarda l'investimento (Figura 1-2) che hanno portato a guadagni nel settore in costante aumento. Nel 2002 il mercato mondiale delle nano tecnologie fatturava 406 milioni di \$ e con una crescita del 28% annuo, dati del 2007 riportano un giro complessivo di 1,37 miliardi di \$ [1].

Capitolo 1.1: L'uso delle nanoparticelle nella Teranostica

Di notevole interesse per migliorare l'indice terapeutico dei farmaci è lo sviluppo di sistemi che consentano una distribuzione selettiva del principio attivo nell'organismo. Raggiungere un sito specifico per la terapia (operazione denominata "targeting"), è l'obiettivo specifico dei Delivery Systems. Con questo termine viene indicato qualsiasi sistema o "carrier" destinato al trasporto di un farmaco per il suo rilascio controllato.

L'utilizzo di *carrier* di dimensioni nanometriche è interessante sia dal punto di vista diagnostico che terapeutico. Il neologismo Teranostica intende infatti conciliare il fatto di poter svolgere entrambe le funzioni, diagnosi e terapia, contemporaneamente. L'interesse per le nanoparticelle sta quindi crescendo col tempo di importanza nel campo medico e in quello farmacologico. Ad oggi, in un solo decennio dalla loro introduzione l'industria farmaceutica e la ricerca allo stesso modo, hanno modificato il loro concetto di formulazione classica del farmaco e i metodi di studio delle patologie. La facile versatilità che propongono le nanoparticelle risulta essere il loro lato affascinante delle stesse perché dimostrano di avere un grande potenziale applicativo. In fase diagnostica l'obiettivo è di localizzare, quantificare e caratterizzare in generale una patologia. I tumori, le disfunzioni cardiache, le placche di amiloide nei malati di Alzheimer sono tutti obiettivi ben definiti che una diagnosi vuole caratterizzare con varie tecniche spesso invasive. Se in questi casi si potesse raggiungere o localizzare la presenza di una determinata patologia, in maniera non invasiva e immediata, sarebbe un grande passo per la medicina. Le nanoparticelle da questo punto di vista sono dei potenziali strumenti di *targeting* della patologia. Esse infatti, se funzionalizzate sulla loro superficie, possono raggiungere per vie convenzionali, quali la circolazione sanguigna, il sito specifico e ad esso legarsi selettivamente. La moderna strumentazione diagnostica poi permette la visualizzazione delle nanoparticelle con varie tecniche. Un esempio pratico sono le nanoparticelle caricate con molecole sensibili ai campi magnetici come l'ossido di ferro (Fe_2O_3). Se nanoparticelle di questo tipo sono funzionalizzate con un ligando specifico per un recettore presente sul sito di interesse diagnostico, è favorito il loro legame univoco. Con la risonanza magnetica (Magnetic Resonance Imaging, MRI) è

possibile localizzare le particelle legate, ottenendo informazioni importanti sulla patologia.

Come per la diagnostica, anche in terapia si possono sfruttare le caratteristiche delle nanoparticelle ed eseguire *drug delivery* grazie al *targeting*. Il rilascio localizzato del farmaco favorisce l'aumento del suo Indice Terapeutico. Questo infatti agisce solo laddove è richiesta la terapia e non viene distribuito in tutto l'organismo come accade per le formulazioni classiche. Inoltre, l'andamento della concentrazione sarebbe controllata dalla diffusione del farmaco dalla particella verso l'esterno, permettendo così di non avere picchi di concentrazione al momento della somministrazione.

Nell'iter di sviluppo di una nuova formulazione farmacologica, le nanoparticelle si inseriscono in uno stadio di nuova concezione detto "Innovative Formulations" cui la molecola può essere sia incapsulata che dispersa nelle nanoparticelle. Le formulazioni tradizionali sono una miscela contenente un principio attivo atto alla terapia della malattia, e degli eccipienti destinati alla prevenzione di effetti collaterali o di tossicità che il principio attivo può provocare. La strategia di somministrazione è uno studio successivo alla formulazione. Le principali vie di somministrazione sono endovena, respiratoria, intraperitoneale e orale.

Delle applicazioni attualmente esistenti in medicina, si hanno delle informazioni concrete degli effetti delle nanoparticelle paragonabili a quelli delle stesse terapie farmacologiche convenzionali.

L'Indice Terapeutico è un indicatore della capacità del farmaco a svolgere la terapia. E' un valore dell'efficacia misurato sulla base dei benefici e degli effetti collaterali.

L'uso di nanoparticelle generalmente non aumenta l'Indice Terapeutico per quanto riguarda la dose efficace. La dose di farmaco in particelle risulta spesso paragonabile alla dose di farmaco libero di una terapia tradizionale. Si hanno però delle diverse dinamiche di farmacocinetica e farmacodinamica poiché, se messo in particelle, il farmaco non è immediatamente disponibile perché la sua concentrazione dipende dal rilascio dello stesso dalle nanoparticelle.

Inoltre esistono casi in cui la tossicità di un farmaco possa essere diminuita dalla presenza delle particelle. Un esempio è la Doxorubicina, un farmaco antitumorale comunemente utilizzato per la terapia anticancro. Risulta rilevante la sua cardiotoxicità (tossico per il cuore), che provoca l'insorgere di cardiopatie. La somministrazione in formulazioni accoppiate a nanoparticelle polimeriche o a

liposomi lipidici è in grado di portare benefici, quali il notevole abbassamento della cardiotossicità nonché un aumento della morte per apoptosi delle cellule tumorali. In campo diagnostico è invece più marcata la crescita d'importanza dell'uso delle nanoparticelle e sono molteplici gli utilizzi, come ad esempio gli studi di "imaging". Le nanoparticelle trovano notevoli sbocchi applicativi sia a livello degli studi *in vitro* che di quelli *in vivo*. In diagnostica, come per la terapia, si ha fondamentale interesse nello sviluppo di approcci non invasivi, trovando perciò le nanoparticelle come prima via di scelta.

Tutte le tecnologie presentano degli aspetti indesiderati. La progettazione delle nanoparticelle è un compito prettamente ingegneristico, di studio su un processo, per la realizzazione di un prodotto con caratteristiche fisiche e chimiche volute. Con le variabili di processo si controllano le dimensioni, la chimica delle molecole, la stabilità e anche alcuni parametri cinetici quali la decomposizione del polimero ed il tempo di rilascio del farmaco. Risultano però ancora importanti gli studi da fare circa la biodegradabilità e l'accumulo, per le applicazioni in campo biologico.

Numerosi i casi di accumulo nei tessuti dell'organismo per la stabilità prolungata dei polimeri costituenti le nanoparticelle in ambienti biologici. Le cinetiche farmacologiche sono oggetto di studio in fase sperimentale, proprio perché si abbia una coscienza degli effetti correlati all'utilizzo *in vivo*.

Le nanoparticelle hanno un ruolo fondamentale nella formulazione di un nuovo farmaco, negli studi preliminari e preclinici per quanto riguarda i test *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* sugli animali. Inoltre in fase clinica sia per la diagnostica che per la terapia.

Capitolo 1.2: La famiglia delle nanoparticelle

Con il termine Nanoparticelle vengono comprese tutte quelle classi di particelle di dimensione dell'ordine del nanometro.

In base alle esigenze applicative è possibile realizzare nanoparticelle di molteplici caratteristiche differenti: dimensione, chimica della superficie, funzionalizzazione, degradazione, proprietà fisiche come ad esempio la carica e le modalità di incapsulamento e stabilità in emulsione.

Le nanoparticelle si possono classificare in:

- Liposomi
- Emulsioni olio in acqua, acqua in olio
- Nanoparticelle polimeriche
- Gold Nanoparticles e Quantum dots

Ognuna di queste classi differisce per le caratteristiche strutturali (Figura 1-3), chimiche, fisiche e spesso comportano un processo di produzione differente.

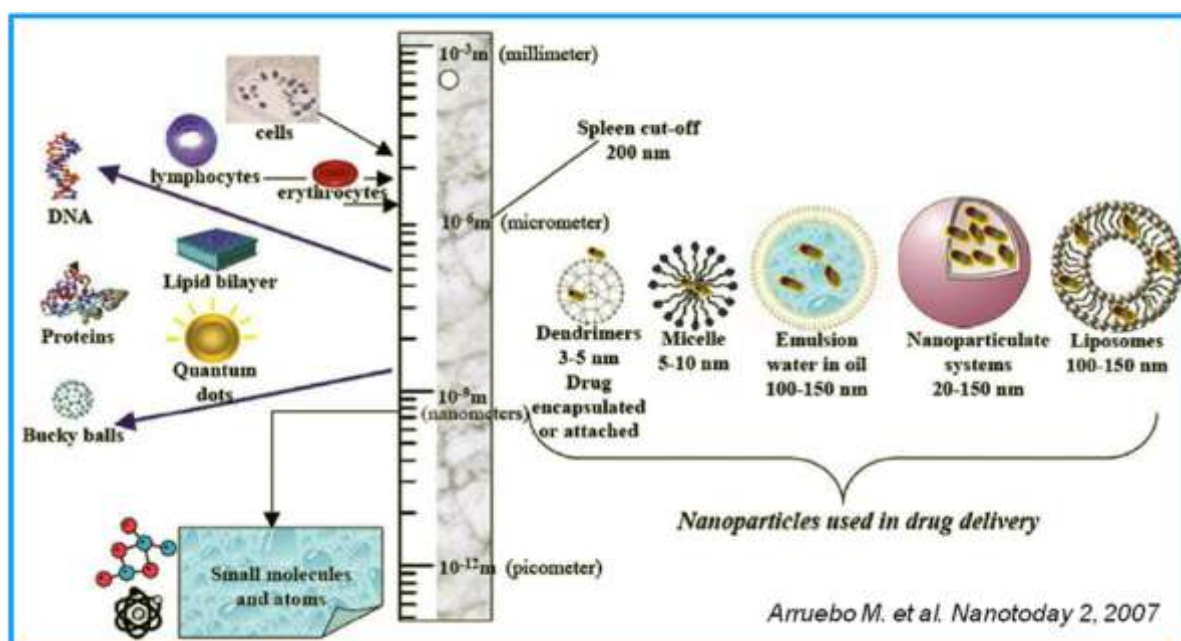


Figura 1-3: distribuzione delle dimensioni caratteristiche delle nanoparticelle (Arruebo M. et al. Nanotoday 2, 2007).

Dal punto di vista della dimensione, che risulta essere un parametro fondamentale per l'utilizzo delle particelle, è possibile identificare un intervallo di diametri rilevante per le applicazioni farmacologiche.

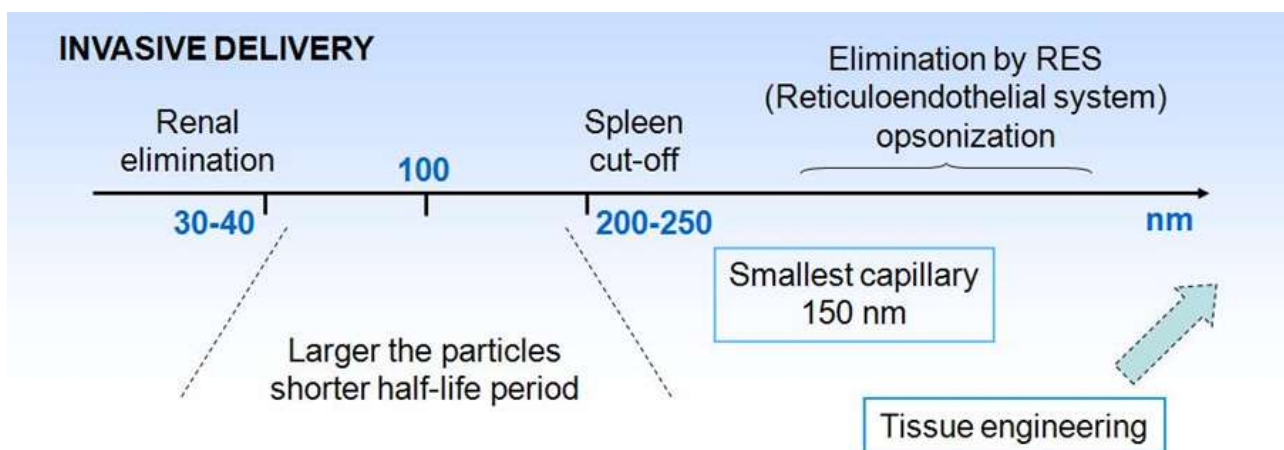


Figura 1-4: intervallo dimensionale utile in farmacologia per l'utilizzo delle nanoparticelle. (Prof. Hans P. Merkle, merkle@pharma.ethz.ch)

Le nanoparticelle sono il mezzo ricercato per trasportare farmaci in un organismo perché possono raggiungere le dimensioni compatibili con i più piccoli capillari sanguigni. Questo è un grosso vantaggio perché risulta efficace il raggiungimento di tutti i siti dell'organismo senza alcuna restrizione, per lo meno dal punto di vista teorico. La scala dimensionale però non è sufficiente per risultare compatibili all'utilizzo qualsiasi tipo di nanoparticella. Esistono infatti dei vincoli di natura morfologica dell'organismo che impediscono l'utilizzo di nanoparticelle di alcune dimensioni.

Nella Figura 1-4 è evidenziato un intervallo di dimensioni caratteristiche. Particelle che hanno una dimensione inferiore ai 30-40 nm sono facilmente eliminabili attraverso i reni perciò hanno bassi tempi di emivita nella circolazione sanguigna. Allo stesso modo, particelle con diametri maggiori di 200-250 nm subiscono la massima selettività da parte della milza, risultando anch'esse facilmente eliminabili dalla circolazione. E' importante per molte applicazioni poter mantenere nella circolazione sanguigna le nanoparticelle così che possano essere disponibili il più

possibile per svolgere il trasporto del farmaco o per rilasciarlo in modo controllato nel tempo.

Questo discorso è valido per l'assunzione mediante tecniche invasive di somministrazione, cioè l'introduzione delle nanoparticelle direttamente nella circolazione sanguigna. In questo caso infatti è condizione necessaria il fatto che il sistema circolatorio trattenga il più possibile nel sangue le particelle, affinché possa avvenire una terapia efficace.

Lo stesso ragionamento è valido per tutti gli altri metodi di somministrazione, quelli non parenterali, come quello orale, cutaneo e respiratorio. Anche per queste tipologie di assunzione esistono dei vincoli dimensionali. Generalmente sono intervalli variabili a seconda degli scopi e dei tipi di tessuto. Nella Tabella 1-1 sono riportati i range tipici delle nanoparticelle utilizzabili con tecniche di somministrazione non invasive.

Tabella 1-1: intervallo dimensionale utile per l'utilizzo delle nanoparticelle con tecniche di somministrazione non invasive.

SOMMINISTRAZIONE	DIMENSIONE MINIMA	DIMENSIONE MASSIMA
	[μm]	[μm]
Orale	1	100
Cutaneo	0,1	100
Respiratorio	0,01	1

Capitolo 1.2.1: Nanoparticelle polimeriche

Le nanoparticelle polimeriche sono frutto di una tradizionale cultura ingegneristica. Nate dagli studi sulla polimerizzazione in emulsione hanno raggiunto traguardi applicativi in molti campi dell'industria dei polimeri e derivati.

I settori industriali delle vernici e dei saponi hanno esperienze decennali con le nanoparticelle, che sono la base dei prodotti commercializzati.

Le applicazioni in campo biologico delle nanoparticelle sono invece più recenti e attualmente destinate al rilascio controllato di farmaci.

Normalmente per ogni applicazione è necessario sviluppare nanoparticelle adeguate all'utilizzo desiderato, utilizzando processi di produzione specifici.

La loro struttura base delle nanoparticelle è composto dal polimero, generalmente biocompatibile, scelto sulla base delle sue proprietà fisico-chimiche adeguate sia per il farmaco da incapsulare che per le proprietà dell'emulsione. Tra i polimeri maggiormente studiati ci sono alcuni poliesteri quali il Polylactide (PLA), il Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) e il Polyethylene glycole (PEG), che sono polimeri idrolizzabili e biodegradabili. Vengono usati anche alcuni co-polimeri, cioè combinazioni di diversi monomeri: un esempio è il PLA-PEG, interessante per la biodegradabilità del PLA e l'aspetto protettivo contro l'opsonizzazione del PEG.

Le nanoparticelle polimeriche possono essere funzionalizzate sulla loro superficie con ligandi specifici per permettere il *targeting* controllato. I ligandi possono essere legati covalentemente alla molecola del polimero oppure possono essere incastrati nella struttura della particella realizzando così una superficie funzionale.

L'utilizzo delle nanoparticelle in farmacologia è ancora in fase di studio e sono ancora molte le variabili da considerare per la progettazione e lo sviluppo di nanoparticelle adatte all'uso clinico.

Capitolo 1.3: Utilizzo delle nanoparticelle come vettori di farmaci

Uno dei vantaggi delle nanoparticelle è costituito dalla loro ridotta dimensione dell'ordine dei nanometri. Per via della loro composizione chimica, le nanoparticelle polimeriche sono insolubili in solventi acquosi, ma vi rimangono di regola perfettamente sospese, e visivamente le loro sospensioni hanno l'aspetto di soluzioni.

La possibilità di inserire sulla superficie delle nanoparticelle gruppi chimici con affinità specifica verso ligandi specifici permette di indirizzare le nanoparticelle verso determinate cellule o tessuti bersaglio. E' attualmente allo studio l'impiego di nanoparticelle come vettori non virali di acidi nucleici in esperimenti di trasfezione, o per altre applicazioni biotecnologiche.

Attualmente lo studio dei derivati polimerici di farmaci è certamente uno dei più affascinanti esempi di ricerca interdisciplinare, in cui convergono discipline diverse ma fra loro complementari, quali la chimica, la biologia, la fisiologia e la farmacologia. Si tratta di un campo relativamente recente, che quindi non ha ancora espresso pienamente tutto il suo potenziale in termini di applicazioni pratiche.

Le opportunità offerte dall'uso dei polimeri solubili derivano da due caratteristiche tipiche della loro natura: le dimensioni molecolari, superiori di due o tre ordini di grandezza rispetto a quelle delle molecole tradizionali, e la multifunzionalità, cioè il fatto che i polimeri, essendo costituiti da un numero molto grande di unità connesse fra loro, possono svolgere numerose funzioni chimiche per ogni molecola. La multifunzionalità comporta la possibilità di legare a ogni singola molecola di veicolante polimerico non soltanto numerose molecole di farmaco, ma anche altri gruppi chimici capaci di coadiuvarne l'attività.

Nei sistemi biologici le sostanze polimeriche e non polimeriche si comportano in modo differente. I polimeri somministrati per iniezione sono bioeliminabili solo quando il loro peso molecolare è inferiore a un valore soglia; polimeri di peso molecolare superiore sono bioeliminabili solo se il loro peso molecolare si riduce nel tempo in seguito a degradazione, mentre un polimero a elevato peso molecolare

oltrepassa con difficoltà le pareti del tratto gastrointestinale e di regola non è significativamente assorbito dopo assunzione orale.

Inoltre, esistono differenze specifiche tra farmaci tradizionali e addotti polimerici di farmaci. La coniugazione di un farmaco a un polimero ne altera profondamente la sua farmacocinetica, perché le elevate dimensioni molecolari raggiunte impediscono la diffusione attraverso le membrane cellulari.

Elementi di progettazione di addotti polimerici di farmaci

Un veicolante polimerico ideale per la preparazione di addotti polimerici di farmaci deve avere una serie di requisiti, alcuni dei quali specifici, altri comuni a tutti i biomateriali: deve essere biocompatibile e bioeliminabile; deve possedere gruppi funzionali che permettano l'aggancio di una quantità sufficiente sia di farmaco, sia di altri gruppi chimici coadiuvanti; deve possedere un adeguato potere solubilizzante nel caso di farmaci poco solubili in acqua; deve accumularsi selettivamente a livello del sito d'azione preferenziale; deve favorire un aggancio polimero-farmaco stabile nel sistema vascolare, ma degradabile nel sito d'azione preferenziale; deve, infine, essere riproducibile su scala industriale e facilmente caratterizzabile.

Gli elementi fondamentali degli addotti polimerici di farmaci sono codificabili in un modello generale, detto modello di Ringsdorf.

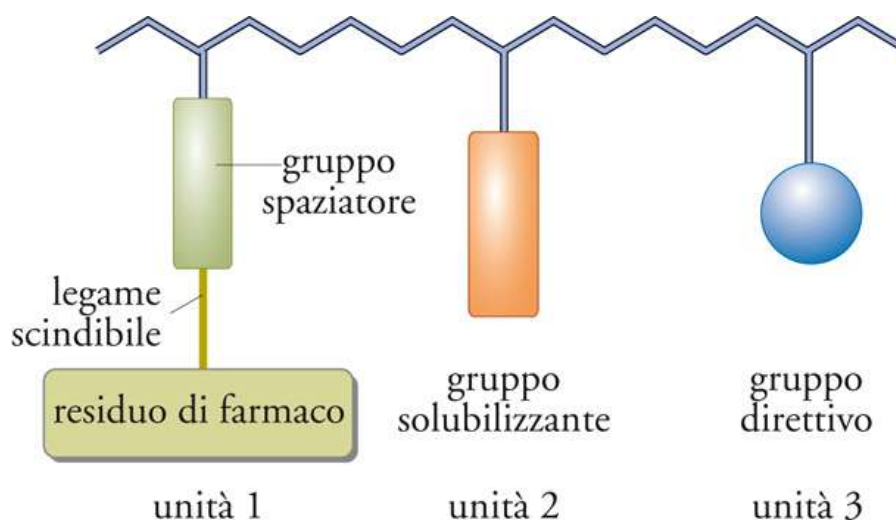


Figura 1-5: modello di Ringsdorf di addotto polimerico di farmaco.

Come riassunto nella Figura 1-5, un polimero in cui sono presenti tre diversi tipi di unità: una unità cui è legato il farmaco tramite uno spaziatore, una solubilizzante e una contenente un gruppo avente la funzione di guidare il farmaco verso un recettore specifico. Il modello è valido per ogni tipo di farmaco, ma è stato sviluppato soprattutto per i chemioterapici antitumorali, dei quali in teoria assicura la solubilizzazione, il direzionamento e il rilascio a livello del tumore. Questo modello è stato applicato nella preparazione di numerosi antitumorali polimerici che attualmente si trovano a vari stadi di sperimentazione clinica [2].

Capitolo 1.3.1: Le tetracicline

Le Tetracicline sono degli antibiotici che derivano dalla famiglia delle naftacenecarbossiamidi policicliche e che possiedono un'attività antimicrobica molto estesa. Essendo utilizzati da molti anni nella pratica clinica, il profilo farmacocinetico e tossicologico delle tetracicline è ampiamente noto.

Tutte le tetracicline hanno in comune la stessa struttura tetraciclina (nucleo naftacenecarbossiamidico) ed il carattere anfotero. Sono composti suscettibili a formare sali cristallini sia con acidi che con basi forti; il loro sistema cromoforo comune dà luogo a spettri di assorbimento caratteristici che si estendono al visibile, impartendo il caratteristico colore giallo a questi antibiotici. Tutte le tetracicline sono in grado di dare chelati con metalli formando composti insolubili in acqua e che si pensa svolgano un ruolo importante nel meccanismo d'azione antibiotica. Come basi anfotere le tetracicline sono scarsamente solubili in acqua, mentre i loro cloridrati hanno una maggiore solubilità.

Un'altra caratteristica comune alle tetracicline è quella di ossidarsi alla luce e di degradarsi in presenza di umidità ed in ambiente acido per formare gli anidroderivati, praticamente privi di potere antibiotico e più tossici dei composti di partenza, probabilmente perché capaci di interagire in modo aspecifico con le membrane cellulari eucariotiche e procariotiche.

A pH alcalini si formano per notevole rimaneggiamento strutturale, le cosiddette Isotetracicline. Le isotetracicline presentano nei confronti della molecola originale dei vantaggi di solubilità che si sfruttano nel processo estrattivo necessario al dosaggio chimico degli antibiotici tetraciclinici nei tessuti e nei liquidi organici.

Le sostituzioni chimiche sulla struttura di base delle tetracicline, riguardano gli atomi di carbonio C5, C6 e C7 del nucleo naftacenico (Figura 1-6).

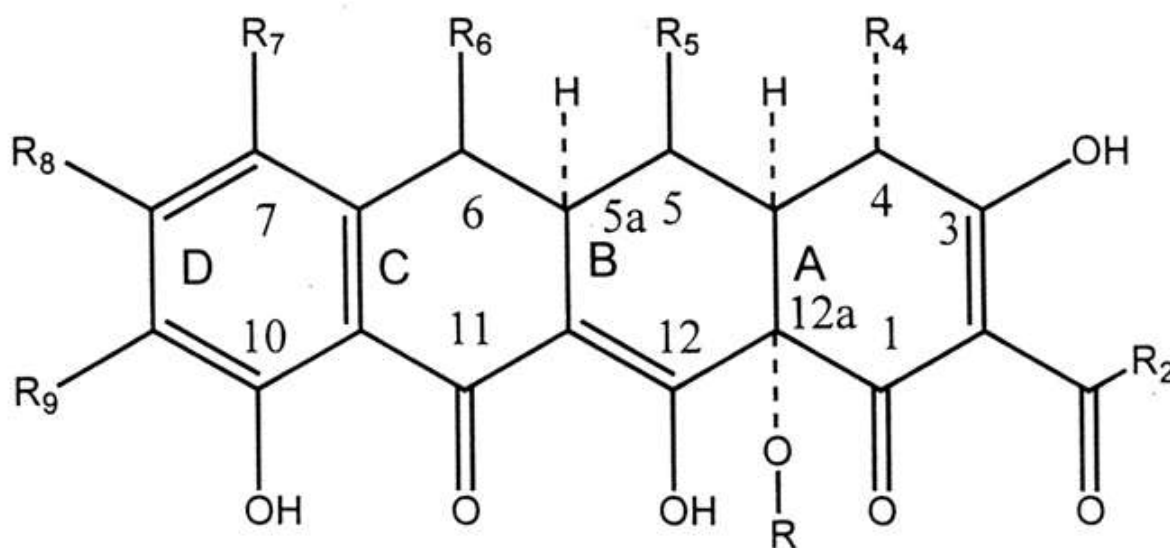


Figura 1-6: formula generale delle tetracicline. Con R_i si intendono i possibili sostituenti che possono essere dei gruppi amminico, amminoalchilici, ammidico, idrogeno o ossidrilico. I quattro anelli aromatici principali sono identificati con le lettere D, C, B, A e i numeri al loro interno identificano con una numerazione antioraria i carboni costituenti la molecola.

Tra i vari farmaci studiati per la cura di alcune malattie neurodegenerative che coinvolgono la formazione di aggregati proteici, le tetracicline rappresentano una classe di molecole particolarmente promettenti. Esse sono in grado di interagire con la proteina del prione e con i depositi di β -amiloide fino ad accelerare la loro disgregazione. Il limite maggiore nell'uso delle tetracicline per la cura delle malattie del CNS è rappresentato dalla loro ridotta capacità di attraversamento della BBB. Quindi lo sviluppo di una formulazione farmacologica che favorisca il passaggio della BBB e che coinvolge l'uso di nanoparticelle, è attualmente di grande interesse.

Capitolo 1.4: Il sistema nervoso centrale

Il sistema nervoso centrale (Central Nervous System, CNS) collega le varie parti dell'organismo e ne coordina le attività, interviene nella regolazione del trofismo e delle funzioni dei singoli organi; rende l'organismo in grado di ricevere stimoli dal mondo esterno e di reagire. E' costituito dall'encefalo e dal midollo spinale, da alcune cavità in cui scorre il liquido cefalorachidiano ed è rivestito da tre membrane, le meningi. Salendo nella scala zoologica l'encefalo si differenzia in: midollo spinale, contenuto nella colonna vertebrale, da cui partono i nervi spinali; midollo allungato, sede dei nervi cranici che ricevono e inviano impulsi a pelle, muscoli della testa, occhio e orecchio; cervelletto, che coordina le contrazioni della muscolatura; cervello, dove tutte le informazioni raccolte vengono integrate ed elaborate nella corteccia cerebrale, particolarmente sviluppata nei mammiferi.

Al sistema nervoso centrale spetta il ruolo fondamentale di controllo dei sistemi sensoriali, dei sistemi motori e delle funzioni superiori. La funzione dei sistemi sensoriali è quella di condurre al sistema centrale gli stimoli captati alla periferia dai recettori sensoriali periferici. Una vasta gamma di stimoli del mondo esterno agisce sui recettori per dar luogo a sensazioni semplici che vengono poi organizzate in percezioni riconoscibili mediante complessi processi d'integrazione che si svolgono a livello del talamo e della corteccia sensitiva dell'encefalo. L'esecuzione armonica di un movimento o il mantenimento di una postura comportano il controllo da parte di strutture superiori del sistema nervoso centrale (corteccia motoria, gangli della base, cervelletto, sostanza reticolare del tronco dell'encefalo) sui centri inferiori, cioè sui motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale. Negli animali più evoluti e nell'uomo un ruolo di primo piano nelle funzioni superiori (comportamento, apprendimento, memoria) viene svolto dalla corteccia associativa degli emisferi cerebrali.

Il cervello è costituito dagli emisferi cerebrali, la regione talamica e l'ipotalamo, più sviluppata nell'uomo che negli altri animali. Il cervello ha forma di ovoide incompleto, con una superficie supero-laterale convessa e una inferiore (base) incavata in senso trasversale. È avvolto dalle meningi, che lo separano dalle pareti ossee della cavità

cranica e, con una loro espansione laminare (chiamata *tentorium*), dal cervelletto. Suoi costituenti principali sono i due emisferi cerebrali e la regione diencefalica.

Capitolo 1.4.1: La Barriera Emato-encefalica e le sue funzioni

La Barriera Emato-encefalica (Blood-Brain Barrier, BBB) è una unità morfo-funzionale in grado di isolare il liquido cerebro-spinale (Cerebrospinal Fluid, CSF), o liquor ed il tessuto nervoso dal compartimento ematico regolando attivamente ed in modo selettivo gli scambi di sostanze e cellule tra sangue e parenchima cerebrale e fra sangue e CSF. Inoltre, la BBB ha il compito di mantenere la delicata omeostasi chimico-fisica del CSF.

La BBB è costituita anatomicamente dall'endotelio dei capillari cerebrali e dai processi perivascolari degli astrociti. I capillari cerebrali differiscono anatomicamente da quelli periferici, sistemici perché sono composti dalle cellule dell'endotelio capillare, provviste di giunzioni serrate (*tigh junction*) che impediscono la libera diffusione dei soluti, e dai periciti, cellule contrattili separate dalla membrana basale mediante una matrice extracellulare di collagene.

I piedi o processi astrocitari perivascolari sono invece delle propaggini degli astrociti, cellule di supporto strutturale per il tessuto nervoso che, come le altre cellule gliali, si dispongono negli spazi compresi fra i neuroni ed i loro prolungamenti (assoni e dendriti). Gli astrociti intervengono anche nel processo di riparazione cicatriziale del danno tissutale ed insieme agli oligodendrociti, le cellule deputate alla formazione della guaina mielinica, formano la macroglia. La microglia è, invece costituita dalle cellule microgliali che sono i macrofagi residenti del CNS.

Dal punto di vista funzionale, per la BBB sono molto importanti le *tigh junction* che limitano selettivamente il transito di sostanze dal compartimento ematico (periferico o sistemico) a quello liquorale e cerebrale (intratecale) sia a livello dei capillari cerebrali che dell'epitelio corioideo.

La BBB quindi esercita la funzione di "filtro biologico" poiché restringe selettivamente il trasferimento di sostanze (ioni, glucosio, proteine) dal sangue al tessuto nervoso.

La BBB svolge molte funzioni. Mantiene costanti le condizioni dell'ambiente circostante il cervello, come le composizioni del Brain Interstitial Fluid (ISF) e il Cerebrospinal Fluid (CSF) diversamente dal Somatic Extracellular Fluid, così che i neuroni possano realizzare al meglio le loro complesse funzioni. Inoltre svolge una importante funzione neuroprotettiva. Durante la vita dell'organismo, il CNS è esposto alla presenza di diverse sostanze tossiche derivate dal metabolismo o da sostanze esogene, che possono danneggiare le cellule fino a causarne la morte.

La BBB protegge il cervello da gradienti di composizione salina e ionica che possono avvenire ad esempio dopo un pasto o uno sforzo fisico, portando un disturbo al sistema sinaptico e ai segnali trasmessi dagli assoni. Inoltre aiuta a mantenere separate le azioni centrali e periferiche dei neurotrasmettitori. Infine il continuo ricircolo e drenaggio del CSF e dell'ISF con il flusso sanguigno aiuta a filtrare le grosse molecole e a eliminare i metaboliti, in modo da conservare il cervello in un micro ambiente particolare.

Capitolo 1.4.2: Sviluppo di terapie farmacologiche innovative per la cura delle malattie del CNS

Numerosi sono gli sforzi che vengono condotti per sviluppare terapie efficaci per la cura di malattie del CNS, come ad esempio alcuni tipi di tumore, la demenza associata all'infezione da HIV, i traumi, le ischemie e le malattie neurodegenerative come l'Alzheimer ed il Parkinson.

Lo sviluppo di farmaci efficaci per la cura delle patologie che interessano il CNS deve tenere conto della presenza della BBB. Infatti molti dei farmaci promettenti per la cura della malattia di Alzheimer non si sono rivelati attivi in clinica proprio per questa ragione.

Tra le varie strategie attualmente utilizzate per il trattamento delle malattie del CNS l'utilizzo delle nanoparticelle è una delle tecniche di maggiore interesse. Le nanoparticelle sono veicolanti per farmaci che possono essere incapsulati all'interno o caricati semplicemente per assorbimento o legame chimico col polimero stesso. Questi *carrier* possiedono una maggiore stabilità nei fluidi biologici rispetto ad altri

sistemi, come i liposomi ad esempio. Esistono già degli studi sui sistemi di *drug delivery* che risultano promettenti per applicazioni destinate al CNS. Particelle di Poly-Butylcianoacrilate (PBCA) stabilizzate da Polysorbate80 sono state usate per veicolare farmaci come il Dalargin, la Loperamide, la Doxorubicina. Particelle di PLGA sono in fase di studio per utilizzarle come *carrier* nel CNS. Il PLGA è un polimero biodegradabile, approvato dall'US Food and Drug Administration (FDA) per l'utilizzo sulle persone, che si degrada senza provocare l'organismo a infezioni o reazioni immunitarie. E' stato recentemente dimostrato che particelle di PLGA coniugate con glico-peptidi possono attraversare la BBB quando somministrate *in vivo*.

CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI

In questo capitolo verranno presentate in maniera dettagliata e cronologica tutte le scelte, gli esperimenti, i metodi sviluppati e gli strumenti utilizzati per ottenere i risultati discussi infine nell'ultimo capitolo.

Capitolo 2.1: Selezione dei polimeri

La materia base di cui sono costituite le nanoparticelle è il polimero che vascelto adeguatamente sulla base delle esigenze da soddisfare.

Le categorie di polimero di cui si dispongono informazioni scientifiche per le applicazioni biologiche sono quelle dei Poliesteri, dei Metacrilati e dei Poli Alchilianocrilati.

E' stato deciso di utilizzare polimeri biocompatibili e poiché lo studio di intere categorie di polimeri per la selezione di quelli con le caratteristiche migliori avrebbe richiesto molto tempo, la scelta del polimero si è basata prevalentemente sulla disponibilità dei monomeri e sulla capacità di produrre le nanoparticelle con processi standardizzati.

Capitolo 2.1.1: Introduzione ai polimeri usati per la preparazione delle nanoparticelle

Poliesteri

Per quanto riguarda la categoria dei Poliesteri, il polimero principalmente studiato è l'Acido Polilattico (Polylactycacyd, PLA) che è di grande interesse come alternativa

ecologica ai polimeri derivati dall'industria petrolchimica. Il PLA è un derivato dell'Acido Lattico (LA), ed è un polimero biocompatibile e biodegradabile che viene utilizzato come materia prima per imballaggi, fili da sutura e la costruzione di tessuti artificiali. Le sue proprietà chimico fisiche dipendono fortemente dal peso molecolare e dalla conformazione tattica della molecola, tanto è vero che attualmente è grande l'interesse per lo sviluppo di un catalizzatore che sia in grado di controllare sia la struttura che il peso molecolare del polimero [3].

L'Acido Polilattico è stato realizzato per la prima volta da Carothers nel 1932, con un processo di condensazione e polimerizzazione diretta in solvente e sotto vuoto spinto dell'acido lattico. Venne abbandonato poi il polimero a causa del punto di fusione troppo basso per lo sviluppo di fibre e prodotti tessili a favore del nylon.

Di recente il PLA è stato riproposto come legante alternativo per nontessuti cellulosici per la facilità di degradazione idrolitica rispetto all'acetato polivinilico o ai copolimeri dell'acido etilenacrilico.

Cargill Dow Polymers LLC, oggi leader nella tecnologia dell'Acido Polilattico, è una joint venture 50-50 fra Cargill e Dow che risale al 1997. Attualmente hanno una capacità produttiva di 4000 tonnellate di polimero EcoPLA™ che raddoppieranno entro l'anno per rispondere alle immediate richieste di mercato. Avevano annunciato la realizzazione di un impianto da 140.000 tonnellate all'anno per produrre il PLA NatureWorks™, "una famiglia di polimeri completamente derivata da risorse rinnovabili annualmente a prezzi competitivi rispetto alle fibre e ai materiali per imballaggio tradizionali" [4]. L'impianto partì nel 2002 e molti produttori stanno già realizzando fibre dal nuovo polimero. (Fibre Innovation Technologies, Parkdale, Unifi, Interface, Woolmark, Unitika, Kanebo e Kuraray vengono menzionate come "alleati nello sviluppo").

Il loro processo [5] prevede l'estrazione di zuccheri (destrosio essenzialmente, ma anche glucosio e saccarosio) da farina di granturco, barbabietole da zucchero o amido di frumento e la successiva fermentazione ad acido lattico. Si preferisce partire da zuccheri raffinati piuttosto che dai meno costosi melassa o siero poiché la purificazione dopo fermentazione è più costosa.

L'acido lattico è convertito nel dimero (lattide) che è purificato e polimerizzato, con il metodo dell'apertura dell'anello (Ring Opening Polymerization, ROP), ad Acido Polilattico (Figura 2-1). La famiglia di polimeri nasce in parte dalla stereochimica

dell'acido lattico e del suo dimero. L'acido lattico fermentato è per il 99,5% in forma L-isomero e per lo 0,5% in forma D-isomero.

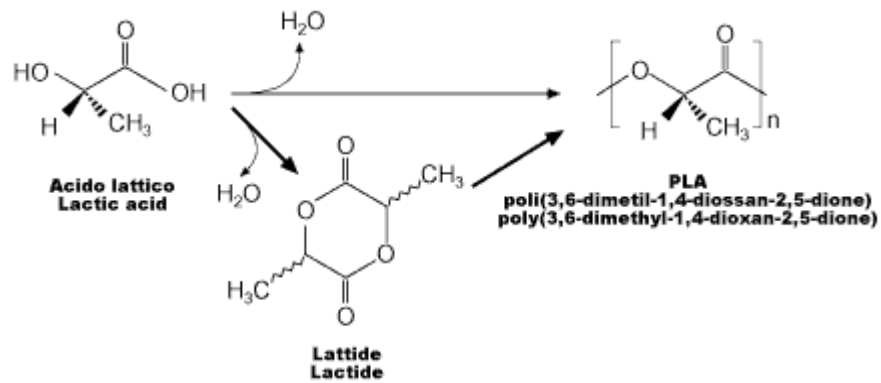


Figura 2-1: rappresentazione della sintesi del PLA per via diretta dall'Acido Lattico o attraverso il dimero.

La conversione a dimero può essere controllata per ottenere tre forme isomeriche differenti: L, D, e mesolattidi (Figura 2-2).

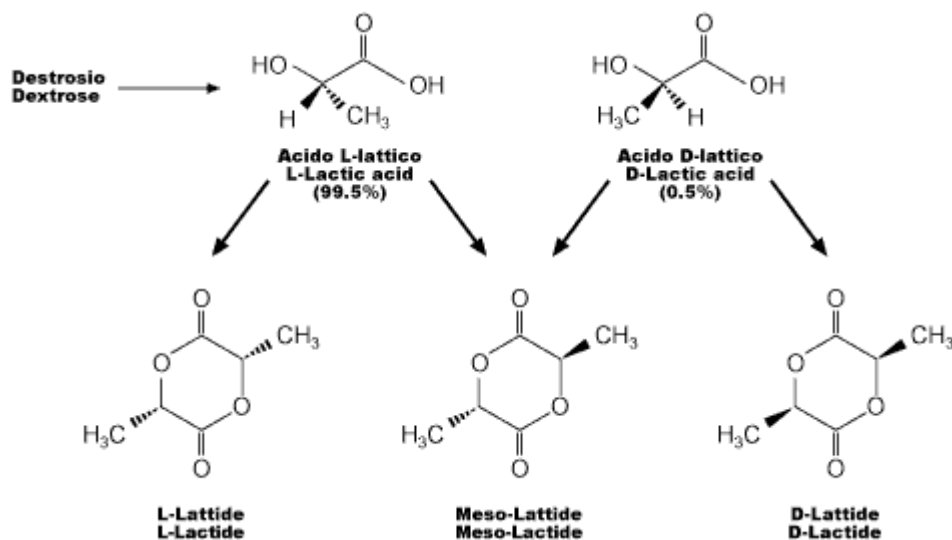


Figura 2-2: tre possibili lattidi diversi provenienti dalla disidratazione dell'Acido Lattico.

La polimerizzazione del lattide verso polimeri ricchi di L-isomero dà prodotti cristallini, mentre quelli che contengono più del 15% di D-isomero sono più amorfi. Il miglior controllo della stereochimica, che si realizza con la via del dimero, spiega la superiorità dei prodotti attuali rispetto a quelli di Carothers del 1932. La resina PLA risultante può essere estrusa come le altre resine termoplastiche per formare fibre, film e spunbond.

Le applicazioni nei nontessuti riguardano fibre per imbottiture, copertura di coltivazioni, geotessili, panni per asciugare, prodotti igienici e medicali, pannolini, fibre leganti.

Il PLA può essere prodotto con differenti proprietà perché l'acido lattico, essendo chirale e con due centri di asimmetria, esiste in quattro differenti forme. Ha anche le proprietà richieste dai pannolini biodegradabili, essendo facilmente convertibile in film, fibra, spunbond e meltblown con le attuali apparecchiature di estrusione. L'impianto Cargill Dow Polymers LLC da 140.000 tonnellate di polimero se potesse produrre a prezzi inferiori ai 50 centesimi di dollaro per libbra (che è il costo della resina PP e PET), avrà un successo garantito.

Metacrilati

I polimeri utilizzati sono quelli provenienti dal monomero Metil Metacrilato (MMA).

Il Polimetilmetacrilato (PMMA, Figura 2-3) è una materia plastica formata da polimeri del metacrilato di metile, estere dell'acido metacrilico, ed è noto anche con i nomi commerciali di Plexiglas, Perspex, Lucite, Vitroflex, Limacryl e Resartglass.

Chimicamente, è il polimero del metacrilato di metile. Nel linguaggio comune il termine metacrilato si riferisce generalmente a questo polimero. Questo materiale fu sviluppato nel 1928 in vari laboratori e immesso sul mercato nel 1933 dall'industria chimica tedesca Röhm.

Di norma è molto trasparente, più del vetro al punto che possiede caratteristiche di comportamento assimilabili alla fibra ottica per qualità di trasparenza, e con la proprietà di essere più o meno in percentuali diverse, infrangibile a seconda della sua "mescola". Per queste caratteristiche è usato nella fabbricazione di vetri di

sicurezza e articoli simili, nei presidi antinfortunistici, nell'oggettistica d'arredamento o architettonica in genere.

Il PMMA è spesso usato in alternativa al vetro e le sue caratteristiche principali sono le seguenti:

- la densità di $1,19 \text{ g/cm}^3$ è circa la metà di quella del vetro;
- è infrangibile;
- è più tenero e sensibile ai graffi e alle abrasioni, ma a questo si ovvia con un opportuno rivestimento;
- può essere modellato per riscaldamento a temperature relativamente basse (100°C circa);
- è più trasparente del vetro alla luce visibile;
- a differenza del vetro, esistono alcune formulazioni del PMMA che non fermano la luce ultravioletta;
- è trasparente alla luce infrarossa fino a 2800 nm , mentre la luce di lunghezze d'onda maggiore viene sostanzialmente bloccata. Esistono specifiche formulazioni di PMMA atte a bloccare la luce visibile e a lasciar passare la luce infrarossa di un dato intervallo di frequenze (usate, ad esempio, nei telecomandi e nei sensori rivelatori di fonti di calore).

Pezzi di PMMA possono essere saldati a freddo usando adesivi a base di CianoAcrilati oppure sciogliendone gli strati superficiali con un opportuno solvente (diclorometano o cloroformio). La giuntura che si crea è quasi invisibile. Gli spigoli vivi del PMMA possono inoltre essere facilmente lucidati e resi trasparenti.

Il PMMA brucia in presenza di aria a temperature superiori a 460°C ; la sua combustione completa produce anidride carbonica e acqua.

Analogo al PMMA, ma con un atomo di idrogeno al posto del gruppo metile che sorge dalla catena principale, è il Polimetilacrilato, un polimero che si presenta come una gomma morbida.

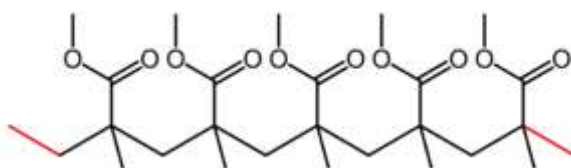


Figura 2-3: catena polimerica del PMMA

Tra gli esempi delle sue applicazioni si annoverano i fanali posteriori delle automobili, le barriere di protezione negli stadi e le grandi finestre degli acquari. Viene usato anche nella produzione dei "laser disc" (videodischi) e occasionalmente nella produzione dei DVD. La vernice acrilica consiste essenzialmente di una sospensione di PMMA in acqua, stabilizzata con opportuni composti tensioattivi, dato che il PMMA è idrofobo.

Il PMMA possiede un buon grado di biocompatibilità con i tessuti umani, viene per questo usato nella produzione di lenti intraoculari per la cura della cataratta. Anche le lenti a contatto rigide sono realizzate con questo polimero; alcuni tipi di lenti a contatto morbide sono invece realizzate con polimeri simili, dove però il monomero acrilico ospita sulla sua struttura uno o più gruppi ossidrilici, in modo da rendere il polimero maggiormente idrofilo come l'idrossietilmetacrilato (HEMA).

In ortopedia il PMMA è usato come fissante di impianti, per rimodellare parti di osso perdute o per riparare vertebre fratturate (vertebroplastica). Viene commercializzato in forma di polvere da miscelare al momento dell'uso con metacrilato di metile (MMA) liquido per formare una pasta che indurisce gradualmente. Nei pazienti trattati in questo modo, l'odore del metacrilato di metile può essere percepibile nel loro respiro. Benché il PMMA sia biocompatibile, l'MMA è una sostanza irritante. Anche le otturazioni dentali sono realizzate in modo analogo. In chirurgia estetica, iniezioni di microsfere di PMMA sotto pelle vengono usate per ridurre rughe e cicatrici.

Il PMMA è un materiale sensibile alla corrente che lo attraversa e perciò viene utilizzato anche nell'industria microelettronica nei processi di litografia elettronica. Utilizzato pure per l'elevata conducibilità della luce viene impiegato anche per la realizzazione di fibra ottica.

In radiologia il Perspex è usato per la creazione di fantocci usati per ricerca o per le prove di qualità.

La migliore qualità di lastre in PMMA è certamente ottenuta per colata di uno sciropo acrilico ottenuto prepolimerizzando in reattore agitato il monomero di MMA. La grande esotermicità legata però alla polimerizzazione del prodotto rende possibile per la maggioranza dei produttori l'ottenimento di lastre di spessore non superiore ai 3 cm. Oltre questo spessore pochi produttori al mondo possiedono impianti e tecnologie per polimerizzare il PMMA sotto forma di blocco fino a spessori anche

superiori ai 400 mm. Il destino primario di detti blocchi è artistico (come materia prima per sculture altrimenti non realizzabili con il cristallo), apparecchi medicali e lenti di grossa dimensione, finestrature per i sottomarini e pareti trasparenti per gli acquari oceanici.

Poli Alchilcianoacrilati

I CianoAcrilati (CA) sono delle resine acriliche utilizzati da oltre cinquant'anni nelle più svariate applicazioni quali l'elettronica, la meccanica, la biomedica e la modellistica. L'applicazione commerciale più nota è la produzione di colle acriliche super adesive come ad esempio la SuperGlue prodotta dal marchio Loctite.

I CianoAcrilati furono inventati nel 1942 da un impiegato dell'azienda Kodak, l'Ing. Harry Coover che, durante alcuni esperimenti finalizzati alla produzione di una speciale plastica da utilizzare come mirino nelle armi, si rese conto della forte e rapida azione adesiva di questi polimeri. L'utilizzo originariamente pensato per i CA non ebbe fortuna a causa della scarsa trasparenza di tali polimeri, ma si diffusero rapidamente numerose altre applicazioni.

Il CA monomero è prodotto tramite una reazione a due stadi. Nella prima fase un cianoacetato reagisce con formaldeide in ambiente basico per ottenere un polimero Poli-Alchil- α -CianoAcrilato (PACA). Nella seconda fase il polimero formato è depolimerizzato, purificato e infine stabilizzato in forma monomerica con un inibitore della polimerizzazione, per evitare la ripolimerizzazione del monomero.

Questo tipo di processo venne brevettato nel 1956 da Ardis, che propose una reazione basata sulla condensazione dell'alchil-cianoacetato con una soluzione acquosa di formaldeide, commercialmente nota come Formalina. Questa soluzione contiene tra il 33% e il 40% in peso di formaldeide. Risulta inoltre necessaria l'aggiunta di un catalizzatore basico per iniziare la reazione. Da questo primo stadio si ottengono una componente acquosa ed una polimerica che devono essere separate. Il polimero così ottenuto contiene ancora sostanziali quantità di acqua, che deve essere completamente eliminata prima di procedere con la depolimerizzazione. Questo processo risulta di per sé complicato in quanto il polimero intrappola tenacemente molecole d'acqua all'interno delle catene e richiede quindi la

permanenza in un forno a vuoto spinto per un periodo tra le 24 e le 36 ore. Indagini sperimentali hanno evidenziato come sia sufficiente una minima quantità residua di acqua per innescare la ripolimerizzazione del monomero ottenuto dopo il riscaldamento, nonostante l'aggiunta di un inibitore della reazione come il diossido di zolfo. Il CA monomero che si ottiene con questo metodo non è quindi stabile nel tempo e non può essere conservato per utilizzi non immediati.

Per produrre il polimero l'acido cianoacrilico reagisce con la formaldeide, solo in presenza del catalizzatore basico OH che va a legarsi al primo atomo di carbonio della catena, rendendo la molecola polare. Il doppio legame presente tra gli atomi di carbonio della catena principale non conferisce stabilità alla molecola, che comincia ad allungarsi molto velocemente fino al raggiungimento di un equilibrio tra cationi e anioni che determina l'arresto dell'allungamento.

Per ottenere un monomero più stabile, venne proposto da Joyner e Hawkins nel 1955 di far reagire il cianoacetato con formaldeide, o con un suo polimero, in un solvente organico non acquoso sempre in presenza di un catalizzatore basico. La quantità necessaria di catalizzatore è minima (tra lo 0,001 e lo 0,5 %) considerando l'elevata reattività del cianoacetato. Una quantità maggiore di catalizzatore risulterebbe anzi svantaggiosa, in quanto verrebbe trasportato senza reagire sia durante la polimerizzazione sia durante la successiva depolimerizzazione contribuendo all'instabilità del monomero. Ogni traccia d'acqua presente durante la polimerizzazione deve comunque essere asportata. Per questo motivo viene utilizzato un solvente come il benzene che formi un azeotropo con l'acqua, permettendone la simultanea distillazione. La prima fase della reazione permette di ottenere un polimero con un bassissimo grado di umidità e si può così direttamente procedere con la fase di depolimerizzazione, riscaldando il polimero ottenuto a temperature relativamente basse. Grazie all'aggiunta di un inibitore di polimerizzazione, si ottiene un monomero stabile sostanzialmente anidro. Particolarmente efficace è risultato l'utilizzo di un inibitore gassoso come il diossido di zolfo (SO₂), che viene miscelato ai vapori di monomero che si formano durante la depolimerizzazione. Nel momento in cui questi vapori condensano, il diossido di zolfo rimane disciolto nel monomero, garantendone la stabilità. Altri inibitori che permettono di stabilizzare ulteriormente il monomero sono il pentossido di fosforo che è aggiunto durante la depolarizzazione, e l'idrochinone, utilizzato per ricoprire l'interno del pallone dove sono raccolti i vapori di monomero.

Il monomero ottenuto può essere successivamente modificato, andando ad alterare il gruppo -COOR per ottenere dei composti con diverse lunghezze di catena e con diverse proprietà chimico-fisiche. Gli Alchil-CianoAcrilati (ACA) sintetizzati più comunemente sono il Metil-CianoAcrilato (MCA), l'Etil-CianoAcrilato (ECA), il Butil-CianoAcrilato (BCA) e Ottil-CianoAcrilato (OCA) (Figura 2-4).

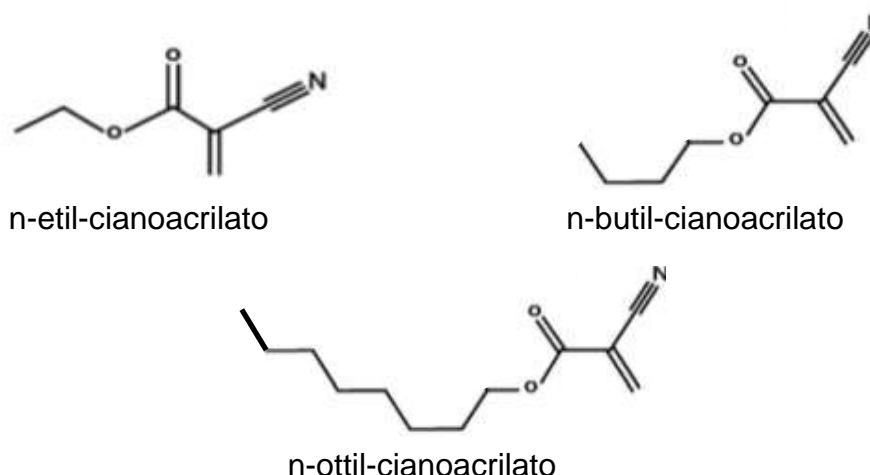


Figura 2-4: Monomeri di n-etil-CianoAcrilato, n-butil-CianoAcrilato e n-ottil-CianoAcrilato.

I CianoAcrilati sono principalmente utilizzati come colla, sia per uso domestico che per uso commerciale. A contatto con i gruppi idrossile presenti in acqua o nell'umidità dell'aria, il CA monomero reagisce, attivando la reazione di polimerizzazione anionica che porta alla formazione di lunghe catene polimeriche. La reattività del monomero è molto elevata e la reazione viene attivata dalla semplice umidità dell'aria. A temperatura ambiente la polimerizzazione è completa dopo al massimo un minuto e, una volta completata la reazione, lo strato di colla applicato ha già una tenuta molto elevata. Le colle cianoacriliche sono particolarmente indicate per incollare superfici non porose, superfici metalliche, per incollare materiali diversi, materie plastiche o ceramiche, ma non le rende indicate per superfici vetrose.

Le colle cianoacriliche sono adoperate nelle più svariate applicazioni. Quotidianamente vengono utilizzate come colle di precisione ad esempio dagli appassionati di modellistica. In elettronica vengono utilizzate per l'assemblaggio di

circuiti integrati o per il fissaggio di trasduttori piezoelettrici per la misura di emissioni acustiche, test a ultrasuoni e per tomografie, tutti ambiti per i quali è necessario un buon accoppiamento tra sensore e la superficie di supporto. In casi in cui tra un esperimento e l'altro si debba invece rimuovere il sensore, l'eccessiva tenacia delle colle cianoacriliche non permette il riassetto del set sperimentale di trasduttori, rendendolo svantaggioso rispetto ad adesivi più malleabili come la plastilina.

Un'applicazione recente è l'utilizzo dei CianoAcrilati nel campo delle investigazioni forensi, con l'analisi delle impronte digitali sulla scena di un crimine. Semplice e nota da più di un secolo è la tecnica di rilevamento di impronte tramite polveri igroscopiche che si legano alle componenti acquose dell'impronta. Se le impronte sono vecchie o la superficie è porosa, come nel caso di un tessuto, le impronte sono difficilmente rilevabili e le tecniche tradizionali non portano benefici. Tecnica sviluppatasi molto recentemente è la ricopertura della superficie in questione con un vapore di CianoAcrilato che a contatto con l'impronta comincia a polimerizzare. Il sottile strato di polimero che si forma permette di ottenere un rivestimento che segue esattamente la forma dell'impronta presente, rendendola visibile. Il vapore cianoacrilico diminuisce la sua efficacia se l'impronta lasciata si secca, come nei casi in cui trascorre molto tempo tra il momento in cui l'impronta viene lasciata e quello in cui viene rilevata.

Nella loro forma monomera, gli Alchilcianoacrilati vengono utilizzati in campo medico da quasi cinquant'anni sfruttando le loro proprietà adesive. Solo a partire dagli anni '80 del secolo scorso i PACA hanno trovato impiego in forma polimerica come nanoparticelle per il rilascio di farmaci. Attualmente questi polimeri sembrano essere i materiali più promettenti per lo sviluppo di sistemi colloidali per il rilascio di farmaci, grazie ai vantaggi creati dalla degradazione del polimero e alla buona tolleranza *in vivo*. Le nanoparticelle di PACA studiate comprendono le nanosfere, le nano capsule contenenti olio e acqua e le nanosfere *core-shell*, prodotte a partire dal monomero o direttamente dal polimero.

La polimerizzazione in emulsione è un approccio molto comune per sintetizzare polimeri colloidali come le nanosfere. Nel 1979 Couvreur utilizzò per primo i CianoAcrilati per creare nanoparticelle biodegradabili con questo metodo. La polimerizzazione anionica viene generalmente condotta in un ambiente acquoso e

iniziata proprio dagli ioni idrossile dell'acqua. I principali parametri utilizzati per controllare la reazione di un monomero così reattivo sono il pH, la temperatura di reazione e la quantità di inibitore presente nel monomero, come ad esempio l'SO₂. Risulta inoltre importante favorire la solubilità dei farmaci all'interno delle nanosfere di PACA. Questo risultato può essere raggiunto aggiungendo le ciclodestrine, degli oligosaccaridi ciclici che hanno la capacità di favorire l'associazione tra farmaci poco idrosolubili e le particelle di PACA. Un altro aspetto importante da tenere presente è la capacità di certi farmaci di iniziare la polimerizzazione del monomero causando la riduzione dell'azione farmacologica del composto *in vivo*. Questa reazione può essere però sfruttata per promuovere legami tra i PACA e il composto per aiutare l'associazione tra i due, fondamentale per due obiettivi, quello di ottenere particelle tracciabili, marcandole ad esempio con metalli radioattivi, e quello di produrre nanosfere con proprietà superficiali modificate, ricoperte di macromolecole che ne aumentano ulteriormente la biocompatibilità.

Con questo metodo si preparano nanocapsule con un nucleo liquido ricoperte da un sottile strato di polimero. Si possono effettuare reazioni con emulsioni acqua-in-olio o olio-in-acqua. Nel primo caso si crea una fase organica di olio, CianoAcrilato e farmaco che viene aggiunta nel solvente acquoso dove è presente un surfattante idrofilico. Tramite agitazione si creano goccioline di olio, stabilizzate dal surfattante, sulla cui superficie avviene la polimerizzazione del CianoAcrilato e si fa evaporare il solvente. Grazie all'elevata velocità di polimerizzazione si possono inserire nelle nanocapsule altre molecole altamente idrosolubili, come l'insulina. Nel secondo caso si ottengono nanocapsule tramite una microemulsione acqua in olio, con nanoparticelle acquose in solvente organico. Si inserisce il monomero che polimerizza in contatto con la superficie delle micelle. Nanocapsule ottenute in questo modo sono di speciale interesse per incapsulare molecole idrosolubili come peptidi e acidi nucleici. Per essere somministrate nell'organismo queste particelle devono essere separate dalla fase organica tramite centrifugazione e trasferite in solvente puramente acquoso con aggiunta di altro surfattante che le stabilizzi.

Capitolo 2.2: Preparazione delle nanoparticelle

La prima fase di lavoro della tesi ha riguardato lo studio dei processi di preparazione delle nanoparticelle e la ricerca dei metodi di produzione standardizzabili, per ottenerle delle caratteristiche desiderate.

Le particelle sono preparate con metodi di emulsione olio in acqua (O/W) stabilizzate da surfattanti sterici o ionici.

Sono stati considerati due metodi di preparazione delle nanoparticelle.

Un processo parte dal polimero già formato e che per sonicazione produce l'emulsione, e un'altroche invece consiste nella vera e propria polimerizzazione in emulsione, che parte dal monomero aggiunto alla fase acquosa.

I processi di produzione dell'emulsione di nanoparticelle sono semplificabili come un'operazione di mixing di una fase organica e di una acquosa sotto agitazione.

Le variabili che sono state manipolate durante la preparazione sono state:

- il tipo di polimero
- il tipo di surfattante
- i tempi di agitazione e di alimentazione dei reagenti
- la potenza dell'agitazione
- i volumi trattati
- la temperatura del processo
- il pH delle soluzioni

Modificando una o più variabili è stato possibile realizzare nanoparticelle polimeriche differenti, adattandole allo scopo applicativo.

Capitolo 2.2.1: Il polimero

Il polimero è il componente strutturale delle nanoparticelle. Si vuole realizzare nanoparticelle utilizzabili in campo farmacologico perciò bisogna porsi nelle

condizioni affinché queste possano essere biocompatibili e possibilmente anche biodegradabili. Le caratteristiche chimico fisiche del polimero determinano il rilascio del farmaco o in generale del composto disciolto all'interno delle particelle. Il peso molecolare, la struttura chimica e la cinetica di decomposizione sono i parametri che si vuole controllare.

Nei lavori svolti si è voluto indagare solo alcune classi di polimeri. Il criterio di scelta è stato basato più sull'interesse che la letteratura scientifica propone.

E' importante sottolineare che i metodi di produzione delle nanoparticelle che sono utilizzati, sono processi tipici presenti nelle industrie del settore delle vernici o dei saponi. Generalmente le emulsioni prodotte hanno l'1% di fase polimerica dispersa.

I polimeri utilizzati per la produzione delle nanoparticelle sono stati l'Acido Polilattico, il Polimetilmetacrilato e i PoliAlchilcianoacrilati, in particolare il Poli-etilcianacrilato e il Poli-butilcianacrilato.

Capitolo 2.2.2: La fase acquosa

Lavorando in campo biologico è stato pensato di produrre le nanoparticelle in una fase acquosa che fosse biocompatibile. In alternativa all'acqua distillata, fase disperdente tipicamente utilizzata per questo tipo di emulsioni, si può utilizzare la soluzione fisiologica che consiste in una soluzione acquosa di sali di NaCl allo 0.9% (0,154 M). Tale soluzione ha il vantaggio di essere alla concentrazione salina pari a quella del sangue e questo dovrebbe consentire una maggiore affinità tra l'emulsione e l'organismo nel momento in cui questa entra in circolazione. Dal punto di vista della preparazione dell'emulsione non si hanno differenze nella conduzione del processo. La presenza di NaCl nella preparazione finale, aumenta la forza ionica dell'emulsione. Questo determina la diminuzione del potenziale elettrostatico di interazione tra le particelle portando una maggiore capacità di aggregazione delle particelle fra loro. A parità di emulsioni prodotte si ha una diminuzione della stabilità cinetica dell'emulsione prodotta con fisiologica rispetto a quella in acqua distillata.

In farmacologia è solito utilizzare anche una soluzione tampone che mantenga il pH al valore fisiologico di 7.4, il tampone Fosfato (Phosphate Buffer Saline, PBS). Questo buffer è una soluzione acquosa contenente i seguenti sali alle seguenti concentrazioni:

[NaCl]	137mM
[KCl]	2,7mM
[Na ₂ HPO ₄]	10mM
[KH ₂ PO ₄]	1,76mM

A queste concentrazioni saline, il PBS viene chiamato 1x. Con 10x si identifica il tampone Fosfato concentrato 10 volte ([Na₂HPO₄]=100mM).

Un organismo vivente è in grado di compensare locali variazioni di concentrazione salina o di pH attraverso un sistema tampone del sangue. Perciò qualora si immettesse nella circolazione sanguigna una piccola dose di emulsione prodotta con acqua distillata, non comporta alcuno scompensamento nell'animale trattato. Allo stesso modo se l'emulsione fosse a pH acido anziché a quello fisiologico.

E' però necessario svolgere i test sulle nanoparticelle in queste condizioni di salinità e di pH, così da avere il più possibile completa la conoscenza del loro comportamento una volta introdotte nell'organismo.

Capitolo 2.2.3: Il surfattante

Il surfattante, che solitamente è un detergente, stabilizza l'emulsione depositandosi sulla superficie delle nanoparticelle impedendone l'aggregazione.

I tipi di surfattanti utilizzati sono di tipo sterico, come il Polisorbato80 (conosciuto con il nome commerciale di Tween80, prodotto dalla ICI Americas Inc.), o di tipo anionico, come il Sodio Dodecil Solfato (SDS, prodotto dalla Fluka).

Il Tween80 (Figura 2-5) è un surfattante sterico di peso molecolare pari a 1310 g/mol e densità circa unitaria. E' costituito da una parte (testa) idrofila grazie ai gruppi ossidrilici e da una parte lipofila (coda) costituita da una catena di carboni saturi. In acqua è solubile e si disperde sotto forma di micelle, sfere di circa 3 nm con la coda

di Polisorbato all'interno e le teste rivolte verso l'esterno. In presenza di una fase oleosa come ad esempio il polimero, il surfattante si interpone tra le due fasi acquosa e polimerica andando a costituire le nanoparticelle. La stabilità dell'emulsione è ottenuta per stericità delle teste che diminuiscono l'efficacia degli urti tra le particelle stesse.

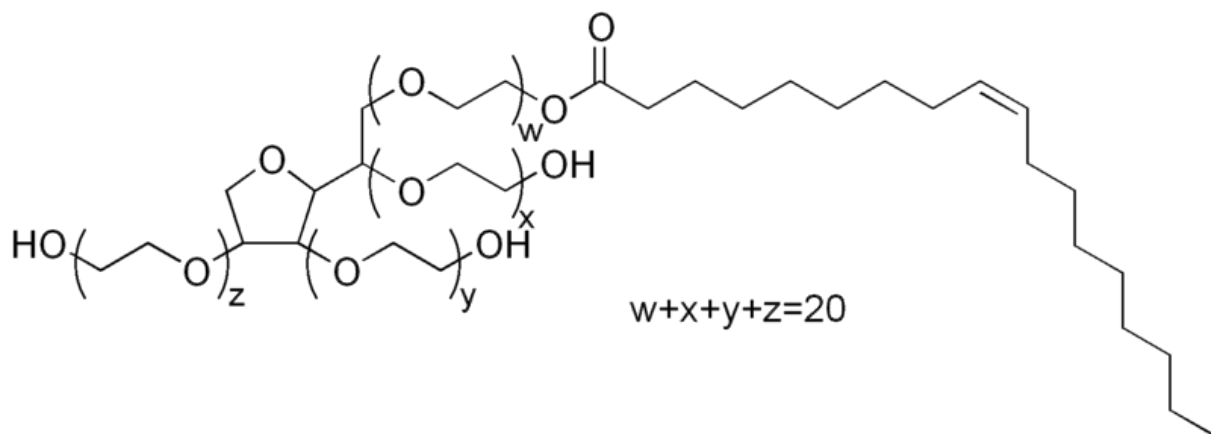


Figura 2-5: struttura della molecola di Polisorbato 80

L'SDS (Figura 2-6) è invece un surfattante anionico con peso molecolare 288 g/mol, densità unitaria e solubile in acqua. E' caratterizzato da una testa polare costituita da un gruppo solfato e da una coda, catena satura di dodici carboni.

A differenza dei surfattanti sterici, in questo caso l'urto tra le particelle in emulsione viene contrastato dalla repulsione elettrostatica. La testa anionica del surfattante fornisce alle particelle un potenziale elettrostatico di tipo negativo e, l'interazione tra i potenziali di due particelle in linea di collisione, ne impedisce l'urto efficace all'aggregazione preservando così la stabilità del sistema emulsione.

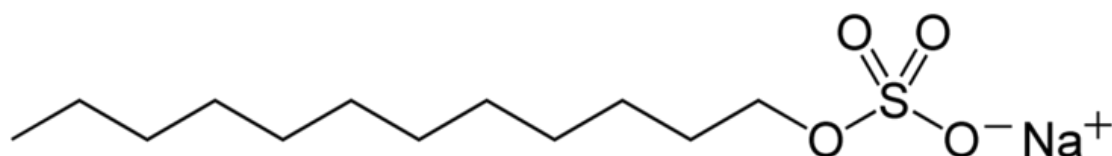


Figura 2-6: struttura della molecola del Sodio Dodecil Solfato

Capitolo 2.2.4: I processi sviluppati

Per produrre le nanoparticelle si sono utilizzati dei metodi esistenti, prodotti dall'esperienza nel settore da parte dei professori del nostro dipartimento. I processi utilizzati sono di due tipi, quello di polimerizzazione in emulsione e quello di emulsione del polimero. Verranno di seguito definiti entrambi metodi.

Processo 1: emulsione di nanoparticelle da polimero già sintetizzato

Questo è un processo di produzione di nanoparticelle a partire dal polimero già sintetizzato.

Le operazioni preliminari di questo processo sono la produzione del polimero, la sua soluzione in un solvente organico e la soluzione del surfattante in un solvente acquoso.

La prima operazione consiste nel produrre il polimero con le caratteristiche desiderate e ottenerlo in forma secca, disidratata. I polimeri utilizzati per questo studio sono stati sintetizzati in laboratorio, come il caso dei Polialchilcianoacrilati, oppure commissionati allo Swiss Federal Institute of Technology Zurich ETHZ, come l'Acido Polilattico.

La produzione di Polibutilcianoacrilato e Polietilcianoacrilato è stata eseguita per polimerizzazione anionica, che è un tipo di polimerizzazione a catena. Un nucleofilo, quale lo ione ossidrile (OH^-) presente nell'acqua, reagisce con il carbonio primario insaturo del monomero di CianoAcrilato. La rottura conseguente del doppio legame genera lo spostamento della carica (negativa) sul carbonio terziario, formando un enolato. L'enolato diventa perciò l'iniziatore della polimerizzazione perché andrà a reagire con il doppio legame di un monomero secondo il meccanismo rappresentato in Figura 2-7. La reazione termina in presenza di un catione proveniente dall'acqua o da un alcol.

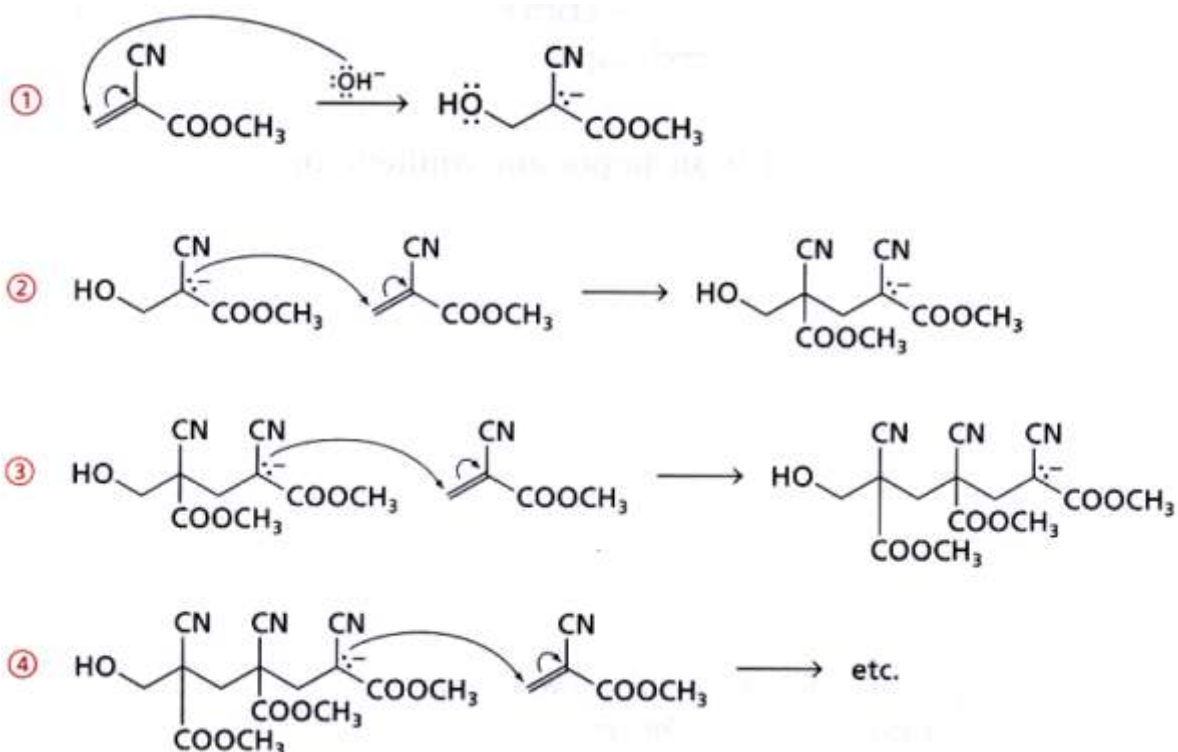


Figura 2-7: schema delle reazioni della polimerizzazione anionica del MetilCianoAcrilato.

Queste reazioni sono caratterizzate da una alta velocità di iniziazione, una elevata esotermicità e la particolarità di formare catene di polimero riattivabili in presenza di monomero.

In particolare, la polimerizzazione è stata condotta come descritto di seguito.

Si provvede ad anidrificare del Tetraidrofurano (THF) con Zeoliti qualche giorno prima dell'utilizzo.

1 ml di monomero di AlchilCianoAcrilato (Henkel Biomedical, Dublin, Ireland), in particolare Etil- e Butil-CianoAcrilato, conservati in un frigorifero a 5°C e inibiti da acido n-para-toluen-solfonico allo 0,5%, è stato aggiunto a 50 ml di THF anidro e la polimerizzazione è stata attivata aggiungendo 100 μl di H_2O distillata.

Si agita manualmente la soluzione per qualche secondo.

Il sistema viene mantenuto a temperatura ambiente per 2 ore e poi trasferito in un pallone per l'evaporazione del solvente con l'uso di un evaporatore rotante (Rotavapor R-114, Büchi) dove si imposta la temperatura del bagno d'acqua a

80°C ($T_{b,THF}=66^{\circ}C$). Dopo circa un'ora di evaporazione si ottiene il polimero secco sulle pareti del pallone. Vengono aggiunti 10 ml di diclorometano (CH_2Cl_2), anidrificato allo stesso modo del THF. Il pallone viene poi agitato con cura per recuperare il polimero dalle pareti e ottenere una miscela oliosa di polimero al 10% in solvente acquoso.

E' possibile variare le quantità di solvente e polimero, mantenendo però fissi i seguenti rapporti:

- Monomero/THF = 1g/50ml
- Iniziatore H_2O = 100 μ l
- Polimero secco/ CH_2Cl_2 = 1g/10ml

L'Acido Polilattico (Figura 2-8) invece lo si ha già nella forma sintetizzata da D-lactide nella forma PDLA, del peso di 10 kDa, già utilizzabile per produrre le nanoparticelle.

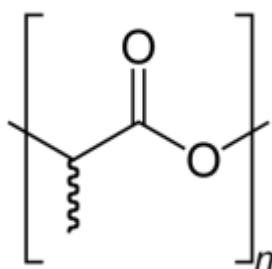


Figura 2-8: struttura molecolare dell'acido polilattico.

Il polimero secco viene sciolto in un solvente organico affine quale il diclorometano (CH_2Cl_2), che ha una alta volatilità. Questo solvente ha una temperatura di ebollizione di 40°C ed ha una bassa solubilità in acqua (20g/l). L'operazione di dissoluzione del polimero secco nel solvente è necessaria perché si possa alimentare con una corrente liquida il polimero al reattore. Una volta ottenuta l'emulsione, il solvente deve essere eliminato per evaporazione. Il polimero viene disciolto in rapporto 1:10 (m/v) con il solvente, ottenendo così una soluzione organica di 1 g di polimero in 10 ml di solvente. Per l'operazione ci si avvale dell'utilizzo di un matraccio o di un vial.

Un reattore termostato con camicia esterna (del tipo Figura 2-9) viene riempito con 50ml di acqua nella quale sono disciolti 500 mg di surfattante.



Figura 2-9: reattore termostato in PIREX con camicia esterna. La camera di reazione viene alimentata dei reagenti attraverso l'apertura superiore che può essere anche chiusa con il proprio coperchio. La camicia esterna invece viene riempita di fluido refrigerante o riscaldante che attraverso un collegamento di tubi con un serbatoio e una pompa, viene fatto circolare passando dall'ingresso (apertura IN) all'uscita (apertura OUT).

La fase organica può essere aggiunta tutta in una volta, all'inizio del processo o con un flusso di portata in un arco di tempo. Il secondo metodo è preferibile perché un sistema semi-Batch risulta più efficiente in fatto di recupero di polimero in particelle. Nel reattore alla fine del processo si vuole ottenere il 100% del polimero alimentato in emulsione e non come corpo di fondo.

L'agitazione può essere effettuata con due diversi strumenti, quali l'agitatore magnetico e il sonicatore a sonda (UP200S, Hielscher, Germania). Quest'ultimo non

garantisce l'omogeneità del sistema, ma fornisce potenze superiori all'altro. È preferibile lavorare con entrambi gli strumenti in contemporanea, di modo che si abbia la massima potenza di agitazione in un sistema continuamente omogeneo. La termodinamica del sistema semi-Batch garantisce efficienze elevate per tempi prolungati dell'alimentazione e del tempo di processo rispetto l'alimentazione.

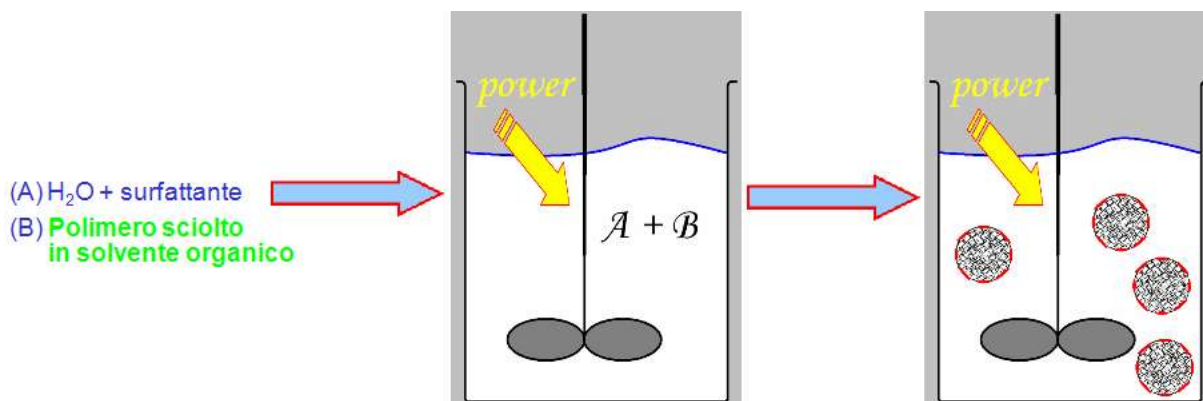


Figura 2-10: schema del processo di produzione di nanoparticelle a particelle dal polimero già sintetizzato.

In particolare, per produrre emulsioni di nanoparticelle di PDLA stabilizzate con SDS, sono state condotte le seguenti operazioni.

In 200 ml di acqua distillata vengono sciolti 2 g di SDS. Agitando in modo blando si ottiene una soluzione omogenea, dalla quale si preleverà il volume da destinare al processo. Questo, tipicamente 25 ml viene travasato nel reattore.

Separatamente viene fatto sciogliere 1g di PDLA (MW=10 kDa) in 10ml di CH_2Cl_2 , e raggiunta la soluzione completa è possibile utilizzarlo per alimentarlo nel reattore.

Per avere un'emulsione con 1:100 (m/v) di polimero in acqua, occorre alimentare 2,5 ml di fase oliosa.

Il processo inizia con l'immissione con portata costante (<4.5 ml/h) del polimero in fase oliosa all'interno del reattore, con una pompa programmabile (Lambda VIT-FIT).

Il reattore mantenuto agitato da una ancorotta magnetica rotante a 950 rpm e dal sondatore a sonda che, generando vibrazioni a 30 kHz, agita

maggiormente la soluzione contribuendo a formare particelle di dimensioni nanometriche. Per il sonicatore sono mantenute costanti l'ampiezza di emissione dell'onda (55% della massima emettibile) e la frequenza della pulsazione (cycle = 1). E' importante mantenere la punta del sonicatore appena al di sotto del pelo libero perché si fornisca energia a tutto il volume del liquido.

Terminata l'alimentazione, l'agitazione viene mantenuta per qualche ora fino ad arrivare ad una durata complessiva di 4 ore di processo.

Per tutto il tempo del processo il sistema viene mantenuto ad una temperatura di 25°C attraverso un flusso d'acqua a 20°C passante per la camicia esterna del reattore. Al termine delle 4 ore, viene spento il sonicatore e viene alzata la temperatura a circa 60°C per 20 min. Questa operazione consente di far evaporare ogni traccia di solvente organico.

A seconda delle esigenze è possibile variare le quantità di fase disperdente, di polimero, il tipo di fase disperdente acquosa (H₂O, Fisiologica), il tipo di surfattante (Tween80, SDS) e il tipo di polimero (PECA, PBCA o PLA), mantenendo però fissi i seguenti rapporti:

- Surfattante / fase acquosa = 1g/100ml
- Polimero / fase acquosa = 1g/100ml

Processo 1 di preparazione delle nanoparticelle da polimero già sintetizzato, con incorporamento di molecole traccianti o farmaco

Questo processo è una modifica del *Processo 1* descritto in precedenza, sviluppato per ottenere un'emulsione di nanoparticelle che contengano un tracciante fluorescente o un farmaco e che comporta un diverso tipo di fase oliosa alimentata al reattore. Alla miscela di polimero 1:10 (m/v) in diclorometano viene aggiunta una soluzione in diclorometano contenente il tracciante o il principio attivo che si vuole incorporare nelle particelle. E' necessario che tali molecole siano idrofobe, o meglio

lipofile, perché possano rimanere nelle nanoparticelle per affinità al polimero rispetto all'acqua.

Per incorporare un tracciante fluorescente, in un piccolo becker o un vial viene preparata una soluzione di 10ml di diclorometano contenente 1mg di fluoroforo. Quando la dissoluzione del tracciante è completa (anche se generalmente è immediata), viene prelevato un volume di 2,5ml e viene aggiunto a 2,5ml di soluzione di polimero in diclorometano come visto nel *Processo 1* (polimero/solvente= 1:10 m/v). Questo per avere un rapporto finale tra fluoroforo e polimero di 1:1000 (m/m). La miscela così ottenuta viene poi alimentata al reattore con una portata doppia rispetto al *Processo 1*, ovvero di 9 ml/h. Anche il tempo viene prolungato a 6 ore per garantire che tutto il solvente organico venga eliminato adeguatamente.

Per incorporare un principio attivo, si preleva un volume di 2,5 ml di soluzione di polimero in diclorometano (polimero/solvente= 1:10 m/v) e si aggiunge una quantità di farmaco liposolubile tale da ottenere un rapporto farmaco/polimero dell'1% in peso ($10 \text{ mg}_{\text{farmaco}}/\text{g}_{\text{polimero}}$). Si lascia sciogliere bene il farmaco nel solvente organico. La miscela così ottenuta viene poi immessa nel reattore come per il *Processo 1*, ovvero con una portata di circa 4,5 ml/h.

In entrambi i casi è possibile variare i rapporti tracciante/polimero e farmaco/polimero, aumentando o diminuendo le quantità in massa dei composti nella soluzione organica.

Processo 2: preparazione di nanoparticelle per polimerizzazione in emulsione

Questo processo è quello classico impiegato nell'industria di processo. Si tratta infatti del tipico processo STARVED che favorisce la formazione di polimeri a peso molecolare controllato. Si sfrutta la diffusione del monomero in fase acquosa ad accrescere le micelle, e polimerizzando al loro interno forma particelle stabilizzate dal surfattante stesso.

In questo caso la fase oliosa è costituita dal monomero inibito e la reazione viene promossa da iniziatori. Come per il *Processo 1* l'attivazione del monomero non deve essere istantanea e che il processo deve avere una durata superiore rispetto a quello dell'alimentazione.



Figura 2-11: reattore termostato per le reazioni in semibatch.

Viene di seguito spiegato a titolo esemplificativo il metodo di produzione di nanoparticelle di PMMA stabilizzate con SDS.

Un reattore termostato con camicia esterna del tipo Figura 2-9, viene collegato a un agitatore a pale meccaniche e riempito di 200 ml di acqua

distillata in cui sono stati aggiunti 2 g di SDS. Viene mantenuto in agitazione per favorire la soluzione del surfattante.

Una siringa viene riempita con 2 g (circa 2ml perché la densità è di 0.97g/ml) di monomero liquido di Metilmetacrilato inibito (Henkel Biomedical, Dublin, Ireland) che è stato conservato in frigorifero a 5°C.

Viene fatto passare per la camicia del reattore acqua corrente a 80°C, con una cannuccia si rende inerte il volume gassoso del reattore somministrando azoto proveniente dalle linee di laboratorio e si porta l'agitazione a 300 rpm.

Nella camera di reazione sono stati somministrati in una sola mandata 0,08 g di Persolfato di Potassio (KPS), iniziatore della polimerizzazione.

L'alimentazione del monomero al reattore avviene con una portata con una portata di 4,5 ml/h attraverso la siringa collegata a una pompa programmabile (Lambda VIT-FIT).

La reazione procede per 24 ore, dopo le quali il reattore viene spento viene recuperata l'emulsione.

Il processo utilizzato per la polimerizzazione in emulsione degli Alchilcianoacrilati è il medesimo sebbene i parametri applicati siano leggermente differenti. In particolare:

- $T_{\text{processo}} = 60^{\circ}\text{C}$
- Siccome l'iniziatore della polimerizzazione è l'acqua, non serve introdurre l'iniziatore dall'esterno
- Tempo di reazione = 2 ore
- Tempo di alimentazione = 40 min (portata di alimentazione del monomero = 3ml/h)

A seconda delle esigenze sono state variate le quantità di fase disperdente, di polimero, il tipo di fase disperdente acquosa (H_2O , Fisiologica), il tipo di surfattante (Tween80, SDS) e il tipo di monomero (ECA, BCA, OCA o MMA), mantenendo però fissi i seguenti rapporti:

- Surfattante / fase acquosa = 1g/100ml
- monomero / fase acquosa = 1g/100ml

Processo 2 di preparazione di nanoparticelle per polimerizzazione in emulsione, con incorporamento di molecole traccianti o farmaco

Al fine di ottenere un'emulsione di nanoparticelle che contengano un tracciante fluorescente o un farmaco viene apportata una modifica al *Processo 2* visto in precedenza.

In questo caso si aggiunge al monomero una miscela di THF (anidro e inibito con *n*-para-toluen-solfonico) contenente il tracciante o il principio attivo del farmaco che si vuole incorporare nelle particelle. E' necessario che le molecole di tracciante o di farmaco siano idrofobe, o meglio lipofile, perché possano rimanere contenute nelle nanoparticelle per affinità al polimero rispetto all'acqua.

Per incorporare un tracciante fluorescente, 2 ml di una soluzione 100 µg/ml di fluoroforo in THF anidro e inibito, vengono aggiunti a 2 ml di monomero puro. Si ottiene così un rapporto finale tra fluoroforo e polimero di 1:1000 (m/m). La miscela così ottenuta viene poi alimentata al reattore con una portata, allo stesso modo del *Processo 2*, pari a 4,5 ml/h

Se invece si vuole preparare un'emulsione di nanoparticelle contenenti un principio attivo liposolubile, 2 ml di una soluzione di 100 mg/ml di farmaco in THF anidro ed inibito, vengono aggiunti a 2ml di monomero in modo da ottenere un rapporto farmaco/monomero di $10 \text{ mg}_{\text{farmaco}}/\text{g}_{\text{monomero}}$. La miscela così ottenuta viene poi alimentata al reattore come descritto precedentemente.

In entrambi i casi è possibile variare i rapporti tracciante/polimero e farmaco/polimero, aumentando o diminuendo le quantità in massa dei composti nella soluzione organica.

Capitolo 2.3: Caratterizzazione delle nanoparticelle

Le nanoparticelle sono state caratterizzate utilizzando la tecnica del Laser Light Scattering (LLS) e l'analisi al Microscopio a Forza Atomica (AFM).

Il LLS, nella fattispecie un LLS Dinamico, è il metodo d'elezione per la determinazione delle dimensioni delle nanoparticelle in emulsione. I dati ottenuti sono poi stati confrontati con quelli derivati dalle analisi condotte con l'AFM.

Con il LLS viene fornita un'informazione sulla distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle in emulsione, mentre con l'AFM viene determinata la geometria delle particelle. Per monitorare eventuali cambiamenti conformazionali e la formazione di eventuali aggregati, è importante condurre queste analisi in parallelo.

Laser-Light Scattering

In fisica la dispersione, o *scattering*, si riferisce a un'ampia classe di fenomeni dove una o più particelle di un fascio sono deflesse ovvero cambiano traiettoria in seguito alla collisione con altre particelle bersaglio. L'utilizzo principale di questa tecnica è la misura delle dimensioni di particelle nanometriche in sospensioni liquide, sfruttando il metodo della spettroscopia a correlazione di fotoni anche detta *Dynamic Light Scattering*. Il principio di funzionamento si basa sulla misura e sull'analisi delle variazioni d'intensità della luce diffusa dalle nanoparticelle in sospensione, variazioni che sono dovute al loro moto Browniano all'interno di una soluzione. L'andamento temporale dell'intensità diffusa è analizzato da un correlatore. Dalla funzione di correlazione sperimentale che si ricava, è possibile determinare il cosiddetto raggio idrodinamico delle nanoparticelle e, entro certi limiti, la loro distribuzione dimensionale. Con questo metodo è possibile misurare particelle di dimensioni da 3-5 nm fino al loro limite di sedimentazione e cioè alcuni micron.

Il Laser-Light Scattering Dinamico (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) è in grado di definire la dimensione caratteristica di oggetti dispersi in un sistema liquido. Il dato misurato viene restituito come distribuzione gaussiana di valori intorno a un

valore medio (la dimensione caratteristica) e la sua dispersione (deviazione standard). L'accuratezza della misura è maggiore quanto più il campione sia diluito. Perciò maggiore è il libero cammino medio delle particelle, minore è l'interferenza da parte delle altre particelle sul raggio scatterato. La presenza di aggregati rende imprecisa la misura, spostando il valore verso numeri che sovrastimano il diametro della particella singola.

La misurazione viene effettuata automaticamente dalla macchina che proietta il laser attraverso una cuvetta in cui bisogna predisporre un volume di 500 µl di campione.

Atomic-Force Microscope

Il microscopio a forza atomica (Atomic Force Microscopy, AFM) consente di analizzare la disposizione, la viscosità, l'elasticità, le forze di adesione e di frizione e le caratteristiche dielettriche del campione in esame. Nel nostro caso è stato utilizzato per studiare le nostre particelle di polimero e di conseguenza rilevare le dimensioni e la presenza delle diverse forme dovute all'eventuale processo di aggregazione nelle emulsioni.

Un microscopio a scansione di forza è costituito da:

- uno scanner piezoelettrico che consente di muovere il campione in tutte e tre le direzioni;
- un sensore a leva, detto *cantilever*, dotato di punta piramidale che risente delle interazioni con il campione e dei possibili movimenti sia verticali che orizzontali;
- un sensore a fotodiodo che registra i movimenti del raggio laser in rapporto a quelli del *cantilever* (Figura 2-12).

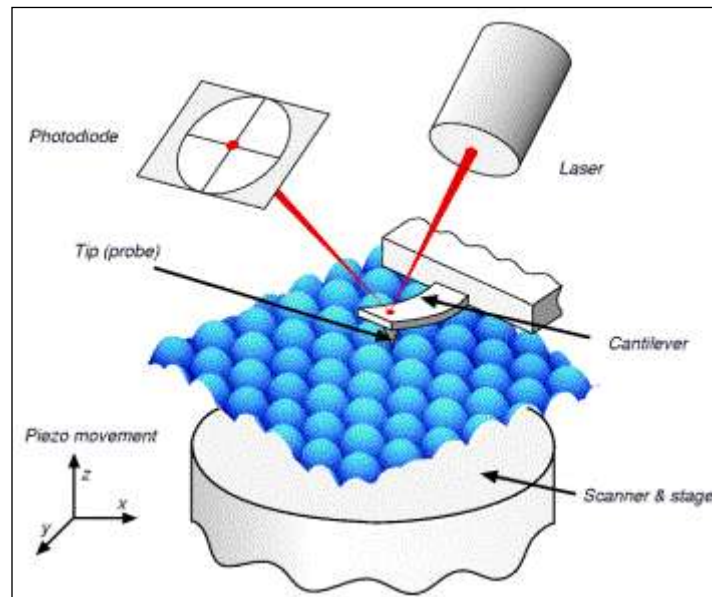


Figura 2-12: Schema di un microscopio a scansione di forza atomica.

La tecnica prevede diversi metodi operativi che permettono di studiare biostrutture rilevandone il profilo 3D grazie alla scansione realizzata con una punta (tip) che viene mossa lungo le direzioni x ed y in due modalità operative differenti: Contact Mode o Tapping Mode. La punta, si trova all'apice di un *cantilever* che viene selezionato con una appropriata frequenza di risonanza ed elasticità per la modalità operativa scelta e le caratteristiche del campione analizzato. La deflessione del *cantilever* che si muove sulla superficie del campione è dell'ordine delle frazioni di nanometro ed è dovuta a forze dell'ordine dei nanoNewton. Per registrare ed amplificare queste forze si sfrutta un sistema ottico costituito da un raggio laser che colpendo la parte superiore del *cantilever* viene riflesso su un fotodiodo che genera un segnale di uscita proporzionale alla posizione del raggio riflesso sulla sua superficie attraverso cui è possibile rilevare gli spostamenti verticali e torsionali della sonda.

La distanza tra la superficie del campione e la punta viene mantenuta costante grazie ad un circuito di feedback basato sul segnale proveniente dal fotodiodo e tutti i movimenti della punta sono possibili grazie a un piezoelettrico che assicura un'alta precisione negli spostamenti lungo i tre assi.

Contact mode: la punta viene sempre mantenuta in contatto con la superficie del campione; responsabili della deflessione della leva sono le forze repulsive di Van der Waals. In questa modalità è necessario lavorare con un *cantilever* che ha una piccola costante elastica per evitare una eccessiva pressione sulla superficie del campione. All'interno di questa modalità operativa è possibile lavorare in:

- **force mode**: la punta viene mantenuta ad un'altezza costante dalla superficie del campione. Questo metodo è molto sensibile ma ha l'inconveniente che accentuate irregolarità della superficie possono produrre grandi forze che danneggiano punta e campione.
- **height mode**: attraverso un circuito di feedback, il piezoelettrico modifica la distanza della punta dalla superficie del campione in modo tale da mantenere costante la forza.
- **error signal** o **deflection mode**: utilizza il circuito di feedback, come nell'height mode, ma elabora il segnale in modo da fornire un'immagine rappresentativa della derivata dell'immagine a forza costante.

Non contact mode: la punta viene mantenuta costantemente a pochi nanometri dalla superficie del campione. In questa modalità si ha una riduzione delle interferenze dovute alle forze laterali e delle interazioni che possono danneggiare i campioni particolarmente morbidi, come micelle, gelatine etc. La punta viene fatta vibrare vicino alla sua naturale frequenza di risonanza e la ricostruzione dell'immagine avviene registrando le variazioni della frequenza di oscillazione. In queste condizioni agiscono le forze attrattive di Van der Waals che sono debolmente dipendenti dalla distanza e quindi non permettono di ottenere un'alta risoluzione laterale.

All'interno di questa modalità operativa è possibile lavorare in:

- **Tapping mode**. Il *cantilever* è fatto oscillare alla sua frequenza di risonanza o molto vicino ad essa; in questo modo la punta ha solo un contatto transiente con la superficie del campione. Con questa tecnica si tende a minimizzare le forze di frizione laterali che potrebbero rovinare il campione e parzialmente alterare i risultati. La forza applicata dalla punta può essere assorbita dalla maggior parte dei campioni senza danneggiamenti, e la costante elastica richiesta è molto elevata per consentire al *cantilever* di avere l'energia potenziale sufficiente per ritrarsi dal campione dopo averlo toccato. L'immagine viene ottenuta registrando i cambiamenti nell'ampiezza di oscillazione del *cantilever*.

- **Phase Imaging.** Rappresenta un'estensione del tapping mode in grado di fornire informazioni sulla struttura superficiale nell'ordine dei nanometri. Mappando, durante la scansione, la fase dell'oscillazione del *cantilever* oltre a tracciare la topografia del campione si riescono a rilevare altre particolarità quali viscosità, elasticità e variazioni della composizione chimica del campione sottoposto a scansione. La risoluzione e la velocità della risposta non cambiano ed è possibile utilizzare questa tecnica per migliorare il contrasto e per fornire osservazioni più chiare sulle strutture fini, come le venature, che possono essere rese scure da una topografia troppo ruvida.

La lettura viene generalmente effettuata in modalità tapping. Per la preparazione del campione è stato necessario prima neutralizzare le cariche negative presenti sul supporto di mica (Figura 2-13). 60 μ l di HCl 10 mM sono stati depositati sulla superficie di mica per 1 minuto e successivamente lavati con 5 ml di acqua bidistillata. Dopo l'asportazione dell'eccesso di HCl, sono depositati 60 μ l dell'emulsione sulla mica ancora umida. Al termine dell'incubazione è stato asportato l'eccesso di campione lavando il supporto con acqua bidistillata, il supporto è stato quindi asciugato con un leggero flusso di azoto prima della scansione.

La punta del *cantilever* è costituita da silice naturalizzata (modello RTESP, fosforo deposited Si 10 Ohm-cm, f_0 246-320 KHz, k:20-80 N/m).

L'analisi di microscopia a forza atomica è stata fatta mediante un MULTIMODE V, costituito da un multimode scanning probe microscope e un nanoscope V controller (Figura 2-14, Veeco instruments INC, Mannheim, Germany).



Figura 2-13: supporto portacampione di mica per le analisi all'AFM.

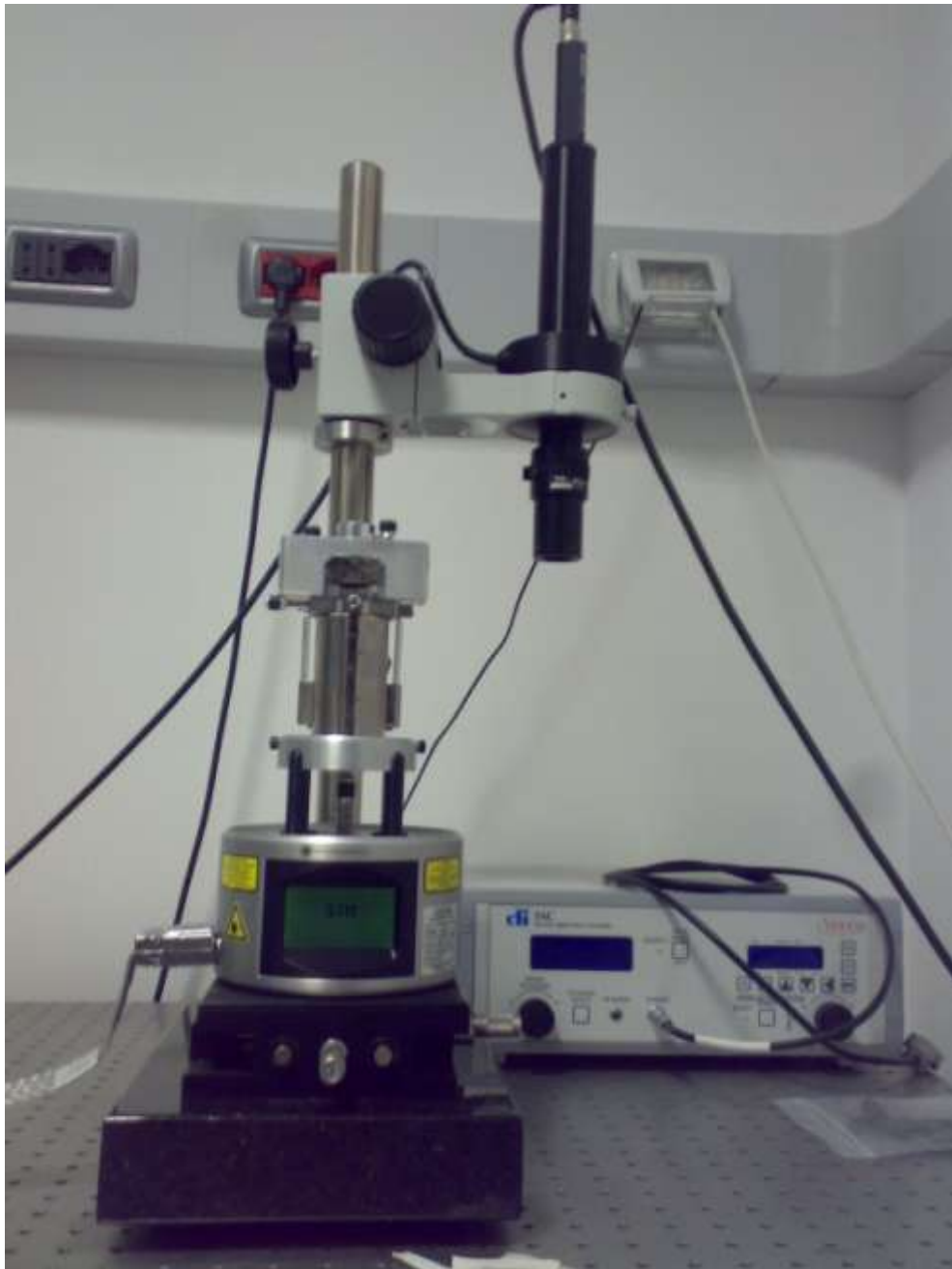


Figura 2-14: il microscopio a forza atomica.

Capitolo 2.4: I test biologici

Le preparazioni di nanoparticelle dopo essere state caratterizzate sono state analizzate eseguendo dei test biologici. Quando si sono raccolte informazioni preliminari sulle nanoparticelle in analisi, poiché lo studio è volto ad uno scopo applicativo in campo biologico è necessario testare l'emulsione con delle prove che forniscano informazioni circa le caratteristiche desiderate per l'applicazione finale.

I test biologici possono essere suddivisi in due categorie: i test *in vitro* e quelli *in vivo*.

I test *in vitro* considerati sono quelli di stabilità dell'emulsione in liquidi biologici e di misura della capacità di incapsulamento di un tracciante e di un farmaco nelle particelle.

I test di stabilità consistono nell'osservazione dei cambiamenti dell'emulsione nel tempo variando le condizioni ambientali in cui sono poste le nanoparticelle. Tra questi rientrano le prove a diverse temperature e quelle in omogenati degli organi rene, fegato, cervello e nel siero del sangue. Questi test prevedono l'utilizzo di un tracciante fluorescente incorporato nelle particelle alla preparazione.

Altre prove *in vitro* invece serviranno per determinare la capacità di inglobamento del farmaco nelle nanoparticelle. Verranno perciò ottimizzati dei metodi di estrazione del farmaco dalle particelle per poi esserne misurata la sua concentrazione.

Con i test *in vivo* invece si vuole determinare la distribuzione delle nanoparticelle nel tempo se somministrata ad un organismo e la misura del loro accumulo nei principali organi.

Capitolo 2.4.1: Metodi di misura della stabilità

Le nanoparticelle polimeriche sono interessate da fenomeni fisici di diffusione, dal moto Browniano e dalla collisione con altre particelle, e da fenomeni chimici di decomposizione del polimero di cui sono costituite.

Caricando le nanoparticelle con una quantità nota di fluoroforo è possibile monitorare come i fenomeni diffusivi nel tempo causino il rilascio del tracciante nell'ambiente esterno alla particella. Questo fenomeno è influenzato attivamente anche dalla degradazione del polimero costituente la nanoparticella.

Insieme a questi fenomeni ci sono anche le dinamiche di collisione tra particelle che in seguito a urti efficaci all'aggregazione, portano alla formazione di aggregati.

Tutti questi fenomeni fisici e chimici contribuiscono a una variazione complessiva dell'emulsione.

Considerando un'emulsione di nanoparticelle caricate con un tracciante fluorescente è possibile determinare nel tempo le variazioni dell'emulsione, somma dei contributi chimici e fisici.

Gli esperimenti sulla stabilità delle nanoparticelle sono quindi stati condotti sulle diverse preparazioni incubandole per tempi diversi e in diverse condizioni di temperatura, in vari liquidi biologici.

Il tracciante fluorescente

Per simulare il rilascio di un farmaco dalle nanoparticelle, o per conoscere la cinetica di degrado delle particelle stesse, è stato pensato di utilizzare una sostanza fluorescente da caricare nelle nanoparticelle. La scelta del tracciante fluorescente è stata fatta considerando principalmente la caratteristica lipofila della molecola affinché potesse essere facilmente caricabile nelle nanoparticelle.

E' stato scelto il Cholesteryl BODIPY® FL C₁₂ prodotto dalla Molecular Probes USA, le cui caratteristiche sono descritte in Figura 2-15.

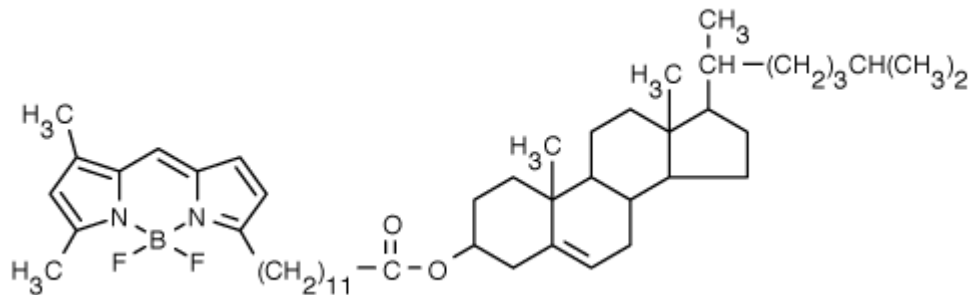


Figura 2-15: struttura molecolare del cholesteryl 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoate ($C_{50}H_{77}BF_2N_2O_2$). MW: 786.98 g/mol. Fluorescence Excitation wavelength: 500 nm. Fluorescence Emission wavelength: 510 nm.

Il fluorimetro

Il fluorimetro è lo strumento dedicato alla misura della intensità di fluorescenza. Questa proprietà della molecola è apprezzabile solo quando si esegue una eccitazione elettronica e per effetto si rileva l'onda emessa, chiamata appunto Fluorescenza.

Il valore restituito dalla macchina è indicato su una scala di intensità ed è fondamentale settare i parametri di lunghezza d'onda di eccitazione ed emissione, ai quali operare. La lunghezza d'onda di eccitazione è la caratteristica desiderata del raggio di eccitazione col quale si promuove il salto elettronico che libera onde elettromagnetiche ad una lunghezza d'onda superiore, ovvero la lunghezza di emissione (energia minore).

Ogni fluoroforo ha una sua curva caratteristica (o spettro) di eccitazione ed una curva caratteristica di emissione (Figura 2-16).

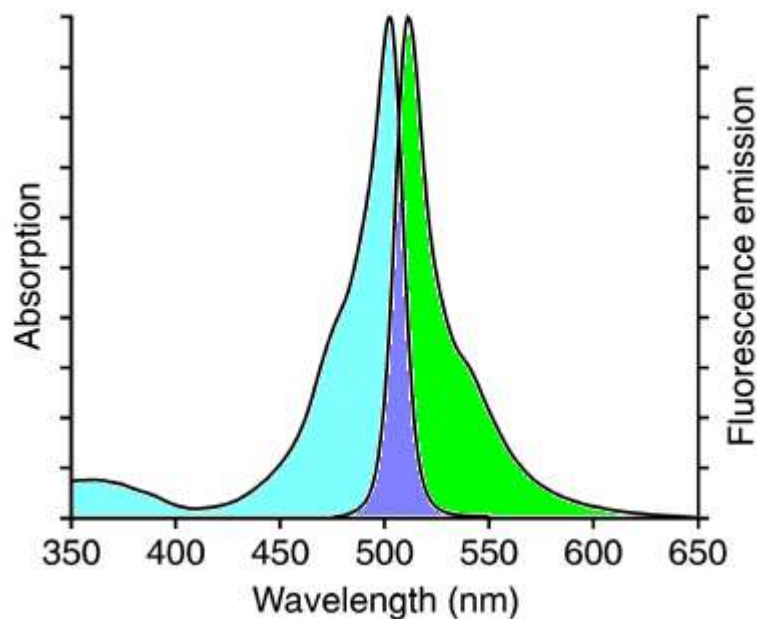


Figura 2-16: spettri di fluorescenza del Cholesteryl BODIPY FL C₁₂. La curva che determina l'area azzurra e blu è lo spettro di eccitazione, ottenuto rilevando l'intensità di fluorescenza (IF) a una lunghezza d'onda fissata al variare della lunghezza d'onda di eccitazione. La curva che determina l'area blu e verde è lo spettro di emissione, ottenuto rilevando l'intensità di fluorescenza (IF) alle varie lunghezze d'onda mantenendo fissata la lunghezza d'onda di eccitazione.

Con la prima si rileva quale sia la lunghezza d'onda che permette la massima eccitazione elettronica. La seconda mostra l'andamento dell'intensità di fluorescenza alle varie lunghezze d'onda dopo aver eccitato la molecola con un'onda a una lunghezza d'onda fissata.

Quando si fornisce energia al sistema, si identifica con "eccitazione" la lunghezza d'onda che la molecola assorbe, e con "emissione" la lunghezza d'onda rilasciata dalla molecola. Maggiore è l'energia immagazzinata durante l'eccitazione, maggiore sarà l'emissione conseguente.

Questi due parametri, essendo una caratteristica intrinseca della molecola, saranno quelli fissati ai quali per ogni prova si andrà a rilevare l'intensità di fluorescenza.

Un altro parametro importante da definire è l'apertura (denominata Gain) del raggio con il quale si eccita il volume di sostanza campione. A gain maggiori corrisponde un volume maggiore eccitato da un raggio a frequenza definita. Perciò il gain da utilizzare sarà inversamente proporzionale alla concentrazione di fluoroforo nel campione.

Una volta ottimizzato anche questo parametro, lo si utilizzerà per ogni test.

Siccome la molecola tracciante non si trova mai in un sistema puro, il raggio di eccitazione inciderà su tutte le molecole presenti nel suo percorso. Le molecole colpite possono essere sensibili alla fonte di energia o inerti, manifestando due comportamenti differenti. Nel caso di molecole inerti, o meglio trasparenti, il raggio luminoso non subisce una significativa sottrazione dell'energia da parte delle molecole stesse, ed in termini di fluorescenza rilevata significa un segnale di emissione nullo. Se invece una molecola è fotosensibile alla lunghezza d'onda del raggio di eccitazione, assorbirà l'energia del raggio luminoso e successivamente emetterà un segnale luminoso con una sua lunghezza d'onda.

Nel caso in cui, nello stesso sistema siano presenti più molecole fotosensibili diverse, è possibile che queste abbiano diverse lunghezze d'onda caratteristiche di eccitazione ed emissione. Se la lunghezza d'onda di emissione di una molecola è simile alla lunghezza d'onda di eccitazione di un'altra, accade che nel momento in cui avviene l'emissione, tale energia venga assorbita dall'altra molecola abbassando così (fino ad annullarlo) il segnale uscente dal sistema.

In uno spettro di lunghezze d'onda, qualora si andasse ad indagare il segnale di emissione ad una lunghezza d'onda fissata, risulterà nullo là dove l'energia emessa venga trattenuta dal sistema per eccitare delle molecole. Questo fenomeno viene chiamato "quench" della fluorescenza. Nella fase preliminare degli esperimenti è doveroso confrontare tutti gli spettri di fluorescenza delle sostanze pure che poi si utilizzeranno miscelate nel campione. Osservando le sovrapposizioni delle curve sono facilmente riconoscibili le condizioni critiche di quenching.

La fisica della fluorescenza insegna che più sono le volte che la molecola viene eccitata, minore sarà l'intensità di fluorescenza rilevata. Perciò è fondamentale risparmiare il più possibile multiple letture dello stesso campione. Un accorgimento è invece replicare più pozzetti di lettura così da avere differenti letture dello stesso campione, per ottenere una media di osservazione.

Infine, ogni macchina ottica, specialmente quando è destinata a misure di fluorescenza, è soggetta ad una progressiva diminuzione dell'intensità di emissione della lampada di eccitazione. Due strumenti identici possono avere perciò due lampade differenti: una più nuova ed una più utilizzata. E' per questo che conviene,

durante le misurazioni del campione su piastra, riservare un pozzetto ad un campione di riferimento rispetto al quale normalizzare sempre tutte le misure.

Per le prove svolte si è utilizzato uno spettro-fluorimetro della Tecan, modello Infinite M200®. I campioni vengono posti in piastre (Perkin Elmer Isoplate 96 black clear flat 96 Flat Bottom black polystyrene) di polistirene, costituite da pozzetti cilindrici del volume di circa 250 µl ciascuno, per un totale di 96 pozzetti. In ogni pozzetto vengono pipettati 50 µl o 100 µl di campione.

Per tarare il segnale e determinare le lunghezze d'onda alle quali operare si è sciolto del Bodipy in metanolo e diluito ad una concentrazione di 1 µg/ml.

50 µl vengono poi messi in un pozzetto della piastra e si provvede a fare più prove di lettura della fluorescenza.

La prima lettura va sempre eseguita facendo calcolare automaticamente dalla macchina il gain ottimale del pozzetto. E' sempre consigliato eseguire una scansione delle lunghezze d'onda di emissione, mantenendo fissa il valore dell'eccitazione nell'intervallo dichiarato dalla scheda tecnica del prodotto.

Svolgendo più prove si ottiene il valore di eccitazione ed emissione ottimali per il lavoro da svolgere. Si noti che i valori dichiarati nella scheda tecnica del prodotto valgono per il fluoroforo sciolto in un solvente trasparente, perciò le lunghezze d'onda ottimali nella condizione dell'esperimento possono subire degli spostamenti di ± 10 nm.

Il Bodipy è un fluoroforo che ha delle lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione comprese nel campo delle lunghezze d'onda dei tessuti (300 nm – 640 nm) [6]. Questa caratteristica risulta un problema perché se si analizza un campione contenente nanoparticelle cariche di Bodipy in un omogenato di un organo, il segnale della fluorescenza subisce un'interferenza da parte del tessuto presente. Il contributo di interferenza sull'intensità di fluorescenza misurata è positivo ovvero andrà a sommarsi a quello del Bodipy puro. Questo contributo andrà corretto nel seguente modo: si sottrae la fluorescenza del campione del tessuto (misurata alle lunghezze d'onda di lettura del Bodipy) alla fluorescenza del campione di tessuto contenente il Bodipy caricato ad esempio nelle nanoparticelle. In questo modo, si ottiene un valore

di Intensità di fluorescenza che è corretto del contributo positivo della presenza di tessuti. Verrà poi discussa meglio ed esemplificata la questione nel capitolo dei risultati.

Per il Bodipy le lunghezze d'onda ottimali si sono ottenute e verificate con un secondo strumento di fluorescenza, Fluorimetro a cuvette (Luminescence Spectrometer, Perkin Elmer LS 50B) e quindi fissate ai valori di:

Excitation wavelength = 470 nm

Emission wavelength = 520 nm

Test di stabilità a diverse temperature

Lo scopo di questi esperimenti è quello di determinare l'effetto della temperatura sulla stabilità dell'emulsione di nanoparticelle. Si vuole osservare come questa influenzi l'emulsione di nanoparticelle nel tempo. Dopo aver caricato le nanoparticelle di un tracciante fluorescente (Processo 1 e 2 visti nel Capitolo 2.2.4:) le si pone in ambienti a temperatura costante e, a tempi diversi, si misura la fluorescenza dell'emulsione.

Per fare questo è stata pensata una procedura standard così organizzata.

Inizialmente viene misurata la fluorescenza al tempo zero, cioè prima di mettere i campioni nell'ambiente alla temperatura di test. In una piastra (Corning 96 Flat Bottom Transparent), i pozzetti vengono riempiti dei seguenti campioni:

- 50 µl del campione originale
- 50 µl del campione originale cui vengono aggiunti 50 µl di cloroformio

Ogni pozzetto viene replicato 4 volte.

La piastra verrà analizzata al fluorimetro con i parametri di *excitation* ed *emission* definiti in precedenza e alla temperatura ambiente oppure impostata di 20°C.

L'aliquota di campione di emulsione da analizzare (4 ml) viene poi posta in camere a temperatura costante quali una stufa a 37°C e un frigorifero a 4,5°C.

In tempi successivi si eseguono le letture della fluorescenza come per il tempo zero iniziale.

Il programma produce un file MS Office Excel contenente i parametri utilizzati dallo strumento e impostati dall'utente per la lettura, nonché i valori di intensità di fluorescenza rilevata.

Test di stabilità in omogenato

Come per la stabilità a diverse temperature, questo test vuole rilevare allo stesso modo la stabilità delle nanoparticelle e delle emulsioni nei liquidi biologici, in particolare negli omogenati di organi di ratto a 37°C.

La procedura di misurazione della fluorescenza è lo stesso metodo utilizzato per i test a diverse temperature, ovvero con la replica in 4 pozzetti da 50µl del campione e la lettura dell'intensità di fluorescenza al fluorimetro.

I campioni si pongono in stufa a 37°C perché è la temperatura fisiologica dell'organismo vivente. E' opportuno replicare le letture nelle prime 24 ore del test per avere una misura affidabile del comportamento del campione nell'arco di tempo che maggiormente ha interesse, in una futura applicazione terapeutica.

Preparazione dell'omogenato

Gli organi estratti dall'animale sacrificato, nella fattispecie il ratto, vengono sciacquati in un tampone (tampone fosfato a pH 7.4, PBS 1x) per pulirli, poi vengono asciugati, pesati ed infine diluiti in PBS 1x (rapporto 1:4 in peso). L'omogenato viene realizzato con un omogenizzatore a vite (Homogenizer, Glas-Col) con pestelli in Teflon.

A titolo di esempio viene riportata la procedura per la preparazione dell'omogenato di cervello.

Il cervello conservato in ghiaccio secco proveniente dallo stabulario in cui è stato sacrificato l'animale, viene scongelato, sciacquato con del PBS 1x e lasciato asciugare su della carta assorbente. Poi viene pesato con una

bilancia di precisione (E42, Gibertini). Se l'organo fosse particolarmente grosso come ad esempio il fegato, si provvede a tagliarne, pesare ed omogenarne solo una parte.

L'organo poi viene introdotto in una provetta da 15ml in polipropilene (da qui verrà chiamata per comodità con il nome del modello "Falcon", BD Biosciences, USA) e si aggiungono 4 volumi di PBS 1x. Ad esempio, se il cervello pesa 2,1 g si aggiungono 8,4 ml di PBS 1x.

Il tutto viene poi trasferito in una provetta di vetro apposita, che incastra perfettamente il pestello montato sul mandrino dell'omogenizzatore.

Si incastra il pestello nella provetta di vetro e si aziona l'omogenizzatore.

Inizialmente lo si fa ruotare a bassi giri, circa 1600 rpm, poi man mano che l'organo si sfalda, si aumenta la velocità fino a 3200 rpm.

L'operatore che sorregge la provetta deve eseguire un movimento di spinta di essa in su e in giù, in successione. Questo per garantire che tutto il volume venga interessato dalla triturazione da parte del pestello. L'operazione dura finché non si ottiene un fluido omogeneo in provetta, che non abbia evidenti grumi (dopo circa 5 minuti).

Al termine dell'operazione l'omogenato viene travasato nella Falcon originaria che viene tappata.

Così sono stati preparati gli omogenati di rene, fegato e cervello.

Per svolgere i test di stabilità in omogenato, l'omogenato deve essere diluito ulteriormente: 1 ml dell'omogenato ottenuto viene diluito 1:10 (v/v) con PBS 1x in una Falcon da 15 ml.

Il volume inutilizzato è possibile conservarlo congelandolo a -80°C.

Il fegato è l'organo che fra quelli considerati ha maggiore concentrazione di enzimi. E' curioso confrontare l'attività di tale organo omogenato e quella dello stesso, ma bollito. Bollendo un omogenato si ha una inattivazione quasi totale degli enzimi che perciò non concorreranno più al degrado delle particelle. Per questo motivo è stato considerato anche il caso di bollire l'omogenato di fegato e di studiare il comportamento dell'emulsione in questo ambiente.

Per ottenere il fegato bollito si è preparata una provetta di omogenato di fegato diluito 1:10 (v/v) in PBS, e si è immersa in un bagno di acqua bollente

per 10 minuti. Al termine si è raffreddata ed è stata fatta una centrifuga di 3 minuti a 3500 rpm (2772 G, Heraeus Multifuge 3S) e separato il surnatante dal precipitato. Si utilizzerà come omogenato di fegato bollito il surnatante. Per verificare l'eventuale o meno perdita di materia, vengono fatte delle pesate alla provetta originale contenente l'omogenato prima della centrifugazione e alla provetta contenente solo il surnatante. Il peso del precipitato è solitamente irrisorio rispetto al grosso volume di surnatante.

Oltre agli omogenati di rene, fegato e cervello, è stata preparata una soluzione diluita di siero. Il siero è un costituente del sangue. Per ottenerlo, il sangue prelevato dall'animale viene lasciato coagulare per qualche minuto dopodiché viene centrifugato a 13200 rpm (16100rcf, 1641G, Eppendorf Centrifuge 5415R) per 3 minuti. Il siero è il surnatante ottenuto. Questo, viene poi diluito 1:2 (v/v) con PBS.

Preparazione del campione

Il campione è una miscela di emulsione di particelle in rapporto 1:1 in volume con l'omogenato. Solitamente, dati i piccoli volumi dei pozzetti, sono necessari 4 ml totali per svolgere tutte le prove ai diversi tempi. Il campione sarà perciò costituito da 2 ml di omogenato e 2 ml di emulsione di nanoparticelle.

Si avranno così 5 condizioni di studio delle nanoparticelle: rene, siero, fegato, cervello e fegato bollito.

Capitolo 2.4.2: Misura del loading di un tracciante e di un farmaco

Per caratterizzare le nanoparticelle è necessario avere un tracciante che faccia da identificatore del comportamento delle particelle durante il test. Ai fini di ottenere informazioni relative al comportamento delle particelle e dell'emulsione, i test fin ora

elencati sono esaustivi, ma da essi non è possibile ottenere una quantificazione precisa del tracciante caricato e successivamente rilasciato.

Applicando un processo di estrazione del tracciante dalle particelle si può risalire all'efficienza di caricamento del tracciante durante il processo di produzione delle nanoparticelle. Questo indice è importantissimo, per due motivi. Primariamente diventa un valore che dà al processo di produzione una efficienza in termini di recupero del tracciante in particelle. Diventa inoltre fondamentale se al posto di un tracciante si utilizzasse il principio attivo di un farmaco. Con l'interesse di riuscire ad avere delle emulsioni di particelle sfruttabili come trasportatori di farmaci, la conoscenza della dose di principio attivo caricato in particelle è fondamentale.

Con queste prerogative si è sviluppato un processo di estrazione mirato a recuperare un determinato tracciante dalla fase polimerica dell'emulsione e poi, ottenendolo diluito in un volume noto, misurarne tramite fluorescenza la sua concentrazione. Questo sia per particelle caricate con Bodipy che per le medesime caricate con il farmaco Tetraciclina (Processi 1 e 2 di produzione di nanoparticelle Capitolo 2.2.4:).

Estrazione del Bodipy dalle nanoparticelle

Ai fini di conoscere la quantità di Bodipy caricabile nelle nanoparticelle durante la produzione, si è pensato ad un metodo per estrarlo dalle particelle nell'emulsione finita.

Il metodo consiste di tre fasi fondamentali: la separazione della fase acquosa dalla fase polimerica, la soluzione del polimero secco in un solvente organico in cui è possibile discioglierlo ed infine le misure al fluorimetro.

L'emulsione scaricata dal reattore è costituita da tutto ciò che è stato inserito durante il processo. Per il bilancio materiale, il prodotto finito conterrà tutte le sostanze in esso immesse o trasformate per le reazioni. Il Bodipy, trattandosi di una molecola inerte, si presenterà nei prodotti nella stessa forma in cui è stato aggiunto.

L'emulsione per definizione è costituita da due fasi: una organica, dispersa, identificabile con le nanoparticelle costituite da polimero, e la fase acquosa,

disperdente, in cui la fase polimerica si disperde. Per una terza sostanza inserita nel sistema è ragionevolmente ipotizzabile che si ripartisca secondo il suo grado di solubilità nelle due fasi.

Ed è proprio questo quello che il test vuole andare ad indagare. In principio, le basi teoriche sono fondamentali per capire come si comporta la molecola all'interno dell'emulsione, ma questo non può mai dare un'informazione quantitativa definitiva.

Si effettua la separazione delle fasi riducendo la fase dispersa in un unico strato di polimero. Nella pratica, si destabilizza l'emulsione con l'aggiunta di un sale, favorendo l'aggregazione delle nanoparticelle e poi centrifugando si ottiene un pellet di polimero. In questo modo per semplice travaso le due fasi vengono separate. Si ottiene una fase acquosa contenente il surfattante e il Bodipy che non è contenuto nelle particelle. La fase polimerica costituita da nanoparticelle aggregate e che contiene anche il surfattante e il Bodipy, viene separata e trattata con un processo di estrazione con solvente del Bodipy.

Il polimero viene sciolto in un solvente organico affine, che sia soprattutto insolubile con l'acqua residua. Il volume utilizzato deve essere abbastanza da poter sciogliere il polimero, ma soprattutto in una quantità che non porti a diluizioni elevate la sostanza poi da misurare. Nella pratica i solventi che si sono dimostrati più efficienti sono stati il normal-eptano (nC_7H_{16}) perché è totalmente immiscibile in acqua, ed il cloroformio ($CHCl_3$) perché ha una efficienza maggiore di estrazione del fluoroforo per via dell'elevata polarità.

Al fluorimetro vengono misurate le aliquote della fase acquosa separata inizialmente e le aliquote della fase organica ottenuta alla termine dell'estrazione.

A titolo esemplificativo viene descritta la procedura utilizzata per estrarre il Bodipy dalle nanoparticelle di PMMA stabilizzate con l'SDS (Processo 2, Capitolo 2.2.4:).

Un volume di 100 μ l di emulsione viene diluito con 1ml di NaCl 6M in acqua in una provetta da 5 ml (cilindrica a fondo tondo, polipropilene, modello Falcon). L'emulsione viene destabilizzata ed alla vista appaiono flocculare le particelle che aggregano.

Si centrifuga per 20 minuti a 4020 G (4350 rpm), ottenendo un precipitato, costituito dalla fase organica, ed un surnatante acquoso. Si separa il

surnatante dal precipitato con un travaso in una provetta. L'eventuale residuo acquoso lo si recupera con una pipetta da vuoto (collegata a un rubinetto).

Si aggiungono al precipitato 2ml di cloroformio e si agita il sistema per 5 minuti su un agitatore meccanico (Labinco L46), per favorire la miscelazione del polimero nel solvente. Si aggiunge infine 1ml di acqua distillata e si continua l'agitazione per 20 minuti.

Si centrifuga per 30 minuti a 4020 G (4350 rpm) e possibilmente a una temperatura di 5-10°C, per favorire la separazione delle fasi che si disporranno su tre strati (Figura 2-17).

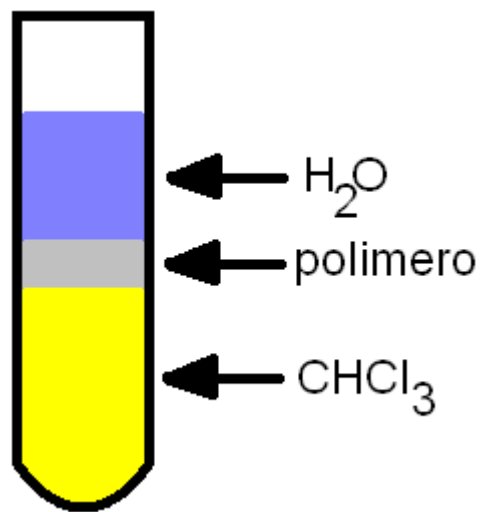


Figura 2-17: provetta dopo la centrifuga. Si distinguono tre fasi: l'acqua, il polimero ed il cloroformio. Il Bodipy sarà passato con una certa efficienza, dalla fase polimerica alla fase oleosa.

Con una pipetta si preleva un'aliquota di 500 µl della fase cloroformio, e la si conserva in una provetta Eppendorf da 2 ml.

Per avere il campione utilizzabile nelle piastra in polistirene si fa un'operazione di cambio del solvente. La Eppendorf contenente il campione in cloroformio, viene messa ad essiccare in un concentratore (Concentrator 5301, Eppendorf) che lavora ruotando a una velocità blanda di 1400 rpm e mantiene sotto vuoto e a una temperatura di 60°C il campione. Dopo 1 ora, tempo necessario per avere una essiccazione completa, si aggiunge nella provetta un volume di

metanolo (CH₃OH) pari a quello di cloroformio essiccato (500 µl) e si agita manualmente il contenuto per favorire lo scioglimento.

Si prosegue leggendo al fluorimetro, con i metodi di lettura visti nel Capitolo 2.4.1: , sia la fase acquosa separata con la prima centrifugata, che la fase organica in metanolo, ottenuta nell'ultimo stadio. Per la rielaborazione dei dati è necessario tener conto di tutte le diluizioni.

Estrazione della Tetraciclina dalle nanoparticelle

Il farmaco scelto per i test *in vitro* è la Tetraciclina (Tetracycline ≥98.0% (NT), Product Number = 87128, Sigma Aldrich).

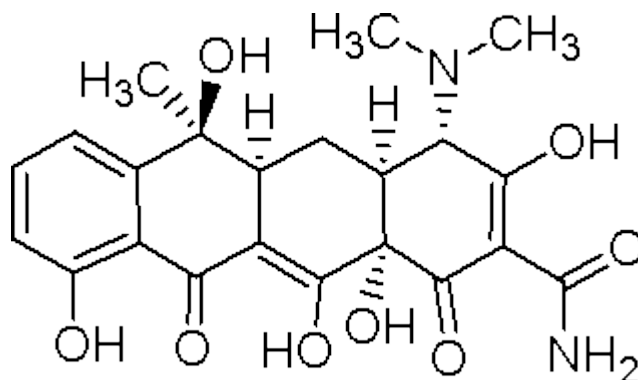


Figura 2-18: struttura molecolare della Tetraciclina utilizzata. Formula chimica: C₂₂H₂₄N₂O₈. MW = 444.43 g/mol. CAS Number = 60-54-8.

Per l'estrazione della Tetraciclina è conveniente sfruttare la sua capacità di passare in fase acquosa se acidificata.

La molecola inizialmente è insolubile in acqua, ma totalmente solubile in molti solventi organici, polari e non polari. Aggiungendo dell'acido cloridrico (HCl) diventa complessivamente polare e completamente idrofila. Al variare della concentrazione di acido si ottengono diverse conformazioni steriche che hanno un effetto sullo scattering della luce e sulla fluorescenza della molecola.

Il metodo in questo caso consiste di cinque passaggi fondamentali: la separazione della fase acquosa dalla fase polimerica, la soluzione del polimero secco in un solvente organico, l'aggiunta di una fase acquosa acida, il contattamento delle fasi e la successiva separazione, ed infine la misura all'HPLC.

Come nel metodo visto per l'estrazione del Bodipy, si destabilizza l'emulsione per aggiunta di un sale alla fase acquosa. Viene fatta una centrifugazione che permette di separare la fase acquosa da quella polimerica, dopodiché si aggiunge il solvente organico alla fase polimerica ottenuta come precipitato. In questo modo viene favorita la dissoluzione del polimero. A questo viene aggiunto un volume di acido cloridrico che attraverso l'agitazione viene a contatto con la Tetraciclina nella fase organica e la trasporta nella fase acquosa. Successivamente viene fatta una centrifugazione per separare le fasi. All'HPLC viene poi analizzata la fase acquosa ottenuta nell'ultimo stadio della separazione in seguito alla centrifugazione.

Di fondamentale importanza per la buona riuscita dell'estrazione della Tetraciclina è l'agitazione del sistema per favorire il contattamento della fase acquosa acida con quella olio-polimerica. E' necessario che venga l'agitazione venga condotta in modo vigoroso e per lungo tempo.

Ai fini pratici l'unico vero interesse era recuperare in una fase acquosa tutta la Tetraciclina presente in origine nelle particelle.

A titolo esemplificativo viene riportato il metodo di estrazione di tetraciclina da un campione di PMMA contenente la Tetraciclina.

In una provetta da 1,5 ml (Eppendorf), si pipettano 200 µl di nanoparticelle e 200 µl di NaCl 6M in acqua. Così facendo si destabilizza l'emulsione e si favorisce l'aggregazione delle particelle. Si agita la provetta per 10 minuti. Successivamente si centrifuga a 13200 rpm (16100 rcf, 1641G) per 20 minuti. Si separa il surnatante dal precipitato. Al precipitato si aggiungono 300 µl di cloroformio e dopo pochi minuti di agitazione per favorire la dissoluzione del polimero, si aggiungono 700 µl di HCl 100mM. A questo punto si mantiene vigorosa l'agitazione per almeno 30-40 minuti. Al termine, si centrifuga a 13200 rpm (16100 rcf, 1641G) per 20 minuti dopodiché si effettua la

separazione delle fasi prelevando la fase acquosa sovrastante, per la lettura finale all'HPLC.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

L'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) è uno strumento analitico derivato dalla cromatografia classica e si basa sugli stessi principi.

Nella cromatografia classica il componente principale è la colonna che contiene la fase stazionaria all'interno della quale scorre la fase mobile rappresentata dall'eluente o buffer.

Il passaggio dell'eluente avviene tramite la spinta esercitata dalla colonna di liquido costituente la fase mobile e quindi il processo, se la fase stazionaria non è abbastanza porosa, può essere anche molto lento. La separazione dei componenti avviene tramite interazioni che si creano fra i costituenti della miscela e le due fasi. Le interazioni possono essere di tipo elettrostatico, dipolo-dipolo, forze di Van Der Waals oppure tramite un meccanismo di scambio ionico. Questo dipende dalle proprietà sia delle due fasi sia della miscela da separare.

Nell'HPLC la forza che permette all'eluente di scorrere nella colonna, è rappresentata dalla pressione che è applicata da una pompa in testa alla colonna e forza la fase mobile a scorrere all'interno della fase stazionaria. Questo permette non solo di rendere il processo più rapido, ma permette anche di ottenere un maggior numero di piatti teorici il che vuol dire una migliore risoluzione.

L'interesse principale dei test su nanoparticelle caricate con la Tetraciclina è quello di misurare la capacità di caricamento del farmaco. Misurando una intensità di fluorescenza e rapportandola ad uno standard, è possibile tramite una retta di taratura, risalire alla quantità (a meno dell'errore sperimentale dovuto al processo di estrazione) a conoscere la quantità di composto contenuto nelle particelle.

Paragonando questo valore con la quantità inizialmente alimentata al reattore, si risale alla quantità di farmaco inglobata in particelle.

Questo valore è aumentabile qualora fosse insoddisfacente, ma complessivamente si è ritenuta accettabile una quantità paragonabile per ordine di grandezza ad una normale dose di Tetraciclina somministrabile ad un topo, come poi verrà spiegato.

Prima di effettuare le misure dei surnatanti ottenuti in ultimo passaggio dal metodo di estrazione, è stato fondamentale definire una retta di taratura ovvero una scala di segnali che lo strumento restituisce variando la concentrazione di Tetraciclina da 2µg/ml fino a valori 40µg/ml. Questi valori sono stati scelti in modo tale che la concentrazione di Tetraciclina di ogni campione ricadesse all'interno di questo intervallo.

Insieme alla Tetraciclina, per avere uno standard interno di lettura del campione e per poter normalizzare le letture su un valore di riferimento, è stata utilizzata la Demeclociclina (Demeclocycline Hydrochloride, ≥90% (HPLC) powder, $C_{21}H_{21}ClN_2O_8 \cdot HCl$, MW = 501.31g/mol, Sigma Aldrich). Quest'ultima viene inserita in aliquota standard (50µg/ml, 1:1 (v/v) con il campione per una concentrazione finale di 25µg/ml) all'interno del campione da analizzare di modo che al grafico di risposta dell'HPLC apparivano due picchi: uno con area ogni volta fissa rappresentante la Demeclociclina, ed uno ad area variabile con la concentrazione di Tetraciclina del campione.

La colonna di separazione usata è una C18 (modello VYDAC 218TP104 C18 Reversed Phase, particle size 7µm, i.d. 4,6mm, length 250mm, VYDAC, U.S.A.) è montata su uno strumento della Bekman (System Gold).

Il metodo prevede il trasporto del campione tramite una portata costante (0,5ml/min) di una miscela, con rapporto variabile nel tempo, di due buffer: uno acquoso composto da H₂O con lo 0,1% di acido trifluoroacetico (TFA, CF₃COOH), e un solvente organico polare, acetonitrile (CH₃CN), con lo 0,08% di TFA. L'acqua è il buffer principale di condizionamento della colonna e permette l'uscita di tutti i composti idrofili all'inizio della lettura. Gradualmente viene fatta aumentare la percentuale di aceto nitrile rispetto all'acqua in modo da favorire il passaggio di tutti i composti.

Il campione frazionato all'uscita della colonna passa attraverso un fluorimetro (con lampada UV, Bakman) per la lettura della fluorescenza a una lunghezza d'onda fissata a 350nm, con frequenza di lettura di 1Hz. Il risultato a video è un grafico dell'andamento della fluorescenza nella portata uscente, funzione della composizione della portata. Facendo variare opportunamente la percentuale dei due buffer nella portata, si ottiene un grafico a picchi tanto più stretti quanto più accurato

è il metodo di separazione. L'area di questi picchi è possibile ricondurla ad una concentrazione tramite la retta di taratura. Il picco corrispondente alla sostanza in indagine uscirà sempre allo stesso tempo, perché il suo tempo di ritenzione in colonna dipende dalla miscela del buffer.

Nella fattispecie, per la Tetraciclina è stato calibrato e poi utilizzato il metodo riassunto in Tabella 2-1:

Tabella 2-1: composizione della miscela del buffer di lavaggio della colonna C18 per la lettura del campione contenente tetraciclina. Con %A si intende la composizione percentuale della portata con la fase acquosa (H₂O+0.1%TFA), mentre %B quella della fase organica (CH₃CN+0.01%TFA). La durata del gradiente è il tempo impostato per far variare la percentuale da un valore X a una percentuale Y, linearmente (X→Y). Al termine di ogni gradiente la composizione della miscela buffer viene mantenuta costante al valore di arrivo del gradiente, fino all'operazione successiva.

Composizione della miscela di buffer in colonna durante un campionamento			
t [min]	%A	%B	Durata gradiente
0	100	0	
1	100→60	0→40	20min
25	60→0	40→100	1min
29	0→100	100→0	3min
44	Fine del processo		

Lo strumento produce un file di dati elaborabile. Il dato recuperato da ogni lettura è l'area di ogni picco, sia di Tetraciclina che di Demeclociclina. Rapportando le aree dei due picchi, si ha la normalizzazione del dato, ovvero la misura dell'area del picco di Tetraciclina viene normalizzata su un valore di concentrazione nota. Con questa operazione si escludono errori casuali di cui il dato può essere affetto. Un fattore che ad esempio può influenzare la misura è la lampada del fluorimetro che a seconda di quanto sia utilizzata comporta una differenza di intensità di fluorescenza misurata.

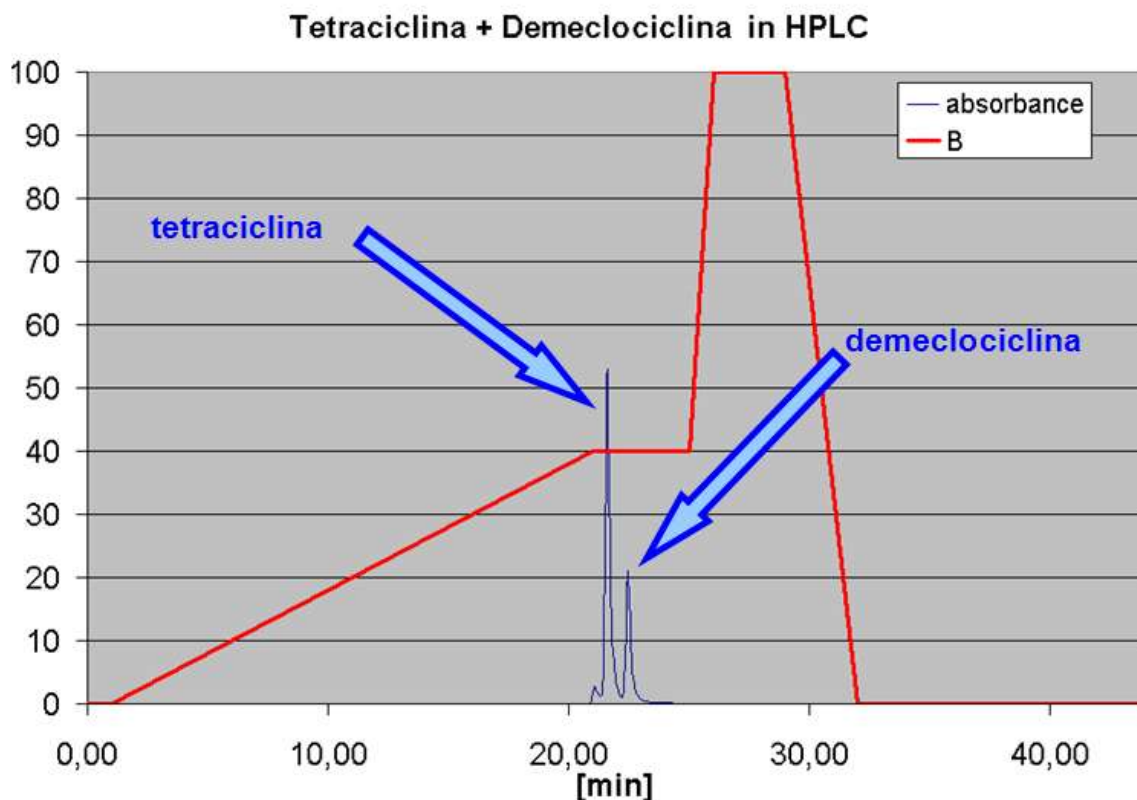


Figura 2-19: grafico ottenuto dalla lettura in HPLC di un campione di Tetraciclina + Demeclociclina. Sulle ordinate, riferita alla linea rossa, la percentuale di Buffer B ($\text{CH}_3\text{CN}+0.01\%\text{TFA}$) sulla composizione della portata circolante in colonna. Sulle ascisse i minuti passati dall'inizio del ciclo di separazione. La linea blu rappresenta l'andamento dell'assorbanza misurata sul flusso uscente dalla colonna cromatografica. Si ottengono due picchi discriminabili a due tempi di ritenzione differenti. Il picco della Tetraciclina è massimo a un tempo di ritenzione di 21.60 minuti; quello della Demeclociclina a un tempo di ritenzione di 22.43 minuti

Preparazione del campione per l'HPLC

In una provetta da 1,5 ml (Eppendorf) si pipettano 100 μl di campione ovvero la fase acquosa raccolta nell'ultimo stadio del metodo di estrazione della Tetraciclina visto in precedenza. A questi vengono aggiunti 100 μl di campione di Demeclociclina preparati separatamente sciogliendo in acqua la Demeclociclina a una concentrazione di 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Si ottiene una miscela del campione con la Demeclociclina in rapporti 1:1 (v/v) (concentrazione finale della Demeclociclina pari a 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Vengono infine prelevati 25 μl di miscela e si iniettano nel loop di mandata alla pompa dell'HPLC.

Capitolo 2.4.3: Test in vivo

Sulla base dei risultati ottenuti dalle prove *in vitro* è stata scelta una classe di nanoparticelle da testare sugli animali, in particolare su i topi C57BL/6. Con queste prove si vuole determinare, in modo preliminare quale sia anzitutto la dose di nanoparticelle iniettabile in un topo e come avvenga la distribuzione delle nanoparticelle nel tempo negli organi principali dell'organismo.

L'interesse principale degli esperimenti *in vivo* è di conoscere se vi sia la possibilità che le nanoparticelle polimeriche prodotte con i processi descritti, siano potenzialmente utilizzabili come veicoli di farmaci. In particolare è ricercato il loro accumulo nel cervello. Questo significherebbe che le nanoparticelle scelte abbiano la capacità di attraversare la barriera emato-encefalica.

Per tutte le prove *in vivo* svolte e di seguito dettagliate, è stato scelto di operare con un tipo di nanoparticelle contenenti Bodipy, con delle caratteristiche fissate, quali:

- nanoparticelle polimeriche di Polimetimetacrilato (PMMA)
- $MW_{PMMA} = \sim 500 \text{ kDa}$
- Processo di produzione: Processo 2 (Capitolo 2.2.4:)
- Dimensione = 20 nm
- $[PMMA] = 10 \text{ mg/ml}$
- $[Bodipy] = 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$
- Surfattante = Tween80

Le procedure utilizzate erano in conformità con le disposizioni di legge nazionali ed internazionali (Decreto legge 116/92, Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n.10, 18 febbraio 1992, EEC Council Directive 86609, OJ L358, 1, 12 December 1987; Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, US National Research Council, 1996).

Esperimento pilota

Per determinare quale sia la dose di emulsione di nanoparticelle da somministrare al topo è necessario fare delle prove preliminari. Da letteratura [7] per i topi in genere si può iniettare fino a 500µl e una concentrazione di 20 mg/ml di polimero.

Le particelle prodotte con i processi visti hanno una concentrazione di polimero minore rispetto ai testi di riferimento in letteratura.

L'esperimento pilota è stato così condotto:

Animale = Topo C57BL/6

Numerosità = 3

Peso = 17 – 18 g

Tipo somministrazione = endovena (iv) nella vena caudale

Volume dose = 100 µl

Concentrazione polimero nella dose = 10 mg/ml

Il volume della dose è quindi di 1 mg (100 µl di 10 mg/ml) della preparazione di nanoparticelle originale.

Si è osservato il comportamento degli animali per 2 giorni.

Dopo l'iniezione non è stato rilevato alcun comportamento anomalo e per tutto l'arco di tempo dell'osservazione.

Da questo esperimento si è deciso che tutte le prove *in vivo* di nanoparticelle polimeriche date *iv* ai topi, si sarebbero svolte con questa dose standard.

Esperimento 1: somministrazione iv di nanoparticelle di PMMA e sacrifici a due tempi

Preparata un'emulsione di nanoparticelle di PMMA con le caratteristiche elencate in precedenza, ovvero:

- Processo di produzione: Processo 2 (Capitolo 2.2.4:)
- Dimensione = 20 ± 3 nm (LLS)

- [PMMA]= 10 mg/ml
- [Bodipy]=10 µg/ml
- Surfattante = Tween80

Si utilizzano 7 topi C57BL/6.

Si somministra *iv* un volume di 100µl della preparazione originale a 6 topi.

Successivamente, il sacrificio dei topi avviene in questo modo:

- 3 topi sacrificati dopo 1 ora dal trattamento
- 3 topi sacrificati dopo 5 ore dal trattamento
- 1 topo non trattato, sacrificato come controllo

Con il sacrificio si preleva per ogni topo: sangue, cervello e milza.

Gli organi vengono conservati in un congelatore a -80°C.

Il sangue viene sierato ovvero prelevato dall'animale, lasciato coagulare per qualche minuto dopodiché viene centrifugato a 13200rpm (16100rcf, 1641G) per 3 minuti. Il siero è il surnatante ottenuto che viene conservato nel congelatore insieme agli altri organi.

Dopo si passerà all'analisi degli organi e dei sieri.

Esperimento 2: somministrazione iv di nanoparticelle di PMMA di diametro 11 nm e sacrificio a un tempo lungo

Preparata un'emulsione di nanoparticelle di PMMA con le caratteristiche elencate in precedenza, a meno del diametro ridotto a 11nm e concentrazione doppia di Bodipy, ovvero:

- Processo di produzione: Processo 2 (Capitolo 2.2.4:)
- Dimensione = 11±5 nm (LLS)
- [PMMA]= 10 mg/ml
- [Bodipy]=20 µg/ml
- Surfattante = Tween80

Si utilizzano 15 topi C57BL/6.

Si somministra *iv* un volume di 100µl della preparazione originale a 6 topi.

Successivamente, il sacrificio dei topi avviene in questo modo:

- 3 topi sacrificati dopo 5 ore dal trattamento (trattato non perfuso)
- 3 topi sacrificati con perfusione dopo 5 ore dal trattamento (trattato perfuso)
- 6 topi non trattati, sacrificati (controllo non perfuso)
- 3 topi non trattati, sacrificati con perfusione (controllo perfuso)

La perfusione dopo il sacrificio, consiste nell'iniezione di una flebo di soluzione fisiologica nelle vene dell'animale sacrificato. Quest'operazione elimina tutto il sangue dell'animale ed anche gli organi prelevati saranno privati di tutto il contenuto dei vasi. Lo scopo di perfondere è quello di discriminare la presenza di nanoparticelle diffuse nel tessuto dell'organo rispetto a quelle che invece sono ancora nel circolo sanguigno e quindi nei vasi o nei capillari.

In un organo di un animale non perfuso i capillari del sistema circolatorio contengono ancora del sangue residuo. Se le nanoparticelle si fossero accumulate nel capillare, ma non fossero ancora diffuse nel tessuto dell'organo, alla microscopia si rivelerebbe la presenza di nanoparticelle nella zona del capillare, ma non si riuscirebbe a differenziare se queste abbiano attraversato o meno il vaso entrando nel tessuto. Ripulendo perciò i vasi di tutto il loro contenuto con la perfusione si ha la certezza che il passaggio sia avvenuto, in particolare nel cervello che a differenza degli altri organi ha una membrana dei vasi sanguigni più impermeabile ed attiva, la barriera emato-encefalica.

Con il sacrificio si preleva per ogni topo: sangue (per i topi non perfusi), fegato, cervello e milza.

Gli organi vengono conservati in un congelatore a -80°C.

Il sangue viene sierato e conservato nel congelatore insieme agli altri organi.

Successivamente si passerà all'analisi degli organi e dei sieri.

Esperimento 3: somministrazione iv di nanoparticelle di PMMA a topi con EAE indotta, e sacrifici a due tempi

Preparata un'emulsione di nanoparticelle di PMMA con le caratteristiche elencate in precedenza, ovvero:

- Processo di produzione: Processo 2 (Capitolo 2.2.4:)
- Dimensione = 20 ± 1 nm (LLS)
- [PMMA]= 10 mg/ml
- [Bodipy]=10 μ g/ml
- Surfattante = Tween80

Si utilizzano 3 topi C57BL/6 e 10 topi C57BL/6 femmina di 6-8 settimane.

Induzione EAE per topo

EAE è l'acronimo di Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (R. Gold, C. Linington, H. Lassmann, 2006), una neuro infiammazione indotta su animali, nella fattispecie topi, che viene utilizzata come modello della Sclerosi Multipla. Questa neuro infiammazione è il risultato del trattamento dell'animale con un peptide (MOG) accoppiato a una Toxina (Pertussis). Ne risulta un progressivo sviluppo della malattia nei primi 20 giorni dal trattamento, con un massimo dell'espressione proprio tra il 16° e il 18° giorno. Lo stato di salute dell'animale si stabilizza dopo il 20° giorno. All'apice dell'espressione della malattia si hanno, oltre ad effetti evidenti sul comportamento dell'animale quali la difficoltà a muoversi e la riduzione della sensibilità, anche degli effetti interni desiderati quali l'infiammazione e la modificazione della barriera emato-encefalica. La barriera emato-encefalica risulta più permeabile per via del suo stato modificato, quasi "bucherellato".

E' interessante paragonare i risultati ottenuti aumentando la permeabilità della barriera emato-encefalica rispetto a quelli precedentemente visti per gli animali sani.

Per il trattamento volto ad indurre la malattia ai topi è stata seguita la procedura descritta nell'articolo "*Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in*

experimental autoimmune encephalomyelitis research” di R. Gold, C. Linington, H. Lassmann, del 2006.

I topi C57 (femmina perché si ha probabilità superiori al 90% che la malattia si sviluppi rispetto a quelli di sesso maschile) vengono pesati e predisposti per il trattamento.

Per ogni topo, viene somministrata *ip* un volume di 300 μ l di emulsione in acqua di MOG (667 μ g/ml), emulsionato con Myco (un adiuvante, 8 μ g/ml).

Successivamente si somministra *iv* un volume di 100 μ l di Pertussis Toxin (PT), 0,3 μ g/ml.

Dopo 2 giorni si fa una nuova somministrazione *iv* di un volume di 100 μ l di Pertussis Toxin (PT), 0,3 μ g/ml.

Dall'8° giorno si monitora in continuo lo stato di salute dell'animale attribuendone uno "score": 0 sano, 1 coda floscia, 2 debolezza della zampe posteriori ed affaticato, 3 paralisi posteriore e stordimento, 4 paralisi completa delle zampe e lievi movimenti, 5 morte o paralisi completa del corpo.

Tra il 16° e il 18° giorno si ha il "top score" della malattia con la massima permeabilità della barriera emato-encefalica. Dal 20° giorno si raggiunge una situazione di stabilità dello stato di malattia dell'animale.

Dopo aver indotto l'EAE ai topi, si inizia il trattamento con le nanoparticelle.

Per i 10 topi con EAE indotta:

Si somministra *iv* una dose di 100 μ l della preparazione originale.

Successivamente, il sacrificio avviene in questo modo:

- 5 topi sacrificati dopo 1.5 ore dal trattamento
- 5 topi sacrificati dopo 5 ore dal trattamento

Con il sacrificio si preleva per ogni topo: sangue, reni, fegato, cervello e milza.

Gli organi vengono conservati in un congelatore a -80°C.

Il sangue viene sierato e conservato nel congelatore insieme agli altri organi.

I 3 topi sani rimasti invece vengono sacrificati come controllo

Con il sacrificio si preleva per ogni topo: sangue, reni, fegato, cervello e milza.

Gli organi vengono conservati in un congelatore a -80°C.

Il sangue viene sierato e conservato nel congelatore insieme agli altri organi.

Microscopia Ottica a fluorescenza

Gli organi prelevati, dopo essere stati congelati, vengono sezionati ed osservati al microscopio ottico a fluorescenza. Questo microscopio (Olympus BX51) è un microscopio ottico che è accoppiato ad una lampada Xe-Ar che permette, attraverso dei filtri, di eccitare il campione e rilevarne la sua fluorescenza. La localizzazione della fluorescenza specifica del Bodipy permette di associare la presenza di nanoparticelle in quel punto del tessuto e quindi di definire quale sia la distribuzione delle nanoparticelle nei vari organi.

Il microscopio ottico non è sensibile alle dimensioni delle nanoparticelle. Un campo di ingrandimento a 40x, rileva un'area di 323,11 μm x 242,11 μm . Le nanoparticelle sono dell'ordine della decina di nanometri di diametro. Solo attraverso la fluorescenza è possibile quindi discriminare la presenza.

Si sottoporranno quindi alla scansione del microscopio ottico tutti gli organi prelevati per determinare anzitutto la presenza e poi la localizzazione delle nanoparticelle nel tessuto.

Per fare questo, gli organi verranno sezionati con un criostato (Microm, Heidelberg) in sezioni di spessore 20 μm .

Le sezioni sono state visualizzate fotografate al microscopio ottico a fluorescenza con un campo di ingrandimento a 40x (UPlanFI 40x/0.75 Ph2) e con i filtri per l'eccitazione nelle frequenze del Bodipy. I filtri sono posti tra la lampada ed il campione per permettere che questo venga esposto solo dai raggi con lunghezze d'onda specifiche per l'eccitazione del fluoroforo. All'oculare vengono restituiti dei raggi con lunghezze d'onda caratteristici dell'emissione del fluoroforo.

Il filtro che permette il passaggio delle onde con lunghezza d'onda d'eccitazione del Bodipy (470 nm) è quello del FITC (finestra tra 460 nm e 490 nm).

Per confronto ogni foto è stata fatta anche con il filtro del TRITC (finestra tra 510 nm e 550 nm).

Anche i sieri sono stati osservati al microscopio, ponendo una goccia di siero sul vetrino portacampione e scansionando allo stesso modo delle sezioni degli organi.

E' importante osservare i sieri degli animali trattati perché spesso sono indice dell'avvenuta iniezione: se le nanoparticelle sono state iniettate correttamente nella vena, allora si rileva fluorescenza nel siero dell'animale trattato. Se per qualche motivo l'iniezione non fosse andata a buon fine, nel siero si trova corrispondenza ovvero non si rileva alcun segnale di fluorescenza.

Estrazione del tracciante fluorescente dall'organo prelevato

Per determinare quantitativamente quale fosse la quantità di nanoparticelle che si è accumulata nell'organo, è stato messo a punto un metodo di estrazione del tracciante fluorescente dagli organi. In particolare è stato pensato per il cervello, così da poter determinare quale sia la quantità di nanoparticelle che hanno raggiunto il tessuto di quest'organo.

Il metodo consiste in una estrazione con solvente del Bodipy (simile a quella vista nel Capitolo 2.4.2:) in presenza di un omogenato di organo.

Si prende l'organo o la parte di organo su cui fare l'estrazione e lo si pesa (esempio: cervello = 0,3008 g).

Si mette in 4 volumi di PBS 1x (esempio: $0,3008 \times 4 = 1,2032$ ml) e si fa l'omogenato (Capitolo 2.4.1:).

All'omogenato ottenuto si aggiungono 8 volumi di n-eptano (esempio: $0,3008 \times 8 = 2,4064$ ml).

Si agita il sistema per 60 minuti.

Si centrifuga a 4350 rpm (4083 rcf, 4020G) per 20 minuti e si preleva il surnatante, o meglio, la fase superiore, organica, che sta in superficie.

Questa viene messa in una provetta Eppendorf da 2 ml, e poi disposta nel concentratore per farne evaporare il solvente contenuto.

Si lascia evaporare nel concentratore sottovuoto a 30°C per 1,5 ore.

Una volta ottenuto il contenuto secco, si aggiungono 400 µl di metanolo e l'intero campione viene sottoposto all'analisi al fluorimetro a cuvette (Perkin Elmer).

Il valore di intensità di fluorescenza misurato viene poi confrontato con una retta di taratura del segnale ottenuta da delle misure condotte su dei cervelli di animali non trattati ($y=1,023*x+1,018$; $R=0,956$; Figura 2-20). Direttamente dopo l'asportazione dell'organo sono state iniettate dosi crescenti (da 0 μ l a 50 μ l) di nanoparticelle contenenti Bodipy (10 μ g/ml) e successivamente è stato seguito tutto il metodo di estrazione fino alla lettura al fluorimetro.

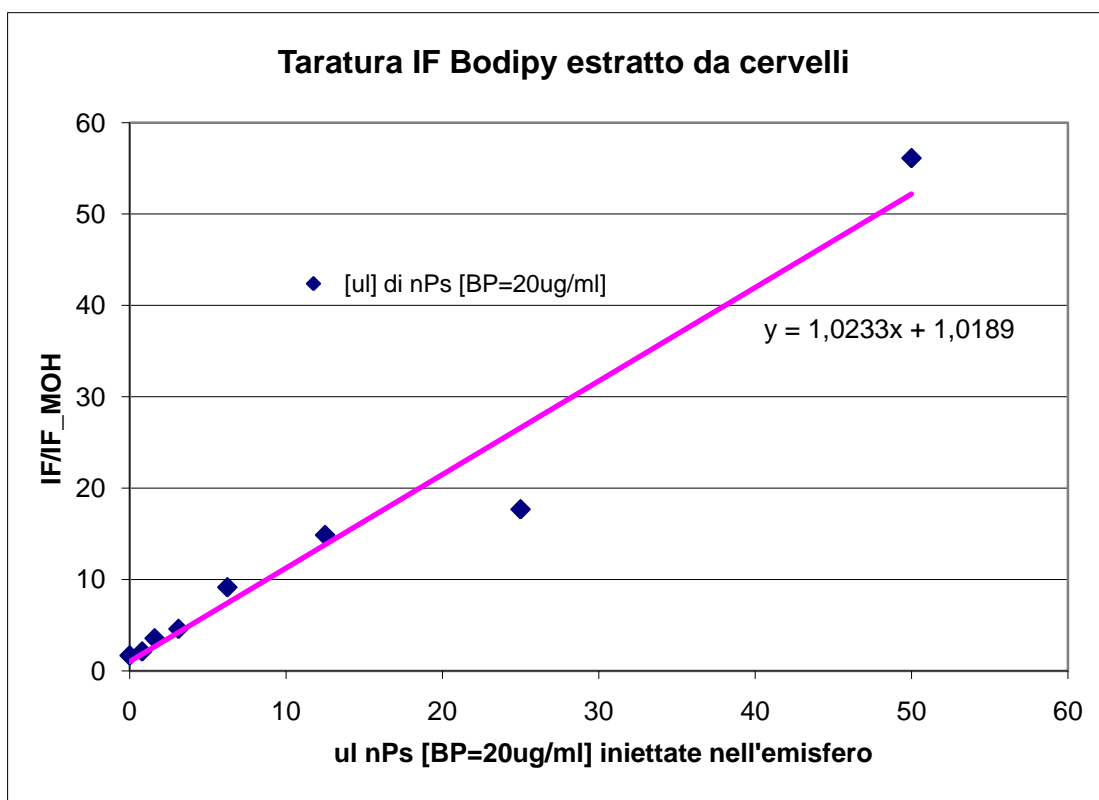


Figura 2-20: retta di taratura del segnale di fluorescenza rilevato dall'estrazione di Bodipy da cervelli cui è stata somministrata una scala di dosi di nanoparticelle di PMMA contenenti il fluoroforo.

Nella letteratura scientifica non si trovano lavori di misura attraverso la fluorescenza, della concentrazione di nanoparticelle polimeriche accumulate negli organi. Inoltre non ci sono lavori che documentano il passaggio della barriera emato-encefalica con nanoparticelle polimeriche accoppiate all'uso di traccianti fluorescenti.

CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo capitolo vengono raccolti e discussi i più significativi risultati ottenuti con gli esperimenti descritti nel capitolo dei Metodi.

Il lavoro di ricerca svolto con questa tesi è iniziato con la selezione dei polimeri utilizzabili per fare nanoparticelle polimeriche, appunto. Da questi si è definito gli standard di produzione ovvero i processi per produrre nanoparticelle in emulsione che avessero le caratteristiche desiderate e compatibili per applicazioni in campo farmacologico.

Successivamente c'è stato lo studio di caratterizzazione delle nanoparticelle poste in diverse condizioni di temperatura e in ambienti biologici. Con questi esperimenti si è condotto uno studio preliminare del comportamento delle nanoparticelle negli organismi viventi.

Tra tutti i tipi di nanoparticelle analizzate, se ne è scelto uno solo, che avesse delle caratteristiche dimensionali, di polimero costituente e di stabilità in ambiente biologico particolari. Di questo tipo di nanoparticelle si è quindi analizzata la capacità di inglobare un farmaco, la tetraciclina.

Infine si sono fatti degli studi *in vivo*, di somministrazione di una dose di emulsione di nanoparticelle a topi da laboratorio per definire la distribuzione nell'organismo nel tempo, l'accumulo negli organi ed in particolare osservare la capacità di attraversare la barriera emato-encefalica.

Capitolo 3.1: Selezione dei polimeri

I polimeri sono la materia costituente le nanoparticelle. Le caratteristiche fisiche e chimiche sono determinati dal polimero che le costituisce. Per applicazioni in campo biologico è necessario che i polimeri siano biocompatibili.

I polimeri utilizzati in questo lavoro di ricerca sono:

- Poli etilcianoacrilato (PECA)
- Poli butilcianoacrilato (PBCA)
- Poli metilmetacrilato (PMMA)
- Acido polilattico (PDLA)

Sono tutti materiali biocompatibili approvati dall'US Food and Drug Administration (FDA) e già utilizzati per molte applicazioni in campo biologico.

Inoltre sono polimeri di rilevanza nel panorama dello studio di applicazioni farmacologiche con le nanoparticelle.

Dei polimeri sono desiderate inoltre alcune caratteristiche quali:

- La facilità di produzione
- La degradabilità e la biodegradabilità
- La facilità di utilizzarli per fare nanoparticelle

La loro produzione non deve essere un vincolo soprattutto per poterli processare per fare nanoparticelle. E' desiderata la capacità di produrli per polimerizzazione in emulsione così da ottenere con un solo processo il polimero e le nanoparticelle.

Inoltre si vuole avere delle nanoparticelle sufficientemente stabili in condizioni biologiche, ma anche biodegradabili all'occorrenza. Perché si possa avere il rilascio di un farmaco in esse caricato, il polimero costituente deve essere biodegradabile per favorire la fuoriuscita del farmaco stesso.

Capitolo 3.2: Preparazione delle nanoparticelle

Una volta definiti i polimeri, si sono utilizzati dei metodi di preparazione delle nanoparticelle noti dalla letteratura scientifica e dall'esperienza dei professori del nostro dipartimento.

Gli standard di produzione delle emulsioni sono stati adeguati per ottenere le caratteristiche chimico-fisiche desiderate affinché si potessero utilizzare per applicazioni biologiche e farmacologiche.

Il primi parametri controllati sono stati la concentrazione del polimero finale nella preparazione e la dimensione delle nanoparticelle.

L'ottimo per tutti i tipi di preparazione è stato trovato in una concentrazione di 10mg/ml di polimero in emulsione (Capitolo 2.2.4:). Questa concentrazione deve essere confrontata con il valore della tossicità di ogni polimero utilizzato. Questo valore è quello di dose letale (Lethal Dose, LD50) caratteristico del polimero e dell'animale a cui lo si somministra.

Per la produzione delle nanoparticelle di PDLA si è utilizzato processo che parte dal polimero già formato (Processo 1, Capitolo 2.2.4:). Il PDLA utilizzato è stato prodotto per ROP e con un peso molecolare di 10kDa.

Per la produzione delle nanoparticelle di PECA e PBCA è stato utilizzato un processo di polimerizzazione in emulsione (Processo 2, Capitolo 2.2.4:). L'iniziatore della polimerizzazione è l'anione OH^- presente nell'acqua. Le nanoparticelle così ottenute, ognuna con le proprie caratteristiche chimiche, sono costituite da polimeri con pesi molecolari:

- PECA = 300kDa
- PBCA = 400kDa

Anche le nanoparticelle di PMMA sono state prodotte con il processo di polimerizzazione in emulsione (Processo 2, Capitolo 2.2.4:). L'iniziatore della polimerizzazione radicalica è il KPS che viene introdotto nel reattore prima che venga alimentata la fase monomerica. Il peso delle catene di polimero prodotte è di circa 500kDa.

Capitolo 3.3: Caratterizzazione

Per ogni preparazione di nanoparticelle è stato svolto un lavoro di caratterizzazione delle emulsioni. Gli strumenti utilizzati sono stati il microscopio a forza atomica e il Light Scattering Dinamico.

Come è stato spiegato nel precedente capitolo dei Metodi, il LLS è uno strumento che consente di determinare la dimensione effettiva delle particelle disperse nell'emulsione. L'AFM invece consente di determinare la loro conformazione geometrica.

Seguendo i metodi visti nel Capitolo 2.3: si può riassumere per ogni tipo di preparazione standard le seguenti caratteristiche dimensionali:

Tabella 3-1: dimensione caratteristica delle nanoparticelle prodotte con gli standard di produzione (Processo 1, Processo 2). Si riportano le misure fatte con AFM, LLS.

Diametro delle nanoparticelle prodotte con gli standard del Capitolo 2.2.4: [nm]		
nPs polimero	AFM	LLS
PECA	110±19	120
PBCA	117±34	115
PLA	145±15	120
PMMA	48±11	30.3

La dimensione misurata con il LLS è generalmente confermata anche dall'AFM (Tabella 3-1).

Mentre per l'analisi al LLS l'emulsione non subisce trasformazioni, per la preparazione del campione da analizzare all'AFM invece si deve ricorrere alla modificazione dell'ambiente in cui si trovano le particelle. Dallo stato disperso in fase acquosa, le nanoparticelle vengono seccate su un supporto di Mica e poi visualizzate al microscopio. L'operazione di deposizione ed essiccazione del campione modifica parzialmente la conformazione delle particelle e può provocare fenomeni di aggregazione. Quando si visualizza il campione al microscopio si osservano tre conformazioni caratteristiche:

- Sfera = rappresentazione della nanoparticella singola

- Grappolo o catena = rappresentazione di un aggregato (cluster) di particelle dove però si riconoscono le singole particelle che lo compongono
- Ammasso amorfo = rappresentazione di un aggregato di particelle dove però non si riconoscono le particelle che lo costituiscono

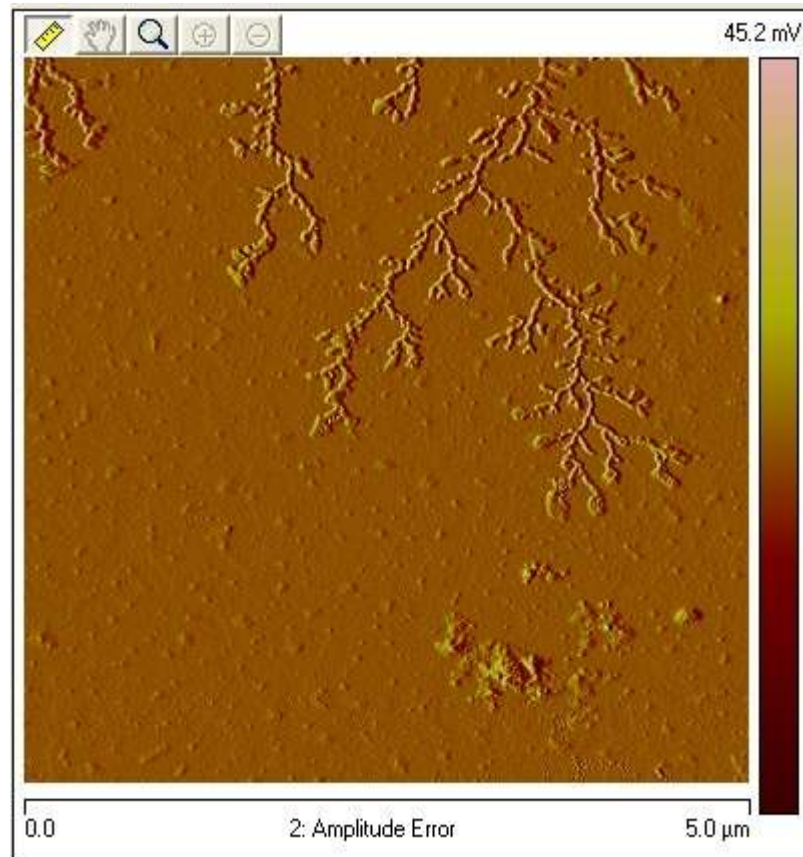


Figura 3-1: foto di una scansione al microscopio a forza atomica di nanoparticelle di PMMA. I punti singoli sono nanoparticelle, i punti uniti a catena o ad ammasso amorfo sono aggregati.

Nella Figura 3-1 si possono osservare le tre conformazioni descritte. La presenza delle forme aggregate nel campione essiccato non è controllabile. Non è possibile determinare se le forme aggregate siano dovute ad un processo di aggregazione intrinseco dell'emulsione o per il fatto che la deposizione delle particelle sul supporto di lettura favorisca questo fenomeno. Si può dire che ci sono questi due contributi.

Le dimensioni misurate indicano il diametro caratteristico delle nanoparticelle. Esso va controllato in maniera che sia mantenuto all'interno dell'intervallo di dimensioni

desiderate (Capitolo 1.2: $30\text{nm} < d < 200\text{nm}$). Le particelle prodotte con i processi visti hanno le caratteristiche di dimensione desiderate perciò sono potenzialmente utilizzabili in farmacologia.

Un'altra caratteristica che è indispensabile controllare è la superficie della particella. In questo lavoro di ricerca non si è approfondita la variazione delle caratteristiche superficiali delle nanoparticelle. Per stabilizzare le particelle in emulsione si è ricercato un surfattante che permettesse di realizzare delle preparazioni utilizzabili in farmacologia, ovvero che fosse biocompatibile. L'interfaccia, che si è scelto di realizzare tra fase polimerica e fase acquosa dell'emulsione, è costituita da un surfattante sterico, biocompatibile e biodegradabile: il Polisorbato (Tween80).

Per alcuni esperimenti preliminari *in vitro* è stato utilizzato in alternativa al Tween80 un surfattante di tipo anionico, il Sodio Dodecil Solfato (SDS). Questo surfattante è particolarmente nocivo se ingerito perciò non può essere utilizzato per realizzare dei farmaci. Viene comunque utilizzato per ottenere un'emulsione facilmente destabilizzabile attraverso l'aggiunta di un sale che scherma le cariche repulsive tra le particelle e ne favorisce l'aggregazione.

La dimensione caratteristica delle particelle non cambia. Utilizzando il Tween80 o l'SDS non viene riscontrata alcuna variazione di forma e dimensione.

Capitolo 3.4: I test biologici

Gli esperimenti che sono volti a determinare l'andamento temporale della stabilità delle emulsioni di nanoparticelle sono i test biologici. Con questi esperimenti attraverso l'ausilio di molecole fluorescenti, si vogliono osservare le variazioni delle emulsioni poste in ambienti biologici, ovvero in condizioni di temperatura e diluizione simili a quelli di un organismo vivente.

Andando a misurare la variazione della fluorescenza dell'emulsione nel tempo diventa possibile determinare la presenza di una modificazione dell'emulsione di particelle dovuto a diversi fattori chimici e fisici.

I primi test biologici consistono nel porre le emulsioni di nanoparticelle a condizioni di temperature particolari: 5°C e 37°C.

La temperatura di 5°C è quella di conservazione di alcune preparazioni biologiche e conoscere se si modificano le emulsioni in queste condizioni, è utile per sapere se sia possibile conservarle in quelle condizioni.

La temperatura di 37°C è invece la temperatura corporea dell'organismo. In una fase preliminare di studio è necessario un indice del comportamento delle emulsioni di particelle a questa temperatura.

Successivamente gli esperimenti sono stati svolti utilizzando gli omogenati di organo. Gli organi, provenienti da topi da laboratorio, dopo essere omogenati vengono utilizzati come ambiente dove le particelle vengono diluite. Con queste prove si ottengono indicazioni sull'azione degli enzimi presenti nei vari organi sulle nanoparticelle, inducendo l'emulsione a delle variazioni rilevate per misura della fluorescenza.

Dai dati ottenuti con le prove biologiche *in vitro* si è valutata la capacità di caricamento di molecole lipofile nelle particelle alla preparazione. In primo luogo la capacità di caricamento del fluoroforo, Bodipy, e di una molecola nota come farmaco antibiotico e di recente importanza anche per malattie neurologiche, la tetraciclina.

Gli esperimenti biologici si sono conclusi con dei test *in vivo* su topi da laboratorio. Iniettando endovena un solo tipo di nanoparticelle, quelle di PMMA, si è osservata la loro distribuzione nell'organismo andando a visualizzare i vari organi principali al

microscopio ottico a fluorescenza. In particolare si è osservata la capacità di attraversamento della barriera emato-encefalica e il conseguente accumulo nel parenchima cerebrale.

Capitolo 3.4.1: Stabilità delle nanoparticelle polimeriche

La stabilità delle emulsioni di nanoparticelle nel tempo è stata valutata mediante alcuni test biologici attraverso l'ausilio di Cholesteryl Bodipy come tracciante. Attraverso la misura dell'intensità di fluorescenza (IF) emessa dall'emulsione, a tempi e condizioni di temperatura e diluizione differenti, è stato possibile determinare le modificazioni delle nanoparticelle e delle emulsioni, causate da diversi fattori chimici e fisici.

Da ogni esperimento si ipotizza che avvengano variazioni nella fluorescenza dell'emulsione in seguito a fenomeni di rilascio del tracciante e di aggregazione delle particelle.

Effetto delle temperatura sulla stabilità

I primi esperimenti hanno valutato l'effetto della temperatura (5°C e 37°C) sulla stabilità delle diverse preparazioni di nanoparticelle. La temperatura di 5°C è quella di conservazione delle preparazioni e fornisce indicazioni sulla stabilità prima del loro utilizzo. La temperatura di 37°C rappresenta la temperatura fisiologica degli organismi viventi e fornisce indicazioni sulla stabilità delle nanoparticelle dopo la loro somministrazione *in vitro* o *in vivo*.

Nanoparticelle composte da diversi polimeri sono state quindi conservate alla temperatura di 5°C o 37°C per diversi tempi (0, 24, 48 e 166 ore), e la misura della fluorescenza del campione è stata eseguita come descritto precedentemente (Capitolo 2.4.1:).

In particolare sono state analizzate nanoparticelle composte da diversi polimeri e con dimensioni differenti, le cui caratteristiche sono riassunte nella Tabella 3-2.

Tabella 3-2: caratteristiche principali delle nanoparticelle analizzate.

Polimero	MW [kDa]	Dimensione [nm]
PECA	300	120
PBCA	400	115
PMMA	500	30
PDLA	10	120

In tutte le preparazioni, la concentrazione di polimero nell'emulsione è di 10mg/ml, la concentrazione di Bodipy nell'emulsione è di a 10 µg/ml e il surfattante utilizzato per è il Tween80.

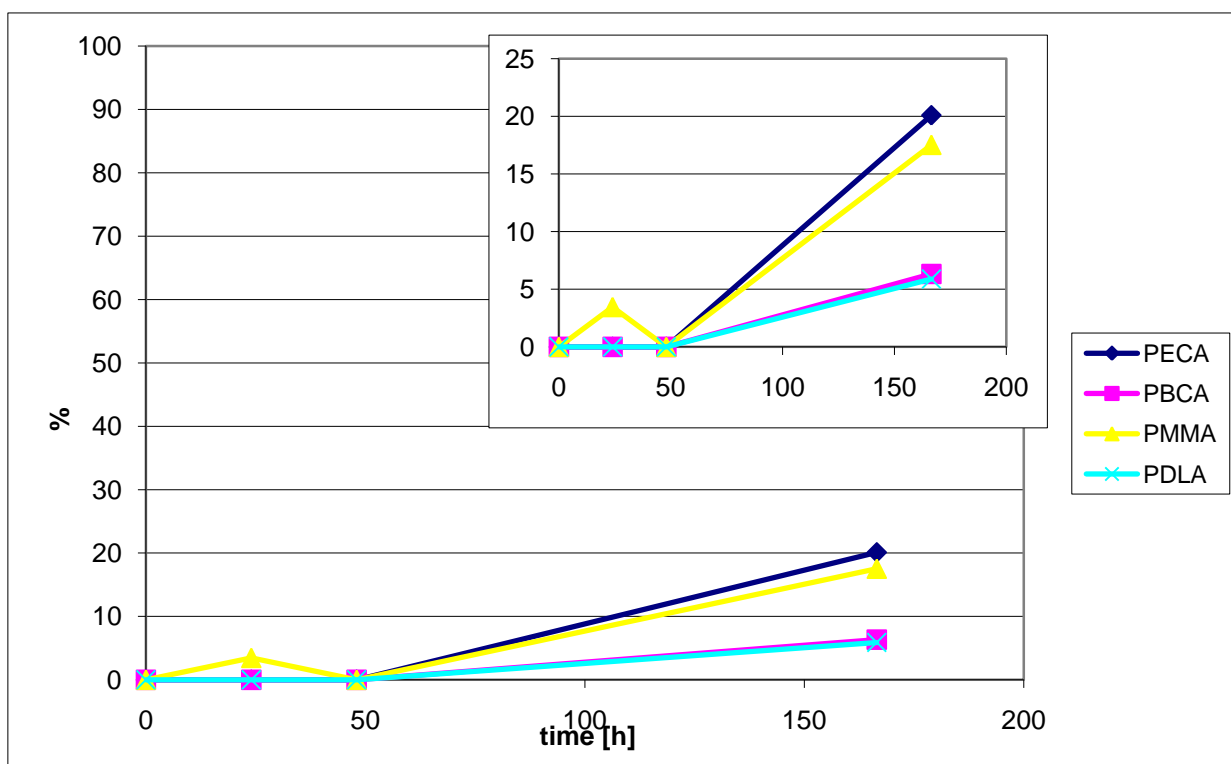


Figura 3-2: effetto delle temperatura di 5°C sulle nanoparticelle. Scostamento percentuale dell'IF rispetto al tempo zero. Ogni punto rappresenta la media di 4 valori sperimentali.

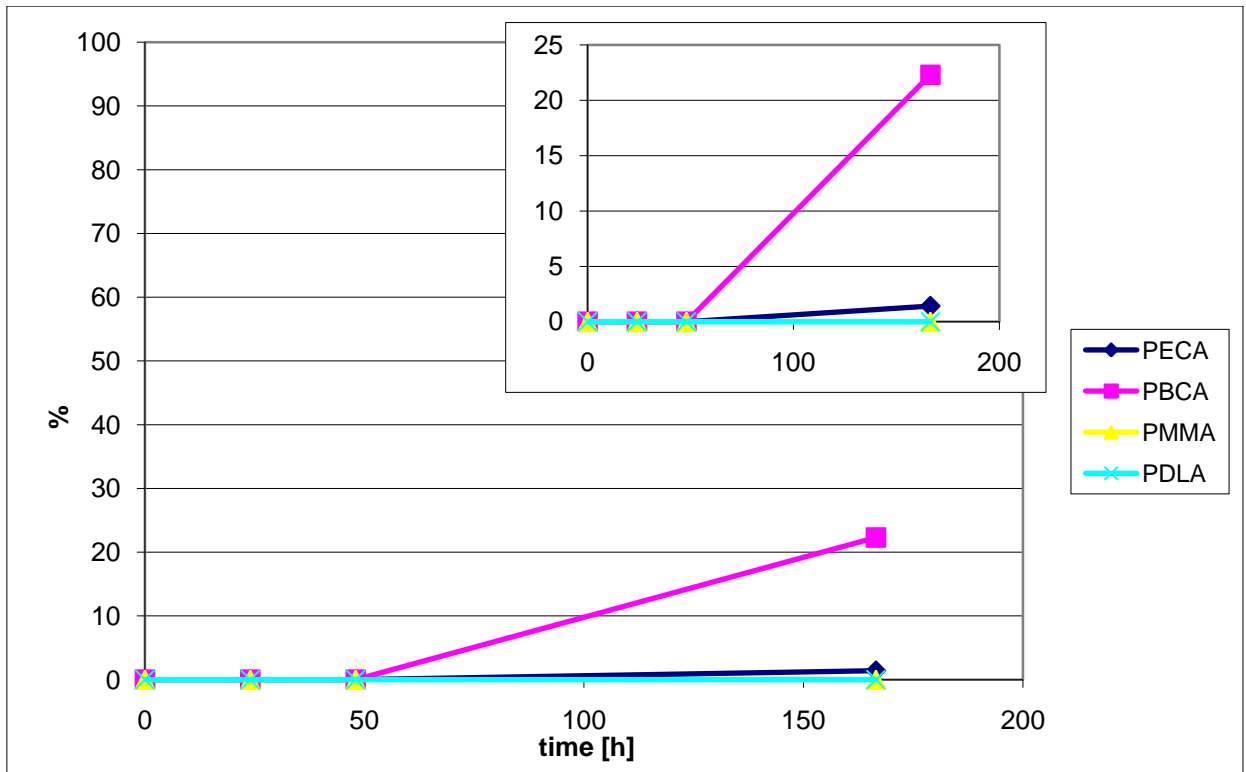


Figura 3-3: effetto delle temperatura di 37°C sulle nanoparticelle. Scostamento percentuale dell'IF rispetto al tempo zero. Ogni punto rappresenta la media di 4 valori sperimentali.

Dai dati riportati in Figura 3-2 e Figura 3-3 è possibile osservare che tutte le preparazioni di nanoparticelle siano stabili, sia a 5°C che a 37°C, per circa 48 ore e che tendono a destabilizzarsi, a tempi più lunghi. Dopo 7 giorni i campioni discostano la loro fluorescenza rispetto al tempo iniziale del 20% circa nel caso più rilevanti. Inoltre, i dati ottenuti indicano che la stabilità delle emulsioni di nanoparticelle, conservate a 5°C e a 37°C, non è influenzata né dal tipo di polimero utilizzato per la preparazione né dalla dimensione delle nanoparticelle stesse.

Stabilità delle nanoparticelle in omogenato

In questo esperimento i campioni di ogni tipo di particelle, ottenuti con il proprio processo di produzione, vengono diluiti in omogenati di organo e posti ad una temperatura di 37°C. A tempi diversi si è eseguita poi la misura della fluorescenza del campione al fluorimetro. I valori di IF restituiti dallo strumento sono stati normalizzati e confrontati su dei grafici.

E' stata valutata la stabilità delle diverse preparazioni di nanoparticelle (Tabella 3-2). I campioni sono stati posti in siero e in omogenati tessutali di fegato, fegato bollito, rene e cervello, ed incubati a 37°C. Ogni campione è costituito da 2 ml di emulsione miscelati con 2 ml di siero o di omogenato e, a tempi diversi (fino a 6 giorni), aliquote del campione sono state prelevate e la misura dell'IF è stata eseguita come descritto precedentemente (Capitolo 2.4.1:).

Anche per questo esperimento si ipotizza che avvengano variazioni nella fluorescenza dell'emulsione in seguito a fenomeni di rilascio del tracciante, di aggregazione delle particelle e di decomposizione delle particelle per degrado del polimero.

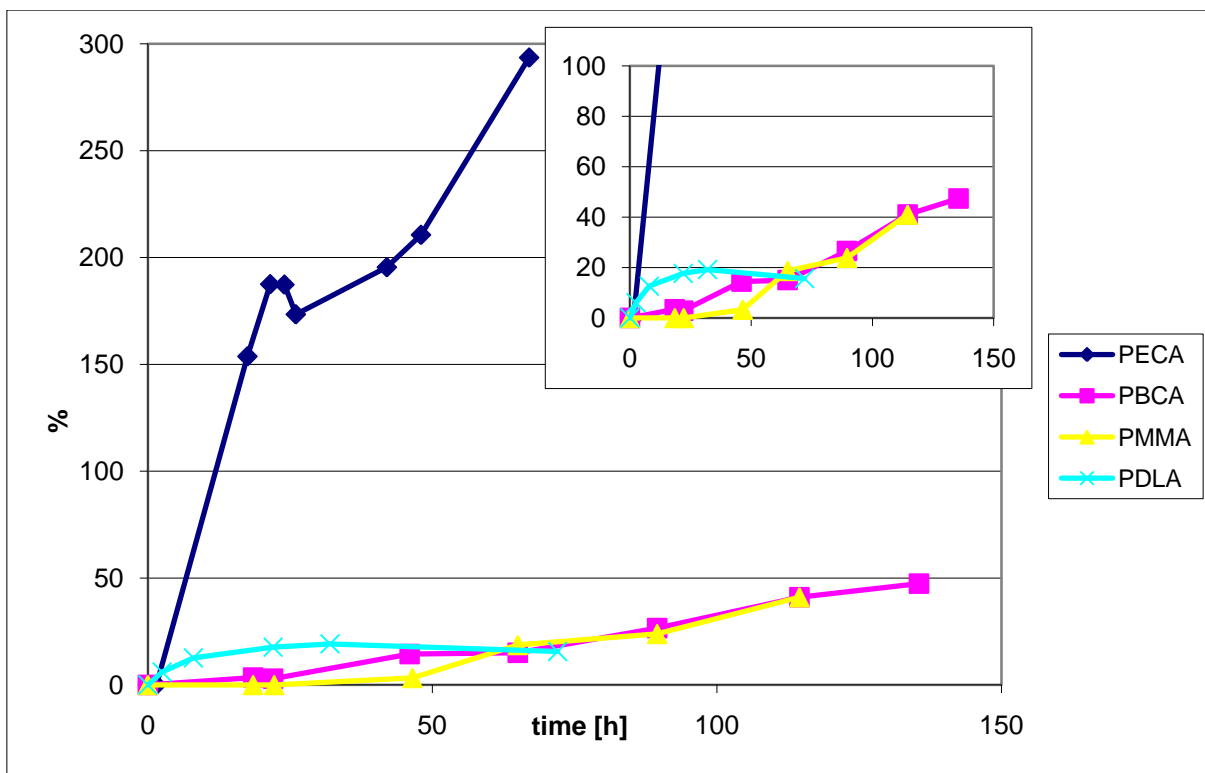


Figura 3-4: effetto del siero alla temperatura di 37°C sulle nanoparticelle. Scostamento percentuale dell'IF rispetto al tempo zero. Ogni punto rappresenta la media di 4 valori sperimentali.

Come indicano i dati riportati in Figura 3-4, quando incubate con il siero per le nanoparticelle composte di PECA si osserva un aumento importante (200%) della fluorescenza rispetto quella iniziale, entro le 24 ore. Per le altre nanoparticelle invece la fluorescenza aumenta di circa il 20% del fluoroforo inglobato entro le 72 ore di incubazione e circa il 40% dopo 6 giorni.

Dai dati emersi per le nanoparticelle incubate con l'omogenato di fegato (Figura 3-5), anche in questo caso, quelle composte da PECA risultano le più instabili, variando la fluorescenza di circa il 60% entro le 24 ore e di circa il 90% dopo 72 ore di incubazione. Le nanoparticelle composte da PBCA variano di circa il 20% la loro fluorescenza entro le prime 24 ore, ma la preparazione risulta poi abbastanza stabile nelle ore successive, fino a 6 giorni. Le nanoparticelle di PMMA e PDLA risultano più stabili nelle prime 48 ore di incubazione, ma il rilascio complessivo di fluoroforo a tempi più lunghi è simile a quello osservato nelle preparazioni di PBCA.

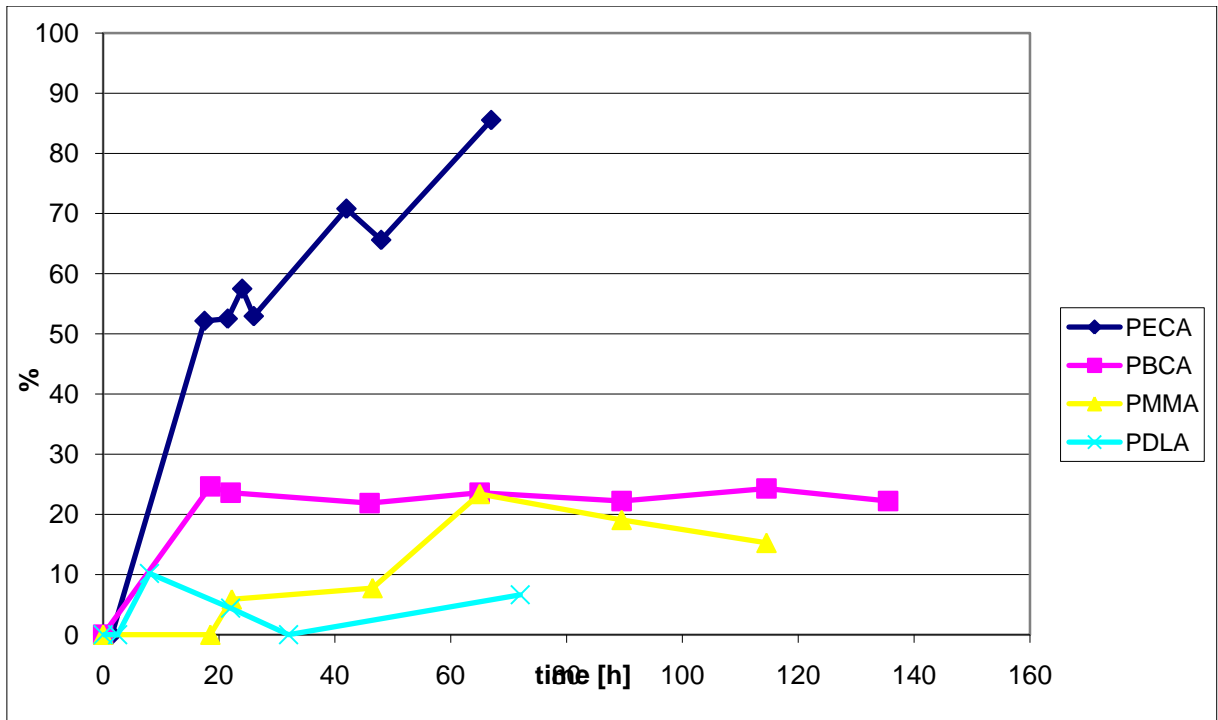


Figura 3-5: effetto dell'omogenato di fegato alla temperatura di 37°C sulle nanoparticelle. Scostamento percentuale dell'IF rispetto al tempo zero. Ogni punto rappresenta la media di 4 valori sperimentali.

Per verificare che la degradazione delle nanoparticelle e la modificazione delle emulsioni osservata nell'omogenato di fegato fosse specificatamente dovuta all'azione delle proteasi e degli enzimi di degradazione normalmente attivi in questo organo, l'esperimento è stato ripetuto incubando le nanoparticelle in un omogenato precedentemente bollito, in modo da inattivare qualsiasi tipo di attività enzimatica.

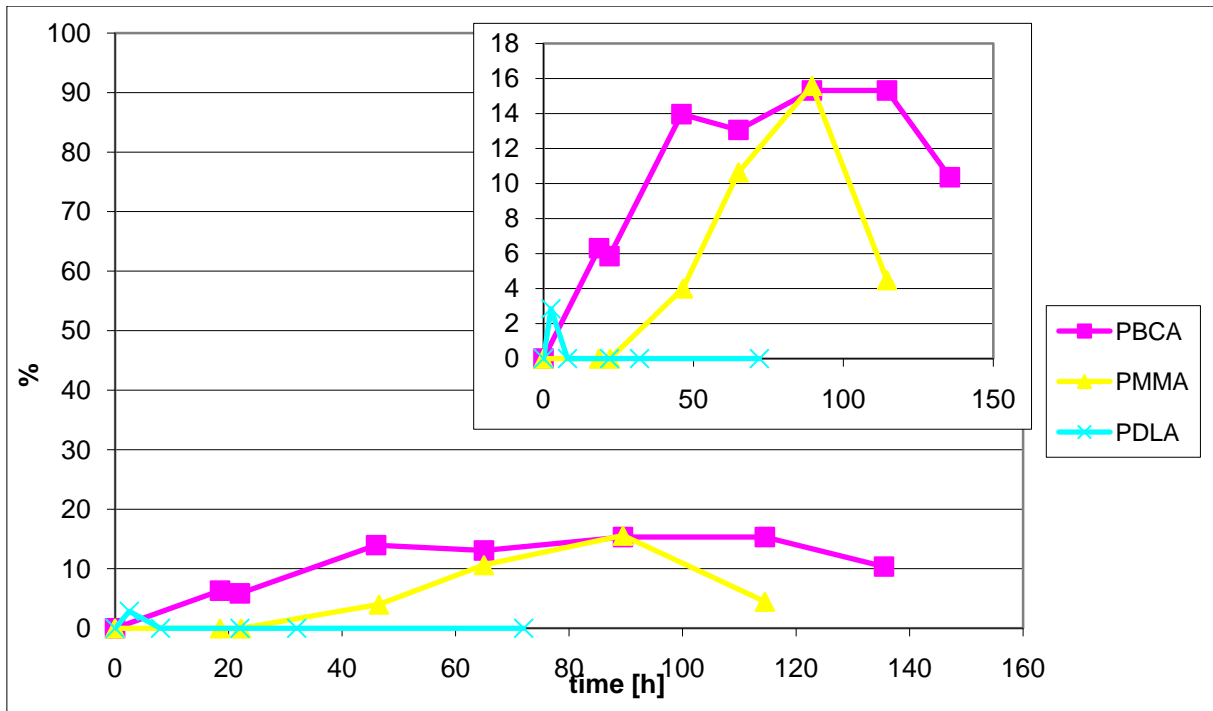


Figura 3-6: effetto dell'omogenato bollito di fegato alla temperatura di 37°C sulle nanoparticelle. Scostamento percentuale dell'IF rispetto al tempo zero. Ogni punto rappresenta la media di 4 valori sperimentali.

Come si può osservare dalla Figura 3-6 tutte le preparazioni si possono considerare stabili nell'omogenato bollito, ad indicare che la degradazione vista precedentemente è da attribuirsi ad una azione specifica degli enzimi epatici.

Quando incubate in omogenato di reni, la preparazione di nanoparticelle composte da PECA vengono completamente modificate e vi è un aumento considerevole della fluorescenza dopo 72 ore di incubazione (Figura 3-7). Le nanoparticelle composte da PBCA o PMMA aumentano la loro fluorescenza gradatamente nel tempo fino ad arrivare ad un massimi di circa il 40% dopo 6 giorni di incubazione. Le preparazioni di PDLA invece hanno una modificazione più veloce e raggiungono il 20% circa di aumento della fluorescenza entro 24 ore e del 40% dopo 72 ore.

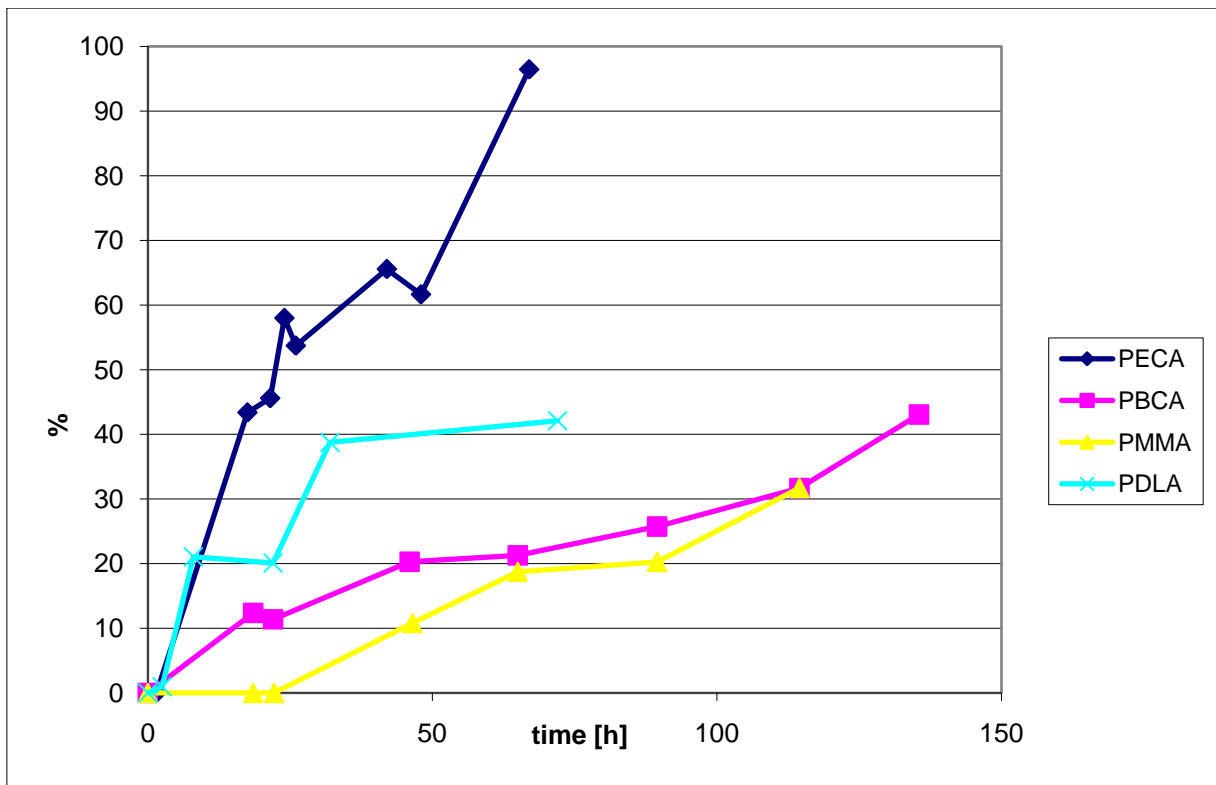


Figura 3-7: effetto dell'omogenato di reni alla temperatura di 37°C sulle nanoparticelle. Scostamento percentuale dell'IF rispetto al tempo zero. Ogni punto rappresenta la media di 4 valori sperimentali.

Un andamento simile a quelle nell'omogenato di reni è osservato quando le nanoparticelle sono state incubate con l'omogenato di cervello (Figura 3-8). Anche in questo caso, le preparazioni composte da PECA sono risultate le più instabili, rilasciando circa l'80% del fluoroforo inglobato dopo 72 ore di incubazione.

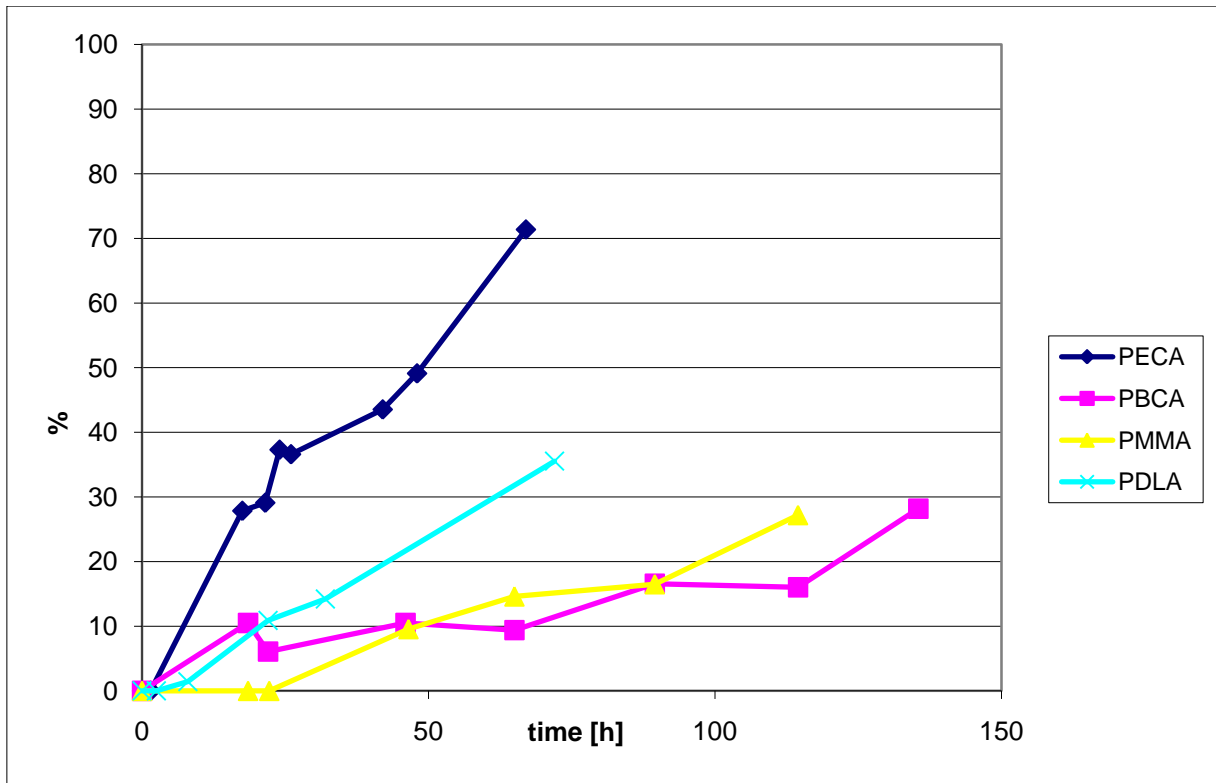


Figura 3-8: effetto dell'omogenato di cervello alla temperatura di 37°C sulle nanoparticelle. Scostamento percentuale dell'IF rispetto al tempo zero. Ogni punto rappresenta la media di 4 valori sperimentali.

I risultati ottenuti con questo esperimento indicano che la composizione del polimero influenza pesantemente la stabilità delle le nanoparticelle nei liquidi biologici e che in particolare le nanoparticelle composte da PECA sono quelle che si degradano più facilmente.

Inoltre, i dati ottenuti suggeriscono che ci possa essere una correlazione tra la dimensione delle nanoparticelle e la loro stabilità *in vitro*. Infatti, le particelle di PMMA che hanno le dimensioni di 30 nm sono quelle che risultano essere le più stabili a 24 ore, rispetto a tutte le altre preparazioni testate che hanno dimensioni superiori ai 100 nm (Tabella 3-3).

Tabella 3-3: confronto delle nanoparticelle nelle diverse preparazioni nelle prime 24 ore dall'incubazione.

Nanoparticelle	Dimensione [nm]	% scostamento dell'IF rispetto t0 dopo 24h			
		SIERO	FEGATO	RENI	CERVELLO
PECA	120	187	58	58	37
PBCA	115	3	24	12	6
PMMA	30	0	6	0	0
PDLA	120	18	5	20	11

Capitolo 3.4.2: Misura del loading di un tracciante e di un farmaco

Con i metodi visti in precedenza (Capitolo 2.4.2:) è stata valutata la capacità delle nanoparticelle di inglobare un tracciante o un farmaco caricato durante il processo di preparazione. Per conoscere questa caratteristica, propria per ogni tipo di particella, sono stati messi a punto dei metodi di estrazione specifici per il tracciante, Cholesteryl Bodipy, e per il farmaco, Tetraciclina. Inoltre tramite due diverse tecniche di misura, è stato calcolata la quantità di sostanza caricata nelle particelle.

Estrazione del Bodipy dalle nanoparticelle

Con la procedura di estrazione del fluoroforo dalle nanoparticelle, vista nel capitolo dei Metodi (Capitolo 2.4.2:), si ottengono per ognuno dei tipi di nanoparticelle analizzate, due fasi: una acquosa ed una organica, contenenti il Bodipy estratto dalle particelle. Queste fasi sono state analizzate al fluorimetro e, sulla base del rapporto, è stata determinata la quantità di fluoroforo inglobata dalle nanoparticelle durante il processo di produzione.

Per svolgere questo esperimento sono state prodotte delle nanoparticelle cariche di Bodipy con le caratteristiche riassunte nella Tabella 3-4 *Tabella 3-4*.

Tabella 3-4: schema delle nanoparticelle cui è stata misurata la quantità di fluoroforo inglobata.

	Processo produttivo	Dimensione	Polimero	Bodipy	Surfattante
		[nm]	[mg/ml]	[µg/ml]	
PECA	2	120	10	10	SDS
PBCA	2	115	10	10	SDS
PMMA	2	30	10	10	SDS
PDLA	1	120	10	10	SDS

Dopo aver normalizzato le misure della fluorescenza è stato adeguato il valore secondo la diluizione finale del campione in modo che le misure potessero essere confrontate. Le percentuali di inglobamento del fluoroforo ottenute dai vari campioni, sono state riportate nella Tabella 3-5.

Tabella 3-5: confronto tra le percentuali di Bodipy inglobate nelle nanoparticelle. Ogni valore rappresenta la media di 4 valori sperimentali. Per ogni valore medio è indicata la deviazione standard.

% di Bodipy inglobata nelle nanoparticelle				
	Fase acquosa		Fase organica	
PECA	26,13	±0,57	73.87	±1.61
PBCA	40.80	±6.20	59.20	±12.05
PMMA	18.71	±2.81	81.29	±12.19
PDLA	9.34	±1.36	90.66	±13.25

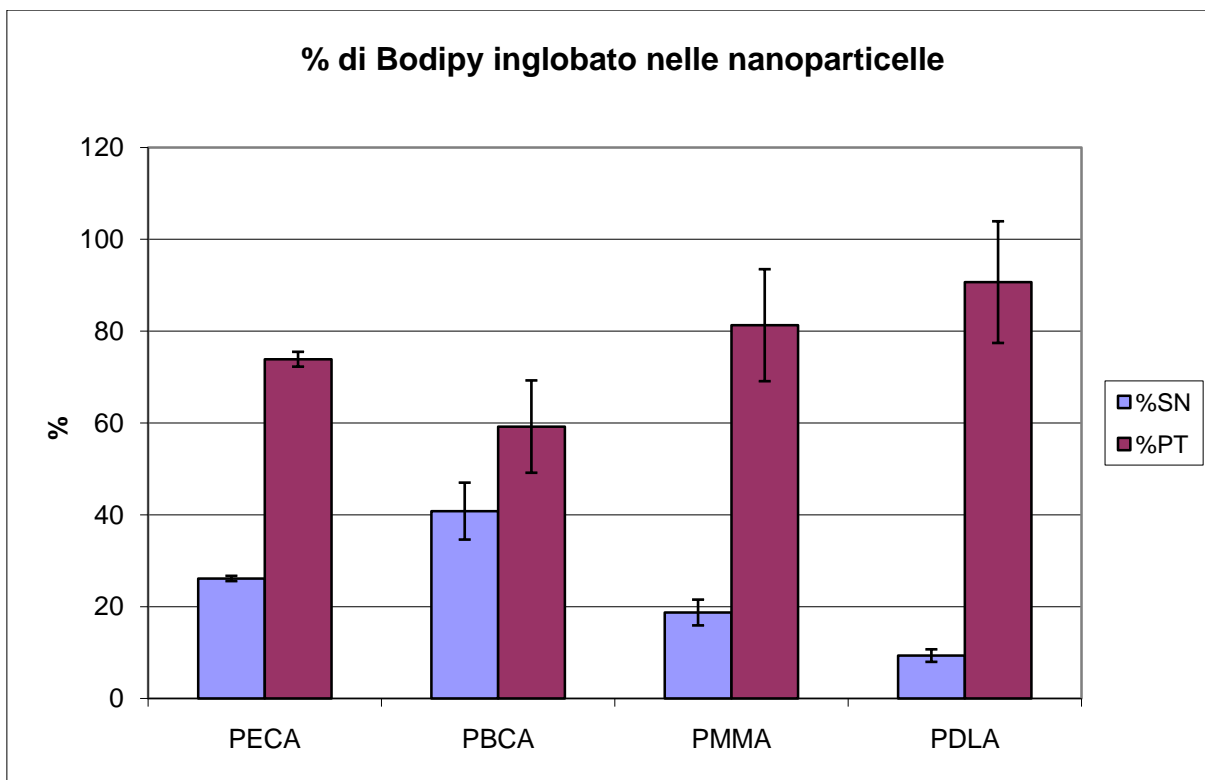


Figura 3-9: confronto tra le percentuali di Bodipy inglobate nelle nanoparticelle e la quella presente nella fase acquosa.

Dal grafico in Figura 3-9 si osserva che le particelle di PECA, PMMA e PDLA hanno una capacità elevata di inglobamento del tracciante. I valori percentuali dimostrano una grande affinità del Bodipy con i polimeri.

Il metodo di estrazione del fluoroforo utilizzato è da considerarsi adeguato per avere un'indicazione sulla capacità di inglobamento di una molecola lipofila da parte delle particelle. Non è stato fatta una misura dell'efficienza del processo di estrazione, però in generale si può concludere che il Bodipy abbia una forte affinità con le nanoparticelle e che durante il processo di produzione si abbia la possibilità di inglobare una quantità significativa di tracciante nelle nanoparticelle.

Tabella 3-6: confronto tra la dimensione delle nanoparticelle e la capacità di inglobamento del Bodipy.

Nanoparticelle polimeriche	Dimensione [nm]	MW del polimero [kDa]	% Bodipy inglobato
PECA	120	300	73.87±1.61
PBCA	115	400	59.20±12.05
PMMA	30	500	81.29±12.19
PDLA	120	10	90.66±13.25

Si può inoltre osservare che ogni tipo di nanoparticelle ha una sua caratteristica capacità di inglobamento del fluoroforo (Tabella 3-6). Questa capacità non sembra essere correlata né dalla sua dimensione né dal peso del polimero, infatti particelle di PMMA con un diametro di 30 nm (MWpolimero = 500kDa) inglobano circa la stessa quantità di Bodipy delle nanoparticelle di PDLA aventi un diametro 4 volte superiore (MWpolimero = 10kDa). Probabilmente queste differenze sono attribuibili alle diverse affinità che ogni polimero mostra nei confronti del Bodipy.

Estrazione della Tetraciclina dalle nanoparticelle

Con la procedura di estrazione della Tetraciclina dalle nanoparticelle, vista nel capitolo dei Metodi (Capitolo 2.4.2:), si ottiene una fase acquosa contenente il principio attivo estratto. Questa è stata analizzata con una procedura di lettura all'HPLC ed è stato determinata la concentrazione di Tetraciclina presente in essa.

Con questo esperimento è possibile determinare la quantità di Tetraciclina che le nanoparticelle riescono ad inglobare durante il processo di produzione.

Si vuole infine ottenere una preparazione che contenga una quantità di Tetraciclina paragonabile ad una dose normalmente somministrabile ad un topo di 80µg.

Per svolgere questo esperimento sono state prodotte delle nanoparticelle cariche di Tetraciclina a concentrazione variabile, le cui caratteristiche sono riassunte in Tabella 3-7: *Tabella 3-4*

Tabella 3-7: caratteristiche delle nanoparticelle contenenti Tetraciclina

PMMA [10mg/ml] – 30 nm – Tween80		
% Tetra rispetto al polimero	Tetra [$\mu\text{g/ml}$]	Tetra teorica estratta in 25μl per HPLC [$\mu\text{g/ml}$]
0,5	50	7,143
1	100	15,0
2	200	28,571
5	470,4	67,2

Questo è un esperimento “dose-risposta” ovvero producendo nanoparticelle contenenti Tetraciclina ad una concentrazione variabile, si vuole osservare la corrispondenza con i valori di concentrazione misurati con l’HPLC.

Aumentando la concentrazione della Tetraciclina nell’emulsione si prevede un aumento della quantità di tetraciclina contenuta nelle particelle.

Per effettuare la quantificazione è stata determinata una retta di taratura del segnale. Nell’HPLC sono stati analizzati dei campioni di 25 μl di acqua contenenti Demeclociclina (25 $\mu\text{g/ml}$) e Tetraciclina (Idroclorata perché fosse solubile in acqua) a concentrazione variabile (2, 5, 20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$).

Dal rapporto delle aree dei picchi di Tetraciclina e Demeclociclina si ottiene un valore corrispondente alla concentrazione di Tetraciclina presente nel campione. In Figura 3-10 viene rappresentata la retta di taratura ricavata ($y= 0,034*x+0,191$; $R=0,998$).

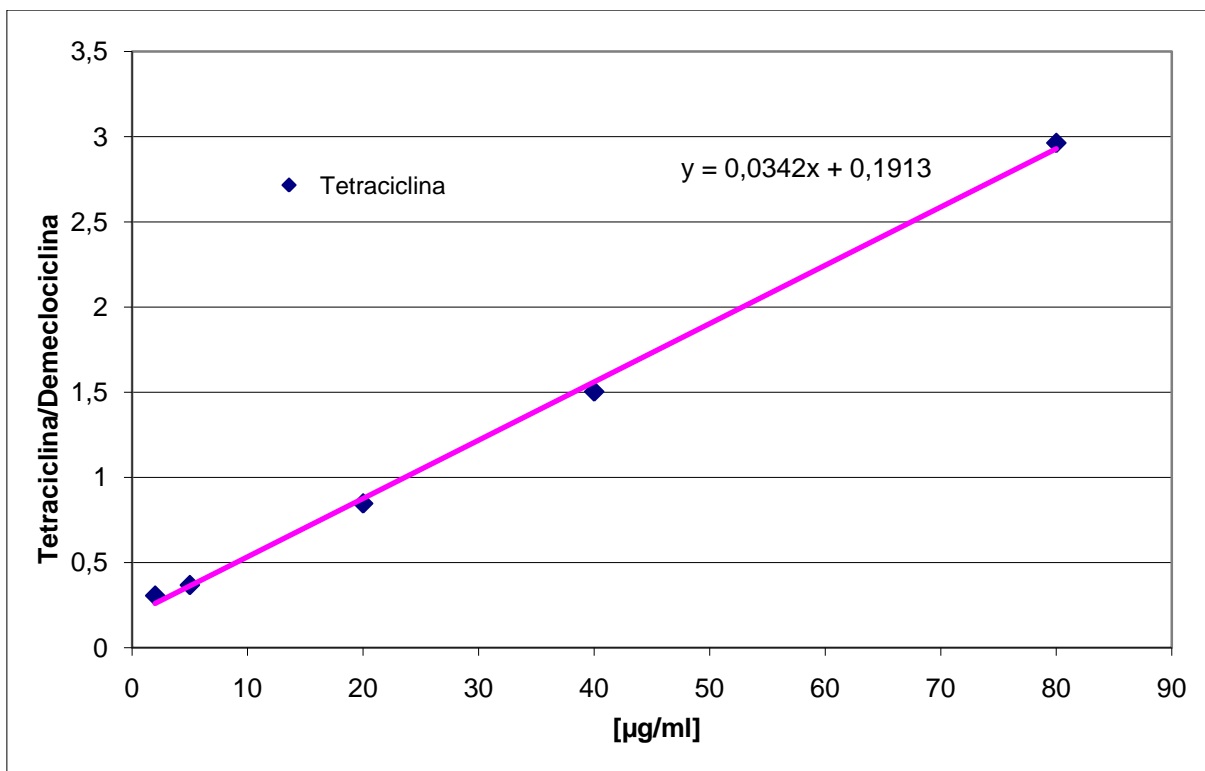


Figura 3-10: retta di taratura del segnale misurato con l'HPLC, corrispondente alla concentrazione della Tetraciclina. Il valore dei singoli punti è ottenuto facendo il rapporto tra l'area del picco della Tetraciclina con quella del picco della Demeclociclina usata come standard interno (25µg/ml).

Dall'operazione di estrazione della Tetraciclina dai campioni di nanoparticelle, effettuata come descritto nel capitolo dei Metodi (Capitolo 2.4.2:), si ottiene un campione in fase acquosa contenente la Tetraciclina estratta. Ogni campione è stato analizzato all'HPLC, e attraverso la retta di taratura, è stata ricavata la concentrazione finale di Tetraciclina contenuta in esso. Questo valore corrisponde alla quantità di Tetraciclina incapsulata nelle nanoparticelle del campione, ovvero quella quantità che durante il processo di produzione delle nanoparticelle viene accumulata nella fase polimerica. Il rimanente quantitativo si assume che rimanga disperso nella fase acquosa dell'emulsione.

Il processo di estrazione della Tetraciclina dalle nanoparticelle polimeriche ha una propria efficienza specifica. La quantità di Tetraciclina estratta dalle nanoparticelle potrebbe essere infatti solo una parte di quella che è contenuta in tutta la fase polimerica. Per verificare questo è stata fatta una valutazione dell'efficienza del

processo di estrazione. Un campione di nanoparticelle di PMMA (30nm, 10mg/ml, stabilizzate da Tween80) prive di Tetraciclina è stata trattata come prevede il metodo di estrazione visto per le particelle contenenti Tetraciclina. Quando si è ottenuta la fase polimerica dell'emulsione separata dalla fase acquosa, è stata aggiunta della Tetraciclina (0,47 mg/ml). Così facendo si è ottenuto un campione di polimero e Tetraciclina che avesse le stesse caratteristiche di un campione di nanoparticelle contenente Tetraciclina (0,47 mg/ml) con efficienza di inglobamento del 100%. Proseguendo con il processo di estrazione, si ottiene infine un campione di fase acquosa contenente la Tetraciclina estratta dalla fase polimerica. La concentrazione di Tetraciclina presente in questo campione, confrontata con quella iniziale, determina l'efficienza di estrazione del processo utilizzato.

Tabella 3-8: riassunto della quantità di Tetraciclina incapsulata per ogni campione di nanoparticelle di PMMA prodotto. Ogni campione di nanoparticelle differisce per la diversa percentuale di tetraciclina rispetto al polimero.

Tetraciclina nelle nPs di PMMA (30nm, 10mg/ml, Tween80)					
% TC rispetto polimero	TC teorica nella nPs	TC in 25µl per HPLC		% incapsulamento	TC misurata nelle nPs
%	[µg/ml]	TC teorica [µg/ml]	TC misurata [µg/ml]	%	[µg/ml]
0,5	50	7,14	2,31	32,37	16,18
1	100	15	4,58	30,55	30,55
2	200	28,57	3,99	13,97	27,93
5	470,4	67,2	13,60	20,25	95,24

I dati riassunti nella Tabella 3-8 dimostrano che la quantità di Tetraciclina incapsulata nelle nanoparticelle, rispetto a quella introdotta nel reattore, per ciascuna delle 4 preparazioni sia di circa il 30% e che tenda a diminuire all'aumentare della Tetraciclina disponibile. In Figura 3-11 si può osservare la differenza marcata tra la concentrazione di Tetraciclina totale nella preparazione di nanoparticelle (Tetra teorica, somma della Tetraciclina nella fase acquosa e nella fase polimerica dell'emulsione) e la quantità presente nelle nanoparticelle (Tetra effettiva).

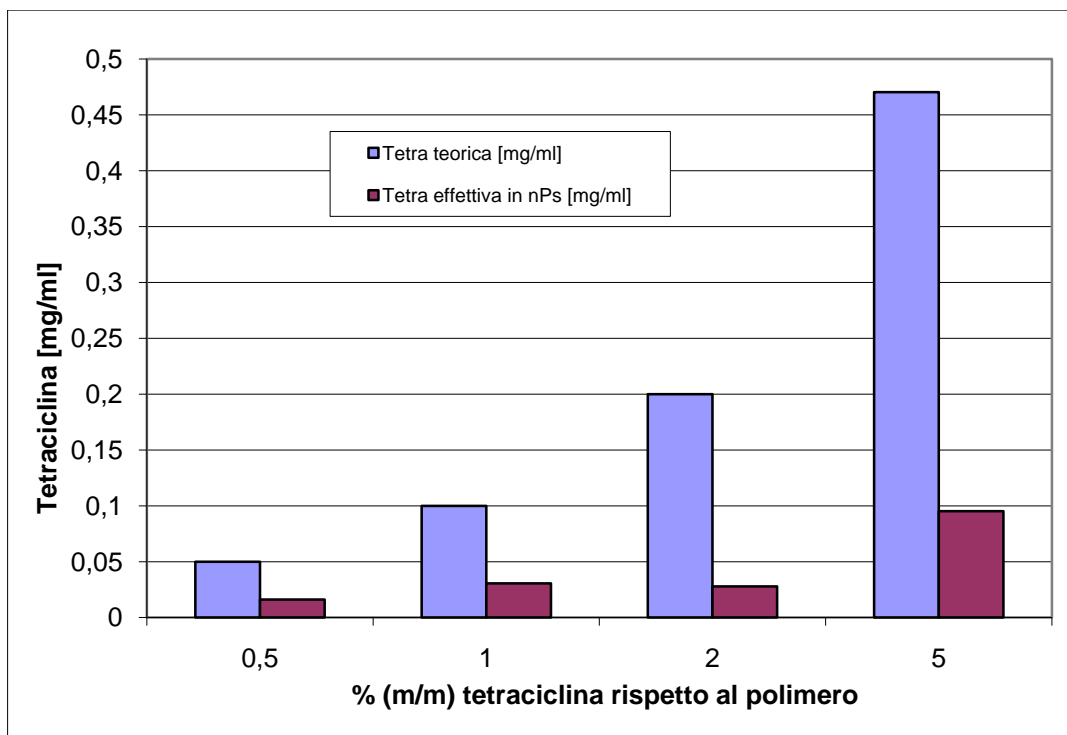


Figura 3-11: quantificazione della Tetraciclina incapsulata nelle nanoparticelle (Tetra effettiva) all'aumentare di quella disponibile nella preparazione (Tetra teorica).

Dall'analisi dell'efficienza del processo di estrazione, risulta che con il metodo utilizzato si estrae il 36% della Tetraciclina presente nella fase polimerica. Si può quindi dedurre che in realtà la quantità di Tetraciclina misurata sia molto inferiore rispetto alla quantità presente realmente nelle nanoparticelle.

Tenendo conto dell'efficienza di estrazione, si può risalire a dei valori che verosimilmente approssimino la capacità delle nanoparticelle di incapsulare la Tetraciclina (Tabella 3-9).

Tabella 3-9: quantità di Tetraciclina incapsulata per ogni campione di nanoparticelle di PMMA prodotto, tenendo conto dell'efficienza di estrazione della Tetraciclina dalla fase polimerica pari al 36%.

Tetraciclina nelle nPs di PMMA (30nm, 10mg/ml, Tween80)			
% TC rispetto polimero	TC teorica	TC misurata nelle nPs (eff. estrazione 36%)	% incapsulamento
%	[µg/ml]	[µg/ml]	%
0,5	50	44,95	89,91
1	100	84,85	84,85
2	200	77,58	38,79
5	470,4	264,56	56,24

Da questi risultati si può perciò confermare il fatto che all'aumentare del rapporto Tetraciclina/polimero nell'emulsione, l'efficienza di inglobamento del farmaco da parte delle nanoparticelle diminuisca. A basse concentrazioni di Tetraciclina si hanno efficienze paragonabili a quelle viste in precedenza per il Bodipy. L'interesse di incapsulare la Tetraciclina è quello di poter utilizzare le nanoparticelle come veicolo per il farmaco.

Perché si possano utilizzare le nanoparticelle di PMMA come veicolo della Tetraciclina, in linea di principio è necessario che vengano rispettati due condizioni. In primo luogo la dose di polimero somministrata deve essere inferiore alla dose letale (Letal Dose, LD50). Il valore di LD50 dipende dal tipo di somministrazione e dal soggetto a cui è somministrata la sostanza: in un topo, una dose *iv* di PMMA ha un LD50 di 1960 mg/kg_{topo} [8], ovvero di 39,2 mg/topo (peso topo standard = 20g).

Le emulsioni utilizzate hanno una concentrazione di PMMA pari a 10 mg/ml e per un volume di iniezione *iv* nei topi di 100µl, la dose di polimero assunta risulta di 1mg/topo, cioè 40 volte inferiore alla dose letale.

La seconda condizione è che la dose di farmaco da somministrare sia pari ad una dose standard di riferimento. La dose di Tetraciclina convenzionalmente somministrata *iv* ad un topo è di 4 mg/kg_{topo} [9], ovvero 80 µg/topo (peso topo standard = 20 g). Dai dati ottenuti con le nanoparticelle di PMMA, la quantità di Tetraciclina incapsulata in un volume di 100 µl di emulsione somministrabili *iv* ad un topo, è riassunta in Figura 3-12 e nella Tabella 3-10.

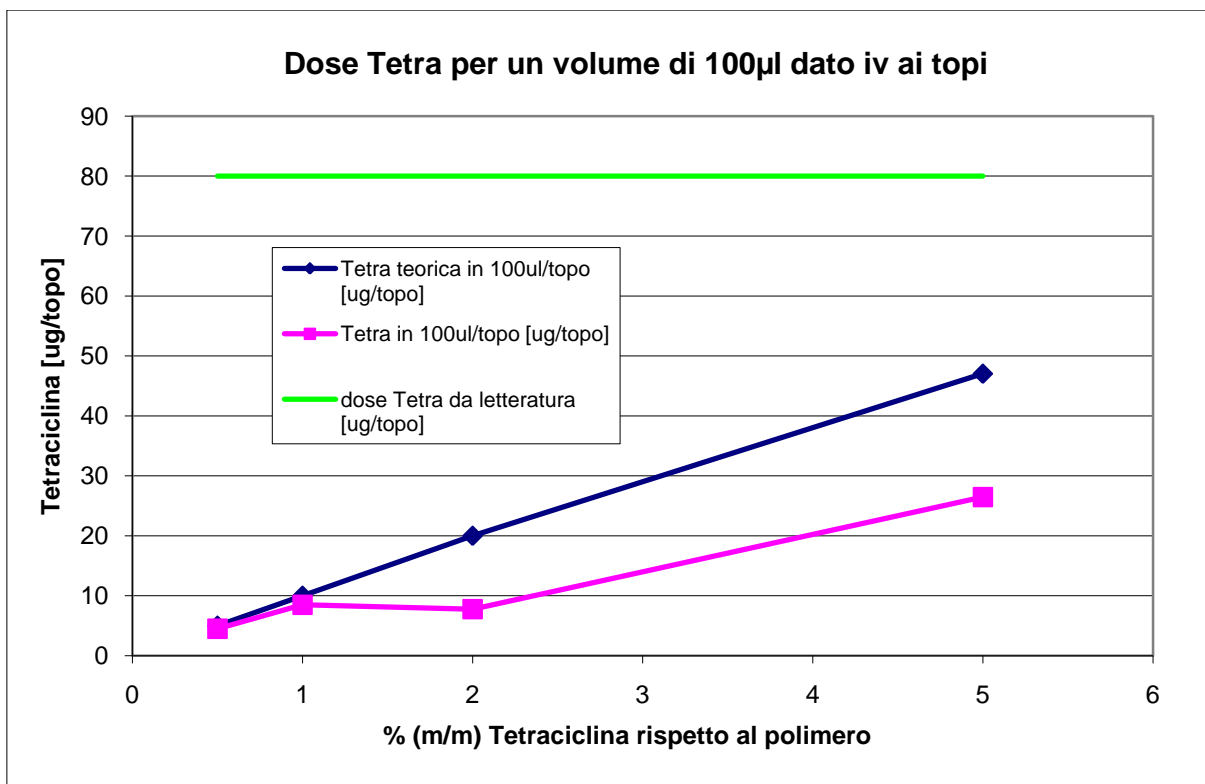


Figura 3-12: variazione della dose di Tetraciclina somministrata ad un topo con un volume di 100µl dato *iv*.

Tabella 3-10: dose di Tetraciclina somministrata al topo con 100 µl di emulsione di nanoparticelle di PMMA.

Dose iv topo di Tetraciclina in nPs di PMMA (30nm, 10mg/ml, Tween80)		
% TC rispetto polimero	TC teorica in 100 µl iv/topo	TC misurata in 100 µl iv/topo
%	[µg/topo]	[µg/topo]
0,5	5	4,50
1	10	8,49
2	20	7,76
5	47,04	26,46

Dal grafico in Figura 3-12 si può riscontrare visivamente come l'efficienza di incapsulamento della Tetraciclina sia elevata per bassi rapporti farmaco/polimero.

In Tabella 3-10 viene presentata quale sia la dose di Tetraciclina somministrabile ai topi con un volume di 100 µl iniettati *iv*. La dose massima somministrabile si ottiene per un rapporto Tetraciclina/polimero del 5% (m/m). 26,46 µg/topo sono una dose 3 volte inferiore alla dose caratteristica di Tetraciclina di 80 µg/topo.

Considerando nuovamente alle considerazioni fatte in precedenza, riguardanti l'LD50 del PMMA e la necessità di avere una maggiore dose di Tetraciclina somministrabile con le nanoparticelle, si può pensare di modificare le concentrazioni del polimero in emulsione per permettere di ottenere una dose efficace di Tetraciclina. Aumentando infatti di 3 volte la concentrazione di nanoparticelle in emulsione, la dose di Tetraciclina diventa circa 80 µg/topo, ma la dose di PMMA introdotto rimane ancora molto inferiore alla dose letale (3 mg/topo contro i 39,2 mg/topo).

Capitolo 3.4.3: Test *in vivo*

Le nanoparticelle utilizzate per le prove *in vivo* sono costituite da PMMA e stabilizzate con il TWEEN80.

Le nanoparticelle sono state somministrate ai topi e sono stati prelevati gli organi per l'osservazione dell'accumulo.

La Tabella 3-11 riassume le caratteristiche principali degli esperimenti condotti *in vivo* con nanoparticelle di PMMA (10mg/mL) stabilizzate con TWEEN80 e somministrate iv alla dose di 100µl/topo.

Tabella 3-11: schema delle prove *in vivo*.

Prova	d	Bodipy	topi	stato	sacrificio	perfusione	organi prelevati				
							siero	reni	fegato	cervello	milza
N°	[nm]	[µg/ml]			[h]						
1	20	10	C57	Sani	1 – 5	No	X			X	X
2	11	20	C57	Sani	5	Si	X		X	X	X
3	20	10	C57 femm	EAE	1.5 – 5	No	X	X	X	X	X

Le nanoparticelle sono state osservate al microscopio per verificare la specificità di emissione del Bodipy alla lunghezza d'onda di 460-490nm (filtro FITC).

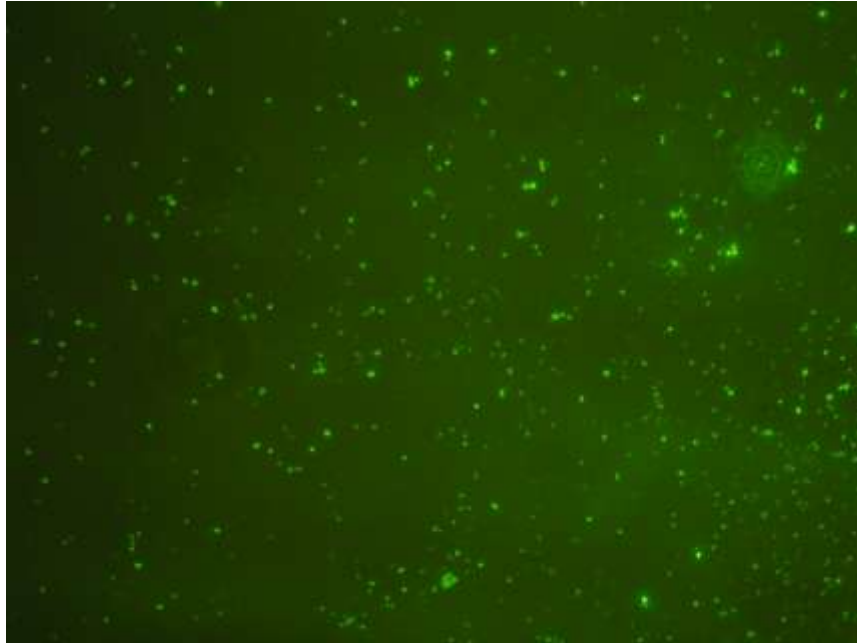


Figura 3-13: nanoparticelle di PMMA contenenti Bodipy osservate al microscopio ottico a fluorescenza con un ingrandimento 40x e filtro FITC.

Dalla Figura 3-13: si riconosce il segnale del Bodipy con il colore verde rispetto al *background* (nero) dell'acqua in cui sono disperse le nanoparticelle, come mostrato dallo spettro di fluorescenza in Figura 3-14.

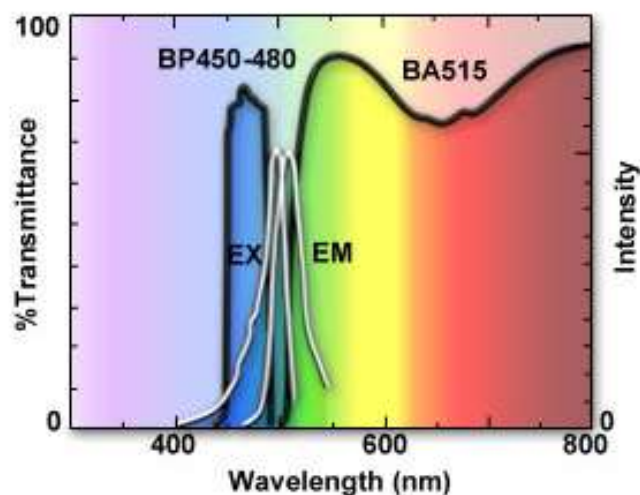


Figura 3-14: collocazione dello spettro di fluorescenza del Bodipy nello spettro delle lunghezze d'onda del visibile. Mostrate entrambe le curve di Eccitazione ed Emissione.

Esperimento 1

Sono state osservate le sezioni degli organi provenienti da animali trattati con 100 μ l di nanoparticelle di PMMA (10mg/ml) marcate con Bodipy.

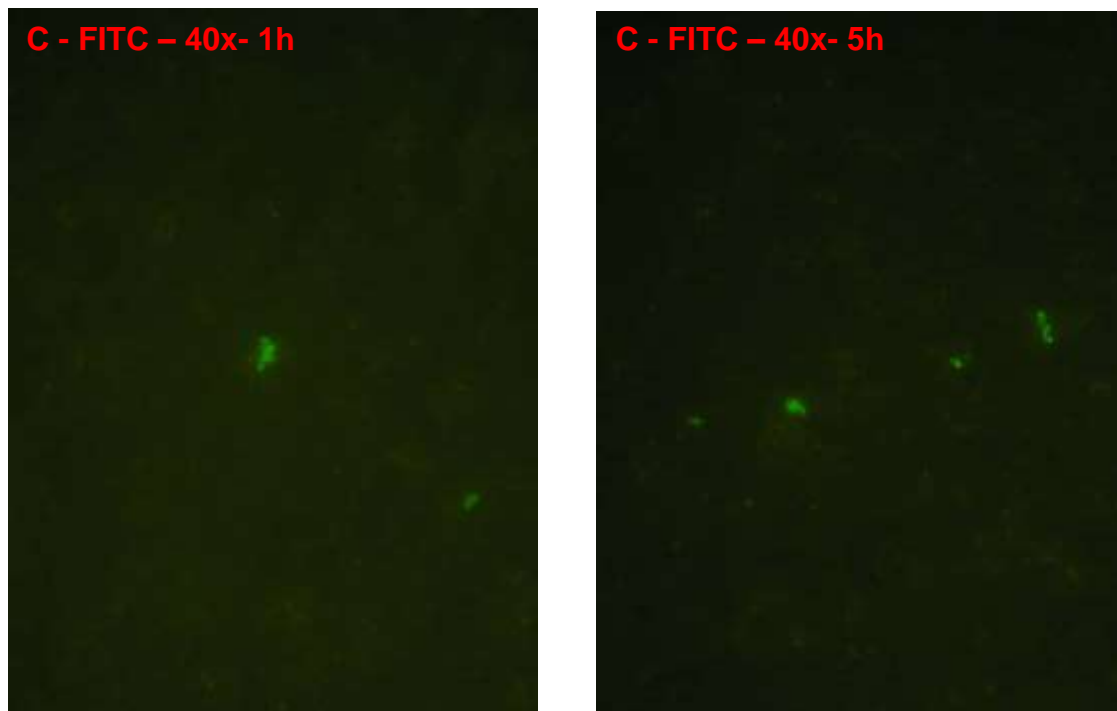


Figura 3-15: sezioni di cervello al microscopio ottico a fluorescenza con un ingrandimento 40x e filtro FITC. Topi trattati con nanoparticelle cariche di Bodipy e sacrificati dopo 1h e 5h dal trattamento.

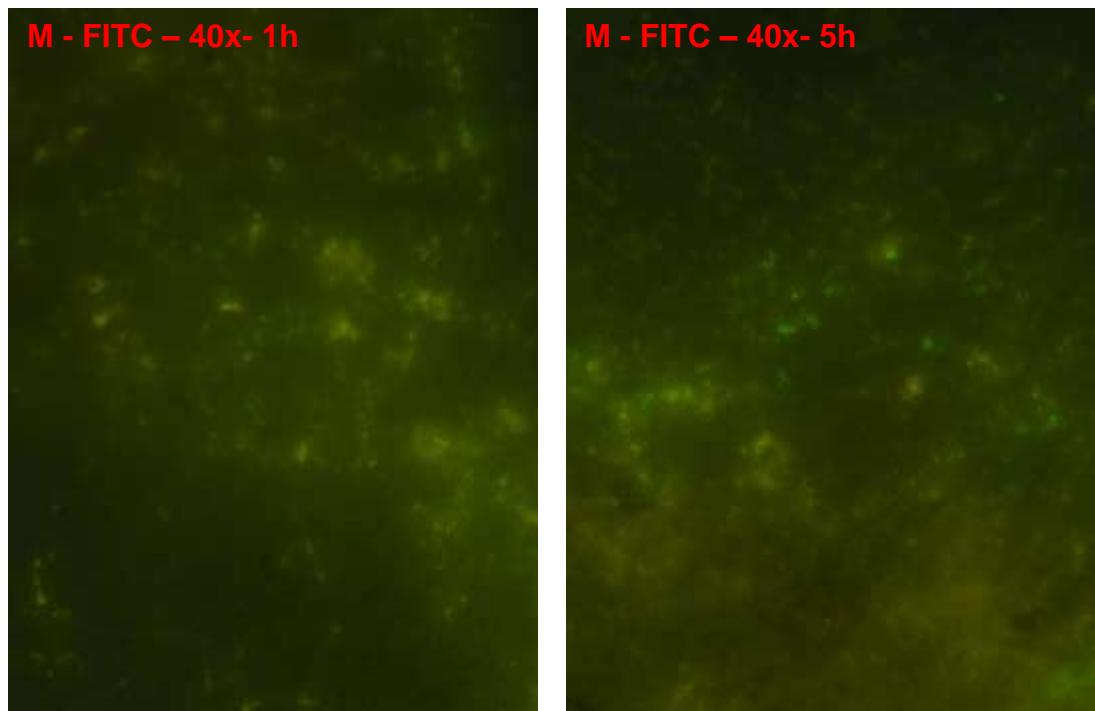


Figura 3-16: sezioni di milza al microscopio ottico a fluorescenza con un ingrandimento 40x e filtro FITC. Topi trattati con nanoparticelle cariche di Bodipy e sacrificati dopo 1h e 5h dal trattamento.

Dalle immagini riportate in Figura 3-15 si osserva la presenza di segnale positivo del Bodipy sia nelle sezioni di cervelli prelevati dopo 1 ora o 5 ore dal trattamento. Si può osservare che le nanoparticelle non siano distribuite nel tessuto in modo omogeneo ma probabilmente in forma accumulata.

In modo analogo, nella milza dell'animale, la distribuzione delle nanoparticelle è maggiore che nel cervello (Figura 3-16).

Dall'insieme di tutte le immagini ottenute si possono trarre alcune considerazioni.

La presenza di segnale del Bodipy in entrambi gli organi dimostra la capacità delle nanoparticelle di PMMA di diffondere nel parenchima del cervello e nella milza di topi sani, sia dopo un'un che dopo 5 ore dalla somministrazione.

La collocazione delle particelle osservate nel cervello rimane in aree extravasali perciò è dimostrata la capacità di attraversare la barriera emato-encefalica.

I dati ottenuti dall'Esperimento 1, sebbene preliminari e con alcuni limiti di determinazione mediante microscopia ottica, suggeriscono che le nanoparticelle di PMMA sino capaci di attraversare la barriera emato-encefalica.

Esperimento 2

Dall'osservazione delle sezioni degli organi provenienti da animali trattati con la dose 100 μ l di nanoparticelle di PMMA (10 mg/ml) marcate con Bodipy mostrate in Figura 3-17 e Figura 3-19, si riscontra l'accumulo di nanoparticelle solo nelle sezioni di fegato e milza, in topi sia perfusi che non perfusi, mentre nei cervelli dei topi perfusi o non perfusi (Figura 3-18) il segnale risulta assente.

Per confermare l'assenza delle nanoparticelle marcate con Bodipy nei cervelli dei topi trattati è stata seguito il protocollo di estrazione del tracciante dall'omogenato dell'organo. Anche con questa analisi non è stato possibile rilevare nessun segnale specifico di fluorescenza in nessuno dei cervelli considerati.

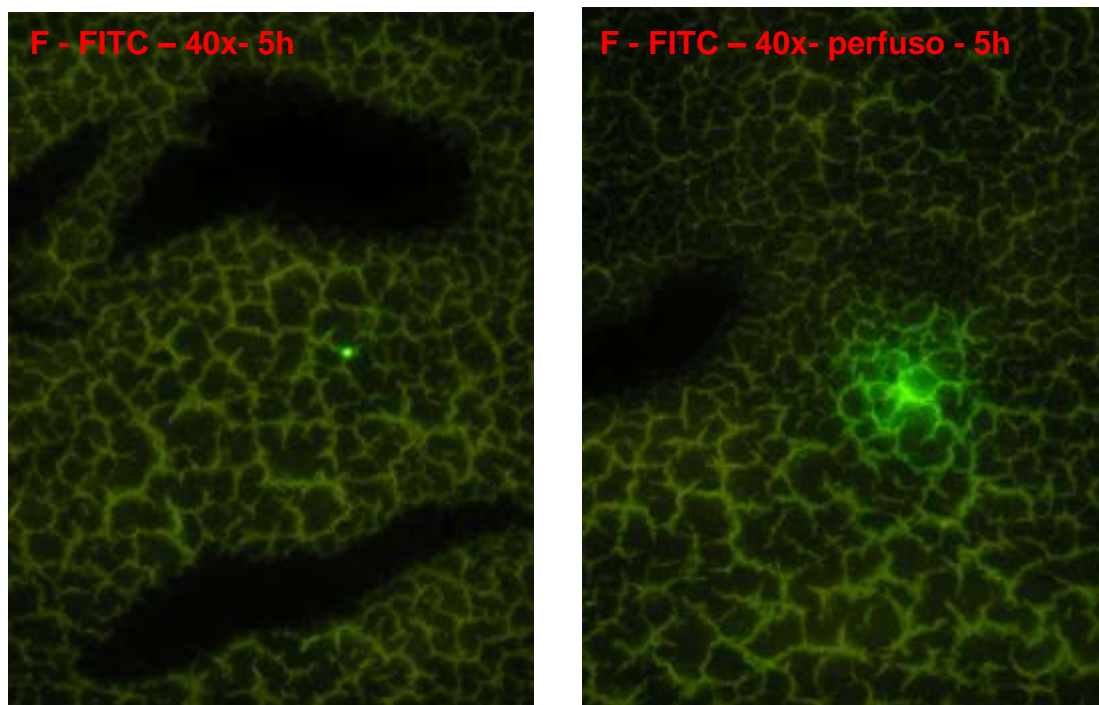


Figura 3-17: sezioni di fegato al microscopio ottico a fluorescenza con un ingrandimento 40x e filtro FITC. Topi trattati con nanoparticelle cariche di Bodipy e sacrificati dopo 5h dal trattamento con e senza perfusione.

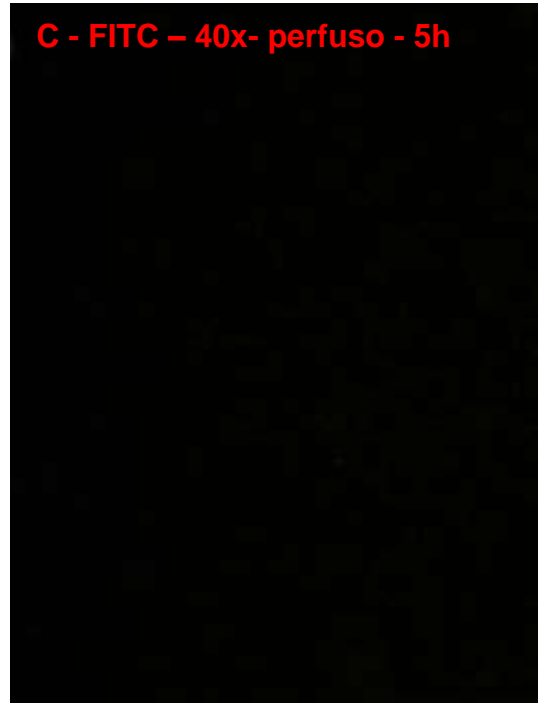
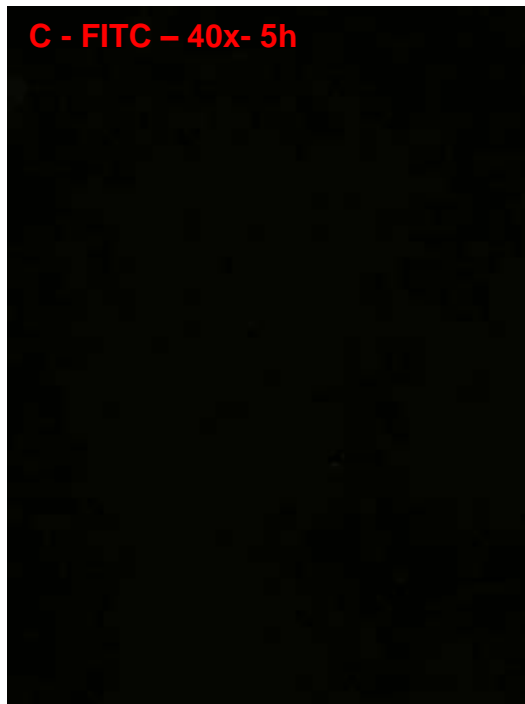


Figura 3-18: sezioni di cervello al microscopio ottico a fluorescenza con un ingrandimento 40x e filtro FITC. Topi trattati con nanoparticelle cariche di Bodipy e sacrificati dopo 5h dal trattamento con e senza perfusione.

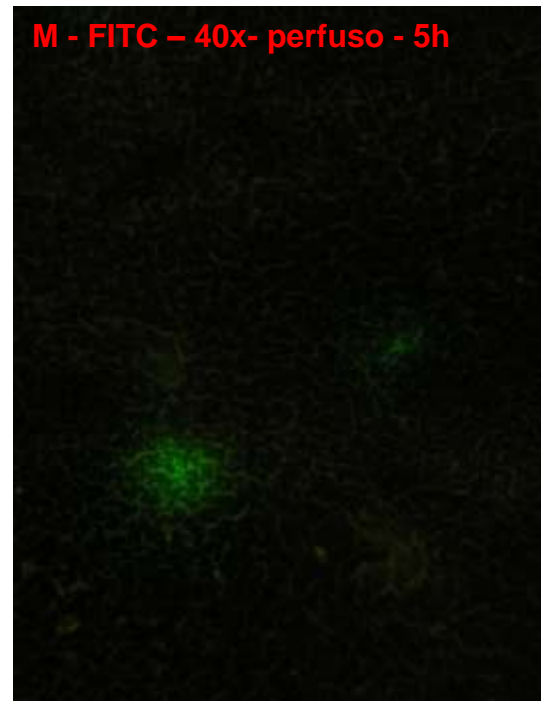
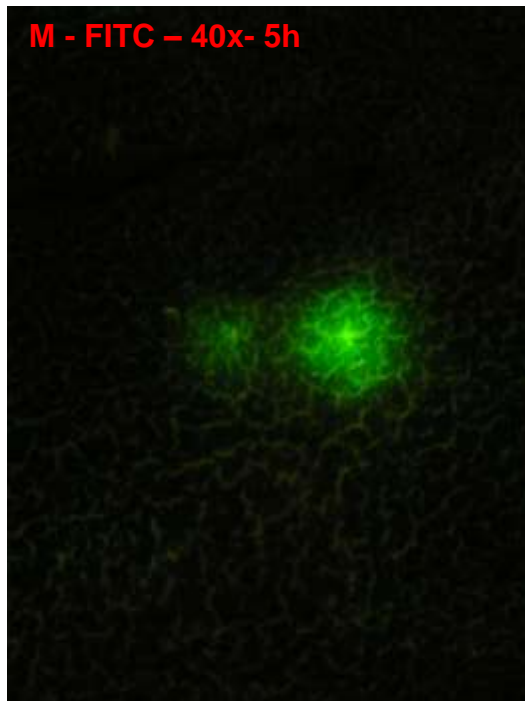


Figura 3-19: sezioni di milza al microscopio ottico a fluorescenza con un ingrandimento 40x e filtro FITC. Topi trattati con nanoparticelle cariche di Bodipy e sacrificati dopo 5h dal trattamento con e senza perfusione.

Dall'esperimento condotto si può concludere che le nanoparticelle di PMMA del diametro di 11nm, marcate con Bodipy si accumulano nel fegato e nella milza diffondendo nel parenchima dei due organi dei topi.

L'assenza di nanoparticelle nel cervello può essere attribuita al fatto che le nanoparticelle con un diametro di soli 11nm potrebbero non essere capaci di attraversare la barriera emato-encefalica in modo efficiente, oppure che il tempo scelto per l'osservazione sia troppo lungo e che il meccanismo di retrodiffusione delle nanoparticelle dal parenchima cerebrale verso la circolazione sanguigna ne abbia già determinato la loro espulsione.

Esperimento 3

In questo esperimento è stata valutata la capacità delle nanoparticelle di attraversare la barriera emato-encefalica in topi in cui è stata indotta una neuroinfiammazione. Il confronto rispetto alla condizione di salute dell'animale viene fatto con nanoparticelle di PMMA di 20 nm, marcate con Bodipy.

Come è previsto dal protocollo dell'esperimento (Capitolo 2.4.3:), ad ognuno dei 10 topi a cui è stata indotta la neuroinfiammazione, viene attribuito uno *score* della malattia.

Tabella 3-12: score finale della malattia nei topi a cui è stata indotta l'EAE prima del trattamento con le nanoparticelle.

Score dei topi con EAE	
Topo n°	Score al 16° giorno
1	0
2	0
3	2
4	2
5	2
6	1
7	1.5
8	2
9	1
10	2.5

Dopo il trattamento con le nanoparticelle i topi sono stati sacrificati a due tempi diversi, a 1,5 ore e a 5 ore.

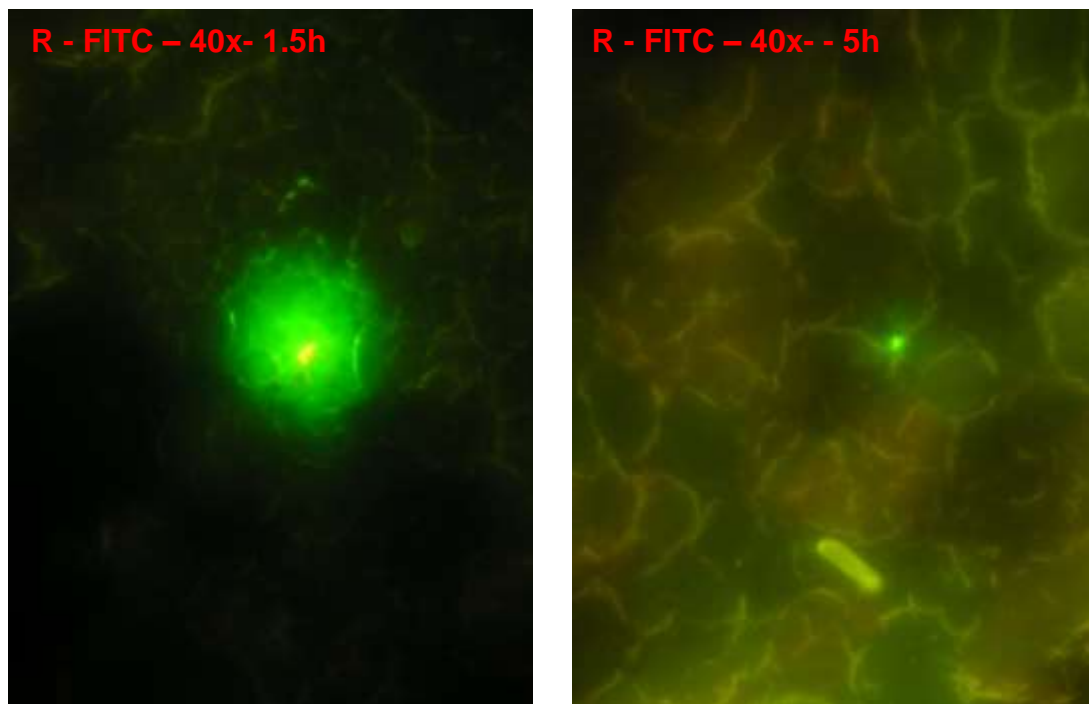


Figura 3-20: sezioni di rene al microscopio ottico a fluorescenza con un ingrandimento 40x e filtro FITC. Topi con EAE trattati con nanoparticelle cariche di Bodipy e sacrificati dopo 1.5h e 5h dal trattamento.

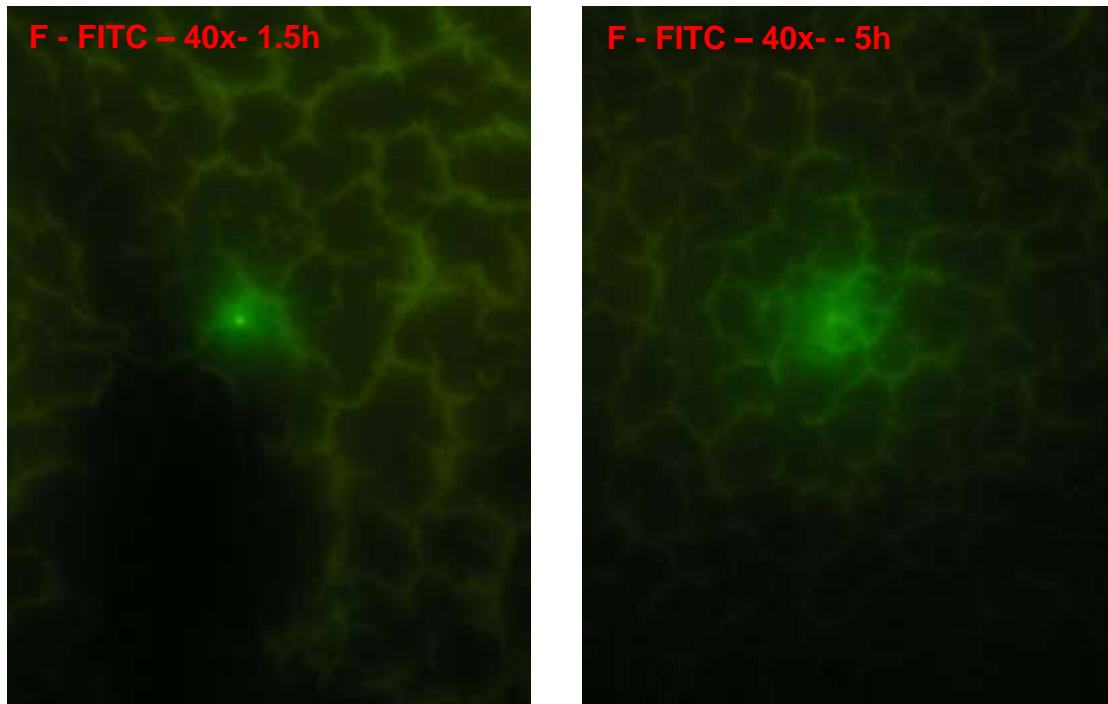


Figura 3-21: sezioni di fegato al microscopio ottico a fluorescenza con un ingrandimento 40x e filtro FITC. Topi con EAE trattati con nanoparticelle cariche di Bodipy e sacrificati dopo 1.5h e 5h dal trattamento.

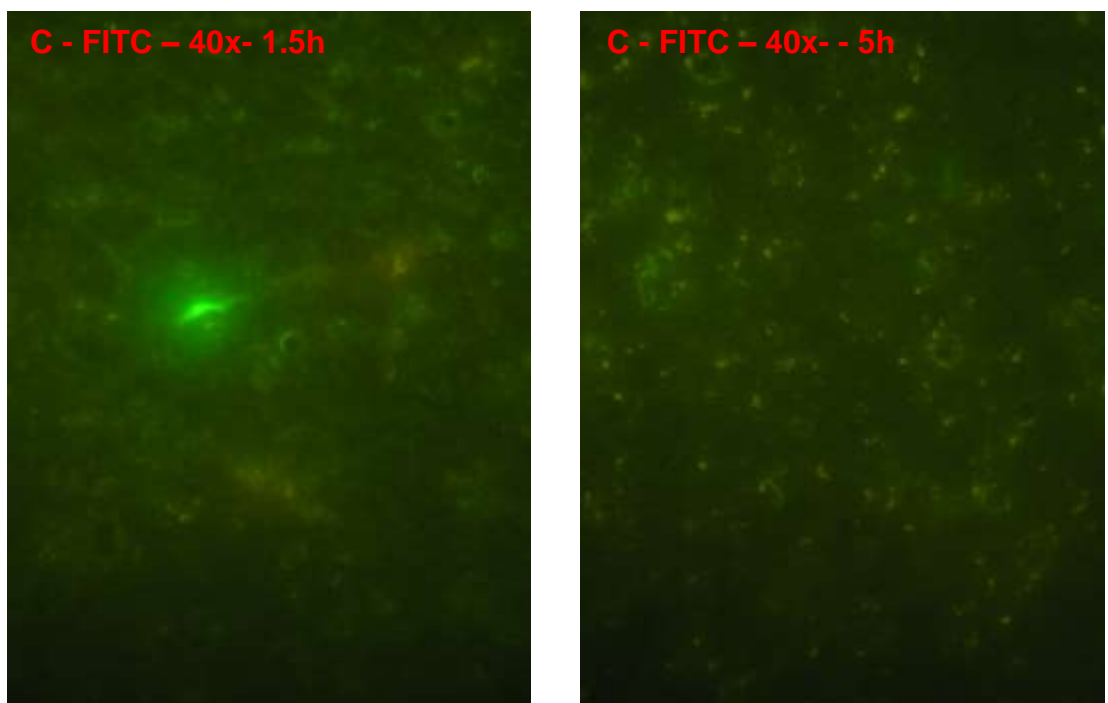


Figura 3-22: sezioni di cervello al microscopio ottico a fluorescenza con un ingrandimento 40x e filtro FITC. Topi con EAE trattati con nanoparticelle cariche di Bodipy e sacrificati dopo 1.5h e 5h dal trattamento.

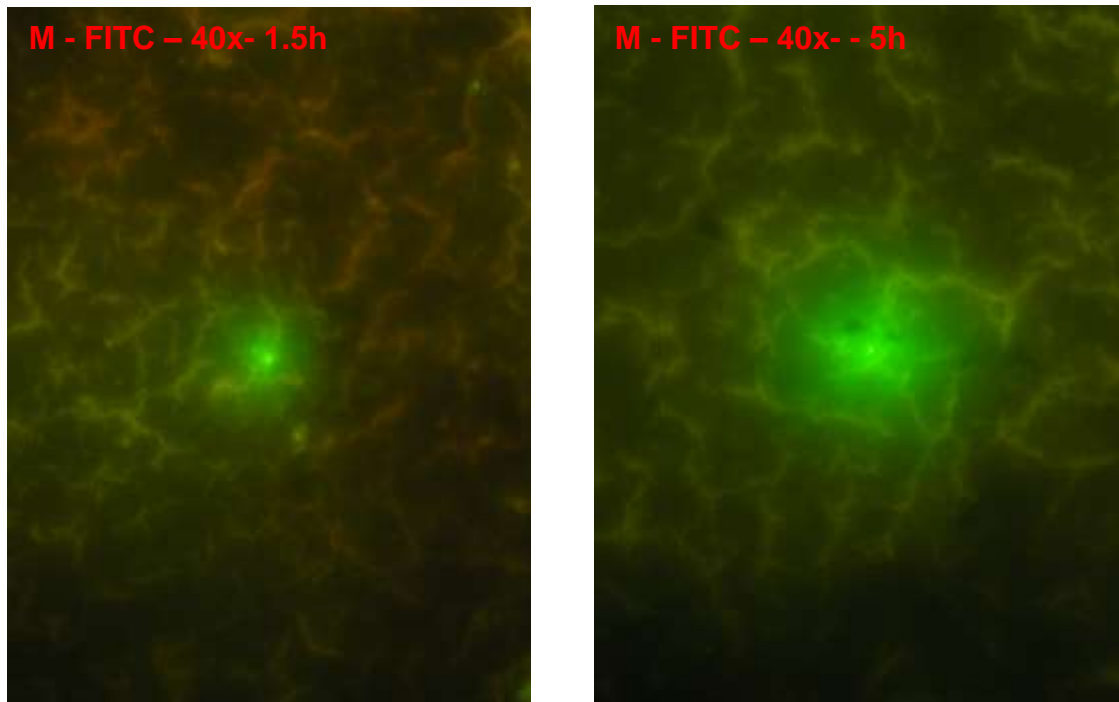


Figura 3-23: sezioni di milza al microscopio ottico a fluorescenza con un ingrandimento 40x e filtro FITC. Topi con EAE trattati con nanoparticelle cariche di Bodipy e sacrificati dopo 1.5h e 5h dal trattamento.

Come riportato in Figura 3-20, Figura 3-21 e Figura 3-23, la presenza di nanoparticelle caricate con Bodipy è stata riscontrata nelle sezioni di rene, fegato e milza, nei topi con EAE sacrificati dopo 1,5 ore e 5 ore.

Nelle sezioni di cervello (Figura 3-22) il segnale positivo di Bodipy è stato rilevato solo dopo 1,5 ore mentre era assente dopo 5 ore.

I cervelli dei topi trattati con le nanoparticelle sono stati poi omogenati e sottoposti al protocollo di estrazione del tracciante per la sua quantificazione. I dati ottenuti non mostrano nessun livello significativo di fluorescenza sia nei cervelli dei topi sacrificati dopo 1,5 ore che in quelli sacrificati dopo 5 ore dal trattamento. Questi dati negativi possono essere attribuiti alla ridotta sensibilità del metodo che non consente di determinare la presenza di poche nanoparticelle disperse nel cervello.

Dall'esperimento effettuato sul modello murino di EAE si possono quindi riassumere le seguenti conclusioni.

Le nanoparticelle di PMMA marcate con Bodipy e con un diametro di 20nm si confermano capaci di diffondere nel parenchima di reni, fegato e milza. Inoltre le nanoparticelle sono state osservate anche nei cervelli dei topi sacrificati solo dopo 1,5 ore dalla somministrazione, mentre la loro assenza a tempi più lunghi suggerisce che siano già state eliminate dall'organismo.

Tabella 3-13: confronto tra score della malattia del topo e la presenza di nanoparticelle nel cervello

Esperimento 3 – segnale positivo del Bodipy nel cervello – topi con EAE – sacrificio 1.5h		
Topo n°	Score	nPs nel cervello
2	0	No
3	2	Si
4	2	Si
9	1	No
10	2.5	Si

Come riassunto nella Tabella 3-13 sembra esistere una relazione diretta tra la gravità della neuro infiammazione causata dalla EAE (score) e la presenza di nanoparticelle nel cervello. Infatti solo nei topi con score alto della malattia (2 – 2,5), è stata rilevata la presenza di nanoparticelle nel cervello mentre in quelle con score basso (0 - 1) le nanoparticelle non sono state osservate.

Sebbene questo esperimento sia stato condotto su un numero limitato di topi, i dati ottenuti indicano chiaramente che in presenza di neuroinfiammazione che rende la barriera emato-encefalica più permeabile, le nanoparticelle possono essere utilizzate come formulazioni terapeutiche.

CAPITOLO 4: CONCLUSIONI

Il lavoro di ricerca svolto è indirizzato all'utilizzo di nanoparticelle polimeriche nel campo del drug delivery. I processi utilizzati per produrre le nanoparticelle sono standardizzati e consentono la realizzazione di emulsioni di nanoparticelle con un intervallo di dimensioni compreso fra 30 nm e 200 nm. (Tabella 4-1).

Tabella 4-1: intervallo di dimensioni ottenibili con gli standard produttivi delle nanoparticelle di PECA, PBCA, PMMA, PDLA.

Nanoparticelle	Processo produttivo	Dimensione minima [nm]	Dimensione massima [nm]
PECA	2	100	150
PBCA	2	90	200
PMMA	2	7	60
PDLA	1	100	200

Le sostanze utilizzate per produrre le nanoparticelle sono biocompatibili e le concentrazioni all'interno delle emulsioni sono mantenute al di sotto dei limiti di tossicità.

Dai risultati ottenuti attraverso prove *in vitro* è stata determinata la diversa stabilità delle emulsioni e delle nanoparticelle, al variare del dal tipo di polimero con cui sono sintetizzate. In particolare nanoparticelle di PMMA risultano avere una stabilità maggiore di quelle di PECA, PBCA e PDLA, sia incubate in condizioni di temperatura differenti (5°C e 37°C), sia quando diluite in liquidi biologici come il siero o gli omogenati di rene, fegato e cervello.

Anche la capacità di inglobamento dei traccianti e dei farmaci, purché siano molecole lipofile, è risultata positiva differente al variare dei diversi materiali utilizzati per sintetizzare le nanoparticelle. In particolare l'efficienza di caricamento del Cholesteryl Bodipy varia tra il 70% e il 90% a seconda del polimero di cui sono costituite le particelle e, grazie a questi valori elevati, è possibile pensare di poterle applicarle in fase diagnostica. Per le nanoparticelle di PMMA inoltre è stata riscontrata un'elevata

efficienza di carico della Tetraciclina ed un'elevata stabilità, pertanto queste particelle sono state scelte per effettuare prove di passaggio della BBB.

Con l'obiettivo di testare il possibile trasporto di farmaci attraverso la barriera emato-encefalica, sono state svolte delle prove *in vivo* su dei topi, per determinandone la distribuzione di nanoparticelle nell'organismo. Si è osservato che particelle di PMMA sono in grado di accumularsi in tutti i principali organi, in particolare nel fegato, nella milza, nei reni e anche nel cervello. Svolgendo ulteriori verifiche su topi nei quali la permeabilità della BBB era compromessa in seguito ad una neuro-infiammazione, si è raggiunta una correlazione tra avanzamento della malattia e la presenza di nanoparticelle nel cervello.

BIBLIOGRAFIA

- [1]. Freitas, *Current status of nano medicine and medical nanorobotics*, *Computational and Theoretical Nanoscience*, Vol. 2, 1-25, 2005
- [2]. Enciclopedia Treccani: *Biomateriale*.
- [3]. *Stereoselective and controlled polymerization of D,L-lactide using indium trichloride*, Agostino Pietrangelo, Marc A. Hillmyer and William B. Tolman, 2009
- [4]. The Dow Chemical Company, Press Release 11/1/2000
- [5]. Lunt J, Shafer. A, *Polylactic Acid Polymers from Corn: Potential Applications in the Textile Industry*, Cargill Dow Polymers LLC, www.cdpoly.com
- [6]. VisEn Medical, U.S.A.
- [7]. *Long-Circulating PEGylated Polycyanoacrylate Nanoparticles as New Drug Carrier for Brain Delivery*, P. Calvo, 2001
- [8]. Evident Technologies, MSDS v1.0, giugno 2005, product PMMA
- [9]. J H Bowdre et. al., *Antibiotic efficacy against Vibrio vulnificus in the mouse: superiority of tetracycline*, *J Pharmacol Exp Ther* June 1983, 225:595-598

RINGRAZIAMENTI

Tutto cominciò così.

Mercoledì, 12 Marzo 2008 ore 23.23 05”

Da: massimiliano.guarnaschelli@mail.polimi.it

A: davide.moscatelli@polimi.it

Buongiorno,
vorrei informala, chiederle un parere e capirci qualcosa.

Anzitutto, oggi dopo essere uscito entusiasta dalla presentazione del corso TIC2 ho contattato (per conoscenza) un cardiologo che si interessa di ricerca e collabora con l'istituto Mario Negri. La conversazione mi è stata necessaria per ricevere la garanzia che proprio quell'istituto possa e sia disposto a fornire sussidi di vario genere per quanto riguarda gli studi applicativi proposti dal suo corso. Ad esempio si potrebbe avere accesso alle biblioteche o alle relazioni dei congressi o addirittura conoscere persone che studiano e fanno ricerca in campo farmacologico. Questa è l'informazione che volevo darle.

Ora, è utile (alla classe in generale) questa "cosa" ai fini del lavoro da svolgere per il corso TIC2 o addirittura se si entrasse nell'ottica di un possibile tirocinio (per tesi)?
Considera pertinente al programma da svolgere le informazioni provenienti da un istituto di ricerca del campo farmacologico, o quello in cui si vuole muovere è un altro settore della ricerca?
Questo è il parere che volevo chiederle.

E' chiaro che gli aspetti considerati da un Ingegnere Chimico sono differenti rispetto a quelli che interesserebbero a un medico o ad un chirurgo però considero che sia comune il background. Proprio questo fa da filo conduttore e permette alle due realtà di incontrarsi, aiutarsi e arrivare allo stesso fine.

Insomma, per farla breve se volessi seguire il corso TIC2 è utile o meno questo "aggancio"? Per me e per la classe ovviamente.
Spero di aver fatto un intervento pertinente e di non averle rubato del tempo inutilmente. Se così non fosse, significa che non abbia capito bene quello che si farà al corso e sarebbe meglio che me lo reillustrasse nuovamente.

Grazie
Massimiliano Guarnaschelli 725224

p.s.: al corso non mi sono iscritto perché sto valutando ancora le mie preferenze però sono molto interessato.

ciao Massimiliano,

direi che più pertinente di così non si può!
tra l'altro conosco bene l'istituto mario negri: mi ha pagato 10 anni di borse di studio dalla 1^ superiore all'ultimo anno dell'università. e mia moglie ci ha lavorato!

quando partiamo con la collaborazione?
L'aggancio è ottimo e se c'è possibilità di fare una tesi, acchiappala al volo! se riesci a combinare un incontro per parlare con loro/cardiologo ancora meglio!

e a questo punto mi permetto di spingerti a fare il corso!!!!!!

fammi sapere
ciao ciao
Davide

Buongiorno,
va bene, se l'entusiasmo è a questi livelli, farò il suo corso.
Per quanto riguarda l'"aggancio" oggi stesso lo contatterò per confermare la necessità di avere informazioni da lui e dall'istituto.
Prima che inizi la collaborazione vorrei mettere in contatto anche lei con lui/loro così che si abbia tutti un'idea di cosa si ha bisogno (da una parte) e cosa si può fornire (dall'altra).
Ora, attendo che il Prof. Turazza (il cardiologo) mi risponda e poi le farò sapere e se mi permette vi metterò in contatto in qualche modo.
Infine sarà il corso a svelare che cosa vogliamo fare e cosa dovremmo chiedere come supporto, perciò a mercoledì.

Grazie
Massimiliano Guarnaschelli 725224

Era l'inizio secondo semestre del 4° anno, ed oggi ricordando allora sembra passata un'eternità, specialmente per il numero (incredibile) di fatti, lavori, esperienze e persone che hanno riempito le mie giornate.

Sarebbe bello ricordare tutto e tutti, ma questo è pur sempre l'appendice di una tesi. Perciò mi limiterò a ringraziare coloro i quali hanno partecipato e collaborato per la realizzazione di questo lavoro.

Il primo grazie va fatto al mio capo e mentore, Davide. Il suo motore a combustione di entusiasmo con efficienza pari a quella ideale mi ha permesso di correre in un circuito del tutto nuovo che, nonostante le numerose curve e ostacoli, è stato possibile percorrere a velocità altamente competitive e ad un livello professionistico.

Del dipartimento di Ingegneria Chimica "Giulio Natta" del Politecnico di Milano ringrazio:

Prof. Massimo Morbidelli

Prof. Giuseppe Storti

Ing. Marco Dossi

Ing. Fabio Codari

Del dipartimento di Biochimica e Chimica delle Proteine dell'IRF Mario Negri ringrazio:

Dott. Mario Salmona, correlatore di questa tesi

Dott.ssa Luisa Diomede

Dott.ssa Laura Colombo

Dott.ssa Ada de Luigi

Grazie veramente a tutti per l'attenzione e per il sostegno.

O come si dice in inglese: thanks for your attention, thanks to all my supporters!

Massi