

CAPITOLO 4 Risultati sperimentali

4.1 Laser light scattering

4.1.1 Determinazione delle condizioni di misura

Inizialmente, è stato necessario uno studio per determinare le condizioni sperimentali ottimali di misura nelle misure di light scattering, in particolare si è dovuto analizzare la stabilità delle preparazioni in relazione alla concentrazione e al tipo di diluizione. Infatti, le sospensioni di nanoparticelle di lecitina e chitosano tal quali si mostrano troppo lattescenti per misure di diffusione di luce. Inoltre, sono state svolte delle misure di cinetica, ovvero di QELS a vari intervalli di tempo successivi alla diluizione, al fine di studiare la stabilità degli aggregati nel tempo. Invece, le soluzioni di liposomi di lecitina, alla concentrazione di preparazione, erano assolutamente limpide, non necessitavano di diluizione nelle misure di light scattering.

Sono state effettuate delle misure in diluizione su campioni costituiti da lecitina/chitosano 20:1 (NLC 20:1), in questo caso, come detto in precedenza, non è stato possibile effettuare misure sulla soluzione con concentrazione iniziale, ma solo su quelle diluite.

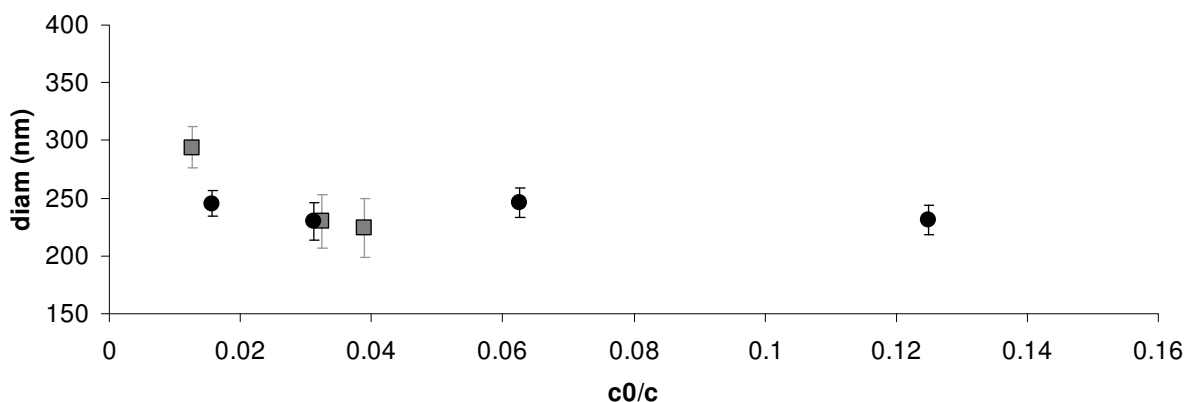


FIG. 1 Dimensioni di nanoparticelle NLC 20:1, a varie diluizioni in acqua distillata. Misure raccolte a 90°.

In figura 1 vengono riportati i risultati ottenuti su due lotti diluendo con acqua distillata. Si nota che le dimensioni non subiscono significative variazioni al cambiare della concentrazione.

Si è, quindi, proceduto a misure su campioni ottenuti diluendo la sospensione colloidale originale (NLC 20:1), con un solvente di composizione uguale a quello presente nelle preparazioni di nanoparticelle (8% etanolo e 0.01% HCl e acqua distillata). Le misure sono state effettuate a due angoli di osservazione: 90° e 60°.

In figura 2 si nota subito come al diminuire della concentrazione si ha una diminuzione del diametro delle particelle. Questo sembra indicare che l'etanolo contribuisce a determinare la il raggio di curvatura degli aggregati: all'aumentare della diluizione una maggiore quantità di etanolo può solubilizzarsi all'interfaccia degli aggregati e modificare il raggio di curvatura facendolo diminuire, cosa che non accade per i campioni ottenuti diluendo con acqua distillata. Si osserva, a prova della polidispersità del sistema, che le misure a 60° forniscono un diametro maggiore di quelle a 90°, infatti particelle di dimensione maggiore, diffondono maggiormente ad angoli minori.

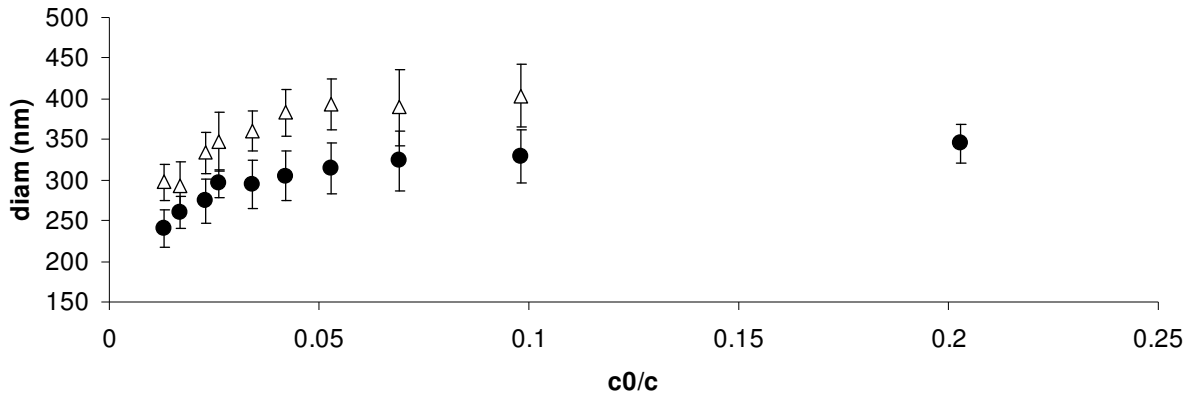


FIG. 2 Dimensioni a varie diluizioni in acqua distillata e etanolo 8%, per preparazioni di NLC 20:1. le misure sono raccolte a 90° (cerchio pieno) e a 60° (triangolo vuoto)

E'importante notare che gli oggetti in studio sono carichi, pertanto, al variare della concentrazione, ci saranno interazioni differenti tra gli aggregati. La presenza di interazioni influisce sul fenomeno della diffusione riflettendosi sia sull'intensità di luce diffusa sia sulla determinazione del raggio. Per quel che riguarda l'intensità:

$$I(q) \propto cMP(q)S(q) \quad .1$$

Con I intensità diffusa, c concentrazione, M massa molecolare, P(q) fattore di forma dell'aggregato e S(q) fattore di struttura della soluzione.

Diminuendo la concentrazione, diminuisce l'interazione tra le nanoparticelle cariche e, nel caso di interazioni repulsive, si nota un aumentare del raggio apparente dell'aggregato: infatti, diminuendo l'intensità della repulsione elettrostatica, le particelle si muovono più lentamente e la diffusione è determinata solamente dalle dimensioni degli oggetti in sospensione. Si osserva cioè, un coefficiente di diffusione dipendente solamente dalle delle particelle e non influenzato dalla repulsione esistente tra di esse. Nelle misure svolte sulle nanoparticelle composte da lecitina e chitosano, si hanno, quindi, due effetti concomitanti: uno dovuto alla carica, per cui si dovrebbe

vedere aumentare il raggio al diminuire della concentrazione e uno per cui si ha un diminuire del raggio al diminuire della concentrazione perchè la maggiore quantità di etanolo a disposizione aumenta il raggio di curvatura. Dalla misure effettuate, l'effetto di aumento delle dimensioni dovuto a una minore repulsioni tra le nanoparticelle non è stato rilevato né per la diluizione con acqua (Figura 1) né per la diluizione con la miscela acqua/etanolo 92:8 (Figura 2). Se ne deduce che per questi sistemi risulta preponderante l'effetto dell'etanolo rispetto a quello della carica. Si è, quindi, voluto studiare la stabilità nel tempo delle dimensioni delle nanoparticelle in funzione della concentrazione, in particolare per quanto riguarda le diluizioni con acqua che non introducono altre variabili come un aumento di curvatura e quindi una variazione del raggio medio delle nanoparticelle.

Sono stati realizzati dei campioni composti da lecitina e chitosano in proporzione 20:1 con concentrazione $1/25$ (cerchio pieno e cerchio vuoto sono due diversi lotti), $1/70$ (quadrato pieno) e $1/100$ (triangolo pieno) di quella iniziale (figura 3).

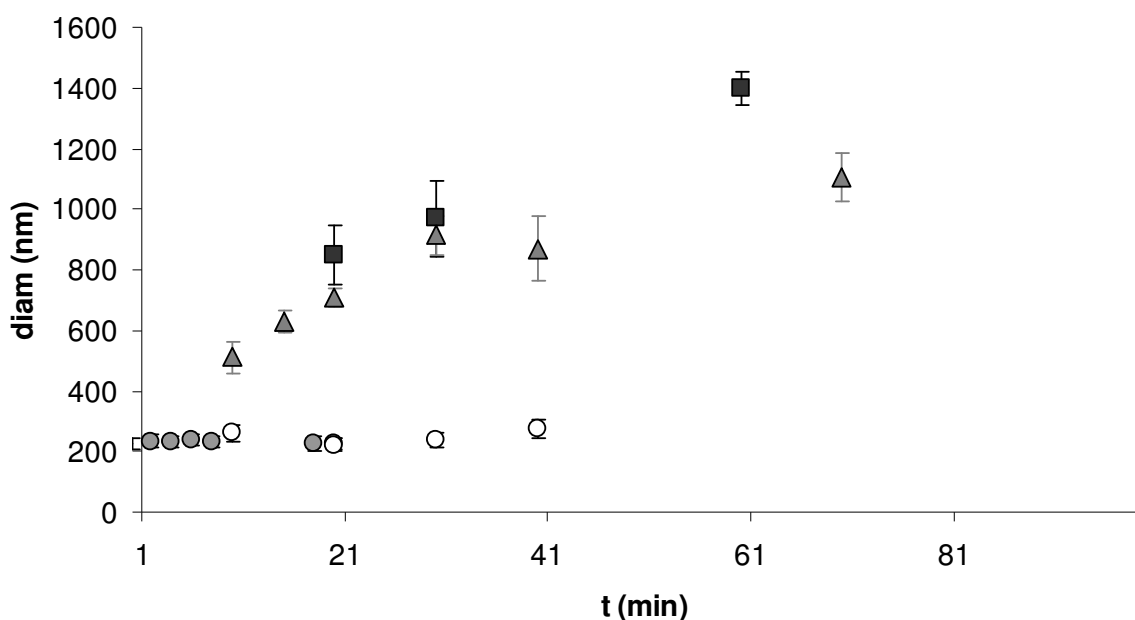


FIG. 3 stabilità delle dimensioni per diverse diluizioni in acqua distillata, per preparazioni di NLC 20:1. le misure sono raccolte a 90° . Cerchio pieno $c=1/25c_0$, cerchio vuoto $c=1/25c_0$, quadrato $c=1/70 c_0$, triangolo $c=1/100c_0$.

Si nota come per soluzioni maggiormente diluite le dimensioni siano decisamente instabili in un tempo dell'ordine delle decine di minuti, seguendo un trend di crescita. Misurando nuovamente le dimensioni dopo quattro giorni (i campioni sono sempre rimasti a T ambiente) si è ottenuto:

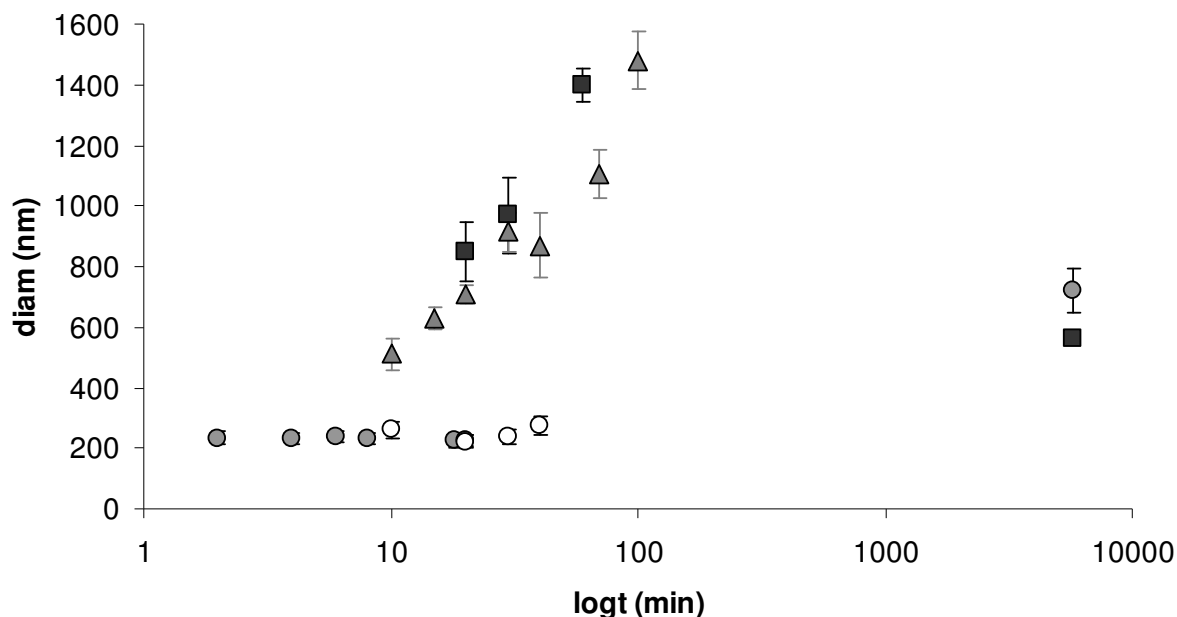


FIG.4 Stabilità delle dimensioni per diverse diluizioni in acqua distillata, per preparazioni di NLC 20:1. le misure sono raccolte a 90°.

In Figura 4 si nota come, le dimensioni delle nanoparticelle, su tempi di qualche giorno, non siano stabili. Un'ipotesi di spiegazione dell'instabilità per alte diluizioni, è che il chitosano, al di sotto di un certo pH, si deprotona; la conseguenza di questo fenomeno è che le nanoparticelle si aggregano, dando origine a oggetti di dimensione maggiore. Per questo motivo nelle diluizioni operate in seguito si è utilizzato un solvente composto da acqua e 0.01% di HCl, ovvero la stessa proporzione che si realizza tra acqua e HCl nelle preparazioni di nanoparticelle.

Conclusioni : a seguito delle analisi svolte per stabilire le condizioni di misura (FIG.1, FIG.2, FIG.3, FIG.4), nello specifico la determinazione della diluizione più opportuna (come solvente da utilizzare e come concentrazione da raggiungere), si è concluso che le diluizioni più stabili sono quelle in cui la nuova concentrazione è 1/25 di quella iniziale e il solvente ideale è composto da una miscela di acqua distillata e 0.01% di HCl; utilizzando questo solvente, non si introducono effetti sulla curvatura, come avviene in presenza dell'etanolo (FIG.2) e si evita la deprotonizzazione del chitosano, possibile causa della creazione di grossi aggregati.

Una volta determinate le condizioni ottimali di misura, si è voluto studiare l'influenza dei parametri di preparazione sulle proprietà finali delle nanoparticelle.

4.1.2 Effetto della velocità di iniezione, della quantità di materiale utilizzato e della velocità di mescolamento sulla

Sono stati confrontati dei campioni prodotti utilizzando uno strumento di iniezione automatico (Model 200, KD Scientific Inc., Holliston, MA, USA), secondo il protocollo usuale, con dei campioni prodotti mediante un protocollo modificato: l'iniezione della soluzione alcoolica di lecitina è stata realizzata mediante pipetta Gilson e utilizzando quantità di materiali ridotte rispetto a quelle messe del protocollo originale, inoltre, ci si è serviti di semplici agitatori magnetici invece che un Ultraturrax. Sono stati presi in considerazione dei campioni composti da:

- nanoparticelle
- liposomi di lecitina
- liposomi di lecitina successivamente ricoperti con chitosano

In figura 5 viene riportato un confronto tra il diametro effettivo di nanoparticelle e liposomi ricoperti realizzati mediante le due procedure di iniezione.

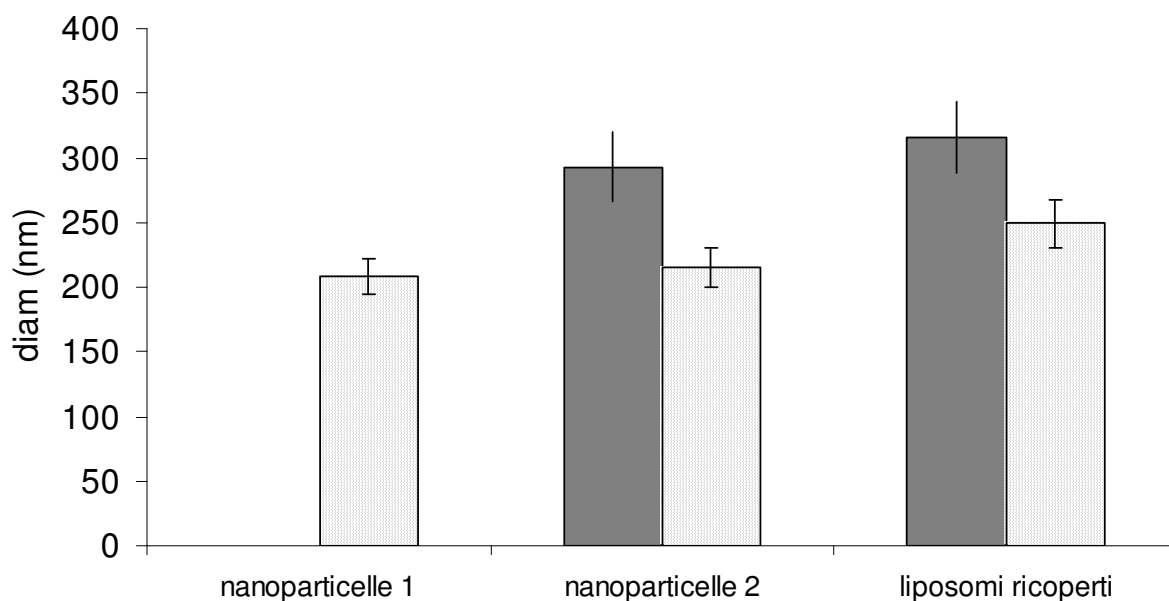


FIG. 5 Dimensioni delle nanoparticelle NLC20:1 prodotte con iniezione automatica(40 ml/min)(bianco) e con iniezione mediante Gilson (grigio)

Si osserva:

- i campioni prodotti con Ultraturrax sono leggermente più piccoli di quelli prodotti a con l'agitatore magnetico, anche se le differenze di dimensione non sono sostanziali.
- in entrambi i casi, il diametro effettivo delle nanoparticelle e quello dei liposomi ricoperti risulta analogo entro l'incertezza dovuta alla polidispersità.
- a parità di concentrazione (non osservabile dal grafico), anche il valore dell'intensità diffusa risulta essere uguale tra nanoparticelle e liposomi ricoperti sia per i campioni prodotti con iniezione automatica che per quelli prodotti con la pipetta Gilson; considerando l'espressione della $I(k)$ si può, quindi, dedurre che le due tipologie di vettori posseggono una massa molecolare analoga.

Nella preparazione di nanoparticelle con rapporto lecitina/chitosano 20:1, si è provato a variare la velocità di iniezione della soluzione etanolica di lecitina:

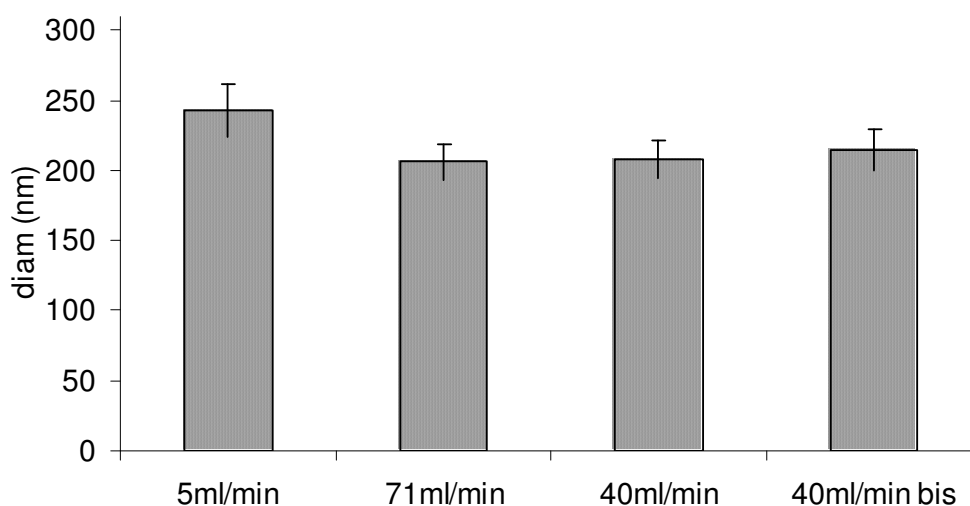


FIG. 6 Dimensioni tra NLC20:1 prodotte con iniezione automatica a diverse velocità di iniezione

ovviamente le nanoparticelle prodotte utilizzando la velocità di iniezione minore, risultano leggermente più grandi di quelle ottenute con iniezioni più veloci, ma la differenza è quasi entro la barra d'errore.

Conclusione:

A seguito delle analisi svolte, si sono notate solamente piccole differenze nella dimensione degli oggetti in sospensione, variando differenti parametri del protocollo di preparazione (velocità di iniezione, velocità di mescolamento, quantità di materiale, ordine dei vari passaggi del protocollo). Appare evidente che le dimensioni delle nanoparticelle prodotte non dipendono in modo sostanziale

dal protocollo di preparazione ma dalla tipologia delle interazioni tra la lecitina e il chitosano utilizzati.

Si è scelto di continuare l'attività di ricerca sulle nanoparticelle preparate mediante il protocollo usuale, al fine di non introdurre variabili nella procedura di preparazione.

4.1.3 Analisi dimensionale

L'analisi dimensionale sulle preparazioni prodotte con iniezione automatica, è stata condotta su campioni con complessità strutturale crescente; infatti, per indagare l'effetto di ciascun componente sulla preparazione finale, si è svolta un'analisi dimensionale partendo dagli oggetti con composizione più semplice e introducendo un componente alla volta.

4.1.3.1 Liposomi

Come descritto in precedenza, i liposomi vengono ottenuti dalla semplice iniezione in acqua di una soluzione etanolica o metanolica di lecitina (in dipendenza dal farmaco che si vuole complessare con la lecitina è necessario utilizzare un opportuno solvente organico), secondo le concentrazioni e la velocità di iniezione stabilite nel protocollo.

Fin dalle prime analisi svolte sui liposomi è emersa una polidispersità media (definita come il coefficiente del secondo cumulante) delle dimensioni intorno al 20%. Le dimensioni ricavate dall'analisi dei cumulanti sono riproducibili, in particolare danno sempre dei valori del diametro dei liposomi intorno ai 70 nm.

Da un'indagine più dettagliata, utilizzando procedure di fit (double exponential) e di inversione (NNLS, CONTIN), si è potuto discriminare la presenza di più famiglie all'interno di ciascun campione, ovvero di più distribuzioni, ciascuna con una propria polidispersità, centrate intorno a diversi diametri medi.

In figura 7 vengono riportate alcune distribuzioni delle dimensioni di liposomi di 4 lotti differenti, ottenute utilizzando la funzione NNLS (processo di inversione; software Brookhaven Instr.); le distribuzioni sono ricavate pesando in intensità il contributo delle varie famiglie.

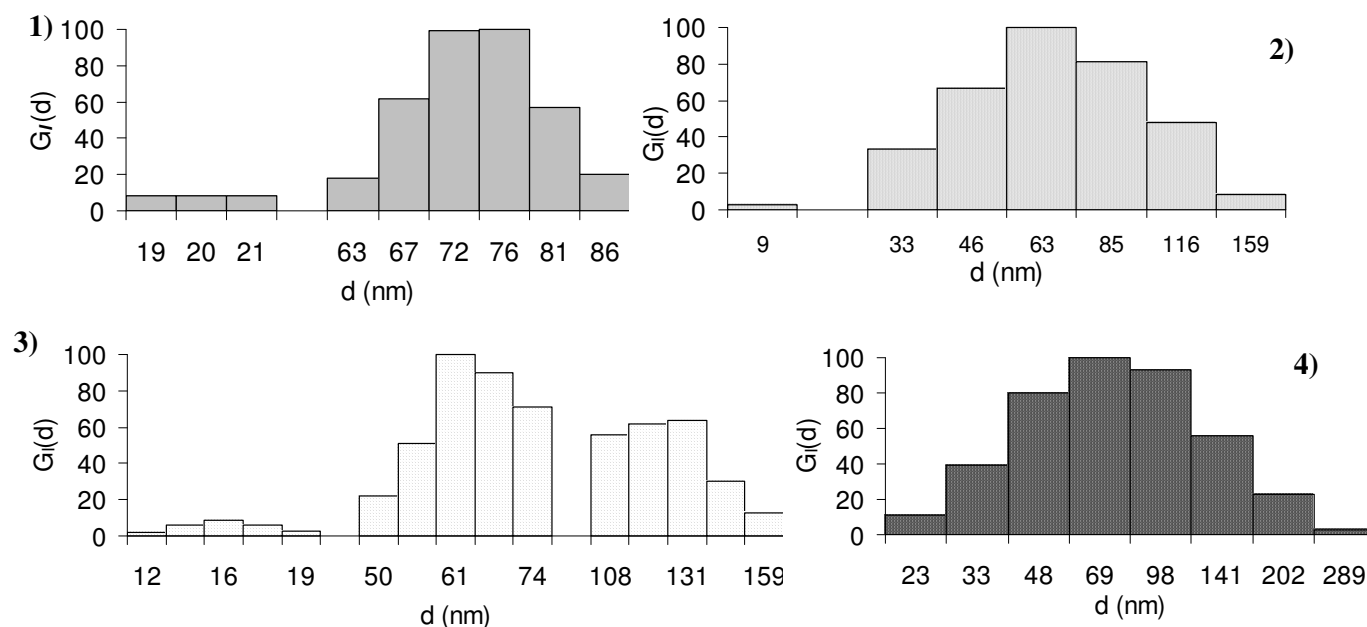


FIG. 7 Confronto tra le distribuzioni delle dimensioni (pesate in intensità e riportate come percentuale) di lotti composti da liposomi di lecitina.

Risulta chiaro in tutti i casi riportati, che la distribuzione delle dimensioni dei liposomi è più complicata di quello che si aspetta da una semplice analisi svolta con i cumulanti. Dai grafici riportati è evidente che:

- il maggior contributo all'intensità viene portato da quegli oggetti di diametro intorno ai 70-65 nm.
- vi sono degli oggetti di dimensione inferiore che portano anch'essi un contributo all'intensità, a volte vengono risolti come una famiglia distinta da quella intorno ai 70-65nm, delle volte appaiono come coda della distribuzione. In ogni caso è rilevabile un'intensità diffusa dovuta ad oggetti con diametro intorno ai 15-20nm (con un'analisi del genere non si riesce a definire la dimensione esatta degli aggregati ma sicuramente se ne può dare una stima).
- vengono risolti dei contributi di oggetti di dimensioni superiori ai 100nm, probabilmente agglomerati dovuti a una agitazione non uniforme del campione in fase di formazione dei liposomi o impurezze in soluzione.

L'intensità diffusa fissato l'angolo di raccolta, come riportato in precedenza, dipende da varie grandezze caratteristiche del campione in esame tra cui la concentrazione degli aggregati, ovvero il loro numero, e la loro massa, ovvero il loro volume; nel caso di campione polidisperso, è

interessante svolgere l'analisi dimensionale pesando l'intensità diffusa da oggetti con una certa dimensione anche sul numero o sul volume, oltre che sull'intensità diffusa.

Nei quattro casi riportati sopra si ottiene:

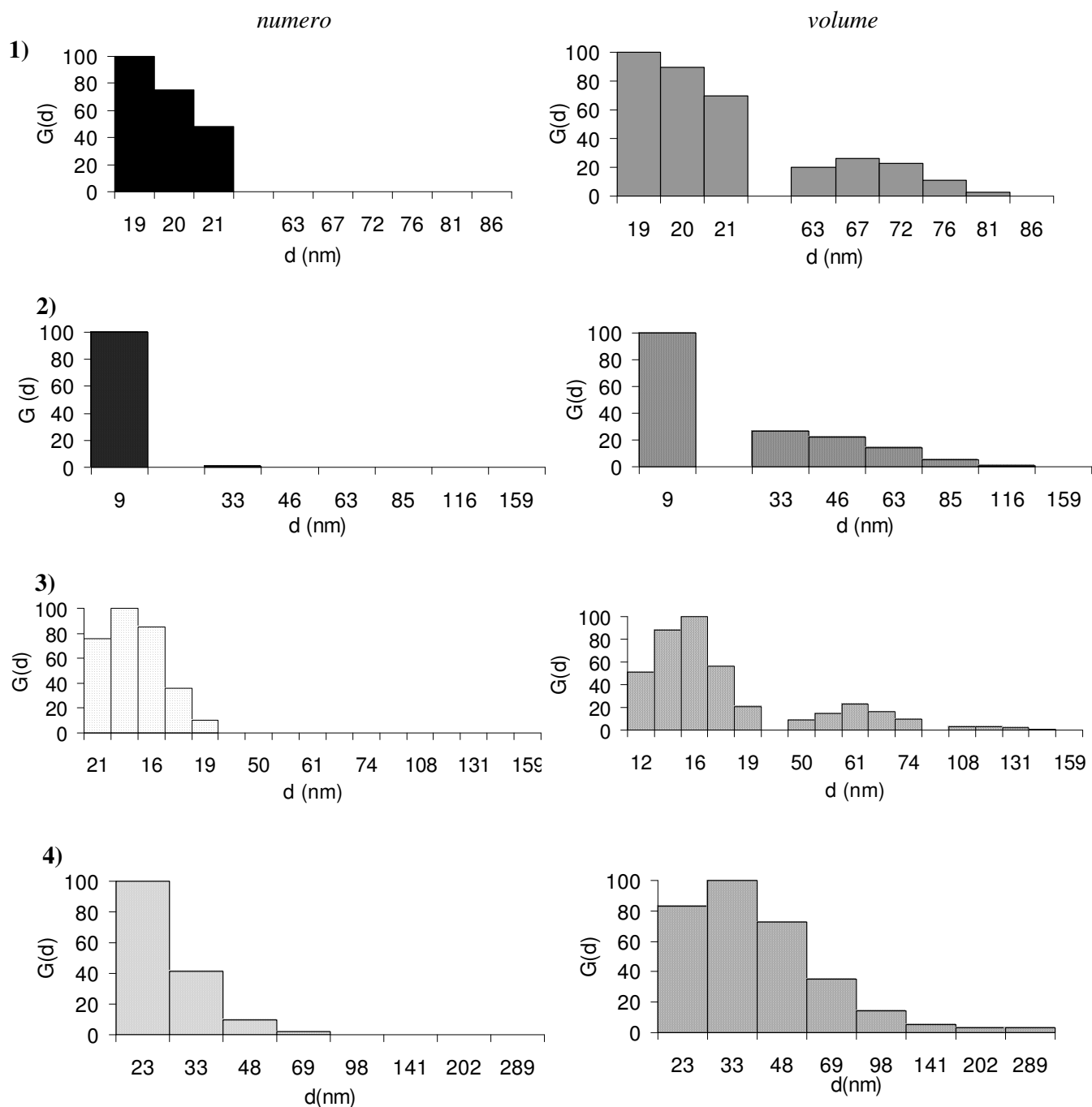


FIG. 8 Confronto tra le distribuzioni delle dimensioni (pesate in volume e in numero e riportate come percentuale relativa) di lotti composti da liposomi di lecitina

Osservando contemporaneamente i grafici delle distribuzioni dimensionali dei liposomi pesate in intensità, numero e volume, si può concludere:

- il maggior numero dei liposomi possiede diametro tra i 15-20 nm.
- che la maggior parte del materiale lipidico si organizza su questa dimensione; proprio perchè questi liposomi hanno una dimensione inferiore rispetto quelli da 70-80 nm, nonostante il numero maggiore, danno un contributo inferiore in intensità.
- il maggior contributo all'intensità viene da liposomi con diametro intorno ai 70-80 nm;
- sono sicuramente presenti anche oggetti di dimensione superiore ai 100 nm ma, viste le analisi pesate in numero e il basso contributo dato all'intensità nonostante le dimensioni, si conclude che sono presenti in numero esiguo, inferiore all'1%.

Le misure di scattering statico confermano quanto trovato nell'analisi dimensionale con lo scattering dinamico. In FIG.9, è mostrata una distribuzione angolare di intensità diffusa, ricavata utilizzando un laser nel rosso (677 nm) e uno nel verde(514 nm), per estendere, come detto in precedenza, il range di misura. La diffusione dovuta al solvente è stata sottratta. La curva nera rappresenta la ricostruzione di intensità diffusa dovuta ad aggregati sferici uniformi distribuiti su tre dimensioni medie con diametro **16 nm**, **65 nm** e **1600 nm** (ovvero la sovrapposizione di tre fattori di forma relativi a sfere piene di raggio e peso in intensità ricavato secondo le informazioni del Light scattering dinamico, vedi figura del capitolo 3).

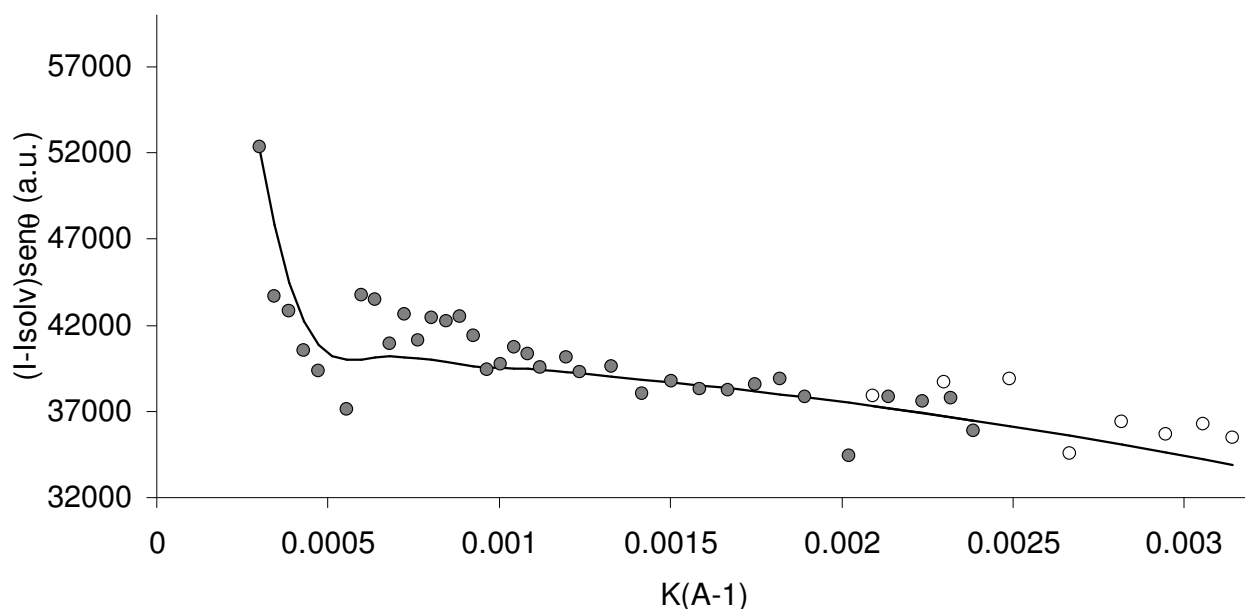


FIG. 9 Distribuzione angolare dell'intensità diffusa da una sospensione di liposomi di lecitina, ottenuta con due radiazioni: 677 nm (rosso) e 514 nm (verde)

Dalla figura 9 si osserva che è stato necessario introdurre un contributo da aggregati di 1600 nm, non osservato con misure dinamiche, al fine di simulare anche il punto a più basso angolo e più alta

intensità. Nell'analisi dimensionale, la presenza di questa famiglia è stata sottovalutata perchè già a 30° (l'angolo più piccolo a cui si sono svolte misure di scattering dinamico), l'intensità associata è decaduta.

Conclusioni: le distribuzioni dimensionali sono riproducibili; i liposomi presenti in sospensione, hanno dimensione inferiore a quella dedotta da una semplice analisi basata sul metodo dei cumulanti (70 nm): infatti si nota (dalle analisi pesate in volume e in numero) che la maggior quantità di materiale e il maggior numero di liposomi si organizzano su dimensioni di poche decine di nanometri (20-30 nm). Vi sono, però, presenti in sospensione anche liposomi di grandi dimensioni, come si osserva dal grafico relativo allo scattering statico (FIG. 9).

4.1.3.2 Nanoparticelle: effetto dell' introduzione del chitosano, dell'IPM, del progesterone

Iniettando la soluzione alcoolica di lecitina in una soluzione acquosa di chitosano, a causa dell'interazione elettrostatica tra la lecitina (carica negativa) e il polisaccaride (carica positiva) si ottengono degli oggetti più complessi dei semplici liposomi.

Sono state svolte misure su varie tipologie di nanoparticelle:

1. con rapporto in peso lecitina/chitosano 20:1: senza principio attivo (non caricate)
2. con rapporto in peso lecitina/chitosano 20:1 in aggiunta dell'IPM e senza principio attivo
3. con rapporto in peso lecitina/chitosano 20:1 con progesterone incapsulato

Per ciascuna tipologia si è operata una centrifuga a 5500 rpm per 30 min a temperatura ambiente per cercare di separare le famiglie presenti nella sospensione e ottenere campioni meno polidispersi. Sono stati in seguito analizzati, dopo opportuna diluizione, sia il surnatante che il sedimento prodottisi dalla centrifuga.

In FIG. 10 viene riportata l'analisi dimensionale sul surnatante di vari campioni, eseguita a 90° con un laser rosso (677nm) e ottenuta attraverso la procedura di NNLS; sono riportati i tre tipi di pesi utilizzati anche per i liposomi: intensità, volume e numero.

Surnatante

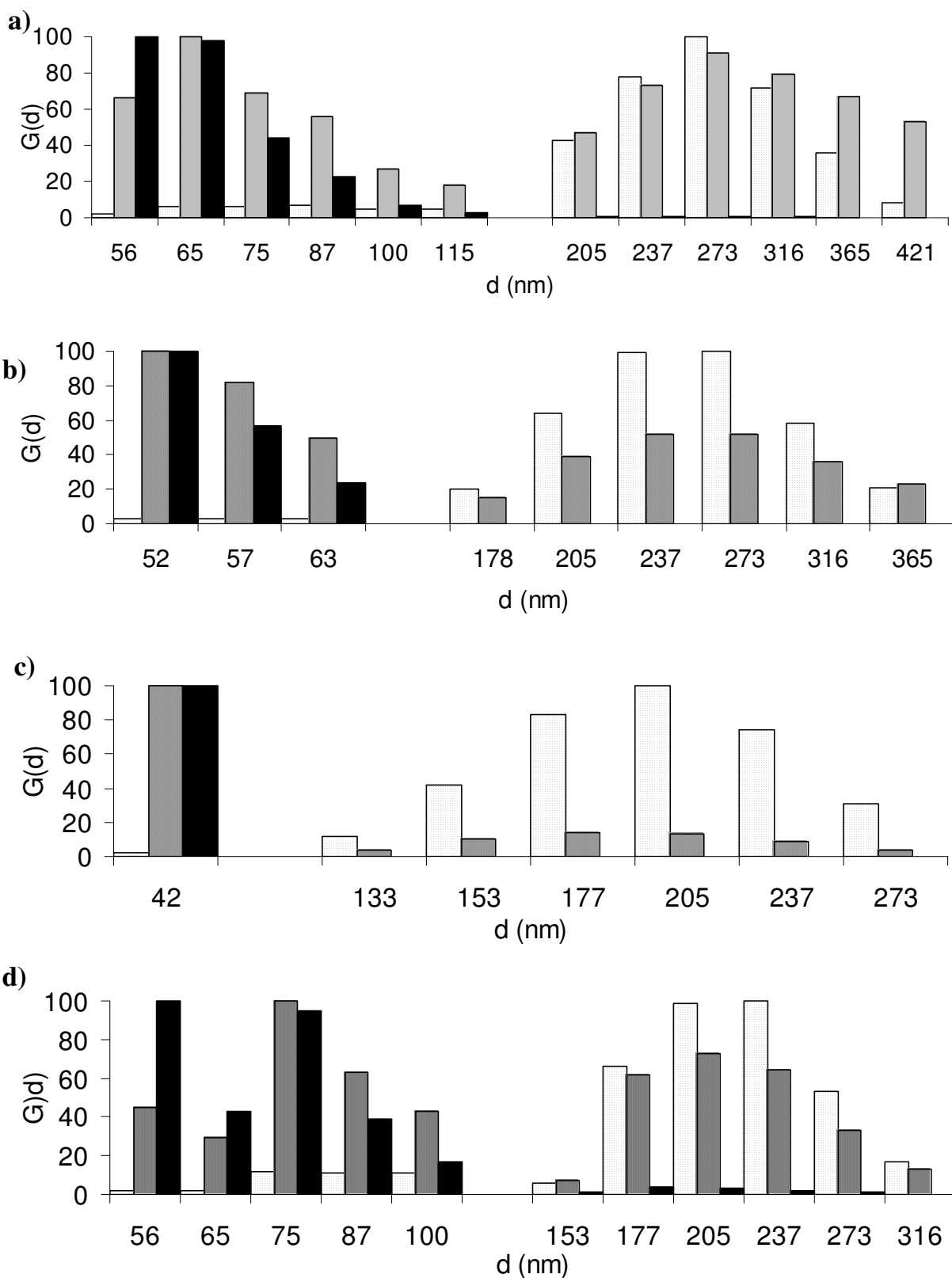


FIG. 10 Distribuzione delle dimensioni, pesate in intensità (bianco), in volume (grigio) e in numero (nero), riportate come percentuale relativa. a) e b) nanoparticelle non caricate; c) nanoparticelle con progesterone; d) nanoparticelle con IPM.

Nei grafici a) e b) in figura 10, relativi a campioni costituiti da nanoparticelle composte solamente da lecitina e chitosano, si nota che:

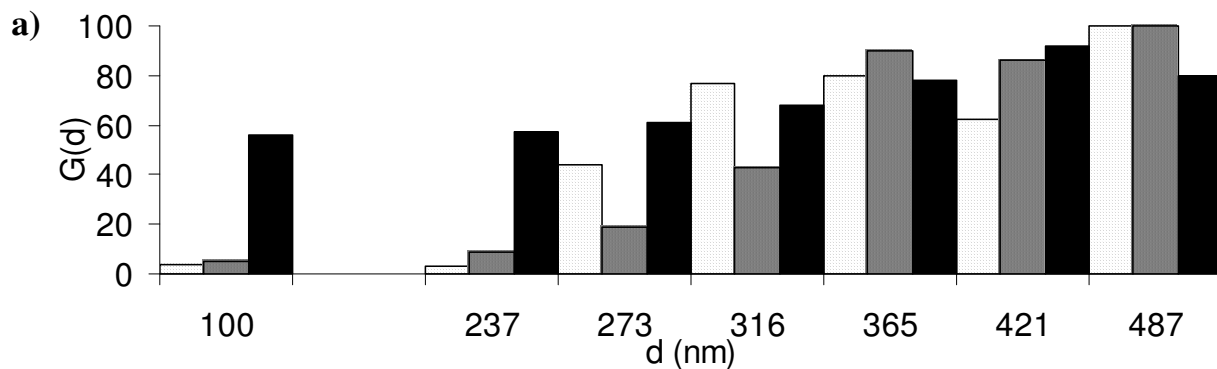
- la distribuzione delle dimensioni dei vettori copre un intervallo che va dai 40-50 nm fino ai 400 nm (circa).
- il picco in intensità è intorno ai 250-270 nm, valore analogo a quello ottenuto dall'analisi dei cumulanti.
- il picco relativo all'analisi pesata sul volume indica una distribuzione abbastanza uniforme del materiale tra gli oggetti di dimensione maggiore e quelli di dimensione inferiore.
- il picco relativo all'analisi pesata sul numero mostra come gli oggetti di dimensioni minori siano preponderanti come quantità.

Il grafico d), relativo a nanoparticelle contenenti anche IPM, è del tutto analogo ai grafici a) e b). Nel caso di nanoparticelle caricate con progesterone (grafico c) si evidenzia ancora un'ampia distribuzione per i diametri di questi vettori:

- il picco in intensità è centrato su valori leggermente inferiori rispetto agli altri casi.
- si riscontra un contributo a valori molto grandi rispetto agli altri casi.
- le nanoparticelle di dimensioni "piccole" sembrano riportate su valori inferiori ai 40-50nm: un'ipotesi di spiegazione è che la presenza di oggetti con dimensione maggiore di quella trovata nel caso di nanoparticelle vuote o con IPM, falsi la misura delle dimensioni minori; questi oggetti "grandi", si pensa che possano essere delle impurezze o provenienti del sedimento.

Per quanto riguarda le analisi svolte sui corrispondenti sedimenti risospesi si è ottenuto:

sedimento



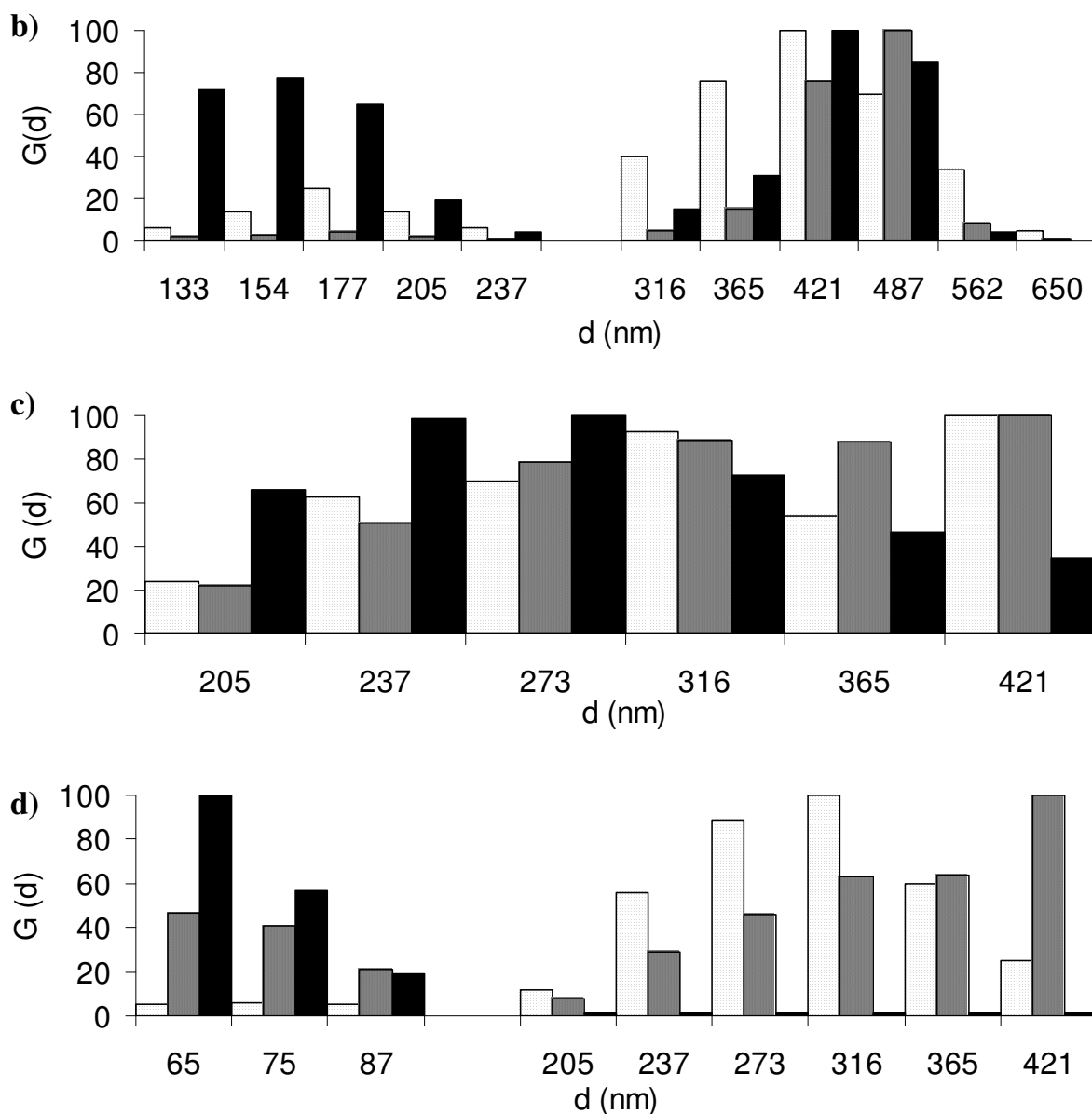


FIG. 11 Distribuzione delle dimensioni, pesate in intensità (bianco), in volume (grigio) e in numero (nero), riportate come percentuale relativa. a) e b) nanoparticelle non caricate; c) nanoparticelle con progesterone; d) nanoparticelle con IPM.

Per quanto riguarda le analisi svolte sui corrispondenti sedimenti risospesi si è ottenuto:

- Le nanoparticelle senza principio attivo e quelle contenente progesterone, presentano un picco in intensità, corrispondente anche al picco in numero e in volume, intorno ai 400-450 nm.
- in tutti i casi si notano degli oggetti tra i 100 e i 270 nm, dimensione analoga a quella della famiglia “grande” trovata nel surnatante: evidentemente i parametri di centrifuga scelti, producono una sedimentazione di parte di questa famiglia

- Il grafico relativo alle nanoparticelle contenenti IPM presenta, invece, un aspetto differente: la distribuzione delle dimensioni trovate nel sedimento che, come mostra la tabella 1, risultava essere molto poco dopo la centrifuga, è molto simile a quella trovata nel surnatante:

pesi dopo liofilizzazione	Nanoparticelle 1 Grafico a)	Nanoparticelle 2 Grafico b)	Nanoparticelle + progesterone Grafico c)	Nanoparticelle + IPM Grafico d)
Peso surnatante (g)	0.0035	0.0032	0.0036	0.0042
Peso sedimento (g)	0.0012	0.0012	0.0010	0.0005

TABELLA 1 Pesi del liofilizzato ottenuto per il sedimento e il surnatante di campioni di varia composizione. I campioni liofilizzati sono i medesimi relativi ai grafici di FIG. 10 e FIG. 11

Dopo aver prelevato circa 2 ml dai campioni e averli centrifugati secondo gli stessi parametri utilizzati per ottenere i surnatanti e i sedimenti analizzati con lo scattering, si è proceduto ad una liofilizzazione. I risultati, riportati in tabella, mostrano che:

- nei primi tre casi, la maggior quantità di materiale si organizza sulle dimensioni tipiche trovate nel surnatante, in particolare si equidistribuisce tra oggetti di dimensione 50-60 nm e oggetti di dimensione 250 nm (misure di scattering)
- nel caso delle nanoparticelle contenenti IPM, quasi non si produce sedimento, ma il materiale utilizzato, segue una ripartizione analoga a quella degli altri tre casi
- i pesi del liofilizzato concordano con la concentrazione teorica di materiale in soluzione (0.2%).
-

Come per i liposomi, le misure di scattering statico vengono associate a quelle di scattering dinamico (in FIG.12 è riportata una misura eseguita su un campione di nanoparticelle 20:1 senza aver subito centrifuga):

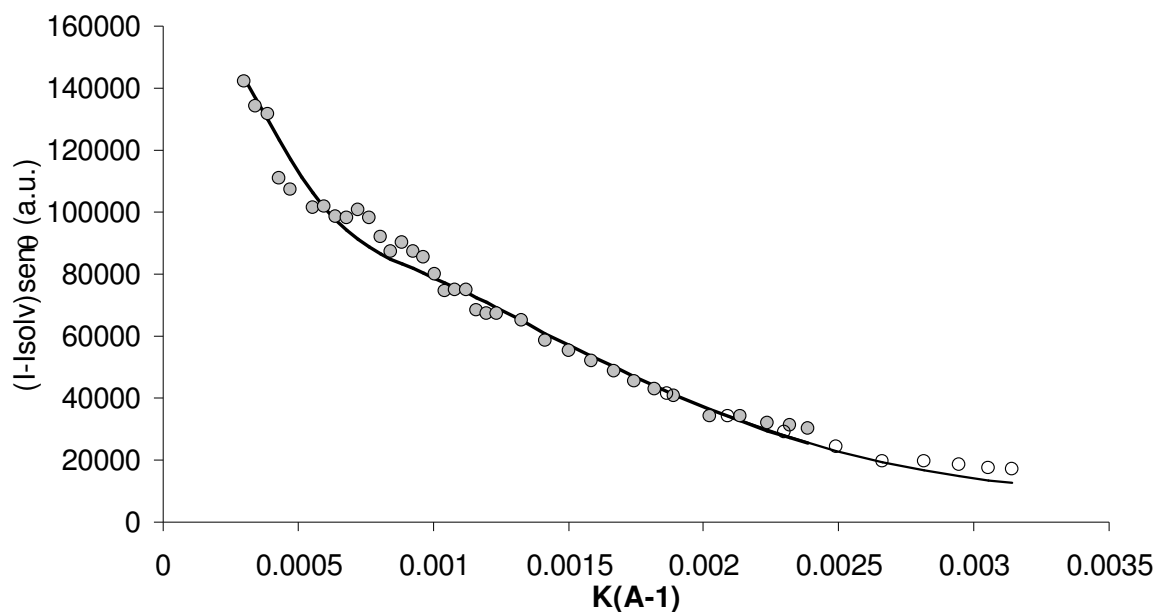


FIG. 12 Distribuzione angolare dell'intensità diffusa da una sospensione di nanoparticelle senza principio attivo incapsulato, ottenuta con due radiazioni: 677 nm (rosso) e 514 nm (verde). In nero la ricostruzione del profilo dell'intensità diffusa.

Analogamente al caso dei liposomi, la curva nera rappresenta la ricostruzione di intensità diffusa dovuta ad aggregati sferici uniformi distribuiti su quattro dimensioni medie con diametro **60nm**, **140nm**, **260nm** e **1000nm** (ovvero la sovrapposizione di tre fattori di forma relativi a sfere piene di raggio e peso in intensità ricavato secondo le informazioni del Light scattering dinamico, vedi figura del capitolo 3).

- Anche in questo caso si riscontra che i risultati delle misure di dinamica concordano con quelli ottenuti dallo scattering statico (seppure con un'analisi solo preliminare, da raffinare)
- in aggiunta, una famiglia di diametro più grande di quelli trovati nelle misure di dinamica; la spiegazione di questo fatto è già stata fornita nel caso dei liposomi

Per le misure di scattering statico svolte su nanoparticelle con l'aggiunta IPM, si possono fare delle considerazioni analoghe a quelle esposte per le nanoparticelle semplici:

- anche in questo caso la ricostruzione della distribuzione angolare dell'intensità è stata svolta utilizzando il modello più semplice possibile: gli oggetti in sospensione sono stati modellizzati con delle sfere piene, secondo la stessa modalità detta in precedenza; sono state

considerate quattro famiglie di diametro pari a **60 nm**, **140 nm**, **260 nm** (del tutto analoghi a quelli ricavati dalle misure di scattering dinamico) e **1600 nm**.

- Le dimensioni utilizzate per la ricostruzione concordano con quelle trovate nelle misure di scattering dinamico.

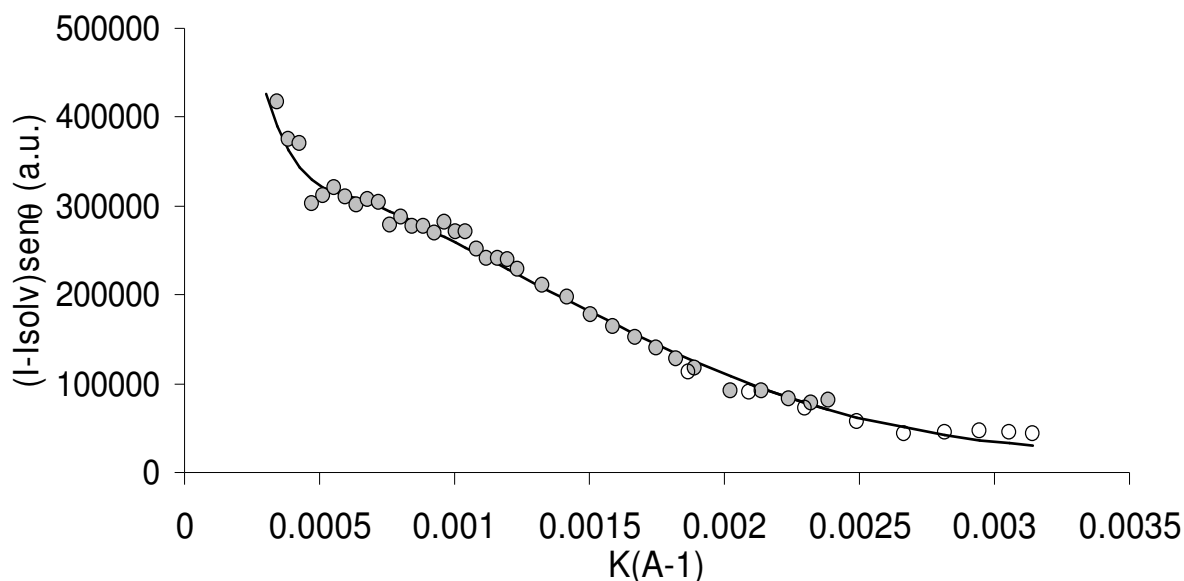


FIG.13 Distribuzione angolare dell'intensità diffusa da una sospensione di nanoparticelle senza principio attivo incapsulato contenenti IPM, ottenuta con due radiazioni: 677 nm (rosso) e 514 nm (verde). In nero la ricostruzione del profilo dell'intensità diffusa.

In tabella 2 viene riportato il riassunto dell'analisi dimensionale relativa al surnatante delle varie tipologie di nanoparticelle (dove non ho gli oggetti di grandi dimensioni, probabilmente grossi aggregati, ed è coinvolta la maggiore quantità di materiale, vedi tabella 1) e ai liposomi. In ogni caso sono distinguibili due famiglie principali, la 1^a famiglia e la 2^a famiglia in tabella fanno riferimento a queste famiglie. La distribuzione $G(d)$ (vedi figura.7, 8, 10) relativa alle analisi ottenute pesando sul volume di materiale organizzato su una determinata dimensione, mostra l'importanza percentuale di ciascuna famiglia, relativamente alla famiglia corrispondente al picco più alto della distribuzione; in tabella è riportato il valore medio del picco della $G(d)$ relativamente alla 2^a famiglia.

	Picco 1^a famiglia	Picco 2^a famiglia	G(d) picco 1^a famiglia	G(d) picco 2^a famiglia
Liposomi	18 nm	72 nm	100	26
Nanoparticelle senza p.a. (surn)	61 nm	260 nm	100	70
Nanoparticelle con progesterone (surn)	50 nm	225 nm	100	40
Nanoparticelle con IPM (surn)	75 nm	250 nm	100	70

TABELLA 2 Riassunto delle analisi dimensionali su varie tipologie di vettori

Osservazioni:

- nel caso dei liposomi il materiale utilizzato per la loro preparazione si organizza maggiormente su dimensioni di poche decine di nanometri;
- nel caso delle nanoparticelle si nota una distribuzione del materiale a disposizione abbastanza omogenea tra le due famiglie. È singolare che la 1^a famiglia delle nanoparticelle abbia una dimensione media simile a quella della 2^a famiglia dei liposomi.
- le nanoparticelle caricate con progesterone sono state più difficili da trattare: infatti i campioni sono stati analizzati 2-3 giorni dopo la preparazione e senza eliminare il progesterone rilasciato; probabilmente per questo motivo le analisi dimensionali si discostano da quelle degli altri casi.

4.1.3.3 Nanoparticelle con diverse proporzioni lecitina/chitosano: effetto della concentrazione del chitosano

Variando la quantità di chitosano presente nella soluzione acquosa dove viene spruzzata la lecitina opportunamente solubilizzata, non sempre si ottengono dei vettori nanoparticellari: infatti, in un range compreso tra 30:1 e 50:1 (rapporto in peso lecitina/chitosano) si ha un precipitato.

Quello che si è osservato da misure precedenti è che:

- la carica delle nanoparticelle resta costante e positiva per rapporti in peso (b.w.) tra lecitina e chitosano che vanno da 5:1 fino a 20:1;
- diminuendo la quantità di chitosano si assiste prima alla formazione di un precipitato e quindi alla formazione di nanoparticelle con carica negativa;

- è ragionevole ipotizzare che quando si osserva un precipitato gli oggetti in sospensione presentino una carica complessiva nulla, favorendo la loro agglomerazione e precipitazione.

Sono state prese in considerazione tre concentrazioni di chitosano, espresso come rapporto b.w. lecitina/chitosano:

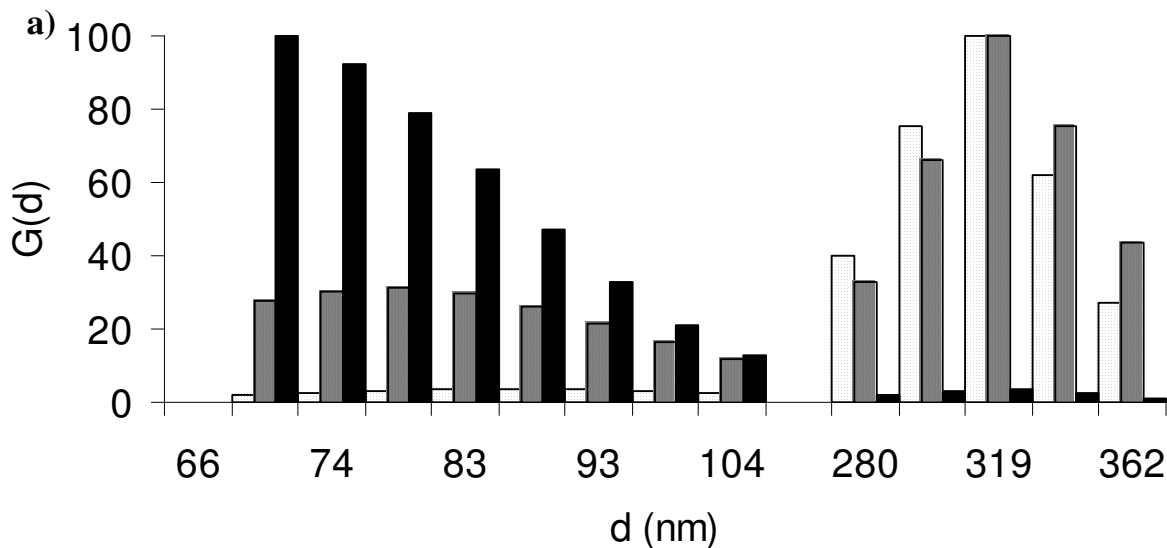
- 5:1
- 20:1
- 80:1

Le misure sono state effettuate a tre angoli di raccolta: 30°, 60°, 90°, così da evidenziare, come spiegato in precedenza, i contributi delle varie famiglie presenti.

Le nanoparticelle analizzate in questa fase del lavoro, non hanno l'aggiunta di principio attivo, nè di IPM: l'unico effetto che si vuole indagare è quello dovuto al chitosano; le preparazioni utilizzate ne contengono concentrazioni decrescenti da 0.2% a 0.04%.

Nelle figure successive vengono mostrate le distribuzioni dei diametri delle nanoparticelle pesate in intensità, volume, numero. Sono mostrati solo i grafici relativi alle misure effettuate a 60° e 90°.

90°)



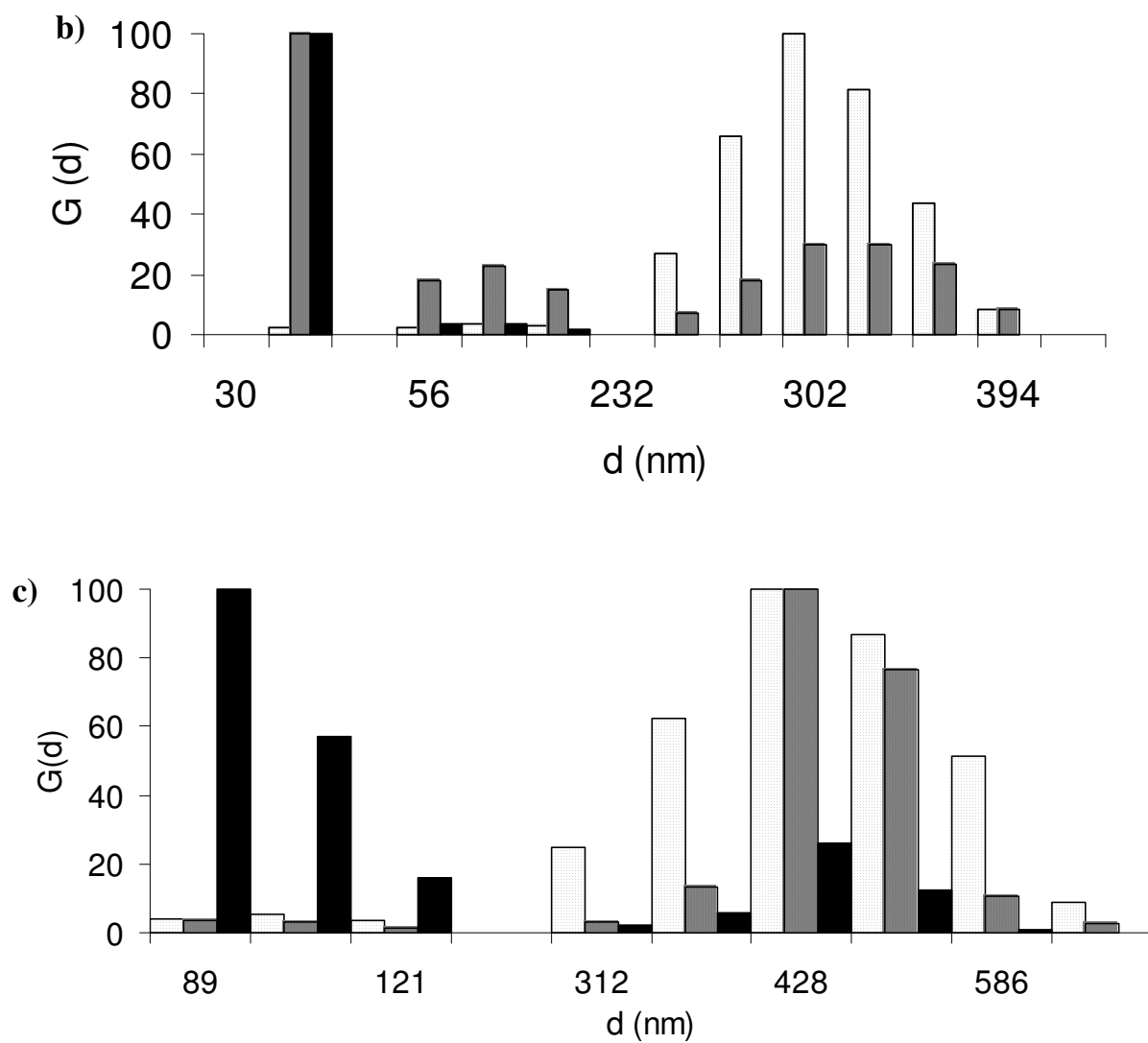


FIG. 14 Distribuzione delle dimensioni acquisite a 90° , pesate in intensità (bianco), in volume (grigio) e in numero (nero), riportate come percentuale relativa. a) NLC 5:1 b) NLC 20:1; c) NLC 80:1.

60°)

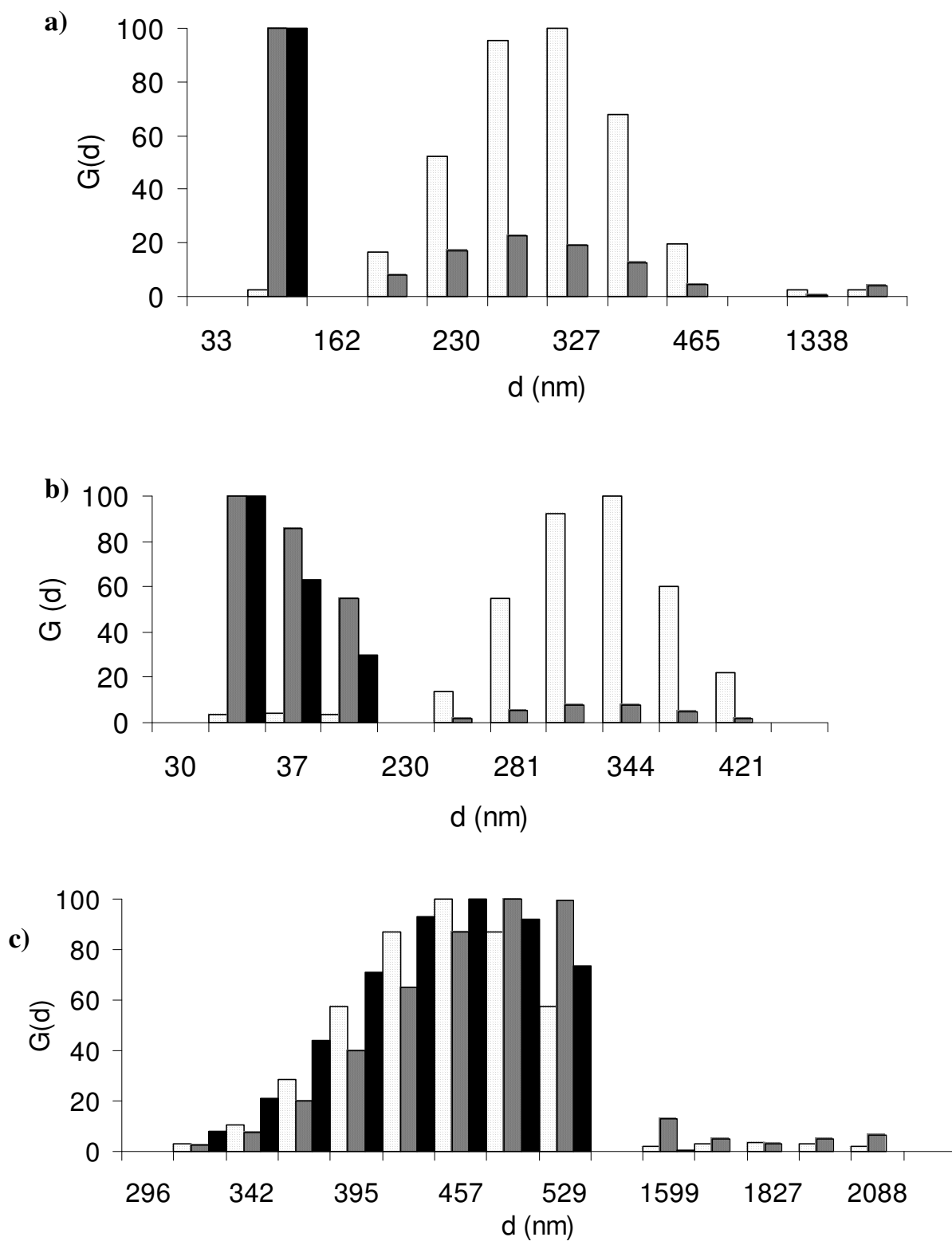


FIG. 15 distribuzione delle dimensioni acquisite a 60°, pesate in intensità (bianco), in volume (grigio) e in numero (nero), riportate come percentuale relativa. a) NLC 5:1 b) NLC 20:1; c) NLC 80:1.

Osservazioni:

- In tutti i campioni si osserva la presenza di più famiglie di nanoparticelle.
- In FIG. 14 grafici a) e b) si notano dei contributi relativi ad oggetti con le dimensioni tipiche dei liposomi semplici (60-70 nm); risulta evidente che nella distribuzione in numero è la famiglia più numerosa e che organizza circa metà del materiale in soluzione.
- Per le nanoparticelle 80:1, la famiglia di dimensioni minori, è centrata su valori dimensionali più alti che nel caso delle nanoparticelle 20:1 e 5:1.
- Anche la famiglia che porta il maggior contributo in intensità è centrata su valori maggiori per le nanoparticelle 80:1 (420-450 nm) rispetto a quelle delle altre nanoparticelle (300nm);
- E' da sottolineare che, pur variando la quantità di chitosano, tra le nanoparticelle 20:1 e quelle 5:1 non si osservano delle differenze nella distribuzione delle dimensioni acquisite a 90° e a 60°.
- Per le nanoparticelle 80:1 a 90° si distingue anche un contributo di oggetti molto grandi, probabilmente agglomerati, che sono presenti anche nelle sospensioni con le nanoparticelle 20:1 e 5:1; come si nota ad angoli di scattering più piccoli (60°).
- Il fatto che nelle nanoparticelle 20:1 non si distinguono oggetti grandi come negli altri due casi, non significa che non ci siano: come spiegato in precedenza, a 90° la $P(k)$ di questa famiglia di grandi dimensioni, è quasi decaduta; inoltre non vi sono molti oggetti con dimensioni così grandi, può succedere che nel tempo della misura non si abbia nessun contributo da parte di questi oggetti. Da altri set di misure anche nel caso delle nanoparticelle 20:1 si è registrato un contributo dovuto ad oggetti di dimensioni paragonabili a quelle delle famiglie "grandi" osservate in questo set di misura per le nanoparticelle 80:1 e 5:1. Le altre famiglie (60-70nm e 300nm) sono state osservate in ogni set di misura.
- Andando ad angoli più piccoli (60°) risulta ancora più evidente che le nanoparticelle 80:1 si organizzano su dimensioni maggiori rispetto a quelle degli altri due casi che continuano a mostrare la presenza di una famiglia piccola e di una intorno ai 300 nm.

Il fatto che le nanoparticelle 80:1 sono più grandi di quelle 20:1 e 5:1, potrebbe essere dovuto alle catene del chitosano. Nel caso delle nanoparticelle 80:1, il chitosano presente in soluzione è molto poco, tanto che la carica delle nanoprticelle è negativa, come quella lecitina, il chitosano trova a sua disposizione molti oggetti di carica opposta e, probabilmente, preferisce legare insieme gli oggeeti di carica opposta, piuttosto che rivestire interamente un singolo oggetto. Nel caso delle nanoprticelle 20:1 e 5:1, vi è molto più chitosano, tanto da riuscire a rivestire completamente gli oggetti con carica opposta.

Le misure di statica, mostrano su una più ampia scala angolare, quanto emerso dal confronto delle misure di scattering dinamico effettuato su due soli angoli:

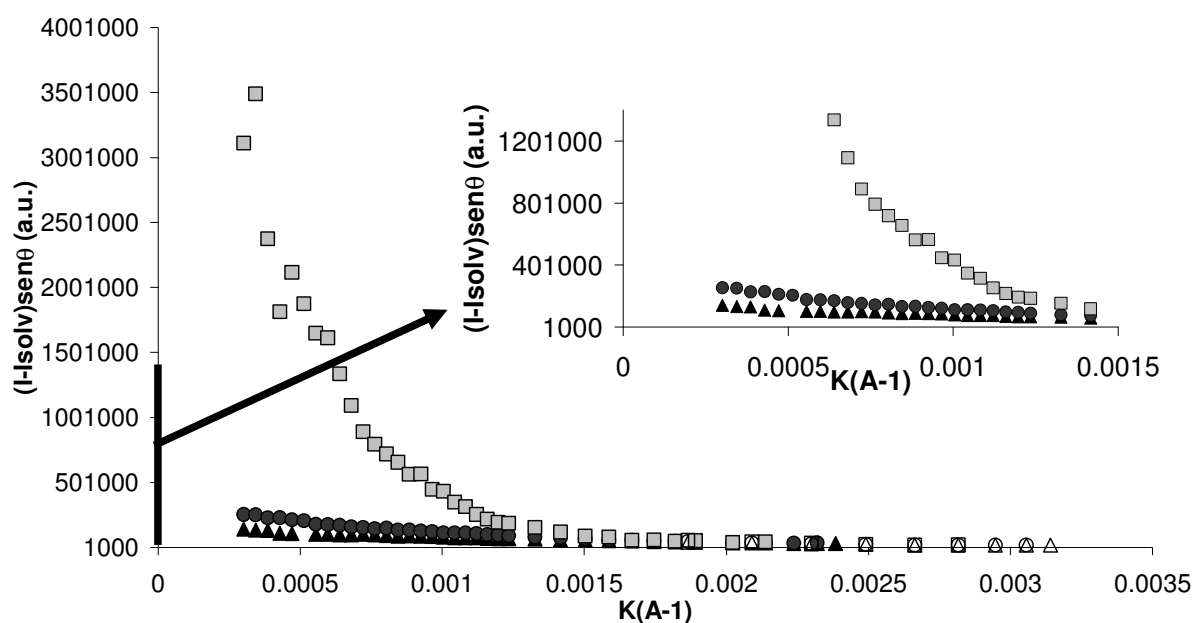


FIG.16 Distribuzione angolare dell'intensità diffusa da una sospensione NLC 20:1 (triangoli), NLC 5:1 (cerchi), NLC 80:1 (quadrati), ottenuta con due radiazioni: 677 nm (simboli pieni) e 514 nm (simboli vuoti, a alti k). Nell'inserito è riportato l'ingrandimento della zona evidenziata nel grafico

- Le nanoparticelle 80:1 a piccoli k, quindi a piccoli angoli, hanno un'intensità diffusa più alta (a parità di concentrazione) e un profilo angolare con una pendenza decisamente maggiore rispetto alle nanoparticelle 20:1 e 5:1, segno della presenza in sospensione di oggetti di dimensione maggiore.
- Si nota anche che le nanoparticelle 80:1, a grandi k, hanno un'intensità diffusa minore degli altri due tipi di nanoparticelle; è da sottolineare che le preparazioni hanno tutte la medesima concentrazione, quindi combinando le informazioni della dinamica con i diversi valori dell'intensità diffusa si può dedurre che nelle nanoparticelle 80:1 la maggior parte del materiale si organizza su dimensioni maggiori che negli altri due casi.
- Le nanoparticelle 5:1 hanno un andamento assolutamente analogo a quello delle nanoparticelle 20:1 per grandi k, mentre a piccoli k si nota un'intensità diffusa poco maggiore: da queste osservazioni se ne deduce che tra le varie famiglie distinte nelle misure di dinamica, quelle di dimensioni medie e piccole sono presenti in entrambe i campioni, mentre a piccoli angoli, a cui non sono state svolte le misure di dinamica e dove si esalta il contributo delle dimensioni grandi, si notano degli aggregati di dimensione poco maggiore

(maggiore intensità e pendenza del profilo) nel caso delle nanoparticelle con rapporto b.w. tra lecitina e chitosano pari a 5:1.

Dalle misure svolte con lo scattering dinamico a diversi angoli e dalle misure di scattering statico su un ampio range di k , è evidente che la concentrazione di chitosano influenza la distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle. In particolare le NLC 80:1 sono organizzate su dimensioni sensibilmente maggiori rispetto alle NLC 20:1 e alle NLC 5:1 che, invece, non mostrano delle differenze così sostanziali.

4.1.3.4 Effetto del Tamoxifene citrato

L'analisi dimensionale sulle nanoparticelle caricate con il tamoxifene citrato (TAM), ha coinvolto unicamente quelle con rapporto lecitina/chitosano 20:1. Il farmaco è stato sciolto in una soluzione metanolica di lecitina e, quindi, spruzzato in una soluzione acquosa di chitosano in modo tale da ottenere tre diverse concentrazioni finali di principio attivo in soluzione: 10mg/100ml (nanoparticelle T10), 60mg/100ml (nanoparticelle T60), 120mg/100ml (nanoparticelle T120). La molecola del TAM a pH acido presenta una carica positiva: questo fatto è di fondamentale importanza in quanto la carica del principio attivo compete con quella del chitosano e, inoltre, interagisce elettrostaticamente con la lecitina, carica negativamente.

Per poterli confrontare con le nanoparticelle sono stati considerati anche vettori preparati senza chitosano (liposomi carichi con il TAM). I 60mg/100ml (liposomi T60) e 120mg/100ml (liposomi T120).

Una prima osservazione immediata, evidente guardando a occhio nudo le preparazioni originali, è che il campione costituito da liposomi contenenti 120mg/100ml (LT120), istantaneamente inizia a flocculare, mentre la corrispondente preparazione costituita da nanoparticelle (NLC-T120) resta stabile. Per i liposomi T120 quindi, è stato possibile analizzare le dimensioni solamente del supernatante. Di seguito vengono riportate i risultati delle misure di scattering dinamico effettuate a 90°.

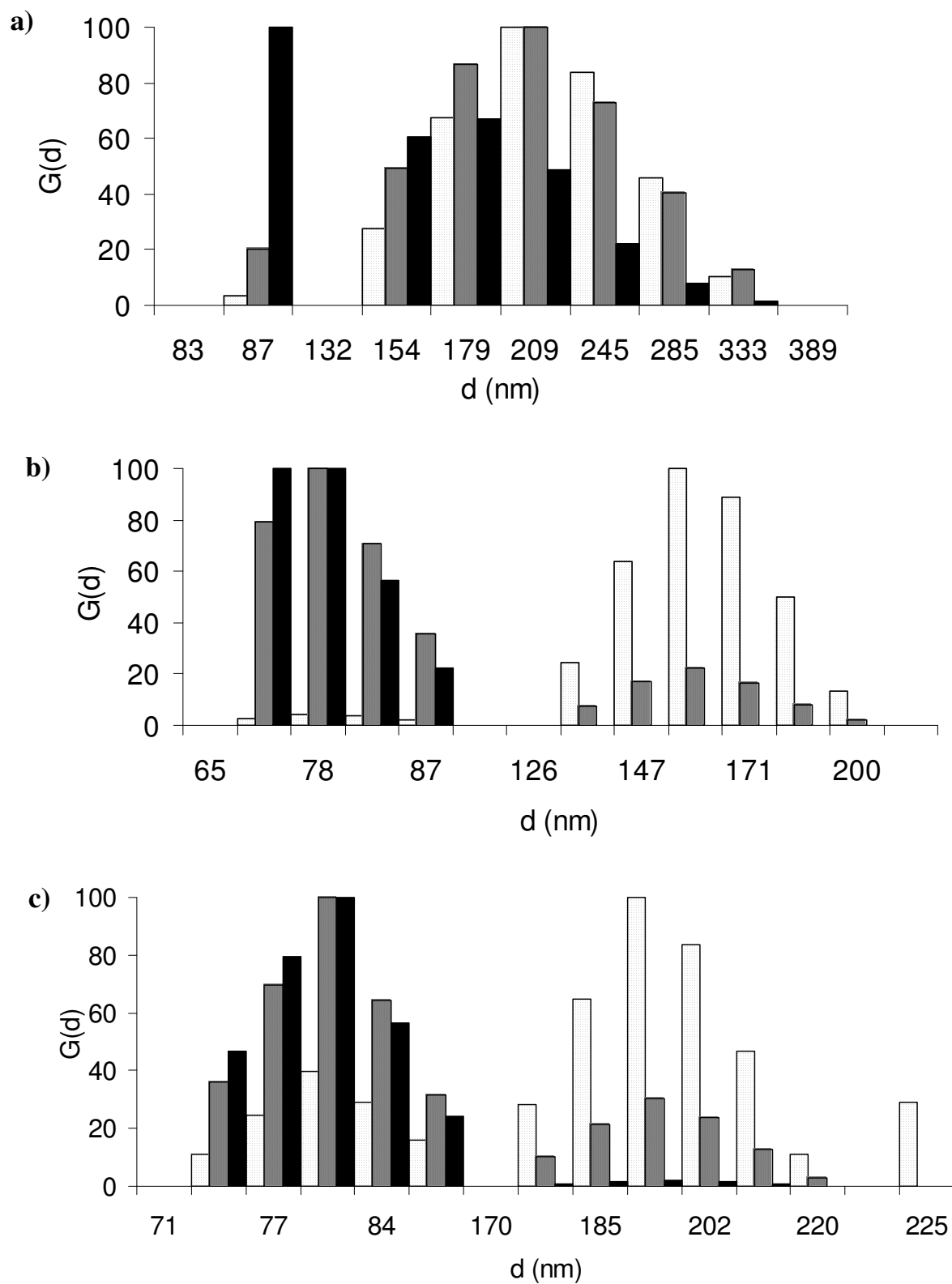


FIG. 17 Distribuzione delle dimensioni pesate in intensità (bianco), in volume (grigio) e in numero (nero), riportate come percentuale relativa. a) nanoparticelle T10 b) nanoparticelle T60 20:1; c) nanoparticelle T120.

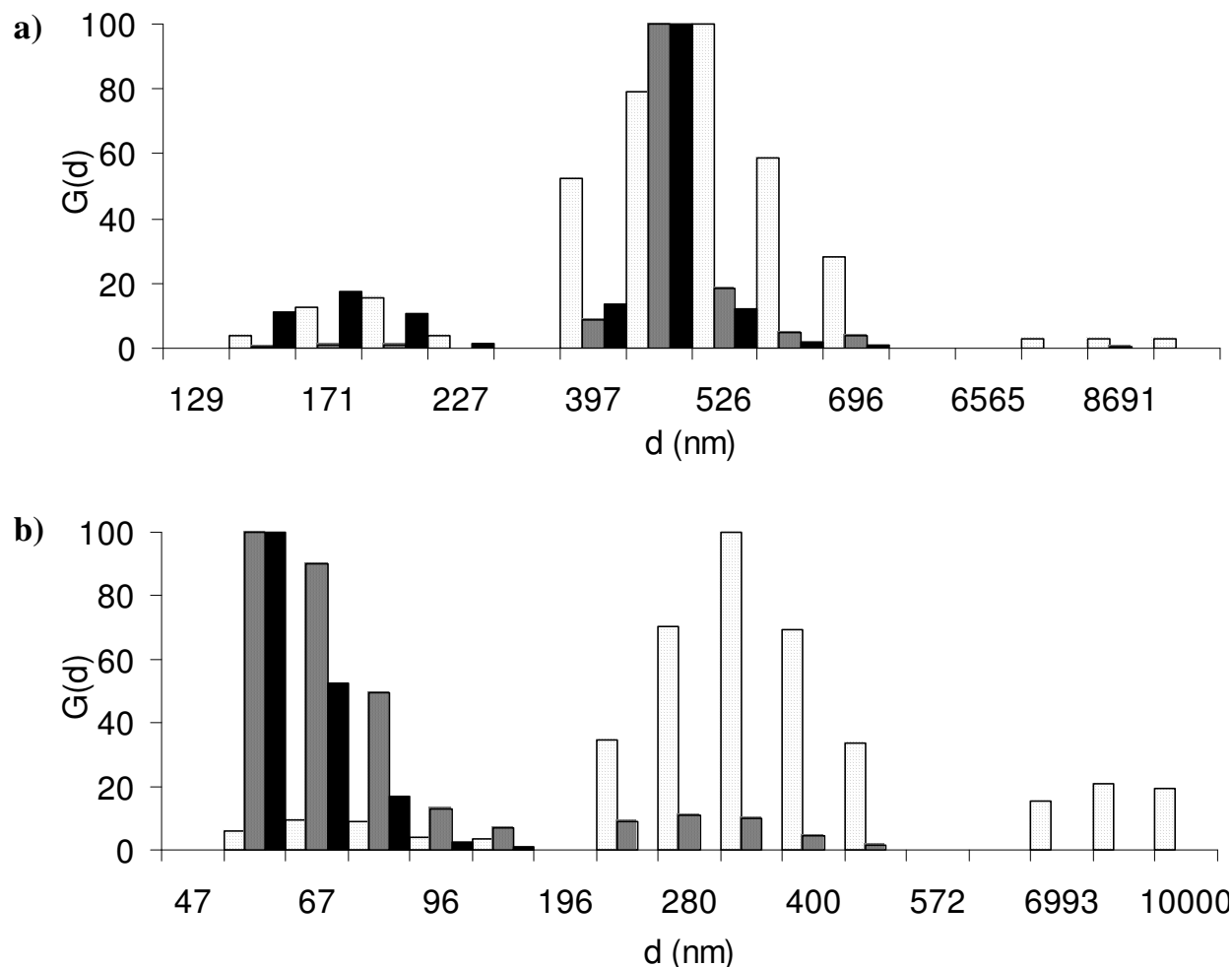


FIG. 18 Distribuzione delle dimensioni pesate in intensità (bianco), in volume (grigio) e in numero (nero), riportate come percentuale relativa. a) liposomi T60 b) liposomi T120.

Dagli esperimenti svolti possono essere fatte le seguenti osservazioni:

- In FIG. 17 si nota che in tutti i grafici, relativi ai differenti tipi di nanoparticelle, si distinguono due famiglie: una su dimensioni intorno ai 70-80 nm, preponderante nell'analisi in numero, e una centrata sui 170-180 nm per le nanoparticelle T60 e T120, intorno ai 200 nm per le nanoparticelle T10.
- osservando le distribuzioni pesate in volume, si nota che aumentando la concentrazione di TAM, aumenta la quantità di volume organizzato sulla famiglia piccola.
- la famiglia centrata intorno ai 70-80nm corrisponde a quella trovata anche nelle nanoparticelle non caricate, caricate con progesterone, con IPM.

- La famiglia di dimensione maggiore è centrata su valori più piccoli rispetto ai 250-300 nm delle nanoparticelle non caricate, da quelle caricate con progesterone e da quelle contenenti IPM.
- le misure sui liposomi si sono rilevate più complesse di quelle sulle nanoparticelle; infatti, in tempi dell'ordine dei 15 minuti, si vedevano crescere le dimensioni dei diametri.
- osservando i grafici relativi ai liposomi (figura 18) si nota che le dimensioni sono distribuite su valori più alti di quelli relativi alle nanoparticelle.

Le misure di scattering statico mostrano un interessante andamento dell'intensità diffusa a piccoli k :

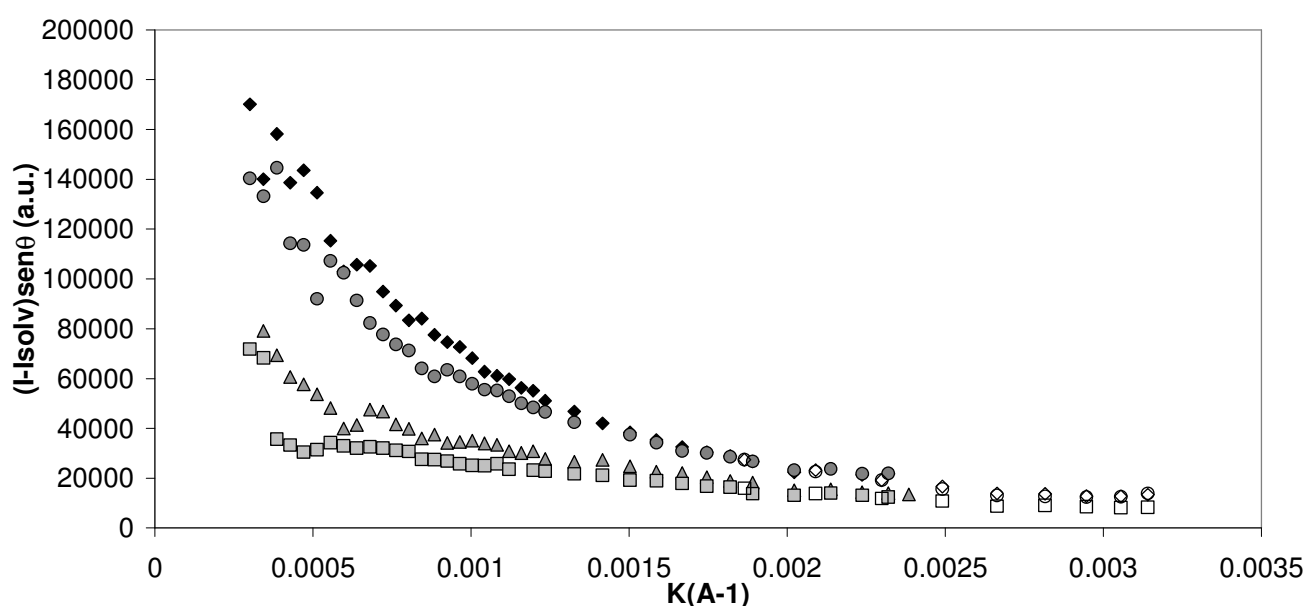


FIG.19 Distribuzione angolare dell'intensità diffusa da una sospensione nanoparticelle T10 (diamanti), nanoparticelle T60 (triangoli), nanoparticelle T120 (quadrati), ottenuta con due radiazioni: 677 nm (simboli pieni) e 514 nm (simboli vuoti, ad alti k).

Osservazioni:

- Le nanoparticelle T60 e T120 (NLC-120) presentano un andamento dell'intensità diffusa molto simile, specialmente a grandi k ; pur avendo il doppio di farmaco caricato (e nessuna correzione per la concentrazione) le nanoparticelle T120 hanno un'intensità diffusa inferiore alle T60, anche la diversa forma del profilo suggerisce che le NLC-T120 si organizzano su dimensioni più piccole di quelle delle T60, in accordo con l'osservazione dedotta dalle misure di scattering dinamico per cui le distribuzioni pesate in volume si spostano verso la famiglia di dimensioni inferiori, all'aumentare della concentrazione di TAM.

- l'andamento dell'intensità diffusa dalle nanoparticelle T10 risulta essere molto simile a quello del surnatante dei liposomi T120; quello che si può ipotizzare è che il chitosano svolga una sorta di azione contenitiva del farmaco nei vettori; i liposomi T120 caricati con molto farmaco, lo rilasciano velocemente trattenendo solo la quantità di principio attivo che interagisce elettrostaticamente con la lecitina: nel qual caso si otterrebbero dei vettori con carica superficiale nulla, portando il sistema colloidale ad essere instabile e quindi a flocculare. Non sono state ancora svolte misure per verificare tale ipotesi.

	picco 1^a famiglia	picco 2^a famiglia	G(d) picco 1^a famiglia	G(d) picco 2^a famiglia
Liposomi T60	170 nm	400 nm	10	100
Liposomi T120 surnatante	70 nm	350 nm	100	20
Nanoparticelle T10	87 nm	210 nm	20	100
Nanoparticelle T60	78 nm	170 nm	100	30
Nanoparticelle T120	80 nm	190 nm	100	30

TABELLA 3 riassunto delle analisi dimensionali su varie tipologie di vettori, al variare della concentrazione di tamoxifene citrato.

Come a conclusione dell'analisi dimensionale, in tabella 3, viene riportato il riassunto dell'influenza del tamoxifene citrato, in assenza e in presenza del chitosano, sulla distribuzione dimensionale dei vettori. E' da sottolineare che le dimensioni dei liposomi hanno mostrato un trend di crescita su una scala temporale paragonabile al tempo di misura (pochi minuti); le misure riportate sono state effettuate 5 minuti dopo la diluizione ma non erano ancora stabili.

Dalle misure di scattering statico e dinamico combinate si può concludere che il tamoxifene citrato contribuisce alla modifica della distribuzione dimensionale dei vettori e che la presenza del

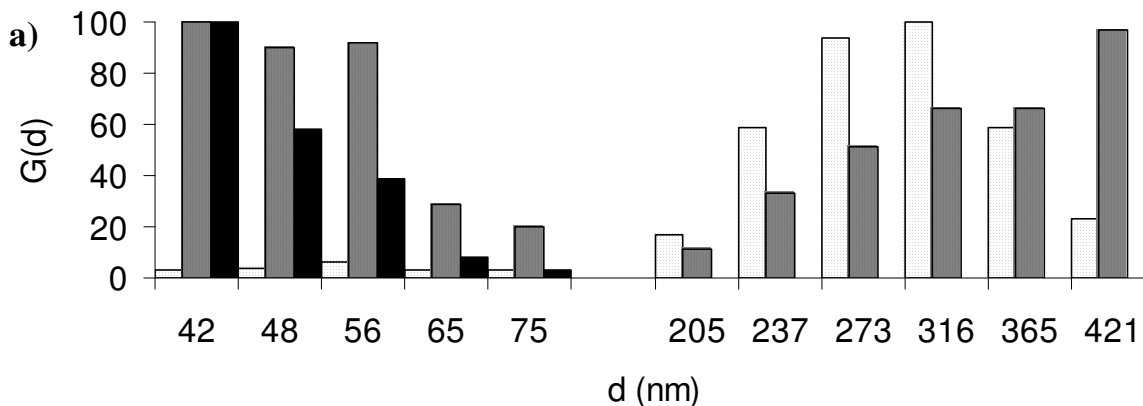
chitosano è fondamentale, specialmente ad alte concentrazioni di principio attivo, in quanto svolge una sorta di azione stabilizzante delle nanoparticelle caricate di tamoxifene, probabilmente creando una barriera elettrostatica.

4.1.3.5 Liposomi ricoperti: confronto con vettori di morfologia nota

E' stata condotta un'analisi dimensionale anche su campioni costituiti da liposomi ricoperti, al fine di confrontare le nanoparticelle (di morfologia ignota), con oggetti di morfologia nota. Il protocollo di preparazione è analogo a quello messo a punto per la realizzazione delle nanoparticelle, solamente sono stati invertiti due passaggi: la soluzione alcoolica di lecitina è stata iniettata in acqua distillata, formando dei semplici liposomi di lecitina, in seguito si è aggiunta la soluzione acida di chitosano che, per interazione elettrostatica va a ricoprire i liposomi di lecitina. La proporzione utilizzata tra lecitina e chitosano è pari a 20:1 in peso .

I grafici riportati in figura 20, sono relativi a misure di dinamica effettuate a 90° su campioni che hanno subito una centrifuga caratterizzata dagli stessi parametri utilizzati nel caso delle nanoparticelle 20:1 (5500 rpm, 30minuti a temperatura ambiente); sono mostrati i grafici relativi al surnatante e al sedimento di due differenti campioni, confrontati con le distribuzioni dimensionali del sedimento e del surnatante di due campioni costituiti da sospensioni di nanoparticelle e già mostrati in precedenza in FIG. 10 e FIG. 11.

surnatante



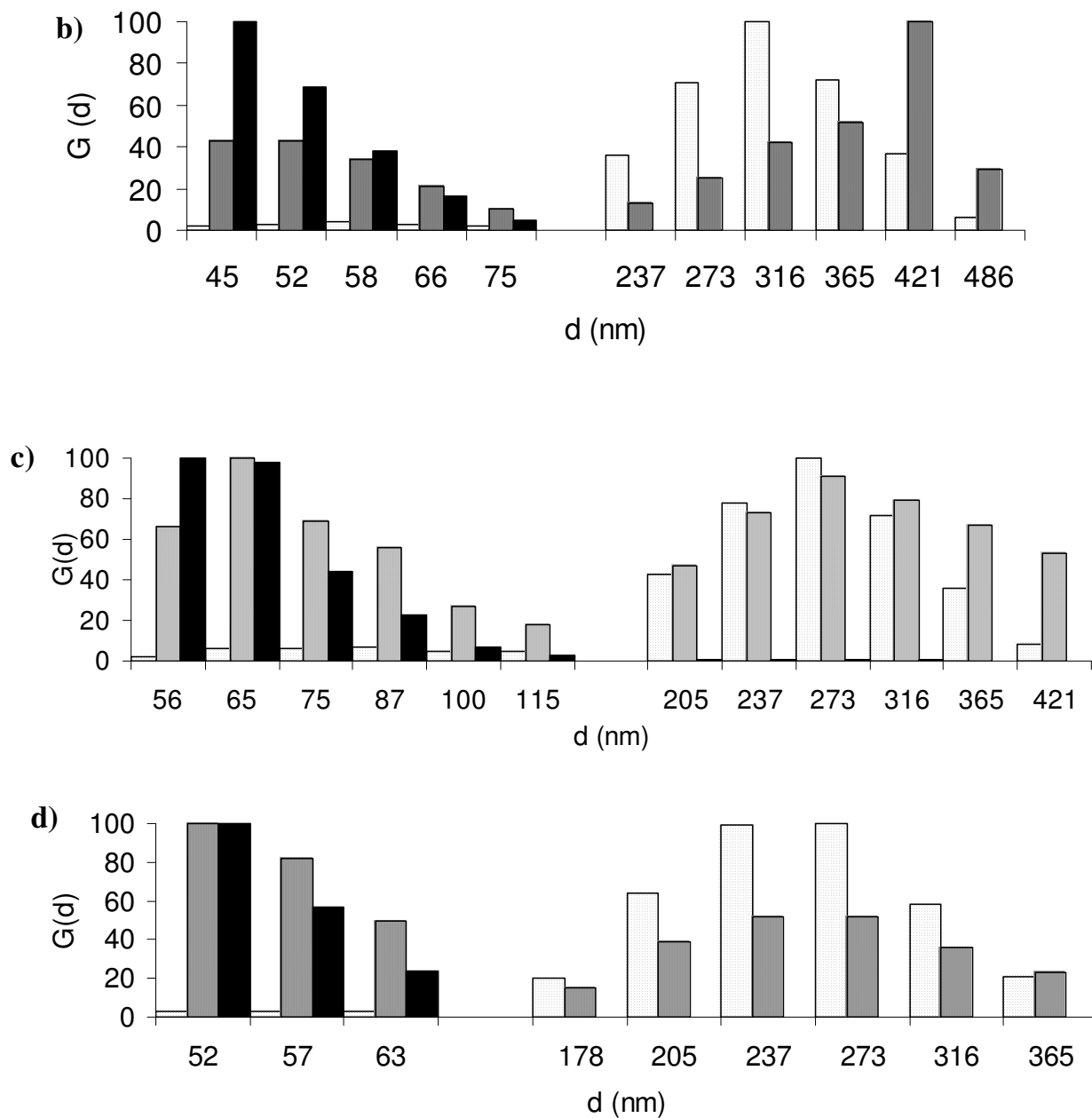


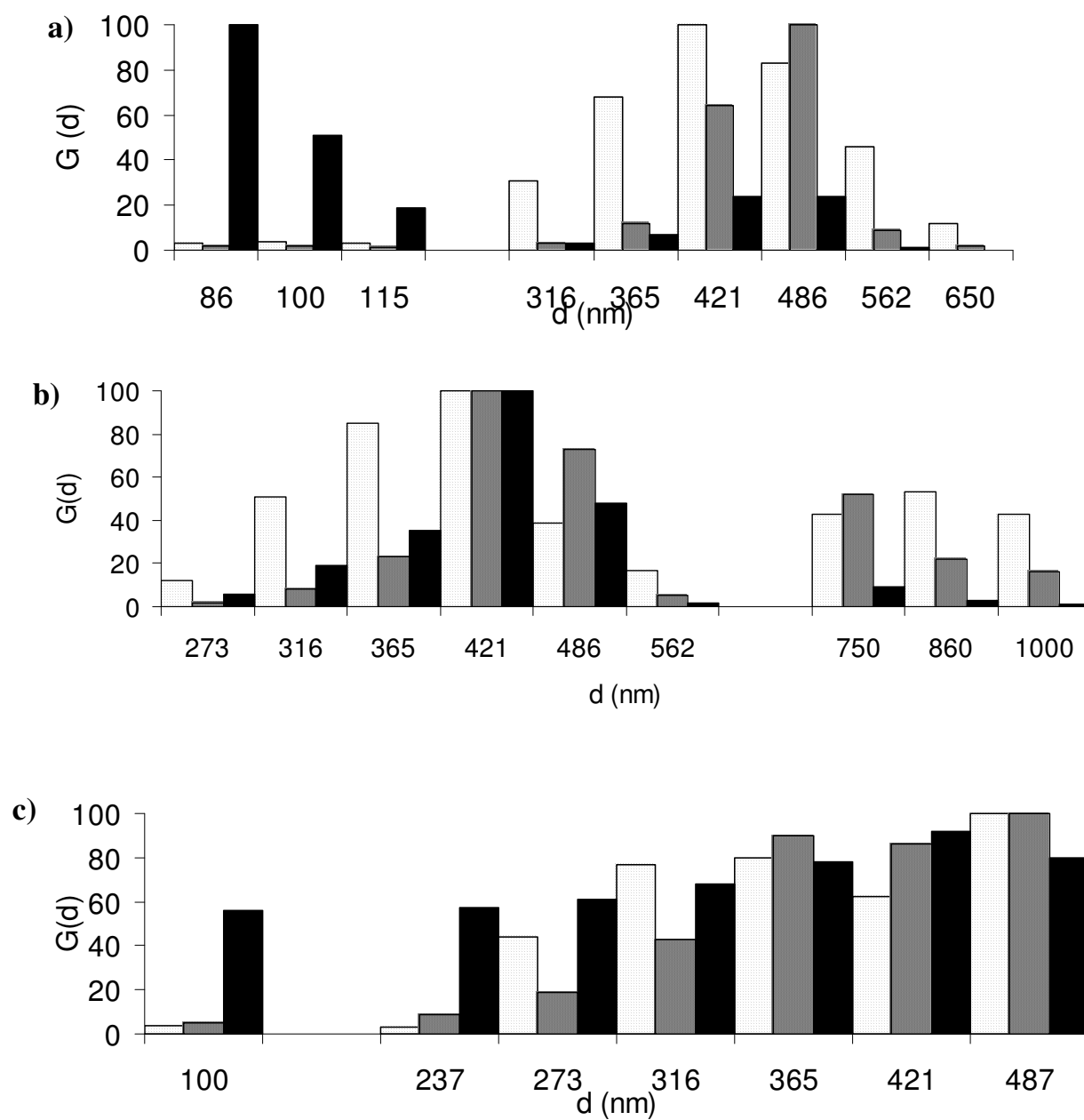
FIG. 20 Distribuzione delle dimensioni pesate in intensità (bianco), in volume (grigio) e in numero (nero), riportate come percentuale relativa. a) e b) liposomi ricoperti 20:1; c) e d) nanoparticelle NLC 20:1.

Dall'osservazione dei risultati presentati in Figura 20 si possono effettuare le seguenti considerazioni:

- si nota immediatamente che le distribuzioni delle dimensioni sono simili, sia per quanto riguarda i due campioni di liposomi ricoperti sia nel confronto con i due campioni costituiti da nanoparticelle semplici.
- in ogni caso si risolve una famiglia intorno ai 50-60 nm, preponderante in numero e che organizza circa metà del materiale a disposizione.

- la famiglia di dimensioni maggiori, è intorno ai 250-300 nm.

sedimento



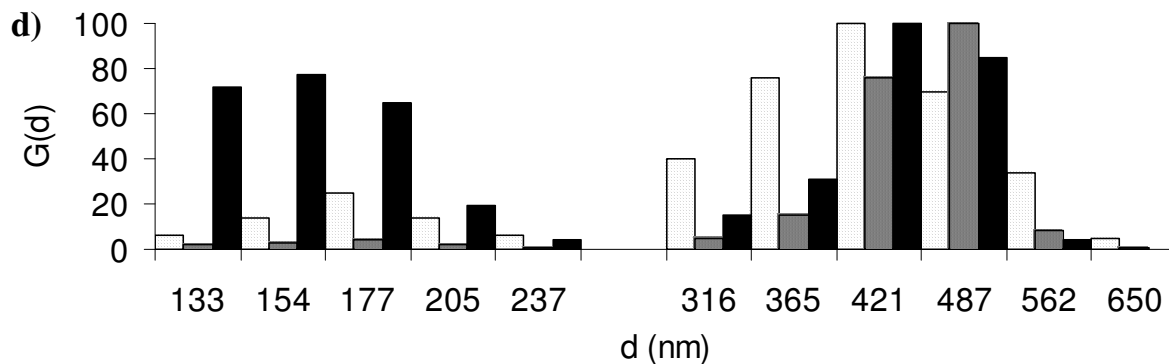


FIG. 21 Distribuzione delle dimensioni pesate in intensità (bianco), in volume (grigio) e in numero (nero), riportate come percentuale relativa. a) e b) liposomi ricoperti 20:1; c) e d) nanoparticelle NLC 20:1.

Anche in questo caso si riscontrano andamenti simili:

- parte degli oggetti di dimensione intorno ai 100-150 nm si trova già nel sedimento, tranne che per il campione relativo al grafico b) in cui, però, vengono distinti degli oggetti molto grandi che possono falsare la rivelazione di quelli più piccoli; evidentemente, come già ipotizzato in precedenza per le nanoparticelle, i parametri di centrifuga sono tali da produrre una sedimentazione di parte della famiglia con diametro intorno ai 100-150 nm.
- Le distribuzioni dimensionali dei liposomi ricoperti e delle nanoparticelle è molto simile.

Una volta centrifugati, anche il sedimento e il surnatante dei due campioni di liposomi ricoperti sono stati liofilizzati:

pesi dei liofilizzati	Liposomi ricoperti 1 Grafico a)	Liposomi ricoperti 2 Grafico b)	Nanoparticelle 1 Grafico c)	Nanoparticelle 2 Grafico d)
Peso surnatante (g)	0.0032	0.0031	0.0035	0.0032
Peso sedimento (g)	0.0015	0.0013	0.0012	0.0012

TABELLA 4: Pesi dei liofilizzati ottenuto per il sedimento e il surnatante di campioni di varia composizione. I campioni liofilizzati sono i medesimi relativi ai grafici di FIG. 20 e FIG. 21

Osservazioni:

- Anche per i liposomi ricoperti è evidente che la maggior quantità di materiale si organizza sulle dimensioni tipiche trovate nel surnatante, in particolare si equidistribuisce tra oggetti di dimensione 60-70 nm e oggetti di dimensione 250-300 nm (misure di scattering).
- i pesi del liofilizzato concordano con la concentrazione teorica di materiale in soluzione.
- la quantità di materiale presente nel sedimento e nel surnatante dei campioni costituiti da liposomi ricoperti e da quelli di nanoparticelle è del tutto analoga, segno che la quantità e la massa degli oggetti presenti nelle due fasi ottenute dalla centrifuga è assolutamente simile.

	Picco 1^a famiglia	Picco 2^a famiglia	G(d) picco 1^a famiglia	G(d) picco 2^a famiglia
Liposomi ricoperti 1	70 nm	270 nm	100	60
Liposomi ricoperti 2	60 nm	280 nm	100	60
Nanoparticelle 1	61 nm	260 nm	100	80
Nanoparticelle 2	65 nm	250 nm	100	60

TABELLA 5 Riassunto delle analisi dimensionali su varie tipologie di vettori

In tabella 5 viene riportato il riassunto dell'analisi dimensionale relativa al surnatante (dove non ho gli oggetti di grandi dimensioni, probabilmente grossi aggregati, ed è coinvolta la maggiore quantità di materiale) di due lotti di nanoparticelle e di due lotti di liposomi. In ogni caso sono distinguibili due famiglie principali, la 1^a famiglia e la 2^a famiglia in tabella fanno riferimento a queste famiglie. La distribuzione G(d) (vedi FIG.20, FIG.21) relativa alle analisi ottenute pesando sul volume di materiale organizzato su una determinata dimensione, mostra l'importanza percentuale di ciascuna famiglia, relativamente alla famiglia corrispondente al picco più alto della distribuzione; in tabella è riportato il valore medio del picco della G(d) relativamente alla 2^a famiglia.

4.2 Potenziale ζ - determinazione della carica superficiale

4.2.1 Effetto della velocità di iniezione, della quantità di materiale utilizzato e della velocità di mescolamento

Si è voluto studiare, anche dal punto di vista della carica superficiale, l'eventuale effetto prodotto:

- dall'utilizzo di quantità di materiali ridotte rispetto a quelle utilizzata nel metodo dell'iniezione automatica,
- semplici agitatori magnetici invece che un Ultraturrax,
- velocità di iniezione non controllate, preparazione mediante aggiunta con pipetta Gilson.

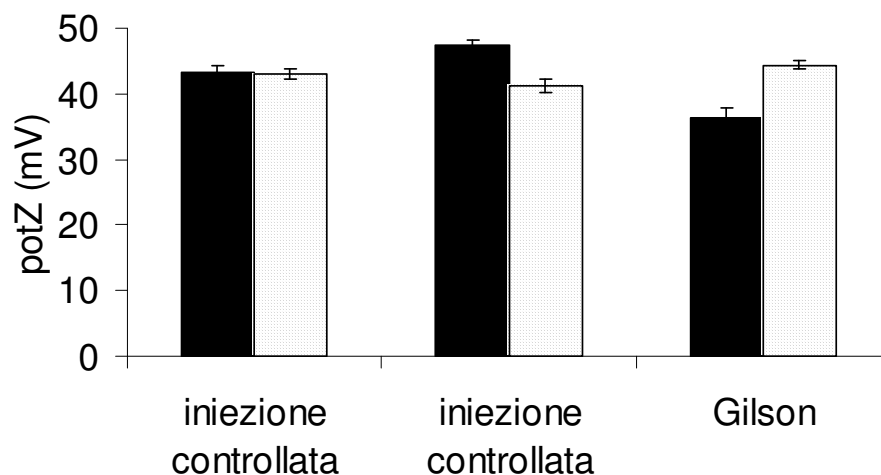


FIG. 22 Potenziale ζ relativo a nanoparticelle 20:1 (bianco) e liposomi ricoperti (nero) per diversi metodi di iniezione.

Dal grafico in FIG. 22 non si notano sostanziali differenze nel potenziale ζ , al variare della morfologia dei vettori (nanoparticelle e liposomi ricoperti) e dei parametri elencati all'inizio del paragrafo.

Nella preparazione di nanoparticelle con rapporto lecitina/chitosano 20:1, si è provato a variare la velocità di iniezione automatica della soluzione etanolica di lecitina:

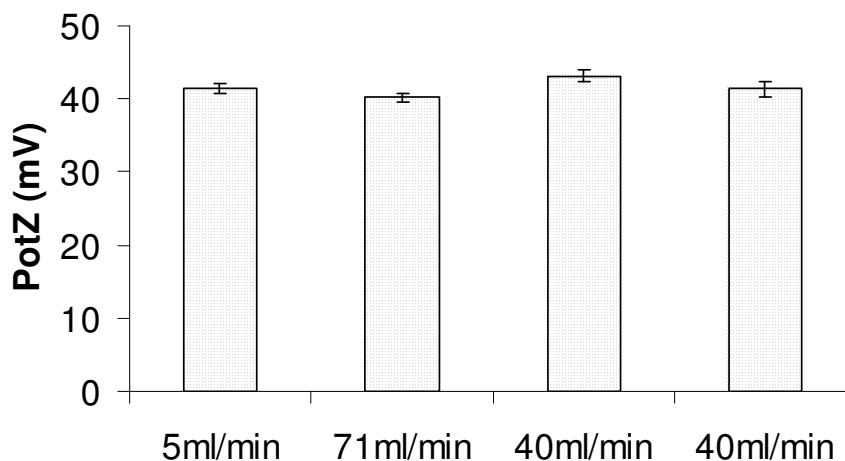


FIG. 23 Potenziale ζ relativo a nanoparticelle 20:1 ottenute mediante diverse velocità di iniezione automatica. Nel caso di 40ml/min si è riportato il risultato relativo a due lotti.

Quello che si osserva dalla FIG. 23 è che la velocità di iniezione non influisce in modo deciso sul potenziale Z delle nanoparticelle.

I vettori prodotti mediante iniezione controllata, sono stati precedentemente caratterizzati al potenziale ζ (1,2).

Dalla letteratura citata si può osservare che:

- Le nanoparticelle 5:1 posseggono la medesima carica di quelle 20:1; evidentemente, già nel caso con una minore quantità di polisaccaride tutti i legami con la lecitina vengono impegnati.
- È evidente la differenza di carica tra le nanoparticelle T60 e i liposomi T60, questo fatto supporta l'ipotesi che il chitosano, nonostante la presenza del principio attivo con carica positiva, partecipi alla morfologia delle nanoparticelle.
- Nelle nanoparticelle 20:1 in cui viene incapsulato il TAM, non varia la carica superficiale al variare della concentrazione del farmaco (carico positivamente al pH della preparazione).

4.3 SAXS (Small Angle X-ray Scattering)

Anche nello studio strutturale delle nanoparticelle, per evidenziare l'effetto sulla struttura dei diversi componenti, si è partiti dall'analisi dei sistemi più semplici (liposomi di lecitina di soia), e si è aggiunto un componente alla volta, quello di cui si voleva studiare il ruolo nel realizzare la struttura delle nanoparticelle.

Durante lo svolgimento del dottorato, non si è scesi nel dettaglio dell'analisi degli spettri: è la prima volta che misure di questo tipo vengono condotte sulle nanoparticelle in studio, pertanto lo scopo del lavoro nell'ambito del dottorato, è stato di creare una casistica e di comprendere i punti di maggiore interesse su cui condurre in seguito delle misure mirate e un'analisi più dettagliata.

Lo spettro ai raggi X dei liposomi composti dalla sola lecitina (FIG. 24), presenta il fattore di forma tipico del bilayer, il cui andamento nel caso ideale di sistema monocomponente è rappresentato dalla linea continua in figura 24. Nell'andamento dello spettro si nota che la misura è abbastanza rumorosa, nonostante questo si osserva un picco di struttura a $q = 1.13 \text{ nm}^{-1}$), la cui distanza caratteristica associata è circa 5.5 nm.

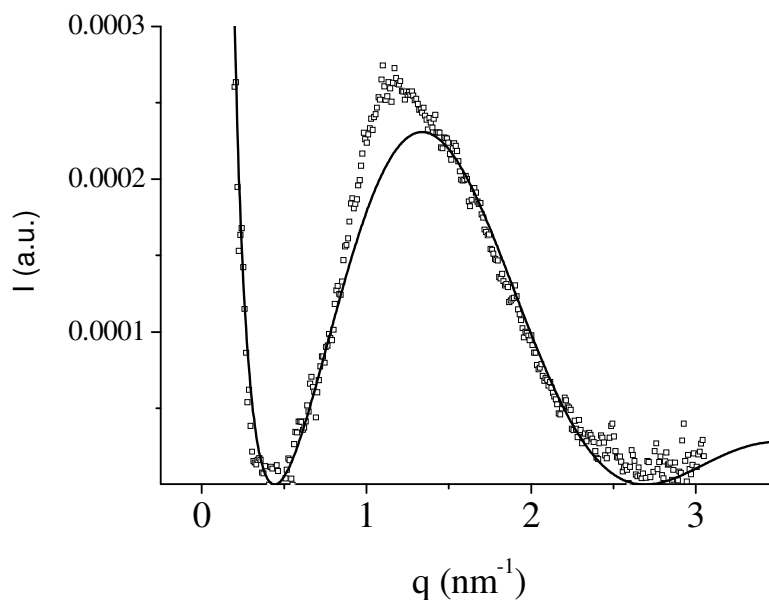
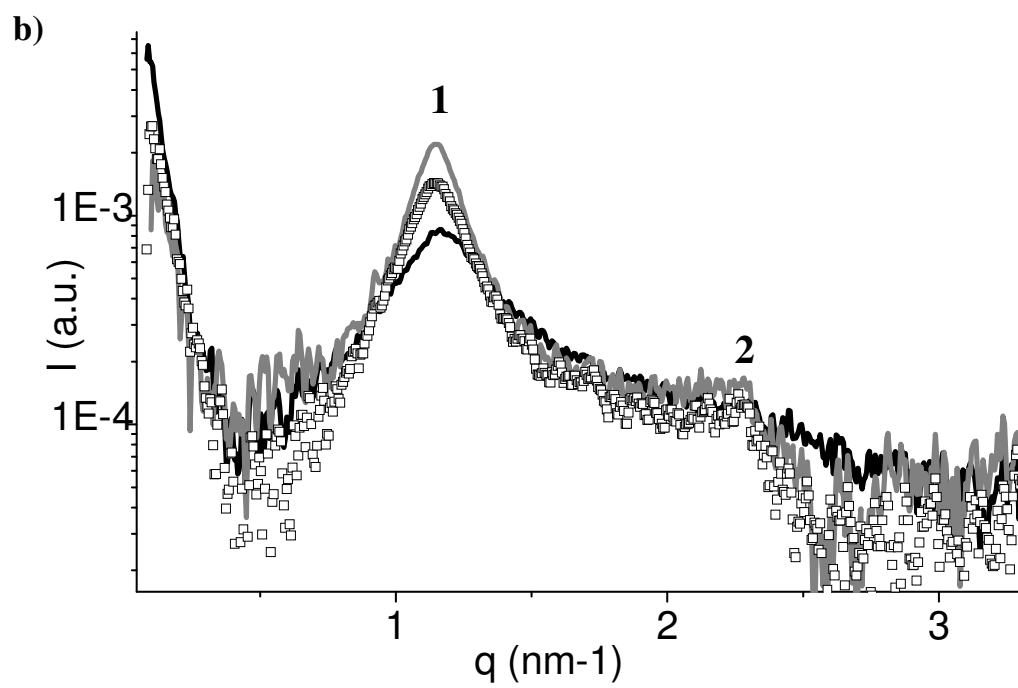
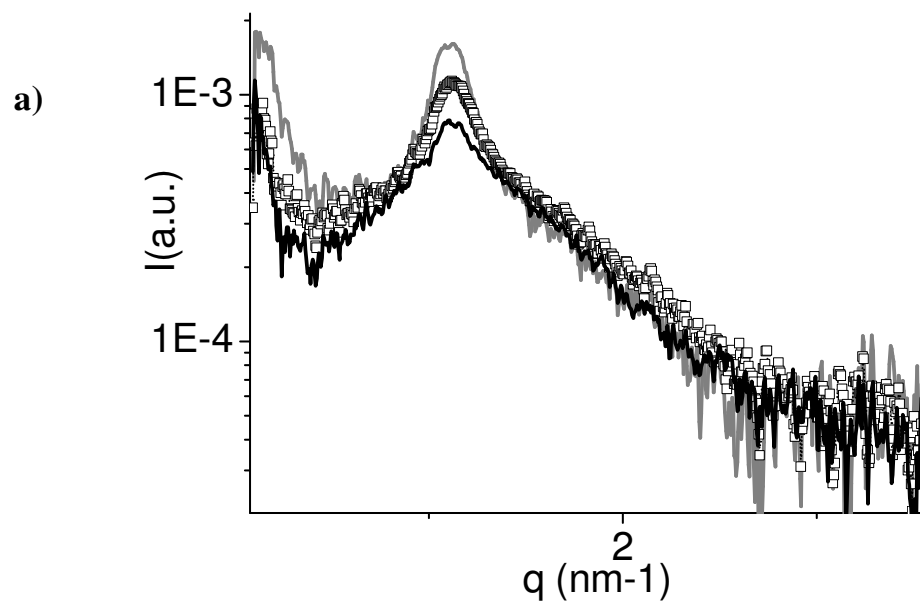


FIG. 24 *Spettro RX relativo a liposomi di lecitina; è stato sottratto il contributo del solvente e del capillare porta campione. Viene riportato anche l'andamento del fattore di forma di un bilayer monocomponente.*

4.3.1 Effetto dell'introduzione del chitosano:

4.3.1.1 Variazione della proporzione tra lecitina e chitosano

Sono state svolte misure utilizzando del chitosano con tre differenti pesi molecolari (8cP, 103cP, 715cP); per ciascun peso molecolare del polisaccaride, sono state realizzate nanoparticelle con tre differenti porporzioni in peso tra lecitina e chitosano. In FIG. 25 si osserva un confronto tra i valori di scattering ottenuto per i diversi campioni al variare del rapporto lecitina/chitosano.



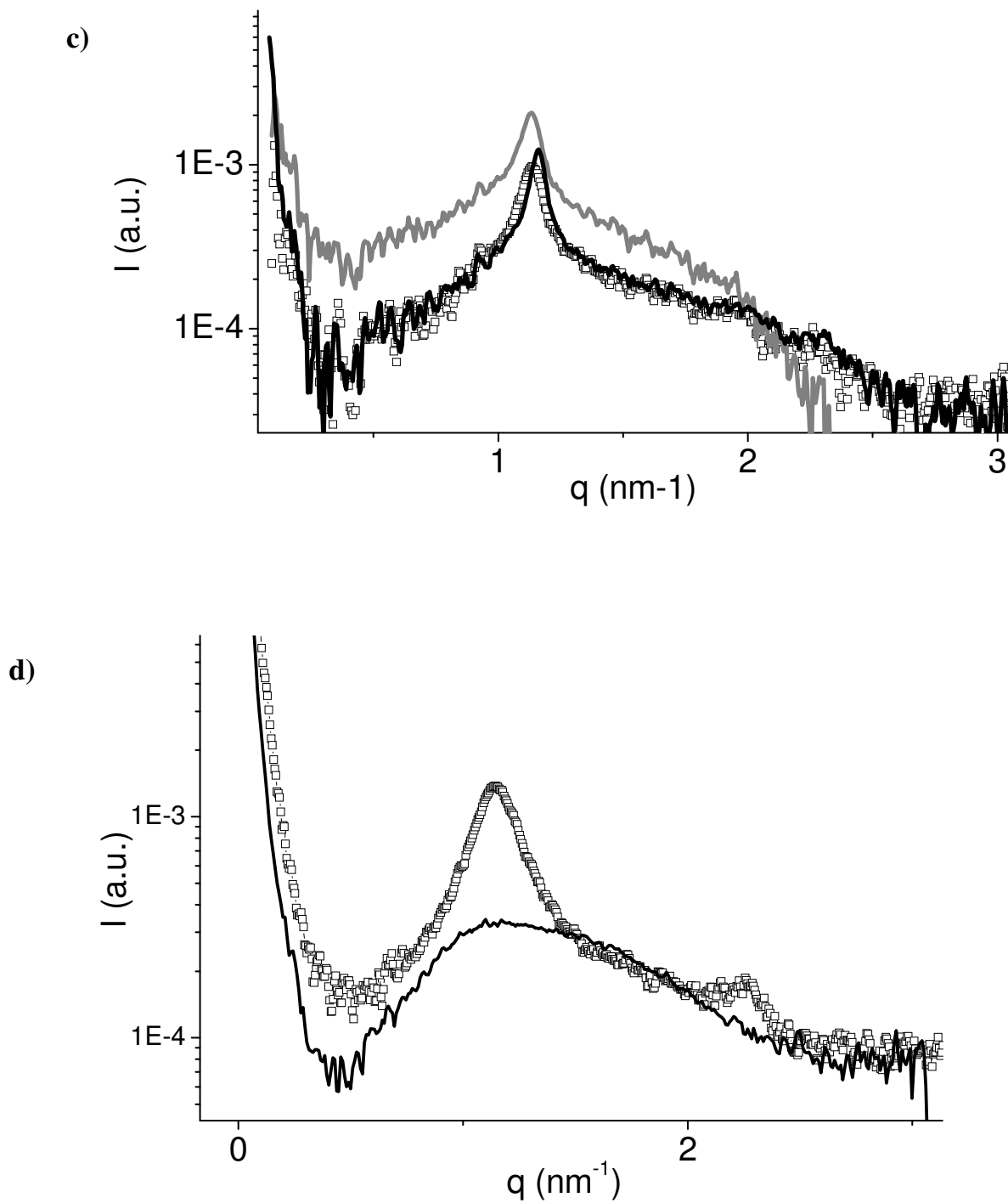


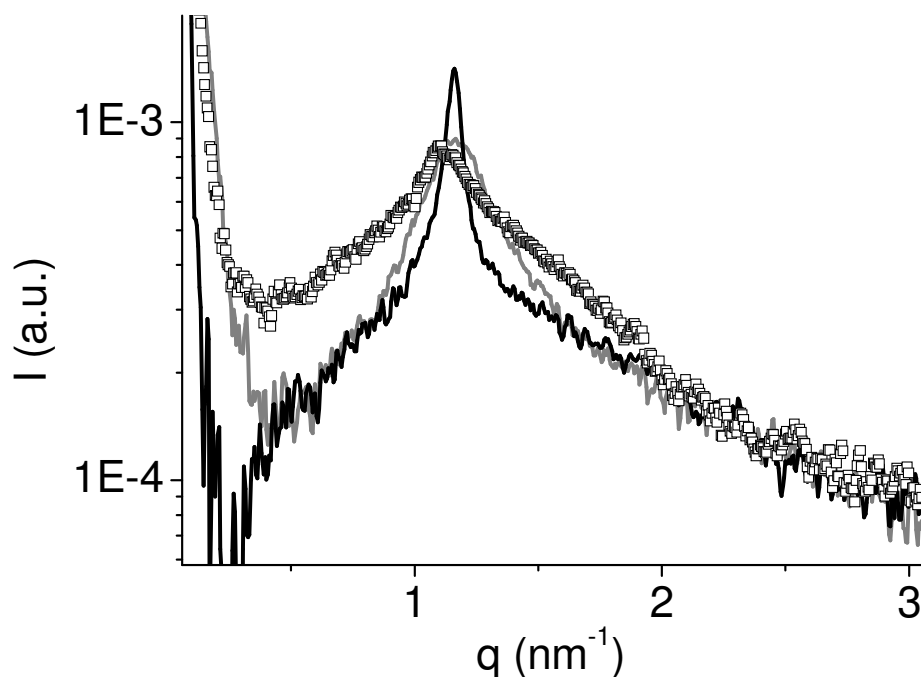
FIG. 25 Spettri di diffrazione RX al variare del rapporto lecitina/chitosano; in nero chitosano 8cP, quadrati vuoti chitosano 103 cP, in grigio chitosano da 715 cP; a) NLC 5:1 b) NLC 20:1 c) NLC 80:1 d) confronto tra NLC 20:1 con chitosano 103cP e liposomi di lecitina

Introducendo il chitosano (FIG. 25) si osserva che l'andamento del fattore di forma rimane quello del bilayer (grafico d FIG. 25). Il picco di struttura osservato anche nello spettro dei liposomi di lecitina (FIG: 24) diviene più pronunciato: il chitosano è una molecola con una densità elettronica più elevata di quella lecitina, pertanto contrasta maggiormente rispetto al solvente; la distanza caratteristica corrispondente è di 5.5nm, indipendentemente dal tipo di chitosano utilizzato che, invece, modifica l'intensità associata al picco. Nel caso in cui il rapporto in peso tra lecitina e chitosano è 20:1, si nota una ripetizione ad un q doppio di quello del primo picco, indice di una struttura a multilayer.

4.3.2.1 Variazione del peso molecolare del chitosano:

Sono state realizzate nanoparticelle con del chitosano da 8cP, 103cP, 715cP.

a)



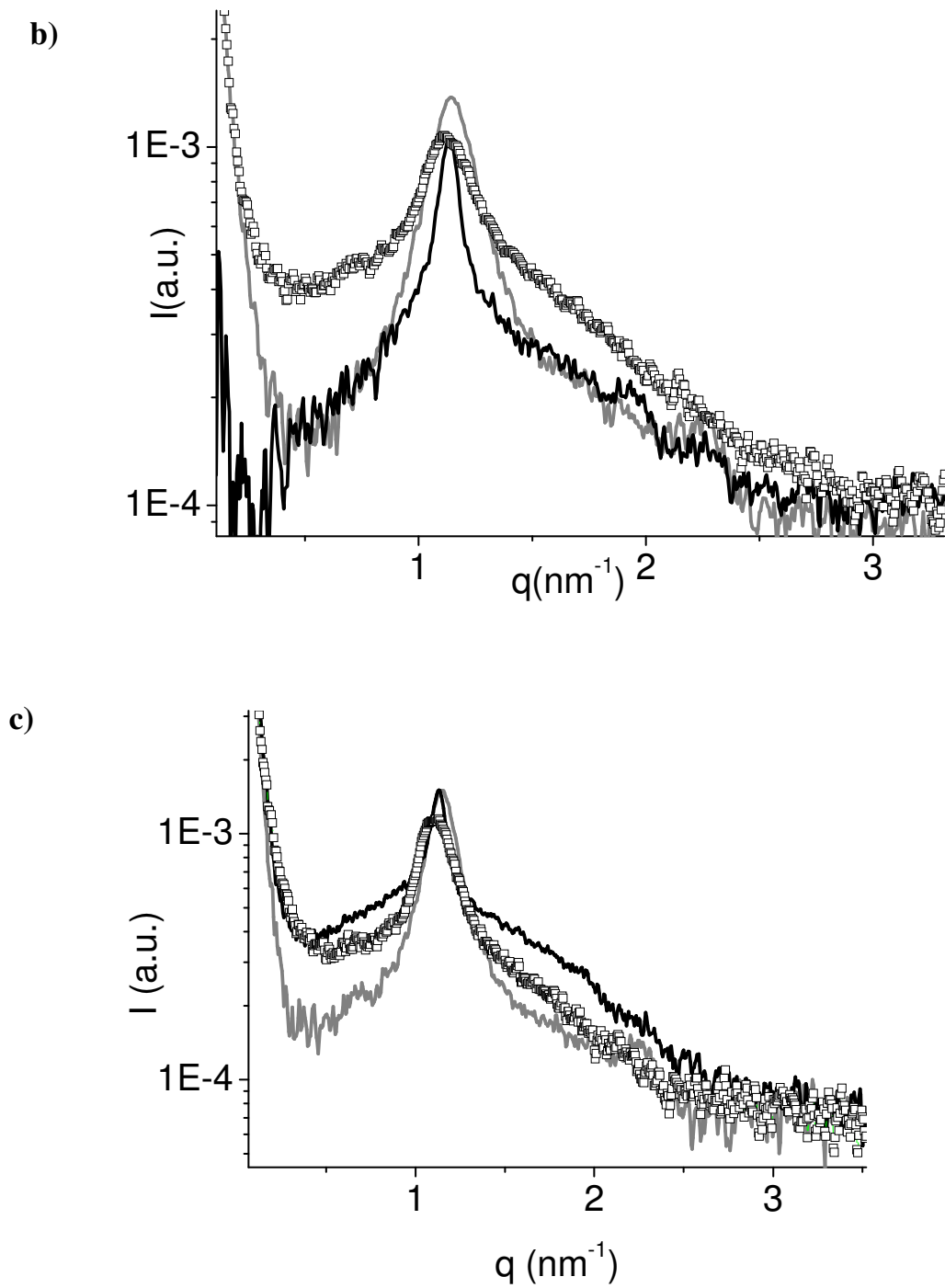


FIG. 26 Spettri di diffrazione RX al variare del peso molecolare del chitosano; in nero NLC 80:1; quadrati vuoti NLC 5:1, in grigio NLC 20:1; a) chitosano 8 cP b) Chitosano 103 cP c) chitosano 715.

Confrontandosi con i grafici in FIG. 26, si nota immediatamente che, pur non cambiando la struttura in modo sostanziale, ciò che modifica sensibilmente l'andamento dello spettro dei campioni, è la variazione tra la proporzione di lecitina e chitosano, piuttosto che il peso molecolare del polisaccaride.

Il picco di struttura resta sempre centrato intorno alla distanza caratteristica di 5.5 nm, cambia il profilo: nel caso in cui il rapporto tra lecitina e chitosano è 80:1 si nota che il picco è più stretto, meglio definito. Nelle nanoparticelle 20:1 il picco si allarga e diventa evidente la ripetizione del multilayer; infine nel caso 5:1, il picco, soprattutto per il chitosano da 8 cP, risulta ancora allargato e con un'intensità relativa rispetto a quella del fattore di forma, diminuita.

Dall'analisi dei dati SAXS si può, quindi, concludere che i vettori composti solamente da lecitina, presentano il fattore di forma del bilayer e almeno un evidente picco di struttura corrispondente ad una distanza caratteristica di circa 5.5 nm; si può dedurre che i liposomi posseggono una struttura a multilayer su una distanza caratteristica di 5.5 nm.

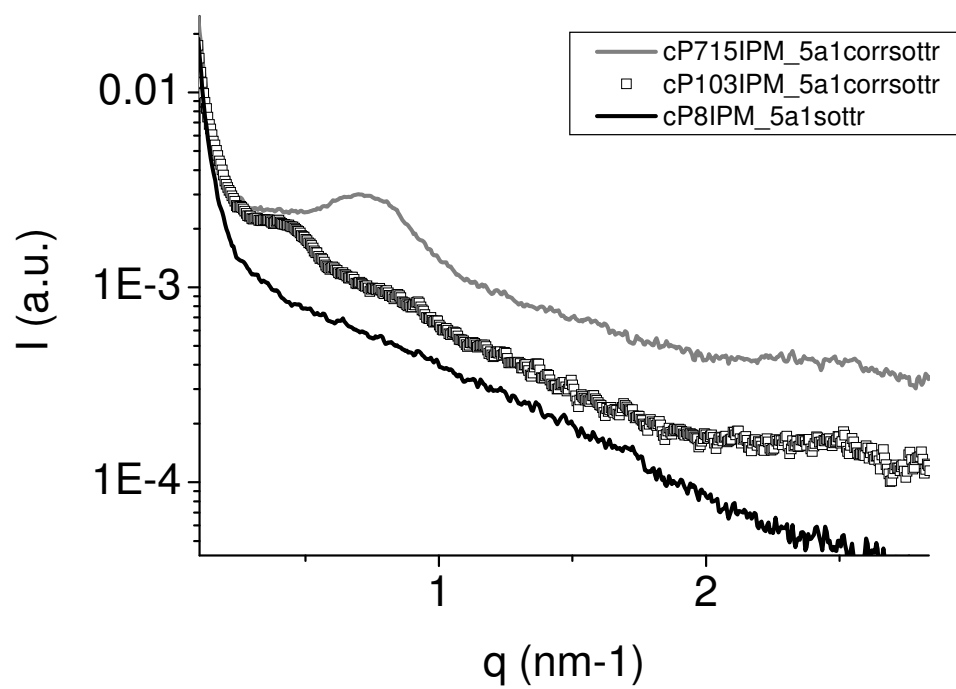
Aggiungendo il chitosano (indipendentemente dalla concentrazione e dal peso molecolare), il picco di struttura diventa più pronunciato, restando centrato attorno ad una distanza caratteristica di 5.5nm.

4.3.2 Effetto dell'introduzione dell' IPM

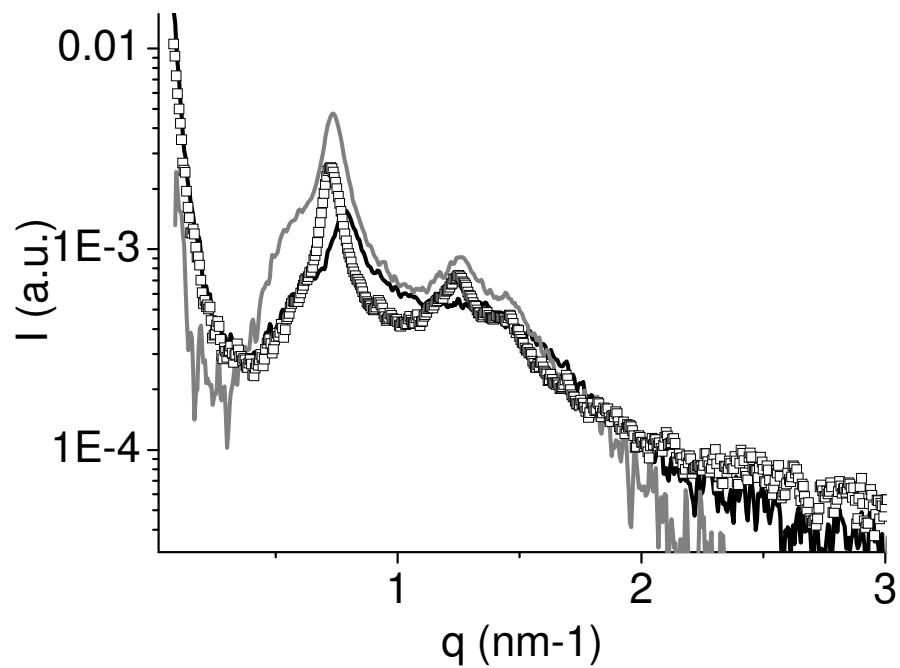
Per migliorare l'efficienza di caricamento e prolungare il tempo di rilascio del progesterone, è stato aggiunto alla preparazione delle nanoparticelle dell'isopropilmiristato (IPM). L'effetto ottenuto sulla struttura delle nanoparticelle è decisamente significativo relativamente sia al peso molecolare del chitosano sia alla proporzione tra lecitina e zucchero.

4.3.2.1 Variazione della proporzione tra lecitina e chitosano fissata la quantità di IPM

a)



b)



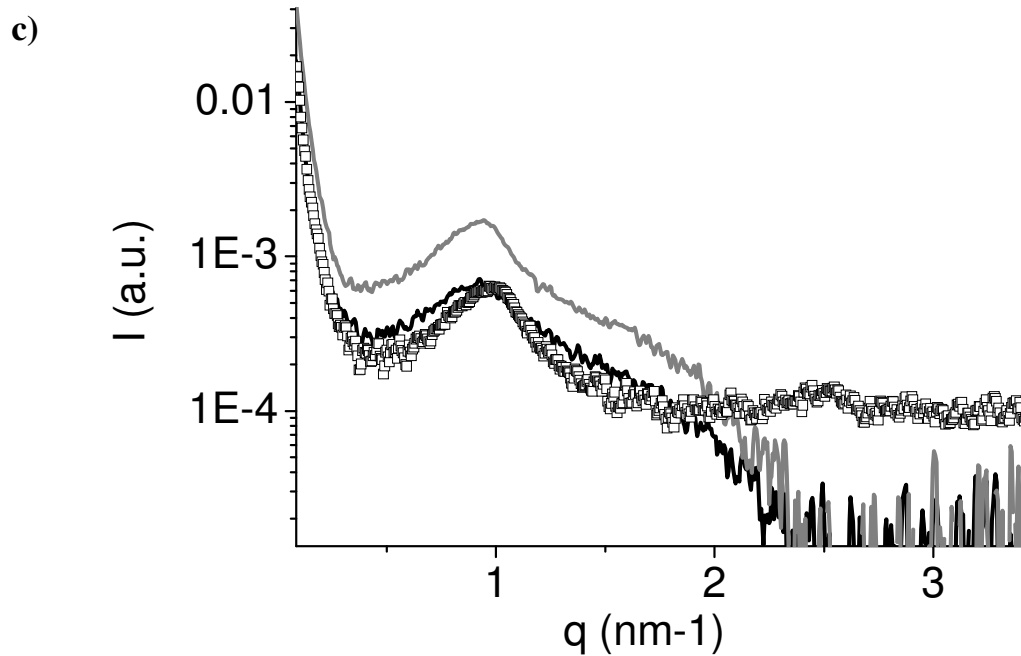
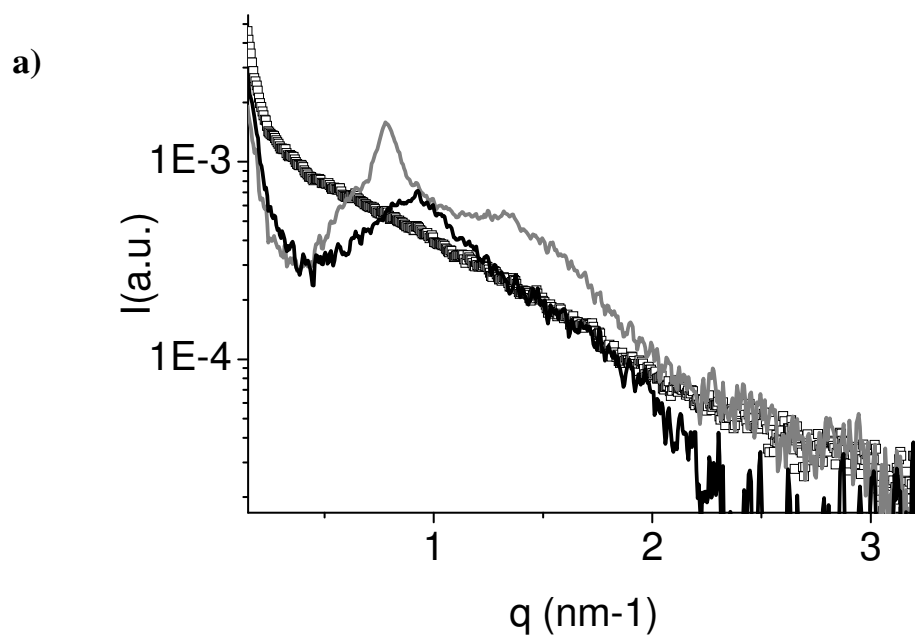


FIG. 27 Spettri RX al variare del rapporto lecitina/chitosano fissata la quantità di IPM; in nero chitosano 8cP, quadrati vuoti chitosano 103 cP, in grigio chitosano da 715 cP; a) NLC 5:1 b) NLC 20:1 c) NLC 80:1.

4.3.2.2 Variazione del peso molecolare del chitosano fissata la quantità di IPM:



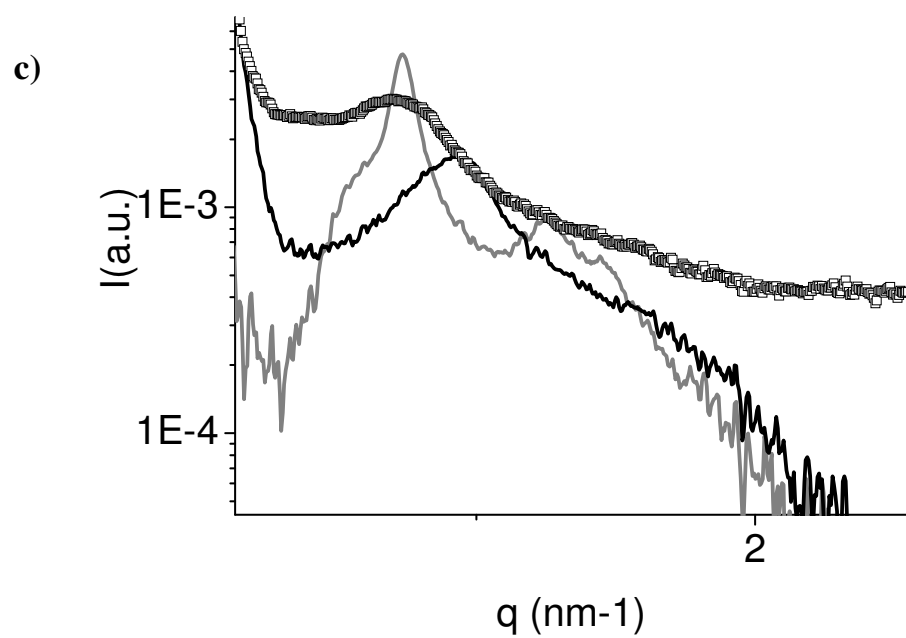
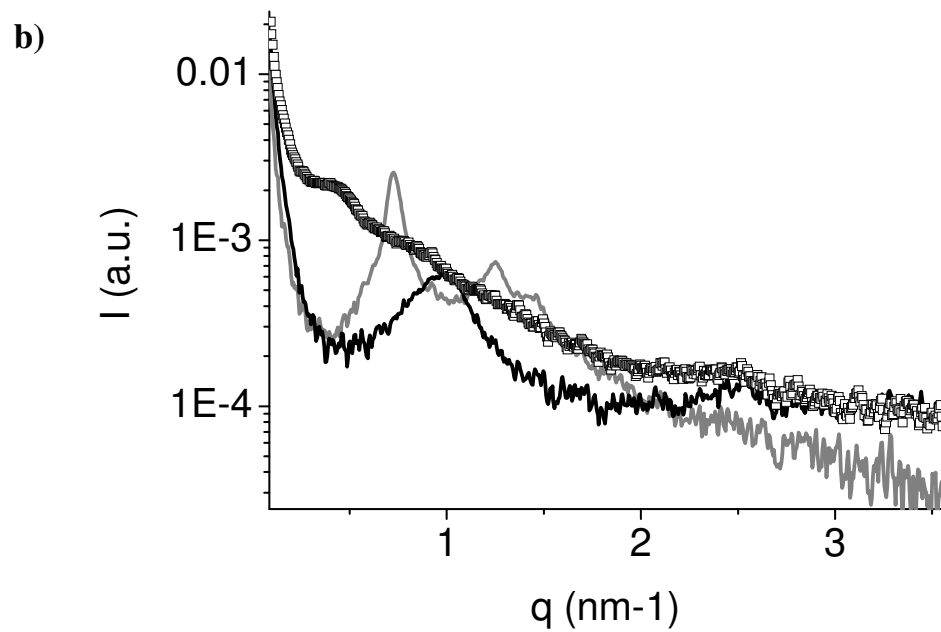


FIG. 28 Spettri RX al variare del peso molecolare del chitosano; in nero NLC 80:1; quadrati vuoti NLC 5:1, in grigio NLC 20:1; a) chitosano 8 cP b) Chitosano 103 cP c) chitosano 715.

I grafici riportati in FIG. 27 e in FIG. 28, mostrano al variare del rapporto in peso tra lecitina e chitosano e del peso molecolare del chitosano, l'effetto dell'introduzione dell'IPM (2.5% p/v); si nota immediatamente che:

- la struttura delle nanoparticelle è fortemente influenzata dalla presenza dell'IPM. In assenza dell'IPM si è notato che la proporzione tra lecitina e chitosano, concorre alla struttura delle nanoparticelle ma le differenze che si notano sono minime, in ogni caso, la tipologia della struttura viene mantenuta; introducendo l'IPM, cambia completamente la struttura al variare della proporzione lecitina/chitosano (FIG. 28).
- Variando il peso molecolare del chitosano, fissato il rapporto in peso con la lecitina (FIG.27), si notano significativi effetti sul picco di struttura: in questo caso, non cambia la tipologia di struttura ma le distanze caratteristiche su cui la struttura si organizza; comunque, le posizioni dei picchi di struttura, in tutti i casi riportati, sono su distanze maggiori rispetto quanto osservato in assenza di IPM.
- Ai picchi di struttura sono associate delle distanze caratteristiche di circa 15 nm nel caso del chitosano da 103 cP, 8.9 nm per il chitosano da 715cP, mentre per lo zucchero con il peso molecolare da 8 cP, non si distingue picco di struttura; anche nei due casi in cui si riconosce la presenza di una struttura, il picco è decisamente allargato.
- Nel caso in cui la proporzione tra lecitina e chitosano è pari a 20:1 (FIG. 27 grafico b)), si riconoscono tre picchi, almeno nei due casi con chitosano di peso molecolare da 103 e 715 cP ; le posizioni dei picchi cambiano leggermente, al variare del peso molecolare del chitosano ma la tipologia della struttura viene mantenuta. La ripetizione che si osserva è di tipo 1, $\sqrt{3}$, 2, tipico di fasi esagonali; resta da verificare se la struttura che si realizza è di tipo esagonale piuttosto che la sovrapposizione di più strutture tipo multilayer. Comunque, la distanza caratteristica associata ai picchi di struttura, mostra che si tratta di un'organizzazione intra-particella, non inter-particelle.
- Per la proporzione 80:1 (FIG.27 grafico c)), il picco di struttura è centrato intorno ai 6.5 nm, anche si notano lievi variazioni in funzione del peso molecolare del chitosano.

Per quanto riguarda l'introduzione dell'IPM nella composizione delle nanoparticelle, si può concludere che l' IPM interagisce nella struttura delle nanoparticelle sia dal punto di vista della tipologia che delle distanze caratteristiche su cui la struttura si organizza. In presenza dell'IPM, diventa decisivo rispetto alla struttura delle nanoparticelle, il rapporto tra lecitina e chitosano; il peso molecolare dello zucchero produce cambiamenti significativi alla struttura, anche se meno importanti. Un'ipotesi di spiegazione di quanto osservato potrebbe essere che l'IPM va ad

intercalarsi tra la lecitina di soia, rendendo accessibili allo zucchero delle cariche che normalmente si trovano sotto la superficie delle nanoparticelle, quindi schermate. Sotto questa ipotesi appare evidente che l'introduzione dell'IPM va a modificare l'interazione tra lecitina e chitosano.

Per evidenziare l'effetto dovuto all'introduzione dell'IPM, sulla struttura delle nanoparticelle, vengono riportati in FIG. 29 i grafici relativi alle nanoparticelle con rapporto lecitina/chitosano 20:1 in presenza e in assenza di IPM.

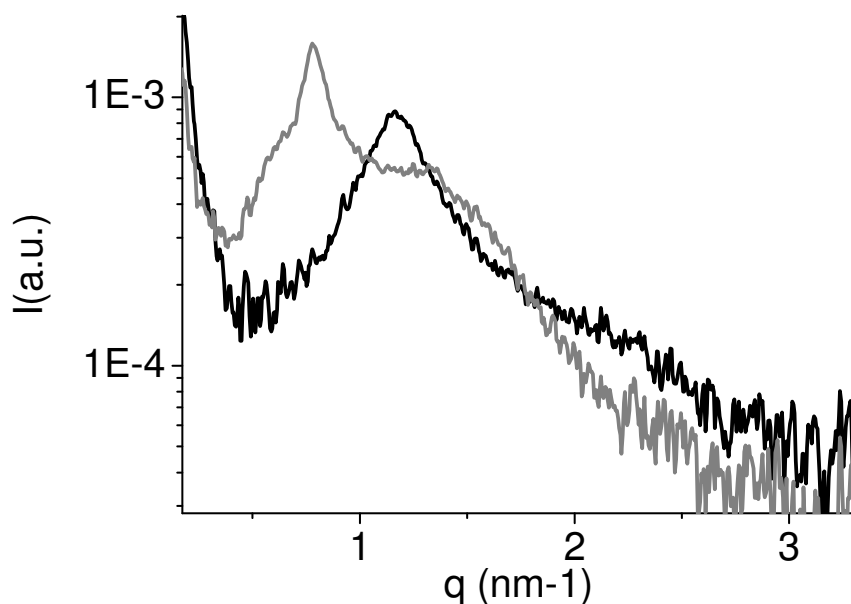


FIG. 29 Spettridi diffrazione RX per NLC 20:1 con chitosano da 103 cP, in presenza (grigio) e in assenza (nero) di IPM.

4.3.3 Effetto dell'introduzione dell'Progesterone:

Le misure su campioni contenenti IPM e progesterone non mostrano significativi cambiamenti nella struttura rispetto ai campioni con il solo IPM.

4.3.4 Nanoparticelle e vescicole con Tamoxifene citrato

4.3.4.1 vescicole

Sono stati studiati campioni ottenuti complessando la lecitina e diverse quantità di tamoxifene citrato in presenza e in assenza di chitosano (con tre diverse proporzioni tra lipide e polisaccaride e diversi pesi molecolari dello zucchero, vedi tabella 6) e diverse quantità di principio attivo.

Chitosano 8cP			Chitosano 103cP			Chitosano 715 cP		
• 10mg(TAM citrato)/100ml • 60mg(TAM citrato)/100ml • 120mg(TAM citrato)/100ml			• 10mg(TAM citrato)/100ml • 60mg(TAM citrato)/100ml • 120mg(TAM citrato)/100ml			• 10mg(TAM citrato)/100ml • 60mg(TAM citrato)/100ml • 120mg(TAM citrato)/100ml		
5:1 (lec/chit b.w.)	20:1 (lec/chit b.w.)	80:1 (lec/chit b.w.)	5:1 (lec/chit b.w.)	20:1 (lec/chit b.w.)	80:1 (lec/chit b.w.)	5:1 (lec/chit b.w.)	20:1 (lec/chit b.w.)	80:1 (lec/chit b.w.)

Tabella 6 tipologia dei vettori contenenti Tamoxifene citrato analizzati.

Per quanto riguarda le vescicole di lecitina e tamoxifene citrato (vettori composti dalla sola lecitina e principio attivo, chiamate così per distinguerle dai vettori contenenti anche il chitosano, detti nanoparticelle), sono state ottenute due sospensioni stabili (con 10mg/100ml e 60mg/100ml) e una che da subito ha flocculato (120mg/100ml); per quest'ultima si è analizzato solo il surnatante della preparazione separata.

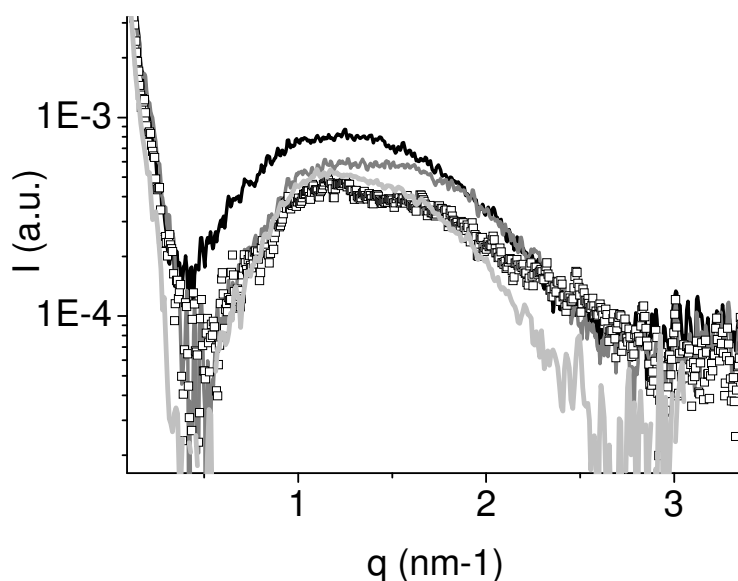


FIG. 29 Spettri di diffrazione RX in assenza di chitosano, al variare della quantità di TAM: 10mg/100ml (nero), 60mg/100ml (grigio scuro), 120mg/100ml(quadrati vuoti). In grigio chiaro lo spettro relativo ai liposomi di lecitina.

L'andamento dello spettro delle vescicole contenenti il Tamoxifene citrato è simile a quello dei liposomi di lecitina, ovvero in assenza di tamoxifene citrato. Aumentando la quantità di principio attivo, si osserva che il primo minimo dello spettro si sposta verso q più alti, ovvero su distanza inferiori, in accordo con le misure di scattering dinamico in cui si osservava come all'aumentare della concentrazione del principio attivo, le vescicole andavano ad organizzarsi su dimensioni minori.

4.3.4.2 Effetto dell'introduzione del chitosano:

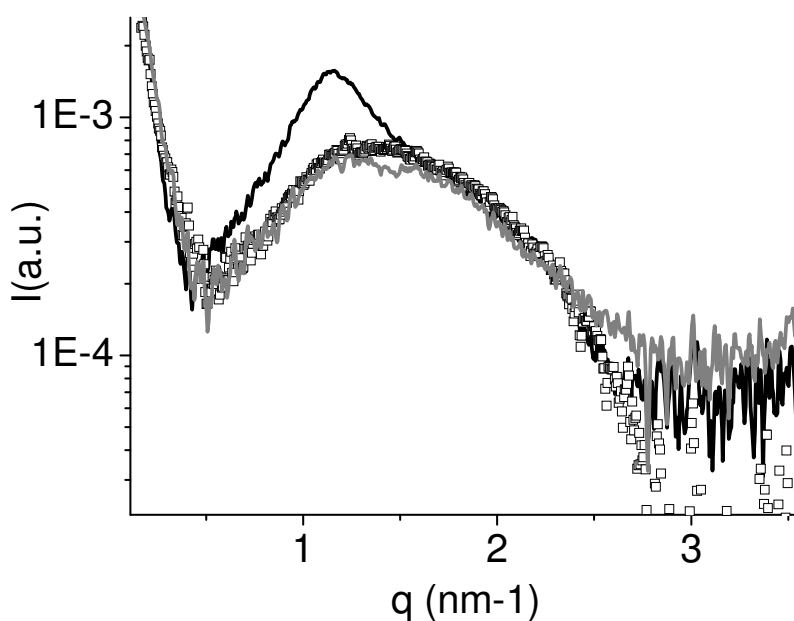


FIG. 30 Spettridi diffrazione RX per NLC 20:1 con chitosano da 103 cP, al variare della quantità di TAM: 10mg/100ml (nero), 60mg/100ml (grigio scuro), 120mg/100ml(quadrati vuoti).

Dal grafico in FIG.30 si nota che, in aggiunta del chitosano, il picco di struttura appare più evidente solo nel campione con la minore quantità di principio attivo; il tamoxifene citrato è carico positivamente al pH (acido) della preparazione), compete, quindi, con le cariche positive del chitosano nell'interazione elettrostatica con la lecitina. Una maggiore quantità di principio attivo presente nella preparazione porta ad una minore quantità di cariche negative libere della lecitina e, quindi, diminuisce la quantità di chitosano che può interagire con la lecitina.

L'effetto della competizione elettrostatica tra principio attivo e chitosano, risulta più evidente confrontando vettori contenenti la medesima quantità di TAM, in assenza e in presenza di chitosano.

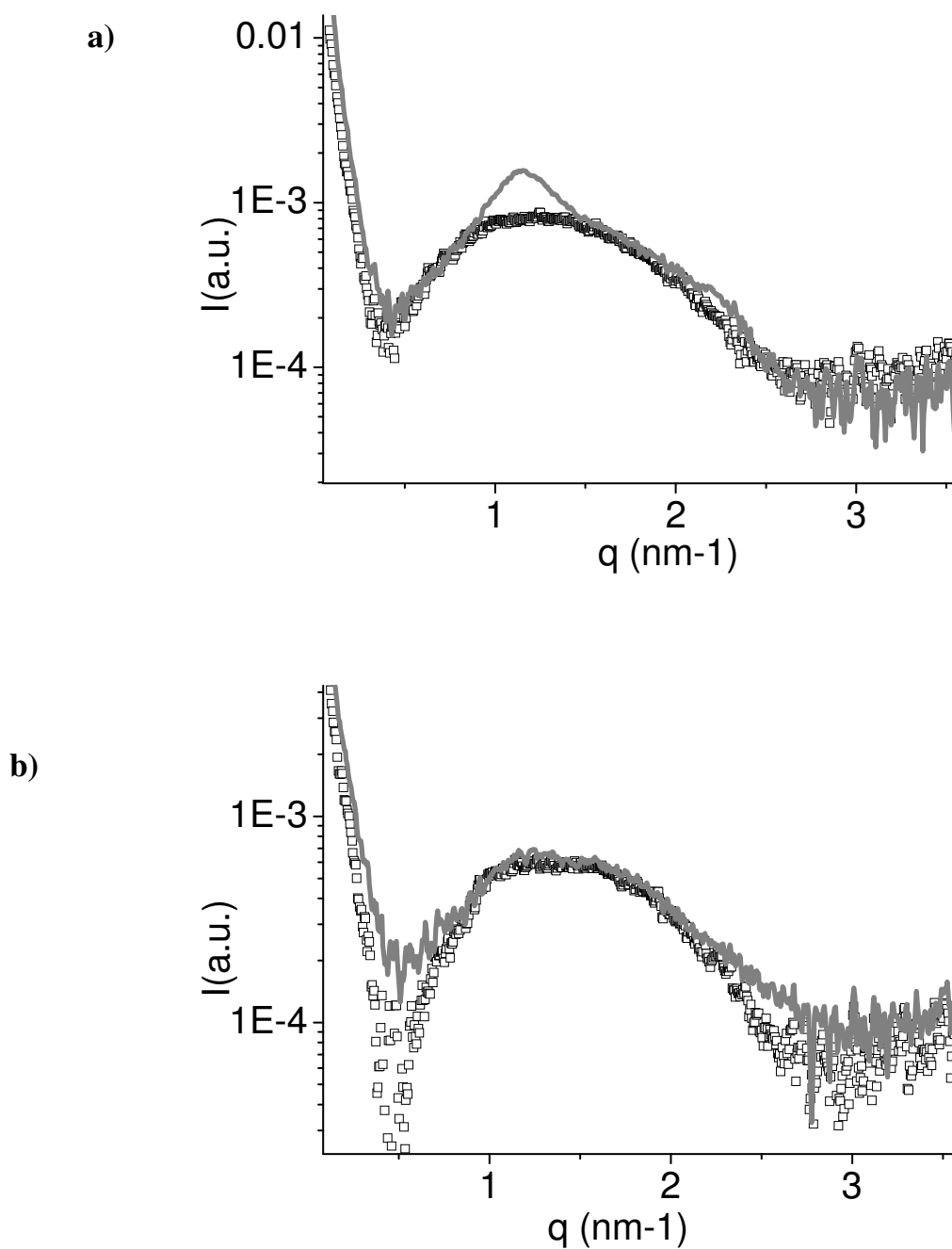


FIG.. 31 Spettridi diffrazione RX per NLC 20:1 con chitosano da 103 cP (linea grigia) e vescicole (quadrati vuoti), al variare della quantità di TAM incapsulato: a) 10 mg/100 ml, b) 60 mg/100 ml.

Dalla FIG. 31 b) si osserva che in presenza di 60 mg di tamoxifene citrato per 100 ml di soluzione, lo spettro è analogo a quanto osservato in assenza di chitosano: verosimilmente già 60 mg/100 ml di tamoxifene citrato, sono sufficienti per permettere l'adesione solamente di una esigua quantità di

polisaccaride e, quindi, non si notano evidenti diversità tra gli spettri raccolti in presenza e in assenza di chitosano (a parità di TAM).

In FIG.31 a) vi sono gli spettri relativi alla minore quantità di principio attivo incapsulato (10mg/100ml):innanzitutto si evidenzia notevolmente il primo picco di struttura, inoltre si ha una ripetizione (poco risolta) ad una distanza doppia. La distanza caratteristica associata al picco di struttura è 5.5 nm, la medesima trovata nel caso delle nanoparticelle non caricate e la tipologia della ripetizione è quella del multilayer, come osservato in precedenza per le nanoparticelle.

Sono stati acquisiti degli spettri su campioni in cui si è variato sia la quantità che il peso molecolare del chitosano: non si sono verificati cambiamenti significativi.

Si può, quindi, concludere che il tamoxifene citrato, al pH della preparazione (circa 4) risulta carico positivamente: sicuramente compete con la carica positiva del chitosano; nella preparazione con la minore quantità di principio attivo, restano ancora delle cariche negative della lecitina non impegnate dal tamoxifene citrato, è quindi possibile un'interazione con il chitosano; già nel caso in cui si hanno 60mg/100ml di tamoxifene citrato, il principio attivo “ostacola” l'interazione del chitosano con la lecitina.

Da misure di potenziale Z si osserva che la carica superficiale (a parità di principio attivo) aumenta in presenza del chitosano anche nel caso di 60mg/100ml di TAM (da 33mV a 42mV): sicuramente una certa quantità di chitosano va ad interagire con i vettori, ma non abbastanza per creare una struttura superficiale come nel caso con la minore quantità di principio attivo.

4.4 Cryo-TEM

A causa dei costi elevati, le immagini di microscopia elettronica sono state ottenute solo per le due tipologie di campioni maggiormente significative: nanoparticelle con rapporto in peso lecitina/chitosano 20:1 e chitosano da 103cP; il secondo campione è composto da nanoparticelle con rapporto in peso lecitina/chitosano pari a 20:1, chitosano da 103 cP e Tamoxifene citrato con una concentrazione pari a 60mg/100ml di soluzione. Le immagini si riferiscono a preparazioni alla concentrazione iniziale di preparazione, nessuna diluizione è stata effettuata.

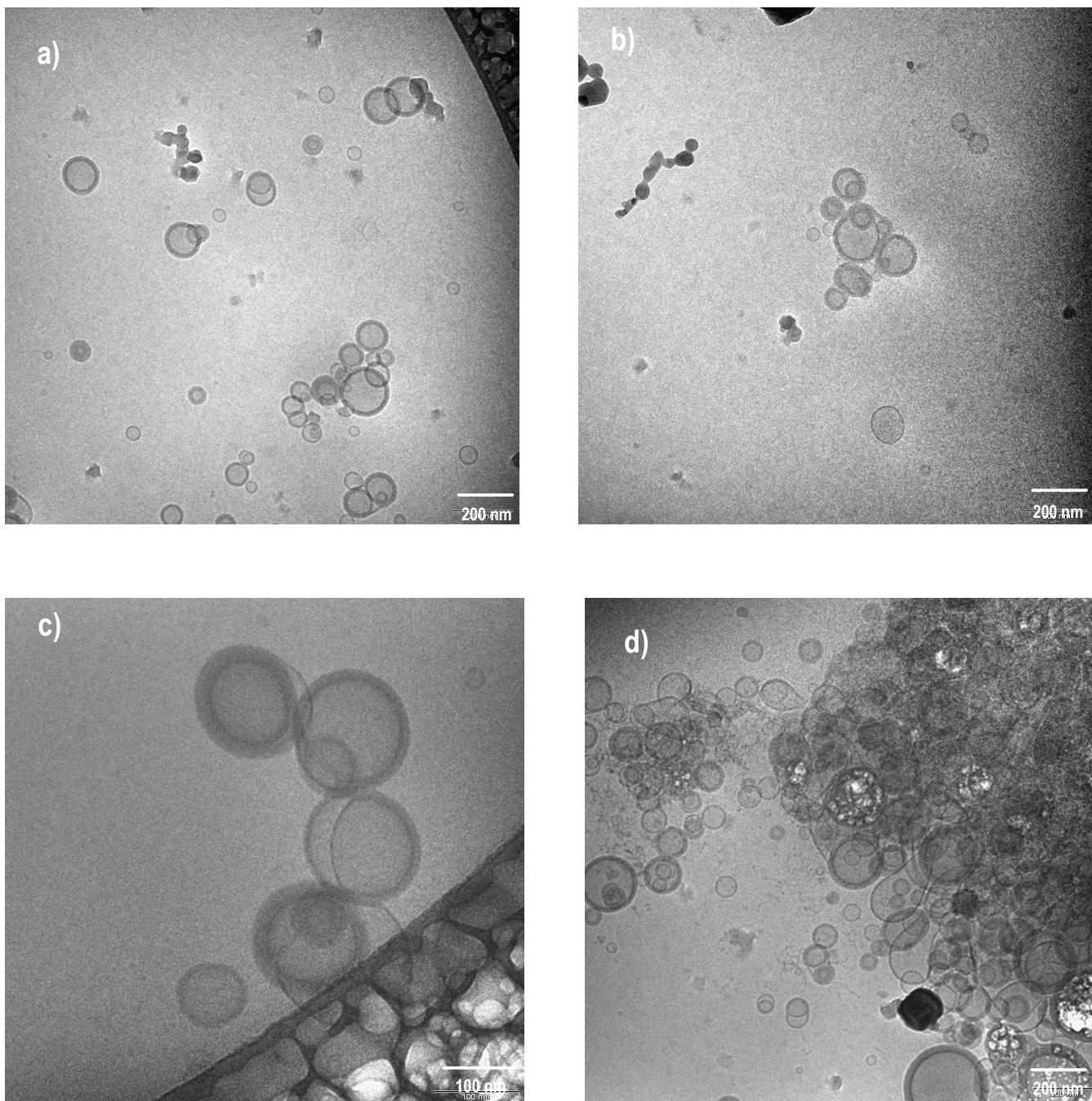


FIG. 32 Immagini cryo-Tem su NLC 20:1 con chitosano da 103 cP; la scala è indicata in figura.

La prima evidenza è che esiste un'estesa tipologia di oggetti differenti sia per dimensione che per morfologia: in tutte le immagini sono presenti sia oggetti con un grosso contorno scuro che altri con un bordo più sottile; questi ultimi hanno il tipico aspetto dei liposomi. Il fatto che abbiano un bordo marcato rispetto all'interno, indica che siamo in presenza di sfere e non di dischi (questi, infatti,

hanno una colorazione uniforme tra interno e bordo e sono visibili anche di taglio, non solo come cerchi).

Le dimensioni degli oggetti visibili nelle immagini di microscopia, concordano con quelle trovate nelle misure di scattering dinamico operate sulle nanoparticelle e sui liposomi: si distinguono oggetti da poche decine di nm fino a 170-180 nm. E' da sottolineare che per il tipo di tecnica utilizzata, non è possibile risolvere la struttura presente all'interno dei liposomi: infatti il termine di contrasto è dato dalla differenza di densità elettronica che, nel caso della lecitina e del solvente acquoso è praticamente nullo, eventuali multilayer di lecitina non sono visibili se intervallati solo dal solvente acquoso. Al contrario, il chitosano, possiede una densità elettronica molto alta, differente da quella del solvente e della lecitina; proprio questo fatto porta a dire che nello spesso bordo scuro (grande contrasto), visibile in alcuni vettori, è presente il chitosano, al contrario del core dei vettori, dove non si nota la presenza dello zucchero.

Quest'ultima osservazione è decisamente importante, infatti, chiarisce vari aspetti: non in tutti gli oggetti chitosano e lecitina interagiscono secondo la medesima modalità; i vettori in cui è evidente la presenza del chitosano, sono costituiti da una core lipidico e da una ricopertura in cui si raccoglie il chitosano, una specie di liposomi ricoperti, come ipotizzato in precedenza dalle misure di scattering confrontando dimensioni, carica e peso molecolare di nanoparticelle e liposomi ricoperti.

Osservando nel dettaglio le immagini si nota che i campioni in cui certamente si ha la presenza del chitosano, sono organizzati in aggregati:

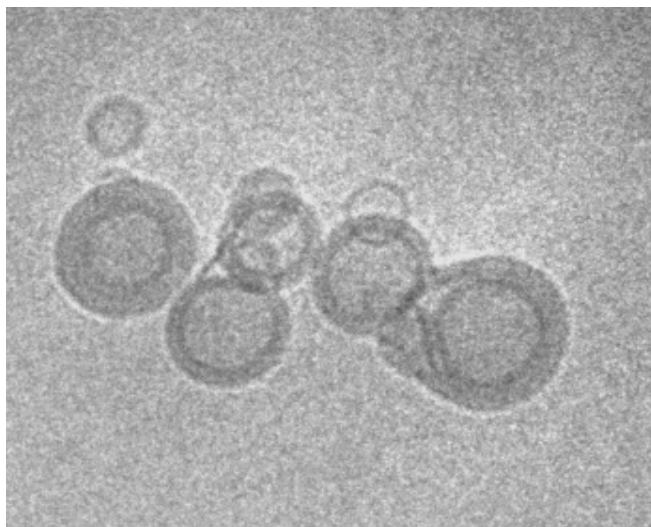


FIG. 33 ingrandimento di un' immagine cryo-Tem su NLC 20:1 con chitosano da 103 cP.

In FIG. 33 si nota chiaramente che più nanoparticelle sono collegate insieme da filamenti che partono dalla ricopertura.

Infine dall'immagine d) in FIG. 32 (zona più spessa del film rispetto alle altre immagini) si notano degli oggetti di dimensione maggiore rispetto a quella delle nanoparticelle riportate nelle altre immagini (vedi figura 6 capitolo 3); si nota anche la grande varietà di oggetti presenti in sospensione, tutto questo concorda con le misure di scattering dinamico.

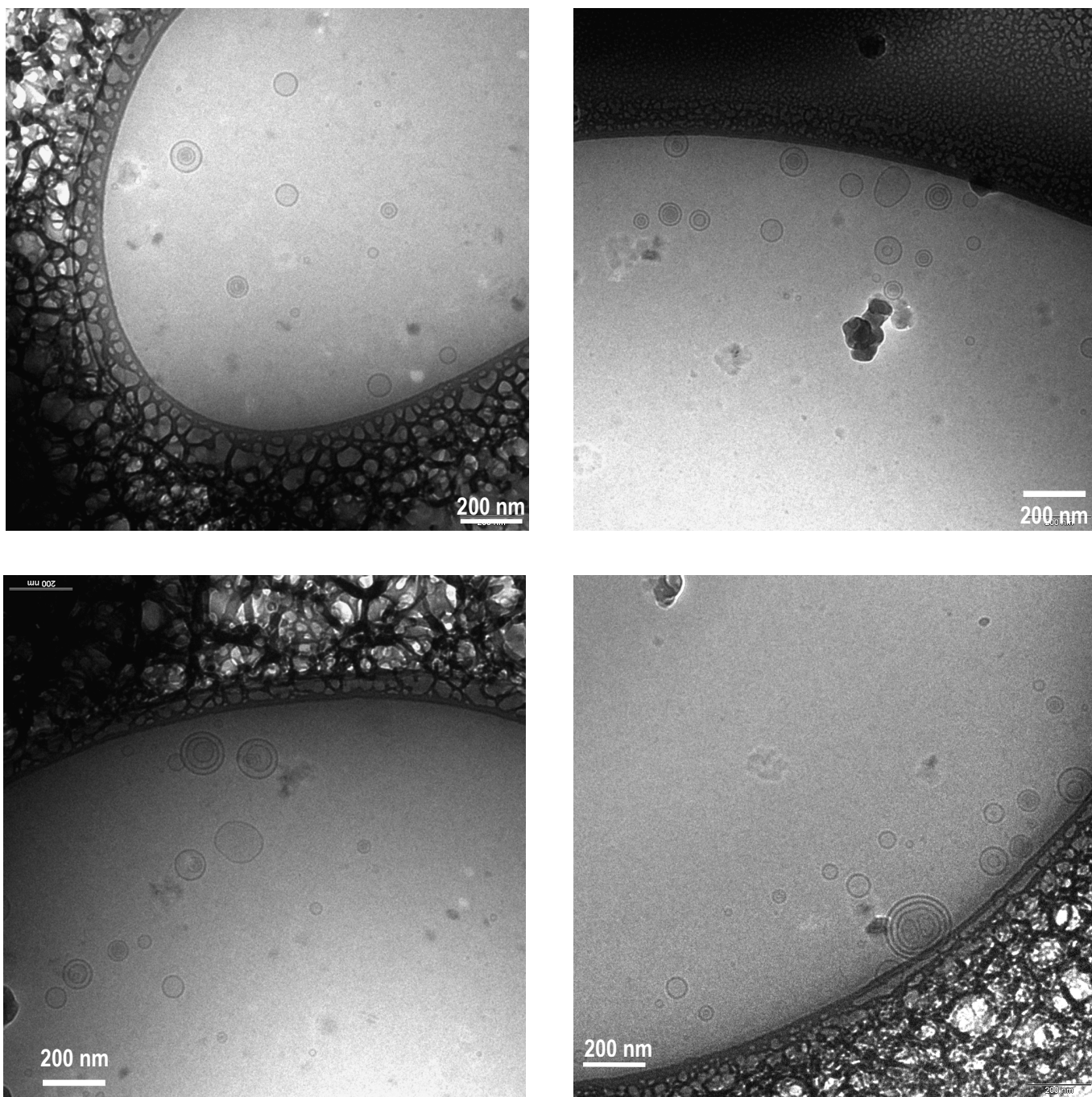


FIG. 34 Immagini cryo-Tem Nanoparticelle 20:1 con chitosano da 103cP e 60mg/100ml di TAM citrato (T60)

Si osserva immediatamente la presenza di oggetti di dimensione e morfologia differente: vi sono strutture semplici simili a liposomi e oggetti di morfologia più complessa che, sicuramente, sono composti da multilayer carichi, infatti i multilayer sono concentrici o comunque presentano sempre una precisa distanza caratteristica, segno di repulsione elettrostatica. I vari strati dei multilayer, contengono molecole con densità elettronica superiore a quella della lecitina, si nota, infatti, un buon contrasto sia con il solvente che con la lecitina presente nell'interno dei vettori; comunque, non è possibile discriminare se gli strati che si vedono contengono solamente TAM o chitosano, piuttosto che entrambi, in quanto la densità elettronica del TAM non è ancora stata calcolata.

Infine, contrariamente a quanto osservato nel caso delle nanoparticelle caricate con il progesterone, non si osservano aggregati di nanoparticelle; dalle misure di potenziale Z si è dedotto che nel caso delle nanoparticelle T60, una certa quantità di chitosano si dispone alla superficie dei vettori: infatti, nel caso delle nanoparticelle T60 si misura una carica superficiale superiore rispetto ai liposomi (quindi in assenza di chitosano) a parità di concentrazione di principio.

Da quanto ottenuto dalle misure di SAXS e dalle immagini di microscopia elettronica, si può concludere che il chitosano presente nelle nanoparticelle T60, non è sufficiente per organizzarsi in una struttura, probabilmente per questo motivo non si assiste alla connessione di più nanoparticelle osservata nel caso del progesterone, e che almeno in una certa porzione, va a disporsi sulla superficie delle nanoparticelle.

Nelle pagine seguenti vengono riportate due tabelle riassuntive dell'effetto dei vari componenti delle nanoparticelle sulle proprietà fisiche dei vettori.

	<i>Distribuzione delle dimensioni (Light scattering)</i>	<i>Carica superficiale (Potenziale ζ)</i>	<i>Variazioni struttura (SAXS)</i>
Introduzione del chitosano			
<i>Introduzione chitosano</i>	2 famiglie principali: 70nm (come i liposomi) 250-300nm	Dipende dal rapporto lec/chito	Evidenzia picco di struttura a 5.7 nm, strutture multilayer
<i>Variazione peso molecolare chitosano</i>	Fissato il rapporto lec/chito non varia	Fissato il rapporto lec/chito non varia	Cambia la forma non la tipologia del picco di struttura
<i>Variazione rapporto lecitina/chitosano</i>	Lec/chito 80:1 aumentano le dimensioni	Positiva fino a 30:1 (lec/chito) Negativa da 60:1 in poi	Cambia la forma non la tipologia del picco di struttura
Introduzione dell' IPM			
<i>Variazione peso molecolare chitosano</i>	Analizzato solo il caso 20:1 103cP, analogo al 20:1 in assenza di progesterone	Analizzato solo il caso 20:1 103 cP, analogo al 20:1 in assenza di progesterone	Picco su distanze maggiori che in assenza di IPM, non dipende dal peso molecolare del chitosano
<i>Variazione rapporto lecitina/chitosano</i>	Analizzato solo il caso 20:1 103cP, analogo al 20:1 in assenza di progesterone	Analizzato solo il caso 20:1 103 cP, analogo al 20:1 in assenza di progesterone	Picco su distanze maggiori che in assenza di IPM, dipende fortemente dal rapporto lec/chito
Introduzione del TAM in assenza del chitosano			
<i>Variazione concentrazione TAM</i>	Aumenta TAM, diminuiscono le dimensioni: 120mg/100ml flocculato	Analizzato solo il caso 60mg/100ml: +33mV	Saxs non varia: bilayer e accennato picco di struttura a 5.7 nm
Introduzione del TAM in presenza del chitosano (20:1, 103cP)			
<i>Variazione concentrazione di TAM</i>	Aumenta TAM, diminuiscono le dimensioni: 120mg/100ml è stabile	+40mV, costante all'aumentare del TAM	Picco di struttura evidente per 10mg/100ml(si organizza il chito) meno evidente all'aumentare del TAM.

Tabella 7 riassunto delle proprietà fisiche delle varie tipologie di vettori analizzati, al variare della loro composizione.

E' da sottolineare che in presenza del TAM, le analisi dimensionali sono state condotte solo nel caso in cui il rapporto lecitina/chitosano era pari a 20:1; nelle misure SAXS si è variato sia la

quantità che il peso molecolare del chitosano senza notare cambiamenti significativi, pertanto nel riassunto viene riportato solo il caso del rapporto 20:1.

Un altro aspetto importante riguarda le nanoparticelle caricate con il progesterone: per motivi prettamente sperimentali, non si è potuto svolgere le misure di light scattering e di SAXS, immediatamente dopo la preparazione dei campioni, ma solo dopo 4-5 giorni. I campioni contenenti progesterone in presenza e in assenza di IPM, presentavano un deposito, probabilmente contenente anche il principio attivo; pertanto le analisi strutturali e dimensionali non sono state considerate determinanti dal punto di vista dell'interazione del principio attivo con le nanoparticelle e saranno da ripetere nelle condizioni sperimentali ottimali, ovvero immediatamente dopo la produzione delle nanoparticelle.

4.5 Sistemi modello: miscele controllate di lipidi puri

E' stato avviato uno studio utilizzando miscele controllate di lipidi puri, per poter comprendere su sistemi più semplici, i meccanismi di interazione tra i principi attivi e i componenti dei vettori.

Inizialmente, sono state eseguite varie prove con differenti miscele controllate di lipidi per mettere a punto la composizione migliore.

Per simulare la totalità della carica superficiale dei liposomi di lecitina, si è scelto di utilizzare un'unica molecola con una carica netta negativa, la DMPS (dimiristoilfosfatidilserina), e procedere alla formazione dei vettori mediante la tecnica a spruzzo, realizzata su quantità scalate di un decimo rispetto quelle messe a punto nel protocollo di realizzazione, di utilizzare un'iniezione della soluzione alcoolica di lecitina mediante pipetta Gilson e un semplice agitatore magnetico invece dell'Ultraturrax; quanto mostrato nei paragrafi .1.2 e .2.1 valida questa procedura.

La prima parte dell'analisi è svolta su vettori in assenza di chitosano, chiamati per analogia con quanto analizzato fin'ora, liposomi; le analisi su vettori realizzati anche con il chitosano, sono in fase preliminare.

In seguito, sono stati realizzati vettori composti da miscele controllate ma prodotti mediante estrusione su filtri di policarbonato, per eliminare la variabile della polidispersità dimensionale.

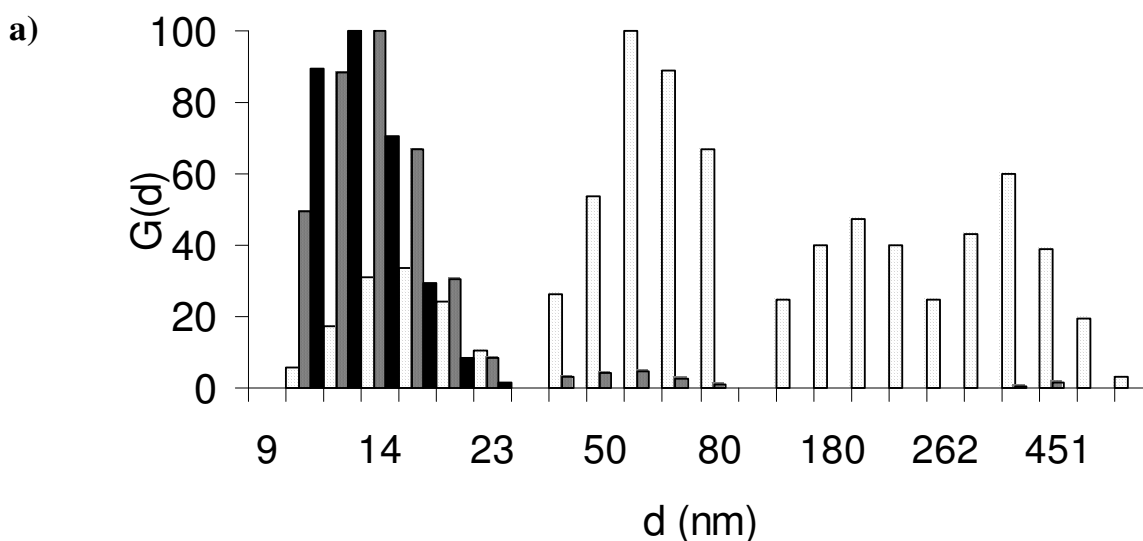
4.5.1 Analisi dimensionale

4.5.1.1 Liposomi (tecnica a spruzzo)

Il protocollo utilizzato in questa fase è analogo a quello utilizzato per la preparazione dei liposomi di lecitina di soia: in etanolo si è sciolta una quantità di lipidi pari a 25mg/ml; dalla composizione

della lecitina di soia dell'Avanti Lipids si è determinato che la quantità di lipide carico necessaria a simulare la carica della lecitina di soia è il 2% in peso del lipide neutro utilizzato per creare la matrice della membrana fosfolipidica.

Una volta spruzzata la soluzione etanolica di lipidi si è proceduto all'analisi dimensionale dei liposomi costituiti da POPC/DMPS, DMPC/DMPS (POPC, palmitolioleoilfosfatidilcolina e DMPC, dimiristoilfosfatidilcolina, fosfolipidi zwitterionici) prodotti con un'iniezione veloce e DMPC/DMPS prodotti con un'iniezione lenta, mediante pipetta Gilson.



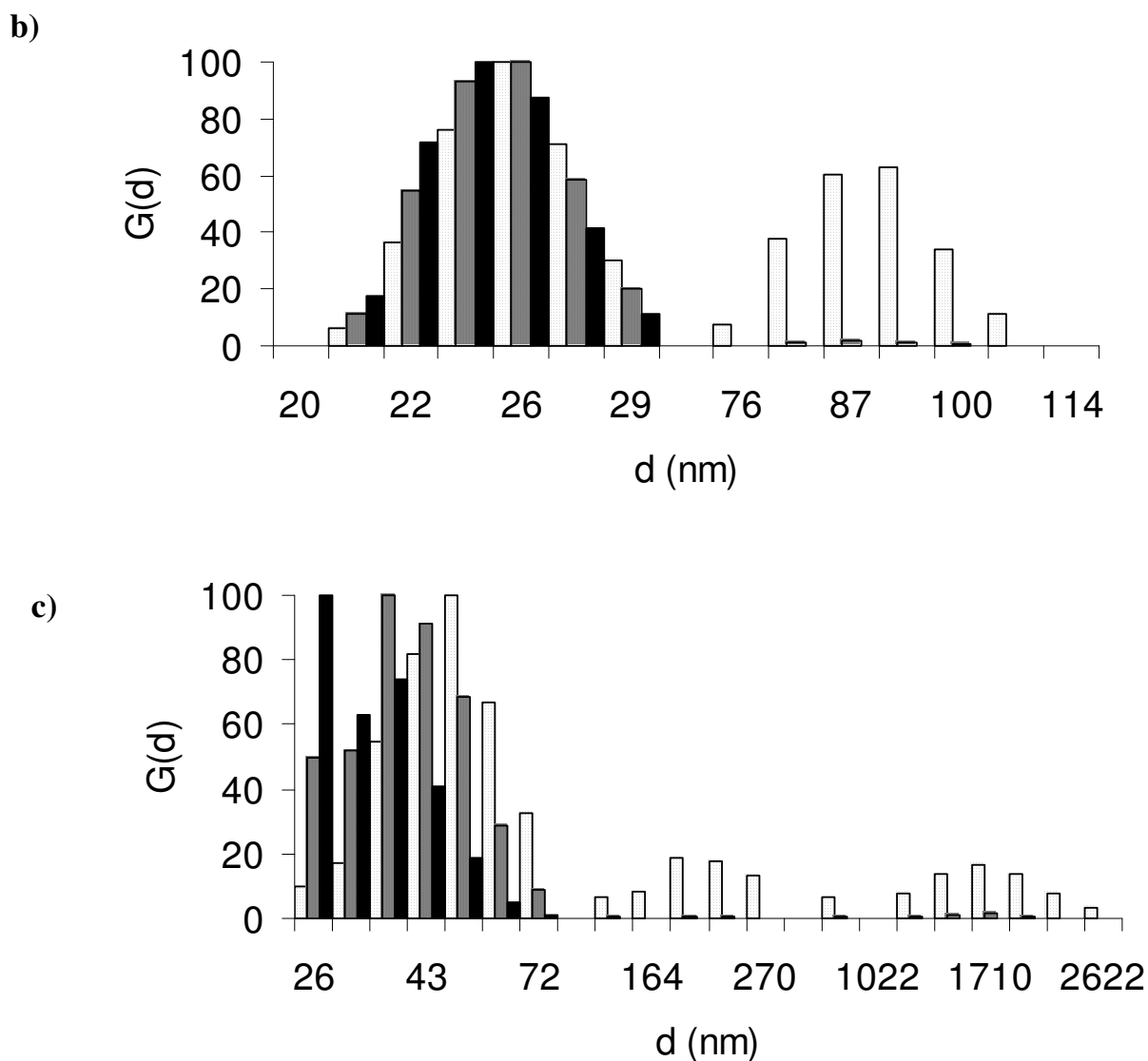


FIG. 35 Distribuzione delle dimensioni acquisite a 90° , pesate in intensità (bianco), in volume (grigio) e in numero (nero), riportate come percentuale relativa. a) POPC/DMPS, b) DMPC/DMPS iniezione veloce, c) DMPC/DMPS iniezione lenta.

Si osserva che i diametri dei liposomi di DMPC/DMPS veloci, sono distribuiti su dimensioni simili a quelle dei liposomi di lecitina di soia, nel caso dei liposomi DMPC/DMPS lenti la famiglia più piccola non è risolta da quella che fornisce le dimensioni tipiche dei liposomi nei cumulant (70-80nm), inoltre, sia nel caso dei liposomi di POPC/DMPS e DMPC/DMPS lenti, vengono risolti dei componenti su grandi dimensioni: si ha, quindi, una notevole polidispersità sia all'interno del singolo campione, sia tra un campione e l'altro.

4.5.1.2 Nanoparticelle (tecnica a spruzzo)

Per ora, come anche i liposomi ricoperti, sono state realizzate solo nel caso delle miscela POPC/DMPS e in modo tale da avere rapporto in peso lipidi/chitosano pari a 20:1.

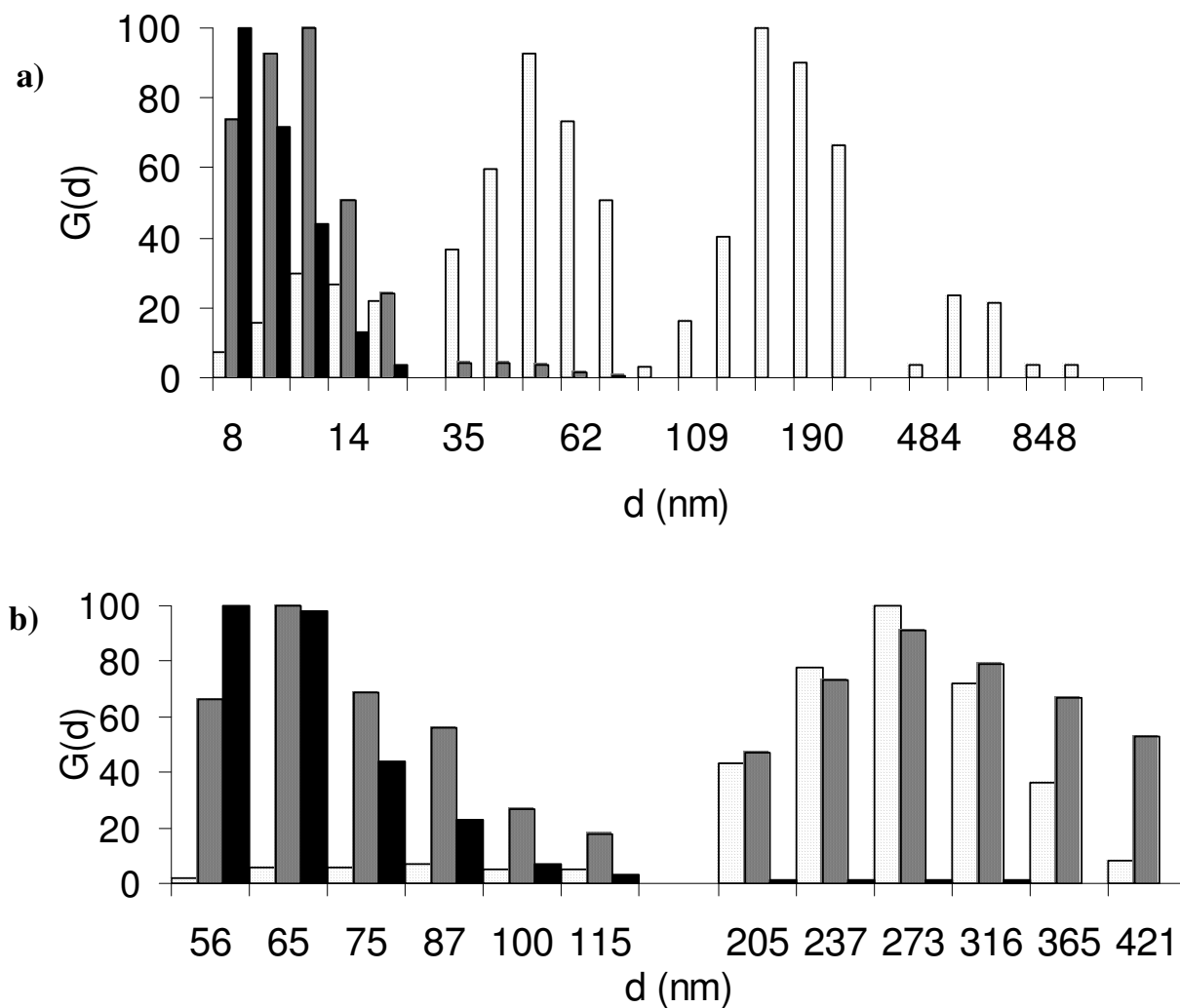


FIG. 36 Distribuzione delle dimensioni acquisite a 90°, pesate in intensità (bianco), in volume (grigio) e in numero (nero), riportate come percentuale relativa. a) nanoparticelle di POPC/DMPS 20:1, b) nanoparticelle lecitina e chitosano 20:1 (vedi FIG.10 Grafico a)).

Le diverse famiglie che si distinguono, sono centrate su valori analoghi a quelli delle famiglie trovate nell'analisi dimensionale dei liposomi di POPC/DMPS, mentre la distribuzione delle dimensioni è abbastanza differente da quella relativa alle nanoparticelle (FIG. 36 grafici a) e b)), soprattutto nella distribuzione pesata in volume.

4.5.1.3 Liposomi DMPC/DMPS (tecnica dell'estrusione)

Le miscele analizzate al light scattering, sono state preparate sempre con il 2% in peso di DMPS rispetto alla DMPC. La concentrazione della preparazione è dello 0.4%, più concentrata rispetto alle sospensioni di nanoparticelle: questo accorgimento è stato adottato per avere un maggiore segnale nelle misure di DSC, svolte sui medesimi campioni osservati (opportunamente diluiti) al light scattering.

Le diluizioni per ottenere soluzioni sufficientemente limpide per il light scattering, sono state fatte con acqua e 0.01% di HCl (in modo da avere lo stesso pH delle preparazioni delle nanoparticelle), e con acqua distillata.

Le misure sono state svolte alla temperatura di 40°C, sopra la temperatura di transizione di entrambi i lipidi: 35°C per la DMPS e 23°C per la DMPC (LIPIDAT).

Per i campioni diluiti con acqua e HCl sono state provate due diluizioni: non si è notata alcuna dipendenza delle dimensioni dalla concentrazione della soluzione. Si nota una dipendenza temporale delle dimensioni, sulla scala dei 10 minuti le dimensioni delle vescicole diminuiscono passando da un diametro di circa 133nm ad un valor medio di 90nm; questo fenomeno può essere dovuto al fatto che, intorno a pH 4 (quello della sospensione), la serina, il gruppo portatore di carica negativa nella DMPS, ha un punto isoelettrico. Sicuramente questo fatto presenta un problema, dato che il chitosano finora in uso necessita di pH acido per sciogliersi.

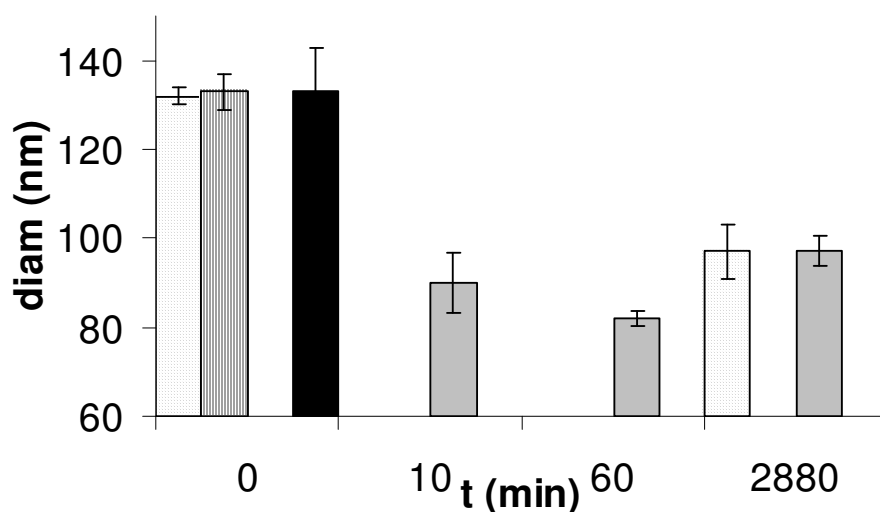


FIG. 37. Misura a 90° con laser 677nm, T=40°C diluizioni effettuate con acqua e 0.01% HCl. La scala dei tempi parte dall'istante della prima misura (t=0), pochi minuti dopo la diluizione.

Le dimensioni dei liposomi ottenuti con la lecitina di soia, secondo il protocollo di realizzazione delle nanoparticelle, presentano un diametro intorno agli 86nm ma con una polidispersità decisamente più alta (circa 35%) di quella delle preparazioni di vescicole “controllate” viste finora.

Le preparazioni diluite solamente con acqua distillata mostrano un diametro leggermente maggiore di quello osservato quando si è operata la diluizione con acqua acidificata.

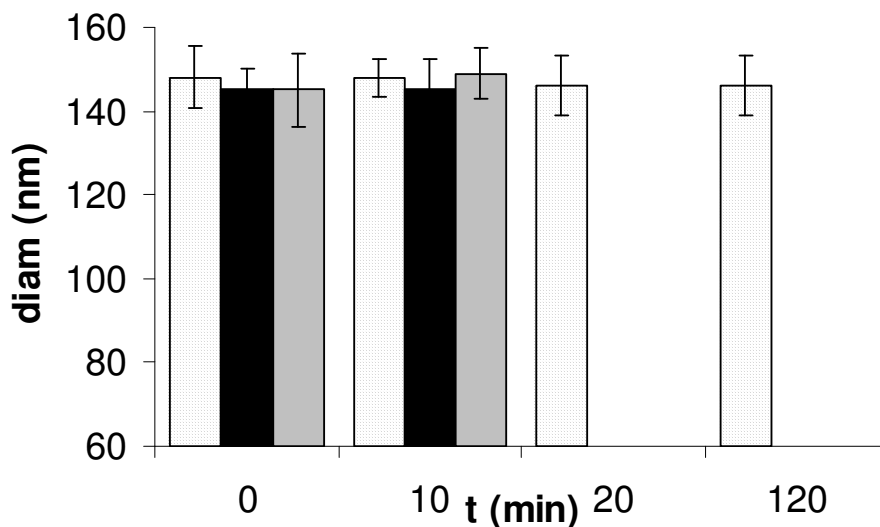


FIG. 38 Misura a 90° con laser 677nm, $T=40^{\circ}\text{C}$ diluizioni effettuate con **acqua**. La scala dei tempi parte dall'istante della prima misura ($t=0$), pochi minuti dopo la diluizione. Nei vari colori sono riportati diversi lotti a confronto.

L'altra evidente diversità, rispetto al campione diluito con acqua acidificata, riguarda la stabilità delle dimensioni nel tempo: diluendo solamente con acqua distillata non si osserva alcuna modifica delle dimensioni, già visibile nell'altro caso dopo 10 minuti di misura.

È stato studiato un solo caso in cui viene aggiunto il chitosano ad una preparazione di vescicole di DMPC/DMPS diluita solamente con acqua (si è utilizzata la preparazione più stabile):

<u>solo lipidi</u>	<u>lipidi e chitosano</u>
146 ± 6 nm (stabile nel tempo)	140 ± 7 nm
	133 ± 6 nm (dopo 10 min)
	135 ± 6 nm (dopo 1 ora)

Dopo una prima analisi delle miscele controllate di lipidi, si è concluso che la composizione più interessante è quella costituita da DMPC/DMPS: infatti la POPC, possiede una temperatura di fusione molto differente dalla DMPS (intorno agli 0°C, mentre la temperatura di fusione della DMPS è intorno ai 30°C (LIPIDAT): questo fatto potrebbe portare ad una segregazione della DMPS o si potrebbe ottenere un picco di transizione della miscela molto allargato o addirittura sdoppiato (volendo osservare se il rilascio del farmaco modifichi la forma del picco di transizione, queste non sono situazioni facilitanti).

La POPC ad ora disponibile in laboratorio, inoltre, non ha una purezza controllata; inizialmente questo è stato il motivo per cui la si è scelta, per simulare meglio la miscela non controllata della lecitina di soia, in seguito si è deciso di proseguire lo studio su sistemi più controllati.

4.5.2 Potenziale ζ - determinazione della carica superficiale

Sono state eseguite delle misure di carica superficiale sulle tre tipologie di vettori realizzate con la miscela POPC/DMPS: in ogni miscela l'unico componente carico è la DMPS, si è voluto se la quantità di lipide carico portasse una carica superficiale analoga a quella trovata con la lecitina di soia.

- **Liposomi:** carica superficiale intorno ai -40mV
- **Nanoparticelle:** carica superficiale intorno ai + 43mV
- **Liposomi ricoperti:** carica superficiale intorno ai 40mV

I valori di carica superficiale concordano bene con quelli ottenuti nelle preparazioni contenenti la lecitina di soia, si è dedotto che la quantità di lipide carico è adatta a simulare la carica della lecitina di soia.

4.5.3 SAXS (Small Angle X-ray Scattering)

Misure di spettroscopia X sono state svolte anche su campioni composti da miscele controllate, preparati sia in acqua che in acqua e HCl (0.01%), al fine di indagare la struttura dei vettori e confrontarla con quella delle nanoparticelle prodotte secondo il protocollo messo a punto.

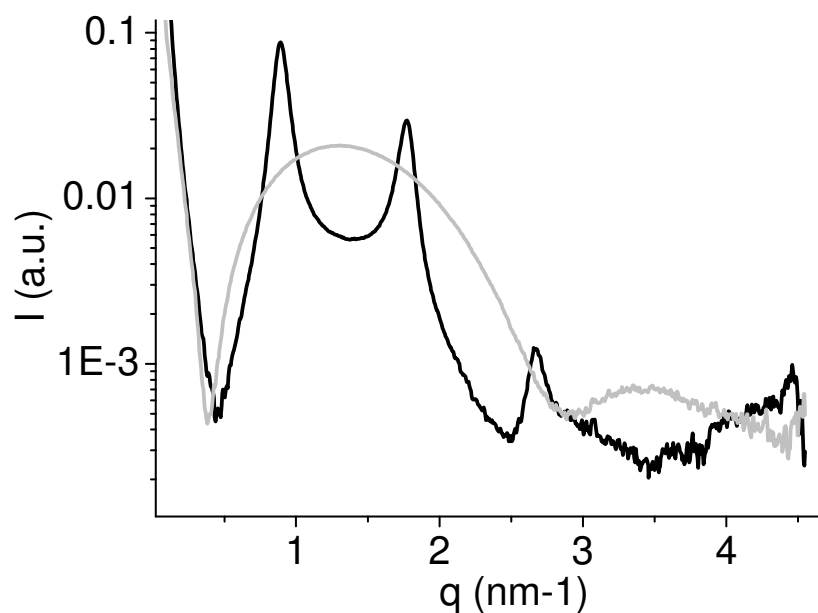


FIG. 39 Liposomi di DMPC/DMPS (2% b.w.) estrusi su 100 nm, preparati in acqua (grigio) e in acqua e HCl 0.01% (nero).

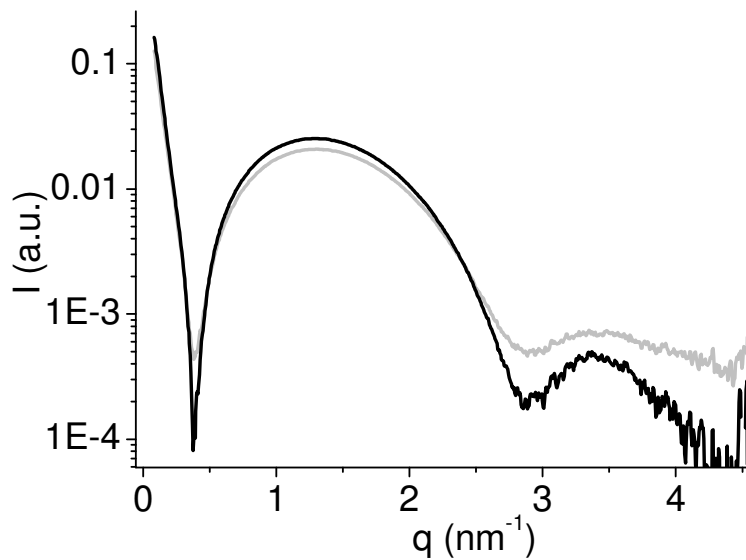


FIG. 40 Liposomi di DMPC/DMPS (2% grigio e 4% b.w in nero di DMPS/DMPC) preparati in acqua distillata.

Gli spettri mostrati in FIG. 39 sono relativi a campioni preparati sia in acqua che in acqua acidificata per osservare il corrispettivo ai raggi X delle differenze osservate al light scattering sulla stabilità dimensionale. . Si nota immediatamente come il campione DMPC/DMPS 2% prpreparato in

acqua distillata (FIG.39) mostri l'andamento tipico del fattore di forma del bilyer, senza nessun tipo di struttura; in nero (FIG.39) si osserva lo spettro di un campione di medesima composizione ma preparato in acqua e 0.01% HCl: sono evidenti i picchi di struttura. La distanza caratteristica associata è di 7 nm, la ripetizione è di tipo 1:2:3, tipica della struttura multilayer; si può concludere che la carica della serina, annullata a pH acido, è assolutamente determinante nella struttura dei liposomi.

Si è studiato il caso in cui la proporzione tra DMPS e DMPC fosse pari al 4% b.w. (di DMPS rispetto alla DMPC)(FIG. 40)), per evidenziare l'effetto della carica sulla struttura del vettore: si nota che l'andamento dello spettro nel caso del 4% di DMPS è molto simile a quello con il 2% di lipide carico, diventano più accentuati i minimi, segno di minore polidispersità nella forma, ma la loro posizione resta invariata.

Andando a confrontare gli spettri relativi alle vescicole composte da DMPC e DMPS con quello dei liposomi di lecitina di soia (per evidenziare differenze e similitudini si è riportato il grafico in scala lineare e non semilogaritmica), si notano dei profili decisamente simili (è da sottolineare che la misura sui liposomi di lecitina di soia è stata fatta successivamente e su una scala di q leggermente differente):

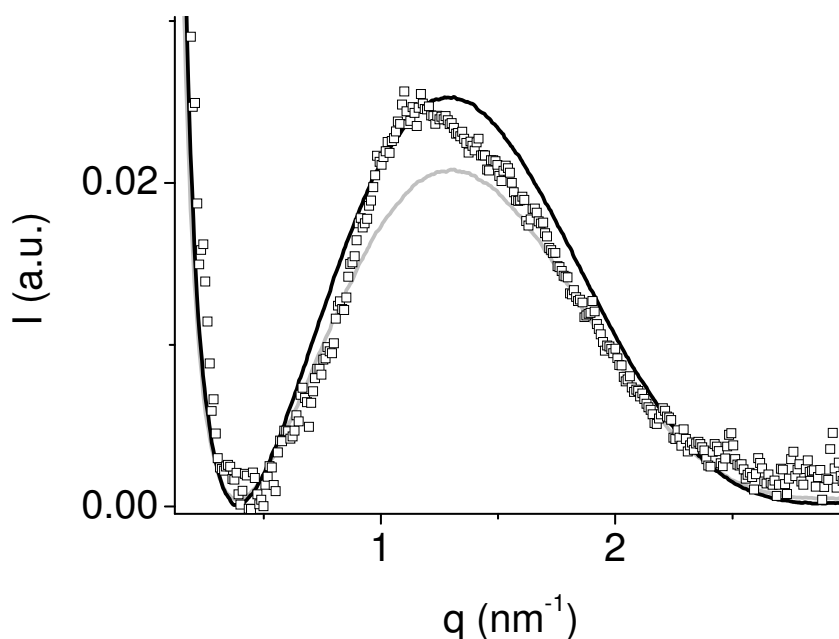


FIG. 41 spettri RX relativi a liposomi di DMPC/DMPS 2% (grigio) e 4% (nero) estrusi su 100nm e liposomi di lecitina di soia ottenuti mediante l'usuale protocollo di produzione.

Si nota, come già osservato in precedenza, che lo spettro relativo ai liposomi di lecitina di soia, presenta un picco di struttura, la cui distanza caratteristica è pari a 5.7 nm circa, non presente nello spettro relativo ai liposomi composti da miscele controllate.

In seguito alle misure di scattering (SAXS e light scattering) e di potenziale ζ , si deduce che la preparazione che meglio simula i liposomi di lecitina di soia è quella di DMPC e DMPS 2% (da misure al potenziale Z si è ricavato che il 2% di lipide carico simula esattamente la carica della lecitina). Preparati in acqua distillata; i campioni realizzati in partenza in acqua e HCl, infatti, presentano una struttura molto lontana da quella dei liposomi di lecitina di soia.

I campioni per i raggi X a cui è stato aggiunto il chitosano, nel tempo del viaggio al sincrotrone, hanno separato formando un gel: non è stato possibile eseguire misure su questi campioni, sicuramente si rende necessario poter svolgere delle misure utilizzando un chitosano che non necessita di pH acido per disciogliersi (chitosano trimetilato) (misure già in programma) o un lipide con un punto isoelettrico lontano dal pH della preparazione.

4.5.4 DSC (Differential Scanning Calorimetry)

Per poter, innanzitutto, determinare la temperatura di transizione della miscela DMPC/DMPS ottenuta mediante la tecnica a spruzzo, si è operata una DSC alla velocità di 3°C/min da 10° a 50°C. La miscela in studio è sembrata quella più interessante soprattutto perché le temperature di melting delle DMPC e della DMPS, oltre ad essere simili tra loro, sono anche vicino alla temperatura ambiente e questo assicura di essere nelle condizioni di operabilità del calorimetro in dotazione. Misure di DSC sono state operate sia su campioni realizzati mediante tecnica a spruzzo, sia mediante estrusione.

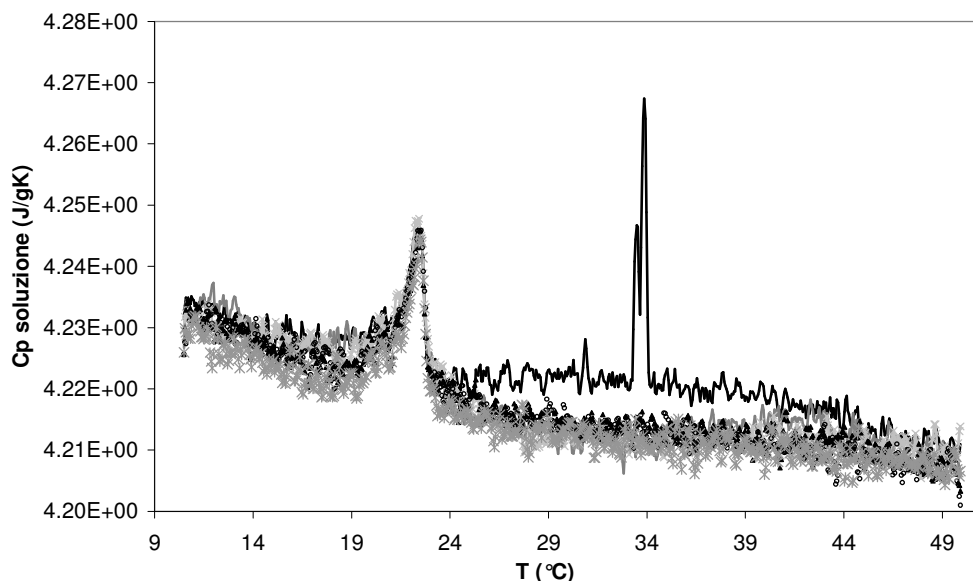


FIG. 42 scansioni DSC su liposomi DMPC/DMPS 2% ottenuti mediante iniezione a spruzzo lenta. Le misure sono state ottenuti aumentando la temperatura da 10° a 50°C.

Si osserva un unico picco di transizione con larghezza di circa 2°C, segno di mixing dei due lipidi; come ipotizzato il picco si trova vicino alla temperatura ambiente, intorno ai 22°C, per entrambe le velocità di iniezione. La prima scansione (FIG.42 in nero), mostra anche un picco intorno ai 34°C, probabilmente è un picco relativo all'energia di mixing delle due tipologie di lipide, la quale viene assorbita durante la prima scansione di DSC. Le scansioni realizzate su campioni ottenuti mediante iniezione veloce, non mostrano differenze rispetto quanto osservato in FIG. 42:

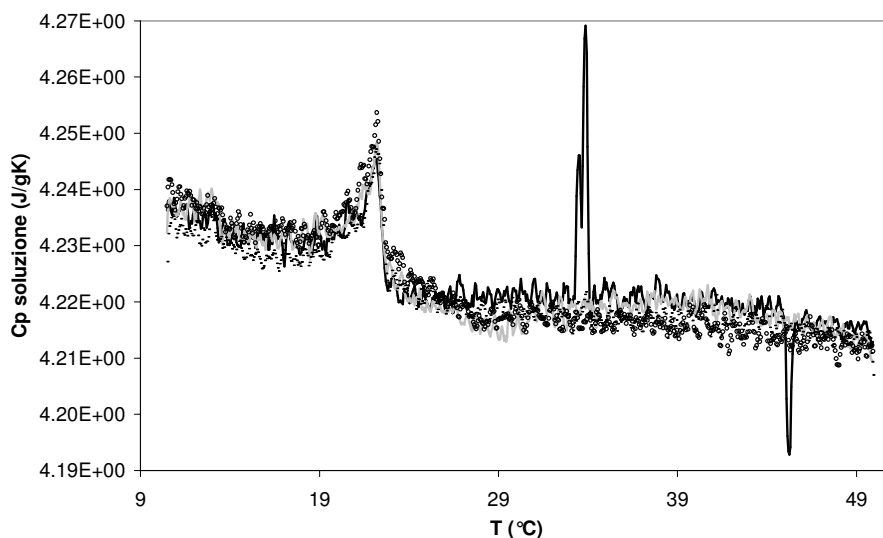


FIG. 42 Scansioni DSC su liposomi DMPC/DMPS 2% ottenuti mediante iniezione a spruzzo veloce. Le misure sono state ottenuti aumentando la temperatura da 10° a 50°C.

Le misure di calorimetria su campioni ottenuti mediante estrusione, sono state utili per determinare il grado di mixing dei due lipidi: in caso di segregazione dei lipidi, infatti, si sarebbero notati due distinti picchi di transizione di fase, a 23°C circa per la DMPC e a 35° circa per la DMPS. I risultati mostrano un unico picco di transizione.

Le misure sono state svolte alla velocità di 3°C/min, tra una rampa “in salita” (aumentando la temperatura) e una “in discesa” (diminuendo la temperatura) sono state fatte delle isoterme da 20min. L’intervallo di temperatura indagato va da 10°C a 60°C, assicurando quindi sia il raggiungimento della fase liquida, sia della fase gel dei lipidi.

I campioni analizzati sono stati preparati non estrusi, estrusi su 100nm, ed estrusi su 200nm, in ambiente acquoso non acidificato.

Dopo un primo set di misure si è riscontrata la necessità di un processo di annealing per ottenere un buon mescolamento dei lipidi: si notavano, infatti picchi endotermici a temperature diverse da quelle di transizione dei lipidi, probabilmente picchi di mixing. I campioni sono, allora, stati incubati per 7 ore a 60°C già all’interno del calorimetro; dopo questa procedura il picco di transizione di fase del sistema si è spostato leggermente rispetto a quello ottenuto prima del processo di annealing e i picchi di mixing sono scomparsi.

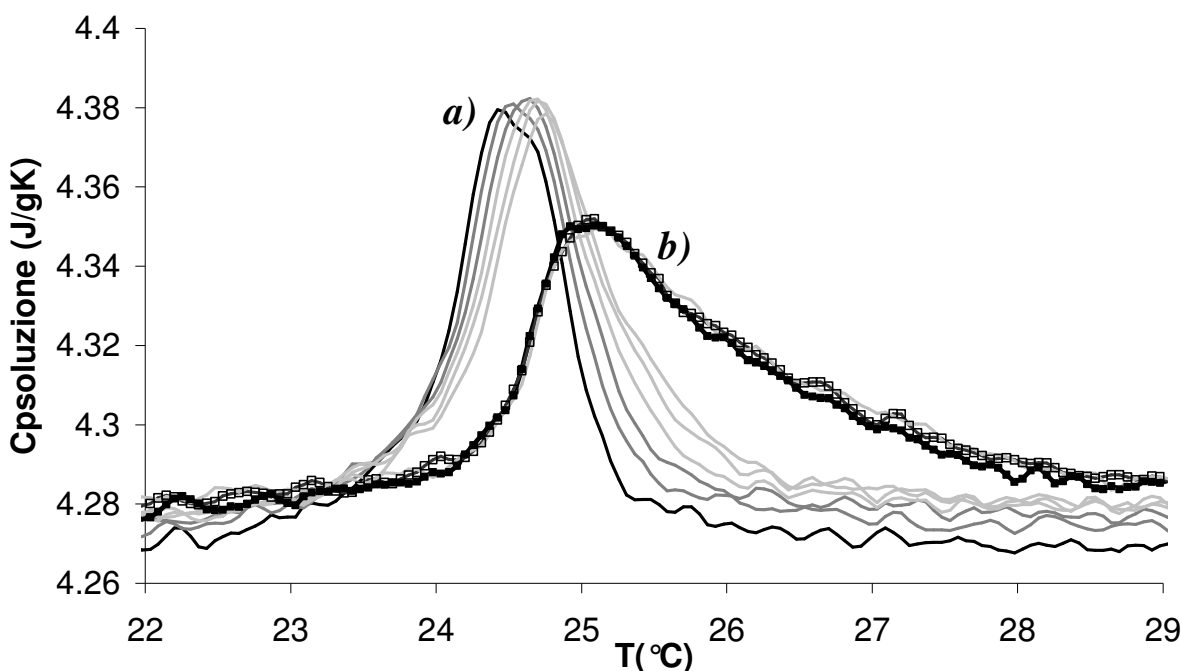


FIG. 43 Liposomi di DMPC/DMPS estrusi su 200 nm prima (a) e dopo b)l’annealing: si nota che dopo il processo di annealing il picco di transizione non trasla più a scansioni successive, inoltre si trova a temperature più alte.

A seguito a questa fase iniziale di determinazione di sistemi modello semplificati per le nanoparticelle, si è concluso che la proporzione tra lipide carico e neutro che ben simula la carica della lecitina è pari a 2% . la miscele testate, nonostante abbiamo mostrato un buon accordo per dimensioni e struttura rispetto ai liposomi di lecitina, non sono adatte per il tipo di chitosano utilizzato. Sono già in programma misure su nuove miscele ottenute con lipidi carichi che non presentano un punto isoelettrico al pH della preparazione, e l'utilizzo di un chitosano trimetilato, che non necessita di un Ph acido per disperdersi in solvente acquoso.