



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

SCIENZE MORFOLOGICHE

Ciclo XXIV

CARATTERIZZAZIONE DIMENSIONALE E MORFOLOGICA DI
NANOPARTICELLE LIPIDICHE CONTENENTI MOLECOLE
FARMACOLOGICAMENTE
ATTIVE

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza
BIO/16

Presentata da:	Manca Marianna
Coordinatore Dottorato	Sogos Valeria
Tutor/Relatore	Loy Francesco, Baroli Biancamaria

Esame finale anno accademico 2010 – 2011

Alla mia famiglia

RINGRAZIAMENTI

I miei ringraziamenti vanno a mio marito e alla mia famiglia, che in questi anni mi hanno sostenuta e sopportata.

Un ringraziamento particolare va alla Dr.ssa Biancamaria Baroli per avermi dato la possibilità di svolgere un dottorato nei suoi laboratori, per la sua pazienza e i suoi insegnamenti. Ringrazio tanto il Prof. A. Riva, grazie al quale ho potuto iniziare il dottorato, la Prof.ssa M. C. Blanco Varela, e i Prof. C. Vasquez Vasquez e A. Lopez Quintela, per avermi dato la possibilità di trascorrere una bellissima esperienza a Santiago de Compostela.

Infine, ma non per questo meno importanti, vorrei ringraziare di cuore le dottorande, e amiche, Antonella e Carla, per tutto il loro aiuto, e Carla S. che mi ha aiutato durante il primo periodo di dottorato.

INDICE

1	INTRODUZIONE	1
1.1.	Note bibliografiche	2
2	SISTEMI NANOPARTICELLARI	3
2.1.	Le dispersioni particellari	4
2.1.1.	I liposomi	5
2.1.2.	I niosomi	5
2.1.3.	Gli etosomi	6
2.1.4.	I transfersomi	6
2.1.5.	SLN ed NLC	6
2.1.6.	Le micro- e le nanoparticelle polimeriche	7
2.2.	Metodiche di analisi delle nanoparticelle	7
2.2.1.	Il microscopio elettronico a trasmissione	8
2.2.2.	Il cryo-TEM	10
2.2.3.	Il dynamic lighth scattering	10
2.2.4.	Lo spettrofotometro	13
2.3.	Note bibliografiche	14
3	MATERIALI E METODI	16
3.1.	Materiali	16
3.2.	Strumenti	17
3.3.	Preparazione delle nano particelle lipidiche	17
3.3.1.	NC e NE Ibu	19
3.3.2.	NC e NE Ibu Na	20
3.3.3.	NC e NE Pacli	22
3.3.4.	NC e NE RA	23
3.3.5.	NC e NE AZL 38	23
3.3.6.	NC e NE AZL 6	24
3.3.7.	NC e NE NBD	25

3.3.8.	NC e NE FITC	26
3.4.	Purificazione delle NP	27
3.5.	Caratterizzazione delle NP al DLS	28
3.6.	Caratterizzazione delle NP al TEM	29
3.7.	Caratterizzazione delle NP al Cryo-TEM	29
3.8.	Quantificazione spettrofotometrica delle molecole attive	29
3.9.	Percentuale di incapsulazione	30
3.10.	Analisi dei dati	30
4	PRESENTAZIONE E DISCUSSIONE DEI RISULTATI	31
4.1.	Preparazione delle nanoparticelle lipidiche	31
4.2	Caratterizzazione delle NP al DLS: dimensioni e carica superficiale	32
4.2.1.	NC e NE Ibu	32
4.2.2.	NC e NE Ibu Na	45
4.2.3.	NC e NE Ibu Na – comparazione tra concentrazioni differenti	58
4.2.4.	NC e NE Pacli	75
4.2.5.	NC e NE RA	82
4.2.6.	NC e NE AZL 38	95
4.2.7.	NC e NE AZL 6	115
4.2.8.	NC e NE NBD	133
4.2.9.	Analisi generale del dimensionamento al DLS	140
4.3.	Caratterizzazione delle NP al TEM: dimensioni e morfologia	151
4.3.1.	NC e NE Ibu	151
4.3.2.	NC e NE Ibu – dimensioni a confronto	153
4.3.3.	NC e NE Ibu Na	154
4.3.4.	NC e NE Ibu Na – dimensioni a confronto	156
4.3.5.	NC e NE RA	157
4.3.6.	NC e NE RA – dimensioni a confronto	159
4.3.7.	NC e NE AZL 38	161
4.3.8.	NC e NE AZL 38 – dimensioni a confronto	163
4.3.9.	NC e NE AZL 6	164
4.3.10.	NC e NE AZL 6 – dimensioni a confronto	165
4.4.	Caratterizzazione delle NP al Cryo-TEM: dimensioni e	167

morfologia	
4.5. Quantificazione spettrofotometrica delle molecole attive	171
4.5.1. Ibu	171
4.5.2. Ibu Na	172
4.5.3. RA	174
4.5.4. AZL 38	175
4.5.5. AZL 6	176
4.6. Percentuale di incapsulazione	178
5 CONCLUSIONI	182

INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni le nanoparticelle, grazie alle loro proprietà e possibili applicazioni, hanno assunto un'importanza sempre maggiore in campo medico [1]. La branca della medicina che si occupa di studiare ed utilizzare queste nanoparticelle, ad esempio per veicolare molecole farmacologicamente attive all'interno dell'organismo umano, è la nanomedicina [2]. Le nanoparticelle, in merito alle loro ridotte dimensioni, dovrebbero essere in grado di superare o attraversare le diverse barriere anatomiche, quali, per esempio, la barriera emato-encefalica, l'apparato respiratorio e le tight junctions epiteliali della cute [3]. Inoltre, tra i loro possibili utilizzi è di rilevante importanza la veicolazione direzionata, anche conosciuta con il nome di "targeting", di diverse molecole in particolari distretti dell'organismo umano, evitando pertanto l'accumulo o l'interazione con organi/distretti che non necessitano il trattamento farmacologico. Pertanto, risulta di fondamentale importanza studiare e analizzare le nanoparticelle da due punti di vista, quello dimensionale e quello morfologico. In questo modo è possibile comprendere al meglio le interazioni che potrebbero crearsi tra le nanoparticelle e le barriere anatomiche o gli organi e le cellule bersaglio [4] durante un loro utilizzo in vivo. Infatti, lo scopo di questa tesi di dottorato è lo studio delle caratteristiche dimensionali e morfologiche di due particolari tipi di nanoparticelle lipidiche contenenti, diverse molecole dotate di attività farmacologica. Per quanto riguarda la caratterizzazione dimensionale, questa è stata fatta utilizzando tre diverse strumentazioni, il microscopio elettronico a trasmissione (TEM), il cryo-TEM, ed il dynamic light scattering (DLS). Tutti e tre questi strumenti misurano il diametro delle nanoparticelle ma in modo differente, e pertanto forniscono informazioni diverse. Ampio spazio verrà dedicato alla discussione dei dati, e di come questi si possono

interpretare anche in funzione del fatto che le nanoparticelle lipidiche studiate non hanno una struttura solida.

1.1. Note bibliografiche

- [1] Sito web a cura di Nature Publishing Group,
<<http://www.nature.com/nnano/journal/v3/n1/full/nnano.2007.433.html>
030212>, (03 Febbraio 2012).
- [2] Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C. 2005. Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB Journal*. Review. 19, 311-330.
- [3] Scatturin A.. Nanoparticles as drug delivery systems for peptides and protein, documento preparato per la Scuola Nazionale Dottorale in Tecniche Farmaceutiche, Cagliari, 7-9 Settembre 2009.
- [4] Torchilin V.P.. Multifunctional nanocarriers. 2006. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 58:1532–1555.

SISTEMI NANOPARTICELLARI

La ricerca sul trasporto e sul targeting di agenti terapeutici e diagnostici basati su sistemi nanoparticellari sta riscuotendo un interesse sempre maggiore tra gli studiosi [1]. In campo tecnologico vengono utilizzate diversi tipi di nanoparticelle, che possono essere suddivise, in base alla loro composizione, in: inorganiche, lipidiche e polimeriche. Le nanoparticelle inorganiche sono costituite da materiali non biodegradabili, e tra queste ci sono per esempio le nanoparticelle d'oro, che comunque non sembrano essere tossiche per le cellule [2]. Le nanoparticelle lipidiche sono costituite da lipidi, sono biodegradabili, e possono quindi essere utilizzate all'interno dell'organismo umano con un grande margine di sicurezza. Le nanoparticelle polimeriche sono costituite da polimeri, e, a seconda del polimero utilizzato, possono essere o meno biodegradabili [3]. Le nanoparticelle hanno dimensioni nell'ordine dei nanometri, alcune di esse hanno un diametro inferiore ai 100 nm, mentre altre superano questo diametro [4]. Questa soglia dei 100 nm è quella al di sotto della quale le proprietà nanotecnologiche della materia iniziano a manifestarsi. Grazie alle ridotte dimensioni i carrier nanoparticellari potrebbero essere in grado di superare le barriere anatomiche quali la barriera emato-encefalica, l'apparato respiratorio e le tight junctions epiteliali della cute [5-6]. Nei nostri esperimenti sono state utilizzate nanoparticelle lipidiche, nello specifico nanocapsule e nanoemulsioni.

L'utilizzo di questi carrier nanoparticellari presenta numerosi vantaggi rispetto alle formulazioni convenzionali [6]. Le formulazioni basate su sistemi nanoparticellari possono essere in grado di aumentare la biodisponibilità del farmaco, controllarne il rilascio nel tempo, e veicolarlo in modo più mirato al sito bersaglio [7].

L'utilizzo di forme di dosaggio convenzionali comporta diversi problemi, come la veicolazione non direzionata del farmaco verso l'organo, tessuto o fenotipo cellulare

interessato [6]. Questo comporta l'impiego di una concentrazione di farmaco superiore a quella necessaria, in modo che il farmaco raggiunga il sito bersaglio alla concentrazione adeguata. Un altro importante problema è l'impossibilità di somministrare per via orale farmaci instabili al pH del tratto gastrointestinale.

Attraverso la somministrazione multipla e ravvicinata di farmaci convenzionali si possono inoltre verificare fluttuazioni dei livelli ematici del farmaco e si ha così il rischio che il farmaco raggiunga concentrazioni inefficaci e tossiche [6]. L'utilizzo dei carrier nanoparticellari permette il rilascio controllato o modificato del farmaco. La liberazione del farmaco infatti dipende dalle caratteristiche della formulazione e può costituire il fattore limitante la velocità di assorbimento, influenzando la biodisponibilità del principio attivo. Il rilascio del farmaco può essere modificato rispetto alla forma farmaceutica convenzionale in termini di velocità, tempo e luogo. Inoltre, la velocità di rilascio del farmaco può essere sia incrementata che rallentata.

Il rilascio del farmaco può iniziare solo dopo un certo intervallo di tempo dalla somministrazione, oppure può essere rilasciato a intervalli di tempo più o meno regolari dopo la somministrazione, o in relazione alle esigenze terapeutiche del momento. Il principio attivo può essere rilasciato in particolari distretti dell'organismo, come il rilascio specifico a livello del colon, per la terapia di quel tratto intestinale. Il farmaco in questo caso è stato direzionato. La questione assume un'importanza fondamentale per le terapie antitumorali, quando cioè si tratta di colpire in maniera il più possibile selettiva alcune cellule risparmiando le altre [6]. Le sostanze che vengono utilizzate per la produzione di nanoparticelle, all'interno delle quali i farmaci possono essere intrappolati, incapsulati, e/o adsorbiti, devono avere requisiti essenziali quali: (i) essere chimicamente inerti [8], (ii) essere biocompatibili [8], (iii) essere biodegradabili [9], ed (iv) essere facilmente sterilizzabili [7].

2.1. Le dispersioni particellari

Nella categoria delle dispersioni particellari rientrano i liposomi, i niosomi, gli etosomi, i transfersomi, le nanoparticelle lipidiche, le micro- e le nanoparticelle polimeriche, che comprendono le microsfele e le microcapsule, le nanosfele e le nanocapsule [5]. Le microsfele e le microcapsule rientrano generalmente nella categorie delle microparticelle, mentre i liposomi, i niosomi, gli etosomi ed i transfersomi rientrano nella famiglia delle vescicole lipidiche. I niosomi, gli etosomi ed i transfersomi sono stati sviluppati per migliorare alcune caratteristiche dei liposomi [5].

2.1.1. I liposomi

I liposomi sono vescicole costituite da uno o più doppi strati lipidici, che racchiudono un ambiente acquoso [5] (Fig. 2.1), e sono capaci di incapsulare farmaci lipofili, idrofili o amfilici [10]. Essi sono costituiti da una miscela di fosfolipidi, oppure da fosfolipidi e colesterolo, e possono essere carichi positivamente o negativamente [5]. Il lipide più comunemente utilizzato è la fosfatidilcolina ottenuta dalla soia o dal tuorlo dell'uovo, mentre la presenza di colesterolo tende a stabilizzare la struttura del liposoma, aumentando la sua rigidità [10]. I liposomi sono ampiamente utilizzati sia nel campo cosmetico che in quello dermatologico come anche per formulazioni che si somministrano per via parenterale [9].

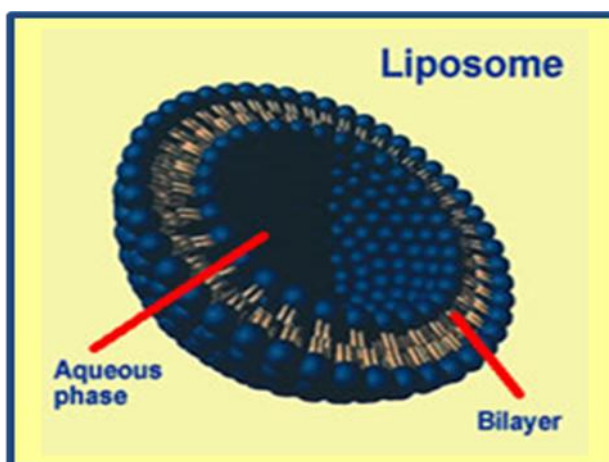


Figura 2.1. Rappresentazione di un liposoma monolamellare. Nel liposoma il doppio strato fosfolipidico racchiude un ambiente acquoso. Adattato da [11].

2.1.2. I niosomi

I niosomi sono costituiti da una miscela di tensioattivi non ionici, colesterolo e, in alcuni casi, piccole quantità di fosfolipidi [5]. Essi sono particelle rigide, e come i liposomi possono essere cariche positivamente o negativamente [5]. I niosomi sono stati sviluppati con lo scopo di aumentare la stabilità dei liposomi [5] e sono ampiamente impiegati nel campo cosmetico e dermatologico, per facilitare la permeazione dei farmaci attraverso la cute [9].

2.1.3. Gli etosomi

Gli etosomi sono stati creati con lo scopo di migliorare alcune delle caratteristiche dei liposomi. Queste particelle sono state sviluppate per incrementare la permeabilità cutanea, aumentando l'elasticità delle vescicole. Gli etosomi contengono sino al 20-40 % di etanolo [5], fosfolipidi e acqua [12]. Queste particelle sono generalmente cariche negativamente, e hanno un doppio strato lipidico fluido [5]. Gli etosomi, come anche i niosomi, sono in grado di entrare negli strati più esterni dello strato corneo della cute, ma non sono capaci di permearla [5].

2.1.4. I transfersomi

I transfersomi sono vescicole ultradeformabili costituite da fosfolipidi (che rappresentano il componente principale) e da tensioattivi (10-25 %). I tensioattivi hanno la funzione di fornire l'elasticità e la deformabilità vescicolare [5], permettendogli di comprimersi e di attraversare lo strato corneo attraverso la via transepidermica [10]. Queste particelle sono state fortemente studiate proprio per la loro capacità di penetrare la cute attraverso la via transepidermica, in condizioni non occlusive [5]. I transfersomi sono generalmente carichi negativamente [5].

2.1.5. SLN ed NLC

Alcune nanoparticelle lipidiche possono essere ulteriormente suddivise in nanoparticelle lipidiche solide (SLN) ed in carrier lipidici nanostrutturati (NLC) [5].

Le prime SLN furono prodotte all'inizio del novecento con un singolo lipide [13], che era solido alla temperatura corporea e, le loro matrici erano dei perfetti reticoli cristallini [5]. Le SLN sono rivestite da un tensioattivo che stabilizza la loro dispersione [5]. Queste nanoparticelle possono essere cariche positivamente o negativamente [5].

Le NLC invece sono prodotte con lipidi solidi e liquidi, la cui miscela forma una struttura solida alla temperatura corporea [13].

L'organizzazione strutturale della loro matrice può essere un reticolo cristallino distorto, una miscela lipidica amorfa, oppure una matrice lipidica solida che intrappola liquidi nei nano-compartmenti lipidici [5].

Anche queste nanoparticelle sono rivestite da un tensioattivo e possono essere cariche positivamente o negativamente. Sia le SLN che le NLC sono particelle rigide [5].

2.1.6. Le micro- e le nanoparticelle polimeriche.

In questa categoria di particelle troviamo le microsfele, le microcapsule, le nanosfele e le nanocapsule. Esse sono state sviluppate per controllare il rilascio di farmaci intrappolati o incapsulati [5]. Le sfere sono costituite da matrici polimeriche, mentre le capsule sono costituite da particelle oleose, rivestite con polimeri [5]. Le sfere sono generalmente rigide e più resistenti rispetto alle capsule [5]. Queste particelle possono essere cariche positivamente o negativamente [5].

2.2. Metodiche di analisi delle nanoparticelle

Le nanoparticelle sono generalmente caratterizzate per forma, dimensione e carica superficiale. Conoscere la forma delle nanoparticelle è di fondamentale importanza, per ipotizzare come possano interagire a contatto con le cellule o i tessuti dell'organismo umano. Lo studio della forma delle nanoparticelle può essere condotto utilizzando diversi strumenti, come il microscopio elettronico a trasmissione (TEM) e il cryo-TEM.

Questi due microscopi, oltre alla forma, danno informazioni anche sulle dimensioni delle nanoparticelle. La dimensione delle nanoparticelle permette di ipotizzare se sono in grado o meno di superare determinate barriere anatomiche, o passare attraverso le cellule che costituiscono un particolare tessuto.

Le nanoparticelle presenti nelle foto generate da questi due tipi di microscopi, possono essere misurate utilizzando appositi programmi per il computer. Nonostante questi due strumenti forniscano le stesse informazioni, e cioè la forma e le dimensioni delle nanoparticelle, non sempre i risultati coincidono. I campioni da analizzare al TEM vengono fatti essiccare, prima di essere osservati. Questo passaggio di disidratazione, potrebbe alterare sia la forma che le dimensioni delle nanoparticelle. Per poter essere osservati al cryo-TEM, i campioni non vengono essiccati, ma vengono congelati a temperature molto basse. In questo modo il campione da analizzare preserva la sua struttura originale. Per quanto riguarda il dimensionamento, può essere ottenuto anche con il dynamic light scattering (DLS). Questo strumento permette di

misurare il diametro idrodinamico [14] di campioni in dispersioni acquose, come le nostre nanoparticelle. Il campione da esaminare viene semplicemente diluito in acqua distillata. Per diametro idrodinamico si intende, il diametro del campione da analizzare (per esempio una nanoparticella sferica) più le altre molecole (per esempio ioni) presenti sulla sua superficie, che nella dispersione acquosa si muovono con essa [15]. I risultati sulle dimensioni che si ottengono dal DLS, saranno probabilmente diversi (maggiori) da quelli ottenuti dal TEM e dal cryo-TEM, dal momento che questi ultimi due danno un'informazione del diametro.

Alcuni DLS sono equipaggiati per poter studiare anche la carica superficiale delle nanoparticelle, attraverso la quale è possibile ipotizzare come interagiscono le nanoparticelle con altre sostanze o molecole.

Oltre alla morfologia, alle dimensioni e alla carica superficiale, le nanoparticelle sono state analizzate anche per valutare la loro capacità di incapsulazione delle molecole farmacologicamente attive. Questi studi possono essere condotti utilizzando lo spettrofotometro. Questo strumento analizza campioni liquidi, e permette di determinare la lunghezza d'onda di assorbimento di una molecola, e successivamente permette di determinare o meno la presenza della molecola, nelle dispersioni nanoparticellari.

Nei successivi paragrafi verranno date maggiori informazioni sugli strumenti utilizzati per le analisi delle nanoparticelle.

2.2.1. Il microscopio elettronico a trasmissione

Il microscopio elettronico a trasmissione (TEM) (Fig. 2.2 A e B) permette di studiare la morfologia e le dimensioni delle nanoparticelle, utilizzando come radiazione un fascio elettronico per produrre l'immagine del campione osservato [16]. Il TEM è costituito da diverse parti: una colonna elettronica, un sistema di comando e di controllo del sistema elettronico, e un sistema di produzione e controllo del vuoto. Nella parte alta della colonna elettronica è presente la sorgente di elettroni (filamento di tungsteno), nella parte centrale sono presenti le lenti condensatrici, e nella parte bassa sono posizionati lo schermo per mostrare l'immagine, il sistema di ingrandimento e di registrazione dell'immagine.

La colonna elettronica è direttamente collegata ad un sistema a vuoto. Nella parte centrale della colonna elettronica è presente anche un'apertura per posizionare il campione. Il filamento di tungsteno viene riscaldato, generando un fascio elettronico

che dal catodo viene accelerato verso l'anodo (posizionato sotto il catodo). Tra il catodo-anodo ed il campione, sono presenti le lenti condensatrici, che convergono il fascio elettronico sul campione. Le prime lenti, chiamate lenti obiettivo, producono l'immagine del campione. Dopo queste lenti sono presenti quelle intermedie, che ingrandiscono l'immagine, e dopo ancora sono presenti quelle di proiezione, che determinano l'ultimo ingrandimento dell'immagine. Una volta che il fascio elettronico ha attraversato tutte le lenti ed il campione, la sua immagine è visibile sullo schermo del computer collegato al TEM, oppure su uno schermo che è posizionato al di sotto delle lenti proiettive. Questo schermo è rivestito da una sostanza (per esempio cristalli di ossido di zinco) che emette fluorescenza quando è colpita dal fascio elettronico. L'immagine ottenuta è in bianco e nero, su uno sfondo fluorescente.

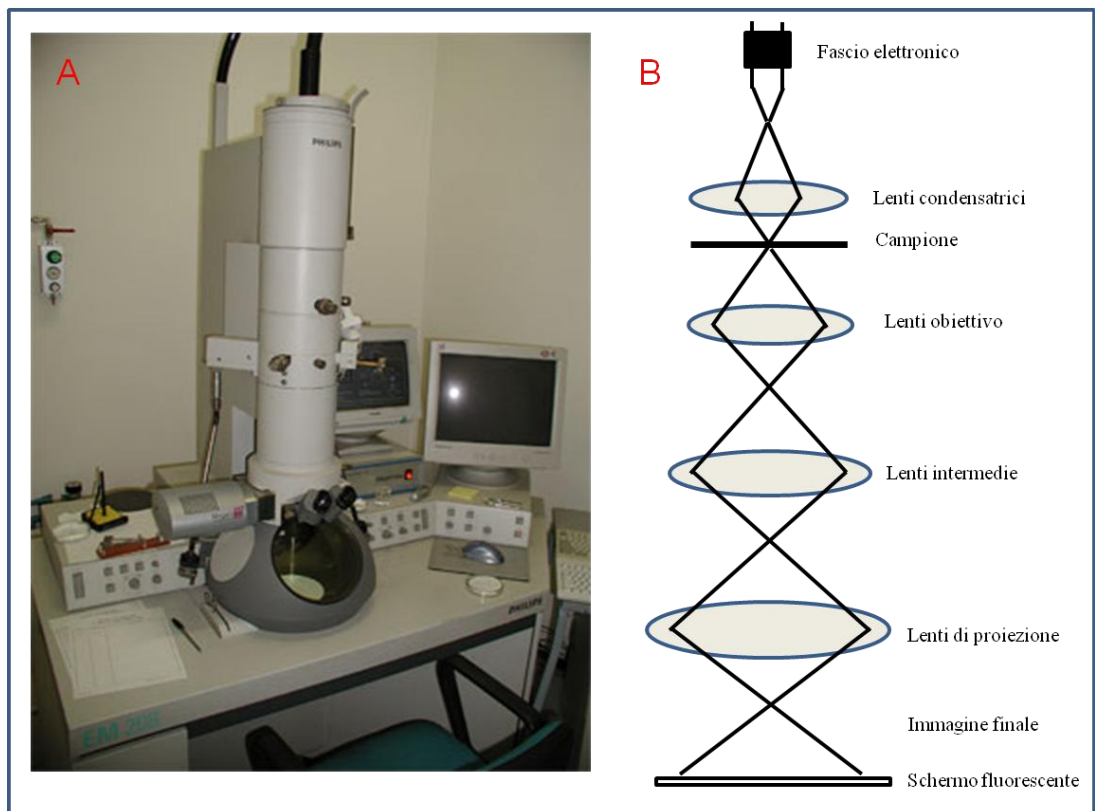


Figura 2.2. Microscopio elettronico a trasmissione, modello Philips EM 400 (A), struttura interna di un TEM (B). Adattato (A) da [17].

I campioni da analizzare si preparano depositando una goccia della dispersione nanoparticellare su un retino di rame, contenete un film di formvar. Successivamente, ciascun retino viene messo ad asciugare all'aria, a temperatura ambiente. In alcuni casi i campioni da osservare possono essere colorati con coloranti particolari che

contengono metalli pesanti che sono elettrondensi agli elettroni (per esempio l'acido fosfotungstico al 2 %). Questa particolare colorazione ha lo scopo di aumentare il contrasto del campione, aumentando la capacità del campione di deviare gli elettroni. L'immagine del campione così colorato appare più scuro, rispetto allo stesso campione senza colorazione.

2.2.2. Il cryo-TEM

Questo microscopio è un TEM, nel quale il campione che deve essere analizzato, è studiato a temperatura criogeniche (Fig. 2.3). Il campione è congelato molto rapidamente attraverso l'immersione in etano liquido, prima di essere osservate. In questo modo l'acqua presente nel campione, non cristallizza ma vetrifica e blocca ogni movimento del campione [18]. Il campione viene osservato sempre a basse temperature.



Figura 2.3. Cryo-TEM, modello IMS T12. Adattato da [19].

2.2.3. Il dynamic light scattering

Il DLS è uno strumento, a volte compatto come in Figura 2.4, che viene utilizzato per misurare le dimensioni di oggetti nella scala micro- o nanometrica in dispersione, acquosa e non, diluita. Alcuni DLS, come precedentemente detto, sono in grado di

misurare anche la carica superficiale degli stessi oggetti dispersi. Infatti, la stabilità della dispersione è direttamente proporzionale alla carica degli oggetti dispersi, che respingendosi l'un l'altro rimangono sospesi. Pertanto è una tecnica semplice e non invasiva per ottenere importanti informazioni anche relativamente allo studio in questione.

Le nanoparticelle in dispersione acquosa, sono circondate lungo la loro superficie da uno strato di molecole o ioni. Le nanoparticelle, come già precedentemente detto, presentano una carica superficiale. Questa carica superficiale modifica la distribuzione degli ioni presenti nello spazio che circonda la particella [15]. Quando la particella in dispersione acquosa si muove, lo strato di ioni che la circonda si muove con essa [15].

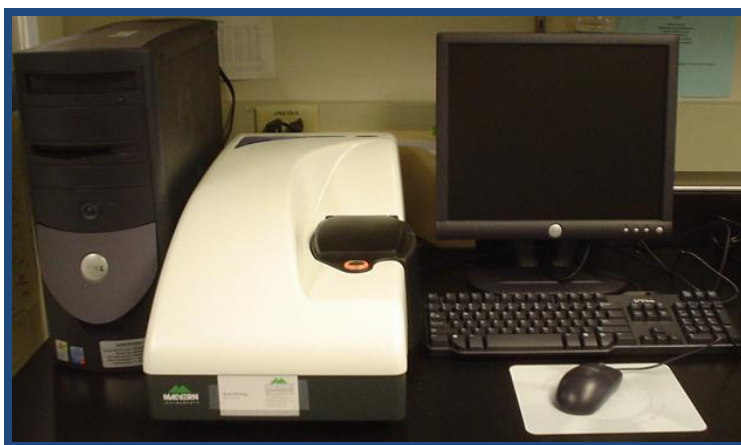


Figura 2.4. Dynamic light scattering, modello ZetaSizer Malvern Instruments. Adattato da [20].

Questo strato può essere suddiviso in due zone, una più interna chiamata strato di Stern, ed una più esterna chiamata strato diffuso [15]. Gli ioni presenti all'interno dello strato diffuso, si possono muovere rispetto al primo strato [15].

All'interno dello strato diffuso è possibile individuare un confine teorico entro il quale, ioni e particelle formano entità stabili (Fig. 2.5).

Quando la particella si muove, gli ioni all'interno di questo confine si muovono con essa [15]. Questo confine teorico è chiamato "slipping plane", ed il potenziale in corrispondenza di questo confine è chiamato potenziale zeta. Per quanto riguarda il diametro, quello calcolato allo slipping plane è il diametro idrodinamico (Z-AV) [15].

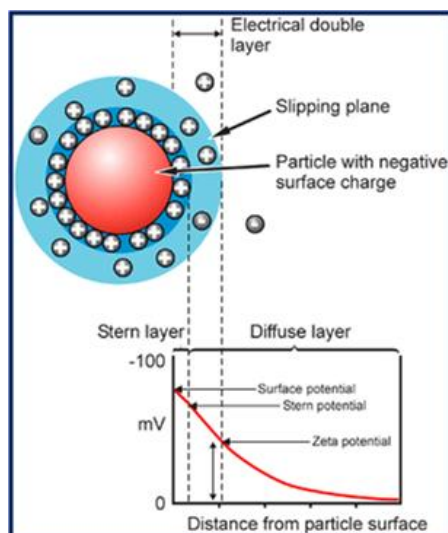


Figura 2.5. Rappresentazione schematica del potenziale zeta. Adattato da [15].

Per quanto riguarda i dati relativi alle dimensioni, che verranno presentati e discussi nei prossimi capitoli, bisogna evidenziare che lo strumento utilizzato fornisce la stessa misura ma espressa in maniera differente. Per esempio, i valori indicati con Z-AV, indicano la dimensione della particella comprensiva della particella stessa più l'acqua e molecole che si muovono insieme alla particella come se fossero un tutt'uno. Si parla infatti di diametro idrodinamico. I valori sono calcolati dallo strumento a partire dalla intensità di scattering e calcolati come media-Z (lo Z-AV per l'appunto). Questo valore è il più importante, ed è utilizzabile per comparazioni con dati provenienti da altri strumenti solo nel caso in cui il campione sia monomodale (i.e. un solo picco), sferico, e monodisperso (i.e. la curva di distribuzione non dovrebbe avere un "width". Vedi oltre). In tutti gli altri casi (e.g. campioni non sferici), il valore di Z-AV dovrebbe essere usato per comparare campioni dispersi nello stesso dispersante e misurati nella stessa maniera e condizioni.

Lo strumento è in grado anche di fornire le dimensioni delle particelle, espresse in percentuale, a partire dall'altezza del picco che generano in funzione dello scattering, volume o del numero. Questi valori sono normalmente leggermente diversi dallo Z-AV (anche quelli in intensità) e dovrebbero indicare la popolazione che è presente in percentuale maggiore. Per esempio, le dimensioni espresse in numero dovrebbero far vedere le dimensioni delle particelle numericamente più abbondanti, depurate dalla interferenza di scattering generata qualora ci fossero delle particelle grandi e piccole contemporaneamente. È risaputo infatti che più grande è la particella, maggiore sarà lo scattering luminoso che produce. Questo si riflette con il mascheramento di eventuali

particelle piccole. Pertanto, osservare e commentare queste altre due misure insieme con l'indice di polidispersità (PDI) permette di descrivere meglio il campione sotto studio.

Per quanto riguarda il PDI, questo valore è calcolato a partire dalla larghezza della curva di distribuzione, o semplicemente del picco. Secondo il manuale dello strumento che abbiamo usato, valori di PDI inferiori o uguali 0,1 indicano campioni monodispersi, cioè costituiti da un'unica popolazione particellare. Al contrario, per valori superiori o uguali a 0,5 si ritiene che il campione sia polidisperso.

La preparazione del campione per queste analisi è molto semplice. Una piccola aliquota del campione da analizzare viene posizionata in una cuvetta di plastica (opportunamente pulita), e diluita con acqua distillata. La cuvetta viene delicatamente agitata, ed inserita nell'apposito spazio all'interno dello strumento. Per analizzare la carica superficiale delle nanoparticelle, viene inserito un elettrodo nella cuvetta, e poi viene posizionato il tutto nell'apposito spazio nello strumento, e si fa partire l'analisi.

2.2.4. Lo spettrofotometro

Lo spettrofotometro (Fig. 2.6 A e B) può essere utilizzato per avere un'analisi quantitativa e qualitativa di una determinata molecola. Questo strumento fornisce gli spettri di assorbimento di varie molecole, e permette di rilevare la presenza di particolari molecole nelle dispersioni nanoparticellari.

Lo spettrofotometro UV/Vis è costituito da diversi componenti: una sorgente luminosa (lampada a filamento di tungsteno per la luce visibile, lampada al deuterio per radiazione ultravioletta), che da origine alla radiazione policromatica; un monocromatore che risolve il fascio policromatico in radiazioni a lunghezza d'onda determinata, un pozzetto per l'introduzione delle cuvette; una cellula fotoelettrica sulla quale incide il raggio emergente dalla soluzione in esame; un sistema di amplificazione della corrente emessa dalla fotocella e un galvanometro per misurare la corrente [21].

Il campione da analizzare viene posizionato all'interno di una cuvetta di quarzo (ben pulita), la quale è poi posizionata all'interno dello strumento. Lo spettrofotometro è di solito collegato ad un computer, attraverso il quale si fa partire l'analisi.

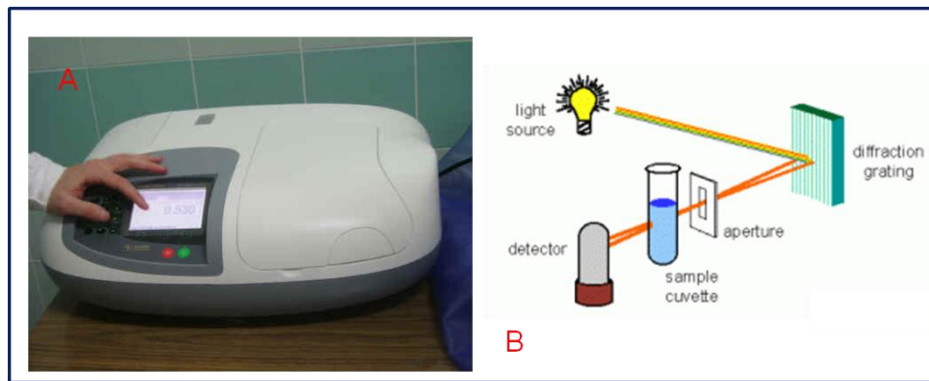


Figura 2.6. Struttura esterna ed interna dello spettrofotometro (A e B). Adattato da [22-23].

2.3. Note bibliografiche

- [1] Sito web a cura dell'Università degli studi di Napoli, <<http://www.fedoa.unina.it/876/>>, (10 Dicembre 2009).
- [2] Ricles L.M., Nam S.Y., Sokolov K., Emelianov S.Y., Suggs L.J.. 2011. Function of mesenchymal stem cells following loading of gold nanotracers. *International Journal of Nanomedicine*. 6, 407–416.
- [3] Ai J., Biazar E., Jafarpour M., Montazeri M., Majdi A., Aminifard S., Zafari M., Akbari H.R., Rad H.G.. 2011. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *International Journal of Nanomedicine*. 6, 1117-27.
- [4] Sito web a cura della Royal Society and Royal Academy of Engineering on Nanotechnology and Nanoscience, <<http://www.nanotec.org.uk/finalReport.htm>>, (10 Gennaio 2010).
- [5] Baroli. B.. 2009. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 99, 21-50.
- [6] Scatturin A.. Nanoparticles as drug delivery systems for peptides and protein, documento preparato per la Scuola Nazionale Dottorale in Tecniche Farmaceutiche, Cagliari, 7-9 Settembre 2009.
- [7] Russo E, Cafaggi S., Parodi B., Cavigliani G., Bignardi G.. Nanoparticelle: loro proprietà e prospettive per l'uso in medicina, documento preparato per la Scuola Nazionale Dottorale in Tecniche Farmaceutiche, Cagliari, 7-9 Settembre 2009.
- [8] Jonson P., Lloyd-Jones J.K.. Drug delivery systems, fundamentals and techniques (Hellis Horwood, Chichester, 1987), pp. 200-223.
- [9] Choi M.J., Maibach H.I.. 2005. Liposomes and Niosomes as Topical Drug Delivery Systems. *Skin Pharmacology and Physiology*. 18, 209-219.

- [10] Benson H.A.E.. 2005. Transdermal drug delivery: Penetration enhancement techniques. *Current Drug Delivery*. 2, 23-33.
- [11] Sito web a cura di INNOVATIVE COSMECEUTICAL PRODUCTS, <<http://icp-sa.gr/images/LIPOSOMA.jpg>>, (14 Gennaio 2010).
- [12] Elsayed M.M.A., Abdallah O.Y., Naggar V.F., Khalafallah N.M.. 2007. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. *Internationa Journal of. Pharmaceutics*. 332, 1-16.
- [13] Müller R.H., Petersen R.D., Hommoss A., Pardeike J.. 2007. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59, 522-530.
- [14] Sito web a cura di Alfatest Srl, <<http://www.alfatest.net/listing.asp?CatID=200>>, (24 Ottobre 2011).
- [15] Sito web a cura di Malvern Instruments Ltd, <http://www.malvern.com/LabEng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LDE.htm>, (03 Febbraio 2012).
- [16] Rosati P., Colombo R.. La Cellula (Edi-ermes, Milano, 1999), pp. 39-61.
- [17] Sito web a cura dell'Università degli studi di Perugia, <<http://www.unipg.it/sites/cume/imm/foto/microscopio208.jpg>>, (15 Gennaio 2010).
- [18] Sito web a cura di Corso di Nanobiotecnologie 2011/2012, <http://137.204.163.138/nanobio/Microscopia11_4up_nomovies.pdf>, (3 Febbario 2012).
- [19] Sito web a cura dell'Institute of Materials Science, University of Connecticut, <<http://www.ims.uconn.edu/~micro/Tecnai%20T12.htm>>, (3 Febbraio 2012).
- [20] Sito a cura di Fred Hutchinson Cancer Research Center, <<http://labs.fhcrc.org/stoddard/Instrumentation.html>>, (25 Ottobre 2011).
- [21] Sito a cura di ProdAl, <<http://www.prodalricerche.it>>, (3 Febbraio 2012).
- [22] Sito a cura di Difossombrone.it, <http://www.difossombrone.it/biochimica/main08interazione_luce-materia.htm>, (3 Febbraio 2012).
- [23] Sito a cura di CHIMICAMO, <<http://www.chimicamo.org/wp-content/uploads/2011/12/spectrometer1-300x169.gif>>, (6 Febbraio 2012).

MATERIALI E METODI

In questo capitolo vengono elencati i materiali e gli strumenti utilizzati in questo lavoro. Vengono anche descritte le metodiche e le modalità di allestimento degli esperimenti condotti.

3.1. Materiali

Prodotti chimici. L'ibuprofene (Ibu), il suo sale sodico (Ibu Na), il paclitaxel (Pacli), il pluronic F-68 (pluronic), l'acetone e l'acido trans-retinoico (RA) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). L'etanolo (EtOH; ≥ 99.8 % v/v) è stato fornito da Fluka (Milano, Italia), il protasan up cl 113 (chitosano) è stato comprato da Nova Matrix (Sandvika, Norvegia). I fluorofori 2-(12-(7-nitrobenzene-2-ossa-1,3-diazol-4-il)amino)-dodecanoil-1-esadecanoil-sn-glicerolo-3-fosfocoline (NBD) e N-(fluo-rescein-5-tiocarbamoil)-1,2-diesadecanoil-sn-glicerolo-3-fosfoetanolamine, sale trietilammonio (FITC) sono stati acquistati da Molecular Probes (Monza, Italia). L'epikuron 145 V (lecitina) ed il miglyol 812 (miglyol) sono stati gentilmente regalati da Cargil (Milano, Italia) e Sasol (Johannesburg, Sud Africa).

Le molecole farmacologicamente attive AZL 38 e AZL 6 sono state sintetizzate dalla Dr.ssa V. Onnis nei suoi laboratori (Università degli studi di Cagliari).

Se non altrimenti specificato, in questi esperimenti è stata utilizzata acqua tipo Milli-Q, filtrata con un filtro sterile 0,2 μm (W M.Q.).

Altro. Bottigliette di vetro pyrex[®] con tappo a vite da 20 e da 10 mL (bottigliette), provette di plastica da 1,5 e 2 mL (provettina), spatole, puntali da 20, 200 e 1000 μL (Eppendorf, Gilson e Corning) e pipette Pasteur, per la preparazione delle soluzioni

contenenti le molecole farmacologicamente attive. Inoltre, per la preparazione delle nanoparticelle, sono stati utilizzati beakers di vetro Duran da 150 mL, spatole, vetrini coprioggetto in vetro, ancorette magnetiche di diverse dimensioni, scarabattole di dimensioni varie, pipette graduate e pipette di plastica da 10 mL. Per gli spettri allo spettrofotometro è stata utilizzata una cuvetta di quarzo (percorso ottico: 1 cm; HELLMMA, Müllheim, DE).

3.2. Strumenti

Gli strumenti utilizzati sono stati i seguenti: due diversi sistemi per la produzione di acqua Milli-Q (Siemens Labostartm 7 TWF-DI/UV, con un filtro sterile di 0,2 µm e il Milli-Q gradient System; Millipore, Billerica, A, USA, con un filtro da 0,22 µm), un vortex (modello GVlab, Gilson), un agitatore magnetico (POLY 15, H+P Labortechnik AG), una bilancia (modello ABS 120-4, quattro cifre decimali, KERN), un dynamic light scattering (DLS, Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments), una centrifuga (Heraeus Megafuge 11R Centrifuge, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), ed uno spettrofotometro (Cary UV-Vis spectrophotometer, Varian, Palo Alto, CA, USA).

In alcuni casi è stato necessario conservare le soluzioni e/o le sostanze in frigorifero (4-6°C, Indesit), o nel freezer (-30°C, Ignis).

Laddove venga scritto “a temperatura ambiente”, se non altrimenti indicato, deve intendersi “ad una temperatura compresa tra i 22° ed i 25°C”.

3.3. Preparazione delle nanoparticelle lipidiche

Nei nostri laboratori sono stati prodotti due tipi di nanoparticelle (NP): le nanocapsule (NC) e le nanoemulsioni (NE). Il metodo di preparazione di questi due tipi di NP è identico, anche se esse differiscono solo per un componente (il chitosano), che è un polimero ed è presente nelle NC ma non nelle NE. Nelle NC la presenza del chitosano determina la formazione di una capsula di rivestimento. I componenti delle NP sono la lecitina, il miglyol, l'EtOH, il pluronic, il chitosano (solo nelle NC), l'acetone e l'W M.Q.

Le quantità dei singoli componenti che costituiscono le NP sono state riassunte nella Tabella 3.1. Queste quantità possono essere dimezzate, in funzione del volume finale della dispersione nanoparticellare necessario per i successivi esperimenti. Per i nostri

esperimenti sono state preparate sia NP vuote, che NP contenenti molecole farmacologicamente attive. Il protocollo di preparazione è identico, e qui di seguito è spiegato quello delle NP vuote.

Tabella 3.1. Composizione delle NP.

	NC	NE
Lecitina (mg)	40	40
Miglyol (μL)	125	125
EtOH (μL)	500	500
Pluronic (mg)	50	50
Chitosano (mg)	10	0
Acetone (mL)	9,5	9,5
W M.Q. (mL)	20	20

Nella preparazione delle NP vuote, la lecitina è stata pesata in una provetta, dove poi sono stati pipettati il miglyol e l'EtOH. Questi componenti lipofilici sono stati miscelati a temperatura ambiente, utilizzando il vortex per circa 10-15 minuti.

Successivamente, il pluronic ed il chitosano sono stati versati in un beaker contenente l'W M.Q. Questi componenti idrofilici sono stati mantenuti sotto agitazione a 300 rpm, a temperatura ambiente, sino alla loro completa dissoluzione. A questo punto, i componenti lipofilici sono stati velocemente pipettati nell'acetone, e questa dispersione istantaneamente versata nella soluzione acquosa, producendo così le formulazioni nanoparticellari finali per emulsione. Queste formulazioni sono rimaste in agitazione ad una velocità maggiore rispetto alla precedente (500-900 rpm), a temperatura ambiente, sino a quando il loro volume è diventato pari alla metà del volume dell'W M.Q. precedentemente utilizzata (Fig. 3.1). Le NP sono state ottenute dall'auto-assemblaggio dei lipidi, durante la fase di emulsificazione. Le NP una volta prodotte sono state conservate alla temperatura di 4°C, sino al loro utilizzo, e non oltre le tre settimane. Nel caso della preparazione delle NP contenenti le molecole farmacologicamente attive, è stata usata una soluzione madre delle stesse in etanolo al posto dell'EtOH.

Le molecole farmacologicamente attive utilizzate sono: l'Ibu, l'Ibu Na, il Pacli, l'RA, l'AZL 38 e l'AZL 6. Oltre a queste molecole, sono stati utilizzati anche due

lipidi fluorescenti: l’NBD ed il FITC. Questi, come anche l’AZL 38, l’AZL 6 ed il Pacli sono sensibili alla luce; pertanto, le provette contenenti le loro soluzioni sono sempre state rivestite con della stagnola.

Sono state preparate diverse soluzioni madre (S.M.) in EtOH delle varie molecole utilizzate, alcune a differenti concentrazioni:

Ibu:	2,6 mg/mL;
Ibu Na:	2,5 mg/mL, 1,5 mg/mL, 0,5 mg/mL, e 0,4 mg/mL;
Pacli:	1 mg/mL;
RA:	2,5 mg/mL;
AZL 38:	2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL;
AZL 6:	2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL;
NBD:	3,3 mg/mL;
FITC:	2 mg/mL.

Nei successivi paragrafi, sono riportate maggiori informazioni sulle NP contenenti le diverse molecole farmacologicamente attive.

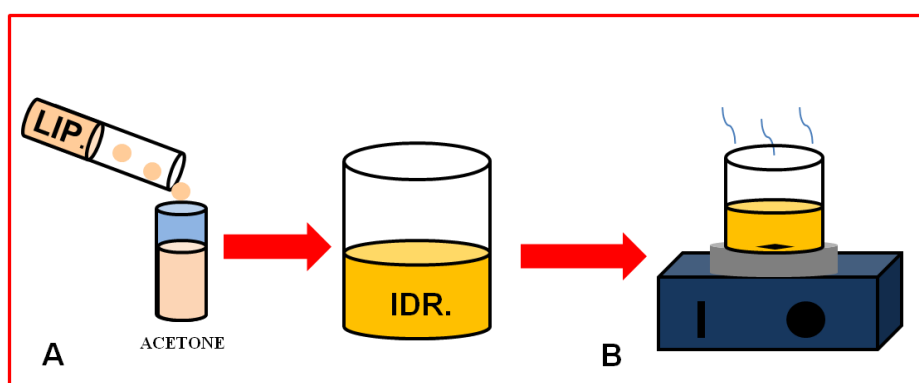


Figura 3.1. Preparazione delle NP. A) La soluzione lipofila (LIP.), costituita dalla lecitina, il miglyol e l’EtOH, è stata rapidamente pipettata nell’acetone, e questa miscela è stata poi versata nel beaker contenente le componenti idrofiliche (IDR.). B) La miscela appena preparata è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente, sino al raggiungimento del giusto volume.

3.3.1. NC e NE Ibu

Nella preparazione delle NC Ibu, i 500 μ L di EtOH sono stati completamente sostituiti con 500 μ L della S.M. di Ibu - 2,6 mg/mL. Le NC Ibu ottenute avevano una concentrazione finale teorica di 101,6 μ g/mL. Al contrario, nell’allestimento delle NE

Ibu sono stati adoperati 270 μL della S.M. di Ibu, ai quali sono stati aggiunti 230 μL di EtOH (per arrivare ad un volume totale di EtOH di 500 μL , vedi Tabella 3.1). Quest'ultimo passaggio è stato necessario perché la S.M. di Ibu non era sufficiente. Le NE Ibu così preparate avevano una concentrazione teorica di 56,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabella 3.2. Composizione delle NC e delle NE Ibu.

	NC	NE
Lecitina (mg)	40	40
Miglyol (μL)	125	125
EtOH-S.M. 2,6 mg/mL (μL)	500	270
EtOH (μL)	0	230
Pluronic (mg)	50	50
Chitosano (mg)	10	0
Acetone (mL)	9,5	9,5
W M.Q. (mL)	20	20
Conc. Finale ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	101,6	56,6

3.3.2. NC e NE Ibu Na

Sono stati preparati otto lotti di NC ed NE contenenti l'Ibu Na a differenti concentrazioni (Tabella 3.3 e 3.4, rispettivamente), utilizzando le diverse S.M. dell'Ibu Na precedentemente allestite.

- Lotto 1. Per questo lotto, l'EtOH è stato completamente sostituito con 500 μL di S.M. di Ibu Na - 2,5 mg/mL. Tuttavia la concentrazione teorica finale delle NC e delle NE è risultata differente; rispettivamente 65,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 96,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Lotto 2. In questo caso, 25 μL di S.M. di Ibu Na - 0,4 mg/mL sono stati aggiunti a 225 μL di EtOH, ottenendo una concentrazione teorica finale sia per le NC che per le NE pari a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Lotto 3. In questo caso, 50 μL di S.M. di Ibu Na - 0,4 mg/mL sono stati aggiunti a 200 μL di EtOH, ottenendo una concentrazione teorica finale di 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ per le NC e di 3,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ per le NE.
- Lotto 4. In questo caso, 100 μL di S.M. di Ibu Na - 0,4 mg/mL sono stati aggiunti a 150 μL di EtOH, ottenendo una concentrazione teorica finale di 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ per le NC e di 7,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ per le NE.

Tabella 3.3. Composizione dei diversi lotti di NC Ibu Na.

NC (lotto)	1	2	3	4	5	6	7	8
Lecitina (mg)	40	20	20	20	20	20	20	20
Miglyol (µL)	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
EtOH-S.M. 2,5 mg/mL (µL)	500					250		
EtOH-S.M. 0,4 mg/mL (µL)		25	50	100	150			
EtOH-S.M. 1,5 mg/mL (µL)							250	
EtOH-S.M. 0,5 mg/mL (µL)								250
EtOH (µL)		225	200	150	100			
Pluronic (mg)	50	25	25	25	25	25	25	25
Chitosano (mg)	10	5	5	5	5	5	5	5
Acetone (mL)	9,5	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75
W M.Q. (mL)	20	10	10	10	10	10	10	10
Conc. Finale (µg/mL)	65,8	2	4	8	11,5	115,7	72,1	22,7

Tabella 3.4. Composizione dei diversi lotti di NE Ibu Na.

NE (lotto)	1	2	3	4	5	6	7	8
Lecitina (mg)	40	20	20	20	20	20	20	20
Lecitina (mg)	40	20	20	20	20	20	20	20
Miglyol (µL)	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
EtOH-S.M. 2,5 mg/mL (µL)	500					250		
EtOH-S.M. 0,4 mg/mL (µL)		25	50	100	150			
EtOH-S.M. 1,5 mg/mL (µL)							250	
EtOH-S.M. 0,5 mg/mL (µL)								250
EtOH (µL)		225	200	150	100			
Pluronic (mg)	50	25	25	25	25	25	25	25
Chitosano (mg)								
Acetone (mL)	9,5	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75
W M.Q. (mL)	20	10	10	10	10	10	10	10
Conc. Finale (µg/mL)	96,2	2	3,9	7,6	11,5	113,6	73,5	22,7

- Lotto 5. In questo caso, 150 μL di S.M. di Ibu Na - 0,4 mg/mL sono stati aggiunti a 100 μL di EtOH, ottenendo una concentrazione teorica finale di 11,5 $\mu\text{g/mL}$ sia per le NC che per le NE.
- Lotto 6. In questo caso, 250 μL di S.M. di Ibu Na - 2,5 mg/mL sono stati completamente sostituiti all'EtOH, ottenendo una concentrazione teorica finale di 115,7 $\mu\text{g/mL}$ sia per le NC, e di 113,6 $\mu\text{g/mL}$ per le NE.
- Lotto 7. In questo caso, 250 μL di S.M. di Ibu Na - 1,5 mg/mL sono stati completamente sostituiti all'EtOH, ottenendo una concentrazione teorica finale di 72,1 $\mu\text{g/mL}$ sia per le NC, e di 73,5 $\mu\text{g/mL}$ per le NE.
- Lotto 8. In questo caso, 250 μL di S.M. di Ibu Na - 0,5 mg/mL sono stati completamente sostituiti all'EtOH, ottenendo una concentrazione teorica finale di 22,7 $\mu\text{g/mL}$ sia per le NC che per le NE.

3.3.3. NC e NE Pacli

Le NC e le NE contenenti il Pacli sono state preparate utilizzando sempre la S.M. di Pacli alla concentrazione di 1 mg/mL, ma sono state preparate tre volte (Tabella 3.5).

Tabella 3.5. Composizione dei vari lotti di NC e NE Pacli.

	Lotto 1		Lotto 2		Lotto 3	
	NC	NE	NC	NE	NC	NE
Lecitina (mg)	40	40	20	20	20	20
Miglyol (μL)	125	125	62,5	62,5	62,5	62,5
EtOH-S.M. 1 mg/mL (μL)	500	500	250	250	250	250
EtOH (μL)	0	0	0	0	0	0
Pluronic (mg)	50	50	25	25	25	25
Chitosano (mg)	10	0	5	0	5	0
Acetone (mL)	9,5	9,5	4,8	4,8	4,8	4,8
W M.Q. (mL)	20	20	10	10	10	10
Conc. Finale ($\mu\text{g/mL}$)	50	49,5	50	50	46,3	47,2

- Lotto 1. In questo caso, l'EtOH è stato completamente sostituito con 500 μL di S.M. di Pacli - 1 mg/mL. Tuttavia la concentrazione teorica finale delle NC e delle NE è risultata differente; rispettivamente 50 $\mu\text{g/mL}$ e 49,5 $\mu\text{g/mL}$.
- Lotto 2. In questo caso, l'EtOH è stato completamente sostituito con 250 μL di S.M. di Pacli - 1 mg/mL, ottenendo una concentrazione teorica finale di 50 $\mu\text{g/mL}$ sia per le NC che per le NE.
- Lotto 3. In questo caso, l'EtOH è stato completamente sostituito con 250 μL di S.M. di Pacli - 1 mg/mL. Tuttavia la concentrazione teorica finale delle NC e delle NE è risultata differente; rispettivamente 46,3 $\mu\text{g/mL}$ e 47,2 $\mu\text{g/mL}$.

3.3.4. NC e NE RA

Le NC e NE RA sono state preparate solo una volta, ed è stata utilizzata la S.M. di RA 2,5 mg/mL. Sia per le NC che per le NE sono stati utilizzati 350 μL della S.M., ai quali sono stati aggiunti 150 μL di EtOH. Tuttavia, la concentrazione teorica finale delle NC e delle NE è risultata leggermente differente; rispettivamente 64,3 $\mu\text{g/mL}$ e 63,4 $\mu\text{g/mL}$ per le NE (Tabella 3.6).

Tabella 3.6. Composizione delle NC e delle NE RA.

	NC	NE
Lecitina (mg)	40	40
Miglyol (μL)	125	125
EtOH-S.M. 2,5 mg/mL (μL)	350	350
EtOH (μL)	150	150
Pluronic (mg)	50	50
Chitosano (mg)	10	0
Acetone (mL)	9,5	9,5
W M.Q. (mL)	20	20
Conc. Finale ($\mu\text{g/mL}$)	64,3	63,4

3.3.5. NC e NE AZL 38

Le NC e le NE contenenti la molecola AZL 38 sono state preparate tre volte (Tabella 3.7), utilizzando due differenti S.M..

- Lotto 1. In questo caso, 125 μL di S.M. di AZL 38 - 1,25 mg/mL sono stati aggiunti a 375 μL di EtOH. Tuttavia la concentrazione teorica finale delle NC e delle NE è risultata differente; rispettivamente 12,6 $\mu\text{g/mL}$ e 11,2 $\mu\text{g/mL}$.
- Lotto 2. In questo caso, l'EtOH è stato completamente sostituito con 250 μL di S.M. AZL 38 - 2,5 mg/mL, ottenendo una concentrazione teorica finale di 125 $\mu\text{g/mL}$ sia per le NC che per le NE.
- Lotto 3. In questo caso, l'EtOH è stato completamente sostituito con 250 μL di S.M. di AZL 38 - 2,5 mg/mL. Tuttavia la concentrazione teorica finale delle NC e delle NE è risultata differente; rispettivamente 113,6 $\mu\text{g/mL}$ e 125 $\mu\text{g/mL}$.

Tabella 3.7. Composizione dei vari lotti di NC e NE AZL 38.

	Lotto 1		Lotto 2		Lotto 3	
	NC	NE	NC	NE	NC	NE
Lecitina (mg)	40	40	20	20	20	20
Miglyol (μL)	125	125	62,5	62,5	62,5	62,5
EtOH-S.M. 1,25 mg/mL (μL)	125	125				
EtOH-S.M. 2,5 mg/mL (μL)			250	250	250	250
EtOH (μL)	375	375	0	0	0	0
Pluronic (mg)	50	50	25	25	25	25
Chitosano (mg)	10	0	5	0	5	0
Acetone (mL)	9,5	9,5	4,8	4,8	4,8	4,8
W M.Q. (mL)	20	20	10	10	10	10
Conc. Finale ($\mu\text{g/mL}$)	12,6	11,2	125	125	113,6	125

3.3.6. NC e NE AZL 6

Le NC e le NE AZL 6 sono state preparate tre volte (Tabella 3.8), utilizzando due differenti S.M..

- Lotto 1. In questo caso, 125 μL di S.M. di AZL 6 - 1,3 mg/mL sono stati aggiunti a 375 μL di EtOH. Tuttavia la concentrazione teorica finale delle NC e delle NE è risultata differente; rispettivamente 10 $\mu\text{g/mL}$ e 12 $\mu\text{g/mL}$.

Tabella 3.8. Composizione dei vari lotti di NC e NE AZL 6.

	Lotto 1		Lotto 2		Lotto 3	
	NC	NE	NC	NE	NC	NE
Lecitina (mg)	40	40	20	20	20	20
Miglyol (μ L)	125	125	62,5	62,5	62,5	62,5
EtOH-S.M. 1,25 mg/mL (μ L)	125	125				
EtOH-S.M. 2,5 mg/mL (μ L)			250	250	250	250
EtOH (μ L)	375	375				
Pluronic (mg)	50	50	25	25	25	25
Chitosano (mg)	10		5		5	
Acetone (mL)	9,5	9,5	4,8	4,8	4,8	4,8
W M.Q. (mL)	20	20	10	10	10	10
Conc. Finale (μ g/mL)	10	12	125	115,7	113,6	120,2

Lotto 2. In questo caso, l'EtOH è stato completamente sostituito con 250 μ L di S.M. AZL 6 - 2,5 mg/mL. Tuttavia la concentrazione teorica finale delle NC e delle NE è risultata differente; rispettivamente 125 μ g/mL e 115,7 μ g/mL.

Lotto 3. In questo caso, l'EtOH è stato completamente sostituito con 250 μ L di S.M. AZL 6 - 2,5 mg/mL. Tuttavia la concentrazione teorica finale delle NC e delle NE è risultata differente; rispettivamente 113,6 μ g/mL e 120,2 μ g/mL.

3.3.7. NC e NE NBD

Le NC e le NE NBD sono state preparate due volte (Tabella 3.9) utilizzando la stessa S.M..

Lotto 1. In questo caso, 60 μ L di S.M. di NBD - 3,3 mg/mL sono stati aggiunti a 190 μ L di EtOH. Tuttavia la concentrazione teorica finale delle NC e delle NE è risultata differente; rispettivamente 38,4 μ g/mL e 40 μ g/mL.

Lotto 2. In questo caso, 60 μ L di S.M. di NBD - 3,3 mg/mL sono stati aggiunti a 190 μ L di EtOH. Tuttavia la concentrazione teorica finale delle NC e delle NE è risultata differente; rispettivamente 40 μ g/mL e 36,3 μ g/mL.

Tabella 3.9. Composizione dei vari lotto di NC e NE NBD.

	Lotto 1		Lotto 2	
	NC	NE	NC	NE
Lecitina (mg)	20	20	20	20
Miglyol (μ L)	62,5	62,5	62,5	62,5
EtOH-S.M. 3,33 mg/mL (μ L)	60	60	60	60
EtOH (μ L)	190	190	190	190
Pluronic (mg)	25	25	25	25
Chitosano (mg)	5		5	
Acetone (mL)	4,8	4,8	4,8	4,8
W M.Q. (mL)	10	10	10	10
Conc. Finale (μ g/mL)	38,4	40	40	36,3

3.3.8. NC e NE FITC

Le NC e le NE FITC sono state preparate due volte (Tabella 3.10) utilizzando sempre la stessa S.M..

Tabella 3.10. Composizione delle NC e delle NE FITC.

	Lotto 1		Lotto 2	
	NC	NE	NC	NE
Lecitina (mg)	20	20	20	20
Miglyol (μ L)	62,5	62,5	62,5	62,5
EtOH-S.M. 2 mg/mL (μ L)	100	100	100	100
EtOH (μ L)	150	150	150	150
Pluronic (mg)	25	25	25	25
Chitosano (mg)	5		5	
Acetone (mL)	4,75	4,8	4,8	4,8
W M.Q. (mL)	10	10	10	10
Conc. Finale (μ g/mL)	40	37,7	37,7	38,5

Lotto 1. In questo caso, 100 μL di S.M. di FITC - 2 mg/mL sono stati aggiunti a 150 μL di EtOH. Tuttavia la concentrazione teorica finale delle NC e delle NE è risultata differente; rispettivamente 40 $\mu\text{g/mL}$ e 37,7 $\mu\text{g/mL}$.

Lotto 2. In questo caso, 100 μL di S.M. di FITC - 2 mg/mL sono stati aggiunti a 150 μL di EtOH. Tuttavia la concentrazione teorica finale delle NC e delle NE è risultata differente; rispettivamente 37,7 $\mu\text{g/mL}$ e 38,5 $\mu\text{g/mL}$.

3.4. Purificazione delle NP

Alcuni lotti delle NP prodotte (vedi oltre) sono stati sottoposti a due diversi trattamenti di purificazione: la centrifugazione e la dialisi. Questi trattamenti permettono la rimozione di alcuni componenti che potrebbero non essere stati utilizzati per la formazione delle NP, e quindi rimanere dispersi o disciolti nella dispersione acquosa nanoparticellare.

La *centrifugazione* è stata eseguita utilizzando le provette filtranti Amicon[®] ultra-4 (MWCO: 3.000 Da; Millipore). Queste provette sono costituite da due unità: una provetta simile ad un tubo da 15 mL, su cui si inserisce una seconda provetta che funge da unità filtrante (Fig. 3.2). Affinché le provette Amicon[®] possano essere usate con il campione in esame, le stesse devono essere precedentemente usate per filtrare dell'acqua distillata (2 mL, 3026 rcf \times 50 minuti, 5° C) in modo da condizionare il setto filtrante. Successivamente, si elimina completamente l'acqua, e si filtra il campione in esame (2 mL, 3026 rcf \times 30 minuti, 5°C). Nei nostri esperimenti, al termine della centrifugazione, il concentrato delle NP (contenuto nell'unità filtrante delle provette) e l'ultrafiltrato (raccolto nel tubo delle provette filtranti) sono stati recuperati e conservati a 4°C, sino al loro utilizzo (Fig. 3.2 A). Le NP sottoposte a centrifugazione verranno indicate successivamente con la sigla APC.

La *dialisi* è stata condotta mettendo 1 mL di ciascuna formulazione nanoparticellare (n = 3) in apposite membrane da dialisi (Spectra/Por[®] 7 Dialysis Membrane, MWCO: 1.000 Da, Spectrum Europe B.V.). Le membrane contenenti le NP, divise per farmaco, sono state immerse in acqua distillata (3 L) dove sono state lasciate sotto lentissima agitazione per 12, 24 e 48 ore (Fig. 3.2 B), e a temperatura ambiente. Nel caso in cui le NP sono state dializzate per 48 ore, l'acqua distillata è stata cambiata dopo le prime 24 ore. Le NP dializzate saranno indicate successivamente con la sigla APD 12, 24 o 48 h. Le NP sottoposte a questi trattamenti sono:

- NC e NE Ibu, rispettivamente 101,6 e 56,6 $\mu\text{g/mL}$ (par. 3.3.1);

- NC e NE Ibu Na, rispettivamente 65,8 e 96,2 $\mu\text{g/mL}$ (par. 3.3.2, lotto 1);
- NC e NE RA, rispettivamente 64,3 e 63,4 $\mu\text{g/mL}$ (par. 3.3.4);
- NC e NE AZL 38, rispettivamente 12,6 e 11,2 $\mu\text{g/mL}$ (par. 3.3.5, lotto 1);
- NC e NE AZL 6, rispettivamente 10 e 12 $\mu\text{g/mL}$ (par. 3.3.6, lotto 1).

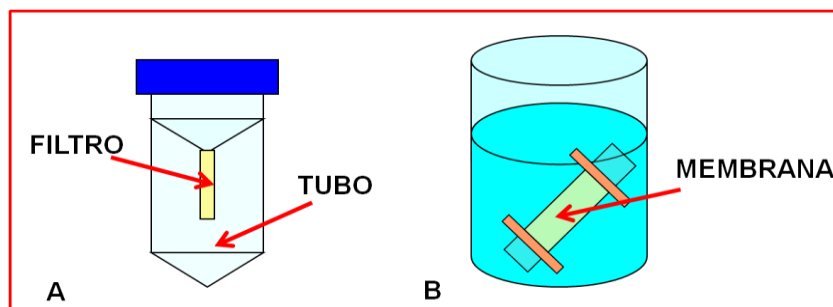


Figura 3.2. Centrifugazione e dialisi delle NP. A) La centrifugazione è stata fatta utilizzando le provette filtranti, che sono costituite da una parte superiore che contiene il filtro (pori da 3000 Da), dove si mette il campione, e da una parte inferiore che costituisce il tubo della provetta. Tutto quello che ha dimensioni inferiori alla grandezza dei pori del filtro, viene raccolto nel tubo della provetta. Per la centrifugazione sono stati utilizzati 2 mL di ciascun campione, ed è stata eseguita a $3026 \text{ rcf} \times 30 \text{ min}$, a 5°C . B) La dialisi è stata condotta utilizzando membrane da dialisi con pori da 1000 Da, dove sono stati messi 1 mL di ciascun campione. Le membrane contenenti i campioni sono state immerse in 3 L di acqua distillata, per 12, 24 e 48 ore.

Infine, le NP che non sono state sottoposte ai trattamenti di purificazione saranno indicate con la sigla AP.

3.5. Caratterizzazione delle NP al DLS

La caratterizzazione al DLS è stata fatta mettendo 5 μL di campione in una cuvetta di plastica, nella quale è stato poi aggiunto 1 mL di W M.Q.. La cuvetta è stata delicatamente agitata ed inserita quindi nello strumento per la lettura delle dimensioni (Z-AV, nm). Lo strumento è stato impostato per fare da 3 a 5 ripetizioni della stessa analisi, ed ogni analisi è il risultato medio di 14 letture (i.e. run). Per la quantificazione del potenziale zeta (ZP, mV) delle NP nella stessa cuvetta si è inserito l'elettrodo costituito da 2 elettrodi di palladio, separati da uno spazio di 2 mm (Universal Dip Cell Kit). In questo caso, lo strumento è stato impostato per fare da 3 a 5 ripetizioni della stessa analisi, ed ogni analisi è il risultato medio di 14 letture (i.e. run).

Le analisi al DLS delle NP sottoposte a purificazione e non sono state eseguite a 25°C , mentre le NP AP e quelle dializzate 12 ore (APD 12 h) sono state analizzate anche a 37°C . In questo caso, il campione è stato equilibrato per 4-5 minuti prima di effettuare l'analisi.

3.6. Caratterizzazione delle NP al TEM

Le NP sono state caratterizzate per forma e dimensione, con due differenti TEM, un JEOL JEM-1011 (con contrasto), che lavora a 100 kV ed un JEOL JEM-100S (senza contrasto), che lavora a 80-100 kV. I campioni da analizzare sono stati preparati depositando una goccia delle NP su un retino di rame, contenete un film di formvar.

Successivamente, ciascun retino è stato messo ad asciugare all'aria, a temperatura ambiente per circa due ore; le NP analizzate con il JEOL JEM-1011 sono state precedentemente contrastate con l'acido fosfotungstico al 2 %.

Una volta ottenute le foto al TEM delle NP, queste sono state misurate (da un minimo di 3 a un massimo di 374 NP) utilizzando il programma Image Tool.

3.7. Caratterizzazione delle NP al Cryo-TEM

Le NP sono state caratterizzate per forma e dimensione anche con un Cryo-TEM, un Zeiss LEO 912 Omega, che lavora a 12 kV. I campioni da analizzare sono stati preparati depositando una goccia delle NP dello spessore di circa 100 nm, su una griglia di alluminio (Quantifoil). I campioni sono poi stati congelati in etano liquido a -170°C, e analizzati alla stessa temperatura.

3.8. Quantificazione spettrofotometrica delle molecole attive

La quantificazione delle molecole attive è stata fatta preparando le S.M. in EtOH delle molecole attive da analizzare. La S.M. dell'Ibu Na è stata preparata anche in acqua distillata. Le S.M. preparate avevano le seguenti concentrazioni:

Ibu:	2,6 mg/mL
Ibu Na:	20 mg/mL
RA:	2,5 mg/mL
AZL 38:	2,5 mg/mL
AZL 6:	2,5 mg/mL

Dalle soluzioni madre sono state poi preparate da 15 a 20 diluizioni seriali a concentrazione nota (i.e. ognuna alla concentrazione di 1/2 rispetto alla precedente). A

questo punto, ciascuna S.M. con le rispettive diluizioni sono state analizzate allo spettrofotometro. Per l'analisi spettrofotometrica, 1 mL di ciascun campione è stato posizionato nella cuvetta di quarzo.

Sono stati così ottenuti gli spettri di assorbimento di ciascuna molecola attiva, alle diverse diluizioni. Gli spettri mostrano a quale lunghezza d'onda, e quanto assorbono le diverse molecole. I dati derivanti dagli spettri sono stati normalizzati rispetto al bianco su Excel, e poi sono stati utilizzati per creare le rette di calibrazione di ciascuna molecola su Origin.

3.9. Percentuale di incapsulazione

La percentuale di incapsulazione è stata calcolata per le NC e NE sottoposte a purificazione (vedi par. 3.4).

Per calcolare la percentuale di incapsulazione, le NP sopra citate sono state centrifugate, ed i filtrati analizzati allo spettrofotometro. Sono state centrifugate anche le NC e le NE vuote, i loro filtrati sono stati analizzati allo spettrofotometro, ed utilizzati come bianchi. Questo ha permesso di poter confrontare gli spettri delle NP contenenti le molecole con quelli delle NP vuote, e quindi di valutare e quantificare (vedi par. 3.8) la presenza eventuali del farmaco.

Ottenuta la concentrazione del farmaco nel filtrato, cioè la quantità di farmaco che non è stata incapsulata nella particella, per differenza si ottiene la percentuale di incapsulazione.

3.10. Analisi dei dati

I dati sperimentali sono stati analizzati ed opportunamente presentati utilizzando i seguenti programmi: Excel e Origin.

PRESENTAZIONE E DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Nel seguente capitolo saranno descritti e discussi i risultati ottenuti dagli esperimenti precedentemente descritti.

4.1. Preparazione delle nanoparticelle lipidiche

La preparazione delle NP è stata abbastanza semplice, una volta che le soluzioni lipofile e idrofile sono state unite, si è dovuto solo aspettare che le formulazioni raggiungessero il volume desiderato (5-7 ore). Le NP lipidiche prodotte avevano l'aspetto di liquidi opalescenti di colore bianco, ad eccezione di quelle contenenti i lipidi fluorescenti, l'AZL 38 e l'AZL 6, che avevano una colorazione giallastra (Fig. 4.1).



Figura 4.1. Alcune formulazioni nanoparticellari preparate in laboratorio.

Come precedentemente detto, le NP sono state conservate in frigorifero per evitare che si potessero rovinare. Tuttavia, dopo circa un mese di conservazione, sia le NC che le NE, tendono a modificare il loro stato liquido. Infatti, il prelievo mediante micropipetta

è reso difficile perché la superficie diventa gelatinosa/gommosa, nonostante l'aspetto macroscopico sembra essere inalterato.

Inoltre, le NP sono sempre state preparate in condizioni di massima pulizia, ma non in condizioni di sterilità. L'assenza della sterilità comporta, con il tempo, la formazione di piccole muffe nere, verdi o rosa, che sono state notate adese alle pareti delle provette contenenti le NP. Nonostante la presenza delle muffe, l'aspetto macroscopico delle NP rimane inalterato.

4.2. Caratterizzazione delle NP al DLS: dimensioni e carica superficiale

In questo paragrafo sono illustrati i risultati della caratterizzazione delle singole NP al DLS. In ogni sotto-paragrafo vengono inizialmente descritti i risultati inerenti le dimensioni (Z-AV, nm) e poi successivamente quelli del potenziale zeta (ZP, mV).

Inoltre, sono riportati i grafici che mostrano i picchi relativi alle dimensioni delle NP percentualmente più abbondanti ed espresse in intensità e in numero. Si è proceduto descrivendo prima i dati delle NC e poi quelli delle NE. In ogni caso, i dati ottenuti dalle singole analisi al DLS (n = 3-5), sono stati analizzati con il programma di gestione dello strumento (Dispersion Technology Software 5.10), esportati su un foglio Excel per essere analizzati relativamente a media e deviazione standard, ed infine graficati utilizzando il programma Origin.

4.2.1. NC e NE Ibu

Nel grafico in Figura 4.2 è mostrato l'andamento delle dimensioni delle **NC Ibu** (101,6 µg/mL) in seguito ai vari trattamenti a 25° (quadrati neri) e a 37°C (cerchi rossi). Gli stessi dati sono anche riportati nella Tabella 4.1 per una più semplice analisi e relativa discussione.

Come si può vedere dal grafico, a 25°C le dimensioni delle NCs Ibu AP (227,5 nm) aumentano notevolmente (ca 76,8 nm \equiv 33,8 %) in seguito alla centrifugazione. Un significativo aumento delle dimensioni delle NC Ibu AP si può osservare anche dopo le diverse dialisi (12, 24 e 48 h), rispettivamente di ca 34,8 (ca 15,3 %), 48,5 (ca 21,3 %) e 56,4 nm (ca 24,8 %).

Per quanto riguarda i dati ottenuti equilibrando le formulazioni a 37°C per 4-5 min, si può notare che la temperatura favorisce la diminuzione delle dimensioni rispettivamente di ca 18,7 nm (ca 8,2 %) per AP e 8,6 nm (ca 3,3 %) per APD 12 h.

Tuttavia, come precedentemente osservato, la dialisi determina comunque un incremento, seppur maggiore, delle dimensioni ca 44,9 nm (ca 21,5 %).

Infine, tutte le deviazioni standard a 25°C sono contenute, e sono comprese tra circa lo 0,3 e l'1,1 % del valore medio (Tab. 4.1). Anche a 37°C le deviazioni standard sono modeste, rappresentando ca l'1,2 % del valore medio delle AP, e lo 0,2 % del valore medio delle APD 12 h (Tab. 4.1).

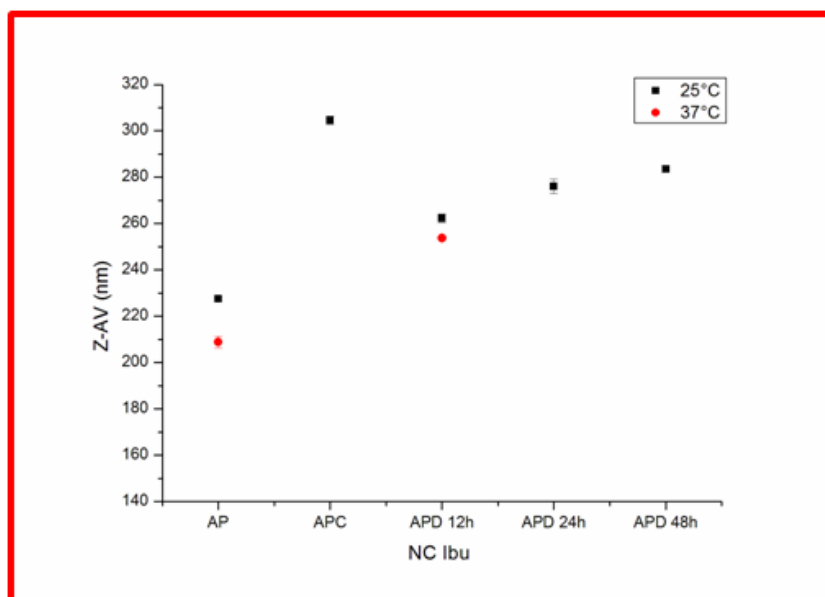


Figura 4.2. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NC Ibu.

Tabella 4.1. Dimensioni delle NC Ibu.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AV	SD	Z-AV	SD
AP	227,5	0,8	208,8	2,6
APC	304,3	1,9		
APD 12 h	262,3	1,8	253,7	0,4
APD 24 h	276,0	3,0		
APD 48 h	283,9	1,4		

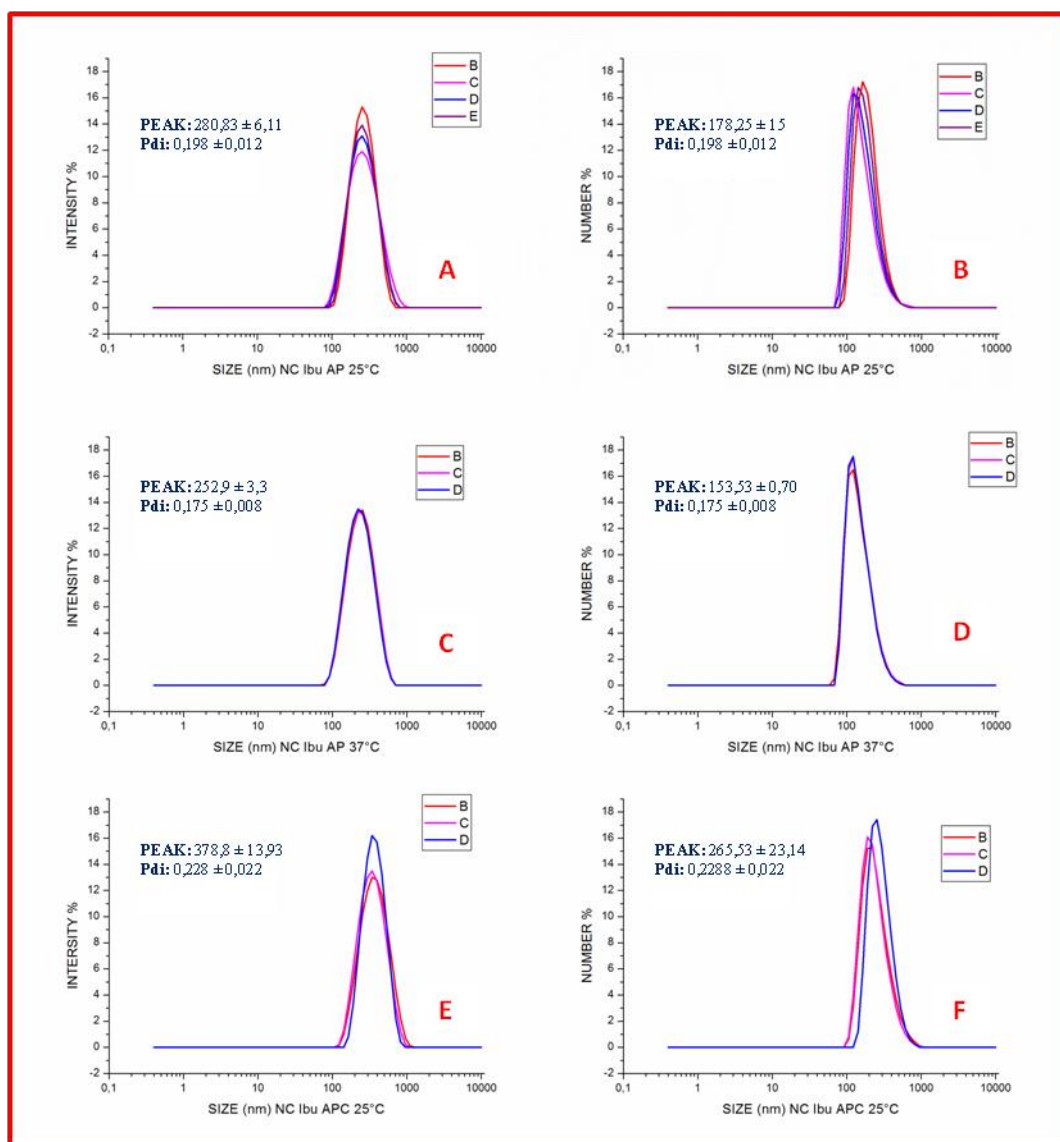


Figura 4.3. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NC Ibu. A-B) AP a 25°C; C-D) AP a 37°C; E-F) APC a 25°C.

Nelle Figure 4.3 e 4.4 vengono mostrati i grafici generati dal DLS relativamente alle dimensioni espresse in intensità e numero, a 25° e 37°C, delle varie formulazioni delle NC Ibu.

L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili e presentano un piccolo "shift" (e.g., Fig 4.2.A vs Fig. 4.2.B). Tuttavia, la sovrapponibilità sia rispetto all'altezza che allo shift è completa quando il campione è riscaldato (vedi e.g. Fig. 4.2.A-D). Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità. Infine, in nessun caso (Fig. 4.2 e 4.3) particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi.

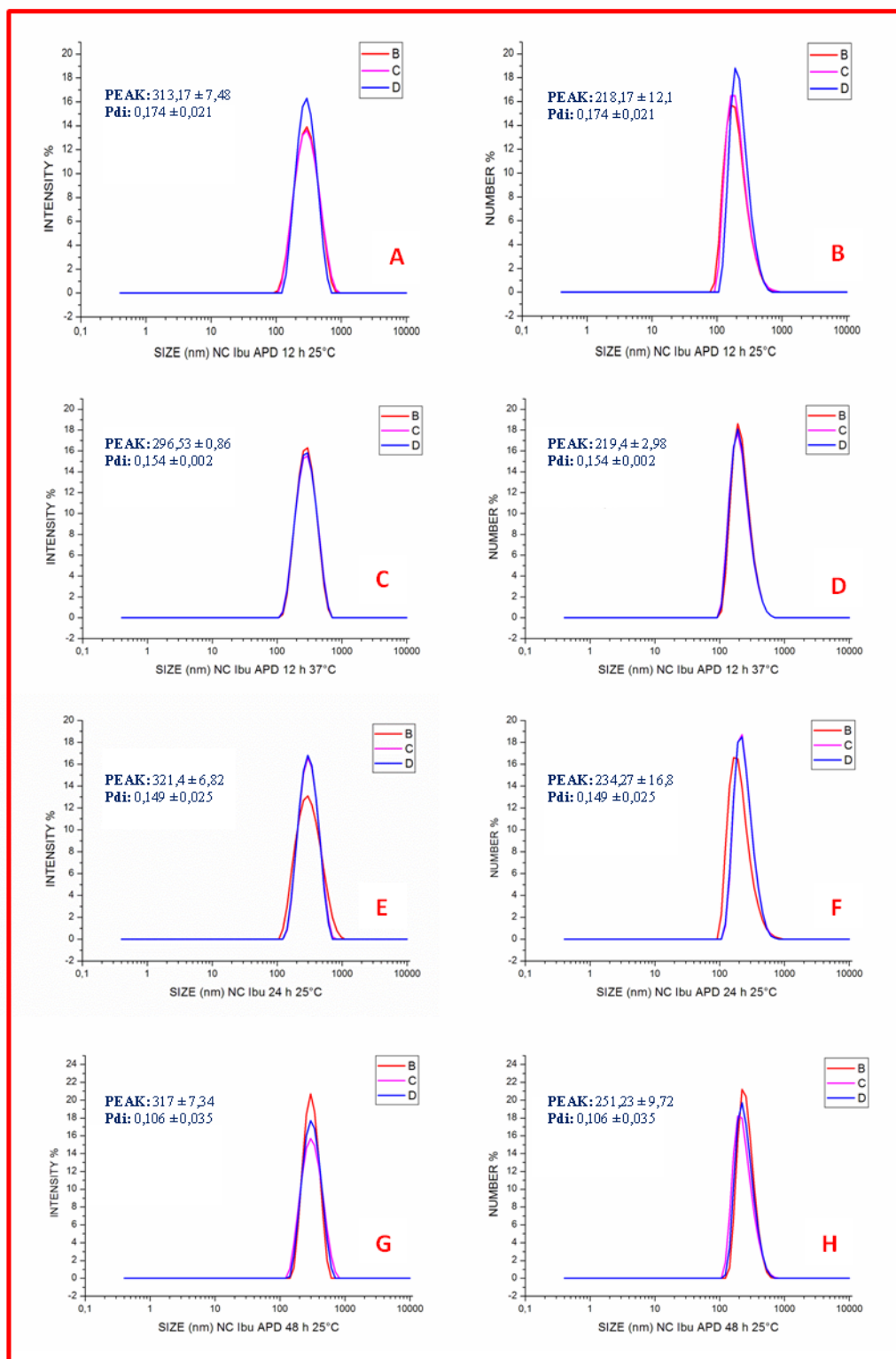


Figura 4.4. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NC Ibu APD. A-B) APD 12 h a 25°C; C-D) APD 12 h a 37°C; E-F) APD 24 h a 25°C; G-H) APD 48 h a 25°C.

Tutti i dati presentati nelle Figure 4.3 e 4.4 sono riportati nella Tabella 4.2 e nella Figura 4.5 dove risulta più semplice commentarli. Inoltre, l'ultimo sotto-paragrafo della

sezione 4.2 presenterà delle tabelle riassuntive per un confronto tra le varie NC e NE supplementate con i differenti farmaci.

Come si vede bene dalla Figura 4.5, l'andamento delle dimensioni, e di come queste si modificano rispetto ai trattamenti di purificazione è molto simile. Si nota che le dimensioni ottenute in modalità Z-Ave si trovano grosso modo a metà tra le altre due. Si parla comunque di una differenza di circa 100 nm (e.g. AP int. vs AP num; Fig 4.5.) che non risulta essere indifferente quando si guardano le cose da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni).

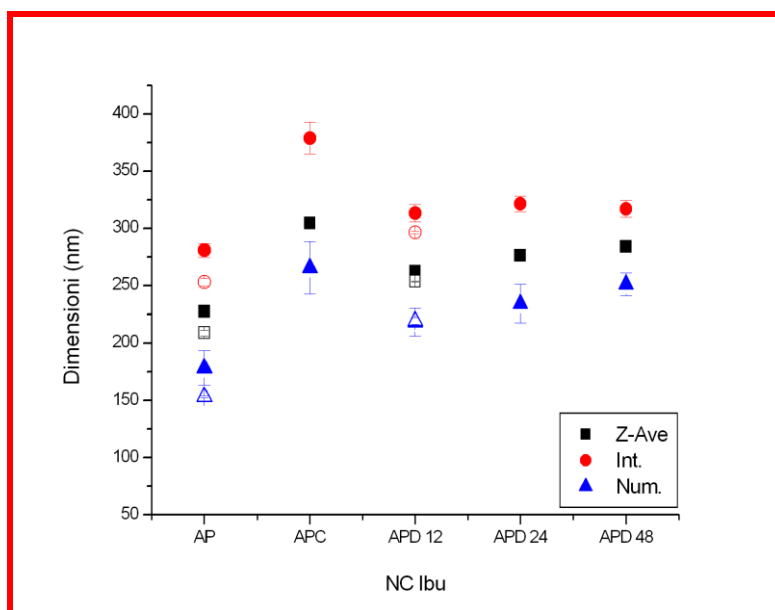


Figura 4.5. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NC Ibu. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

In Tabella 4.2 sono mostrati anche i valori di PDI. Lo strumento da noi utilizzato dà un unico valore indipendentemente da come le dimensioni vengono calcolate (e.g., Z-Ave vs Int). Il valore di PDI rappresenta l'indice di polidispersità; indica cioè se un campione è costituito da popolazioni differenti di NP. Come precedentemente indicato, PDI inferiori o uguali a 0,1 indicano campioni monodispersi, valori superiori o uguali a 0,5 campioni polidispersi. Prendendo in considerazione i PDI a 25°C, si può vedere un incremento di 0,030 in seguito alla centrifugazione, mentre dopo le diverse dialisi si osserva una diminuzione di 0,024, 0,049 e 0,092 (rispettivamente per le APD 12, 24 e 48 h). Anche a 37°C in seguito alle 12 ore di dialisi, si osserva una diminuzione di 0,021.

Tabella 4.2. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NC Ibu.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
AP	280,8 ± 6,1	178,3 ± 15,0	0,20 ± 0,01	252,9 ± 3,3	153,3 ± 0,7	0,18 ± 0,01
APC	378,8 ± 13,9	265,5 ± 23,1	0,23 ± 0,02			
APD 12 h	313,2 ± 7,5	218,2 ± 12,1	0,17 ± 0,02	296,5 ± 0,9	219,4 ± 3,0	0,15 ± 0,002
APD 24 h	321,4 ± 6,8	234,3 ± 16,8	0,15 ± 0,03			
APD 48 h	317,0 ± 7,3	251,2 ± 9,7	0,11 ± 0,04			

Confrontando i PDI a 25° e a 37°C, delle formulazioni AP e APD 12 h, si può notare una diminuzione rispettivamente di 0,023 e 0,020. In altre parole, la centrifugazione aumenta la polidispersità, mentre la dialisi e la temperatura la diminuisce.

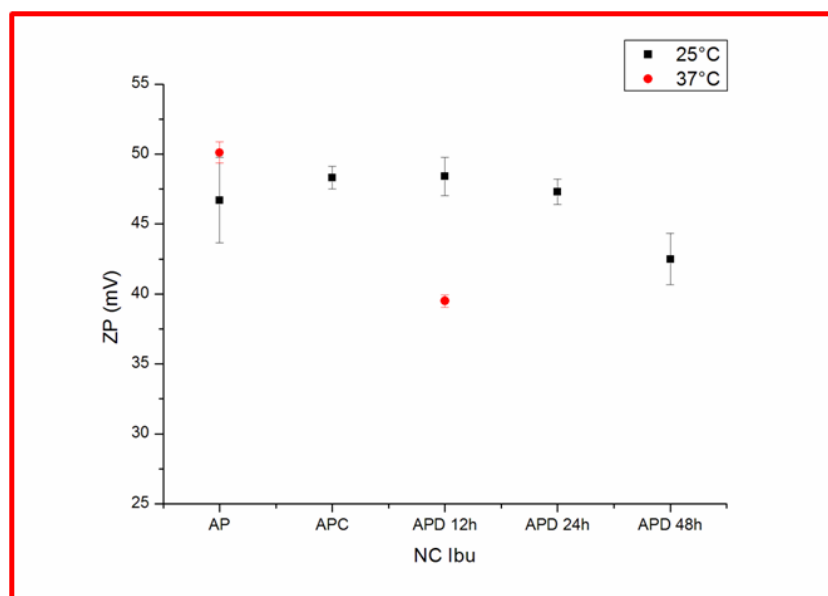


Figura 4.6. Confronto fra i potenziali zeta delle varie formulazioni NC Ibu.

Un altro dato importante che è stato valutato è il potenziale zeta (ZP), e come questo variasse in funzione delle diverse metodiche di purificazione (Fig. 4.6, e Tab. 4.3).

Osservando la Figura 4.6, si vede che a 25°C il ZP delle NC Ibu AP (46,7 mV) in seguito alla centrifugazione e alle dialisi 12 e 24 h aumenta in modo non rilevante rispettivamente di ca 1,6 (ca 3,4 %), 1,7 (ca 3,6 %) e 0,6 mV (ca 1,3 %), mentre dopo le 48 ore di dialisi il ZP diminuisce in maniera non significativa di ca 4,2 mV (ca 9,0 %). A 37°C, le NC Ibu APD 12 h mostrano una significativa diminuzione della carica di ca 10,6 mV (ca 21,2 %) rispetto alle AP. L'aumento della temperatura determina un incremento non rilevante di ca 3,4 mV (ca 7,3 %) del ZP delle AP, ed una significativa diminuzione di ca 8,9 mV (ca 18,4 %) del ZP delle APD 12 h.

Infine, a 25°C tutte le deviazioni standard sono contenute. Le deviazioni standard sono comprese tra l'1,3 e al 6,5 % del valore medio delle formulazioni. A 37°C le deviazioni standard sono più contenute, rispetto a quelle mostrate a 25°C, e rappresentano l'1,5 e l'1,1 % del valore medio delle AP e APD 12 h, rispettivamente.

Tabella 4.3. Potenziale zeta delle NC Ibu.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
AP	46,7	3,05	50,1	0,76
APC	48,3	0,81		
APD 12 h	48,4	1,37	39,5	0,44
APD 24 h	47,3	0,92		
APD 48 h	42,5	1,83		

Sembrerebbe quindi che a 25°C la carica non sia influenzata dal trattamento subito. Questa differenza si noterebbe solo in funzione della temperatura per le APD 12h.

Nel grafico in Figura 4.7 è messo in evidenza l'andamento delle dimensioni delle **NE Ibu** (56,6 µg/mL) in seguito ai vari trattamenti a 25° (quadrati neri) e a 37°C (cerchi rossi). Nella Tabella 4.4 sono mostrati gli stessi dati della Figura 4.7, per una comprensione ed una discussione dei dati più semplice e veloce.

Osservando il grafico in Figura 4.7, si nota che a 25°C le dimensioni delle NE Ibu AP (142,4 nm) in seguito alla centrifugazione diminuiscono in modo non significativo (ca 1,1 nm \equiv 0,8 %). Le NE Ibu APD 12, 24 e 48 h a 25°C mostrano una significativa diminuzione delle dimensioni, rispetto alle NE Ibu AP, rispettivamente di ca 3,6 (ca 2,5

%) 3,8 (ca 2,7 %) e 5,3 (ca 3,7 %) nm. I dati ottenuti equilibrando le formulazioni a 37°C (4-5 minuti), mostrano un significativo aumento delle dimensioni delle NE Ibu AP di ca 2,2 (ca 1,5 %) nm, mentre si osserva un aumento non rilevante di ca 0,9 nm (ca 0,7 %) delle APD 12 h. L'aumento della temperatura determina una rilevante diminuzione delle dimensioni di ca 4,9 nm (ca 3,4 %) delle APD 12 h.

Per quanto riguarda le deviazioni standard, sono tutte contenute e rappresentano mediamente lo 0,4 e l'1,5 % del valore medio delle dimensioni a 25°C. Anche a 37°C le deviazioni standard sono moderate, rappresentando lo 0,6 % del valore medio delle AP, e lo 0,6 % del valore medio delle formulazioni APD 12 h.

È interessante notare che mentre le dimensioni delle NC Ibu tendono ad aumentare in seguito ai trattamenti di purificazione, le NE Ibu mostrano un andamento opposto e maggiormente contenuto.

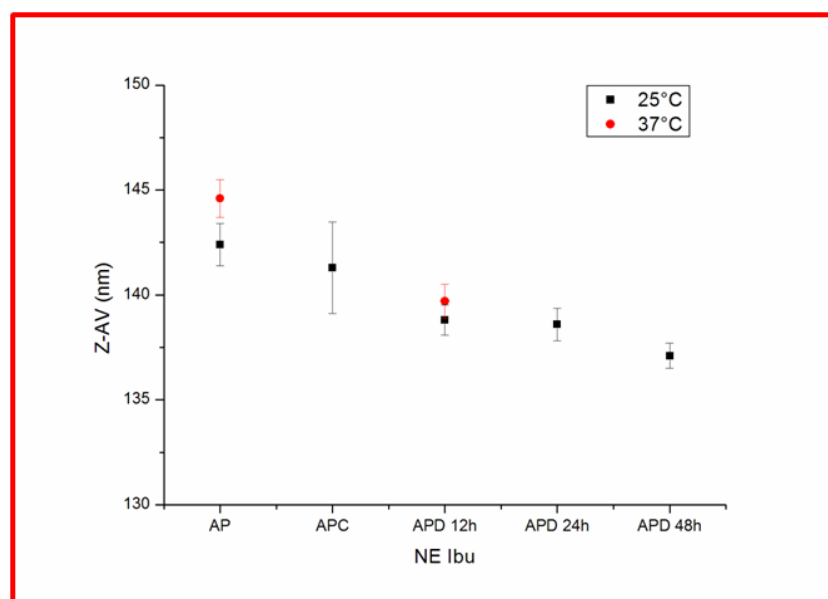


Figura 4.7. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NE Ibu.

I grafici in Figura 4.8 e 4.9 mostrano le distribuzioni dimensionali originate dal DLS relativamente alle dimensioni espresse in intensità ed in numero, a 25° e a 37°C, delle varie formulazioni delle NE Ibu.

L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili e presentano un minimo "shift" (e.g., Fig 4.8.E vs Fig. 4.8.F).

Tabella 4.4. Dimensioni delle NE Ibu.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AV	SD	Z-AV	SD
AP	142,4	1,02	144,6	0,9
APC	141,3	2,2		
APD 12 h	138,8	0,7	139,7	0,8
APD 24 h	138,6	0,8		
APD 48 h	137,1	0,6		

Tuttavia, la sovrapposibilità sia rispetto all'altezza che allo shift migliora quando il campione AP è stato riscaldato (Fig. 4.8.A-D). Non si può dire altrimenti per il campione APD 12 h (Fig. 4.9 A-D). Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità. Infine, in nessun caso (Fig. 4.8 e 4.9) particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi.

Tutti i dati presentati nelle Figure 4.8 e 4.9 sono riportati nella Tabella 4.5 e nella Figura 4.10 dove risulta più semplice commentarli. Inoltre, l'ultimo sotto-paragrafo della sezione 4.2 presenterà delle tabelle riassuntive per un confronto tra le varie NC e NE supplementate con i differenti farmaci.

Tabella 4.5. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NE Ibu.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
AP	164,4 ± 2,3	94,8 ± 7,1	0,13 ± 0,02	166,3 ± 0,4	95,2 ± 4,1	0,12 ± 0,002
APC	162,9 ± 1,3	92,2 ± 11,1	0,13 ± 0,03			
APD 12 h	157,5 ± 1,2	94,9 ± 2,2	0,11 ± 0,02	156,8 ± 1,2	97,8 ± 4,9	0,10 ± 0,01
APD 24 h	157,9 ± 2,7	93,8 ± 5,4	0,11 ± 0,02			
APD 48 h	152,4 ± 1,4	98,1 ± 2,1	0,09 ± 0,01			

Come si vede bene dalla Figura 4.10, l'andamento delle dimensioni, e di come queste si modificano rispetto ai trattamenti di purificazione è molto simile. Si nota che

le dimensioni ottenute in modalità Z-Ave si trovano comprese tra le altre due, ma a differenza di quanto capita nelle NC Ibu, sono più vicine alle dimensioni ottenute in modalità “intensità”.

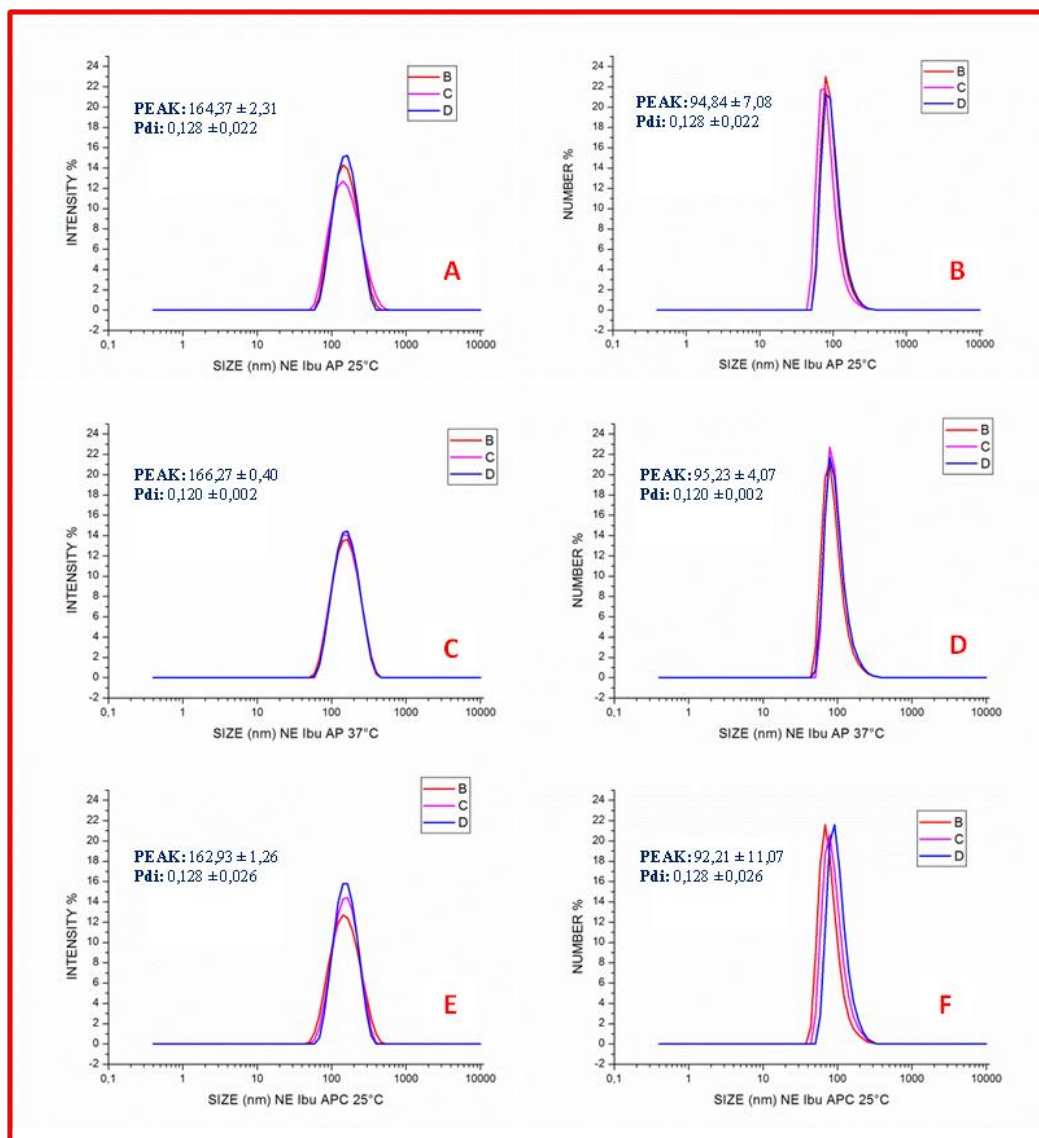


Figura 4.8. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NE Ibu. A-B) AP a 25°C; C-D) AP a 37°C; E-F) APC a 25°C.

Si parla comunque di una differenza massima di circa 75 nm (e.g. AP int. vs AP num; Fig 4.10.) che non risulta essere indifferente quando si guardano le cose da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni). Tuttavia, per ogni insieme di dati, le differenze relativamente ai trattamenti subiti sono invece minime, se viste dal punto di vista biologico.

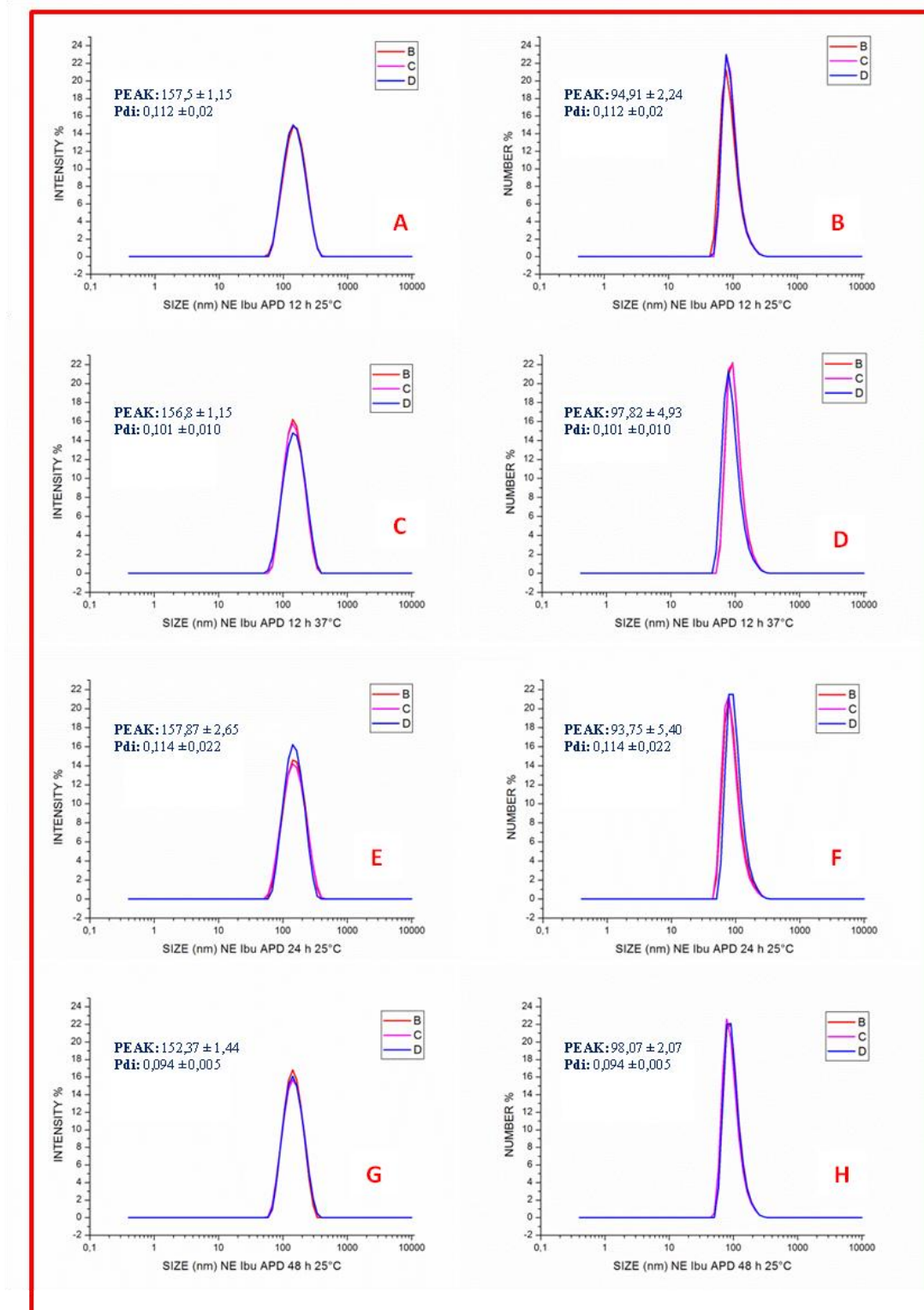


Figura 4.9. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NE Ibu. A-B) APD 12 h a 25°C; C-D) APD 12 h a 37°C; E-F) APD 24 h a 25°C; G-H) APD 48 h a 25°C.

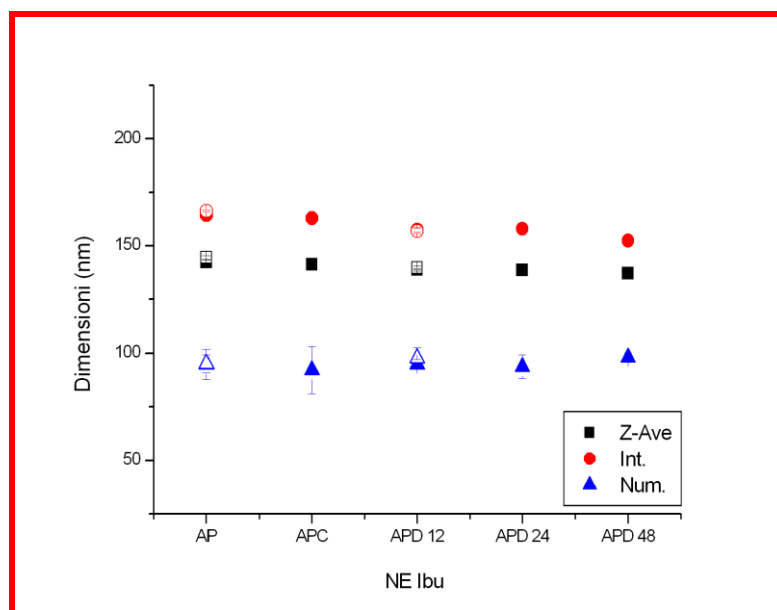


Figura 4.10. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NE Ibu. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

In Tabella 4.5 sono mostrati anche i valori di PDI. Relativamente a questi valori misurati a 25°C, in seguito alla centrifugazione non si osserva nessuna variazione, mentre in seguito alle dialisi a 12, 24 e 48 ore si può vedere una riduzione rispettivamente di 0,02, 0,01 e di 0,03. Anche a 37°C in seguito alle 12 ore di dialisi si osserva una diminuzione del PDI, di 0,02. Infine, mettendo a confronto i PDI a 25° e a 37°C delle formulazioni AP e APD 12 h, si nota una riduzione in entrambi i casi di 0,01.

In altre parole, la dialisi e la temperatura diminuiscono i PDI in maniera non significativa.

Tabella 4.6. Potenziale zeta delle NE Ibu.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
AP	-55,7	1,4	-63,8	1,7
APC	-55,5	1,3		
APD 12 h	-52,3	0,2	-58,1	0,9
APD 24 h	-44,2	0,9		
APD 48 h	-38,8	1,5		

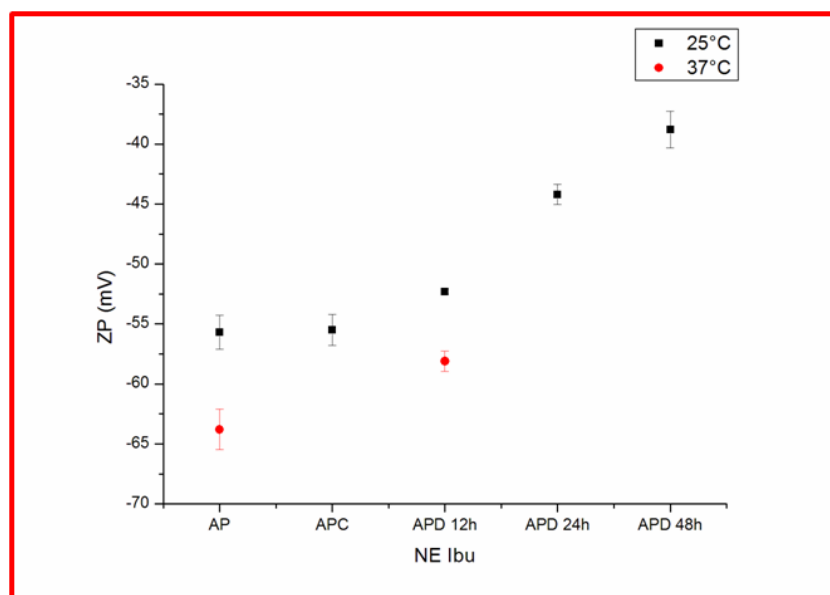


Figura 4.11. Confronto fra i potenziali zeta delle varie formulazioni NE Ibu.

Relativamente al potenziale zeta, nella Figura 4.11 si mostrano i valori di ZP delle NE Ibu in seguito ai vari trattamenti, a 25° (quadrati neri) e a 37°C (cerchi rossi), e questi stessi dati sono riportati anche nella Tabella 4.6.

Come si può vedere dalla Figura 4.11, a 25°C il potenziale zeta delle NE Ibu AP (-55,7 mV) aumenta in modo non rilevante di ca 0,2 mV (ca 0,4 %) in seguito alla centrifugazione. Al contrario, un significativo aumento del potenziale zeta delle NE si può osservare in seguito alle dialisi a 12, 24 e 48 ore (rispettivamente di ca 3,4, 11,5 e 16,9 mV).

In percentuale, gli incrementi del potenziale in seguito alle 12, 24 e 48 ore sono rispettivamente di ca 6,1, 20,7 e 30,3 %. Inoltre, a 37°C si osserva un importante aumento del potenziale zeta dopo le 12 ore di dialisi di ca 5,7 mV (ca 8,9 %). Confrontando i potenziali delle formulazioni AP e APD 12 h a 25° e a 37°C, si vede una rilevante diminuzione rispettivamente di ca 8,1 (ca 14,5 %) e 5,8 mV (ca 11,1 %).

Per quanto riguarda le deviazioni standard, sono abbastanza contenute sia a 25° (0,4 e il 3,9 % del valore medio) che a 37°C (2,7 e l'1,5 % del valore medio rispettivamente delle AP e APD 12 h).

Pertanto, a differenza di quanto capita per le NC Ibu, sembrerebbe quindi che a 25°C la carica sia influenzata solo dalla dialisi e sicuramente dalla temperatura.

Commenti finali

- Le NC Ibu AP (101,6 µg/mL) risultano essere più grandi delle NE Ibu AP (56,6 µg/mL) per la presenza della capsula di chitosano. A 25°C le NC differiscono dalle NE Ibu AP, APC, APD 12, 24 e 48 h, rispettivamente, per 85,1, 163, 123,5, 137,4 e 146,8 nm. La differenza di dimensioni a 37°C, tra le NC e le NE Ibu AP e APD 12 h è pari a 64,2 e 114 nm.
- Le NC sono cariche positivamente perché il chitosano è carico positivamente.
- Le NE sono cariche negativamente perché le teste dei lipidi, che sono posizionati verso il fronte acquoso, sono carichi, nell'insieme, negativamente.
- L'ibuprofene è un acido debole (pKa 4,5 a 25°C) che si dissolve poco in acqua (40 µg/mL a 37°C) e in soluzioni acide. È molto probabile che si disponga con l'unico gruppo acido verso l'ambiente acquoso, oppure che sia intrappolata nell'interno delle code lipidiche.
- NC e NE sembrano comportarsi in maniera speculare rispetto ai trattamenti subiti.
 - Le *dimensioni* aumentano per le NC, rimangono abbastanza stabili per le NE.
 - La *carica* rimane stabile per le NC, aumenta per le NE in seguito alla dialisi.
 - Il *PDI* aumenta per centrifugazione delle NC mentre diminuisce per dialisi e temperatura. Nelle NE il PDI rimane abbastanza stabile. Il PDI delle NE è generalmente inferiore a quello delle NC.

4.2.2. NC e NE Ibu Na

Nel grafico in Figura 4.12 è mostrato l'andamento delle dimensioni delle **NC Ibu Na** (65,8 µg/mL) in seguito ai vari trattamenti, sia a 25° (quadrati neri) che a 37°C (cerchi rossi). Gli stessi dati sono anche riportati nella Tabella 4.7 per una più semplice analisi e relativa discussione.

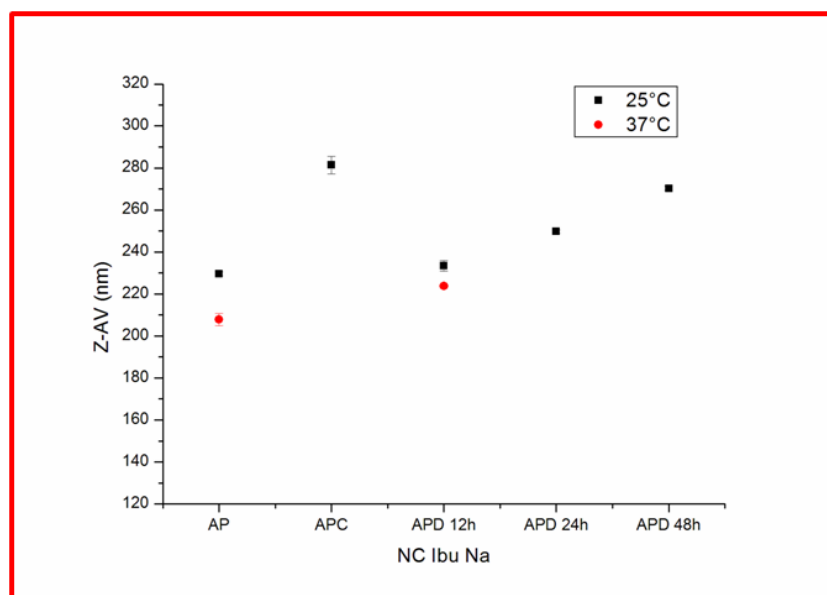


Figura 4.12. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NC Ibu Na..

Tabella 4.7. Dimensioni delle NC Ibu Na.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AV	SD	Z-AV	SD
AP	229,7	0,9	207,8	2,9
APC	281,4	1,9		
APD 12 h	233,4	2,5	223,8	1,0
APD 24 h	249,7	0,9		
APD 48 h	270,3	1,0		

Osservando la Figura 4.12, si può vedere che a 25°C le dimensioni delle NC Ibu Na AP (229,7 nm) aumentano in modo significativo sia in seguito alla centrifugazione (ca 51,7 nm \equiv ca 22,5 %), sia dopo le dialisi a 12, 24 e 48 ore di ca 3,7, 2,0 e 40,6 nm (ca 1,6, 8,7 e 17,7 %).

Per quanto riguarda i dati ottenuti dopo l'equilibratura delle formulazioni a 37°C per 4-5 min, si può notare che la temperatura favorisce la diminuzione delle dimensioni di ca 21,9 (ca 9,5 %) nm per le AP e di ca 9,6 nm (ca 4,1 %) per le APD 12h. Come osservato anche a 25°C, la dialisi a 37°C determina comunque un rilevante incremento delle dimensioni di ca 16 nm (ca 7,7 %).

Infine, tutte le deviazioni standard a 25°C sono contenute e sono comprese tra ca lo 0,4 e l'1,1 % del valore medio (Tab. 4.7). Le deviazioni standard sono moderate anche a

37°C, dove rappresentano l'1,4 % del valore medio delle AP, e lo 0,4 % del valore medio delle APD 12 h (Tab. 4.7).

Nelle Figure 4.12 e 4.13 sono mostrati i grafici generati dal DLS, relativamente alle dimensioni espresse in intensità e in numero, a 25° e a 37°C, delle varie formulazioni NC Ibu Na. L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in numero hanno solo poche volte un'altezza maggiore di quelli in intensità. Inoltre, i picchi espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapponibili l'uno con l'altro (certe volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sono sempre perfettamente sovrapponibili, e mostrano un piccolo "shift" (e.g., Fig. 4.12 E vs Fig. 4.12 F). Comunque, la sovrapponibilità, relativamente all'altezza e allo shift, è completa quando il campione è riscaldato (vedi e.g. Fig.4.12 C-D). Infine, in nessun caso (Fig. 4.12 e 4.13) particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi.

Tutti i dati presentati nelle Figure 4.12 e 4.13 sono riportati nella Tabella 4.8 e nella Figura 4.14 dove risulta più semplice commentarli.

Come mostrato dalla Figura 4.14, l'andamento delle dimensioni, e di come queste si modificano rispetto ai trattamenti di purificazione è molto simile. Si può vedere che le dimensioni ottenute in modalità Z-Ave si trovano più o meno a metà tra le altre due. Si parla comunque di una differenza di circa 100 nm (e.g. AP int. Vs AP num; Fig. 4.14) che non risulta essere indifferente quando le cose si guardano da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni).

Nella Tabella 4.8 sono mostrati i valori di PDI. Per quanto riguarda i PDI a 25°C, si può vedere un incremento in seguito alla centrifugazione di 0,03, mentre dopo le dialisi a 12, 24 e 48 h si osserva una progressiva diminuzione, rispettivamente di 0,02, 0,06 e di 0,01.

A 37°C in seguito alle 12 ore di dialisi non si osserva nessuna variazione dei PDI. Mettendo a confronto i PDI a 25 e 37°C, non si rileva nessuna modificazione per le AP, mentre si ha un aumento di 0,02 per le APD 12 h. Quindi, la centrifugazione aumenta la polidispersità, mentre la dialisi la diminuisce. La temperatura in un caso non altera la polidispersità (per le AP), in un altro la incrementa (per le APD 12 h).

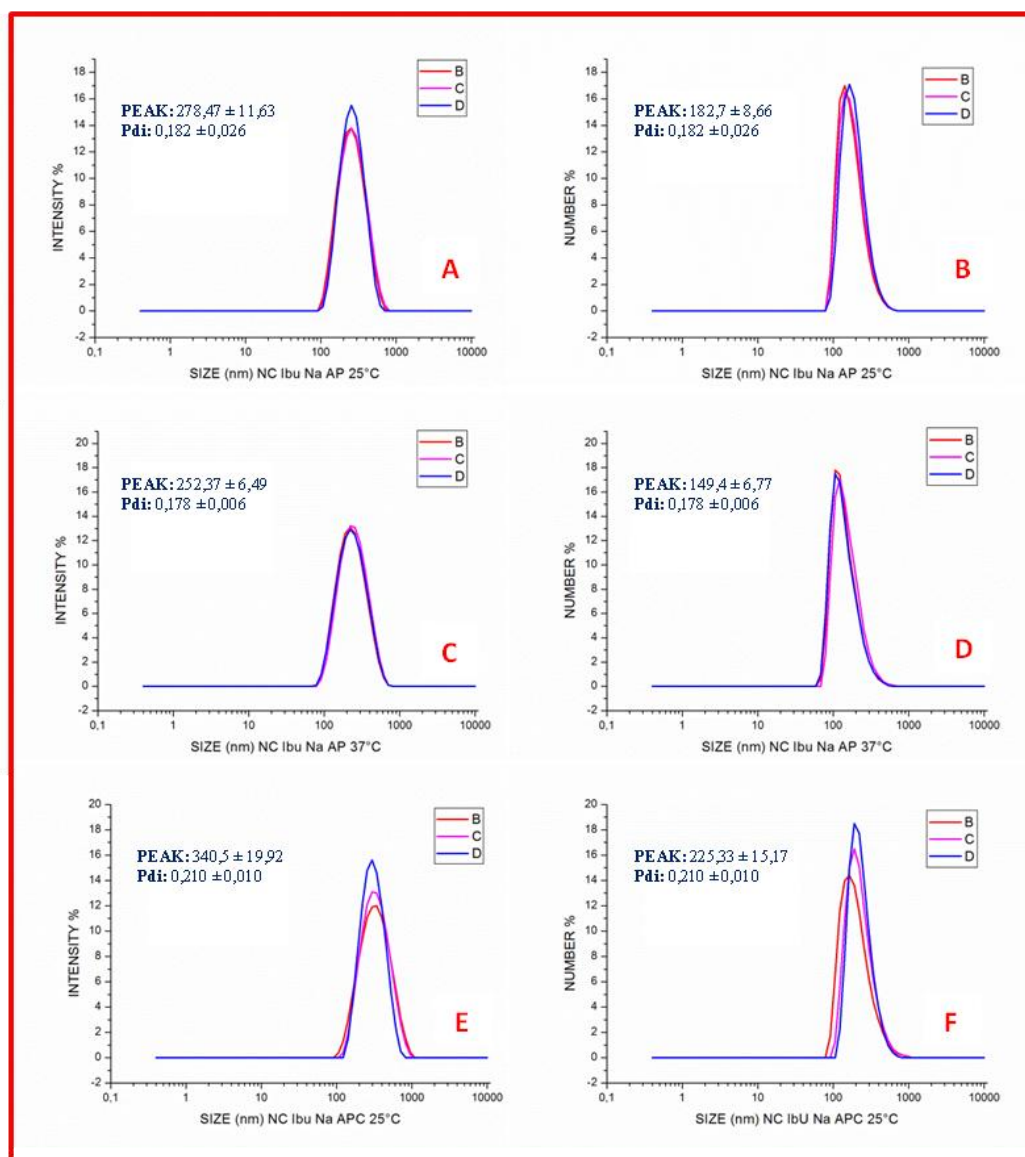


Figura 4.12. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NC Ibu Na. A-B) AP a 25°C; C-D) AP a 37°C; E-F) APC a 25°C.

Tabella 4.8. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NC Ibu Na.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
AP	278,5 ± 11,6	182,7 ± 8,7	0,18 ± 0,03	252,4 ± 6,5	149,4 ± 6,8	0,18 ± 0,01
APC	340,5 ± 19,9	225,3 ± 15,2	0,21 ± 0,01			
APD 12 h	272,7 ± 10,5	200,3 ± 9,7	0,16 ± 0,02	269,3 ± 3,5	172,8 ± 3,0	0,18 ± 0,004
APD 24 h	281,9 ± 1,4	219,7 ± 4,1	0,12 ± 0,004			
APD 48 h	298,5 ± 1,6	232,4 ± 11,2	0,11 ± 0,03			

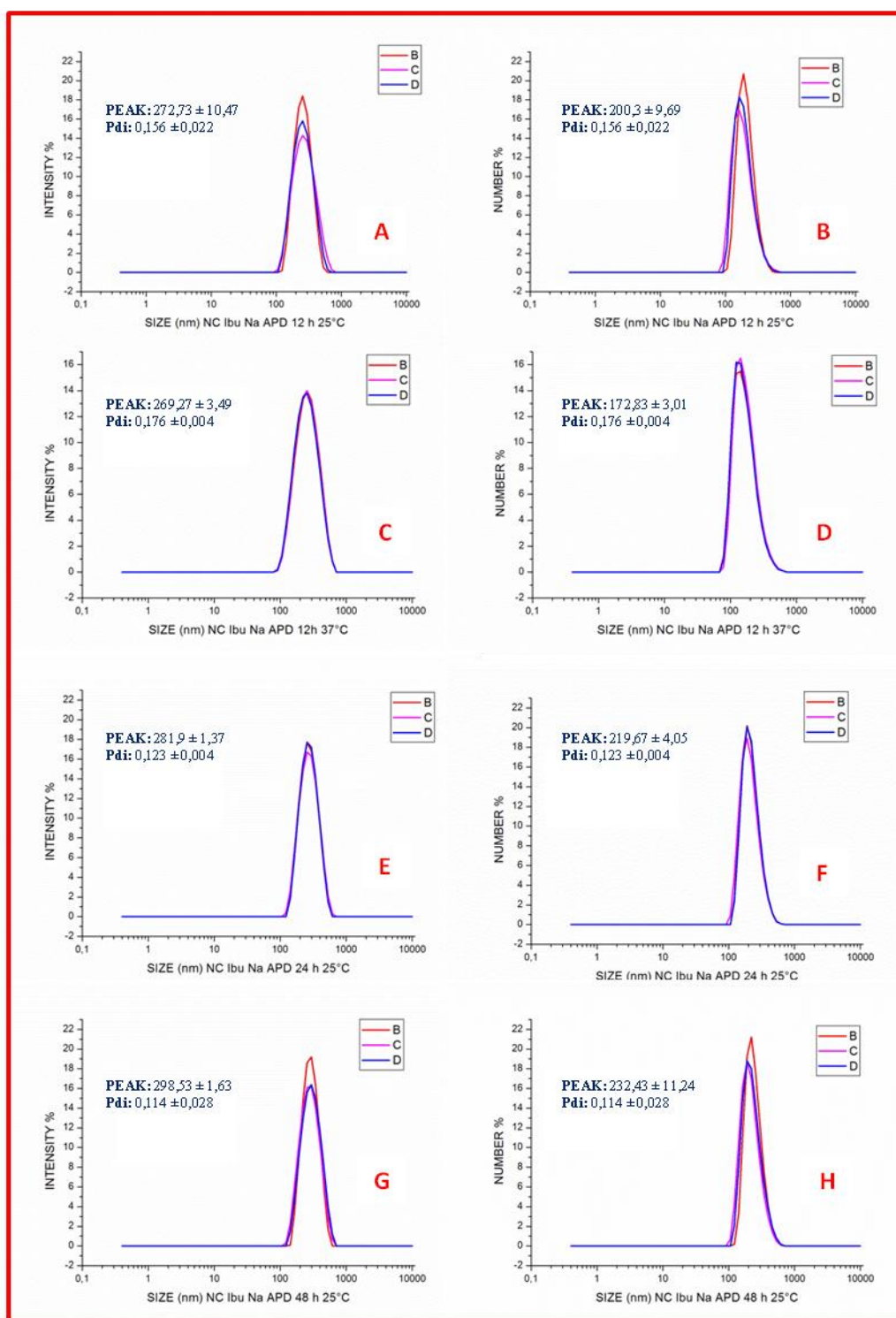


Figura 4.13. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NC Ibu Na. A-B) APD 12 h a 25°C; C-D) APD 12 h a 37°C; E-F) APD 24 h a 25°C; G-H) APD 48 h a 25°C.

Un altro dato importante che è stato valutato è il potenziale zeta (ZP); si è studiato anche come questo variasse in funzione delle diverse metodiche di purificazione (Fig. 4.15, e Tab. 4.9).

Osservando la Figura 4.15 si può vedere che il potenziale zeta delle NC Ibu Na AP (ca 51,5 mV) a 25°C diminuisce in modo significativo sia dopo la centrifugazione di ca 6,3 mV (ca 12,2 %) che dopo le dialisi a 12, 24 e 48 h di ca 22,4, 6,1 e 8,6 nm (ca 43,5, 11,8 e 20,1 %).

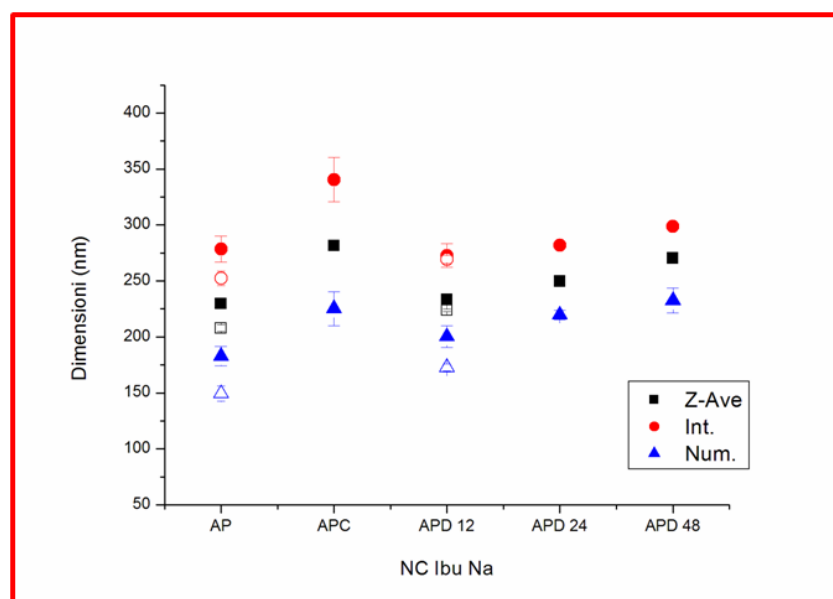


Figura 4.14. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NC Ibu Na. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

Tabella 4.9. Potenziale zeta delle NC Ibu Na.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
AP	51,5	0,1	45,8	2,6
APC	45,2	0,4		
APD 12 h	29,1	0,3	43,4	0,3
APD 24 h	45,4	0,9		
APD 48 h	42,9	0,9		

Anche se mostrato, il valore di APD 12h non si ritiene che sia veritiero.

I dati ottenuti equilibrando i campioni a 37°C mostrano una diminuzione del potenziale zeta delle NC Ibu Na AP di ca 5,7 mV (ca 11,1 %), mentre le APD 12 h

aumentano il loro potenziale zeta di ca 14,3 mV (ca 49,1 %). L'aumento della temperatura determina una diminuzione non significativa del potenziale delle APD 12 h di ca 2,4 mV (ca 5,24 %), rispetto alle AP.

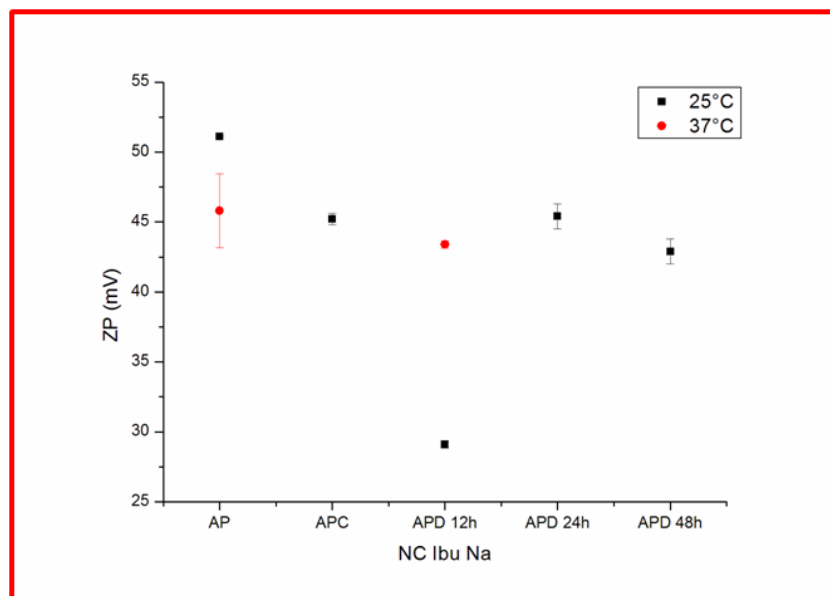


Figura 4.15. Confronto fra i potenziali zeta delle varie formulazioni NC Ibu Na.

Infine, a 25°C tutte le deviazioni standard sono contenute, e sono comprese tra ca lo 0,1 e il 2,1 % del valore delle formulazioni. Anche a 37°C le deviazioni standard sono contenute e corrispondendo ca al 5,7 e allo 0,6 % del valore delle AP e APD 12 h.

Sembrerebbe quindi che a 25°C la carica sia influenzata in modo rilevante dalle 12 ore di dialisi. Anche la temperatura sembra influenzare la carica delle APD 12 h.

Il grafico in Figura 4.16 mostra la variazione delle dimensioni delle **NE Ibu Na** (96,2 µg/mL) in seguito ai vari trattamenti, sia a 25° (quadrati neri) che a 37°C (cerchi rossi), e gli stessi dati sono riportati nella Tabella 4.10, per una comprensione ed un'analisi più semplice e veloce.

Osservando la Figura 4.16, si vede che a 25°C le dimensioni delle NE Ibu Na AP (144,8 nm) in seguito alla centrifugazione diminuiscono in modo non significativo di ca 0,6 nm (ca 0,4 %). Al contrario, in seguito alle tre dialisi (12, 24 e 48 h) si può notare una rilevante diminuzione delle dimensioni rispettivamente di ca 5,9, 6,2 e 5,5 nm (ca 4,1, 4,28 e 3,8 %).

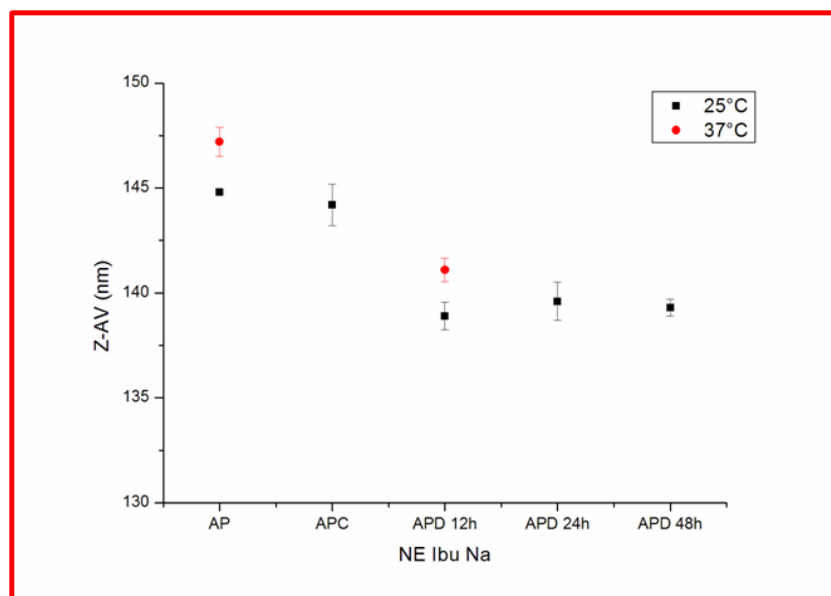


Figura 4.16. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NE Ibu Na.

L'aumento della temperatura a 37°C determina, in seguito alle 12 ore di dialisi, una significativa diminuzione delle dimensioni delle NE Ibu Na di ca 6,1 nm (ca 4,1 %).

Confrontando le dimensioni ottenute a 25° e a 37°C, si può vedere un rilevante aumento delle NE Ibu Na AP di ca 2,4 nm (ca 1,7 %) e delle APD 12 h di ca 2,2 nm (ca 1,6 %).

Prendendo in considerazione le deviazioni standard, si nota che sono molto contenute, sia a 25° che a 37°C. In percentuale, le deviazioni standard a 25°C sono comprese tra lo 0,1 e lo 0,7 % del valore medio delle formulazioni. A 37°C le deviazioni standard rappresentano lo 0,5 % del valore medio delle AP, e lo 0,4 % del valore medio delle APD 12 h.

È interessante notare che mentre le dimensioni delle NC Ibu Na tendono ad aumentare in seguito ai vari trattamenti di purificazione, le NE Ibu Na mostrano opposto e comunque contenuto.

Nelle Figure 4.17 e 4.18 sono mostrati i grafici generati dal DLS, riguardanti le dimensioni espresse in intensità e in numero, delle varie formulazioni NE Ibu Na a 25° e a 37°C.

L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili e presentano un minimo "shift" (e.g., Fig 4.17 E vs Fig. 4.17 F).

Tabella 4.10. Dimensioni delle NE Ibu Na.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AV	SD	Z-AV	SD
AP	144,8	0,1	147,2	0,7
APC	144,2	1,0		
APD 12 h	138,9	0,7	141,1	0,6
APD 24 h	138,6	0,9		
APD 48 h	139,3	0,4		

Tuttavia, la sovrapposibilità sia rispetto all'altezza che allo shift migliora quando il campione APD 12 h è stato riscaldato (Fig. 4.18 A-D). Non si può dire altrimenti per il campione AP (Fig. 4.17 A-D). Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità. Infine, in nessun caso (Fig. 4.17 e 4.18) particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi.

Tutti i dati delle Figure 4.17 e 4.18 sono riportati anche nella Tabella 4.11, e nella Figura 4.19 per una semplicità di comprensione.

Come si vede bene dalla Figura 4.19, l'andamento delle dimensioni, e di come queste si modificano rispetto ai trattamenti di purificazione è molto simile indipendentemente da come le stesse sono espresse. Si nota che le dimensioni ottenute in modalità Z-Ave si trovano comprese tra le altre due, ma a differenza di quanto capita nelle NC Ibu Na, più vicine alle dimensioni ottenute in modalità "intensità". Si parla comunque di una differenza massima di circa 75 nm (e.g. AP int. vs AP num; Fig 4.19) che non risulta essere indifferente quando si guardano le cose da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni). Tuttavia, per ogni insieme di dati, le differenze relativamente ai trattamenti subiti sono minime, se viste dal punto di vista biologico.

In Tabella 4.11 sono mostrati i valori dei PDI. Relativamente a questi valori misurati a 25°C, si può notare una diminuzione sia in seguito alla centrifugazione (ca 0,02), sia dopo le dialisi a 12, 24 e 48 ore, rispettivamente di ca 0,01, 0,01 e 0,02. Anche a 37°C in seguito alle 12 ore di dialisi si osserva una diminuzione del PDI di ca 0,03. Confrontando i PDI a 25° e a 37°C, non si osserva nessuna variazione per le formulazioni AP, e una diminuzione di ca 0,02 per le APD 12 h. In altre parole, la dialisi diminuisce i PDI, mentre la temperatura diminuisce i PDI delle APD 12 h, ma non modifica quelli delle AP.

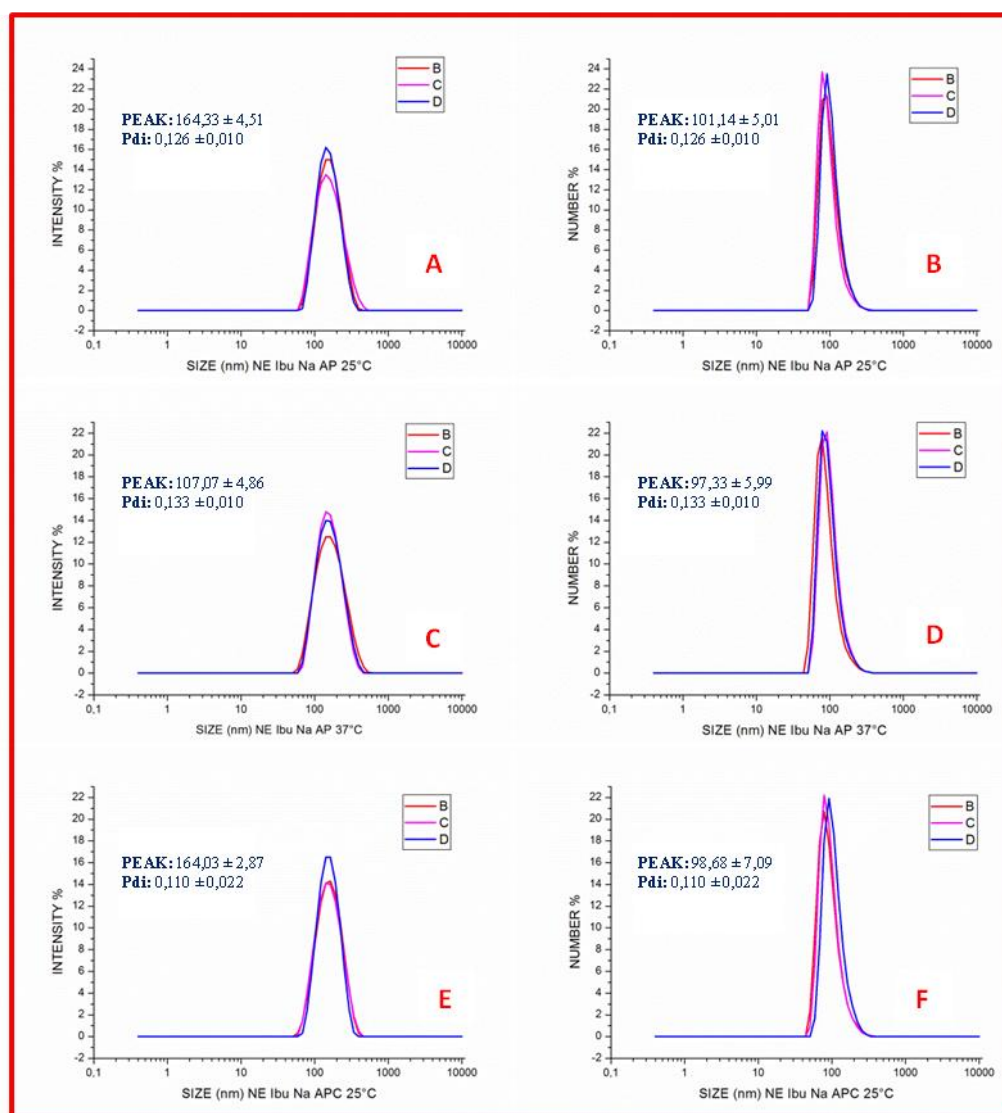


Figura 4.17. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NE Ibu Na. A-B) AP a 25°C; C-D) AP a 37°C; E-F) APC a 25°C.

Il grafico in Figura 4.20 mostra la variazione del potenziale zeta delle varie formulazioni NE Ibu Na, sia a 25° (quadrati neri) che a 37°C (cerchi rossi). Gli stessi dati sono riportati anche nella Tabella 4.12 per semplificare la loro analisi.

Osservando la Figura 4.20 si può vedere che a 25°C il potenziale zeta delle NE Ibu Na AP (ca -59,4 mV) aumenta in modo significativo di ca 6,9 mV (ca 11,6 %). in seguito alla centrifugazione. Un aumento, statisticamente rilevante, del potenziale zeta si può notare anche in seguito alle dialisi a 12, 24 e 48 ore, rispettivamente di ca 8,8, 20,6 e 18,1 mV (ca 14,8, 34,7 e 30,5 %).

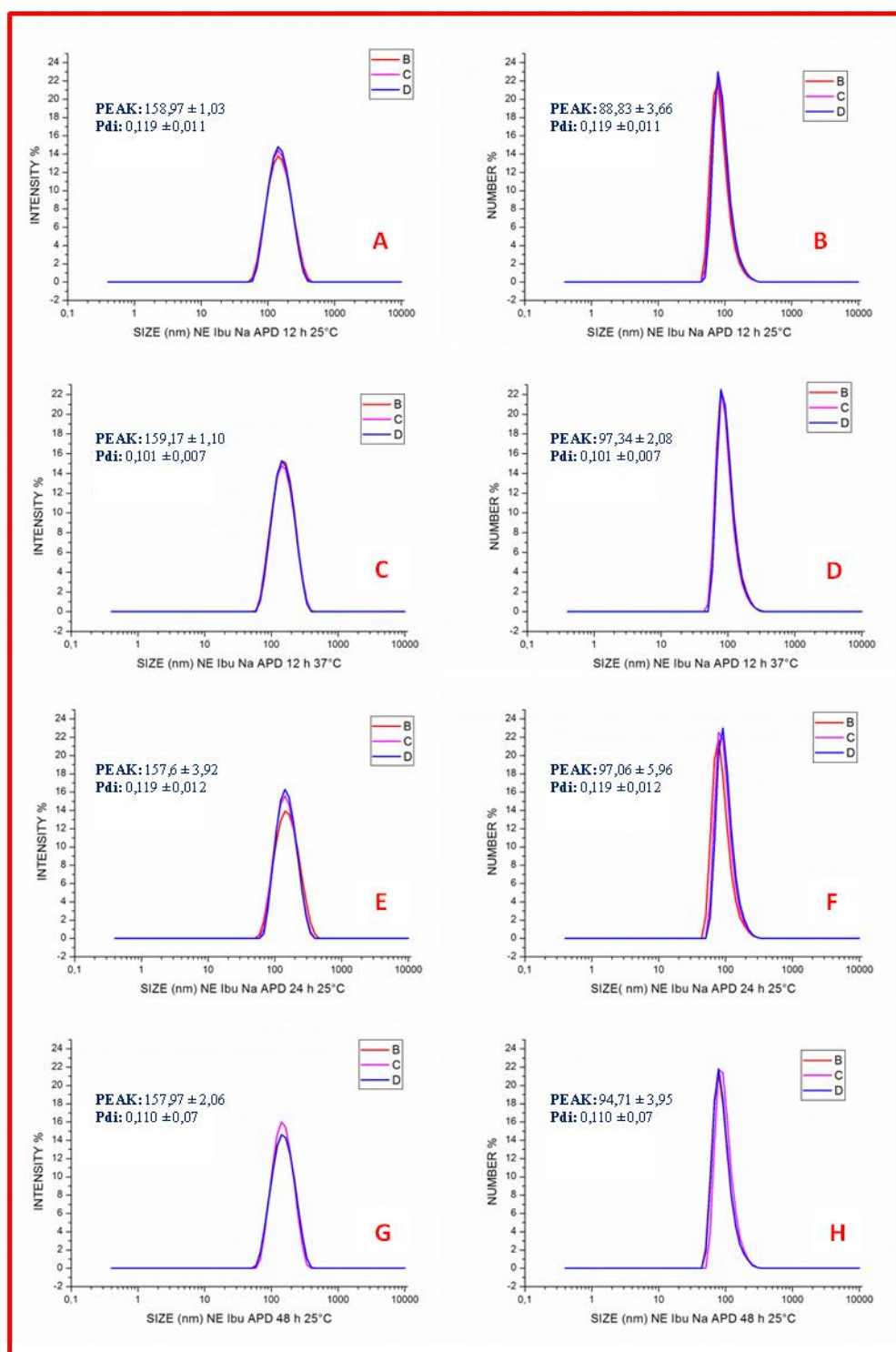


Figura 4.18. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NE Ibu Na. A-B) APD 12 h a 25°C; C-D) APD 12 h a 37°C; E-F) APD 24 h a 25°C; G-H) APD 48 h a 25°C.

Tabella 4.11. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NE Ibu Na.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
AP	164,3 ± 4,5	101,1 ± 5,0	0,13 ± 0,01	107,1 ± 4,9	97,3 ± 6,0	0,13 ± 0,01
APC	164,0 ± 2,9	98,7 ± 7,1	0,11 ± 0,02			
APD 12 h	159,0 ± 1,0	88,8 ± 3,7	0,12 ± 0,01	159,2 ± 1,1	97,3 ± 2,1	0,10 ± 0,01
APD 24 h	157,6 ± 3,9	97,1 ± 6,0	0,12 ± 0,01			
APD 48 h	158,0 ± 2,1	94,7 ± 4,0	0,11 ± 0,01			

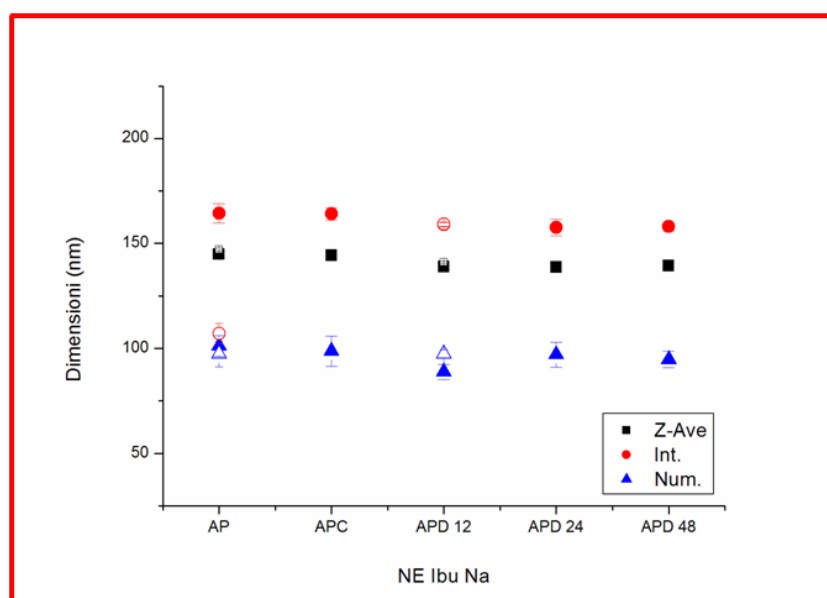


Figura 4.19. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NE Ibu Na. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

Tabella 4.12. Potenziale zeta delle NE Ibu Na.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
AP	-59,4	1,7	-54,4	3,3
APC	-52,5	1,0		
APD 12 h	-50,6	0,4	-48,7	0,04
APD 24 h	-38,8	0,02		
APD 48 h	-41,3	0,9		

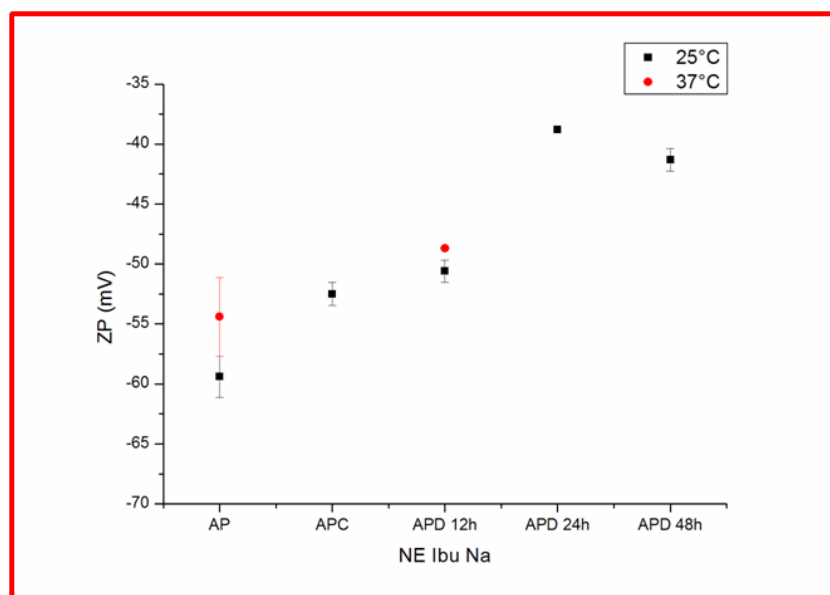


Figura 4.20. Confronto fra i potenziali zeta delle varie formulazioni NE Ibu Na.

I dati ottenuti dall'equilibratura delle formulazioni a 37°C, mostrano un aumento non rilevante del potenziale delle NE Ibu Na AP di ca 5 mV (ca 8,4 %), ed un incremento invece significativo delle APD 12 h di ca 1,9 mV (ca 3,8 %). L'aumento della temperatura a 37°C, determina un importante aumento del potenziale in seguito alle 12 ore di dialisi di ca 5,7 mV, che corrisponde a ca il 10,5 %. Prendendo in considerazione le deviazioni standard, si può vedere che sono tutte contenute sia a 25° che a 37°C. In percentuale, a 25°C le deviazioni sono comprese tra ca lo 0,1 e il 2,9 % del valore medio delle formulazioni. A 37°C le deviazioni rappresentano ca il 6,0 e lo 0,1 % del valore medio rispettivamente delle AP e APD 12 h.

Pertanto, sembrerebbe quindi che a 25°C la carica aumenti in seguito ai trattamenti di purificazione. Tuttavia, la temperatura non sembra influenzare significativamente questo parametro.

Commenti finali

- Le NC AP (65,8 µg/mL) risultano essere più grandi delle NE AP (96,2 µg/mL) per la presenza della capsula di chitosano. A 25°C le NC differiscono dalle NE Ibu Na AP, APC, APD 12, 24 e 48 h, rispettivamente per ca 84,9, 137,2, 94,5, 111,1 e 131 nm. La differenza di dimensioni a 37°C, tra le NC e le NE Ibu Na AP e APD 12 h è pari a ca 60,6 e 81,9 nm.

- Il sale sodico dell'ibuprofene è una molecola idrofila che si scioglie bene in acqua. Sebbene sia stata allestita una soluzione madre in etanolo e che il farmaco sia stato disciolto nella fase lipidica, è probabile che durante la fase di emulsificazione parte dello stesso non sia stato intrappolato nelle NP. Nelle NE è facile immaginare che il gruppo –COOH sia rivolto verso la fase acquosa, e che se le teste dei lipidi non sono ben compattate, il rilascio del farmaco nel tempo (o fino ad un equilibrio) possa essere altrettanto plausibile. Seguendo questo ragionamento, si può anche ipotizzare che nelle NC, il rivestimento di chitosano impedisca, sia per questioni steriche che per interazioni tra cariche opposte, il rilascio dell'ibuprofene sodico. Se queste ipotesi sono corrette, la percentuale di incapsulazione dovrebbe essere più elevata nelle NC.
- NC e NE sembrano comportarsi in maniera abbastanza speculare rispetto ai trattamenti subiti.
 - Le *dimensioni* aumentano per le NC sia dopo centrifugazione che dialisi. Al contrario, la centrifugazione sembra non influenzare le dimensioni delle NE, che invece diminuiscono dopo 12h di dialisi e si stabilizzano ad un certo valore.
 - La *carica* diminuisce per le NC, aumenta per le NE.
 - Il *PDI* delle NC diminuisce con la dialisi passando da 0,2 a 0,1, mentre non viene modificato nelle NE (ca 0,1).

4.2.3. NC e NE Ibu Na – comparazione tra concentrazioni differenti

La Figura 4.21 mostra le dimensioni delle **NC Ibu Na** (115,7 µg/mL) a 25°C e a 37°C, dati riportati anche in Tabella 4.13. Osservando la Figura si nota che le NC Ibu Na AP (ca 220,5 nm) diminuiscono le loro dimensioni (ca 48,3 nm ≡ ca 21,9 %) in maniera significativa con l'aumento della temperatura. Le deviazioni standard rappresentano ca lo 0,4 e lo 0,7 % del valore medio a 25° e a 37°C.

Nella Figura 4.22 sono mostrati i grafici generati dal DLS, relativamente alle dimensioni in intensità ed in numero delle NC Ibu Na (115,7 µg/mL), sia a 25° che a 37°C.

L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili. Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in

intensità (Fig. 4.22 C-D). Infine, in nessun caso particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi.

Nella Tabella 4.14 sono mostrati i valori di PDI, e si può vedere una diminuzione di 0,10, in seguito all'aumento della temperatura. Quindi, la temperatura diminuisce la polidispersità.

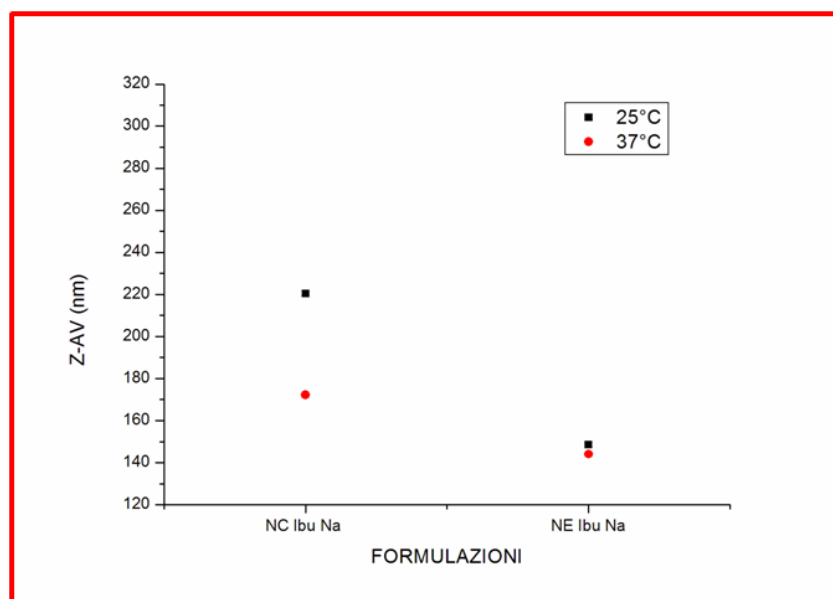


Figura 4.21. Dimensioni delle NC Ibu Na (115,74 µg/mL) e delle NE Ibu Na (113,64 µg/mL), a 25° e a 37°C.

Tabella 4.13. Dimensioni delle NC Ibu Na 115,74 µg/mL.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AZ	SD	Z-AV	SD
AP	220,5	0,98	172,2	1,1

Tabella 4.14. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NC Ibu Na 115,74 µg/mL.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
AP	278,9 ± 5,0	172,7 ± 6,7	0,21 ± 0,01	190,8 ± 2,6	132,8 ± 7,8	0,10 ± 0,02

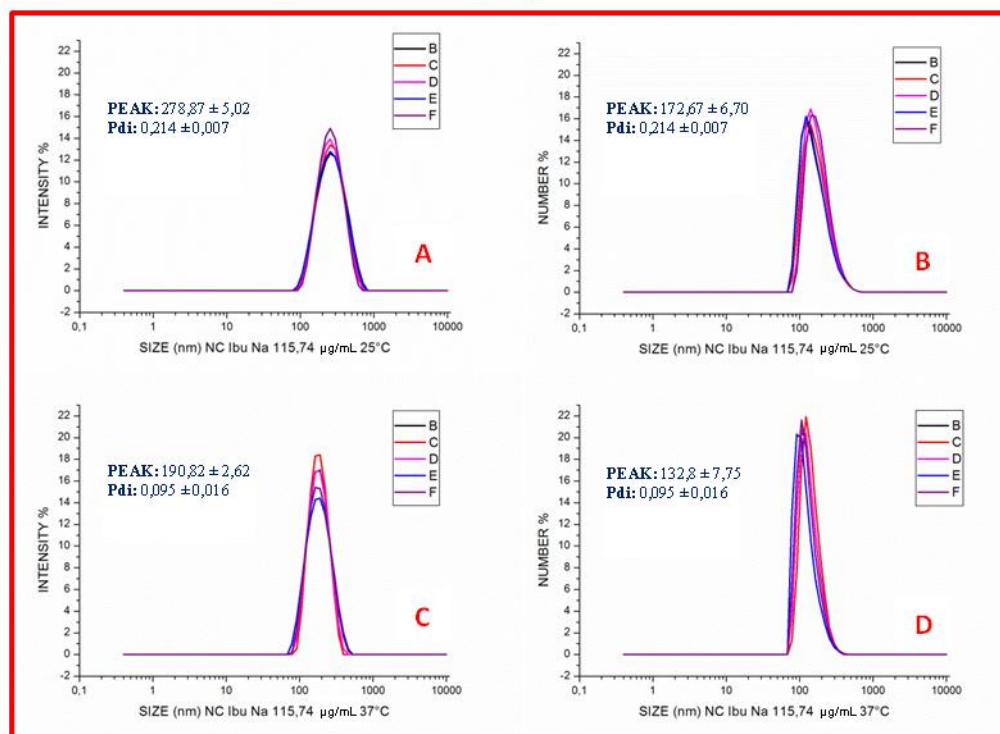


Figura 4.22. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NC Ibu Na. A-B) NCs Ibu Na a 25°C; C-D) NCs Ibu Na a 37°C.

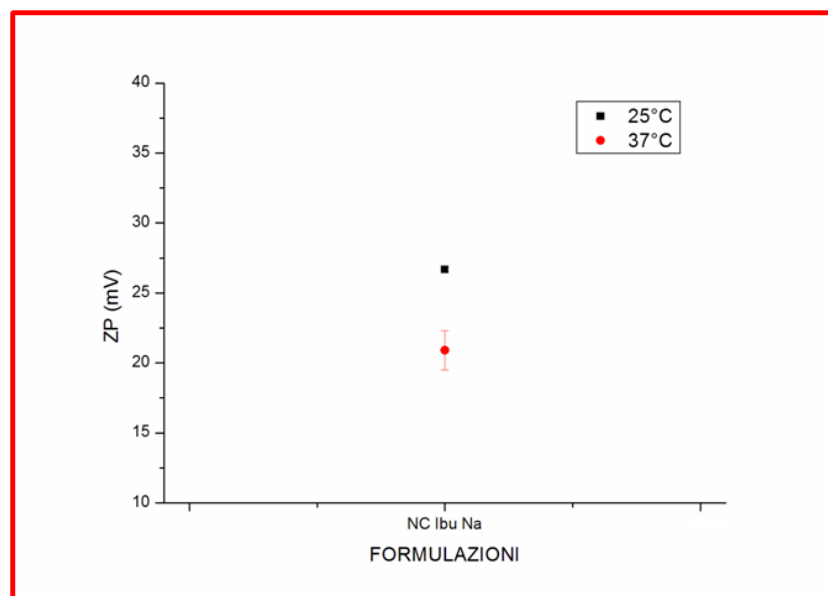


Figura 4.23. Confronto del potenziale zeta delle NC Ibu Na 115,7 µg/mL, a 25° e a 37°C.

Nel Figura 4.23 è mostrato l'andamento del potenziale zeta delle NC Ibu Na (115,7 µg/mL), e nella Tabella 4.15 sono riportati gli stessi dati, per averne un'analisi più rapida. Il potenziale delle NC Ibu Na (ca 26,7 mV) in seguito all'aumento della temperatura a 37°C, diminuisce di ca 5,8 mV (ca 21,6 %). Le deviazioni standard

corrispondono ca allo 0,8 e al 6,8 % del valore del potenziale delle NC, rispettivamente a 25° e a 37°C.

Sembrirebbe quindi che la carica sia influenzata dalla temperatura.

Tabella 4.15. Potenziale zeta delle NC Ibu Na 115,7 µg/mL.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
AP	26,7	0,2	20,9	1,4

Le dimensioni delle **NE Ibu Na AP** (113,6 µg/mL) a 25°C e a 37°C sono state mostrate precedentemente nella Figura 4.21. Gli stessi dati sono riportati anche più sotto nella Tabella 4.16. Osservando la Figura 4.21 si nota che le dimensioni delle NE Ibu Na (ca 148,6 nm) diminuiscono significativamente (ca 4,6 nm \equiv ca 3,1 %) aumentando la temperatura. Le deviazioni standard sono modeste sia 25° che a 37°C, e corrispondono rispettivamente ca allo 0,8 e allo 0,7.

Tabella 4.16. Dimensioni delle NE Ibu Na 113,6 µg/mL.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AZ	SD	Z-AV	SD
AP	148,6	1,2	144	0,98

Nella Figura 4.24 sono mostrati i grafici relativamente alle dimensioni espresse in intensità e in numero delle NE Ibu Na, sia a 25° che a 37°C. L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili. Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità. Infine, in nessun caso particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi. I dati presentati nella Figura 4.24 sono riportati anche nella Tabella 4.17, dove si mostrano i valori di PDI. Qui, si nota che l'aumento della temperatura incrementa, seppur di poco (ca 0,01) la polidispersità.

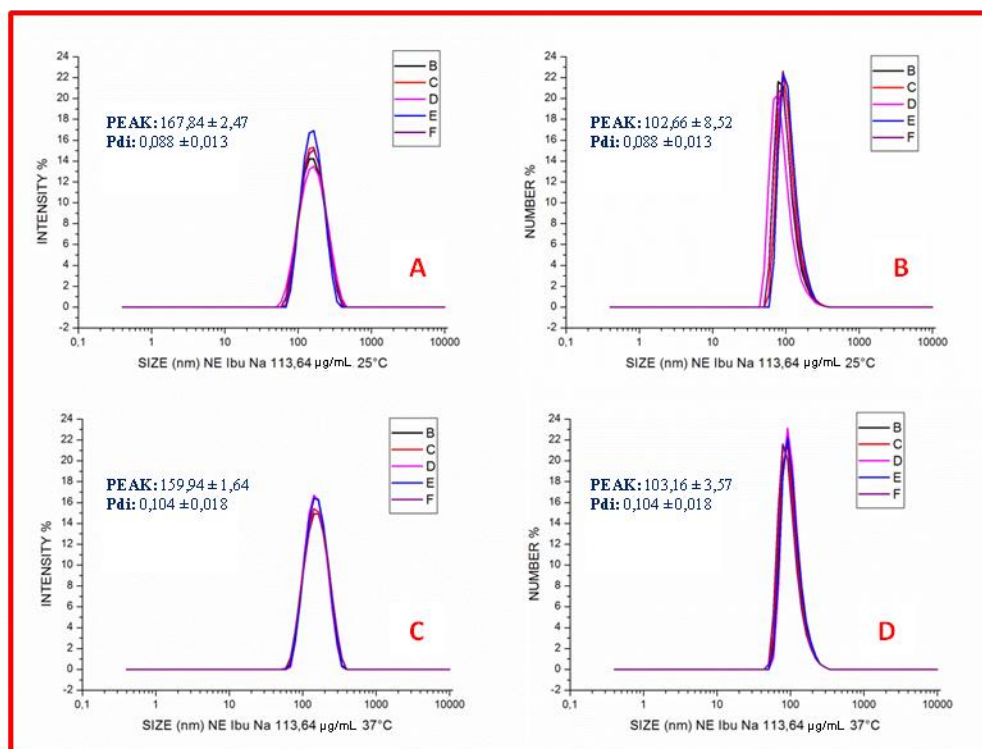


Figura 4.24. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NE Ibu Na. A-B) NE Ibu Na a 25°C; C-D) NE Ibu Na a 37°C.

Tabella 4.17. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NE Ibu Na 113,64 µg/mL.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
AP	167,8 ± 2,5	102,7 ± 8,5	0,09 ± 0,01	160,0 ± 1,6	103,2 ± 3,6	0,10 ± 0,02

La Figura 4.25 e la Tabella 4.18 mostrano che il potenziale zeta delle NE Ibu Na – 113,6 µg/mL (ca -39 mV) subisce una diminuzione non significativa di ca ca 3,7 mV (ca 9,5 %) in seguito all’aumento della temperatura. Le deviazioni standard (Tab. 4.18) corrispondono ca al 6,8 e al 3,0 % del valore medio del potenziale delle NE a 25° e a 37°C. Sembrerebbe quindi che la carica non sia influenzata dalla temperatura.

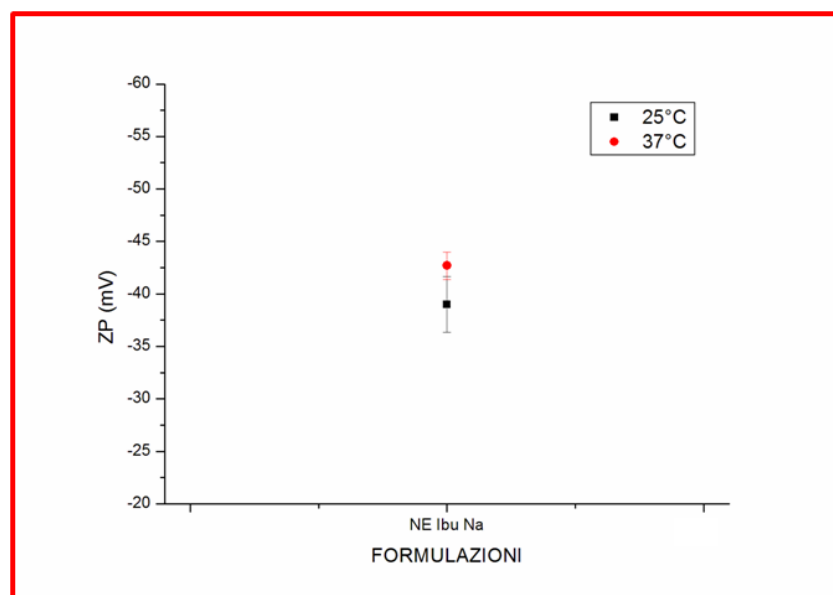


Figura 4.25. Conformito del potenziale zeta delle NE Ibu Na 113,6 µg/mL, a 25° e a 37°C.

Tabella 4.18. Potenziale zeta NE Ibu Na 113,6 µg/mL.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
AP	-39	2,6	-42,7	1,3

Le dimensioni delle **NC Ibu Na AP** (72,1 µg/mL) a 25° e a 37°C sono mostrate in Figura 4.26 e nella Tabella 4.19. Osservando la Figura 4.26 si può vedere che le NC Ibu Na (ca 158,2 nm) mostrano un significativo incremento delle dimensioni (ca 13,1 nm \equiv ca 8,3 %) con l'aumento della temperatura. Le deviazioni standard (Tab. 4.19) sono contenute, e corrispondono a ca lo 0,6 e lo 0,3 % del valore medio misurato 25° e a 37°C.

Tabella 4.19. Dimensioni delle NC Ibu Na 72,1 µg/mL.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AZ	SD	Z-AV	SD
AP	158,2	1,0	171,3	0,5

Nella Figura 4.27 sono mostrati i grafici generati al DLS, relativamente alle dimensioni espresse in intensità e in numero delle NC Ibu Na 72,1 µg/mL, sia a 25° che a 37°C.

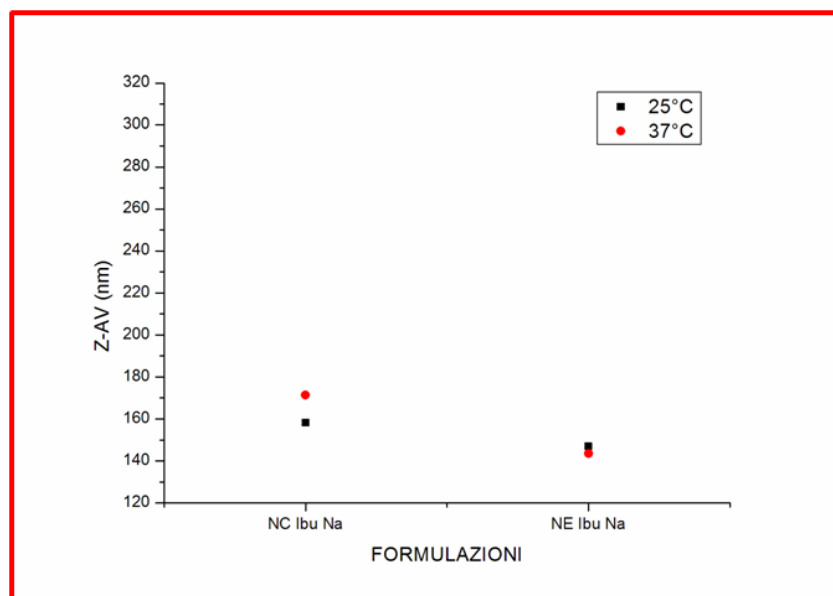


Figura 4.26. Dimensioni delle NC Ibu Na (72,1 µg/mL) e delle NE Ibu Na 73,5 (µg/mL), a 25° e a 37°C.

L'osservazione della forma dei picchi rivela che sia quelli espressi in intensità che in numero, sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza). Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità (Fig. 4.27). Infine, in nessun caso particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi. I dati presentati nella Figura 4.27 sono riportati nella Tabella 4.20, dove sono mostrati anche i valori di PDI. Qui è evidente che la temperatura influisce sulla polidispersità diminuendola (ca 0,02).

Nella Figura 4.28 e nella Tabella 4.21 sono mostrati i dati relativi alla variazione del potenziale zeta delle NC Ibu Na passando da 25° a 37°C.

Tabella 4.20. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NC Ibu Na 72,1 µg/mL.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
AP	176,0 ± 2,9	118,3 ± 4,6	0,10 ± 0,02	188,7 ± 1,0	133,7 ± 2,5	0,08 ± 0,001

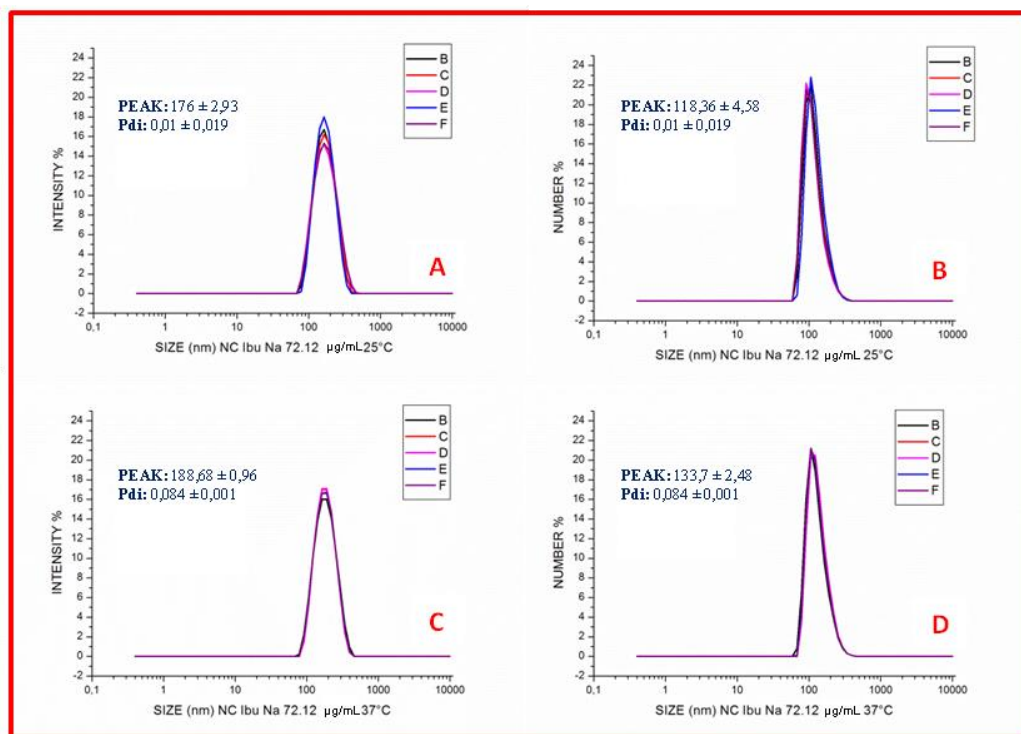


Figura 4.27. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NC Ibu Na. A-B) NC Ibu Na a 25°C; C-D) NC Ibu Na a 37°C.

L'aumento della temperatura determina una diminuzione non significativa della carica delle NC Ibu Na (ca 15,9 mV) di ca 2,3 mV (ca 14,5 %). Per quanto riguarda le deviazioni standard a 25°C è un po' alta, e corrisponde al 6,9 % del valore del potenziale.

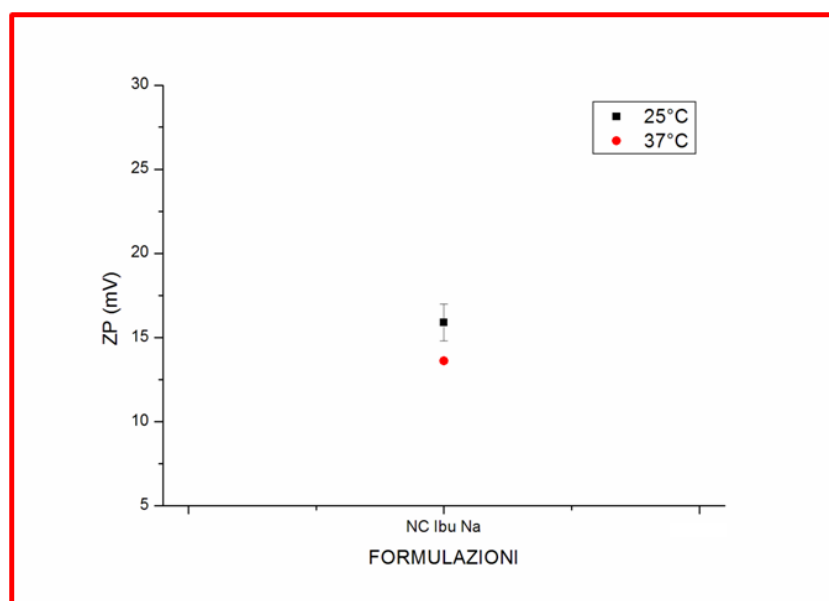


Figura 4.28. Confronto del potenziale zeta delle NC Ibu Na (72,1 µg/mL), a 25° e a 37°C.

La deviazione a 37°C è contenuta e rappresenta lo 0,96 % del valore del potenziale. Sembrerebbe quindi che la carica sia influenzata dalla temperatura.

Tabella 4.21. Potenziale zeta NC Ibu Na 72,1 µg/mL.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
AP	15,9	1,1	13,6	0,1

Le dimensioni delle NE Ibu Na AP (73,5 µg/mL) a 25° e a 37°C sono state mostrate precedentemente in Figura 4.26. Gli stessi dati si ritrovano anche più avanti in Tabella 4.22.

Tabella 4.22. Dimensioni delle NE Ibu Na 73,5 µg/mL.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AZ	SD	Z-AV	SD
AP	147,0	0,7	143,5	1,2

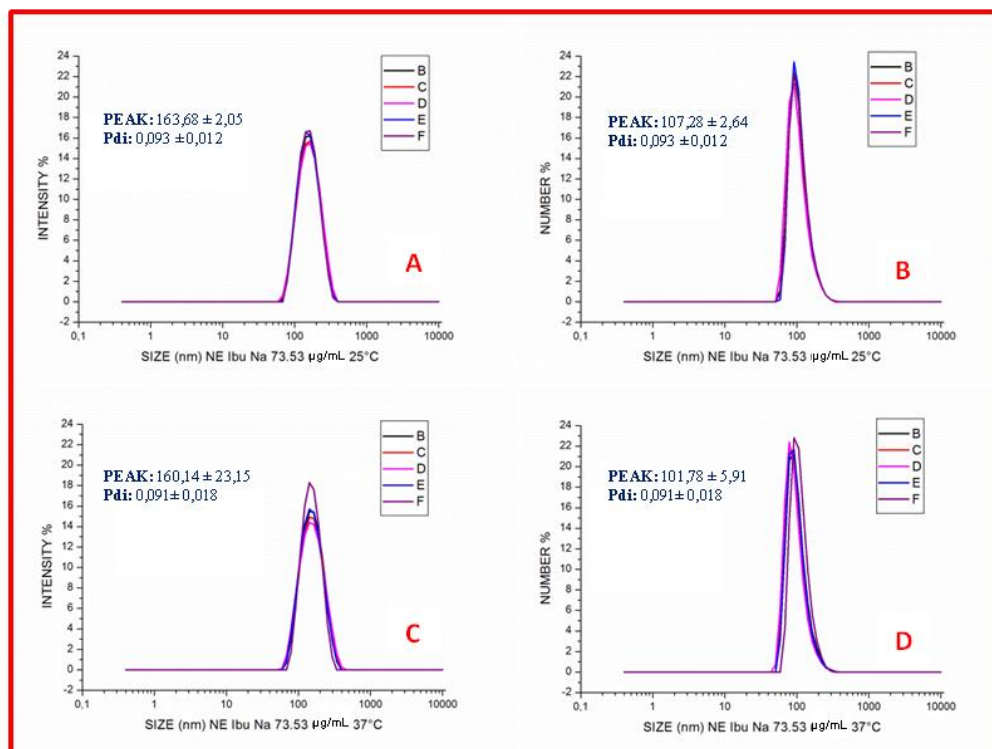


Figura 4.29. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NE Ibu Na. A-B) NE Ibu Na a 25°C; C-D) NE Ibu Na a 37°C.

Osservando la figura o tabella menzionata, si può notare che le dimensioni delle NE Ibu Na (ca 147 nm) diminuiscono di ca 3,5 nm (ca 2,4 %) con l'aumento della temperatura. Le deviazioni standard (Tab.4.22) sono contenute e rappresentano ca lo 0,5 e lo 0,8 %, delle dimensioni medie misurate a 25° e a 37°C.

Nella Figura 4.29 sono mostrati i grafici delle dimensioni in intensità e in numero delle NE Ibu Na 73,5 µg/mL, sia a 25° che a 37°C. L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili. Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità. Infine, in nessun caso particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi. I dati presentati nella Figura 4.29 sono riportati nella Tabella 4.23, dove sono mostrati anche i valori di PDI che rimangono praticamente invariati. Quindi, la temperatura in questo caso non modifica la polidispersità.

Tabella 4.23. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NE Ibu Na 73,5 µg/mL.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
AP	163,7 ± 2,1	107,3 ± 2,6	0,09 ± 0,01	160,1 ± 3,2	101,8 ± 5,9	0,09 ± 0,02

Nella Figura 4.30 e nella Tabella 4.24 sono riportati i dati relativi alla variazione del potenziale zeta delle NE Ibu Na 73,5 µg/mL, a 25 e a 37°C. Con l'aumento della temperatura il potenziale delle NE Ibu Na (ca 39,4 mV) mostra una diminuzione non rilevante di ca 1 mV (ca 2,5 %).

Tabella 4.24. Potenziale zeta NE Ibu Na 73,5 µg/mL.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
AP	-39,4	2,3	-40,4	1,5

Per quanto riguarda le deviazioni standard, non sono così contenute, e corrispondono al 5,7 e al 3,6 % del valore medio del potenziale misurato, rispettivamente a 25° e a 37°C.

Sembrerebbe quindi che la carica non sia influenzata in modo rilevante dalla temperatura.

Nella Figura 4.31 e nella Tabella 4.25 sono mostrati i valori relativi all'andamento delle dimensioni delle **NC Ibu Na AP** (22,7 µg/mL), a 25° e a 37°C.

Tabella 4.25. Dimensioni delle NC Ibu Na 22,7 µg/mL.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AZ	SD	Z-AV	SD
AP	161,6	1,4	174,2	0,7

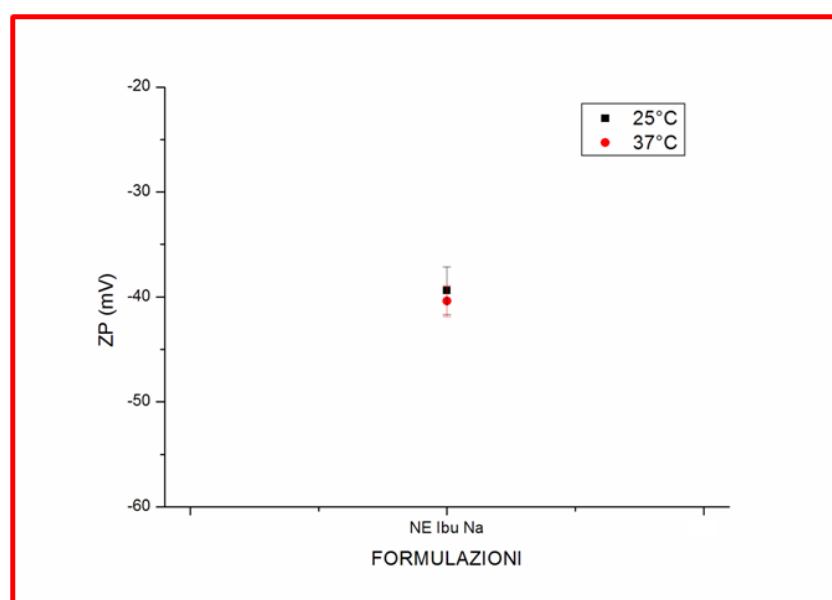


Figura 4.30. Conformto del potenziale zeta delle NE Ibu Na (73,5 µg/mL), a 25° e a 37°C.

Osservando il grafico si può vedere che l'aumento della temperatura determina un aumento delle dimensioni delle NC (ca 161,6 nm) di ca 12,6 nm (ca 7,8 %). Per quanto riguarda le deviazioni standard, sono abbastanza contenute, a 25° e a 37°C corrispondono ca allo 0,9 e allo 0,4 %.

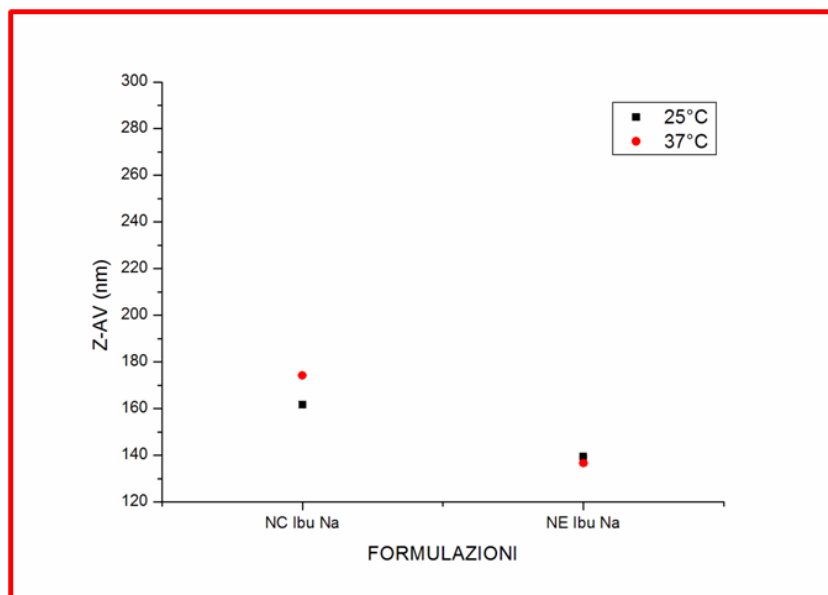


Figura 4.31. Dimensioni delle NC Ibu Na e delle NE Ibu Na (22,7 µg/mL), a 25° e a 37°C.

Nella Figura 4.32 sono mostrati i grafici generati al DLS, relativamente alle dimensioni delle NC Ibu Na (22,7 µg/mL), espresse in intensità e in numero, a 25° e a 37°C.

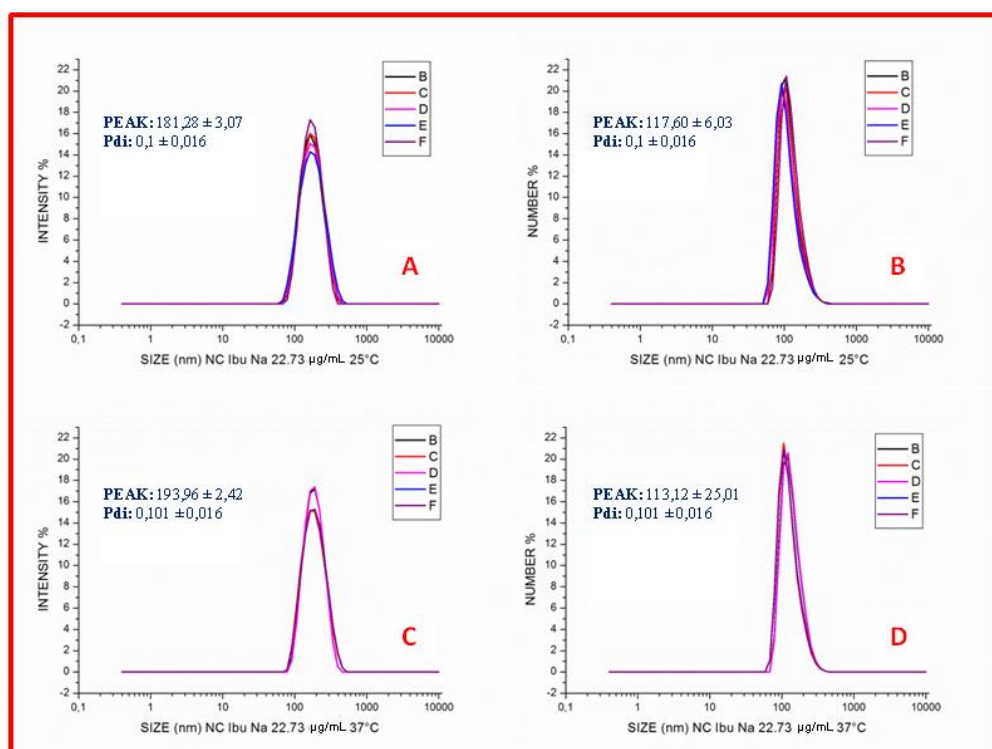


Figura 4.32. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NC Ibu Na 22,7 µg/mL. A-B) NC Ibu Na a 25°C; C-D) NC Ibu Na a 37°C.

Tabella 4.26. Dimensioni espresse in intensità che in numero, e PDI delle NC Ibu Na 22,7 µg/mL.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
AP	181,3 ± 3,1	117,6 ± 6,0	0,10 ± 0,02	194 ± 2,4	133,1 ± 5,0	0,10 ± 0,02

L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili. Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità. Infine, in nessun caso particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi. I dati presentati nella Figura 4.32 sono riportati nella Tabella 4.26, dove sono mostrati anche i valori di PDI. In Tabella 4.26 si può notare che in questo caso la temperatura non influenza la polidispersità.

Nella Figura 4.33 e nella Tabella 4.27 sono riportati i dati relativi alla variazione del potenziale zeta a 25° e a 37°C delle NC Ibu Na 22,7 µg/mL. Come si può osservare, l'aumento della temperatura determina una diminuzione del potenziale zeta delle NC (ca 14,5 mV) di ca 0,7 mV (ca 5,2 %). Le deviazioni standard (Tab. 4.27) non sono così contenute, e rappresentano ca il 6,2 e il 2,9 % del valore del potenziale a 25° e a 37°C. Sembrerebbe quindi che la carica non sia influenzata in modo rilevante dalla temperatura.

Tabella 4.27. Potenziale zeta delle NC Ibu Na 22,7 µg/mL.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
AP	13,5	0,8	12,8	0,4

Tabella 4.28. Dimensioni delle NE Ibu Na 22,7 µg/mL.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AZ	SD	Z-AV	SD
AP	139,4	0,5	136,6	1,1

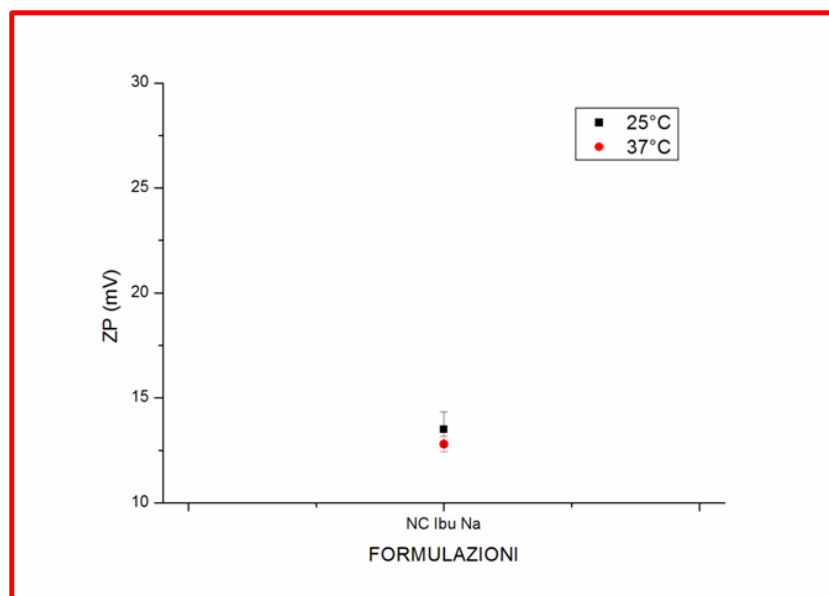


Figura 4.33. Confronto del potenziale zeta delle NC Ibu Na (22,7 µg/mL) a 25° e a 37°C.

L'andamento delle dimensioni delle **NE Ibu Na** (22,7 µg/mL) a 25° e a 37°C è stato precedentemente mostrato in Figura 4.31. Gli stessi dati si ritrovano più sotto anche in Tabella 4.26. Osservando i dati in Figura o in Tabella si nota che le dimensioni delle NE (ca 139,4 nm) diminuiscono di ca 2,8 nm (ca 2,0 %) con l'aumento della temperatura. Le deviazioni standard (Tab. 4.28) sono molto piccole e corrispondono a ca lo 0,3 e lo 0,8 % del valore medio rispettivamente misurato a 25° e a 37°C.

Nella Figura 4.34 sono mostrati i grafici generati al DLS, relativamente alle dimensioni in intensità e in numero delle NE Ibu Na 22,7 µg/mL, a 25° e a 37°C.

Tabella 4.29. Dimensioni espresse in intensità che in numero, e PDI delle NE Ibu Na 22,7 µg/mL.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
AP	156,5 ± 0,5	97,0 ± 2,8	0,10 ± 0,004	154 ± 2,5	93,9 ± 7,7	0,10 ± 0,02

L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili. Inoltre, i

picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità. Infine, in nessun caso particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi. I dati presentati nella Figura 4.34 sono riportati nella Tabella 4.29, dove sono mostrati anche i valori di PDI. Qui si nota che la polidispersità è molto bassa e non viene influenzata dalla temperatura.

Nella Figura 4.35 è mostrato l'andamento del potenziale zeta delle NE Ibu Na 22,7 µg/mL, a 25° e a 37°C; gli stessi valori sono anche riportati nella Tabella 4.30.

L'aumento della temperatura determina un aumento del potenziale delle NE (ca -48,8 mV) di ca 10,9 mV (ca 22,3 %). Le deviazioni standard sono contenute e rappresentano ca lo 0,2 e l'1,7 % del potenziale a 25° e a 37°C. Sembra quindi che la carica sia influenzata dalla temperatura.

Tabella 4.30. Potenziale zeta delle NE Ibu Na 22,7 µg/mL.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
AP	-48,8	0,1	-37,9	0,7

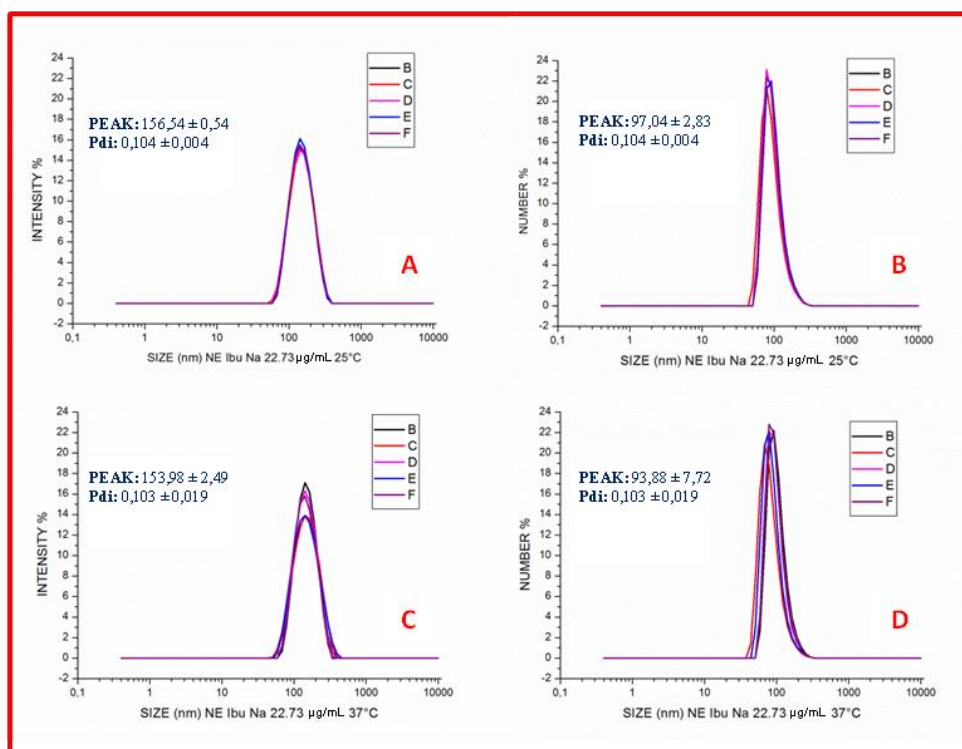


Figura 4.34. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NE Ibu Na 22,7 µg/mL. A-B) NE Ibu Na a 25°C; C-D) NE Ibu Na a 37°C.

Come si vede bene dalla Figura 4.36, l'andamento delle dimensioni delle NC Ibu Na a diverse concentrazioni, e di come queste si modificano in seguito all'aumento della concentrazione stessa è molto simile. Si nota che le dimensioni delle NC Ibu Na 22,7 e 72,1 $\mu\text{g/mL}$ ottenute in modalità Z-Ave si trovano comprese tra le altre due, ma più vicine alle dimensioni ottenute in modalità "intensità". Le dimensioni delle NC Ibu Na 115,7 $\mu\text{g/mL}$ ottenute in modalità Z-Ave si trovano comprese tra le altre due, ma sono più vicine alle dimensioni ottenute in modalità "numero". Tra le NC Ibu Na 22,7 e 72,1 $\mu\text{g/mL}$ non si osserva una significativa differenza delle dimensioni. Le dimensioni delle NC Ibu Na 115,7 $\mu\text{g/mL}$ sono maggiori di quelle delle NC Ibu Na 22,7 e 72,1 $\mu\text{g/mL}$, in tutte le modalità.

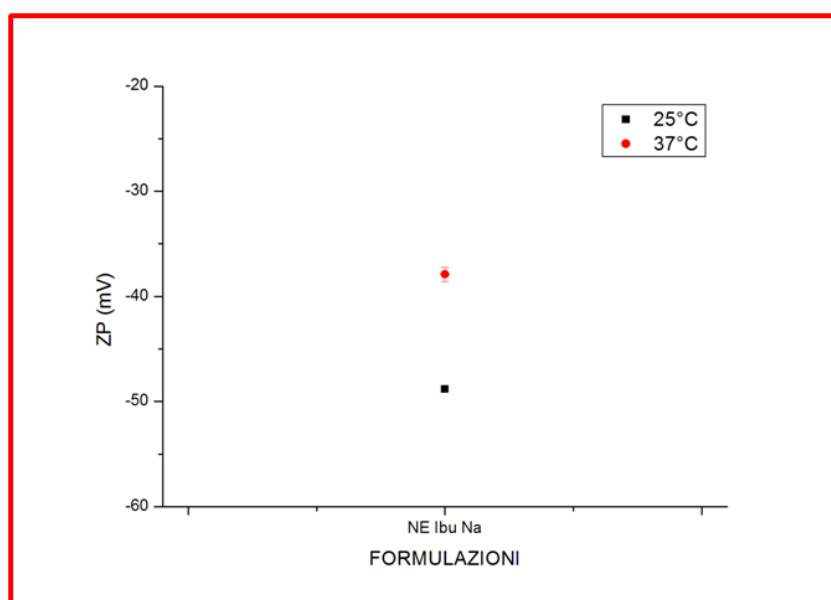


Figura 4.35. Confronto del potenziale zeta delle NE Ibu Na (22,7 $\mu\text{g/mL}$) a 25° e a 37°C.

Si nota che le dimensioni delle NC Ibu Na 115,74 $\mu\text{g/mL}$ ottenute in modalità "intensità" sono le maggiori, ma la differenza è di circa 120 nm (e.g. int. vs num., Fig. 4.36).

Le differenze delle dimensioni con l'aumento della concentrazione non risulta essere indifferente quando si guardano le cose da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni).

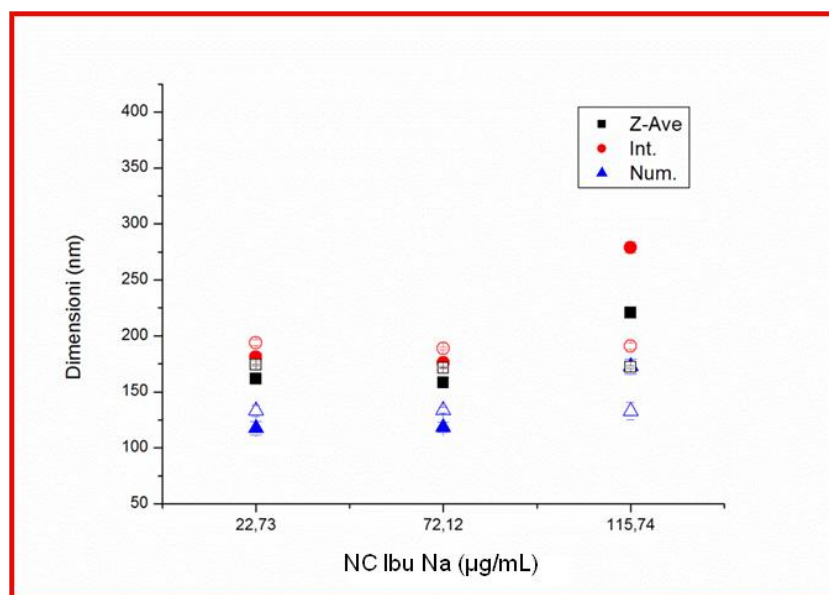


Figura 4.36. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NC Ibu Na. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

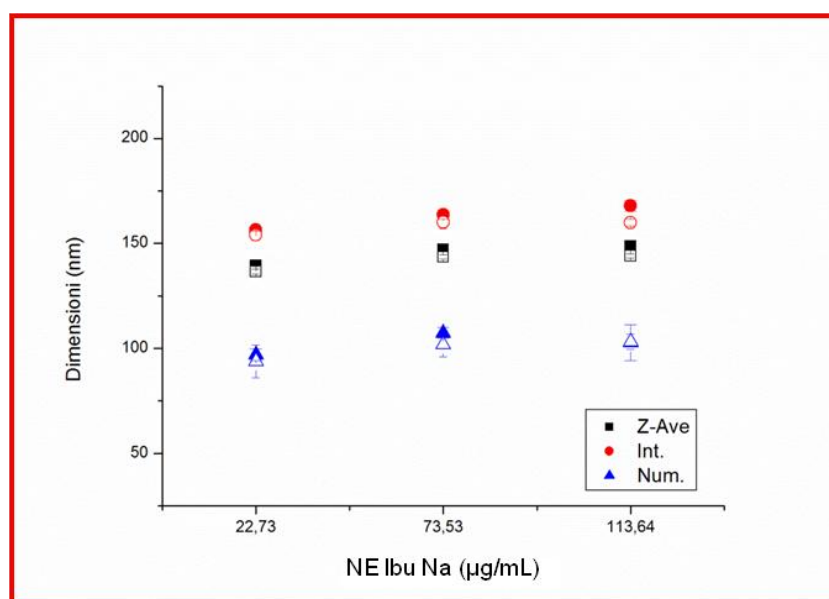


Figura 4.37. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NE Ibu Na. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

Come si vede bene dalla Figura 4.37, l'andamento delle dimensioni delle NE Ibu Na a diversa concentrazione, e di come queste si modificano rispetto all'aumento della concentrazione stessa è molto simile. Si nota che le dimensioni delle NE Ibu Na alle tre diverse concentrazioni, ottenute in modalità Z-Ave si trovano comprese tra le altre due, e sono più vicine alle dimensioni ottenute in modalità "intensità". Si parla comunque di una differenza massima di circa 75 nm (e.g. int. vs num., Fig. 4.37) considerando tutte e tre le diverse concentrazioni. Questa differenza non risulta essere indifferente quando si

guardano le cose da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni).

Commenti finali

- Le NC Ibu Na AP risultano essere più grandi delle NE Ibu Na AP per la presenza della capsula di chitosano. A 25°C le NC (22,7, 72,1 e 115,7 µg/mL) differiscono dalle NE Ibu Na (22,7, 73,5 e 113,6 µg/mL) rispettivamente per 21,8, 11,2 e 71,9 nm, mentre la differenza di dimensioni a 37°C, è pari a 37,6, 27,8 e 28,2 nm.
- Dimensioni a 25°C aumentano per le NC e per le NE, con l'aumento della concentrazione dell'Ibu Na, mentre a 37°C le dimensioni delle NC restano stabili, mentre quelle delle NE aumentano.
- La carica aumenta per le NC a 25° e a 37°C, con l'aumento della concentrazione, mentre per le NE con l'incremento della concentrazione, la carica aumenta a 25°C e diminuisce a 37°C.

4.2.4. NC e NE Pacli

Nella Figura 4.38 è mostrato l'andamento delle dimensioni delle NC Pacli (46,3 µg/mL) a 25° e a 37°C. Gli stessi dati sono riportati anche nella Tabella 4.31.

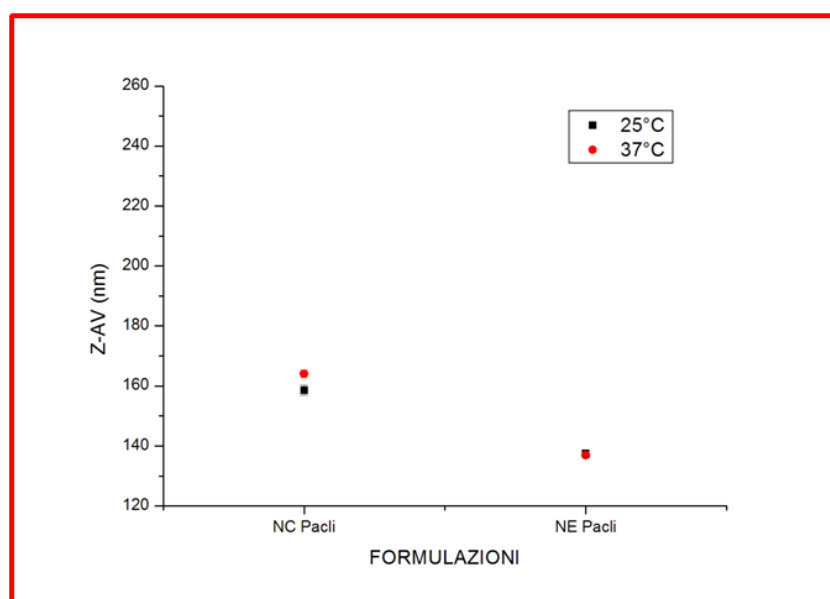


Figura 4.38. Dimensioni delle NC e delle NE Pacli, a 25° e a 37°C.

L'aumento della temperatura determina un significativo aumento delle dimensioni delle NC Pacli (ca 158,6 nm) di ca 5,4 nm (ca 3,4 %).

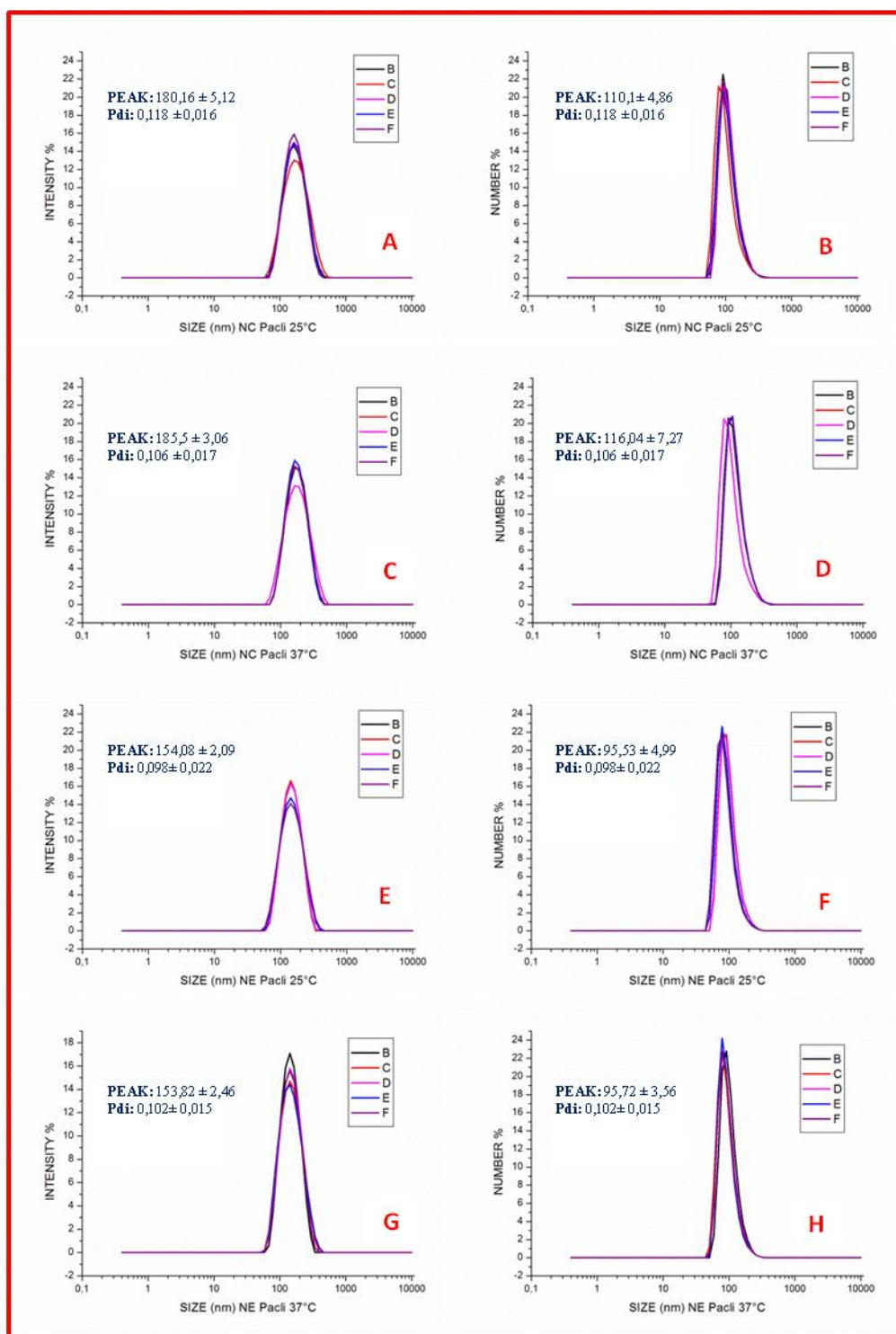


Figura 4.39. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NC e NE Pacli. A-B) NC Pacli a 25°C; C-D) NC Pacli a 37°C; E-F) NE Pacli a 25°C; G-H) NE Pacli a 37°C.

Le deviazioni standard delle NC (Tab. 4.29) sono contenute e rappresentano ca l'1,1 e lo 0,8 % del valore delle dimensioni a 25° e a 37°C.

Tabella 4.31. Dimensioni delle NC e delle NE Pacli.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AV	SD	Z-AV	SD
NC Pacli	158,6	1,7	164,0	1,3
NE Pacli	137,4	1,0	136,9	0,8

Nella Figura 4.39 sono mostrati i grafici generati dal DLS, relativamente alle dimensioni espresse in intensità e in numero, delle NC Pacli, a 25° e a 37°C. L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili e presentano un piccolo "shift" (e.g., Fig. 4.39.C vs Fig. 4.39 D). Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità. Infine, in nessun caso particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi.

Tabella 4.32. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NC Pacli.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
AP	180,2 ± 5,1	110,1 ± 4,9	0,12 ± 0,02	185,5 ± 3,1	116,0 ± 7,3	0,11 ± 0,02

Tutti i dati presentati nelle Figura 4.39 sono riportati anche nella Tabella 4.32 e nella Figura 4.40 dove risulta più semplice commentarli.

In Tabella 4.32 si può notare che l'aumento della temperatura determina un incremento delle dimensioni delle NC Pacli in intensità e in numero (rispettivamente ca 180,2 e 110,1 nm), di ca 5,3 nm (ca 2,96 %) e di ca 5,9 nm (ca 5,4 %).

Per quanto riguarda le deviazioni standard, sono contenute, e a 25°C corrispondono ca al 2,8 e al 4,4 % del valore delle dimensioni in intensità e in numero. A 37°C le

deviazioni rappresentano ca l'1,7 e il 6,3 % del valore delle dimensioni in intensità e in numero.

Come si vede bene dalla Figura 4.40, l'andamento delle dimensioni, e di come queste si modificano in seguito all'aumento della temperatura è molto simile. Si nota che le dimensioni ottenute in modalità Z-Ave si trovano comprese tra le altre due, ma più vicine a quelle espresse in modalità "intensità". Si nota comunque una differenza di pochi nm (e.g. int. vs num; Fig 4.40) con l'aumento della temperatura, che risulta essere indifferente quando si guardano le cose da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni).

In Tabella 4.32 sono mostrati anche i valori di PDI. Prendendo in considerazione i PDI, si può vedere una diminuzione di 0,01 in seguito all'aumento della temperatura. In altre parole, in questo caso la temperatura non influisce significativamente sulla polidispersità.

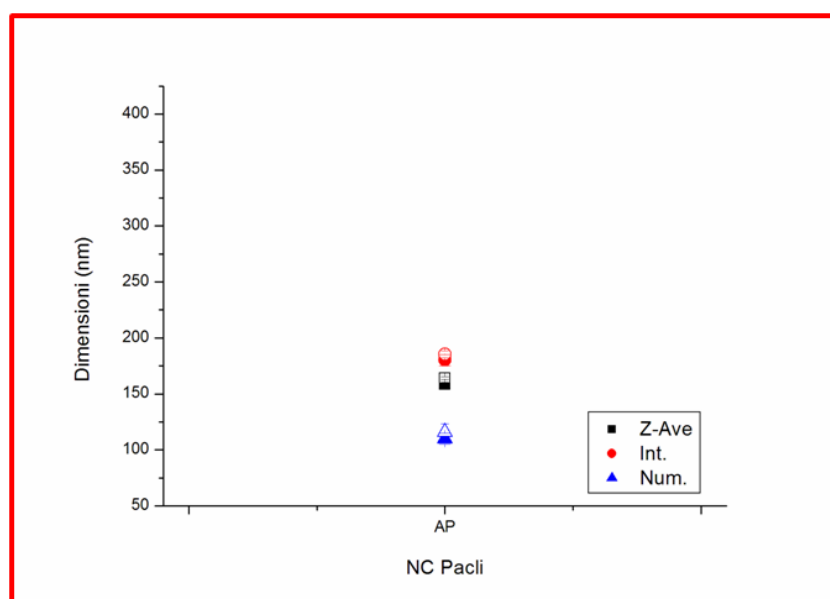


Figura 4.40. Confronto fra le dimensioni delle NC Pacli. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

Un altro dato importante che è stato valutato è il potenziale zeta (ZP), e come questo variasse in funzione dell'aumento della temperatura (Fig. 4.41, e Tab. 4.33).

Osservando la Figura 4.41 si vede che il ZP delle NC Pacli (ca 15,5 mV) rimane invariato in seguito all'aumento della temperatura. Prendendo in considerazione le deviazioni standard, non sono molto contenute, e corrispondono ca al 11 e al 2,2 %,

rispettivamente a 25° e a 37°C. Sembra quindi che la temperatura non influisca in modo rilevante sulle carica.

Tabella 4.33. Potenziale zeta delle NC e delle NE Pacli.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
NC Pacli	15,5	1,7	15,5	0,3
NE Pacli	-44,8	3,6	-37,1	1,3

Nella Figura 4.38 è mostrato l'andamento delle dimensioni delle **NE Pacli** (47,2 µg/mL) a 25° e a 37°C. Gli stessi dati sono riportati anche nella Tabella 4.34.

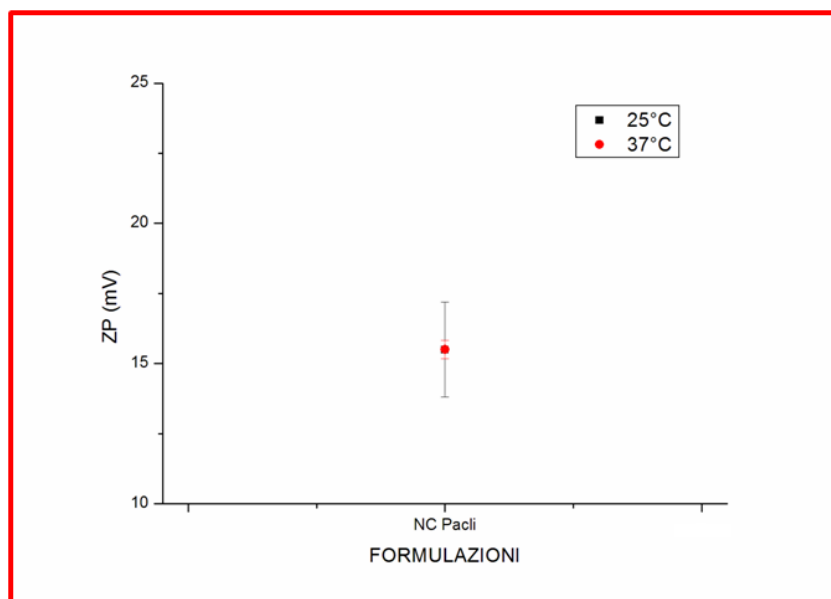


Figura 4.41. Confronto del potenziale zeta delle NC Pacli, a 25° e a 37°C.

L'aumento della temperatura determina una diminuzione delle dimensioni delle NE Pacli (ca 137,4 nm) di ca 0,5 nm (ca 0,4 %). Le deviazioni standard (Tab. 4.33) sono contenute e corrispondono ca allo 0,8 e allo 0,6 % del valore delle dimensioni, rispettivamente a 25° e a 37°C.

È interessante notare che, mentre le dimensioni delle NC Pacli tendono ad aumentare in seguito all'aumento della temperatura, le NE Pacli mostrano un andamento opposto.

Nella Figura 4.39 sono mostrati i grafici generati dal DLS, relativamente alle dimensioni in intensità e in numero, delle NE Pacli, a 25° e a 37°C. L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili. Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità. Infine, in nessun caso (Fig. 4.39) particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi.

I dati presentati nelle Figura 4.39 relativamente alle NE Pacli, sono riportati nella Tabella 4.34 e nella Figura 4.42 dove risulta più semplice commentarli.

In Tabella 4.34 si può vedere che l'aumento della temperatura determina una diminuzione delle dimensioni delle NE Pacli in intensità, e un aumento delle dimensioni in numero (rispettivamente ca 154,1 e 96,5 nm), di ca 0,3 nm (ca 0,19 %) e di ca 0,2 nm (ca 0,21 %).

Tabella 4.34. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NE Pacli.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
AP	154,1 ± 2,1	95,5 ± 5,0	0,10 ± 0,02	153,8 ± 2,5	95,7 ± 3,6	0,10 ± 0,02

Per quanto riguarda le deviazioni standard, sono contenute, e a 25°C corrispondono ca all'1,4 e al 5,2 % del valore delle dimensioni in intensità e in numero. A 37°C le deviazioni rappresentano ca l'1,6 e il 3,8 % del valore delle dimensioni in intensità e in numero.

Come si vede bene dalla Figura 4.42, l'andamento delle dimensioni, e di come queste si modificano in seguito all'aumento della temperatura è molto simile. Si nota che le dimensioni ottenute in modalità Z-Ave si trovano comprese tra le altre due, ma sono più vicine a quelle espresse in modalità "intensità". Si nota comunque una sovrapposizione dei valori delle dimensioni, con l'aumento della temperatura.

Prendendo in considerazione i PDI (Tab. 4.34), si può vedere che l'aumento della temperatura non li modifica.

In altre parole, la temperatura sembra non influenzare la polidispersità.

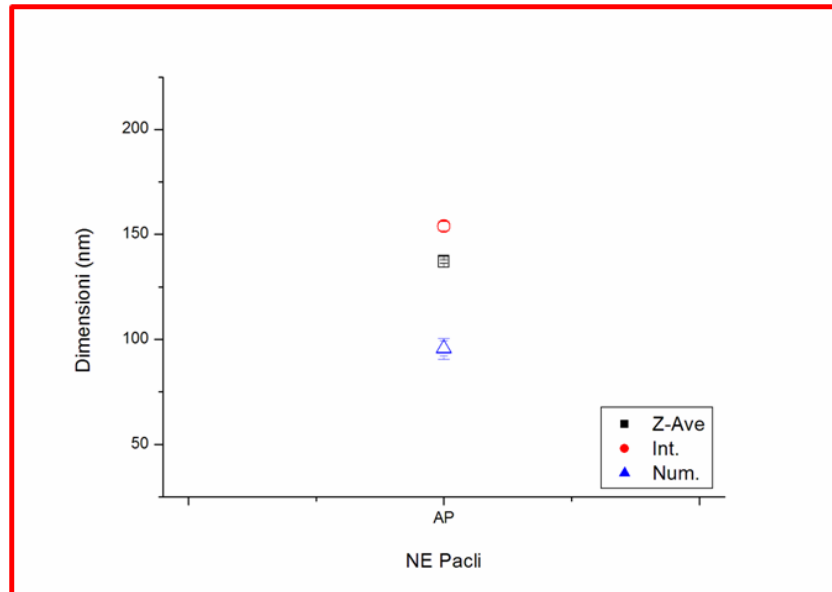


Figura 4.42. Confronto fra le dimensioni delle NE Pacli. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

Relativamente al potenziale zeta, nella Figura 4.43 sono mostrati i valori del ZP delle NE Pacli in seguito all'aumento della temperatura, da 25° a 37°C, e questi dati sono riportati anche nella Tabella 4.33.

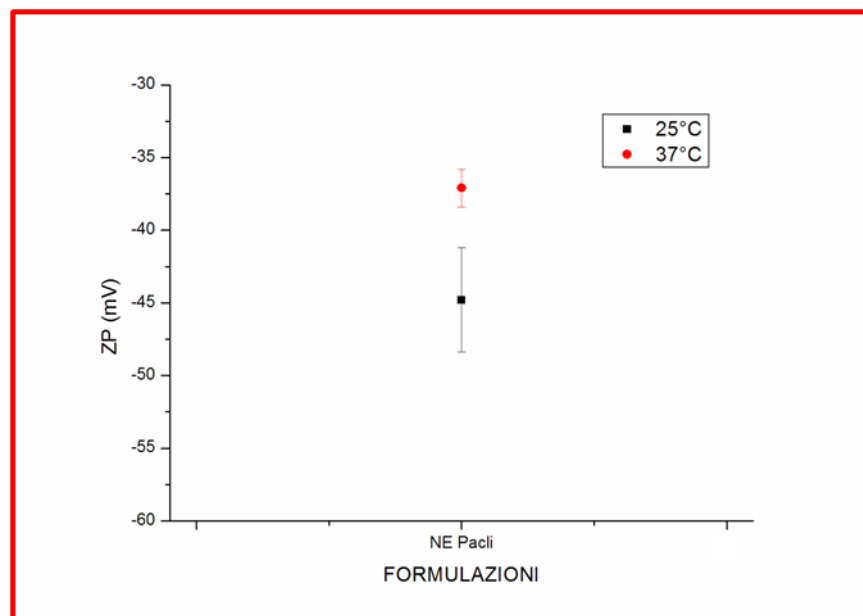


Figura 4.43. Confronto del potenziale zeta delle NE Pacli, a 25 e a 37°C.

L'aumento della temperatura determina un incremento del potenziale delle NE Pacli (ca -44,8 mV) di ca 7,7 mV (ca 17,2 %). Prendendo in considerazione le deviazioni standard a 25° e a 37°C, non sono molto sono contenute, e rappresentano rispettivamente ca l'8,0 e il 3,5 %. Sembrerebbe quindi che la carica delle NE Pacli sia influenzata dalla temperatura.

Commenti finali

- Le NC Pacli AP (46,3 µg/mL) risultano essere più grandi delle NE Pacli AP (47,2 µg/mL) per la presenza della capsula di chitosano. A 25°C le NC differiscono dalle NE Pacli di ca 21,2 nm. La differenza di dimensioni a 37°C, tra le NC e le NE Pacli è pari a ca 27,1 nm.
- Il Paclitaxel è una molecola antitumorale lipofila che si scioglie bene in etanolo. Questa molecola presenta numerosi gruppi –OH, i quali potrebbero interagire con le teste idrofile dei lipidi, sporgendo quindi verso la fase acquosa. Essendo però una molecola lipofila, è molto probabile che la restante parte della molecola sia saldamente intrappolata nell'interno delle code.
- NC e NE sembrano comportarsi in maniera speculare rispetto all'aumento della temperatura.
 - Le *dimensioni* in seguito all'aumento della temperatura aumentano leggermente per le NC, e rimangono abbastanza stabili per le NE.
 - La *carica* rimane stabile per le NC, e aumenta per le NE.
 - Il *PDI* delle NC diminuisce con l'aumento della temperatura di 0,01, mentre non viene modificato nelle NE (ca 0,1).

4.2.5. NC e NE RA

Nel grafico in Figura 4.44 è mostrato l'andamento delle dimensioni delle varie formulazioni **NC RA** (64,3 µg/mL), a 25° (quadrati neri) che a 37°C (cerchi rossi). Gli stessi dati sono riportati anche nella Tabella 4.35 per una più semplice comprensione.

Come si può vedere dalla Figura 4.44., a 25°C le dimensioni delle NC RA AP (ca 184,7 nm), in seguito alla centrifugazione aumentano in modo rilevante (ca 76,6 nm ≡ ca 41,5 %). Un rilevante aumento delle dimensioni delle AP, si può vedere anche dopo

le dialisi a 12, 24 e 48 ore, rispettivamente ca di 41,9 (ca 22,7 %), 63,6 (ca 34,4 %) e 80 nm (ca 43,3 %).

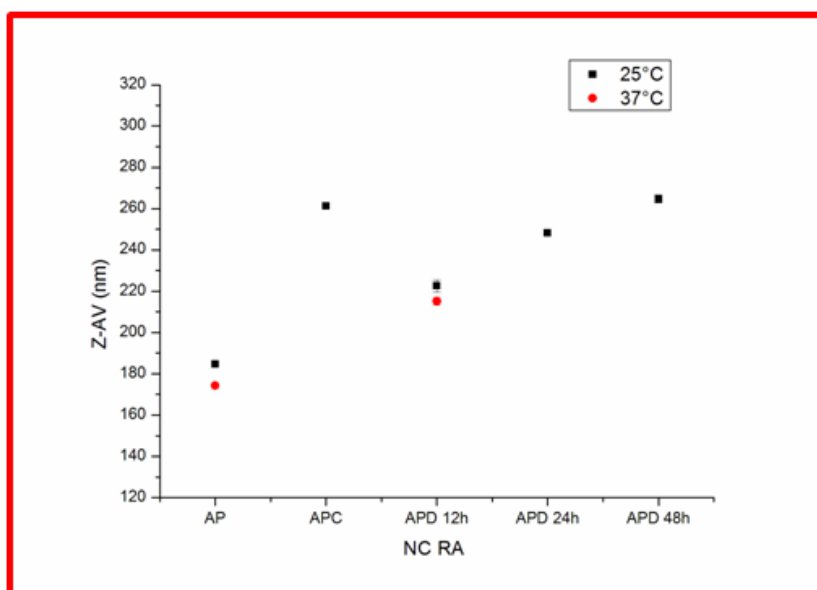


Figura 4.44. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NC RA.

Per quanto riguarda i dati ottenuti equilibrando le formulazioni a 37°C, le dimensioni delle AP e APD 12 h diminuiscono rispettivamente di ca 10,4 (ca 5,6 %) e 11,5 nm (ca 5,1 %). Tuttavia, come precedentemente osservato, la dialisi determina un significativo aumento delle dimensioni, di ca 40,8 nm (ca 23,4 %).

Prendendo in considerazione le deviazioni standard, sono moderate, e a 25°C sono comprese tra ca lo 0,3 e l'1,3 % del valore formulazioni medio (Tab. 4.35). Le deviazioni standard sono contenute anche a 37°C, dove rappresentano ca lo 0,8 e lo 0,9 % del valore medio delle AP e APD 12 h (Tab. 4.35).

Tabella 4.35. Dimensioni delle NC RA.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AV	SD	Z-AV	SD
AP	184,7	0,8	174,3	1,4
APC	261,3	0,8		
APD 12 h	226,6	3,0	215,1	2,0
APD 24 h	248,3	0,9		
APD 48 h	264,7	2,0		

Nelle Figure 4.45 e 4.46 sono mostrati i grafici generati dal DLS, riportano relativamente alle dimensioni espresse in intensità e in numero, a 25° e a 37°C, delle varie formulazioni NC RA.

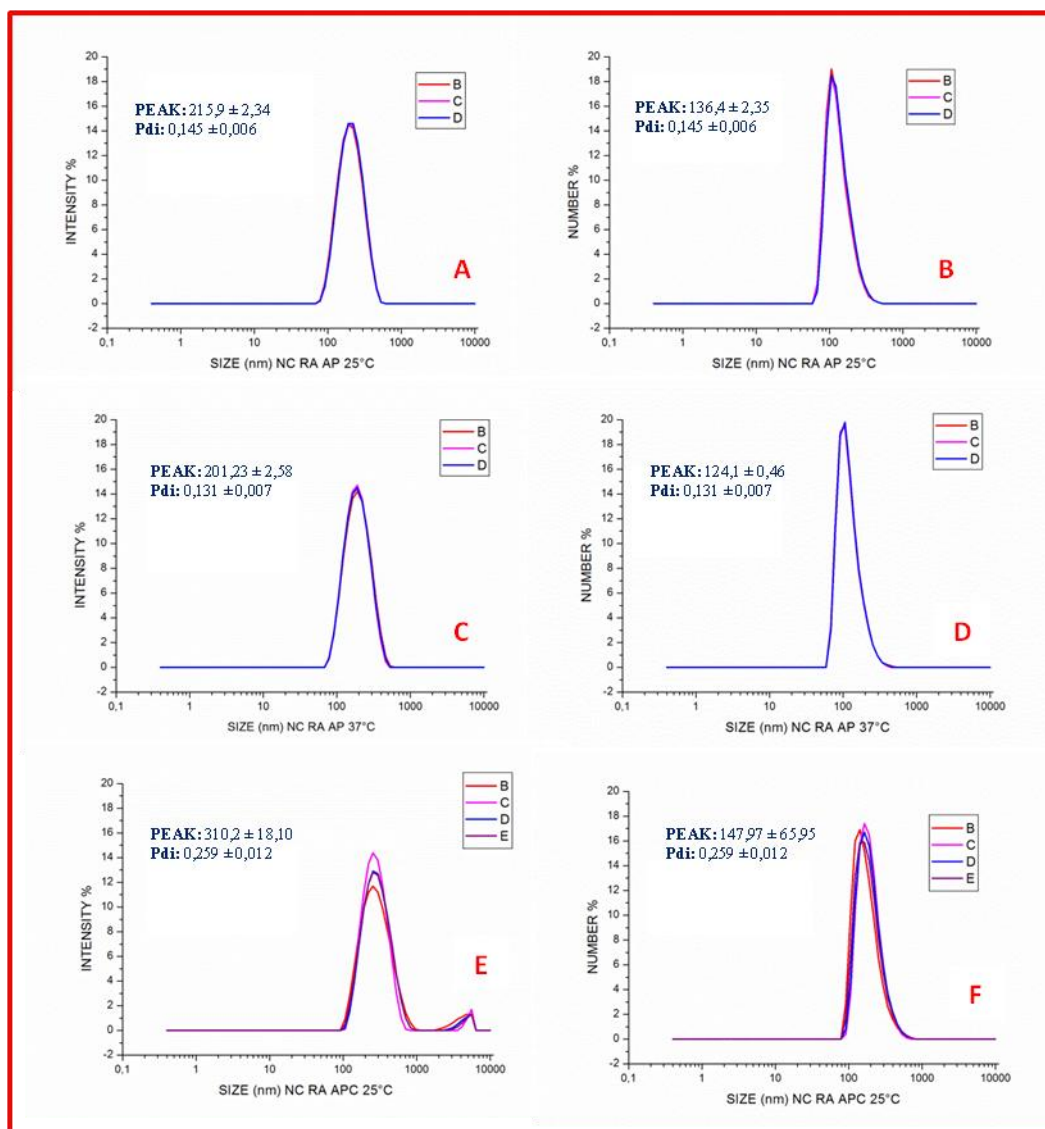


Figura 4.45. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NC RA dopo i vari trattamenti. A-B) AP a 25°C; C-D) AP a 37°C; E-F) APC a 25°C.

L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili e presentano un piccolo "shift" (e.g., Fig 4.46.A vs Fig. 4.46.B). Tuttavia, la sovrapponibilità sia rispetto all'altezza che allo shift è completa quando il campione è riscaldato (vedi e.g.

Fig. 4.45 C-D). Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità.

I picchi in intensità delle APC a 25°C (Fig. 4.45 E) mostrano un picco secondario, alla destra di quello principale. Infine, in nessun caso (Fig. 4.45 e 4.46) particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi.

Tutti i dati presentati nelle Figure 4.45 e 4.46 sono riportati nella Tabella 4.36 e nella Figura 4.47 dove risulta più semplice commentarli.

Come si vede bene dalla Figura 4.47, l'andamento delle dimensioni, e di come queste si modificano rispetto ai trattamenti di purificazione è molto simile. Si nota che le dimensioni ottenute in modalità Z-Ave si trovano comprese tra le altre due.

Si parla comunque di una differenza di circa 100 nm (e.g. AP int. vs AP num; Fig 4.47.) che non risulta essere indifferente quando si guardano le cose da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni).

Nella Tabella 4.36 sono mostrati i valori di PDI. Prendendo in considerazione i PDI a 25°C, si può vedere un incremento di 0,11 e di 0,03 in seguito alla centrifugazione e alle 12 ore di dialisi, mentre dopo le 24 e le 48 ore di dialisi si può vedere una diminuzione di ca 0,01. Anche a 37°C in seguito alle 12 ore di dialisi si osserva un aumento, di ca 0,10. Mettendo a confronto i PDI a 25° e a 37°C, si può vedere una diminuzione di ca 0,03 per le AP, e un incremento di ca 0,5 per le APD 12 h.

Tabella 4.36. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NC RA.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
AP	215,9 ± 2,3	136,4 ± 2,4	0,15 ± 0,01	201,2 ± 2,6	124,1 ± 0,5	0,13 ± 0,007
APC	310,2 ± 18,1	198,4 ± 8,8	0,26 ± 0,01			
APD 12 h	268,6 ± 3,4	186,8 ± 11,8	0,18 ± 0,003	211,9 ± 3,2	193,3 ± 2,7	0,23 ± 0,04
APD 24 h	286,3 ± 2,1	214,1 ± 1,1	0,14 ± 0,01			
APD 48 h	305,5 ± 9,6	224,0 ± 17,7	0,14 ± 0,03			

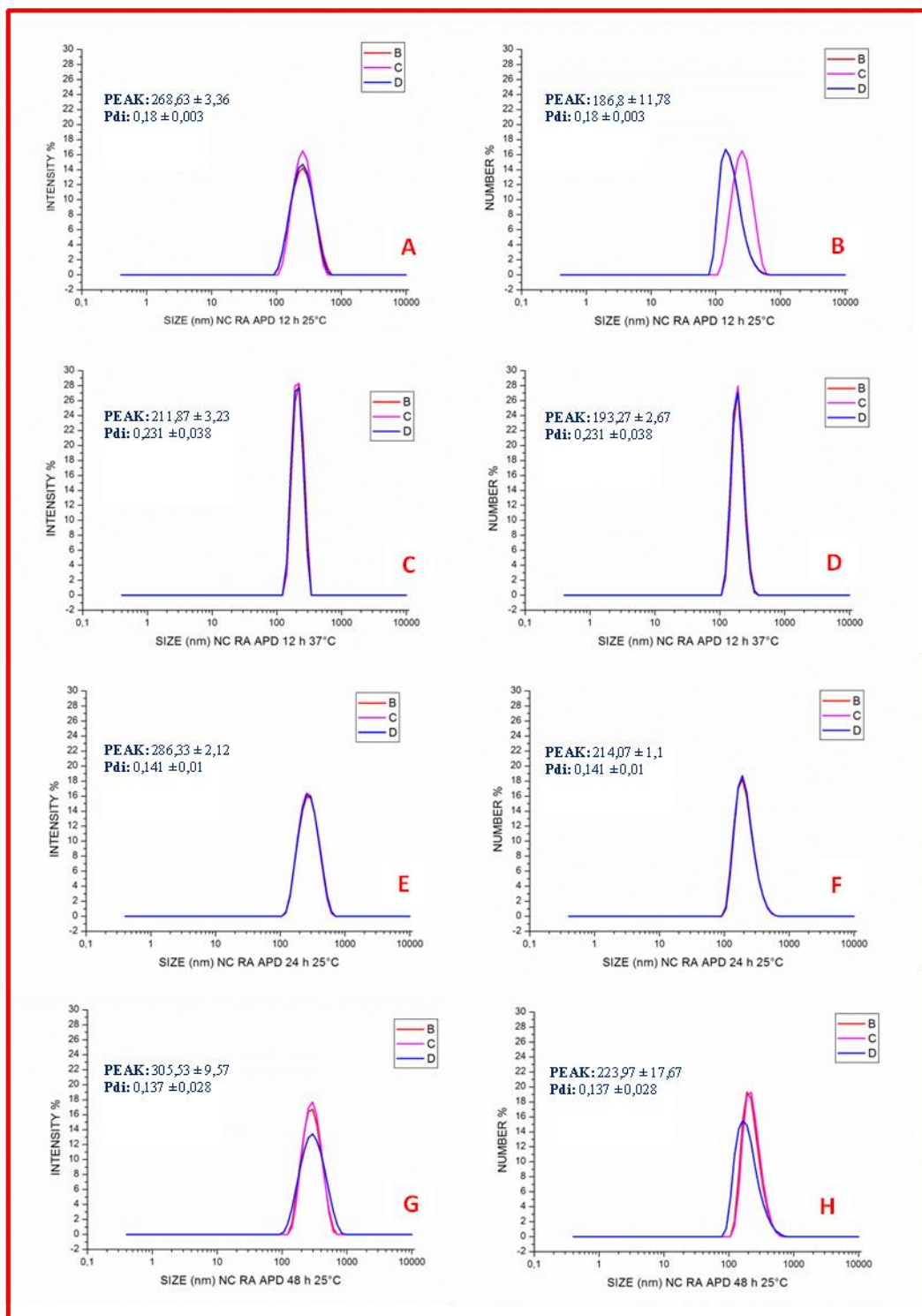


Figura 4.46. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NC RA dopo i vari trattamenti. A-B) APD 12 h a 25°C; C-D) APD 12 h a 37°C; E-F) APD 24 h a 25°C; G-H) APD 48 h a 25°C.

In altre parole, la centrifugazione e le 12 ore di dialisi aumentano la polidispersità, mentre le dialisi a 24 e 48 ore la diminuisce. Inoltre, la temperatura diminuisce la polidispersità delle AP, mentre aumenta quella delle APD 12 h.

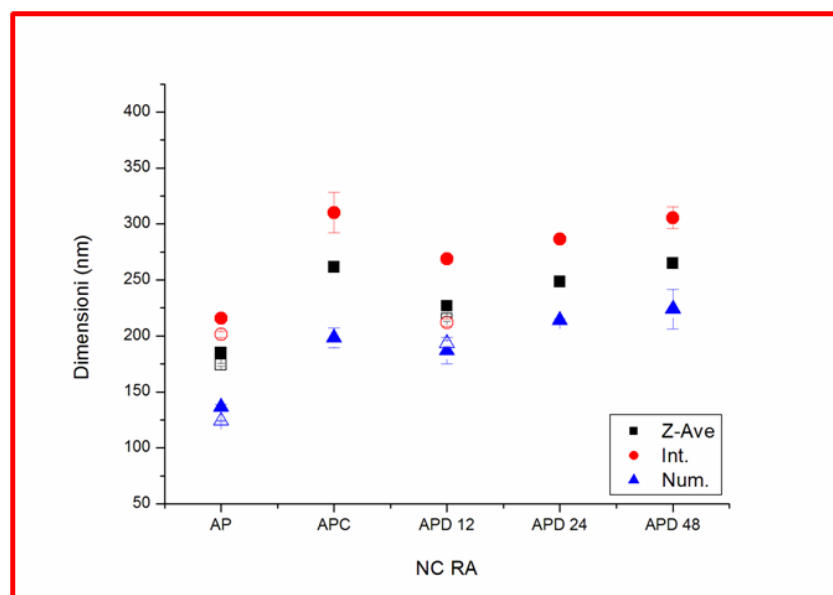


Figura 4.47. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NC RA. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

Un altro dato importante che è stato valutato è il potenziale zeta (ZP); si è studiato anche come questo variasse in funzione delle diverse metodiche di purificazione (Fig. 4.48, e Tab. 4.37).

Osservando la Figura 4.48 si può vedere che a 25°C il ZP delle NC RA AP (ca 41,6 mV) aumenta, in seguito alla centrifugazione di ca 0,9 mV (2,2 %) e in seguito alle dialisi a 12, 24 e 48 ore rispettivamente di ca 2 (ca 4,8 %), 4,2 (ca 10,1 %) e di 3,4 mV (ca 8,2 %). Con l'aumento della temperatura, il ZP delle NC RA AP diminuisce in modo non rilevante di ca 1,1 mV (ca 2,6 %), mentre quello delle APD 12 h aumenta in maniera significativa di ca 3,3 mV (ca 7,6 %). Anche a 37°C le 12 ore di dialisi determinano un aumento del potenziale di ca 6,4 mV (ca 15,8 %).

Tabella 4.37. Potenziale zeta delle NC RA.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
AP	41,6	1,1	40,5	1,1
APC	42,5	0,4		
APD 12 h	43,6	0,7	46,9	0,8
APD 24 h	45,8	0,8		
APD 48 h	45,0	0,8		

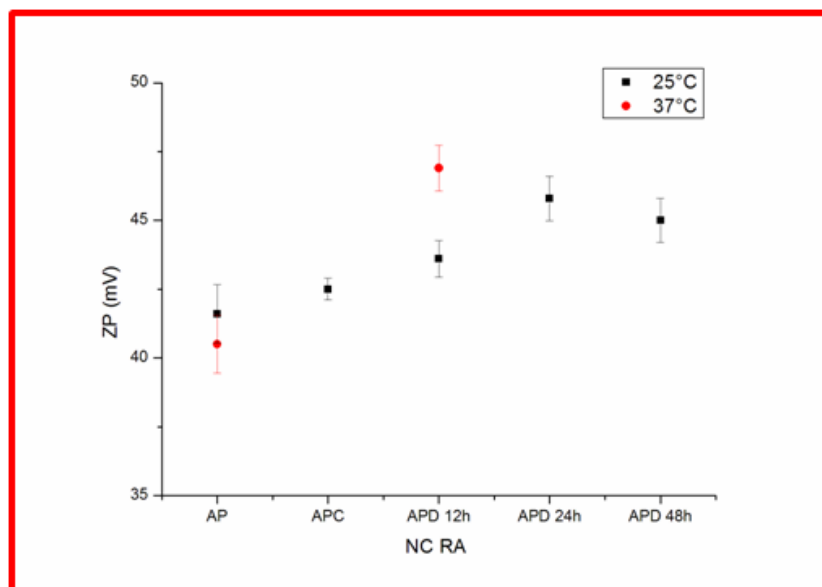


Figura 4.48. Confronto fra il potenziale zeta delle NC RA, a 25° e a 37°C.

Prendendo in considerazione le deviazioni standard a 25°C, si può vedere che sono molto contenute e sono comprese tra lo 0,9 e l'1,8 % del valore medio delle varie formulazioni.

Per quanto riguarda le deviazioni standard a 37°C, si può notare che sono abbastanza contenute, e rappresentano il 2,6 e l'1,8 % del valore medio rispettivamente delle AP e delle APD 12 h.

Semberebbe quindi che a 25°C la carica sia influenzata dal trattamento subito. Questa differenza si nota anche in funzione della temperatura.

Nella Figura 4.49 è mostrato l'andamento delle dimensioni delle varie formulazioni delle **NE RA** (63,4 µg/mL), sia a 25° (quadrati neri) che a 37°C (cerchi rossi), e nella Tabella 4.38 sono riportati gli stessi dati, per una comprensione ed un'analisi più rapida.

Come si può vedere dal grafico in Figura 4.49, a 25°C le dimensioni delle NE RA AP (ca 147,6 nm) in seguito alla centrifugazione diminuiscono in modo non rilevante, di ca 0,8 nm (ca 0,5 %). In seguito alle dialisi a 12, 24 e 48 ore, si può vedere una rilevante diminuzione delle dimensioni rispettivamente di ca 6,7, 8,7 e 7,8 nm (ca 4,5, 5,89 e 5,3 %).

Con l'aumento della temperatura, le dimensioni delle formulazioni AP e APD 12 h aumentano rispettivamente di ca 2,1 (ca 1,4 %) e 3 nm (ca 2,1 %). A 37°C si può vedere una diminuzione delle dimensioni in seguito alle 12 ore di dialisi, di ca 5,8 nm (ca 3,9 %).

Tabella 4.38. Dimensioni delle NE RA.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AV	SD	Z-AV	SD
AP	147,6	0,5	149,7	0,6
APC	146,8	1,3		
APD 12 h	140,9	1,7	143,9	1,1
APD 24 h	138,9	1,4		
APD 48 h	139,8	2,1		

Prendendo in considerazione le deviazioni standard, sono contenute sia a 25° che a 37°C. In percentuale, a 25°C le deviazioni standard sono comprese tra ca lo 0,3 e l'1,5 % del valore medio delle varie formulazioni. Anche a 37°C le deviazioni sono moderate, e rappresentano lo 0,4 e lo 0,7 % delle dimensioni delle formulazioni AP e APD 12 h.

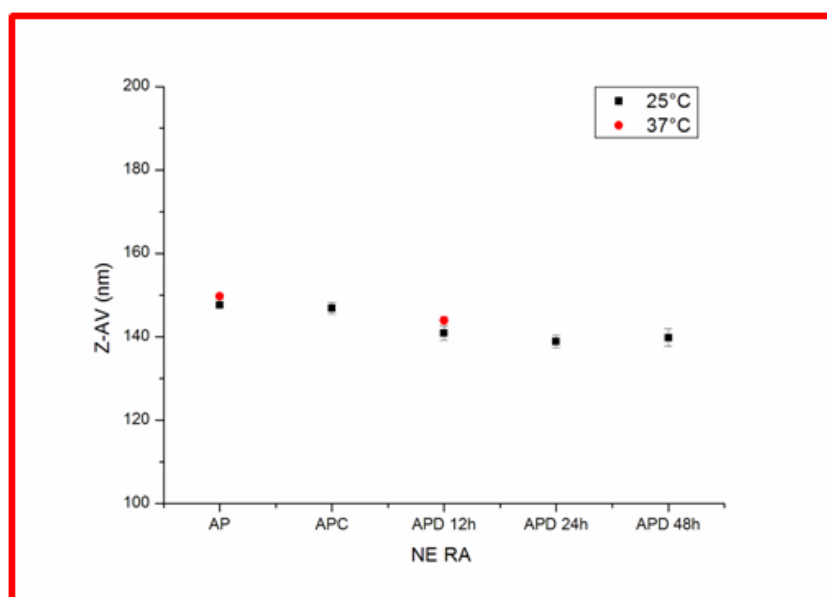


Figura 4.49. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni delle NE RA.

È interessante notare che mentre le dimensioni delle NC RA tendono ad aumentare in seguito ai trattamenti di purificazione, le NE RA mostrano un andamento opposto e maggiormente contenuto.

Tabella 4.39. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NE RA.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
AP	167,3 ± 1,8	101,7 ± 4,5	0,11 ± 0,01	173,4 ± 3	98,1 ± 7,7	0,13 ± 0,01
APC	169,3 ± 0,4	95,3 ± 4,2	0,12 ± 0,01			
APD 12 h	160,3 ± 2,0	95,3 ± 4,3	0,11 ± 0,01	148,6 ± 1,2	124,8 ± 2,4	0,02 ± 0,02
APD 24 h	156,1 ± 5,2	96,3 ± 2,7	0,11 ± 0,01			
APD 48 h	154,6 ± 4,1	101,4 ± 4,5	0,11 ± 0,03			

Nelle Figure 4.50 e 4.51 sono mostrati i grafici ottenuti dal DLS, che mostrano le dimensioni delle varie formulazioni delle NE RA espresse in intensità e in numero, a 25° e a 37°C.

L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili e presentano un minimo "shift" (e.g., Fig 4.50 C vs Fig. 4.50 D). Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità. Infine, in nessun caso (Fig. 4.40 e 4.51) particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi.

Tutti i dati presentati nelle Figure 4.50 e 4.51 sono riportati nella Tabella 4.39 e nella Figura 4.52 dove risulta più semplice commentarli.

Come si vede bene dalla Figura 4.52, l'andamento delle dimensioni, e di come queste si modificano rispetto ai trattamenti di purificazione è molto simile. Si nota che le dimensioni ottenute in modalità Z-Ave si trovano a metà tra le altre due, ma più vicine alle dimensioni ottenute in modalità "intensità". Si parla comunque di una differenza massima di circa 75 nm (e.g. AP int. vs AP num; Fig. 4.52) che non risulta essere indifferente quando si guardano le cose da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni). Tuttavia, per ogni insieme di dati, le differenze relativamente ai trattamenti subiti sono minime, se viste dal punto di vista biologico.

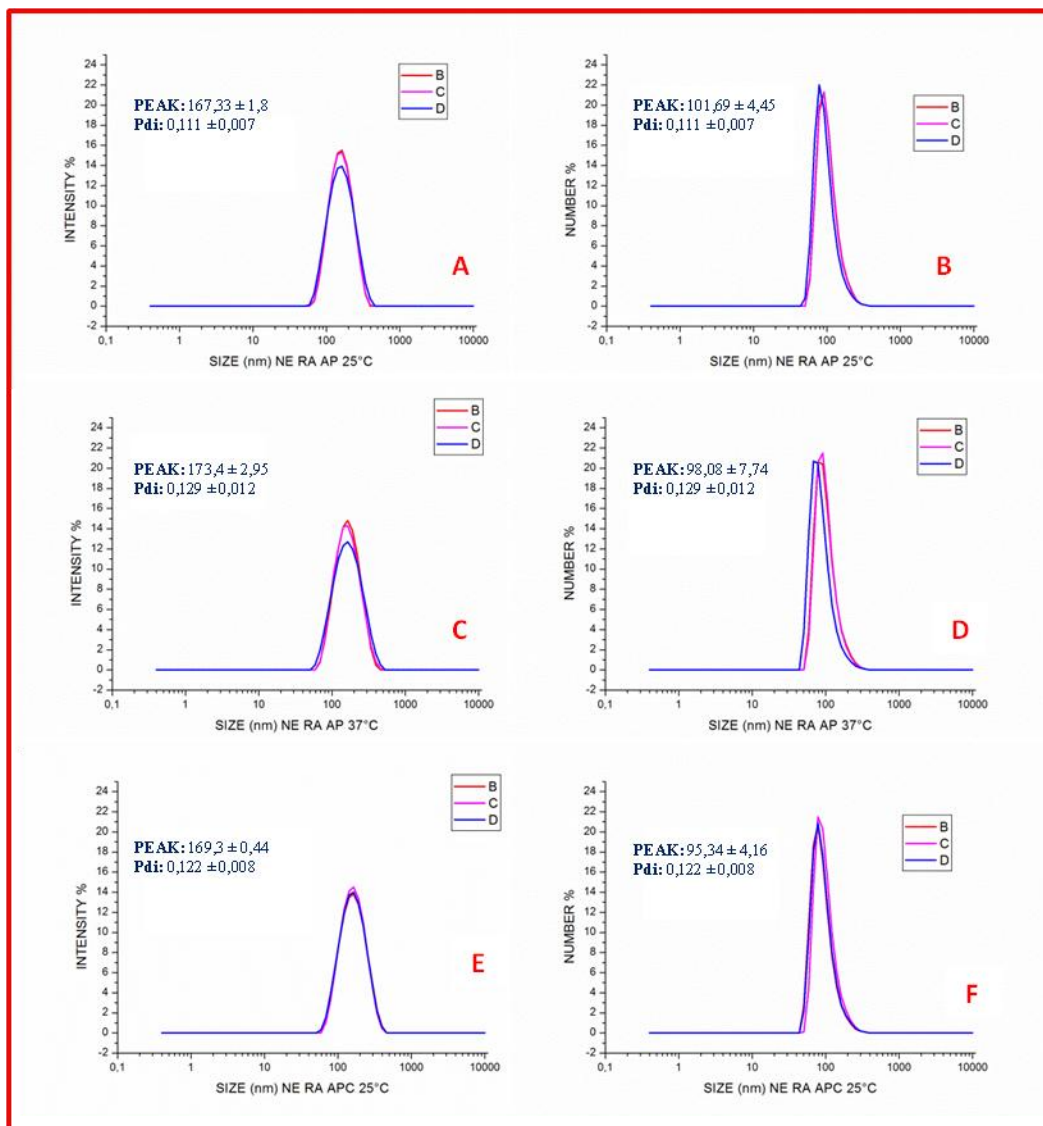


Figura 4.50. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NE RA dopo i vari trattamenti. A-B) AP a 25°C; C-D) AP a 37°C; E-F) APC a 25°C.

In Tabella 4.39 sono mostrati anche i valori di PDI. Relativamente a questi valori misurati a 25°C, si può vedere un aumento in seguito alla centrifugazione (ca 0,01), mentre in seguito alle dialisi a 12, 24 e 48 ore rimane invariato. A 37°C in seguito alla dialisi il PDI diminuisce di ca 0,11. Il confronto tra i PDI a 25 e 37°C rivela un aumento di ca 0,02 per le AP, e una diminuzione di ca 0,09 per le APD 12 h.

In altre parole, la dialisi a 25°C non modifica i PDI, mentre a 37°C lo riduce. La temperatura determina un aumento e una diminuzione dei PDI in maniera non significativa, rispettivamente delle AP e delle APD 12 h.

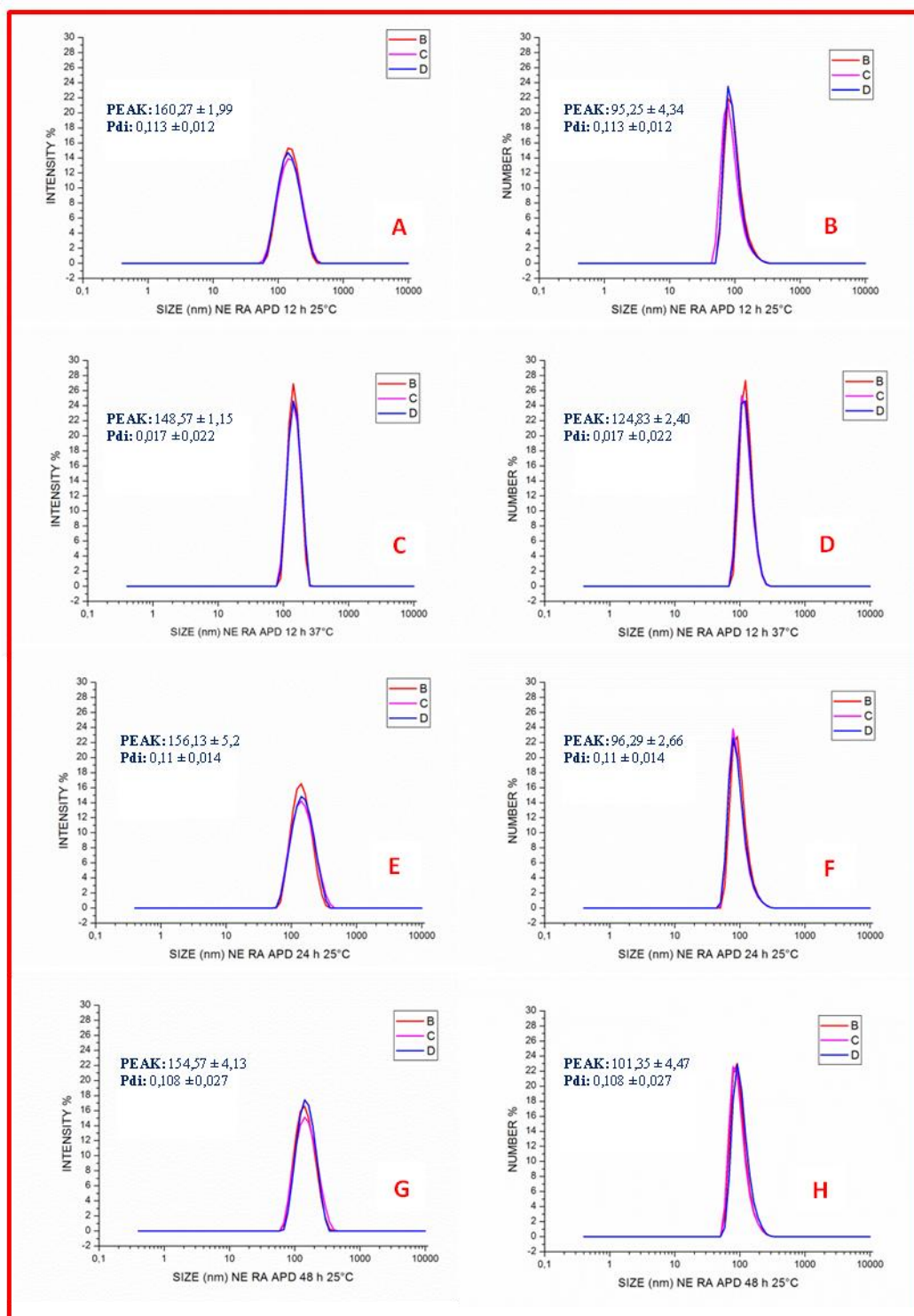


Figura 4.51. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NE RA dopo i vari trattamenti. A-B) APD 12 h a 25°C; C-D) APD 12 h a 37°C; E-F) APD 24 h a 25°C; G-H) APD 48 h a 25°C.

Il grafico in Figura 4.53 mostra l'andamento del potenziale zeta delle varie formulazioni delle NE RA, a 25° (quadrati neri) e a 37°C (cerchi rossi). Gli stessi dati sono riportati anche nella Tabella 4.40 per un'analisi più rapida e semplice.

Tabella 4.40. Potenziale zeta delle NE RA.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
AP	-66,6	1,2	-56,2	1,8
APC	-53,4	0,04		
APD 12 h	-47,3	0,9	-51,7	0,8
APD 24 h	-39,8	0,9		
APD 48 h	-45,0	0,8		

Osservando la Figura 4.54 si può notare a 25°C che il potenziale zeta delle NE RA AP (ca -66,6 mV) aumenta in seguito alla centrifugazione di ca 13,2 mV (ca 19,8 %). Un rilevante aumento del potenziale zeta si può vedere anche dopo le dialisi a 12, 24 e 48 ore, rispettivamente di ca 19,3 (ca 28,98 %), 26,8 (ca 40,2 %) e 21,6 mV (ca 32,4 %).

Analizzando il potenziale zeta delle NE RA a 37°C, si può vedere un aumento di ca 4,5 mV (ca 8 %), in seguito alle 12 ore di dialisi. Mettendo a confronto i valori dei potenziali delle formulazioni AP e APD 12 h a 25 e a 37°C, si vede rispettivamente un aumento di ca 10,4 mV (ca 15,6 %) ed una diminuzione di ca 4,4 mV (ca 9,3 %).

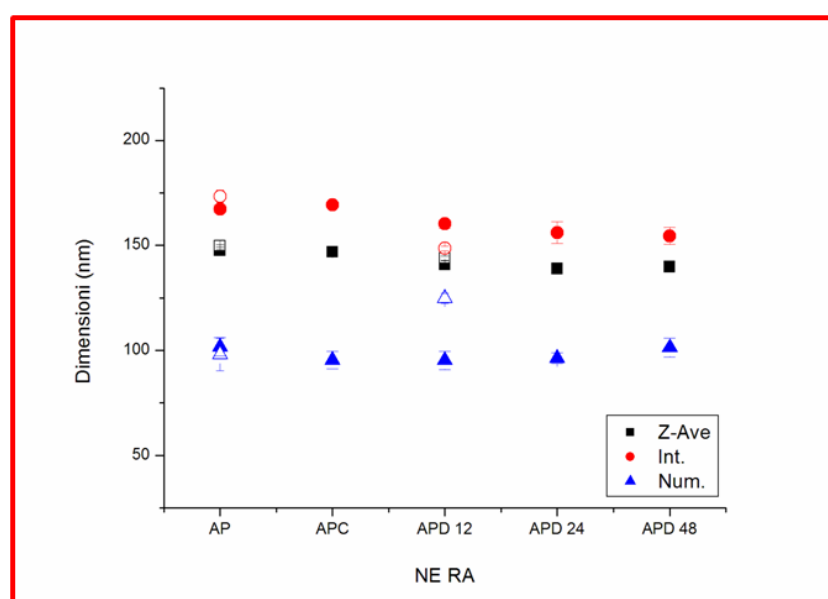


Figura 4.52. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NE RA. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

Per quanto riguarda le deviazioni standard a 25°C, si può vedere che sono contenute, e sono comprese tra lo 0,1 e il 2,2 % del valore medio delle varie formulazioni. Le deviazioni standard a 37°C sono molto contenute, e corrispondono ca al 3,1 e all'1,6 % del valore medio del potenziale delle AP e delle APD 12 h.

Semberebbe quindi che la carica sia influenzata dai vari trattamenti e sicuramente dalla temperatura.

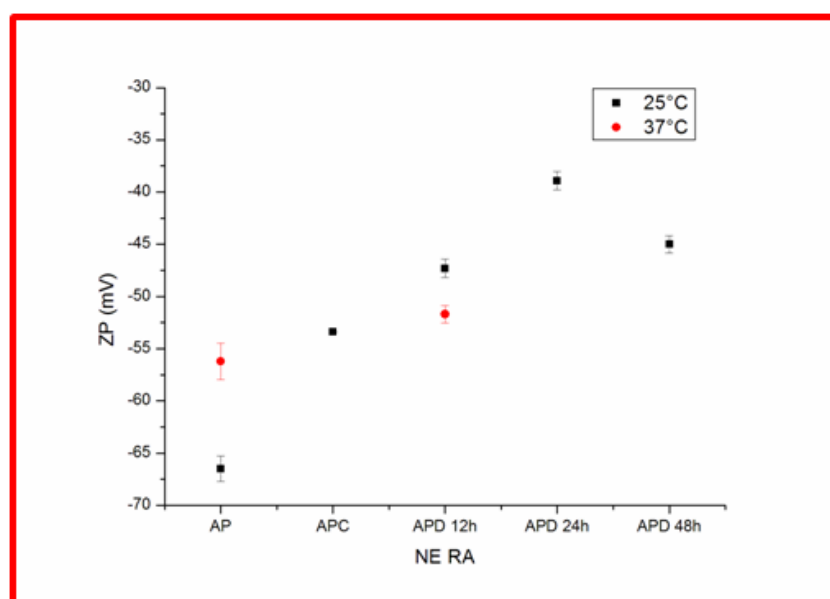


Figura 4.53. Potenziale zeta delle NE RA .

Commenti finali

- Le NC RA AP (64,3 µg/mL) risultano essere più grandi delle NE RA AP (63,4 µg/mL) per la presenza della capsula di chitosano. A 25°C le NC differiscono dalle NE RA AP, APC, APD 12, 24 e 48 h, rispettivamente per 37,1, 114,5, 85,7, 109,4 e 124,9 nm. La differenza di dimensioni a 37°C, tra le NC e le NE Ibu AP e APD 12 h è pari a 24,6 e 71,2 nm.
- L'acido trans-retinoico è una molecola lipofila, che si scioglie bene in etanolo. Questa molecola presenta un gruppo -COOH, ed è probabile che questo gruppo

sia rivolto verso la fase acquosa, ma essendo una molecola lipifila è possibile che la restante parte sia intrappolata all'interno delle code dei lipidi.

- NC e NE sembrano comportarsi in maniera speculare rispetto ai trattamenti subiti.
 - Le *dimensioni* aumentano per le NC, rimangono abbastanza stabili per le NE
 - La *carica* aumenta sia per le NC che per le NE.
 - Il *PDI* aumenta per centrifugazione e 12 ore di dialisi delle NC, mentre per le 24 e 48 ore di dialisi, e per la temperatura (solo per le AP). I PDI delle APD 12 h aumentano con l'incremento della temperatura. Nelle NE il PDI rimane abbastanza stabile a 25°C, mentre l'aumento della temperatura aumenta i PDI delle AP e riduce quello delle APD 12 h.

4.2.6. NC e NE AZL 38

Nel grafico in Figura 4.54 è mostrato l'andamento delle dimensioni delle varie formulazioni delle **NC AZL 38** (12,6 µg/mL), a 25° (quadrati neri) e a 37°C (cerchi rossi).

Questi dati sono riportati anche nella Tabella 4.41, per un'analisi e una comprensioni più rapida e semplice.

Come si può vedere sia dal grafico che dalla Tabella, a 25°C le dimensioni delle NC AZL 38 AP (ca 186,9 nm) aumentano in modo rilevante di ca 100,2 nm (ca 53,6 %), in seguito alla centrifugazione. Un importante incremento delle dimensioni si può osservare anche dopo le dialisi a 12, 24 e 48 ore, rispettivamente di ca 38,3 (ca 20,5 %), 62,2 (ca 33,3 %) e di 97,7 nm (ca 52,3 %).

Confrontando le dimensioni delle formulazioni AP e APD 12 h a 25° e a 37°C, si osserva una diminuzione rispettivamente di ca 14,3 (ca 7,7 %) e 5,4 nm (ca 2,4 %). A 37°C in seguito alla dialisi, si può vedere un aumento delle dimensioni delle NC AZL 38 di ca 47,2 nm (ca 27,4 %).

Tabella 4.41. Dimensioni delle NC AZL 38.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AV	SD	Z-AV	SD
AP	186,9	3,0	172,6	0,7

APC	287,1	2,0		
APD 12 h	225,2	2,7	219,8	1,5
APD 24 h	249,1	1,2		
APD 48 h	284,6	4,2		

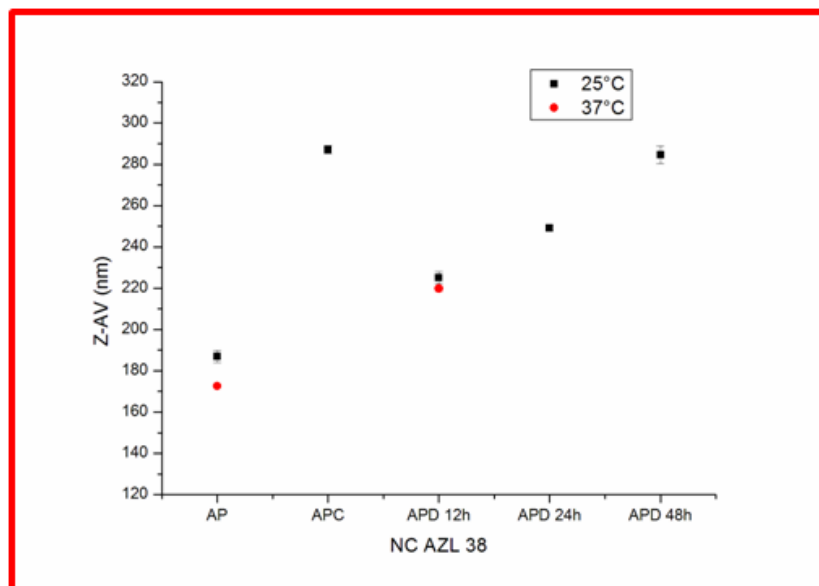


Figura 4.54. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NC AZL 38.

Per quanto riguarda le deviazioni standard, si può vedere che sono contenute, sia a 25° che a 37°C. In percentuale, a 25°C le deviazioni sono comprese tra ca lo 0,5 e l'1,6; % del valore medio delle varie formulazioni (Tab. 4.41). A 37°C le deviazioni stansard corrispondono ca allo 0,4 e allo 0,7 % del valore medio delle dimensioni delle AP e APD 12 h (Tab. 4.41).

Nelle Figure 4.55 e 4.56 sono mostrati i grafici generati dal DLS, relativamente alle dimensioni in intensità e in numero, delle varie formulazioni delle NC AZL 38, a 25° e a 37°C.

Tabella 4.42. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NC AZL 38.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
AP	223,0 ± 3,5	145,9 ± 7,5	0,16 ± 0,02	198,9 ± 3,1	127,6 ± 6,9	0,13 ± 0,01
APC	344,0 ± 22,2	210,5 ± 8,9	0,34 ± 0,02			

APD 12 h	268,3 ± 1,3	191,7 ± 16,1	0,17 ± 0,01	263,7 ± 1,2	175,2 ± 15,6	0,18 ± 0,01
APD 24 h	289,5 ± 3,9	211,5 ± 7,2	0,15 ± 0,01			
APD 48 h	330,8 ± 12,5	249,3 ± 1,6	0,14 ± 0,02			

L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili e presentano un piccolo "shift" (e.g., Fig 4.56 A vs Fig. 4.56 B). Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità.

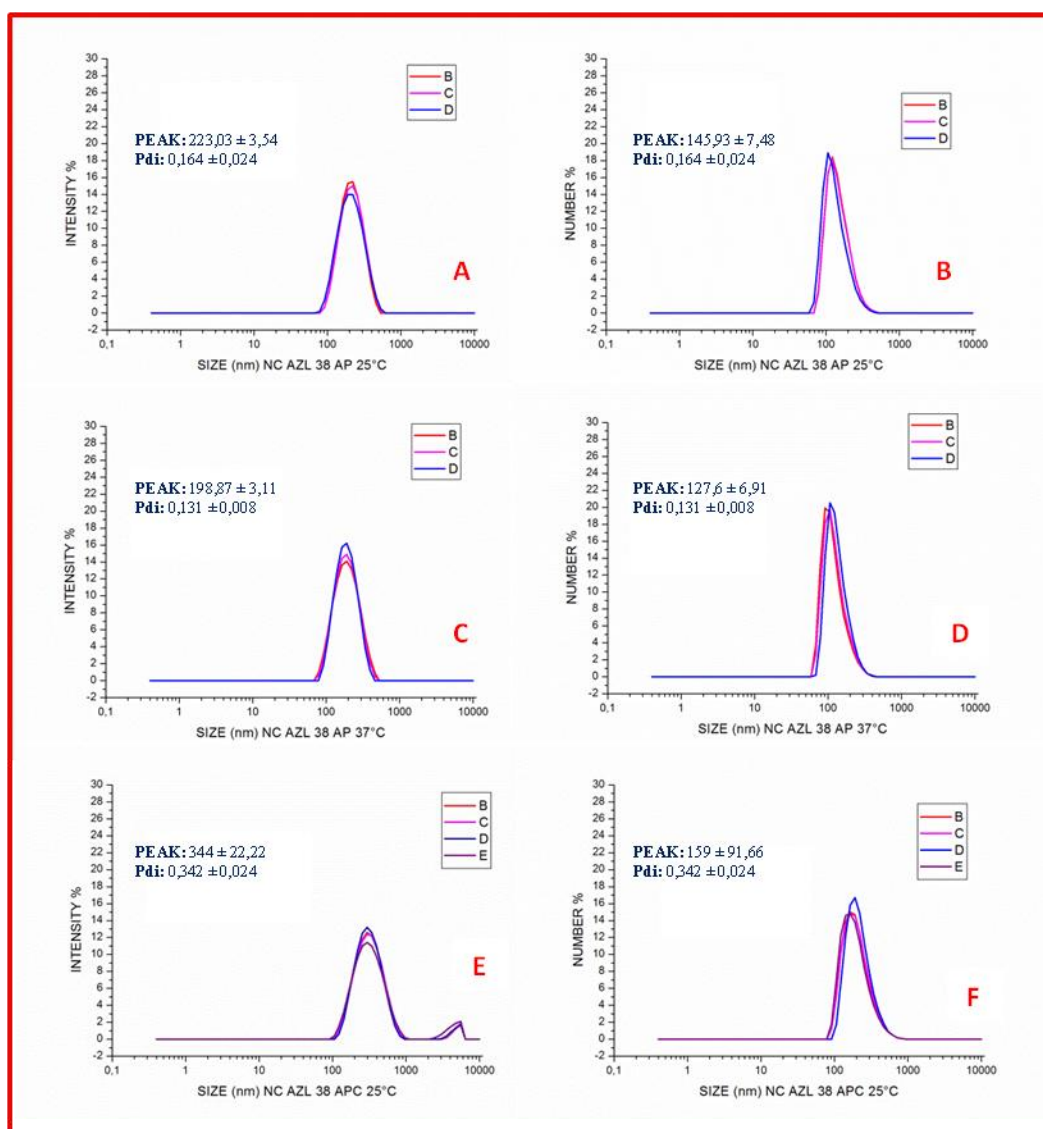


Figura 4.55. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NC AZL 38 dopo i vari trattamenti. A-B) AP a 25°C; C-D) AP a 37°C; E-F) APC a 25°C.

Le NC AZL 38 APC a 25°C mostrano due picchi, uno principale e uno più piccolo, alla destra di quello principale. Infine, in nessun caso (Fig. 4.55 e 4.56) particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi.

Tutti i dati presentati nelle Figure 4.55 e 4.56 sono riportati nella Tabella 4.42 e nella Figura 4.57 dove risulta più semplice commentarli.

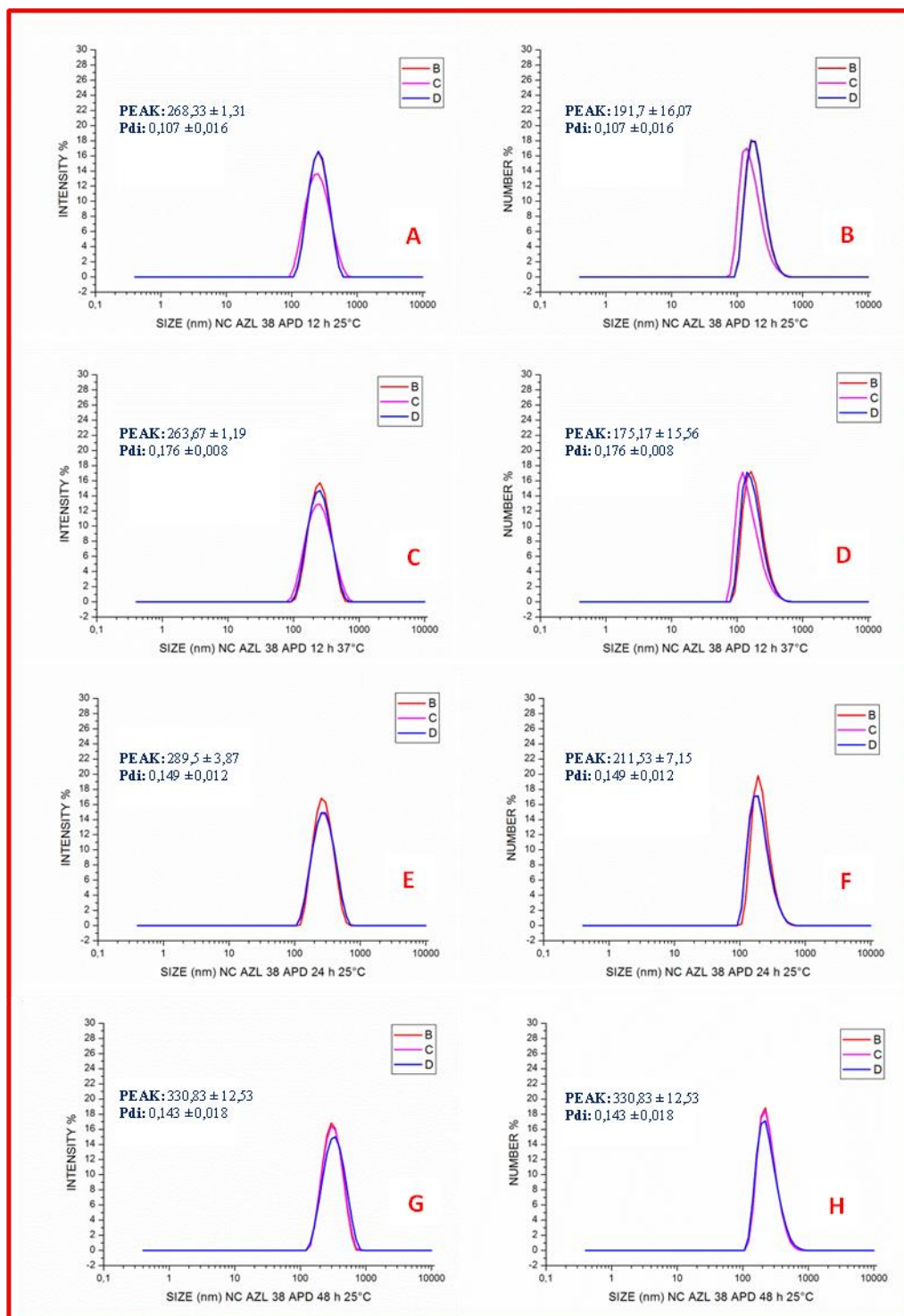


Figura 4.56. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NC AZL 38 dopo i vari trattamenti. A-B) APD 12 h a 25°C; C-D) APD 12 h a 37°C; E-F) APD 24 h a 25°C; G-H) APD 48 h a 25°C.

Come si vede bene dalla Figura 4.57, l'andamento delle dimensioni, e di come queste si modificano rispetto ai trattamenti di purificazione è molto simile. Si nota che le dimensioni ottenute in modalità Z-Ave si trovano comprese tra le altre due. Si parla comunque di una differenza massimadi circa 200 nm (e.g. APC int. vs APC num; Fig

4.57) che non risulta essere indifferente quando si guardano le cose da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni).

In Tabella 4.42 sono mostrati anche i valori di PDI. Prendendo in considerazione i PDI a 25°C, si può notare un aumento di ca 0,18 e di 0,01 rispettivamente in seguito alla centrifugazione e alle 12 ore di dialisi, e una diminuzione di ca 0,01 e di 0,02 in seguito alle 24 e 48 ore di dialisi. A 37°C i PDI in seguito alla dialisi aumentano di ca 0,05.

Confrontando i PDI a 25° e a 37°C, delle AP e delle APD 12 h, si può osservare rispettivamente una diminuzione di ca 0,03 e un aumento di 0,01. In altre parole, la centrifugazione e le 12 ore di dialisi aumentano la polidispersità, mentre le dialisi a 24 e 48 ore la diminuiscono. La temperatura diminuisce i PDI delle AP, e aumenta quelli delle APD 12 h.

Un altro dato importante che è stato valutato è il potenziale zeta. Analizzando la Figura 4.58 e la Tabella 4.43, si può vedere che a 25°C il potenziale zeta delle NC AZL 38 AP (ca 46,1 mV) aumenta di ca 0,8 mV (ca 1,7 %) in seguito alla centrifugazione, e diminuisce in seguito alle dialisi a 12, 24 e 48 ore, rispettivamente di ca 17,1 (ca 37,1 %), 0,1 (ca 0,2 %) e 1,3 mV (ca 2,8 %).

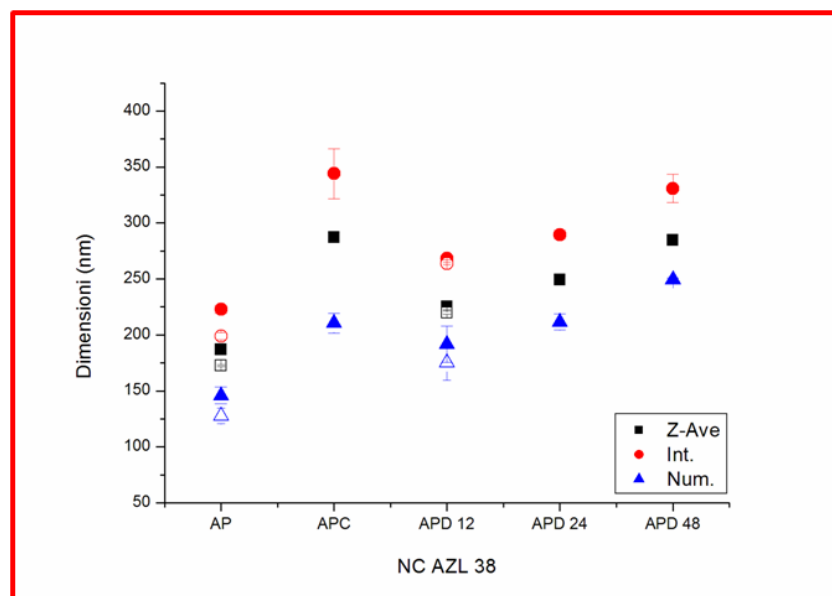


Figura 4.57. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NC AZL 38. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

Confrontando il potenziale zeta a 25° e a 37°C, si può vedere una diminuzione di ca 14,2 mV (ca 30,8 %) per le AP, e un aumento di ca 16,9 mV (ca 58,2 %) per le APD 12

h. A 37°C le 12 ore di dialisi determinano un aumento del potenziale di ca 14 mV (ca 43,9 %).

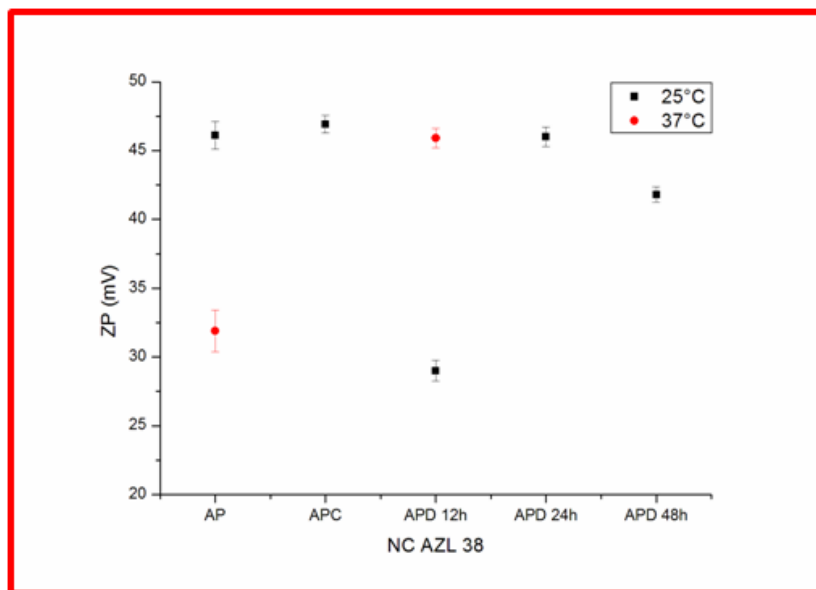


Figura 4.58. Potenziale zeta delle NC AZL 38.

Per quanto riguarda le deviazioni standard, si può vedere che sono molto contenute, e a 25°C sono comprese tra l'1,3 e il 2,6 % del valore medio delle varie formulazioni.

Prendendo in considerazione le deviazioni standard a 37°C, sono contenute e corrispondono a ca il 4,8 e l'1,6 % del valore del potenziale delle AP e APD 12 h.

Semberebbe quindi che a 25°C la carica non sia tanto influenzata dal trattamento subito, ad eccezione delle APD 12 h. La temperatura sembra invece influenzare in modo significativo la carica.

Nel grafico in Figura 4.59 è messo in evidenza l'andamento delle dimensioni delle **NE AZL 38** (11,2 µg/mL) in seguito ai vari trattamenti a 25° (quadrati neri) e a 37°C (cerchi rossi). Nella Tabella 4.44 sono riportati gli stessi dati della Figura 4.59, per una comprensione più rapida dei dati.

Come di può vedere dalla Figura 4.59, a 25°C le dimensioni delle NE AZL 38 AP (ca 141,4 nm) in seguito alla centrifugazione diminuiscono di ca 1,1 nm (ca 0,8 %).

Anche in seguito alle dialisi a 12, 24 e 48 ore si può osservare una diminuzione delle dimensioni, rispettivamente di ca 4,1 (ca 2,9 %), 4,3 (ca 3,0 %) e 4,1 nm (ca 2,9 %).

Per quanto riguarda i dati ottenuti a 37°C, si può notare una diminuzione delle dimensioni in seguito alla dialisi di ca 8,1 nm (ca 5,6 %). Mettendo a confronto le dimensioni delle formulazioni AP e APD 12 h, a 25° e a 37°C, si può vedere rispettivamente un aumento di ca 3,8 nm (ca 2,7 %) e una diminuzione di ca 0,2 nm (ca 0,2 %).

Tabella 4.43. Potenziale zeta delle NC AZL 38.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
AP	46,1	1,0	31,9	1,5
APC	46,9	0,6		
APD 12 h	29,0	0,8	45,9	0,7
APD 24 h	46,0	0,7		
APD 48 h	41,8	0,6		

Per quanto riguarda le deviazioni standard, si può vedere che sono contenute sia a 25° che a 37°C. In percentuale le deviazioni a 25°C sono comprese tra ca lo 0,4 e lo 0,98 % del valore medio delle varie formulazioni. A 37°C le deviazioni rappresentano ca lo 0,4 e lo 0,4 % del valore medio delle dimensioni delle AP e delle APD 12 h.

Tabella 4.44. Dimensioni delle NE AZL 38.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AV	SD	Z-AV	SD
AP	141,5	1,4	145,3	0,6
APC	140,4	0,7		
APD 12 h	137,4	0,6	137,2	0,5
APD 24 h	137,2	0,7		
APD 48 h	137,4	0,5		

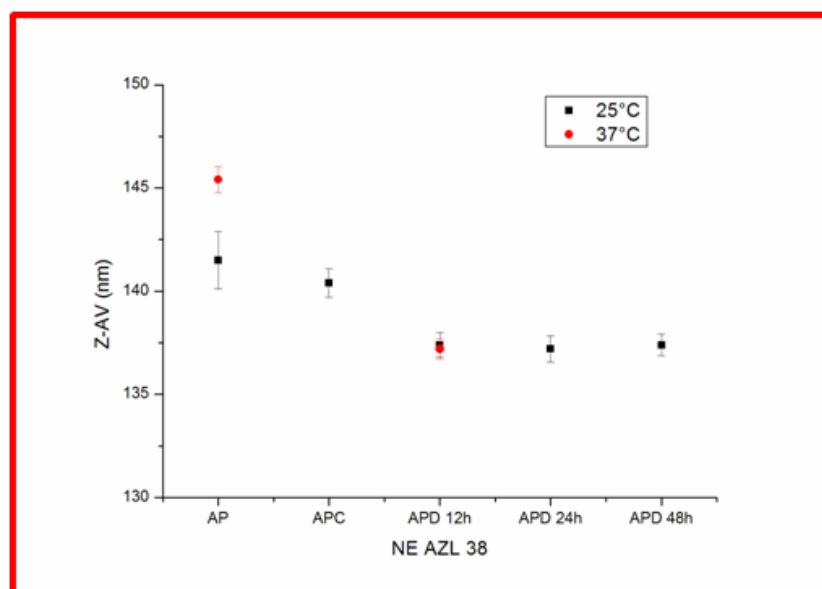


Figura 4.59. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NE AZL 38.

È interessante notare che mentre le dimensioni delle NC AZL 38 tendono ad aumentare in seguito ai trattamenti di purificazione, le NE AZL 38 mostrano un andamento opposto e maggiormente contenuto.

Nelle Figure 4.60 e 4.61 sono mostrati i grafici generati dal DLS, relativamente alle dimensioni espresse in intensità e in numero, delle varie formulazioni NE AZL 38 , a 25° e a 37°C.

Tabella 4.45. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NE AZL 38.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
AP	164,6 ± 3,2	84,1 ± 11,5	0,13 ± 0,01	116,7 ± 1,1	97,8 ± 4,1	0,12 ± 0,01
APC	160,8 ± 3,2	93,3 ± 3,4	0,13 ± 0,003			
APD 12 h	154,0 ± 1,6	96,4 ± 1,4	0,11 ± 0,02	155,4 ± 0,6	90,8 ± 1,1	0,12 ± 0,1
APD 24 h	154,3 ± 1,9	96 ± 3,9	0,11 ± 0,01			
APD 48 h	154,9 ± 1,2	96,1 ± 3	0,11 ± 0,01			

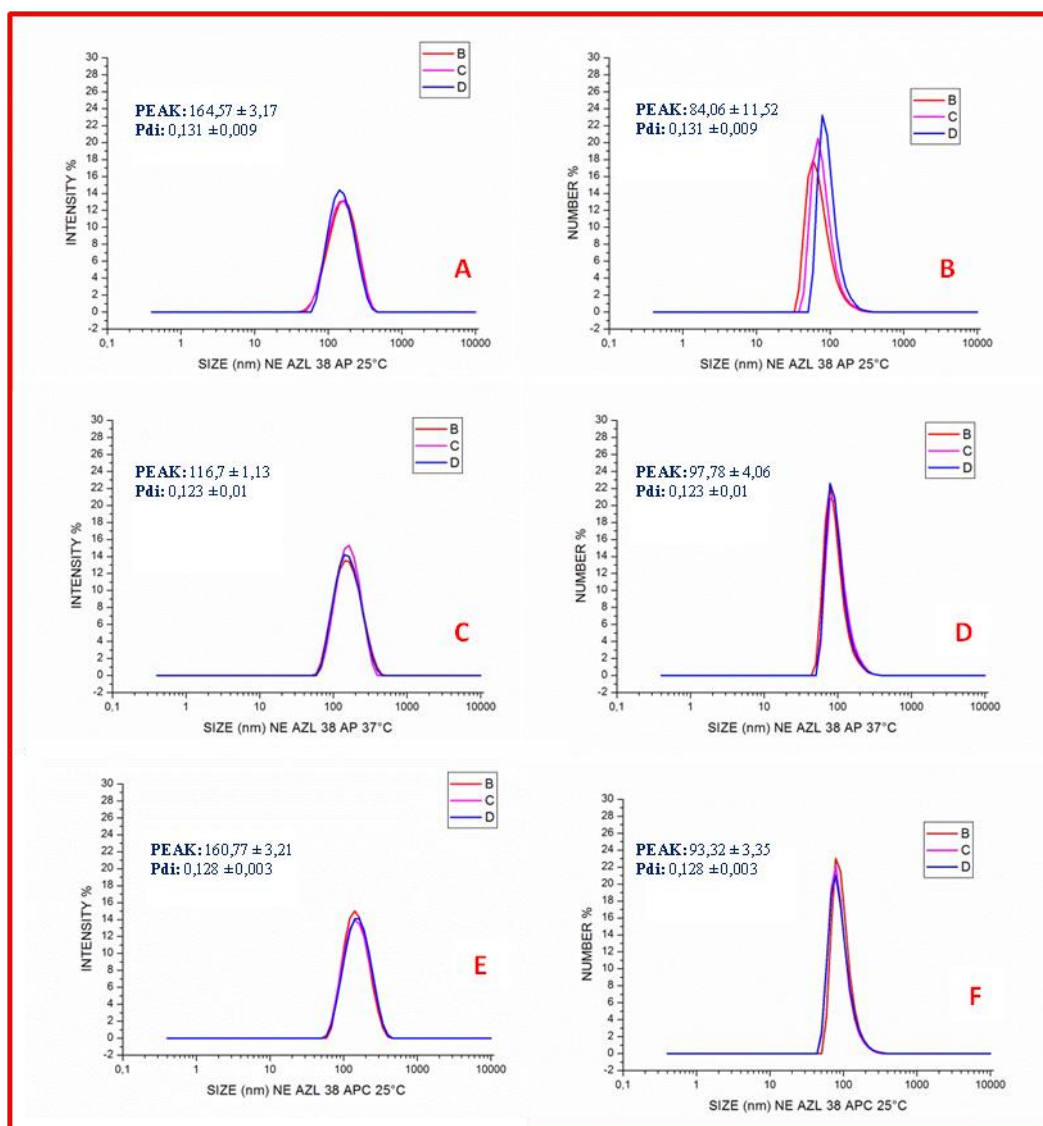


Figura 4.60. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NE AZL 38. A-B) AP a 25°C; C-D) AP a 37°C; E-F) APC a 25°C.

L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili e presentano un minimo "shift" (e.g., Fig 4.60 A vs Fig. 4.60 B). Tuttavia, la sovrapponibilità sia rispetto all'altezza che allo shift migliora quando il campione APD 12 h è stato riscaldato (Fig. 4.611 A-B). Non si può dire altrimenti per il campione AP (Fig. 4.60 A-D). Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità. Infine, in nessun caso (Fig. 4.60 e 4.61) particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi.

Tutti i dati presentati nelle Figure 4.60 e 4.61 sono riportati nella Tabella 4.45 e nella Figura 4.62 dove risulta più semplice commentarli.

Come si vede bene dalla Figura 4.62, l'andamento delle dimensioni, e di come queste si modificano rispetto ai trattamenti di purificazione è molto simile. Si nota che le dimensioni ottenute in modalità Z-Ave si trovano comprese tra le altre due, più vicine alle dimensioni ottenute in modalità "intensità".. Si parla comunque di una differenza massima di circa 100 nm (e.g. AP int. vs AP num; Fig 4.62) che non risulta essere indifferente quando si guardano le cose da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni). Tuttavia, per ogni insieme di dati, le differenze relativamente ai trattamenti subiti sono minime, se viste dal punto di vista biologico.

In Tabella 4.45 sono mostrati anche i valori di PDI. Relativamente a questi valori misurati a 25°C, si può osservare una diminuzione di ca 0,02 in seguito alle dialisi a 12, 24 e 48 ore, mentre rimane invariato dopo la centrifugazione. Anche a 37°C i PDI rimangono invariato dopo la dialisi. Confrontando i PDI a 25° e a 37°C, si può notare una diminuzione di ca 0,01 per le AP, e un aumento di ca 0,01 per le APD 12 h.

In altre parole, le dialisi diminuiscono i PDI in maniera non significativa, mentre la temperatura diminuisce i PDI delle AP e aumenta quelli delle APD 12 h.

Relativamente al potenziale zeta, nella Figura 4.63 si mostrano i valori di ZP delle NE AZL 38 in seguito ai vari trattamenti, a 25° (quadrati neri) e a 37°C (cerchi rossi), e questi dati sono riportati anche nella Tabella 4.46.

Tabella 4.46. Potenziale zeta delle NE AZL 38.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
AP	-57,9	1,0	-67,8	0,03
APC	-52,5	0,2		
APD 12 h	-45,7	0,4	-72,0	0,4
APD 24 h	-43,1	0,5		
APD 48 h	-46,8	1,0		

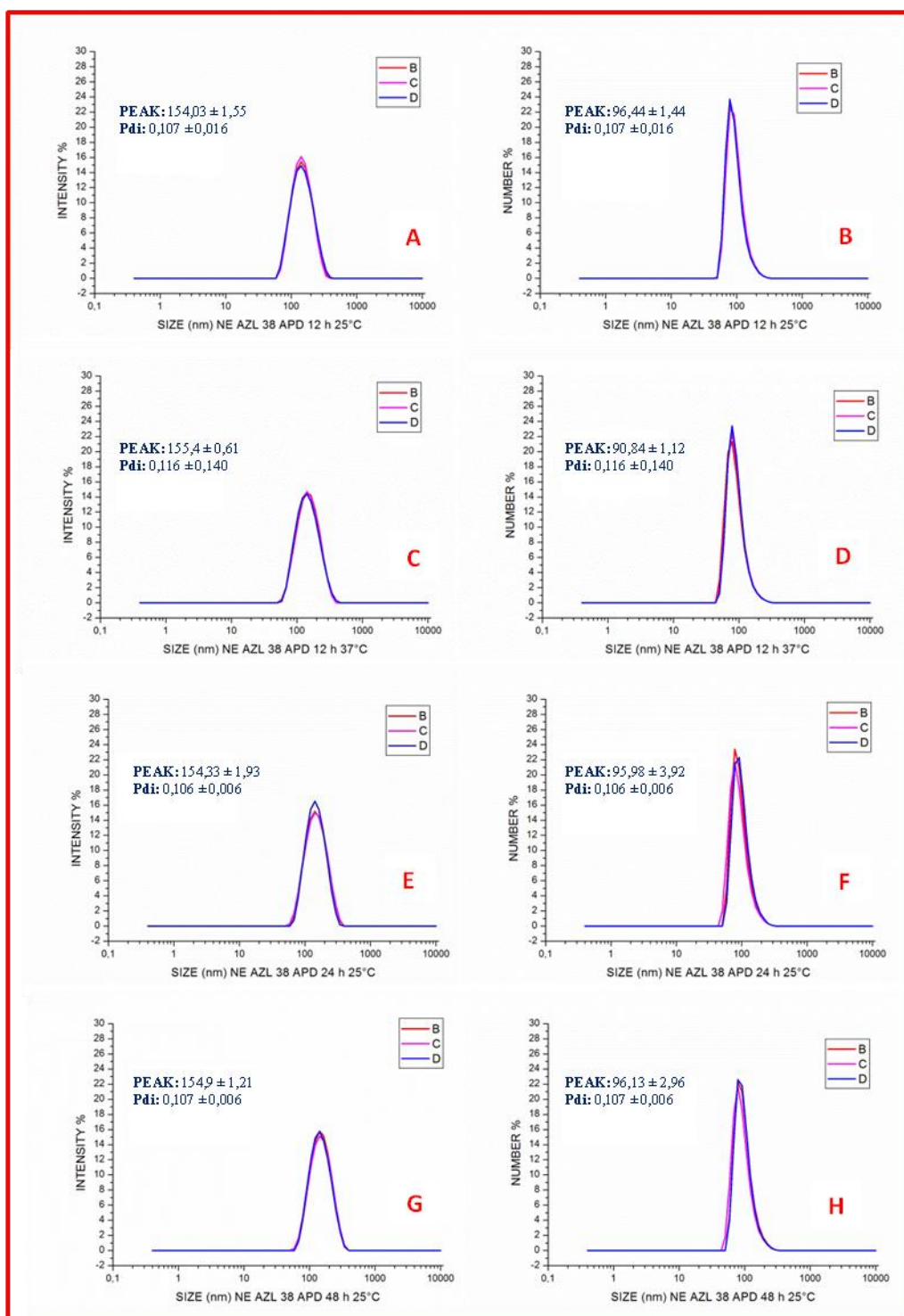


Figura 4.61. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NE AZL 38. A-B) APD 12 h a 25°C; C-D) APD 12 h a 37°C; E-F) APD 24 h a 25°C; G-H) APD 48 h a 25°C.

A 25°C il potenziale zeta delle NE AZL 38 AP (ca -57,9 mV) in seguito alla centrifugazione e alle dialisi a 12, 24 e 48 ore, aumenta rispettivamente di ca 5,4 (ca 9,3 %), 12,2 (ca 21,1 %), 14,8 (ca 25,6 %) e 11,1 mV (ca 19,2 %).

L'aumento della temperatura determina una diminuzione del potenziale delle AP e delle PAD 12 h, rispettivamente di ca 9,9 (ca 17,1 %) e 26,3 mV (ca 57,6 %). Le 12 ore di dialisi a 37°C determinano una diminuzione del potenziale zeta di ca 4,2 mV (6,2 %).

Prendendo in considerazione le deviazioni standard a 25°C, si può vedere che sono contenute, e sono comprese tra ca lo 0,3 e il 2,1 % del valore medio delle formulazioni.

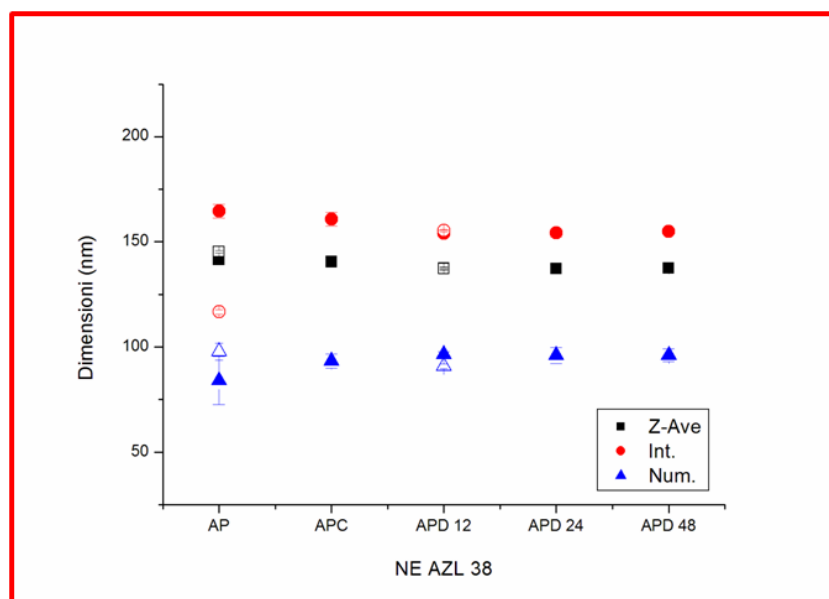


Figura 4.62. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NE AZL 38. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

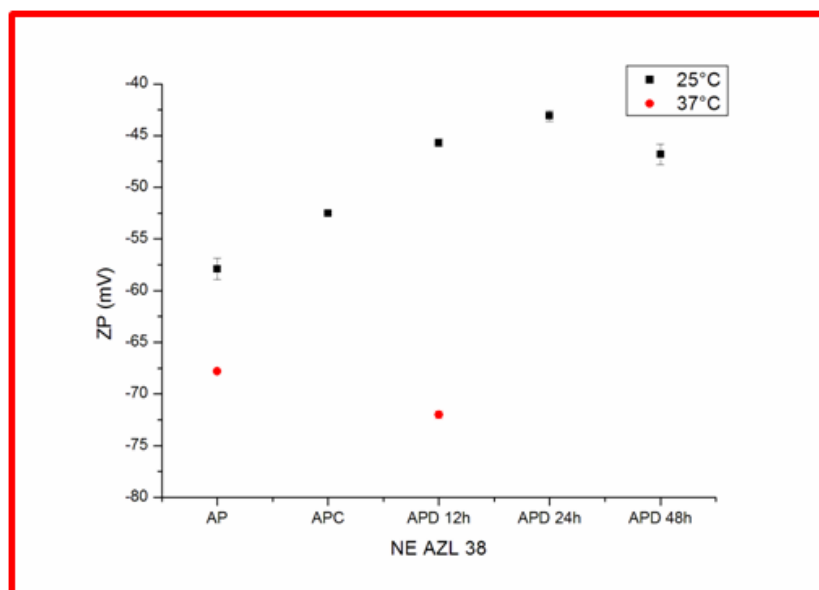


Figura 4.63. Potenziale zeta delle NE AZL 38.

Per quanto riguarda le deviazioni standard a 37°C, si può osservare che sono moderate, e corrispondono ca allo 0,04 e allo 0,5 % del valore del potenziale delle AP e delle APD 12 h.

Pertanto, a differenza di quanto capita per le NC AZL 38, sembrerebbe quindi che la carica sia influenzata dai vari trattamenti, e come mostrato per le NC anche dalla temperatura.

Commenti finali

- Le NC AZL 38 AP risultano essere più grandi delle NE AZL 38 AP per la presenza della capsula di chitosano. A 25°C le NC differiscono dalle NE Ibu AP, APC, APD 12, 24 e 48 h, rispettivamente per ca 45,9, 146,7, 87,8, 111,9 e 147,2 nm. La differenza di dimensioni a 37°C, tra le NC e le NE Ibu AP e APD 12 h è pari a ca 27,3 e 82,6 nm.
- L'AZL 38 è una molecola citotossica lipofila, e si scioglie bene in etanolo. Questa molecole presenta diversi gruppi metilici, ed è probabile che grazie a questi gruppi, sia intrappolata all'interno delle code lipidiche, sia nelle NC che nelle NE. Se questa ipotesi è corretta l'AZL 38 dovrebbe essere completamente incapsulato.
- NC e NE sembrano comportarsi in maniera speculare rispetto ai trattamenti subiti.
 - Le *dimensioni* aumentano per le NC, rimangono abbastanza stabili per le NE
 - La *carica* rimane stabile per le NC (ad eccezione delle APD 12 h), e aumenta per le NE.
 - Il *PDI* aumenta per centrifugazione e per le 12 ore di dialisi delle NC, mentre diminuisce per le 24 e 48 ore di dialisi, e per la temperatura (solo per le AP). Il PDI delle APD 12 h aumenta con l'aumento della temperatura. Nelle NE il PDI rimane abbastanza stabile. Il PDI delle NE è generalmente inferiore a quello delle NC.

È stato preparato un altro lotto di NC e NE AZL 38, con una concentrazione maggiore rispetto a quelle precedentemente analizzate, e come queste sono state analizzate le loro dimensioni e il potenziale zeta, al variare della temperatura.

L'andamento delle dimensioni delle **NC AZL 38** (113,6 µg/mL) a 25° e a 37°C, è mostrato nella Figura 4.64, e nella Tabella 4.47 sono riportati gli stessi dati per un'analisi più rapida.

Le dimensioni delle NC AZL 38 (ca 160,9 nm) aumentano di ca 16,6 nm (ca 10,3 %) con l'incremento della temperatura. Le deviazioni standard delle dimensioni a 25° e a 37°C sono contenute, e corrispondono a ca l'1,1 e l'1,3 % del valore medio.

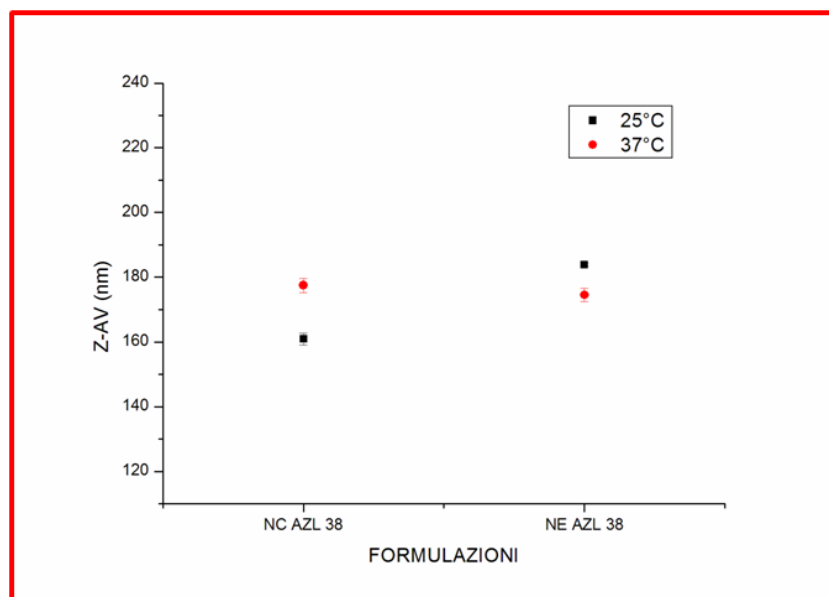


Figura 4.64. Dimensioni delle NC e delle NE AZL 38.

Nella Figura 4.65 (A-D) sono mostrati i grafici generati dal DLS relativamente alle dimensioni espresse in intensità e in numero delle NC AZL 38, a 25° e a 37°C.

Tabella 4.47. Dimensioni delle NC e delle NE AZL 38.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AV	SD	Z-AV	SD
NC AZL 38	160,9	1,8	177,5	2,2
NE AZL 38	183,9	0,5	174,5	2,0

L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili e presentano un

piccolo “shift” (e.g., Fig 4.65 A vs Fig. 4.65 B). Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità. Infine, in nessun caso (Fig. 4.65) particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi.

I dati presenti nella Fig. 4.65 relativamente alle NC AZL 38 sono riportati nella Tabella 4.48 e nella Figura 4.66, dove risulta più semplice commentarli.

Tabella 4.48. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NC e delle NE AZL 38.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
NC AZL 38	185,9 ± 6,0	106,6 ± 11,4	0,13 ± 0,02	202,8 ± 2,8	124,5 ± 13,3	0,11 ± 0,02
NE AZL38	213,4 ± 5,7	122,0 ± 3,4	0,15 ± 0,02	197,2 ± 4,1	127,0 ± 2,8	0,11 ± 0,01

Come si vede bene dalla Figura 4.66, l'andamento delle dimensioni, e di come queste si modificano rispetto all'aumento della temperatura è molto simile. Si nota che le dimensioni ottenute in modalità Z-Ave si trovano comprese tra le altre due, sono però più vicine a quelle ottenute in modalità “intensità”. L'aumento delle dimensioni in seguito all'incremento della temperatura è di pochi nm, che risulta quindi essere indifferente quando si guardano le cose da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni).

In Tabella 4.48 sono mostrati anche i valori di PDI, e si vede che per le NC AZL 38 diminuiscono con l'aumento della temperatura, di ca 0,02. In altre parole, la temperatura aumenta i PDI.

Nella Figura 4.67 è mostrata la variazione del potenziale zeta delle NC AZL 38 in seguito all'aumento della temperatura. Questi dati sono riportati anche nella Tabella 4.48 per un'analisi e una discussione più rapida.

Il ZP delle NC AZL 38 (ca 15,5 mV) diminuisce con l'aumento della temperatura di ca 3,5 mV (ca 22,6 %). Le deviazioni standard non sono molto contenute, e corrispondono ca al 7,16 e all'8,8 % del valore del potenziale a 25° e a 37°C.

Sembrirebbe quindi che la carica sia influenzata dalla temperatura.

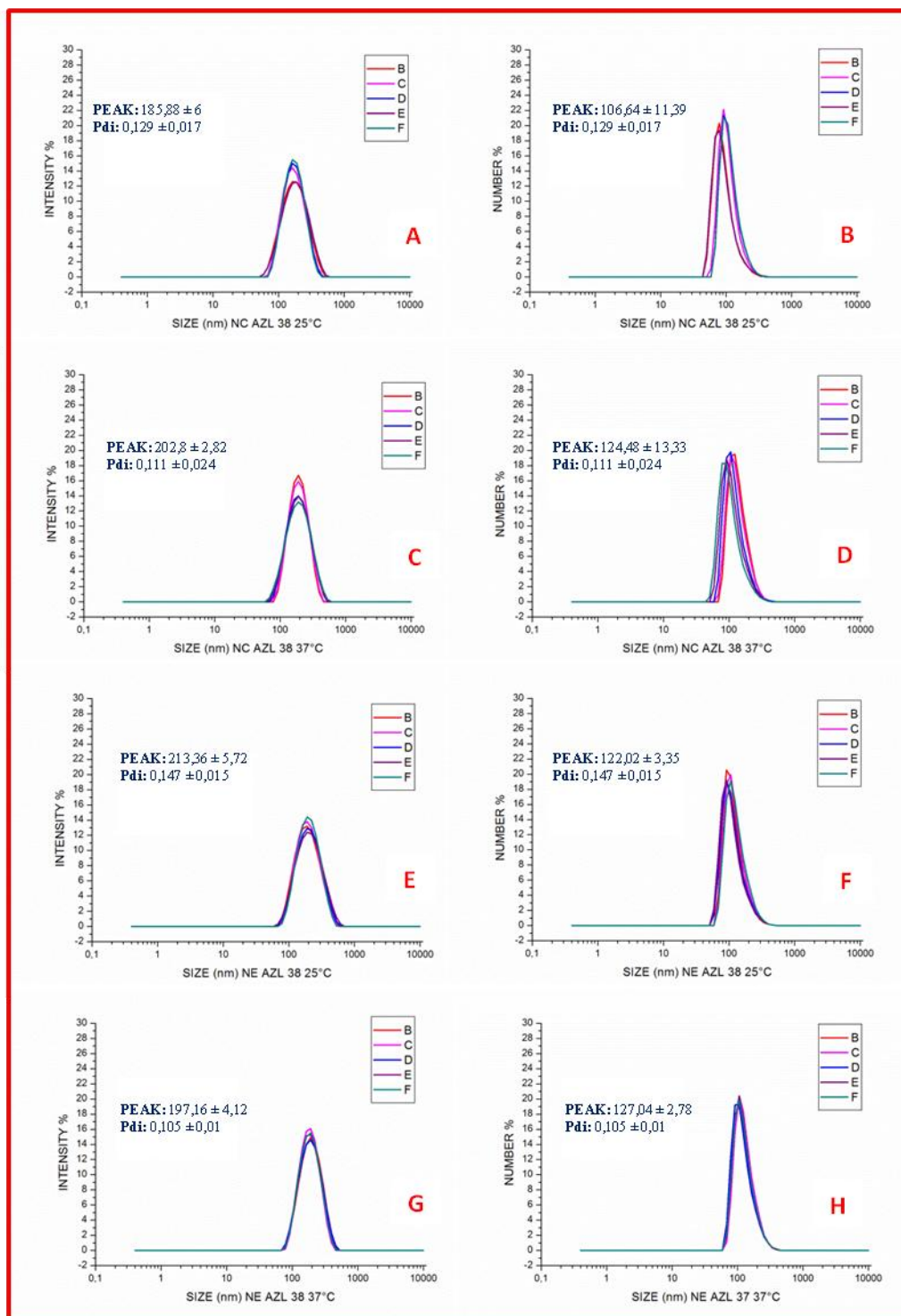


Figura 4.65. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NC e delle NE AZL 38. A-B) NC AZL 38 a 25°C; C-D) NC AZL 38 a 37°C; E-F) NE AZL 38 a 25°C; G-H) NE AZL 38 a 37°C.

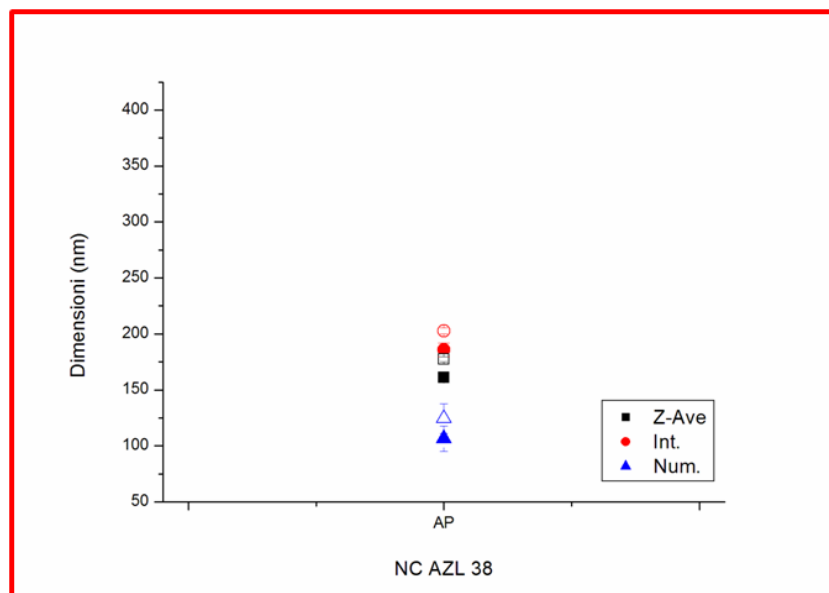


Figura 4.66. Confronto fra le dimensioni delle NC AZL 38. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

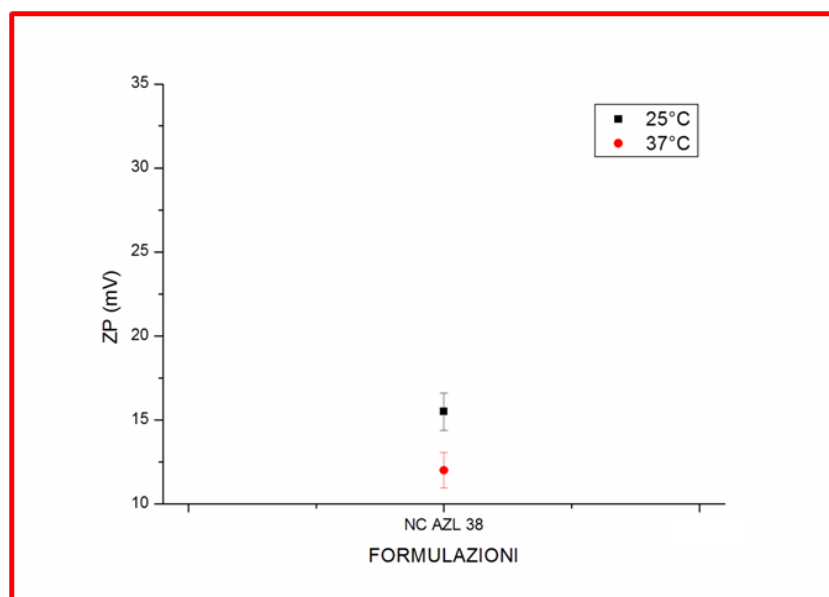


Figura 4.67. Potenziale zeta delle NC AZL 38.

Tabella 4.49. Potenziale zeta delle NC e delle NE AZL 38.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
NC AZL 38	15,5	1,1	12,0	1,1
NE AZL 38	-42,4	1,6	-41,2	1,0

Nel precedente grafico in Figura 4.64 è messa in evidenza l'andamento delle dimensioni delle **NE AZL 38** ($125 \mu\text{g/mL}$) in seguito all'aumento della temperatura. Questi dati sono riportati anche nella Tabella 4.47.

Le dimensioni delle **NE AZL 38** (ca $183,9 \text{ nm}$) diminuiscono di ca $9,4 \text{ nm}$ (ca $5,1 \%$) con l'aumento della temperatura. Le deviazioni standard delle dimensioni delle **NE AZL 38** sono contenute, e rappresentano ca lo $0,3$ e l' $1,1 \%$, rispettivamente a 25° e a 37°C .

Osservando la Figura 4.64, è evidente che le **NE AZL 38 APa** 25°C hanno dimensioni maggiori delle **NC AZL 38 AP**, di ca 23 nm (ca $14,3 \%$). Questo dato è strano, dal momento che grazie alla presenza del chitosano le **NC** dovrebbero avere dimensioni maggiori delle **NE**.

Nella Figura 4.65 (E-H) sono mostrati i grafici generati dal DLS relativamente alle dimensioni espresse in intensità e in numero delle **NE AZL 38**, a 25° e a 37°C .

L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili. Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità. Infine, in nessun caso (Fig. 4.65) particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi.

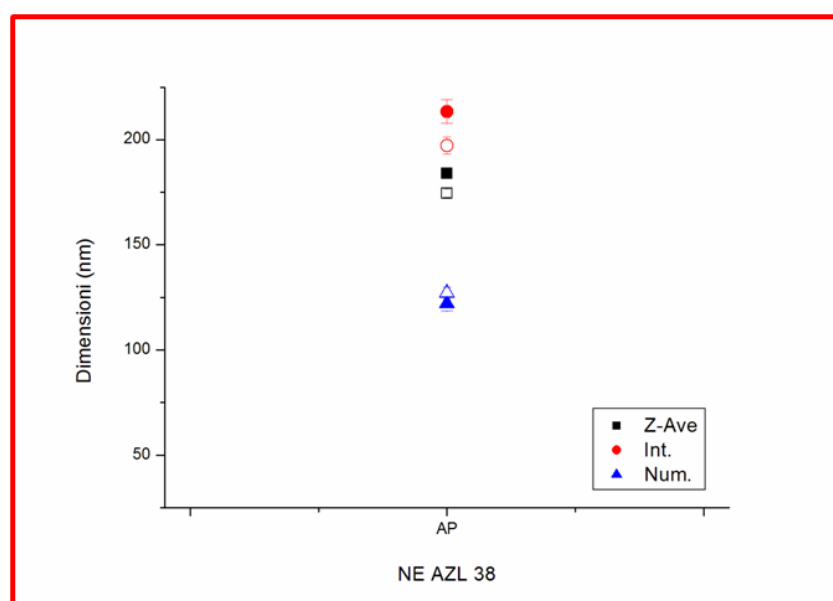


Figura 4.68. Confronto fra le dimensioni delle **NE AZL 38**. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C , mentre quelli vuoti a 37°C .

I dati presentati nella Figura 4.65 relativamente alle NE AZL 38 sono riportati nella Tabella 4.48 e nella Figura 4.68 dove risulta più semplice commentarli.

Come si può vedere dalla Figura 4.68, l'andamento delle dimensioni, e di come queste si modificano rispetto all'aumento della temperatura, è simile. Si nota che le dimensioni ottenute in modalità Z-Ave si trovano comprese tra le altre due, ma sono molto più vicine alle dimensioni ottenute in modalità "intensità". L'aumento della temperatura determina una diminuzione delle dimensioni ottenute in intensità e allo Z-Ave, mentre determina un aumento di quelle ottenute in numero. Questi aumenti e questa diminuzione riguardano pochi nm, quindi risulta essere indifferente quando si guardano le cose da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni).

Nella precedente Tabella 4.48 sono mostrati i valori di PDI. Relativamente a questi valori, si può vedere che diminuiscono con l'aumento della temperatura di ca 0,04 per le NE AZL 38.

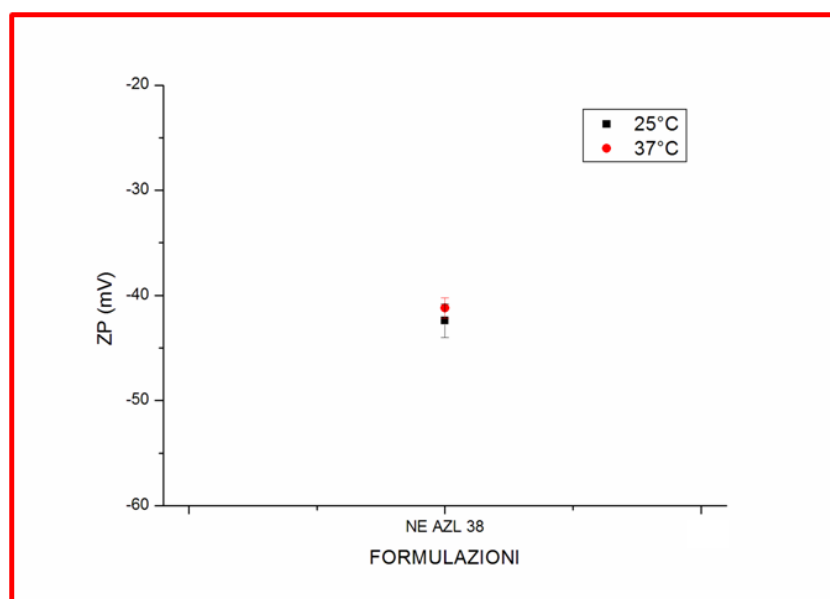


Figura 4.69. Potenziale zeta delle NE AZL 38.

Quindi la temperatura determina una diminuzione dei PDI, come mostrato anche per le NC AZL 38.

Per quanto riguarda il potenziale zeta, nella Figura 4.69 sono mostrati i valori di ZP delle NE AZL 38 in seguito ai vari trattamenti, a 25° (quadrati neri) e a 37°C (cerchi rossi), e questi dati sono riportati anche nella Tabella 4.49.

Il potenziale zeta delle NE AZL 38 (ca -42,4 mV) aumenta con l'aumento della temperatura di ca 1,2 mV (ca 2,8 %). Le deviazioni standard sono contenute e rappresentano ca il 3,8 e il 2,3 % del valore medio del potenziale delle NE AZL 38 a 25° e a 37°C.

Commenti finali

- Le NE AZL 38 AP a 25°C risultano essere più grandi delle NC AZL 38 AP, che però presentano la capsula di chitosano. A 25°C le NC differiscono dalle NE AZL 38 per ca 23 nm. La differenza di dimensioni a 37°C, tra le NC e le NE AZL 38 è pari a 3 nm.
- NC e NE, relativamente alle dimensioni e alla carica, sembrano comportarsi in maniera speculare rispetto all'aumento della temperatura.
 - Le *dimensioni* con l'incremento della temperatura aumentano per le NC, e diminuiscono per le NE.
 - La *carica* diminuisce per le NC, aumenta per le NE.
 - I *PDI* delle NC e delle NE diminuiscono con l'aumento della temperatura.

4.2.7. NC e NE AZL 6

Nella Figura 4.70 è mostrato l'andamento delle dimensioni delle varie formulazioni delle **NC AZL 6** (10,0 µg/mL) a 25° (quadrati neri) e a 37°C (cerchi rossi). Nella Tabella 4.50 sono riportati gli stessi dati, per un'analisi e una comprensione più rapida.

Come si può vedere dalla Figura 4.70, le dimensioni delle NC AZL 6 AP (ca 184,9 nm) a 25°C aumentano di ca 70,9 nm (ca 38,4 %) in seguito alla centrifugazione. Un aumento delle dimensioni si può vedere anche in seguito alle dialisi a 12, 24 e 48 ore, rispettivamente di ca 31,3 (ca 16,9 %), 99,5 (ca 53,8 %) e 74,6 nm (ca 40,4 %). È interessante notare che le dimensioni delle APD 24 h sono maggiori di quelle delle APC, di ca 28,6 nm (ca 11,2 %).

L'aumento della temperatura determina una diminuzione delle dimensioni delle AP e delle APD 12 h, rispettivamente di ca 17,5 (ca 9,5 %) e 16,8 nm (ca 7,8 %). A 37°C le 12 ore di dialisi determinano un aumento delle dimensioni di ca 32 nm (ca 19,1 %).

Per quanto riguarda le deviazioni standard, si può vedere che sono contenute, e a 25°C sono comprese tra ca lo 0,2 e l'1,3 % del valore medio delle varie formulazioni.

Anche a 37°C le deviazioni sono contenute, e rappresentano ca lo 0,3 e lo 0,2 % del valore delle dimensioni delle AP e APD 12 h.

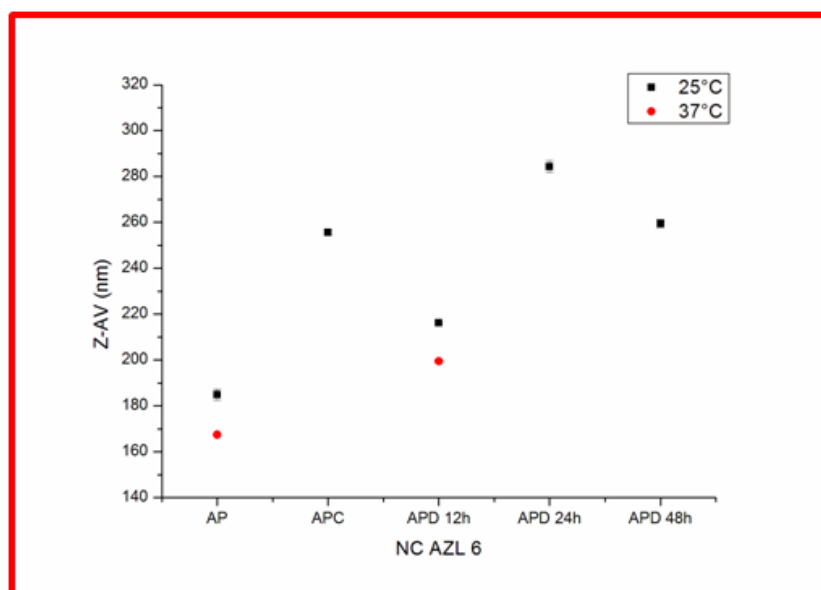


Figura 4.70. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NC AZL 6.

Tabella 4.50. Dimensioni delle NC AZL 6.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AV	SD	Z-AV	SD
AP	184,9	2,4	167,4	0,4
APC	255,8	0,9		
APD 12 h	216,2	0,5	199,4	0,5
APD 24 h	284,4	2,5		
APD 48 h	259,5	1,8		

Nella Figure 4.71 e 4.72 sono mostrati i grafici generati dal DLS, relativamente alle dimensioni espresse in intensità e in numero delle varie formulazioni delle NC AZL 6, a 25° e a 37°C.

L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili e presentano un piccolo "shift" (e.g., Fig 4.72 C vs Fig. 4.72 D). Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità. Infine, in nessun caso

(Fig. 4.71 e 4.72) particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi. Come già visto per altre formulazioni, le NC AZL 6 APC mostrano due picchi, uno principale e uno più piccolo alla destra del precedente.

Tutti i dati presentati nelle Figure 4.71 e 4.72 sono riportati nella Tabella 4.52 e nella Figura 4.73 dove risulta più semplice commentarli.

Come si vede bene dalla Figura 4.73, l'andamento delle dimensioni, e di come queste si modificano rispetto ai trattamenti di purificazione è molto simile. Si nota che le dimensioni ottenute in modalità Z-Ave si trovano a metà tra le altre due. Si parla comunque di una differenza massima di circa 175 nm (e.g. APC int. vs APC num; Fig 4.73) che non risulta essere indifferente quando si guardano le cose da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni).

Tabella 4.52. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NC AZL 6.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
AP	225,5 ± 4,7	126,8 ± 6,2	0,18 ± 0,01	192,3 ± 2,1	125,1 ± 3,3	0,13 ± 0,01
APC	301,2 ± 15,4	156,5 ± 14,6	0,30 ± 0,03			
APD 12 h	264,9 ± 3,5	163,5 ± 8,5	0,19 ± 0,01	237,3 ± 6,4	150,2 ± 13,2	0,16 ± 0,01
APD 24 h	320,8 ± 3,7	255,0 ± 4,0	0,12 ± 0,01			
APD 48 h	294,4 ± 1,0	228,3 ± 0,6	0,13 ± 0,01			

In Tabella 4.52 sono mostrati i valori di PDI. Relativamente a questi dati rilevati a 25°C, si può notare un aumento di ca 0,12 e 0,01 rispettivamente dopo la centrifugazione e la dialisi a 12 ore. In seguito alle 24 e alle 48 ore di dialisi, si può osservare una diminuzione dei PDI, rispettivamente di ca 0,06 e 0,05. Anche a 37°C i PDI in seguito alle 12 ore di dialisi mostrano un aumento di ca 0,03. Confrontando i PDI a 25° e a 37°C delle AP e delle APD 12 h, si osserva una diminuzione di ca 0,05 e di 0,03.

In altre parole, la centrifugazione e le 12 ore di dialisi aumentano la polidispersità, mentre le dialisi a 24 e 48 ore e la temperatura la diminuiscono.

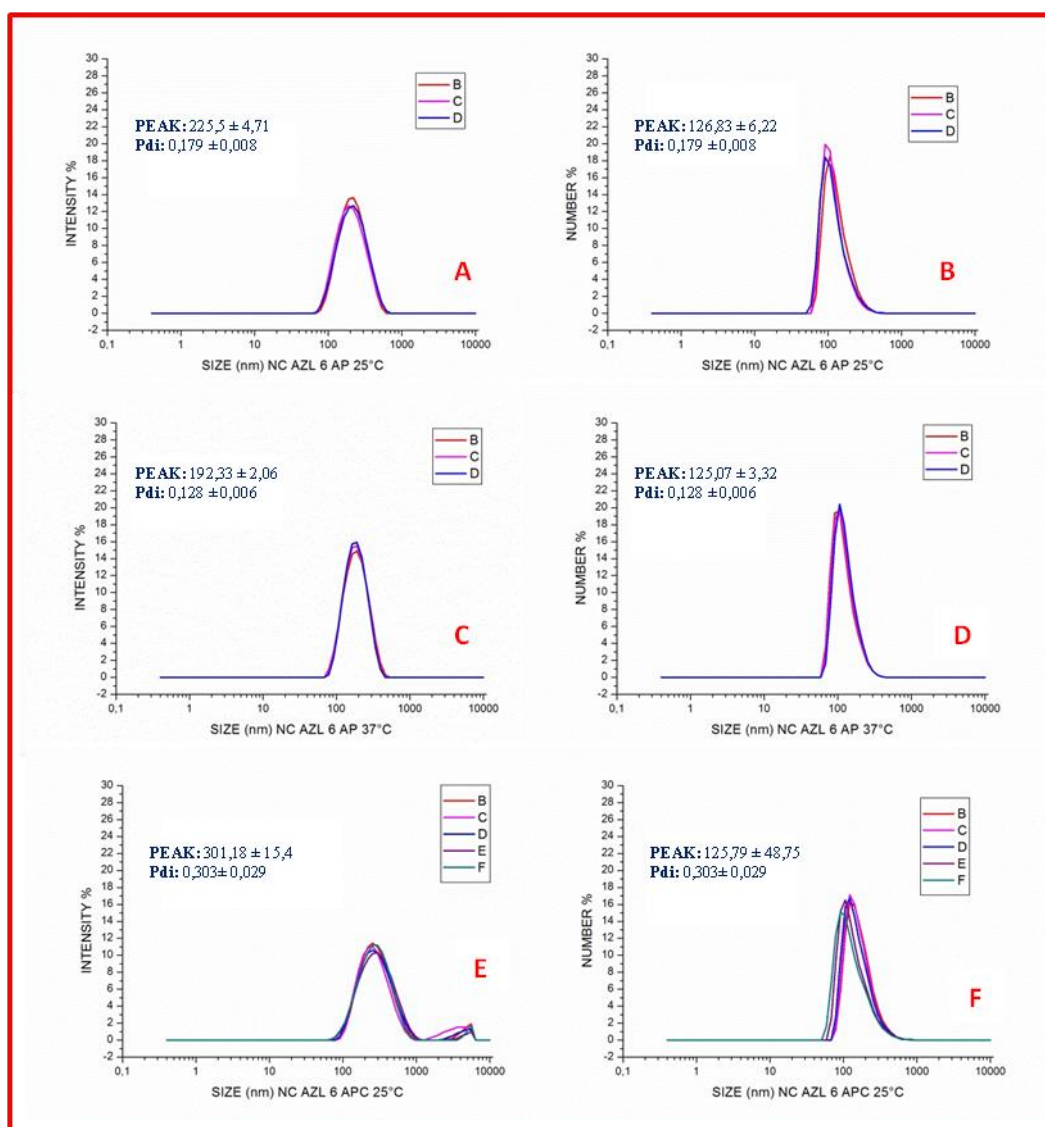


Figura 4.71. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NC AZL 6. A-B) AP a 25°C; C-D) AP a 37°C; E-F) APC a 25°C.

Tabella 4.53. Potenziale zeta delle NC AZL 6.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
AP	46,9	0,8	39,7	0,7
APC	46,0	1,0		
APD 12 h	50,9	0,9	35,9	0,1
APD 24 h	45,5	0,6		
APD 48 h	45,7	1,6		

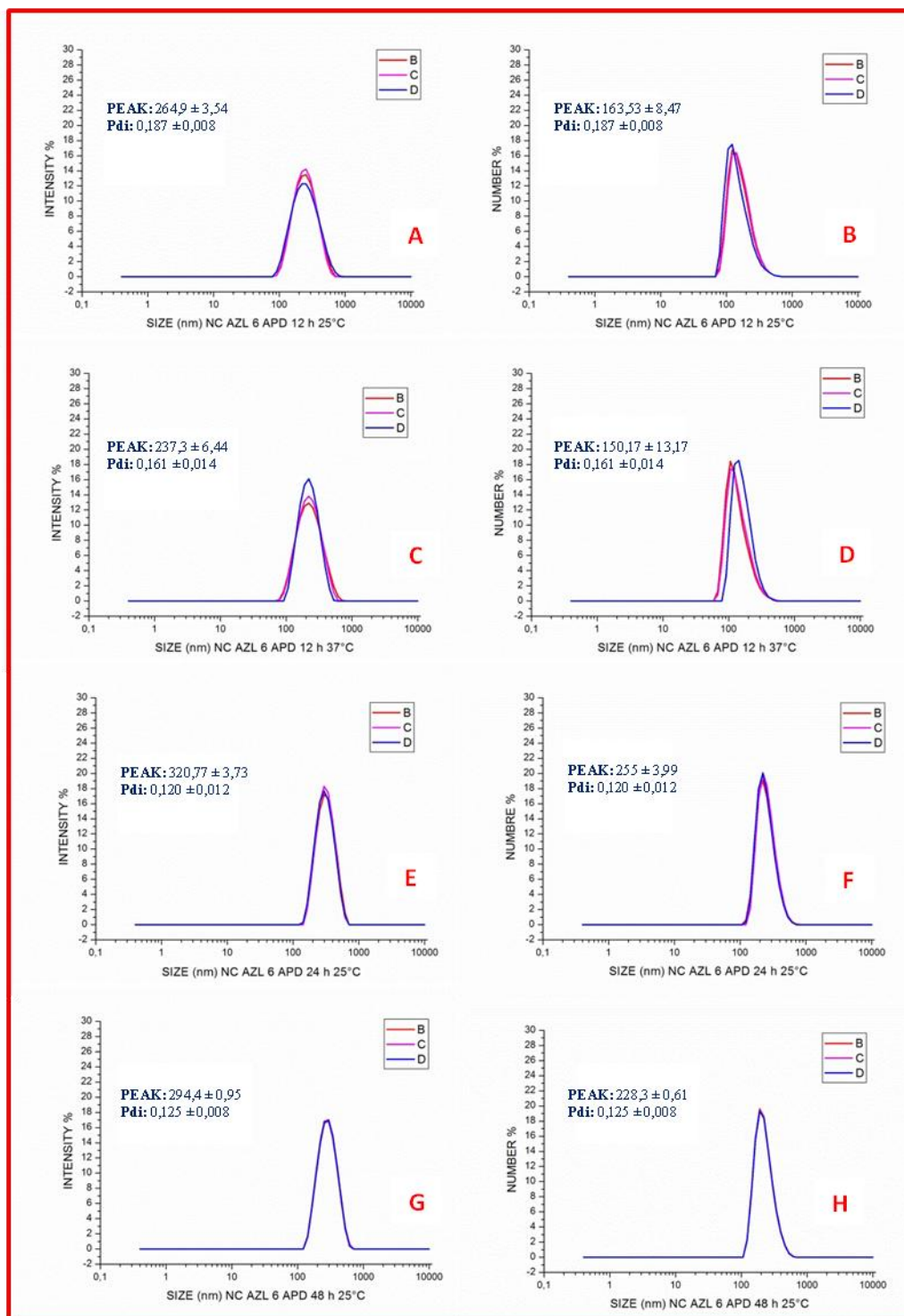


Figura 4.72. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NC AZL 6. A-B) APD 12 h a 25°C; C-D) APD 12 h a 37°C; E-F) APD 24 h a 25°C; G-H) APD 48 h a 25°C.

Nella Figura 4.74 è mostrato l'andamento del potenziale zeta delle varie formulazioni delle NC AZL 6, a 25° (quadrati neri) e a 37°C (cerchi rossi). Nella Tabella 4.53 sono riportati gli stessi dati per un'analisi e una comprensione più rapida.

Il potenziale zeta delle NC AZL 6 AP (ca 46,9 mV) a 25°C, diminuisce di ca 2,1 mV (ca 4,5 %) in seguito alla centrifugazione, e di ca 1,4 (ca 2,9 %) e 1,2 mV (ca 2,6 %) dopo le dialisi a 24 e 48 ore. Al contrario, in seguito alle 12 ore di dialisi si può vedere un aumento del potenziale di ca 4 mV (ca 8,5 %). L'aumento della temperatura a 37°C determina una diminuzione del potenziale delle AP e delle APD 12 h, rispettivamente di ca 7,2 e 15 mV (ca 15,4 e 29,5 %). A 37°C le 12 ore di dialisi determinano una diminuzione del potenziale zeta di ca 3,8 mV (ca 9,6 %).

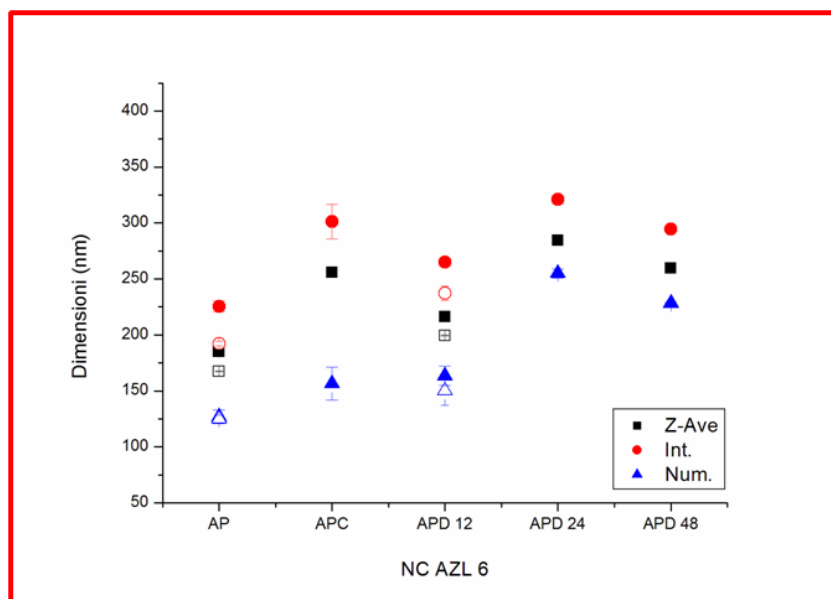


Figura 4.73. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NC AZL 6. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

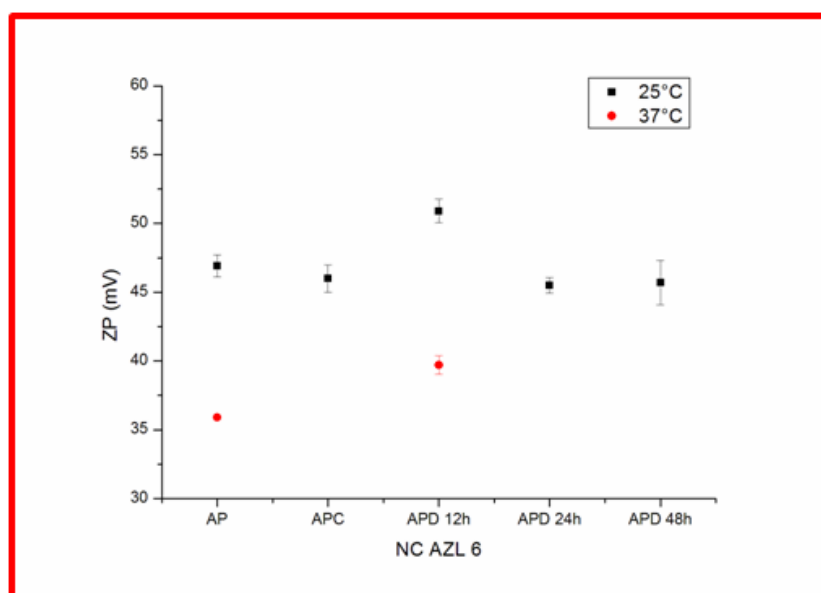


Figura 4.74. Potenziale zeta delle NC AZL 6 a 25 che a 37°C.

Le deviazioni standard sono contenute, e sono comprese tra ca l'1,2 e il 2,2 % del valore del potenziale delle varie formulazioni. Le deviazioni standard a 37°C corrispondono ca all'1,7 e allo 0,3 % del valore del potenziale delle AP e delle APD 12 h.

Sembrerebbe quindi che a 25°C la carica non sia influenzata più di tanto dal trattamento subito. Questa differenza si noterebbe solo in funzione della temperatura.

Nella Figura 4.75 è mostrato l'andamento delle dimensioni delle varie formulazioni delle NE AZL 6 (12,0 µg/mL), a 25° (quadrati neri) e a37°C (cerchi rossi). Nella Tabella 4.54 sono riportati gli stessi dati, per un'analisi e una comprensione più rapida.

Tabella 4.54. Dimensioni delle NE AZL 6.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AV	SD	Z-AV	SD
AP	153,4	1,9	157,7	0,1
APC	168,8	2,0		
APD 12 h	148,6	1,1	148,5	1,0
APD 24 h	148,3	0,7		
APD 48 h	147,0	0,5		

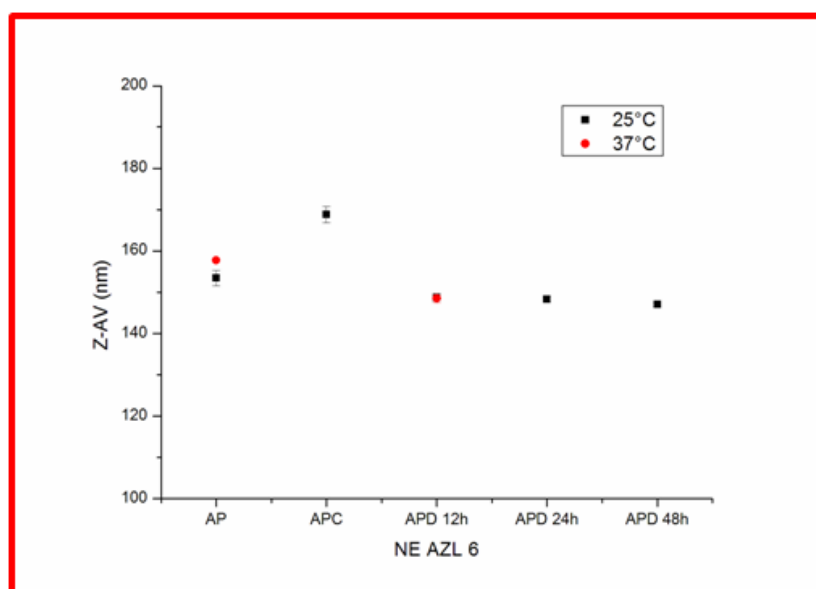


Figura 4.75. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni delle NE AZL 6.

Le dimensioni delle NE AZL 6 AP a 25°C (ca 153,4 nm), aumentano di ca 15,4 nm (ca 10,0 %) in seguito alla centrifugazione. Le dialisi a 12, 24 e 48 ore determinano invece una diminuzione delle dimensioni, rispettivamente di ca 4,8 (ca 3,1 %), 5,1 (ca 3,3 %) e 6,4 nm (ca 4,2 %).

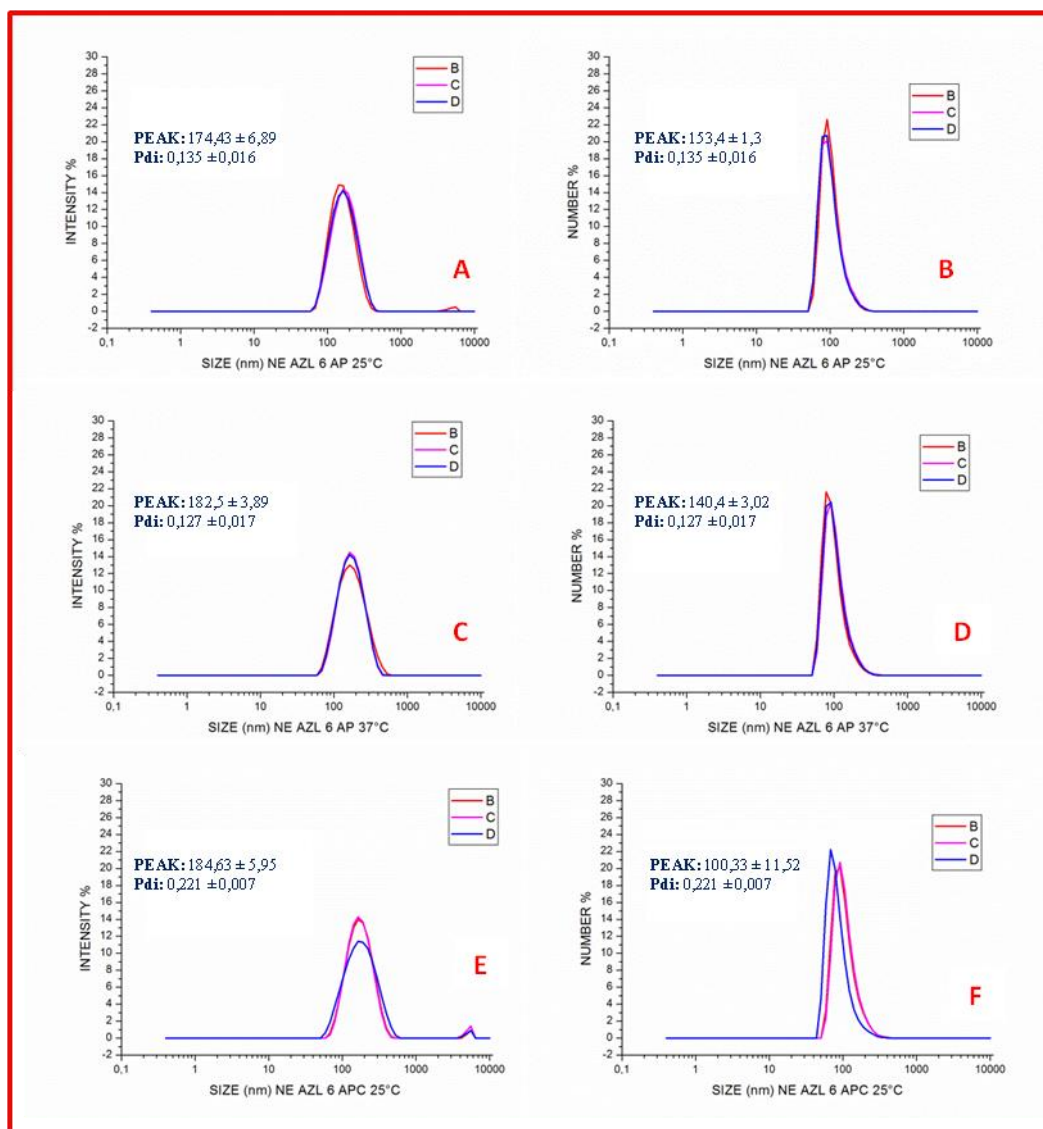


Figura 4.76. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NE AZL 6. A-B) AP a 25°C; C-D) AP a 37°C; E-F) APC a 25°C.

L'aumento della temperatura determina un aumento delle dimensioni di ca 4,3 nm (ca 2,8 %) delle AP, e una diminuzione di ca 0,1 nm (ca 0,1 %) delle APD 12 h. A 37°C le dialisi a 12 ore determinano una diminuzione delle dimensioni di ca 9,2 nm (ca 5,8 %).

Per quanto riguarda le deviazioni standard a 25°C, si può vedere che sono contenute, e sono comprese ca tra lo 0,4 e l'1,2 % del valore medio delle varie formulazioni. A

37°C le deviazioni standard sono contenute e rappresentano ca lo 0,1 e lo 0,7 % del valore medio delle formulazioni AP e APD 12 h.

È interessante notare che mentre le dimensioni delle NC AZL 6 tendono ad aumentare in seguito ai trattamenti di purificazione, le NE AZL 6 mostrano un andamento opposto e maggiormente contenuto, ad eccezione delle APC.

Nelle figure 4.76 e 4.77 sono mostrati i grafici generati dal DLS, relativamente alle dimensioni espresse in intensità ed in numero delle varie formulazioni delle NE AZL 6, a 25° e a 37°C.

L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili e presentano un minimo "shift" (e.g., Fig 4.76 E vs Fig. 4.76 F). Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità.

Infine, in nessun caso (Fig. 4.76 e 4.77) particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi.

Le dimensioni in intensità delle NE AZL 6 APC mostrano due picchi, uno principale e uno più piccolo alla sua destra (Fig. 4.76 E).

Tutti i dati presentati nelle Figure 4.76 e 4.77 sono riportati nella Tabella 4.55 e nella Figura 4.78 dove risulta più semplice commentarli.

Tabella 4.55. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NE AZL 6.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
AP	174,4 ± 6,9	153,4 ± 1,3	0,14 ± 0,02	182,5 ± 3,9	140,4 ± 3,0	0,13 ± 0,02
APC	184,6 ± 6,0	100,3 ± 11,5	0,22 ± 0,01			
APD 12 h	165,0 ± 1,0	107,8 ± 3,4	0,09 ± 0,004	154,9 ± 4,9	125,8 ± 9,2	0,05 ± 0,1
APD 24 h	166,9 ± 5,0	104,3 ± 7,8	0,11 ± 0,02			
APD 48 h	169,4 ± 0,7	94,6 ± 4,7	0,12 ± 0,004			

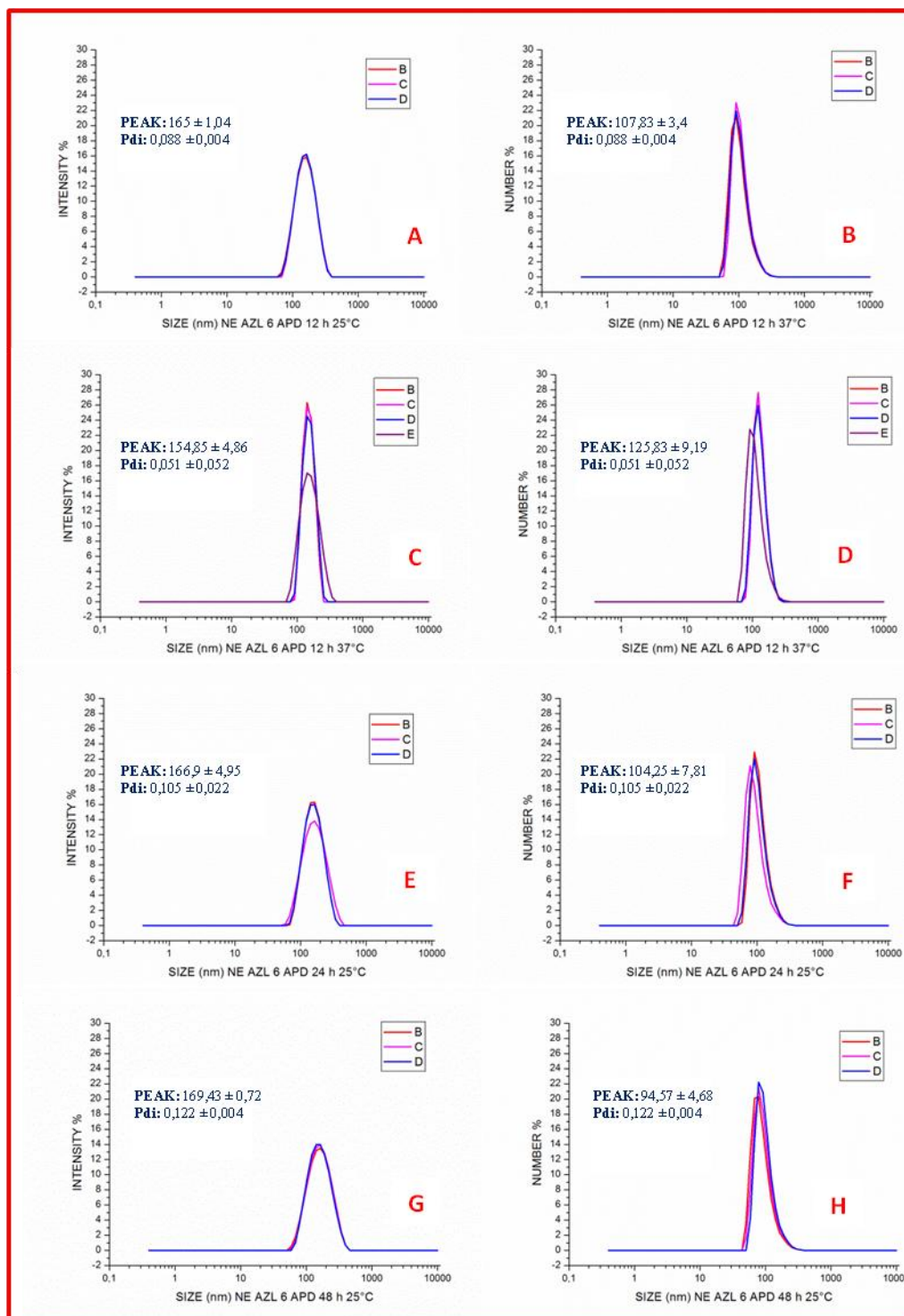


Figura 4.77. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NE AZL 6. A-B) APD 12 h a 25°C; C-D) APD 12 h a 37°C; E-F) APD 24 h a 25°C; G-H) APD 48 h a 25°C.

Come si vede bene dalla Figura 4.78, l'andamento delle dimensioni, e di come queste si modificano rispetto ai trattamenti di purificazione è molto simile. Si nota che le dimensioni ottenute in modalità Z-Ave si trovano comprese tra le altre due, ma più vicine alle dimensioni ottenute in modalità "intensità" ..

Si parla comunque di una differenza massima di circa 80 nm (e.g. APC int. vs APC num; Fig 4.78) che non risulta essere indifferente quando si guardano le cose da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni). Tuttavia, per ogni insieme di dati, le differenze relativamente ai trattamenti subiti sono minime, se viste dal punto di vista biologico.

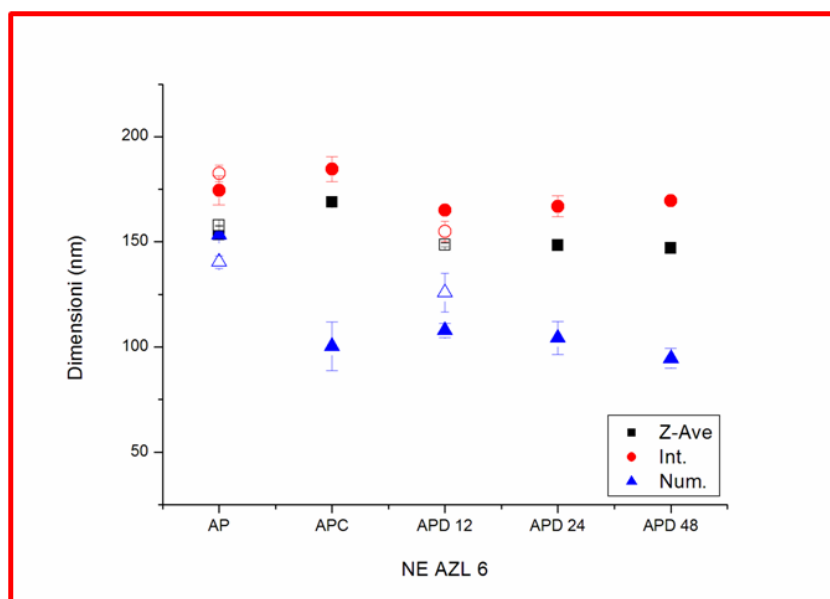


Figura 4.78. Confronto fra le dimensioni delle varie formulazioni NE AZL 6. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

In Tabella 4.55 sono mostrati anche i valori di PDI. Relativamente a questi valori misurati a 25°C, si può vedere un aumento di ca 0,08 in seguito alla centrifugazione, mentre si può notare una diminuzione di ca 0,05, 0,03 e di 0,02 dopo le dialisi a 12, 24 e 48 ore.

Anche a 37°C i PDI diminuiscono in seguito alle 12 ore di dialisi, di ca 0,08.

Mettendo a confronto i PDI a 25° e a 37°C, si può vedere una diminuzione di ca 0,01 e 0,04, rispettivamente delle AP e delle APD 12 h. In altre parole, la dialisi e la temperatura diminuiscono i PDI in maniera non significativa.

Relativamente al potenziale zeta, nella Figura 4.79 sono mostrati i valori del ZP delle NE AZL 6 in seguito ai vari trattamenti, a 25° (quadrati neri) e a 37°C (cerchi rossi), e questi stessi dati sono riportati anche nella Tabella 4.56.

A 25°C il potenziale zeta delle NE AZL 6 (-52,9 mV) aumenta di ca 5,9 (ca 11,2 %), 8,3 (ca 15,7 %), 4,7 (ca 8,9 %) e di 14,6 mV (ca 27,6 %), rispettivamente dopo la centrifugazione e le 12, 24 e 48 ore di dialisi. L'aumento della temperatura determina

una diminuzione di ca 2 mV (ca 3,78 %) del potenziale zeta delle AP, e un aumento di ca 2,3 mV (ca 5,2 %) del potenziale delle APD 12 h. A 37°C le 12 ore di dialisi determinano un aumento del potenziale di ca 12,6 mV (ca 22,95 %).

Le deviazioni standard a 25°C sono contenute, e sono comprese tra ca lo 0,6 e il 2,9 % del valore medio delle varie formulazioni. Le deviazioni standard a 37°C corrispondono ca all'1,3 e allo 0,1 % del potenziale delle AP e delle APD 12 h.

Tabella 4.56. Potenziale zeta delle NE AZL 6.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
AP	-52,9	0,6	-54,9	0,7
APC	-47,0	1,3		
APD 12 h	-44,6	0,9	-42,3	0,1
APD 24 h	-48,2	0,3		
APD 48 h	-38,3	1,1		

Pertanto, a differenza di quanto capita per le NC AZL 6, sembrerebbe quindi che a 25°C la carica delle NE AZL 6 sia influenzata dai trattamenti subiti, e meno dalla temperatura.

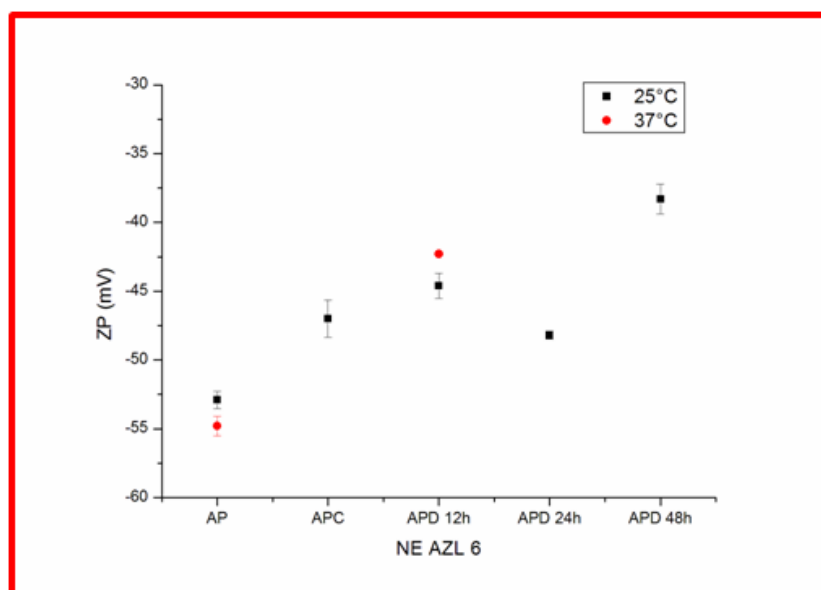


Figura 4.79. Potenziale zeta delle NE AZL 6 a 25° che a 37°C.

Commenti finali

- Le NC AZL 6 AP (12,6 µg/mL) risultano essere più grandi delle NE AZL 6 AP (11,2 µg/mL) per la presenza della capsula di chitosano. A 25°C le NC differiscono dalle NE AZL 6 AP, APC, APD 12, 24 e 48 h, rispettivamente per ca 31,5, 87, 67,6, 136,1 e 112,5 nm. La differenza di dimensioni a 37°C, tra le NC e le NE AZL 6 AP e APD 12 h è pari a ca 9,7 e 50,9 nm.
- L'AZL 6 è una molecola citotossica lipofila, e si scioglie bene in etanolo. Questa molecole presenta diversi gruppi metilici, ed è probabile che grazie a questi gruppi, sia intrappolata all'interno delle code lipidiche, sia nelle NC che nelle NE. Se questa ipotesi è corretta l'AZL 6 dovrebbe essere completamente incapsulato.
- NC e NE sembrano comportarsi in maniera speculare rispetto ai trattamenti subiti.
 - Le *dimensioni* aumentano per le NC, e rimangono abbastanza stabili per le NE.
 - La *carica* rimane stabile per le NC, e aumenta per le NE.
 - Il *PDI* aumenta per centrifugazione e per le 12 ore di dialisi delle NC, mentre diminuisce per le 24 e 48 ore di dialisi e temperatura. Nelle NE il PDI aumenta solo dopo la centrifugazione. Il PDI delle NE è generalmente inferiore a quello delle NC.

Oltre alle NC e NE AZL 6 sopra descritte, ne è stato preparato un altro lotto a concentrazione maggiore di AZL 6, che è stato analizzato per dimensione e potenziale zeta, in seguito all'aumento della temperatura.

L'andamento delle dimensioni delle **NC AZL 6** (113,6 µg/mL) a 25° e a 37°C, è mostrato nella Figura 4.80, e nella Tabella 4.57 sono riportati gli stessi dati.

Le dimensioni delle NC AZL 6 (ca 169,4 nm) aumentano con l'incremento della temperatura, di ca 16,5 nm (ca 9,7 %). Le deviazioni standard a 25° e a 37°C sono contenute, e corrispondono rispettivamente ca allo 0,6 e allo 0,9 % del valore medio delle dimensioni delle NC AZL 6.

Nella Figura 4.81 (A-D) sono mostrati i grafici generati dal DLS, relativamente alle dimensioni in intensità e in numero delle NC AZL 6, a 25° e a 37°C.

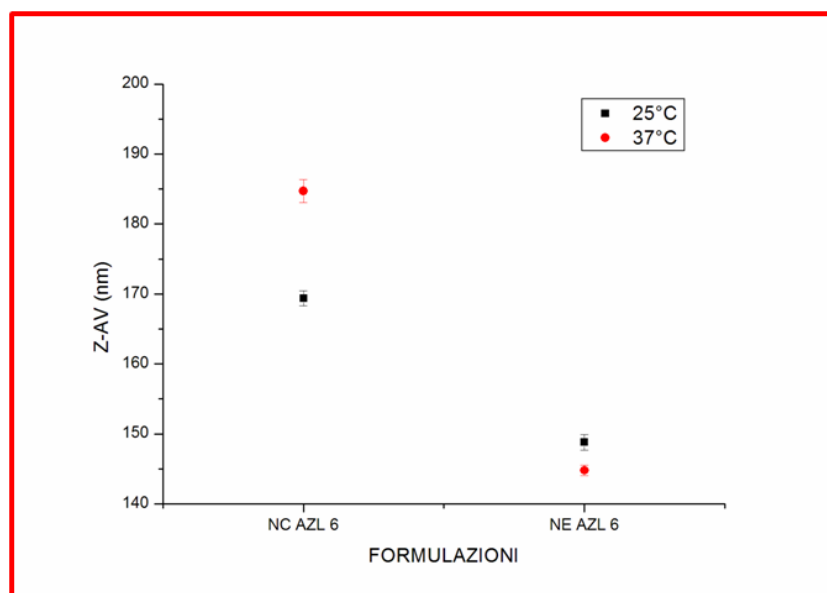


Figura 4.80. Dimensioni delle NC e delle NE AZL 6 a 25 che a 37°C.

Tabella 4.56. Dimensioni delle NC e delle NE AZL 6.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AV	SD	Z-AV	SD
NC AZL 6	169,4	1,1	184,7	1,7
NE AZL 6	148,8	1,1	144,8	0,7

Tabella 4.57. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NC e delle NE AZL 6.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
NC AZL 6	190,3 ± 2,6	124,9 ± 3,8	0,11 ± 0,02	205,4 ± 4,3	143,1 ± 7,5	0,09 ± 0,02
NE AZL 6	169,6 ± 4,5	98,5 ± 5,1	0,12 ± 0,01	166,0 ± 2,4	97,6 ± 2,7	0,12 ± 0,01

L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili. Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità. Infine, in nessun caso (Fig. 4.81) particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi.

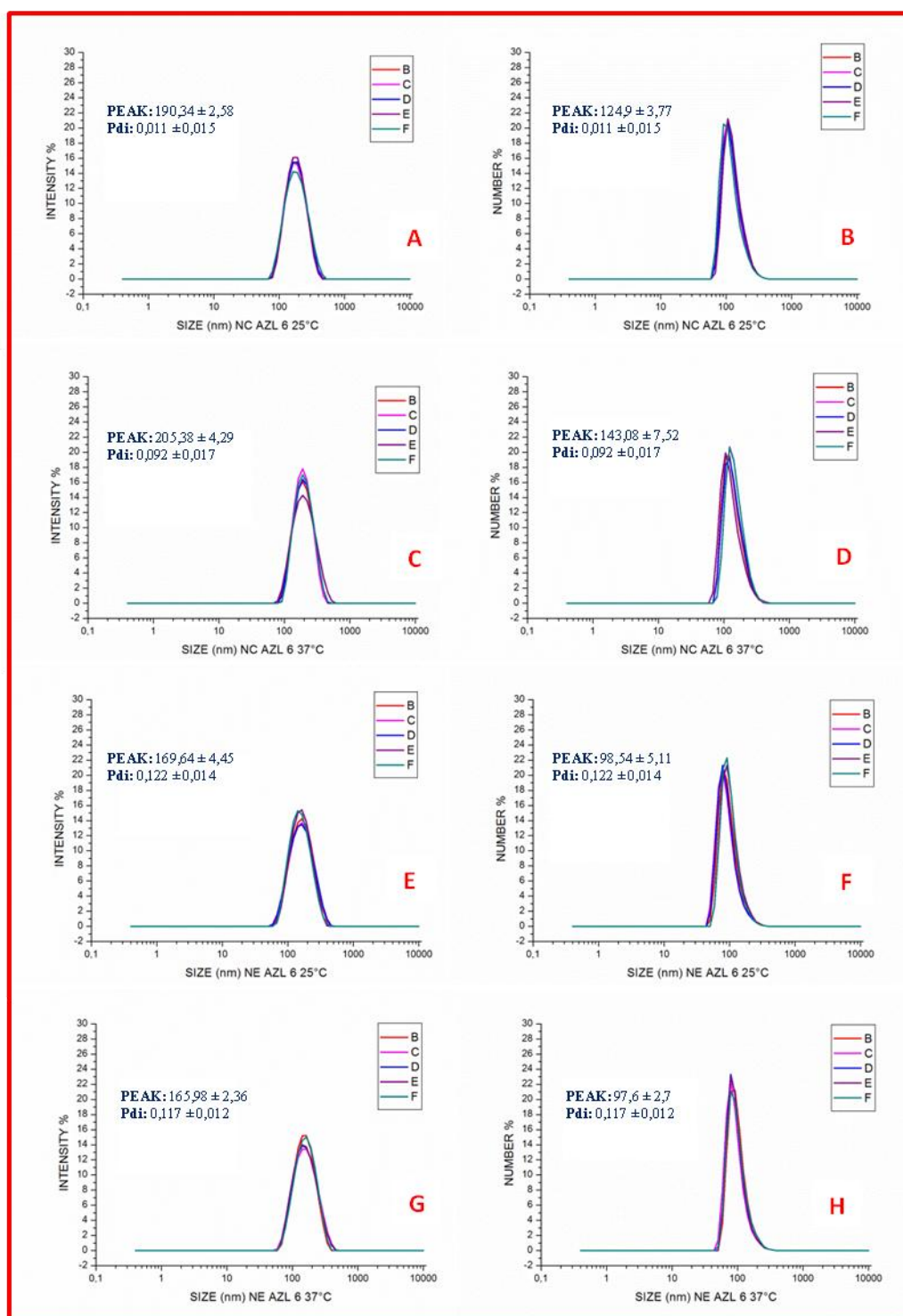


Figura 4.81. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NC e delle NE AZL 6. A-B) NC a 25°C; C-D) NC a 37°C; E-F) NE a 25°C; G-H) NE a 37°C.

I dati presenti nella Fig. 4.81 relativamente alle NC AZL 6 sono riportati nella Tabella 4.57 e nella Figura 4.82, dove risulta più semplice commentarli.

Come si vede bene dalla Figura 4.82, l'andamento delle dimensioni, e di come queste si modificano rispetto all'aumento della temperatura è molto simile. Si nota che le dimensioni ottenute in modalità Z-Ave si trovano comprese tra le altre due, ma sono più vicine a quelle ottenute in modalità "intensità". L'aumento delle dimensioni in seguito all'incremento della temperatura è di pochi nm, che risulta quindi essere indifferente quando si guardano le cose da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni).

In Tabella 4.57 sono mostrati anche i valori di PDI, e si può vedere una diminuzione di ca 0,02, con l'aumento della temperatura. In altre parole, la temperatura diminuisce i PDI.

Nella Figura 4.83 è mostrato l'andamento del potenziale zeta delle NC AZL 6 a 25° e a 37°C, e gli stessi dati sono riportati anche nella Tabella 4.58.

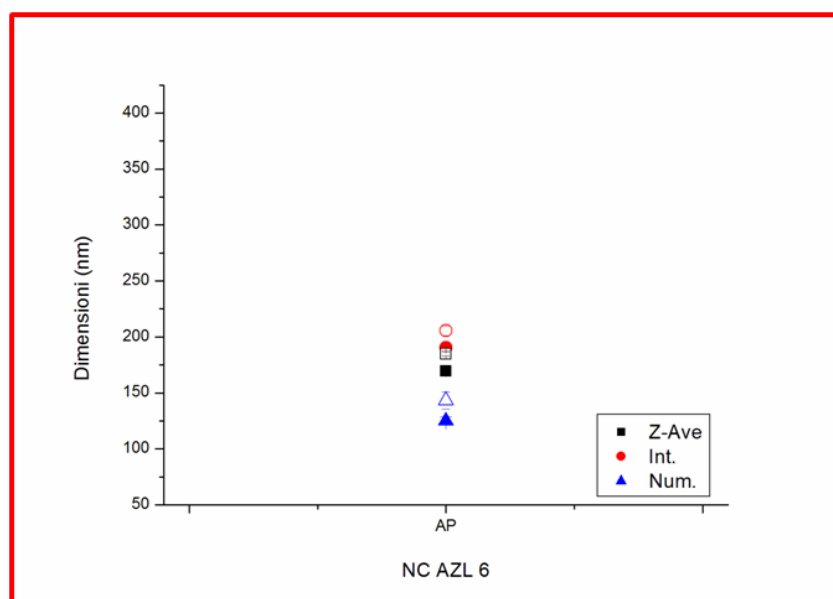


Figura 4.82. Confronto fra le dimensioni delle NC AZL 6. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

Tabella 4.58. Potenziale zeta delle NC e delle NE AZL 6.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
NC AZL 6	15,8	1,4	12,0	0,5
NE AZL 6	-48,4	2,8	-43,4	1,0

Il potenziale zeta delle NC AZL 6 (ca 15,8 mV) diminuisce con l'aumento della temperatura di ca 3,8 mV (ca 24,1 %). Le deviazioni standard non sono molto contenute, e rappresentano ca l'8,8 e il 4,4 % del valore del potenziale delle NC AZL 6 a 25° e a 37°C.

Nella Figura 4.80 è messo in evidenza l'andamento delle dimensioni delle **NE AZL 6** (120,2 µg/mL) a 25° e a 37°C, e nella Tabella 4.56 sono riportati gli stessi valori. Come si vede dal grafico, le dimensioni delle NE AZL 6 (ca 148,8 nm) in seguito all'aumento della temperatura diminuiscono di ca 4 nm (ca 2,7 %). Le deviazioni standard sono moderate, e corrispondono a ca lo 0,8 e lo 0,5 % del valore delle dimensioni a 25° e a 37°C.

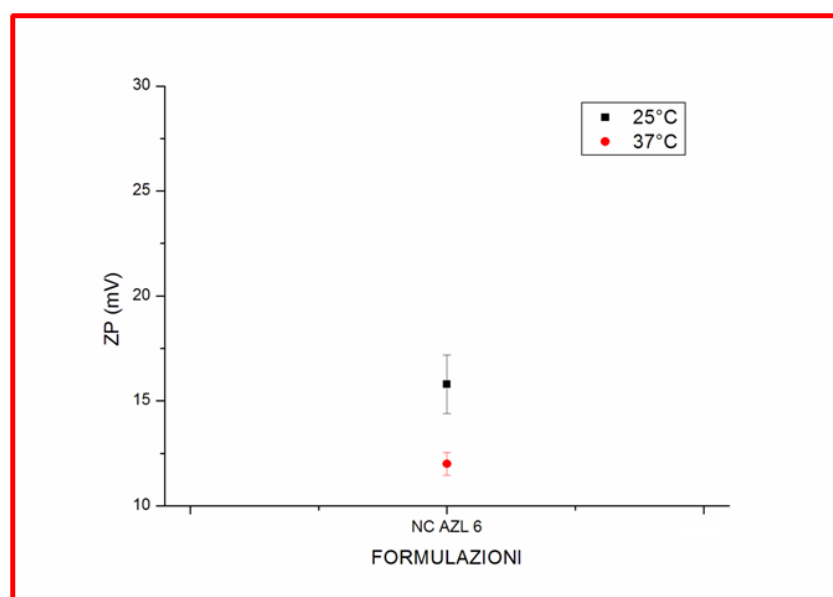


Figura 4.83. Potenziale zeta delle NC AZL 6 a 25 che a 37°C.

Nella precedente Figura 4.81 (E-H) sono mostrati i grafici generati dal DLS, relativamente alle dimensioni in intensità e in numero delle NE AZL 6, a 25° e a 37°C.

L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili. Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità. Infine, in nessun caso (Fig. 4.81) particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi.

I dati presentati nella Figura 4.81 relativamente alle NE AZL 38 sono riportati nella Tabella 4.57 e nella Figura 4.84 dove risulta più semplice commentarli.

Come si può vedere dalla Figura 4.84, l'andamento delle dimensioni, e di come queste si modificano rispetto all'aumento della temperatura, è simile. Si nota che le dimensioni ottenute in modalità Z-Ave si trovano comprese tra le altre due, ma sono molto più vicine alle dimensioni ottenute in modalità "intensità". L'aumento della temperatura determina una minima diminuzione delle dimensioni ottenute in intensità e allo Z-Ave, mentre sembrano invariate quelle ottenute in numero. Questi aumenti e questa diminuzione riguardano pochi nm, quindi risulta essere indifferente quando si guardano le cose da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni).

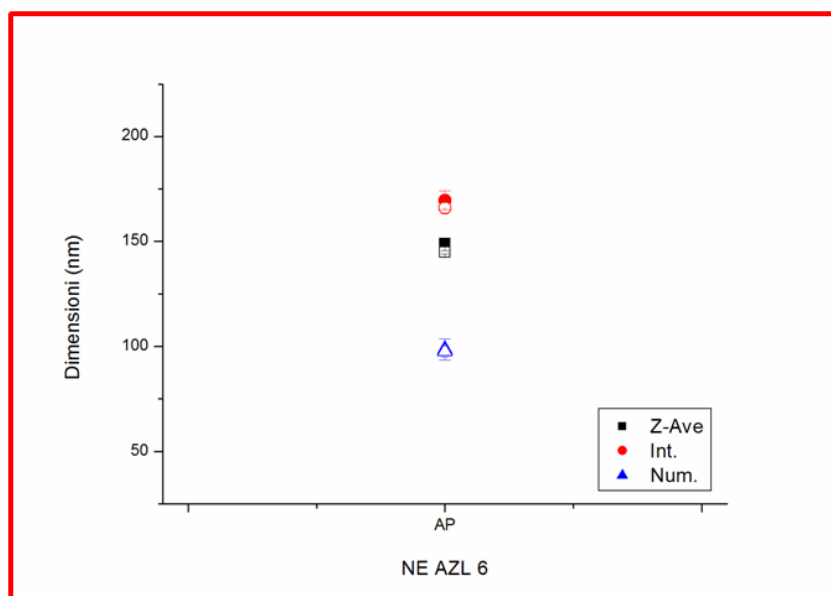


Figura 4.84. Confronto fra le dimensioni delle NE AZL 6. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

Nella Tabella 4.57 sono mostrati anche i valori di PDI. Relativamente a questi valori, si può vedere che in seguito all'incremento della temperatura rimangono stabili.

Nella Figura 4.85 è mostrato l'andamento del potenziale zeta delle NE AZL 6, a 25° e a 37°C, e nella Tabella 4.58 sono riportati gli stessi dati.

Il potenziale zeta delle NE AZL 6 (ca -48,4 mV) aumenta con l'incremento della temperatura, di ca 5 mV (ca 10,3 %). Le deviazioni standard sono contenute, e rappresentano ca il 5,7 e il 2,3 % del valore del potenziale delle NE AZL 6 a 25° e a 37°C.

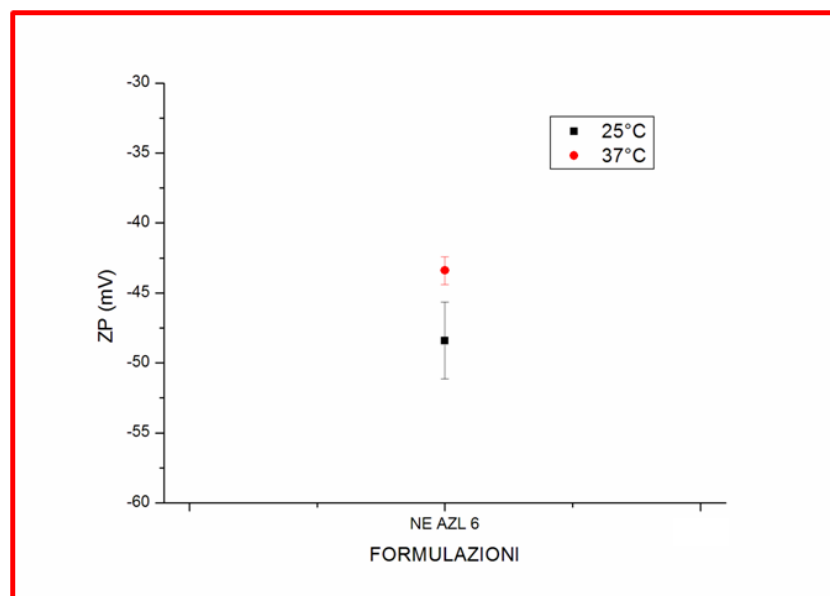


Figura 4.85. Potenziale zeta delle NE AZL 6 a 25° che a 37°C.

Commenti finali

- Le NC AZL 6 AP (113,6 µg/mL) a 25° e a 37°C risultano essere più grandi delle NE AZL 6 AP (120,2 µg/mL), per la presenza della capsula di chitosano. A 25°C le NC differiscono dalle NE AZL 6 per ca 20,5 nm. La differenza di dimensioni a 37°C, tra le NC e le NE AZL 6 è pari a ca 39,9 nm.
- NC e NE sembrano comportarsi in maniera speculare rispetto all'aumento della temperatura.
 - Le *dimensioni* aumentano per le NC, e diminuiscono per le NE.
 - La *carica* diminuisce per le NC, e aumenta per le NE.
 - I *PDI* delle NC e delle NE diminuiscono con l'aumento della temperatura.

4.2.8. NC e NE NBD

Nella Figura 4.86 è mostrato l'andamento delle dimensioni delle **NC NBD** (40 µg/mL) a 25° e a 37°C. Nella Tabella 4.59 sono riportati gli stessi dati, per un'analisi e una comprensione più rapida e semplice.

Tabella 4.59. Dimensioni delle NC e delle NE NBD.

	Dimensioni (nm), a 25°C		Dimensioni (nm), a 37°C	
	Z-AV	SD	Z-AV	SD
NC NBD	158,8	1,3	162,5	0,9
NE NBD	128,7	1,0	126,5	0,9

Le dimensioni delle NC NBD (ca 158,8 nm) aumentano con l'incremento della temperatura, di ca 3,7 nm (ca 2,3 %). Le deviazioni standard sono contenute, e corrispondono ca allo 0,8 e allo 0,6 % del valore delle dimensioni a 25° e a 37°C.

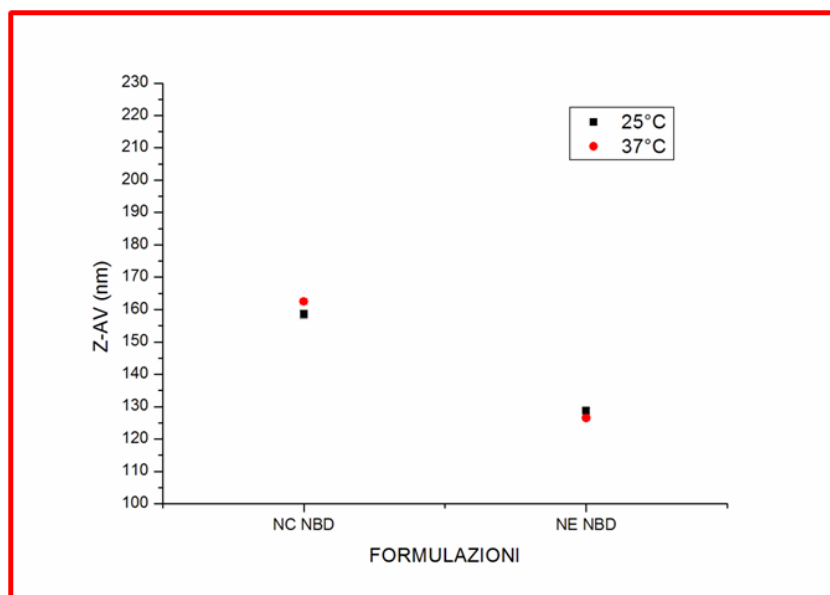


Figura 4.86. Dimensioni delle NC e delle NE NBD a 25° che a 37°C.

Nella Figura 4.87 (A-D) sono mostrati i grafici generati dal DLS, relativamente alle dimensioni espresse in intensità e in numero delle NC NBD, a 25° e a 37°C.

L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili. Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità. Infine, in nessun caso (Fig. 4.87) particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi.

I dati presenti nella Fig. 4.87 relativamente alle NC NBD sono riportati nella Tabella 4.60 e nella Figura 4.88, dove risulta più semplice commentarli.

Osservando la Tabella 4.60 si nota in seguito all'aumento della temperatura, un aumento delle dimensioni in intensità di ca 0,8 nm (ca 0,4 %), e una diminuzione delle dimensioni in numero di ca 13,3 nm (ca 10,2 %).

Come si può vedere dalla Figura 4.88, l'andamento delle dimensioni, e di come queste si modificano rispetto all'aumento della temperatura è molto simile. Si nota che le dimensioni ottenute in modalità Z-Ave si trovano comprese tra le altre due, ma sono più vicine a quelle ottenute in modalità "intensità".

Tabella 4.60. Dimensioni espresse in intensità e in numero, e PDI delle NC e delle NE NBD.

	25°C			37°C		
	Dimensioni (nm)		PDI	Dimensioni (nm)		PDI
	intensità	numero		intensità	numero	
NC NBD	182,6 ± 4,2	130,4 ± 12,2	0,14 ± 0,02	183,4 ± 3,9	117,1 ± 8,7	0,11 ± 0,02
NE NBD	147,6 ± 2,3	83,0 ± 3,5	0,13 ± 0,004	143,4 ± 1,6	84,5 ± 1,0	0,12 ± 0,01

L'aumento delle dimensioni in seguito all'incremento della temperatura con i dati ottenuti allo Z-Ave e in intensità, è di pochi nm, come anche la diminuzione ottenuta per i dati in numero. Questi incrementi e diminuzioni delle dimensioni risultano quindi essere indifferenti quando si guardano le cose da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni).

In Tabella 4.60 sono mostrati anche i valori di PDI, e si vede che diminuiscono di ca 0,03 con l'aumento della temperatura. In altre parole, la temperatura riduce i PDI.

Nella Figura 4.89 è mostrato l'andamento del potenziale zeta delle NC NBD, a 25° e a 37°C, e nella Tabella 4.61 sono riportati gli stessi dati.

Tabella 4.61. Potenziale zeta delle NC e delle NE NBD.

	Potenziale zeta (mV), a 25°C		Potenziale zeta (mV), a 37°C	
	ZP	SD	ZP	SD
NC NBD	21,6	1,4	17,5	1,3
NE NBD	-43,1	1,0	-39,9	0,7

Il potenziale zeta delle NC NBD (ca 21,6 mV) diminuisce di ca 4,1 mV (ca 18,98 %), in seguito all'aumento della temperatura. Le deviazioni standard non sono molto contenute, e corrispondono a ca il 6,3 e il 7,5 % del valore del potenziale a 25° e a 37°C.

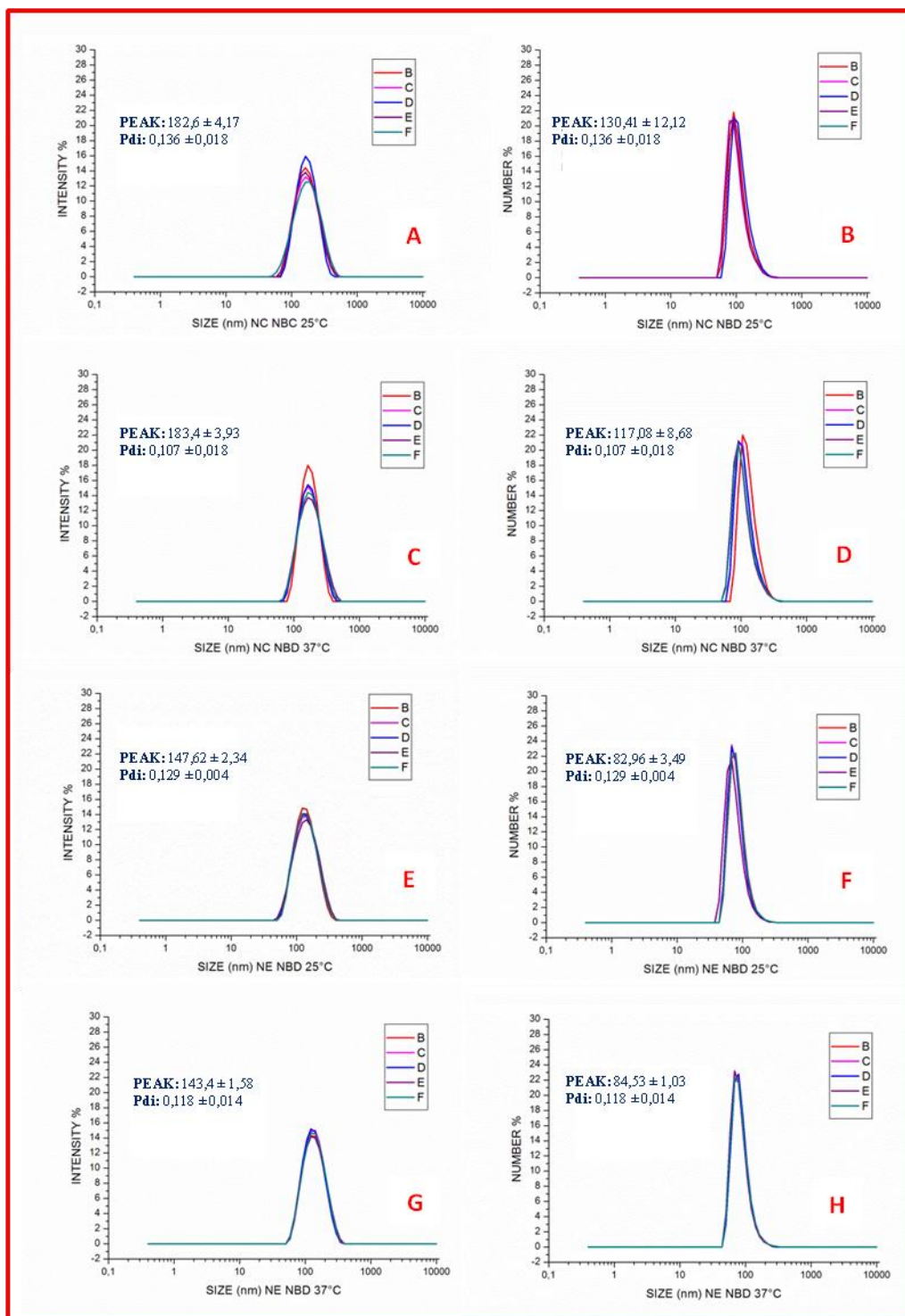


Figura 4.87. Dimensioni espresse in intensità ed in numero delle NC e delle NE NBD. A-B) NC a 25°C; C-D) NC a 37°C; E-F) NE a 25°C; G-H) NE a 37°C.

Nella precedente Figura 4.86 è mostrato l'andamento delle dimensioni delle **NE NBD** (36,3 µg/mL) a 25° e a 37°C. Nella Tabella 4.59 sono riportati gli stessi dati, per un'analisi e una discussione più rapida e semplice.

In seguito all'aumento della temperatura le dimensioni delle NE NBD (ca 128,7 nm) diminuiscono di ca 2,2 nm (ca 1,7 %). Le deviazioni standard delle NE NBD sono moderate, e rappresentano ca lo 0,8 e lo 0,7 % del valore medio delle dimensioni a 25° e a 37°C.

Nella Figura 4.87 (E-H) sono mostrati i grafici generati dal DLS, relativamente alle dimensioni espresse in intensità e in numero delle NE NBD, a 25° e a 37°C.

L'osservazione della forma dei picchi rivela che quelli espressi in intensità sono abbastanza ben sovrapposti l'uno con l'altro (a volte cambia solo l'altezza), mentre quelli espressi in numero non sempre sono perfettamente sovrapponibili. Inoltre, i picchi delle dimensioni in numero hanno, a volte, un'altezza maggiore di quelli in intensità. Infine, in nessun caso (Fig. 4.87) particelle piccole sono state mascherate dallo scattering di particelle più grandi.

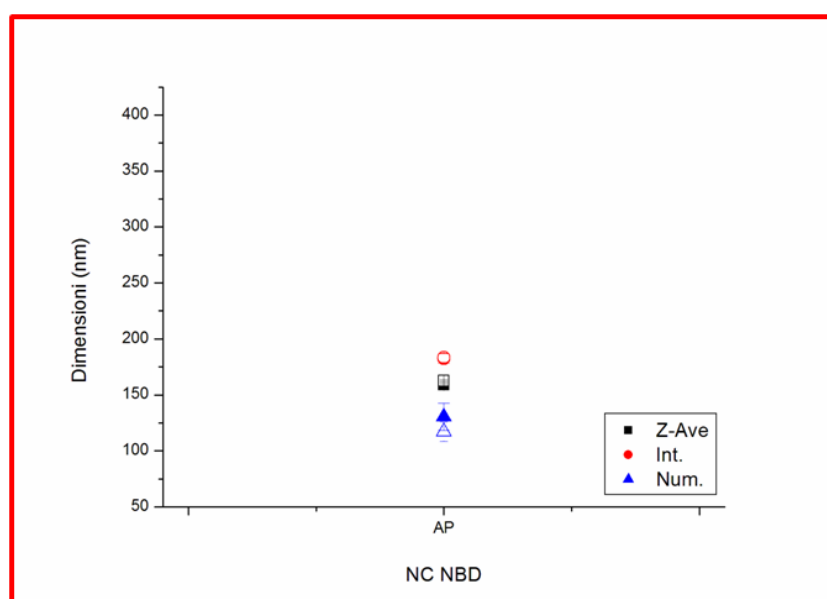


Figura 4.88. Confronto fra le dimensioni delle NC NBD. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

I dati presentati nella Figura 4.87 relativamente alle NE NBD sono riportati nella Tabella 4.60 e nella Figura 4.90, dove risulta più semplice commentarli.

Osservando la Tabella 4.60 si può vedere in seguito all'aumento della temperatura, una diminuzione delle dimensioni in intensità di ca 4,2 nm (ca 2,8 %), e un aumento delle dimensioni in numero di ca 1,5 nm (ca 1,8 %).

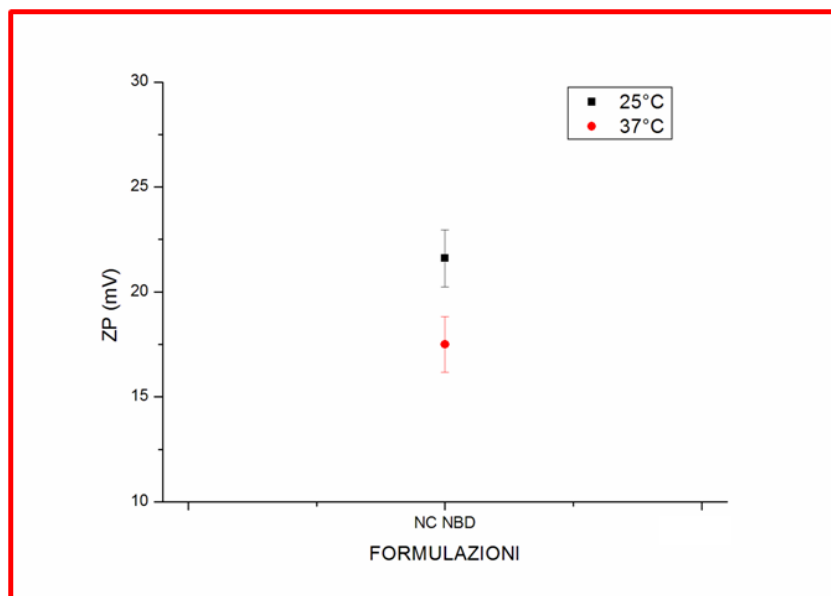


Figura 4.89. Potenziale zeta delle NC NBD a 25° che a 37°C.

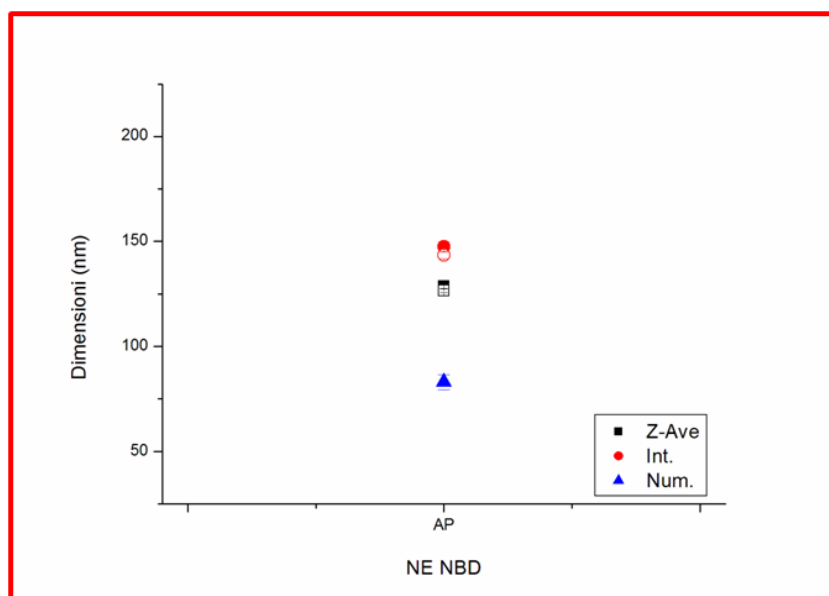


Figura 4.90. Confronto fra le dimensioni delle NE NBD. I simboli pieni indicano misure effettuate a 25°C, mentre quelli vuoti a 37°C.

Come si vede bene dalla Figura 4.90, l'andamento delle dimensioni, e di come queste si modificano rispetto all'aumento della temperatura, è simile. Si nota che le dimensioni

ottenute in modalità Z-Ave si trovano comprese tra le altre due, ma sono molto più vicine alle dimensioni ottenute in modalità “intensità”..

L’aumento della temperatura determina una minima diminuzione delle dimensioni ottenute in intensità e allo Z-Ave, mentre sembrano invariate quelle ottenute in numero.

Questi aumenti e questa diminuzione riguardano pochi nm, quindi risulta essere indifferente quando si guardano le cose da un punto di vista biologico (e.g., uptake cellulare, attraversamento membrane e/o giunzioni).

Nella Tabella 4.60 sono mostrati anche i valori di PDI. Relativamente a questi valori, si può vedere che in seguito all’aumento della temperatura, diminuiscono di 0,01.

Nella Figura 4.91 è mostrato l’andamento del potenziale zeta delle NE NBD, a 25° e a 37°C, e nella Tabella 4.61 sono riportati gli stessi dati. Il potenziale zeta delle NE NBD (ca -43,1 mV) aumenta con l’incremento della temperatura, di ca 3,2 mV (ca 7,4 %). Le deviazioni standard sono contenute, e rappresentano ca il 2,3 e l’1,7 % del valore medio del potenziale zeta a 25° e a 37°C.

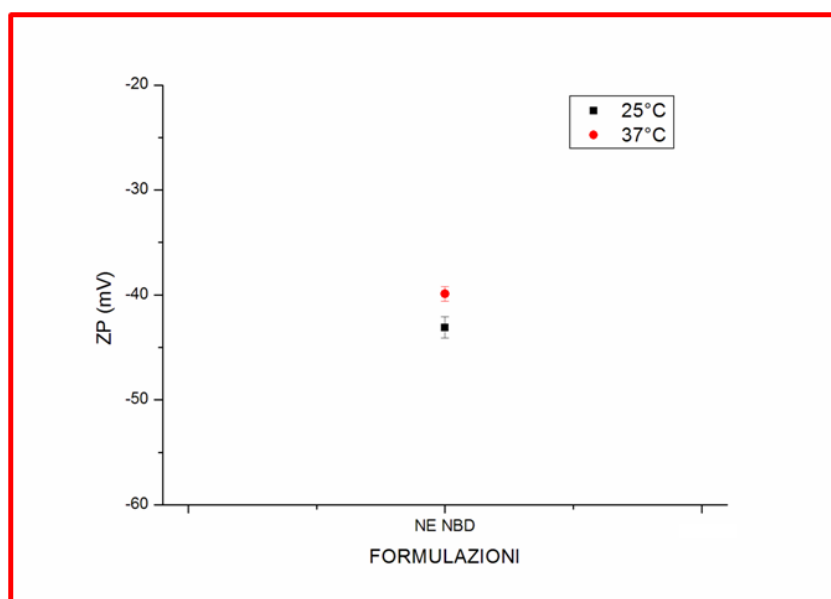


Figura 4.91. Potenziale zeta delle NE NBD a 25° che a 37°C.

Commenti finali

- Le NC NBD AP (40 µg/mL) a 25° e a 37°C risultano essere più grandi delle NE NBD AP (36,3 µg/mL), per la presenza della capsula di chitosano. A 25°C le

NC differiscono dalle NE NBD per ca 30,1 nm. La differenza di dimensioni a 37°C, tra le NC e le NE NBD è pari a ca 36 nm.

- L’NBD è un lipide fluorescente, che presenta un gruppo NO₂ il quale può far tendere il lipide a interagire con regioni idrofiliche, piuttosto che con quelle idrofobiche. Quindi, pur essendo una molecola lipofila è molto probabile che sia intrappolata nell’interno della NP attraverso l’interazione con le teste dei lipidi.
- NC e NE sembrano comportarsi in maniera speculare rispetto all’aumento della temperatura.
 - Le *dimensioni* in seguito all’incremento della temperatura aumentano per le NC, e diminuiscono per le NE.
 - La *carica* diminuisce per le NC, aumenta per le NE.
 - I *PDI* delle NC e delle NE diminuiscono con l’aumento della temperatura.

4.2.9. Analisi generale del dimensionamento al DLS

Nelle Tabelle riportate più avanti (dalla 4.62 alla 4.71) sono riepilogate le variazioni delle dimensioni, espresse allo Z-AV, in intensità e in numero, di ciascuna NP. In ogni Tabella (4.62-4.71) si trovano tre gruppi di colonne evidenziate da colori differenti: rosso per i valori relativi alle dimensioni date in Z-AV, blu per quelli in Intensità, e amaranto per quelli in Numero. Ogni gruppo è composto da tre insiemi di valori separati fra loro orizzontalmente. La prima colonna di ogni gruppo fornisce le dimensioni in nm delle particelle. La seconda colonna fornisce la differenza, in nm, tra la particella indicata nella riga a sinistra ed il valore della particella che in questa colonna ed insieme è indicata con zero (e.g. nella Tabella 4.62 il valore +76,8 nella terza riga-seconda colonna indica che la formulazione NC APC Ibu misurate a 25°C sono più grandi di circa 76,8 nm rispetto alle NC AP Ibu misurate sempre a 25°C). La terza colonna, infine, fornisce gli stessi dati della seconda colonna ma in percentuale.

Le variazioni delle dimensioni delle **NC Ibu** (101,6 µg/mL), sono riportate nella Tabella 4.62. Osservando questa Tabella si può vedere che le dimensioni espresse allo Z-AV, in intensità e in numero, mostrano sempre un aumento in seguito ai vari trattamenti (centrifugazione e dialisi a 12, 24 e 48 ore). In percentuale questo incremento è compreso tra ca il 15,3 e il 33,7 % per i dati allo Z-AV, tra ca l’11,5 e il

34,9 % per i dati in intensità e tra ca il 22,4 e il 48,8 % per i dati espressi in numero. Le percentuali dei dati allo Z-AV e in intensità sono simili tra loro, mentre quelle espresse in numero sono maggiori, e in certi casi sono quasi il doppio rispetto alle altre due. L'aumento della temperatura determina una diminuzione delle dimensioni delle AP allo Z-AV (ca 8,2 %), in intensità (ca 10,0 %) e in numero (ca 14,0 %). La diminuzione con i dati espressi in numero, in percentuale, risulta quasi il doppio di quelle allo Z-AV e in intensità. Per quanto riguarda le dimensioni delle APD 12 h, in seguito all'aumento della temperatura si può vedere una diminuzione allo Z-AV (ca 3,3 %) e in intensità (ca 5,4 %), mentre i dati in numero mostrano un aumento (ca 0,6 %). Osservando l'andamento delle dimensioni a 37°C in seguito alle 12 ore di dialisi, si può vedere un aumento allo Z-AV (ca 21,5 %), in intensità (ca 17,3 %) e in numero (43,1 %). L'aumento con i dati allo Z-AV e in intensità in percentuale è simile tra loro, mentre quello in numero è il doppio rispetto agli altri due.

Prendendo in considerazione le **NE Ibu** (56,6 µg/mL) (Tabella 4.62), si può vedere che le dimensioni allo Z-AV e in intensità diminuiscono dopo i vari trattamenti, e le percentuali sono simili tra loro (da ca 0,8 a 3,7 % allo Z-AV e tra ca 0,9 e 7,3 % in intensità). Le dimensioni in numero mostrano un andamento diverso, diminuiscono dopo la centrifugazione e le 24 ore di dialisi, mentre aumentano in seguito alle 12 e 48 ore di dialisi. Con l'aumento della temperatura si può vedere un aumento delle dimensioni delle AP allo Z-AV (ca 1,5 %), in intensità (ca 1,2 %) e in numero (ca 0,4 %), e quest'ultima è molto più bassa rispetto alle altre due. Le NC Ibu APD 12 h con l'aumento della temperatura, mostrano un aumento delle dimensioni allo Z-AV e in numero (ca 0,7 e 3,1 %), mentre mostrano una diminuzione con i dati in intensità (ca 0,7 %). A 37°C in seguito alle 12 ore di dialisi, si può vedere una diminuzione delle dimensioni allo Z-AV e in intensità (ca 3,4 e 5,7 %), mentre si osserva un aumento con i dati in numero (ca 2,7 %). Le NC e le NE Ibu, pur contenendo la stessa molecola farmacologicamente attiva (però in concentrazione diversa), dopo i vari trattamenti si comportano in modo differente.

Nella Tabella 4.63 sono riportate le variazioni delle dimensioni delle **NC e delle NE Ibu Na** (rispettivamente 65,8 e 96,2 µg/mL). Le dimensioni delle NC allo Z-AV e in numero mostrano un aumento in seguito ai vari trattamenti. In percentuale l'aumento è compreso tra ca 1,6 e 22,5 % allo Z-AV, e tra 9,6 e 27,2 % con i dati espressi in numero. Queste ultime percentuali sono maggiori di quelle delle dimensioni allo Z-AV. Le dimensioni espresse in intensità mostrano un aumento in seguito alla centrifugazione

e alle dialisi a 24 e 48 ore, mentre si può vedere una diminuzione dopo le 12 ore di dialisi.

Con l'aumento della temperatura le NC Ibu Na AP mostrano una diminuzione delle dimensioni, sia con i dati allo Z-AV (ca 9,5 %), in intensità (ca 9,4 %) e in numero (ca 18,2 %). La percentuale di diminuzione espressa in numero, è quasi il doppio di quella mostrata con i dati allo Z-AV e in intensità. Sia i dati allo Z-AV, in intensità e in numero, mostrano una diminuzione delle dimensioni delle APD 12 h, con l'aumento della temperatura. Anche in questo caso la percentuale rilevata con i dati in numero è molto maggiore delle altre due (Z-AV e intensità).

A 37°C le dimensioni delle NC Ibu Na in seguito alle 12 ore di dialisi mostrano un aumento, sia con i dati allo Z-AV, in intensità e in numero. In percentuale la diminuzione con i dati in numero, è quasi il doppio rispetto alle altre due.

Per quanto riguarda le NE Ibu Na, in seguito ai vari trattamenti le dimensioni espresse allo Z-AV, in intensità e in numero mostrano tutte una diminuzione, che in percentuale è maggiore con i dati espressi in numero. L'aumento della temperatura determina per le AP, un aumento delle dimensioni allo Z-AV, e una diminuzione con i dati espressi in intensità e in numero. Le dimensioni delle APD 12 h con l'aumento della temperatura mostrano un incremento sia con i dati allo Z-AV, in intensità e in numero.

La percentuale di incremento delle dimensioni espresse in numero è quasi 10 volte di più delle altre due. A 37°C le 12 ore di dialisi determinano una diminuzione delle dimensioni allo Z-AV, mentre si può vedere un aumento con i dati in intensità e in numero (la percentuale di incremento è maggiore con i dati in intensità).

Nella Tabella 4.64 sono riportate le variazioni delle dimensioni, in seguito all'aumento della temperatura, delle NC e NE Ibu Na a diversa concentrazione.

Le **NC Ibu Na** 22,7 e 72,1 µg/mL con l'aumento della temperatura, mostrano un incremento delle dimensioni allo Z-AV, in intensità e in numero. In percentuale, questi incrementi delle NC Ibu Na sono simili, anche se la concentrazione della molecola è maggiore. Al contrario, le NC Ibu Na 115,7 µg/mL mostrano una diminuzione delle dimensioni allo Z-AV, in intensità e in numero, in seguito all'aumento della temperatura. Questo andamento è stato osservato anche per le NC Ibu Na 65,8 µg/mL (Tabella 4.59), in questo caso però le percentuali di diminuzione delle dimensioni sono molto inferiori a quelle osservate per le NC Ibu Na 115,7 µg/mL, dove la concentrazione dell'Ibu Na è quasi il doppio.

Prendendo in considerazione le dimensioni delle **NE Ibu Na** 22,7 e 73,5 $\mu\text{g/mL}$, si può vedere una diminuzione con i dati allo Z-AV, in intensità e in numero, con l'aumento della temperatura. Le NE Ibu Na 113,6 $\mu\text{g/mL}$ mostrano una diminuzione delle dimensioni con i dati allo Z-AV e in intensità, mentre si può vedere un aumento con i dati espressi in numero. È possibile osservare che le percentuali di diminuzione delle dimensioni delle NE Ibu Na, aumentano con l'aumento della concentrazione dell'Ibu Na.

Nella Tabella 4.65 è mostrata la variazione delle dimensioni delle **NC e NE Pacli** (50 e 49,5 $\mu\text{g/mL}$), in seguito all'incremento della temperatura. Osservando la Tabella si può vedere per le NC un aumento delle dimensioni allo Z-AV, in intensità e in numero. Le percentuali di incremento delle tre dimensioni sono simili tra loro, ma quelle espresse in numero sono le maggiori. Per quanto riguarda le NE, si può vedere una diminuzione delle dimensioni allo Z-AV e in intensità, mentre si osserva un aumento con i dati espressi in numero. La percentuale di diminuzione allo Z-AV è più del doppio di quella delle dimensioni espresse in intensità.

Nella Tabella 4.66 sono riportate le variazioni delle dimensioni delle **NC e NE RA** (64,3 e 63,4 $\mu\text{g/mL}$) dopo i vari trattamenti. In seguito ai vari trattamenti, le NC mostrano un aumento delle dimensioni allo Z-AV, in intensità e in numero. Le percentuali di incremento delle dimensioni allo Z-AV e in intensità sono simili tra loro, mentre quelle dei dati espressi in numero sono maggiori rispetto alle altre due.

L'aumento della temperatura determina una diminuzione delle dimensioni delle AP, allo Z-AV, in intensità e in numero. Le percentuali di diminuzione delle dimensioni in numero sono maggiori, rispetto a quelle dello Z-AV e in intensità. Anche le dimensioni allo Z-AV e in intensità delle APD 12 h, con l'aumento delle dimensioni, diminuiscono, mentre le dimensioni in numero aumentano. A 37°C in seguito alle 12 ore di dialisi, le NC mostrano un aumento delle dimensioni allo Z-AV, in intensità e in numero. La percentuale di incremento delle dimensioni espresse in numero è la maggiore più grande, mentre quella in intensità è la più bassa.

Per quanto riguarda le NE, in seguito ai vari trattamenti si può vedere una diminuzione delle dimensioni allo Z-AV, in intensità e in numero, ad eccezione delle APC in intensità, che mostrano un aumento. L'aumento della temperatura determina un aumento delle dimensioni allo Z-AV e in intensità delle AP, mentre le dimensioni in numero diminuiscono. Le APD 12 h a 37°C mostrano un aumento delle dimensioni allo

Z-AV e in numero, e una diminuzione delle dimensioni in intensità. La percentuale di incremento delle dimensioni in numero è molto maggiore di quella con i dati allo Z-AV. A 37°C le 12 ore di dialisi determinano una diminuzione delle dimensioni allo Z-AV e in intensità (quest'ultima percentuale è molto maggiore di quella allo Z-AV). Al contrario, le dimensioni in numero a 37°C, in seguito alle 12 ore di dialisi aumentano.

Nella Tabella 4.67 sono riportate le variazioni delle dimensioni delle **NC e NE AZL 38** (12,6 e 11,2 µg/mL), in seguito ai vari trattamenti. Le dimensioni allo Z-AV, in intensità e in numero delle NC AZL 38, in seguito ai vari trattamenti, mostrano un aumento.

Le percentuali di incremento delle dimensioni allo Z-AV e in intensità sono simili tra loro, mentre quelle in numero (tranne quella delle APC) sono maggiori rispetto alle altre due. L'incremento della temperatura a 37°C determina una diminuzione delle dimensioni allo Z-AV, in intensità e in numero delle AP. Anche le dimensioni delle APD 12 h allo Z-AV, in intensità e in numero, con l'aumento della temperatura, diminuiscono.

Le percentuali di diminuzione delle dimensioni in numero sono maggiori, rispetto a quelle allo Z-AV e in intensità. A 37°C in seguito alle 12 ore di dialisi, le NC mostrano un aumento delle dimensioni allo Z-AV, in intensità e in numero. Le percentuali di incremento in numero, sono maggiori rispetto a quelle in intensità e allo Z-AV. Prendendo in considerazione le NE, le dimensioni allo Z-AV e in intensità, in seguito ai vari trattamenti diminuiscono, mentre le dimensioni in numero aumentano. Le percentuali di diminuzione delle dimensioni in intensità, sono maggiori di quelle allo Z-AV.

L'aumento della temperatura determina un aumento delle dimensioni allo Z-AV e in numero delle AP, mentre si può vedere una diminuzione delle dimensioni in intensità.

Le percentuali di incremento delle dimensioni in numero, sono maggiori di quelle allo Z-AV. Le dimensioni allo Z-AV delle APD 12 h con l'aumento della temperatura mostrano una diminuzione, mentre le dimensioni in intensità e in numero aumentano.

La percentuale di incremento delle dimensioni in numero sono maggiori di quelle in intensità. A 37°C le 12 ore di dialisi determinano una diminuzione delle dimensioni allo Z-AV e in numero, mentre le dimensioni in intensità mostrano un aumento.

Nella Tabella 4.68 è riepilogato l'andamento delle dimensioni delle **NC e NE AZL 38** (113,6 e 125 µg/mL) in seguito all'aumento della temperatura. Le dimensioni allo Z-

AV, in intensità e in numero delle NC aumentano, e le dimensioni in numero mostrano la percentuale di incremento maggiore. Come visto nella Tabella 3.70, le NC AZL 38 12,6 µg/mL mostrano invece una diminuzione delle dimensioni in seguito all'aumento della temperatura. Per quanto riguarda le dimensioni allo Z-AV e in intensità delle NE, si può vedere una diminuzione, mentre quelle in numero mostrano un aumento. Le NE AZL 38 11,2 µg/mL (Tabella 4.63) mostrano invece un aumento delle dimensioni allo Z-AV, con l'aumento della temperatura.

La Tabella 4.69 mostra le variazioni delle dimensioni delle **NC e NE AZL 6** (10,0 e 12,0 µg/mL), in seguito ai vari trattamenti. Le dimensioni allo Z-AV, in intensità e in numero delle NC (tranne le AP), aumentano in seguito ai vari trattamenti. Le percentuali di incremento delle dimensioni allo Z-AV e in intensità sono simili tra loro, mentre quelle in numero sono maggiori rispetto alle altre due. L'aumento della temperatura determina una diminuzione delle dimensioni allo Z-AV, in intensità e in numero delle AP.

Le dimensioni in intensità mostrano la percentuale di diminuzione maggiore. Anche le APD 12 h con l'aumento della temperatura mostrano una diminuzione delle dimensioni allo Z-AV, in intensità e in numero (le percentuali di diminuzione sono simili tra loro). A 37°C le dimensioni delle NC in seguito alle 12 ore di dialisi mostrano un aumento con i dati allo Z-AV, in intensità e in numero.

Per quanto riguarda le dimensioni delle NE, si può vedere una diminuzione con i dati allo Z-AV (tranne per le APC), in intensità (ad eccezione delle APC) e in numero, in seguito ai vari trattamenti. Le percentuali di diminuzione delle dimensioni in numero, sono maggiori rispetto a quelle in intensità e allo Z-AV. Con l'aumento della temperatura le dimensioni allo Z-AV e in intensità mostrano un aumento, mentre quelle in numero rilevano una diminuzione. Le dimensioni allo Z-AV e in intensità delle APD 12 h, con l'aumento della temperatura, mostrano una diminuzione, mentre le dimensioni in numero aumentano. A 37°C in seguito alle 12 ore di dialisi, le NE mostrano una diminuzione delle dimensioni allo Z-AV, in intensità e in numero.

Nella Tabella 4.70 è riepilogato l'andamento delle dimensioni delle **NC e NE AZL 6** (113,6 e 120,2 µg/mL) in seguito all'aumento della temperatura. Le dimensioni delle NC allo Z-AV, in intensità e in numero mostrano un aumento. Le dimensioni in numero mostrano la percentuale di incremento maggiore. Al contrario, le NC AZL 6 10,0 µg/mL (Tabella 4.65) con l'aumento della temperatura mostrano una diminuzione

delle dimensioni. Per quanto riguarda le NE, con l'aumento della temperatura le dimensioni allo Z-AV, in intensità e in numero diminuiscono. Le percentuali di diminuzione delle dimensioni allo Z-AV e in intensità sono simili tra loro, mentre quella con i dati in numero sono molto più basse. Le NE 12,0 µg/mL (Tabella 4.65) mostrano invece un aumento delle dimensioni allo Z-AV e in intensità.

Nella Tabella 4.71 sono mostrate le variazioni delle dimensioni delle **NC e NE NBD** (40 e 36,3 µg/mL), in seguito all'aumento della temperatura. Le dimensioni allo Z-AV e in intensità delle NC aumentano, mentre quelle in numero diminuiscono. Le dimensioni delle NE con i dati allo Z-AV e in intensità diminuiscono, mentre quelle in numero aumentano.

Commenti conclusivi

- Le dimensioni espresse in Z-AV si trovano sempre tra quelle espresse in intensità (più grandi) e quelle espresse in numero (più piccole). Indipendentemente dal tipo di NP, dal tipo di farmaco intrappolato, e dalla concentrazione del farmaco intrappolato. Tuttavia, mentre nelle NC le dimensioni espresse in Z-AV si trovano circa a metà degli altri due valori, nel caso delle NE le dimensioni espresse in Z-AV sono molto più simili a quelle espresse in intensità.
- Le dimensioni in Z-AV delle NC sono sempre maggiori di quelle delle NE. Nel caso delle formulazioni AP si può avere un incremento fino al 37 % circa. Le dimensioni delle NC risultano comprese in un range che varia tra 158 e 230 nm (media 186 nm), mentre le NE tra 137-153 nm (media 149 nm). Non si è riscontrata una correlazione tra la dimensione della particella e il contenuto teorico di farmaco, né con il suo LogP.
- La centrifugazione aumenta le dimensioni (Z-AV) delle NC mediamente di un 18-34 %. Nel caso delle NE, le dimensioni (Z-AV) rimangono invariate (mediamente una diminuzione inferiore al 1 %). Non si è riscontrata una correlazione tra la dimensione della particella e il contenuto teorico di farmaco, né con il suo LogP.
- Le dimensioni (Z-AV) delle NC aumentano anche con la dialisi. Si è riscontrato che durante le prime 12 ore le dimensioni aumentano di 15-22 %, nelle 24 ore di 11-53 %, e nelle 48 ore di 21-52 %; valori calcolati rispetto alle dimensioni AP. Tuttavia, si è notato che le NC contenenti il farmaco idrofili (Ibu Na) hanno

aumentato la loro dimensione in maniera più contenuta; solo il 2, 9, 18 % rispettivamente dopo 12, 24, e 48 ore. Nell'insieme, comunque, non si è riscontrata una correlazione tra la dimensione della particella e il contenuto teorico di farmaco, né con il suo LogP.

- Le dimensioni (Z-AV) delle NE diminuiscono con la dialisi. Si è riscontrato che durante le prime 12 ore le dimensioni diminuiscono di 2,5-4,5 %, nelle 24 ore di 2,7-5,9 %, e nelle 48 ore di 2,9-5,3 %; valori calcolati rispetto alle dimensioni AP. Non si è riscontrata una correlazione tra la dimensione della particella e il contenuto teorico di farmaco, né con il suo LogP.
- Per quanto riguarda la temperatura è stato curioso notare che le dimensioni (Z-AV) delle NC AP crescono o diminuiscono fino a ca un 10 % in funzione se sono state preparate prima o dopo una certa data. Analogamente, le dimensioni delle NE AP diminuiscono o aumentano però fino a un 5 %. Non si è riscontrata una correlazione tra la dimensione della particella e il contenuto teorico di farmaco, né con il suo LogP.
- Per quanto riguarda i campioni APD 12h misurati a 37°C, tutte le NC aumentano di dimensione (calcolata rispetto al valore corrispondente di AP-37°C) di un 19-27 %. Le NC contenenti Ibu Na aumentano solo di un 8 %. Per contro, le NE diminuiscono le loro dimensioni (Z-AV) di un 3-6 %. Non si è riscontrata una correlazione tra la dimensione della particella e il contenuto teorico di farmaco, né con il suo LogP.
- Seppur con andamenti simili, queste percentuali non sono mantenute se si prendono in esame le dimensioni espresse intensità o numero.

Tabella 4.62. Riepilogo delle dimensioni delle NC e NE Ibu.

NC Ibu - 101,6 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	227,5	0	100	280,8	0	100	178,3	0	100
AP - 37°C	208,8	- 18,7	- 8,2	252,9	- 27,9	-10	153,3	- 25,0	- 14,0
APC - 25°C	304,3	+ 76,8	33,8	378,8	+ 97,8	34,9	265,5	+ 87,0	48,8
APD 12 h - 25°C	262,3	+ 34,8	15,3	313,2	+ 32,3	11,5	218,2	+ 39,9	22,4
APD 24 h - 25°C	253,7	+ 48,5	21,3	321,4	+ 40,6	14,5	234,3	+ 56,0	40,9
APD 48 h - 25°C	276,0	+ 56,4	24,8	317,0	+ 36,2	12,9	251,2	+ 73,0	40,9
APD 12 h - 25°C	262,3	0	100	313,2	0	100	218,2	0	100
APD 12 h - 37°C	253,7	- 8,6	- 3,3	296,5	- 16,9	- 5,4	219,4	+ 1,4	0,6
AP - 37°C	208,8	0	100	252,9	0	100	153,3	0	100
APD 12 h - 37°C	253,7	+ 44,9	21,5	296,5	+ 43,6	17,3	219,4	+ 66,1	43,1
NE Ibu - 56,6 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	142,4	0	100	164,4	0	100	94,8	0	100
AP - 37°C	144,6	+ 2,2	1,5	166,3	+ 1,9	1,2	95,2	+ 0,4	0,4
APC - 25°C	141,3	- 1,1	- 0,8	162,9	- 1,4	- 0,9	92,2	- 2,6	- 2,8
APD 12 h - 25°C	138,8	- 3,6	- 2,5	157,5	- 6,9	- 4,2	94,9	+ 0,1	0,1
APD 24 h - 25°C	138,6	- 3,8	- 2,7	157,9	- 6,5	- 4,0	93,8	- 1,1	- 1,2
APD 48 h - 25°C	137,1	- 5,3	- 3,7	152,4	- 12	- 7,3	98,1	+ 3,2	3,4
APD 12 h - 25°C	138,8	0	100	157,5	0	100	94,9	0	100
APD 12 h - 37°C	139,7	+ 0,9	0,7	156,8	- 1,0	- 0,7	97,8	+ 2,9	3,1
AP - 37°C	144,6	0	100	166,7	0	100	95,2	0	100
APD 12 h - 37°C	139,7	- 4,9	- 3,4	156,8	- 9,5	- 5,7	97,8	+ 2,59	2,7

Tabella 4.63. Riepilogo delle dimensioni delle NC e NE Ibu Na.

NC Ibu Na – 65,8 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	229,7	0	100	278,5	0	100	182,7	0	100
AP - 37°C	207,8	- 21,9	- 9,5	252,4	- 26,1	- 9,4	149,4	- 33,3	- 18,2
APC - 25°C	281,4	+ 51,7	22,5	340,5	+ 62,0	22,3	225,3	+ 42,6	23,3
APD 12 h - 25°C	233,4	+ 3,7	1,6	272,7	- 5,7	- 2,1	200,3	+ 17,6	9,6
APD 24 h - 25°C	249,7	+ 20	8,7	281,9	+ 3,4	1,2	219,7	+ 36,9	20,2
APD 48 h - 25°C	270,3	+ 40,6	17,7	298,5	+ 20,1	7,2	232,4	+ 49,7	- 27,2
APD 12 h - 25°C	233,4	0	100	272,7	0	100	200,3	0	100
APD 12 h - 37°C	223,8	- 9,6	- 4,1	269,3	- 3,5	- 1,3	172,8	- 27,5	- 13,7
AP - 37°C	207,8	0	100	252,4	0	100	149,4	0	100
APD 12 h - 37°C	223,8	+ 16	7,7	269,3	+ 16,9	6,7	172,8	+ 23,4	15,7
NE Ibu Na – 96,2 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	144,8	0	100	164,3	0	100	101,1	0	100
AP - 37°C	147,2	+ 2,4	1,7	107,1	- 57,3	- 34,8	97,3	- 3,8	- 3,8
APC - 25°C	144,2	- 0,6	- 0,4	164,0	- 0,3	- 0,2	98,7	- 2,5	- 2,4
APD 12 h - 25°C	138,9	- 5,9	- 4,1	158,97	- 5,4	- 3,3	88,8	- 12,3	- 12,2
APD 24 h - 25°C	138,6	- 6,2	- 4,3	157,6	- 6,7	- 4,1	97,1	- 4,1	- 4,0
APD 48 h - 25°C	139,3	- 5,5	- 3,8	157,97	- 6,4	- 3,9	94,7	- 6,4	- 6,4
APD 12 h - 25°C	138,9	0	100	158,97	0	100	88,8	0	100
APD 12 h - 37°C	141,1	+ 2,2	1,6	159,2	+ 0,2	0,1	97,3	+ 8,5	9,6
AP - 37°C	147,2	0	100	107,1	0	100	97,3	0	100
APD 12 h - 37°C	141,1	- 6,1	- 4,1	159,2	+ 52,1	48,7	97,3	+ 0,01	0,01

Tabella 4.64. Riepilogo delle dimensioni delle NC e NE Ibu Na.

NC Ibu Na – 115,7 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	220,5	0	100	278,9	0	100	172,7	0	100
AP - 37°C	172,2	- 48,3	- 21,9	190,8	- 88,1	- 31,6	132,8	- 39,9	- 23,1
NE Ibu Na – 113,6 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	148,6	0	100	167,8	0	100	102,7	0	100
AP - 37°C	144	- 4,6	- 3,1	159,9	- 7,9	- 4,7	103,2	+ 0,5	0,5
NC Ibu Na – 72,1 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	158,2	0	100	176	0	100	118,4	0	100
AP - 37°C	171,3	+ 13,1	8,3	188,7	+ 12,7	7,2	133,7	+ 15,3	12,96
NE Ibu Na – 73,5 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	147	0	100	163,7	0	100	107,3	0	100
AP - 37°C	143,5	- 3,5	- 2,4	160,1	- 3,54	- 2,2	101,8	- 5,5	- 5,1
NC Ibu Na – 22,7 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	161,6	0	100	181,3	0	100	117,6	0	100
AP - 37°C	174,2	+ 12,6	7,8	193,96	+ 12,7	6,99	133,1	+ 15,5	13,2
NE Ibu Na – 22,7 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	139,4	0	100	156,5	0	100	97,04	0	100
AP - 37°C	136,6	- 2,8	- 2,0	153,98	- 2,6	- 1,6	93,88	- 3,2	- 3,3

Tabella 4.65. Riepilogo delle dimensioni delle NC e NE Pacli.

NC Pacli – 50 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	158,6	0	100	180,2	0	100	110,1	0	100
AP - 37°C	164	+ 5,4	3,4	185,5	+ 5,3	2,96	116,0	+ 5,9	5,4
NE Pacli – 49,5 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	137,4	0	100	154,1	0	100	95,5	0	100
AP - 37°C	136,9	- 0,5	- 0,4	153,8	- 0,3	- 0,2	95,7	+ 0,19	0,2

Tabella 4.66. Riepilogo delle dimensioni delle NC e NE RA.

NC RA – 64,3 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	184,7	0	100	215,9	0	100	136,4	0	100
AP - 37°C	174,3	- 10,4	- 5,6	201,2	- 14,7	- 6,79	124,1	- 12,3	- 9,0
APC - 25°C	261,3	+ 76,6	41,5	310,2	+ 94,3	43,7	198,4	+ 62	45,5
APD 12 h - 25°C	226,6	+ 41,9	22,7	268,6	+ 52,7	24,4	186,8	+ 50,4	36,95
APD 24 h - 25°C	248,3	+ 63,6	34,4	286,3	+ 70,4	32,6	214,1	+ 77,7	56,9
APD 48 h - 25°C	264,7	+ 80	43,3	305,5	+ 89,6	41,5	223,97	+ 87,6	64,2
APD 12 h - 25°C	226,6	0	100	268,6	0	100	186,8	0	100
APD 12 h - 37°C	215,1	- 11,5	- 5,1	211,9	- 56,8	- 21,1	193,3	+ 6,5	3,5
AP - 37°C	174,3	0	100	201,2	0	100	124,1	0	100
APD 12 h - 37°C	215,1	+ 40,8	23,4	211,9	+ 10,6	5,3	193,3	+ 69,2	55,7
NE RA – 63,4 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	Nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	147,6	0	100	167,3	0	100	101,7	0	100
AP - 37°C	149,7	+ 2,1	1,4	173,4	+ 6,1	3,6	98,1	- 3,6	- 3,6
APC - 25°C	146,8	- 0,8	- 0,5	169,3	+ 1,97	1,2	95,3	- 6,4	- 6,2
APD 12 h - 25°C	140,9	- 6,7	- 4,5	160,3	- 7,1	- 4,2	95,3	- 6,4	- 6,3
APD 24 h - 25°C	138,9	- 8,7	- 5,9	156,1	- 11,2	- 6,7	96,3	- 5,4	- 5,3
APD 48 h - 25°C	139,8	- 7,8	- 5,3	154,6	- 12,8	- 7,6	101,4	- 0,3	- 0,3
APD 12 h - 25°C	140,9	0	100	160,3	0	100	95,3	0	100
APD 12 h - 37°C	143,9	+ 3	2,1	148,6	- 11,7	- 7,3	124,8	+ 29,6	31,1
AP - 37°C	149,7	0	100	173,4	0	100	98,1	0	100
APD 12 h - 37°C	143,9	- 5,8	- 3,9	148,6	- 24,8	- 14,3	124,8	+ 26,8	27,3

Tabella 4.67. Riepilogo delle dimensioni delle NC e NE AZL 38.

NC AZL 38 – 12,6 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	186,9	0	100	223,0	0	100	145,9	0	100
AP - 37°C	172,6	- 14,3	- 7,7	198,9	- 24,3	- 10,9	127,6	- 18,3	- 12,6
APC - 25°C	287,1	+ 100,2	53,6	344	+ 120,97	54,2	210,5	+ 64,6	44,3
APD 12 h - 25°C	225,2	+ 38,3	20,5	268,3	+ 45,3	20,3	191,7	+ 45,8	31,4
APD 24 h - 25°C	249,1	+ 62,2	33,3	289,5	+ 66,5	29,8	211,5	+ 65,6	44,95
APD 48 h - 25°C	284,6	+ 97,7	52,3	330,8	+ 107,8	48,3	249,3	+ 103,3	70,8
APD 12 h - 25°C	225,2	0	100	268,3	0	100	191,7	0	100
APD 12 h - 37°C	219,8	- 5,4	- 2,4	263,7	- 4,7	- 1,7	175,2	- 16,5	- 8,6
AP - 37°C	172,6	0	100	198,9	0	100	127,6	0	100
APD 12 h - 37°C	219,8	+ 47,2	27,4	263,7	+ 64,8	32,6	175,2	+ 47,6	37,3
NE AZL 38 – 11,2 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	141,5	0	100	164,6	0	100	84,1	0	100
AP - 37°C	145,3	+ 3,8	2,7	116,7	- 47,9	- 29,97	97,8	+ 13,7	16,3
APC - 25°C	140,4	- 1,1	- 0,8	160,8	- 3,8	- 2,3	93,3	+ 9,3	11,0
APD 12 h - 25°C	137,4	- 4,1	- 2,9	154,0	- 10,5	- 6,4	96,4	+ 12,4	14,7
APD 24 h - 25°C	137,2	- 4,3	- 3,0	154,3	- 10,2	- 6,2	95,98	+ 11,9	14,2
APD 48 h - 25°C	137,4	- 4,1	- 2,9	154,9	- 9,7	- 5,9	96,1	+ 12,1	14,4
APD 12 h - 25°C	137,4	0	100	154,0	0	100	96,4	0	100
APD 12 h - 37°C	137,2	- 0,2	- 0,2	155,4	+ 1,4	0,9	155,4	+ 5,6	5,8
AP - 37°C	145,3	0	100	116,7	0	100	97,78	0	100
APD 12 h - 37°C	137,2	- 8,1	- 5,6	155,4	+ 38,7	33,2	90,8	- 6,9	- 7,1

Tabella 4.68. Riepilogo delle dimensioni delle NC e NE AZL 38.

NC AZL 38 – 113,6 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	160,9	0	100	185,9	0	100	106,6	0	100
AP - 37°C	177,5	+ 16,6	10,3	202,8	+ 16,9	9,1	124,5	+ 17,8	16,7
NE AZL 38 – 125 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	183,9	0	100	213,4	0	100	122,0	0	100
AP - 37°C	174,5	- 9,4	- 5,1	197,2	- 16,2	- 7,6	127,0	+ 5,0	4,1

Tabella 4.69. Riepilogo delle dimensioni delle NC e NE AZL 6.

NC AZL 6 – 10,0 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	184,9	0	100	225,5	0	100	126,8	0	100
AP - 37°C	167,4	- 17,5	- 9,5	192,3	- 33,2	- 14,7	125,1	- 1,8	- 1,4
APC - 25°C	255,8	+ 70,9	38,4	301,2	+ 75,7	33,6	156,5	+ 29,7	23,4
APD 12 h - 25°C	216,2	+ 31,3	16,9	264,9	+ 39,4	17,5	163,5	+ 36,7	28,9
APD 24 h - 25°C	284,4	+ 99,5	53,8	320,8	+ 95,3	42,3	255	+ 128,2	101,1
APD 48 h - 25°C	259,5	+ 74,6	40,4	294,4	+ 68,9	30,6	228,3	+ 101,5	80
APD 12 h - 25°C	216,2	0	100	264,9	0	100	163,5	0	100
APD 12 h - 37°C	199,4	- 16,8	- 7,8	237,3	- 27,6	- 10,4	150,2	- 13,4	- 8,2
AP - 37°C	167,4	0	100	192,3	0	100	125,1	0	100
APD 12 h - 37°C	199,4	+ 32	19,1	237,3	+ 44,97	23,4	150,2	+ 25,1	20,1
NE AZL 6 – 12,0 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	153,4	0	100	174,4	0	100	153,4	0	100
AP - 37°C	157,7	+ 4,3	2,8	182,5	+ 8,1	4,6	140,4	- 13	- 8,5
APC - 25°C	168,8	+ 15,4	10,0	184,6	+ 10,2	5,9	100,3	- 53,1	- 34,6
APD 12 h - 25°C	148,6	- 4,8	- 3,1	165	- 9,4	5,4	107,8	- 45,6	- 29,7
APD 24 h - 25°C	148,3	- 5,1	- 3,3	166,9	- 7,5	- 4,3	104,3	- 49,2	- 32,0
APD 48 h - 25°C	147	- 6,4	- 4,2	169,4	- 5	- 2,9	94,6	- 58,8	- 38,4
APD 12 h - 25°C	148,6	0	100	165	0	100	107,8	0	100
APD 12 h - 37°C	148,5	- 0,1	- 0,1	154,9	- 10,1	- 6,2	125,8	+ 18	16,7
AP - 37°C	157,7	0	100	182,5	0	100	140,4	0	100
APD 12 h - 37°C	148,5	- 9,2	- 5,8	154,9	- 27,7	- 15,2	125,8	- 14,6	- 10,4

Tabella 4.70. Riepilogo delle dimensioni delle NC e NE AZL 6.

NC AZL 6 – 113,6 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	169,4	0	100	190,3	0	100	124,9	0	100
AP - 37°C	184,7	+ 16,5	9,7	205,4	+ 15,0	7,9	143,1	+ 18,2	14,6
NE AZL 6 – 120,2 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	Nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	148,8	0	100	169,6	0	100	98,5	0	100
AP - 37°C	144,8	- 4	- 2,7	165,98	- 3,7	- 2,2	97,6	- 0,9	- 0,95

Tabella 4.71. Riepilogo delle dimensioni delle NC e NE NBD.

NC NBD – 40 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	158,8	0	100	182,6	0	100	130,4	0	100
AP - 37°C	162,5	+ 3,7	2,3	183,4	+ 0,8	0,4	117,1	- 13,3	- 10,2
NE NBD – 36,3 µg/mL	Z-AV	nm	%	Int	Nm	%	Num	nm	%
AP - 25°C	128,7	0	100	147,6	0	100	82,96	0	100
AP - 37°C	126,5	- 2,2	- 1,7	143,4	- 4,2	- 2,9	84,5	+ 1,57	1,9

4.3. Caratterizzazione delle NP al TEM: dimensioni e morfologia

La metodica di preparazione delle NP da osservare al TEM è molto semplice e veloce, ma nonostante questo non sempre è stato possibile ottenere delle foto nitide, soprattutto utilizzando il TEM 2 (vedi sotto). Questo TEM non ha un forte potere di ingrandimento, e ci sono stati vari problemi con la messa a fuoco. Si sottolinea, ma senza ritenere che questo sia il problema fondamentale, che le NP osservate con questo TEM non sono state contrastate. Non tutte le particelle sottoposte ad osservazione al TEM sono state preventivamente purificate. Pertanto, quando non indicato, debbono intendersi come AP e sono le seguenti:

- NC e NE Ibu, rispettivamente 101,6 e 56,6 $\mu\text{g/mL}$ (par. 3.3.1);
- NC e NE Ibu Na, rispettivamente 65,8 e 96,2 $\mu\text{g/mL}$ (par. 3.3.2, lotto 1);
- NC e NE RA, rispettivamente 64,4 e 63,4 $\mu\text{g/mL}$ (par. 3.3.4);
- NC e NE AZL 38, rispettivamente 12,6 e 11,2 $\mu\text{g/mL}$ (par. 3.3.5, lotto 1);
- NC e NE AZL 6, rispettivamente 10,02 e 12,02 $\mu\text{g/mL}$ (par. 3.3.6, lotto 1).

Le NP prese in esame sono state caratterizzate per dimensioni e morfologia. Le dimensioni ottenute al TEM sono state anche raffrontate con quelle ottenute al DLS. Per quanto riguarda l'aspetto morfologico bisogna ricordare che si tratta di campioni essiccati e che quindi la forma potrebbe non rispettare esattamente quella naturale in soluzione.

Le NP sono state studiate utilizzando diversi TEM: (1) il JEOL JEM-1011, che lavora a 100 kV (Spagna), e (2) il JEOL JEM-100S, che lavora a 80-100 kV (Citomorfologia, Università di Cagliari).

4.3.1. NC e NE Ibu

Le NC Ibu (101,6 $\mu\text{g/mL}$) e le NE Ibu (56,6 $\mu\text{g/mL}$) AP sono state analizzate con il TEM 2, quindi non contrastate.

L'osservazione al TEM delle **NC Ibu** ha messo in evidenza che nel retino si poteva osservare particolato di forma rotondeggiante (Fig. 4.92 A) e di forma quadrata (Fig. 4.92 B). Le strutture sferiche elettrondense al fascio elettronico appaiono sfuocate e con la forma non perfettamente sferica. Al contrario, le strutture di forma quadrata, al fascio elettronico appaiono elettrondense, con una forma geometrica regolare.

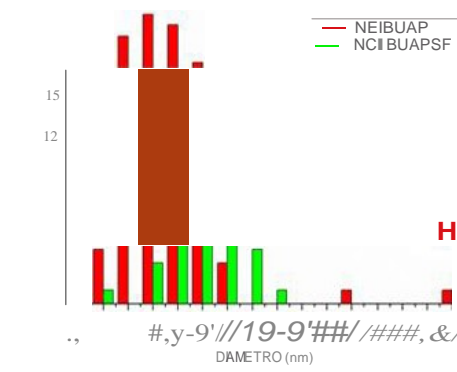
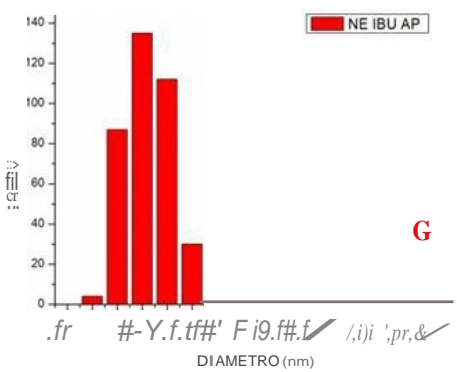
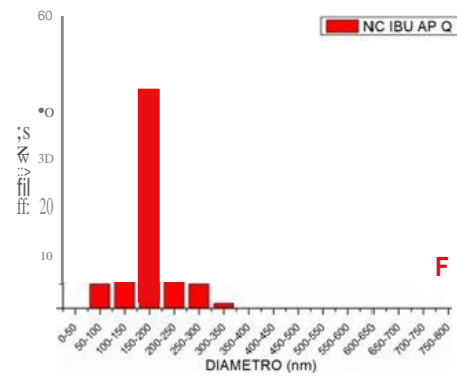
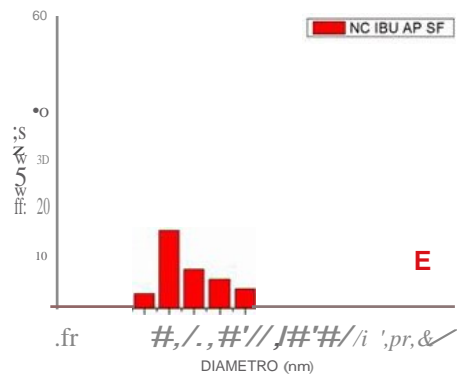
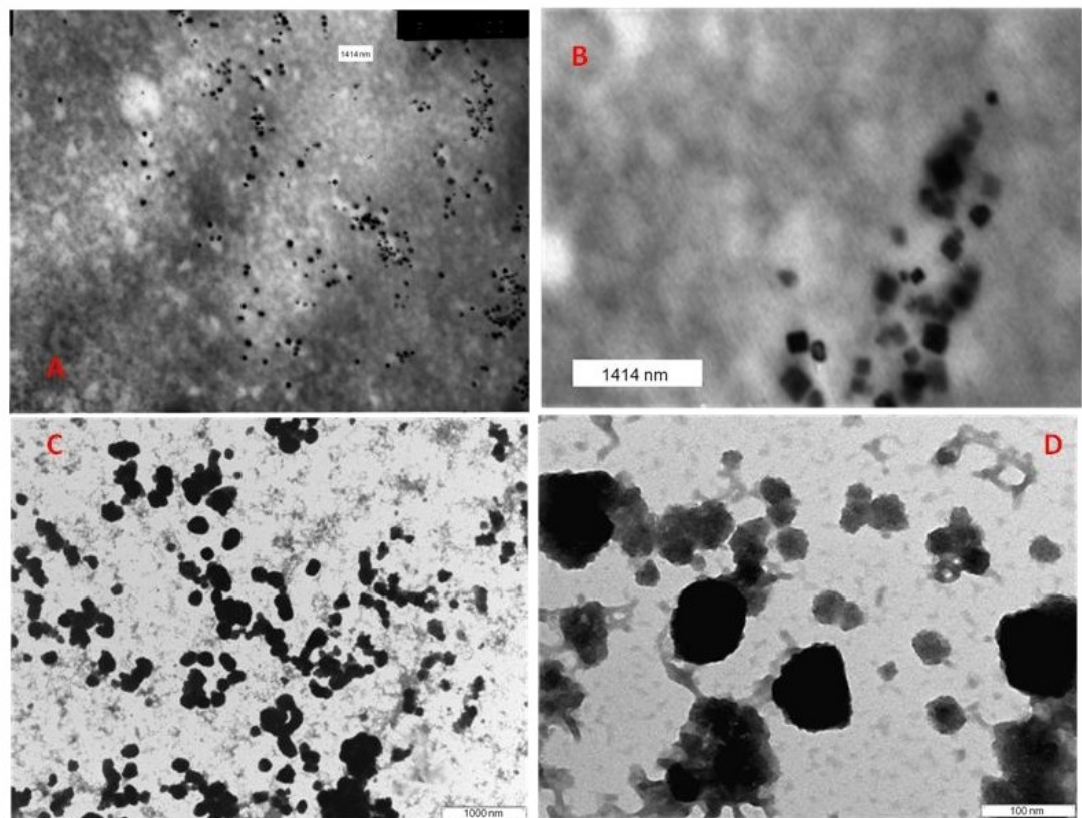


Figura 4.92. Morfologia e dimensionamento al TEM delle NC Ibu AP. A) NC Ibu con forma sferica e quadrata; B) NC Ibu con forma quadrata; C-D) NE Ibu con forma sferica; E) La distribuzione dimensionale delle NC Ibu AP sferiche (n=3); F) La distribuzione dimensionale delle NCs Ibu AP quadrate (n=104); G) La distribuzione dimensionale delle NEs Ibu AP (n=374); H) Andamento dimensionale delle NCs e NEs Ibu insieme.

Siamo rimasti molto sorpresi di trovare del particolato che può far pensare alla presenza di sali, in quanto non ne sono presenti nella formulazione. È altresì curioso osservare che queste strutture sono state trovate solo nelle NC. Si è deciso pertanto di misurarle comunque.

L'analisi dimensionale ha mostrato che le NC Ibu sferiche ($n = 39/\text{foto} = 3$) avevano una dimensione media di $263,9 \pm 70,9$ nm con una frequenza maggiore nel range compreso tra 200 e 250 nm. (Fig. 4.92 E). Per contro, le NC Ibu quadrate ($n = 104/\text{foto} = 3$) avevano una dimensione media pari a $172,2 \pm 45,9$ nm (diagonale), con una maggiore frequenza nel range che va da 100 a 250 nm (Fig. 4.92 F).

L'osservazione al TEM delle **NE Ibu** ha messo in evidenza la presenza di articolato elettrondenso, la cui forma induce a ritenere che prima della disidratazione doveva essere sicuramente sferica (Fig. 4.92 C-D). Inoltre, l'analisi dimensionale ($n = 374/\text{foto} = 10$) ha indicato che le NE Ibu hanno una dimensione media di $189,3 \pm 58,6$ nm, con una maggiore frequenza nel range che va da 100 a 300 nm (Fig. 4.92 G). Si sottolinea che il diametro delle NE non è stato misurato considerando la sfera che meglio racchiudeva la particella presa in esame.

Mettendo insieme l'andamento dimensionale delle NC sferiche con quello delle NE (Fig. 4.92 H), si nota che solo alcune di queste ultime hanno dimensioni molto maggiori delle NC. Ciò non sorprende. È stato già commentato che le NC hanno dimensioni maggiori delle NE a causa della capsula di rivestimento di chitosano. Questa dovrebbe anche conferire una certa resistenza. Pertanto è plausibile che durante la disidratazione le NE si espandano sul retino. A conferma di ciò vedasi anche il sottofondo sotto le NE (Fig. 4.92 C-D).

4.3.2. NC e NE Ibu – dimensioni a confronto

I dati ottenuti dalla analisi dimensionale al TEM delle NC e NE Ibu sono stati confrontati con quelli ottenuti al DLS (Z-Ave) e sono riportati rispettivamente in Figura 4.93 A e 4.93 B.

Dal confronto è evidente che le deviazioni standard nel dimensionamento al TEM sono molto maggiori di quelle al DLS, e pertanto dal punto di vista statistico non ci sarebbero differenze. Tuttavia, considerando che al DLS le dimensioni delle NC Ibu AP e delle NE Ibu AP, a 25°C, sono rispettivamente di ca. 227,5 nm e 142,4 nm, si nota

come questi valori rientrano in quelli di maggiore frequenza riscontrati al TEM. Si nota, comunque un incremento di ca il 16 % per le NC e di ca. e del 33 % per le NE.

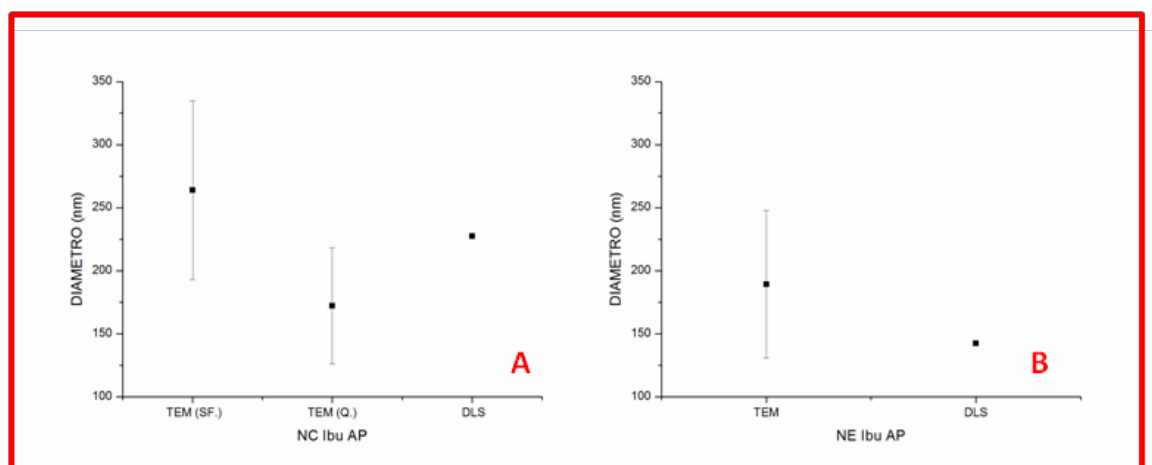


Figura 4.93. Confronto tra le dimensioni ottenute al TEM e al DLS, delle NC e NE Ibu. A) Confronto tra le dimensioni delle NC Ibu sferiche e quadrate ottenute al TEM, e quelle al DLS; B) Confronto tra le dimensioni delle NE Ibu ottenute al TEM e quelle avute dal DLS.

4.3.3. NC e NE Ibu Na

Le NC Ibu Na (65,8 $\mu\text{g/mL}$) e le NE Ibu Na (96,2 $\mu\text{g/mL}$) sono state analizzate in seguito alla loro centrifugazione (APC), utilizzando il TEM 2.

L'osservazione al TEM delle **NC Ibu Na** ha messo in evidenza che nel retino si poteva osservare particolato solo di forma rotondeggiante (Fig. 4.94 A), elettrondense al fascio elettronico.

L'analisi dimensionale ha mostrato che le NC Ibu Na ($n = 104/\text{foto} = 6$) avevano una dimensione media di $225,4 \pm 90,3$ nm, con una frequenza maggiore nel range compreso tra 150 e 300 nm (Fig. 4.94 D).

L'osservazione al TEM delle **NE Ibu Na** ha messo in evidenza la presenza di particolato di forma rotondeggiante (Fig. 4.94 B) e di forma rettangolare (Fig. 4.94 C). Sia le strutture sferiche che quelle rettangolari appaiono elettrondense al fascio elettronico, e queste ultime mostrano una forma geometrica molto regolare. Siamo rimasti molto sorpresi di trovare del particolato che può far pensare alla presenza di sali, in quanto non ne sono presenti nella formulazione. È altresì curioso osservare che queste strutture sono state trovate solo nelle NC.

L'analisi dimensionale (n = 158/foto = 12) ha indicato che le NE Ibu Na hanno una dimensione media di $219,5 \pm 108,8$ nm, con una maggiore frequenza nel range che va da 100 a 250 nm (Fig. 4.94 E).

Mettendo insieme l'andamento dimensionale delle NC sferiche con quello delle NE (Fig. 4.94 F), si nota che alcune di quest'ultime hanno dimensioni maggiori delle NC.

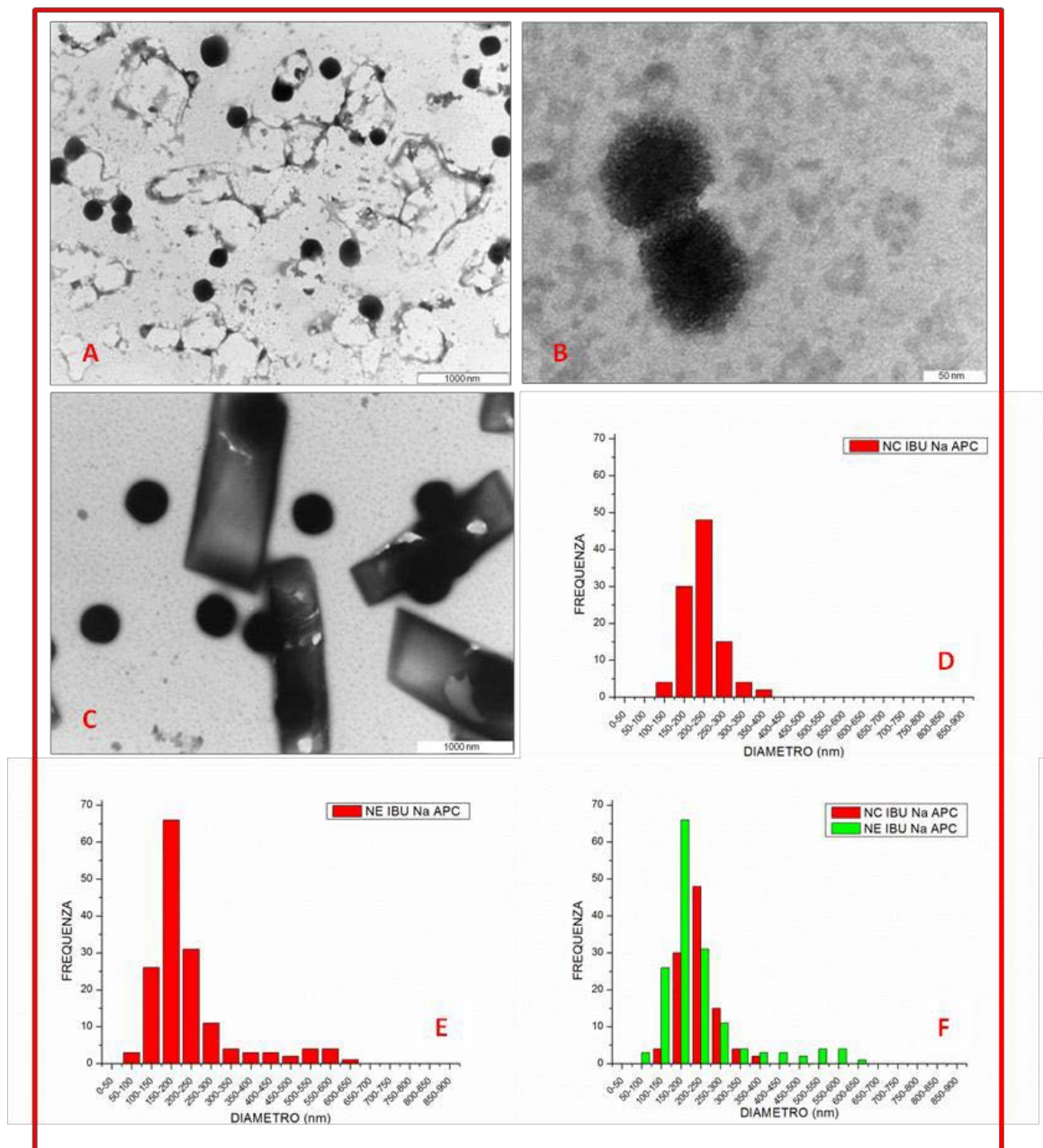


Figura 4.94. Morfologia e dimensionamento al TEM delle NC Ibu Na APC. A) NC Ibu Na con forma sferica; B) NE Ibu Na con forma sferica; C) NE Ibu Na con forma rettangolare; D) La distribuzione dimensionale delle NC Ibu Na APC (n=104); E) La distribuzione dimensionale delle NE Ibu Na APC (n=158); F) Andamento dimensionale delle NC e NE Ibu Na insieme.

È stato già commentato che le NC hanno dimensioni maggiori delle NE a causa della capsula di rivestimento di chitosano. Questa dovrebbe anche conferire una certa resistenza. Pertanto è plausibile che durante la disidratazione le NE si espandano sul retino.

4.3.4. NC e NE Ibu Na – dimensioni a confronto

I dati ottenuti dalla analisi dimensionale al TEM delle NC e NE Ibu Na sono stati confrontati con quelli ottenuti al DLS (Z-Ave) e sono riportati rispettivamente in Figura 4.95 A e 4.95 B.

Dal confronto è evidente che le deviazioni standard nel dimensionamento al TEM sono molto maggiori di quelle al DLS, e pertanto dal punto di vista statistico non ci sarebbero differenze. Tuttavia, considerando che al DLS le dimensioni delle NC Ibu Na APC e delle NE Ibu Na APC, a 25°C, sono rispettivamente di ca 281,4 nm e 144,2 nm, si nota come questi valori rientrino in quelli di maggiore frequenza riscontrati al TEM. Si nota, comunque una diminuzione di ca 20 % per le NC e un incremento di ca il 52% per le NE.

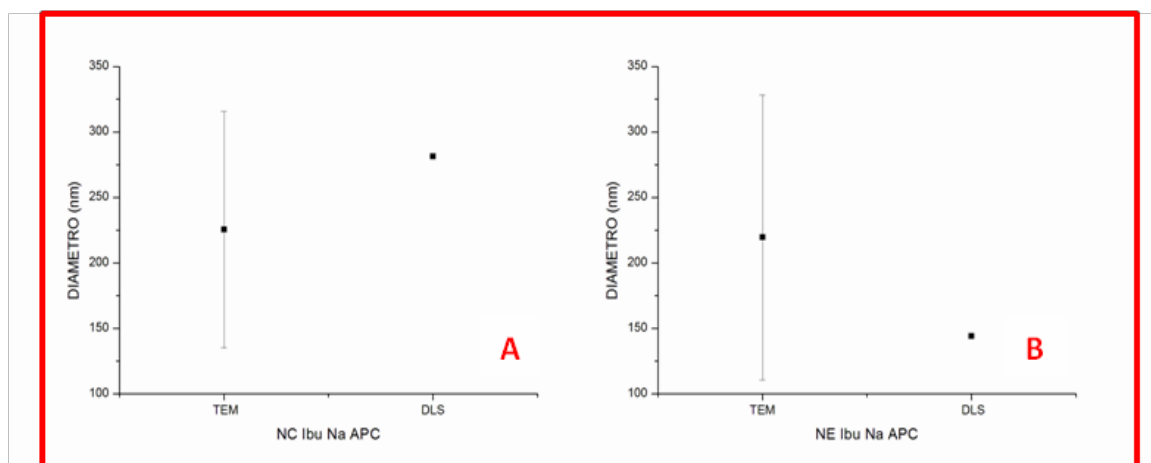


Figura 4.95. Confronto tra le dimensioni ottenute al TEM e al DLS, delle NC e NE Ibu Na. **A)** Confronto tra le dimensioni delle NC Ibu Na ottenute al TEM, e quelle al DLS; **B)** Confronto tra le dimensioni delle NE Ibu Na ottenute al TEM e quelle avute dal DLS.

4.3.5. NC e NE RA

Le NC RA (64,3 $\mu\text{g/mL}$) e le NE RA (63,4 $\mu\text{g/mL}$) sono state osservate al TEM 1, sia dopo la loro preparazione (AP) che dopo la loro centrifugazione (APC).

L'osservazione al TEM delle **NC RA AP** ha messo in evidenza che nel retino si poteva osservare particolato solo con forma sferica (Fig. 4.96 A-B). Dall'osservazione al TEM delle **NC RA APC**, è emersa la presenza di particolato con forma sferica e altre con forma cubica o poliedrica (Fig. 4.96 C-D) sia le particelle sferiche che quelle cubiche apparivano elettrondense al fascio elettronico.

L'analisi dimensionale ha mostrato che le NC RA AP ($n = 147/\text{foto} = 14$) avevano una dimensione media di $66,3 \pm 18,2$ nm, con una frequenza maggiore nel range compreso tra 50 e 100 nm (Fig. 4.97 A). L'analisi delle dimensioni delle NC RA APC ($n = 92/\text{foto} = 14$) ha messo in evidenza una dimensione media di $271,2 \pm 155,3$ nm, con una maggiore frequenza compresa tra 100 e 300 nm.

L'osservazione al TEM delle **NE RA AP** ha messo in evidenza la presenza di particolato con forma sferica (Fig. 4.96 E), mentre le **NE RA APC** non mostravano tutte una forma perfettamente rotondeggiante, come mostrato nelle foto F e G della Figura 4.96.

Nella foto H della Figura 4.96 è mostrato un dettaglio ingrandito di una NE RA APC, che fa vedere la particolare morfologia di questa particella. Da questa foto sembrerebbe che la NP stia perdendo parte del suo materiale, probabilmente in seguito alla fase di essiccazione.

L'analisi dimensionale delle NE RA AP ($n=151/\text{foto}=8$) ha messo in evidenza una dimensione media pari a $51,11 \pm 11,3$ nm, con una frequenza maggiore nel range compreso tra 0 e 100 nm (Fig. 4.97 B). Inoltre, l'analisi dimensionale delle NE RA APC ($n = 98/\text{foto} = 13$) ha messo in evidenza una dimensione media di $222,9 \pm 47,2$ nm, con una frequenza maggiore nel range tra 150 e 300 nm (Fig. 4.97 E).

Mettendo insieme l'andamento dimensionale delle NC AP con quello delle NE AP (Fig. 4.97 C), si vede che le NC hanno dimensioni maggiori delle NE. Questo è normale, in quanto le NC hanno la capsula di rivestimento. Lo stesso andamento si può vedere mettendo insieme gli istogrammi delle NC e delle NE APC (Fig. 4.97 F).

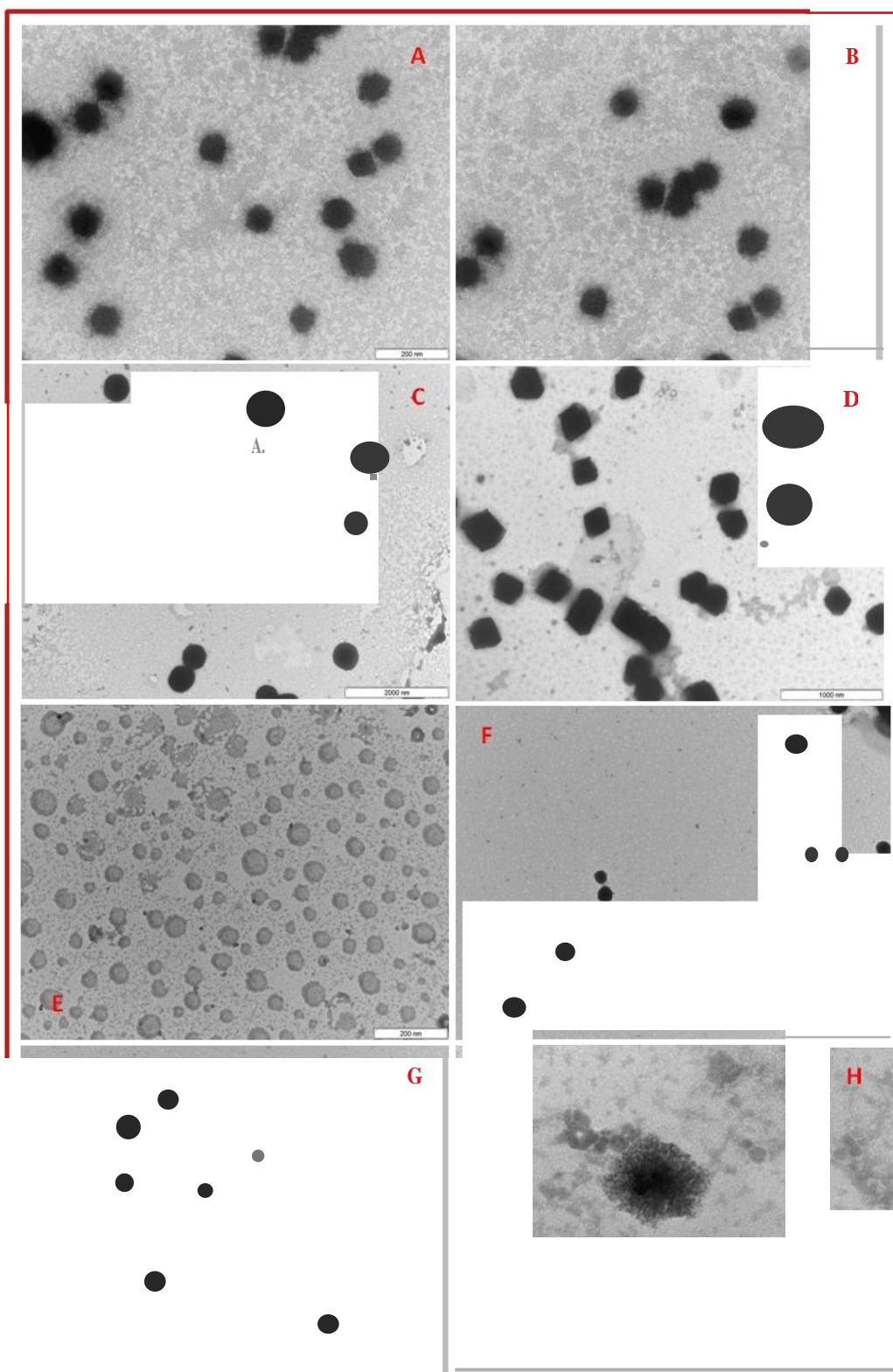


Figura 4.96. Morfologia al TEM delle NC e NERA APe APC. A-B) NC RA AP con fonna sferica; C) NC RA APC con fonna sferica; D) NC RA APC con fonna cubica o poliedrica; E) NE RA AP con forma sferica; F-G) NE RA APC con forma rotondeggiante; H) Un dettaglio ingrandito delle NERA APC.

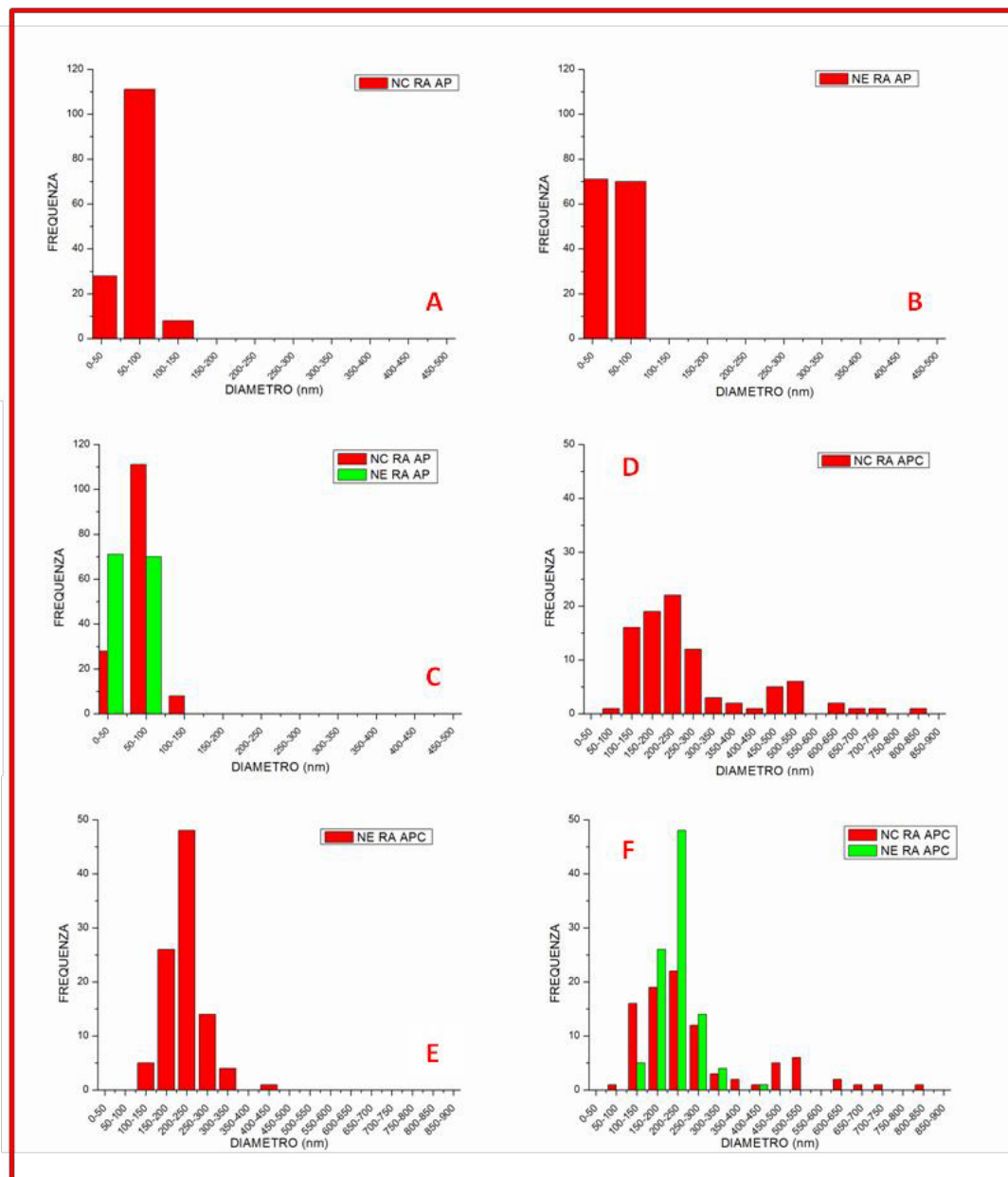


Figura 4.97. Distribuzione dimensionale delle NC e NE RA AP e APC, con i dati ottenuti dalle misurazioni delle foto fatte al TEM. A) NC RA AP; B) NE RA AP; C) NC e NE RA AP insieme; D) NC RA APC; E) NE RA APC; F) NC e NE RA APC insieme.

4.3.6. NC e NE RA – dimensioni a confronto

I dati ottenuti dalla analisi dimensionale al TEM delle NC e NE RA AP e APC sono stati confrontati con quelli ottenuti al DLS (Z-Ave) e sono riportati rispettivamente in Figura 4.98 A-B e 4.98 C-D.

Dal confronto è evidente che le deviazioni standard delle NC e NE AP sono contenute, sia nel dimensionamento al TEM che al DLS. Dal punto di vista statistico quindi le dimensioni sono molto differenti.

Confrontando il dimensionamento al TEM delle NC e NE APC, si vede che sono molto maggiori di quelle al DLS, pertanto dal punto di vista statistico non ci sarebbero differenze.

Tuttavia, considerando che al DLS le dimensioni delle NC RA AP e delle NE RA AP, a 25°C, sono rispettivamente di ca 184,7 nm e 147,6 nm, si nota come i valori delle NC rientrino in quelli di maggiore frequenza riscontrati al TEM, mentre quelli delle NE sono maggiori di quelli rilevati al TEM. Le dimensioni al DLS delle NC RA APC e delle NE RA APC a 25°C, rispettivamente sono 261,3 e 146,8 , e quindi rientrano all'interno dei valori di maggiore frequenza riscontrati al TEM.

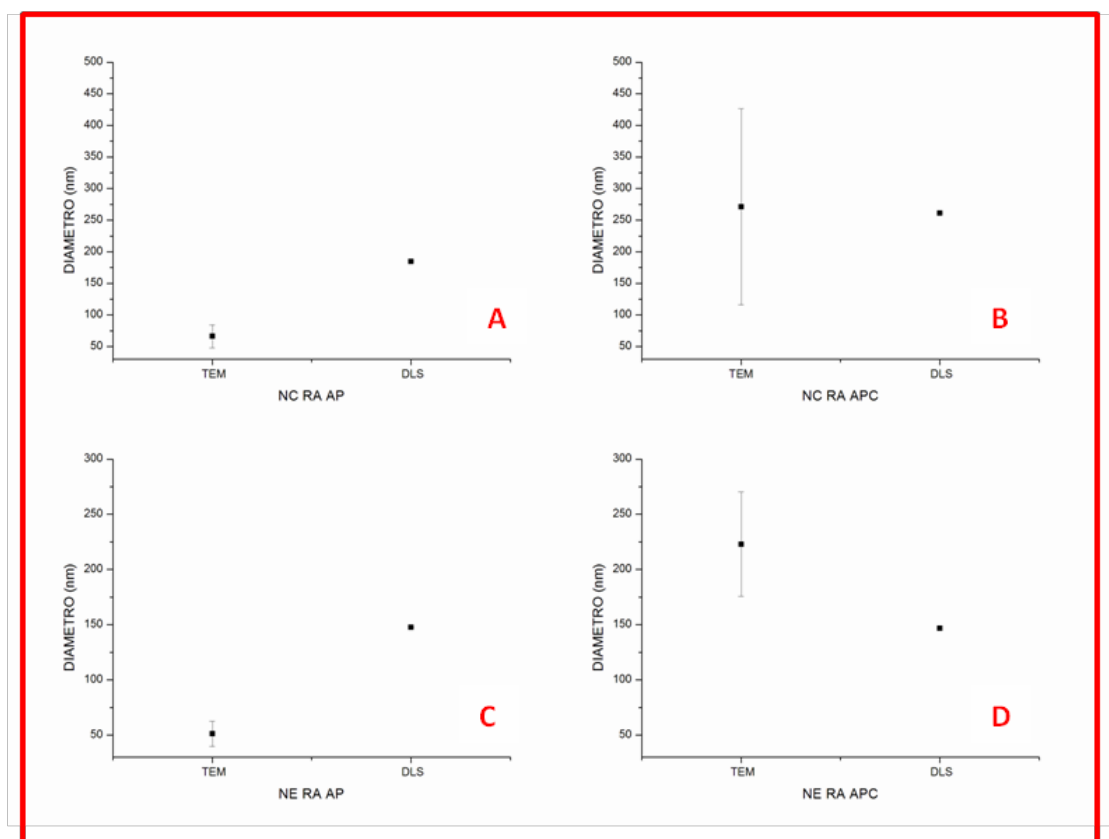


Figura 4.98. Confronto tra le dimensioni ottenute al TEM e al DLS, delle NC e NE RA AP e APC. A) Confronto tra le dimensioni delle NC RA AP ottenute al TEM, e quelle al DLS; B) Confronto tra le dimensioni delle NC RA APC ottenute al TEM e quelle avute dal DLS; C) Confronto tra le dimensioni delle NE RA AP ottenute al TEM e al DLS; D) Confronto tra le dimensioni delle NE RA APC ottenute al TEM e quelle avute dal DLS.

Si nota, comunque una diminuzione di ca 64 e 65 % rispettivamente per le NC e le NE AP. Prendendo in considerazione le NC e le NE APC, si può vedere un incremento rispettivamente di ca il 4 e 52%.

4.3.7. NC e NE AZL 38

Le NC AZL 38 AP (12,6 $\mu\text{g/mL}$) e le NE AZL 38 APC (11,2 $\mu\text{g/mL}$) sono state studiate con il TEM 1.

L'osservazione al TEM delle **NC AZL 38 AP** ha messo in evidenza che nel retino si poteva osservare particolato non sempre con una forma perfettamente sferica, e in alcuni casi aveva una colorazione chiara e altre una colorazione molto scura (Fig. 4.99 A).

Dalla foto A in Figura 4.99 si può notare che le NC AZL 38 AP chiare hanno una forma più sferica mentre, le NC AZL 38 scure tendono ad assumere una forma più squadrata e irregolare. L'analisi dimensionale ha mostrato che le NC AZL 38 AP chiare ($n = 22/\text{foto} = 4$) avevano una dimensione media pari a $575,7 \pm 112,3$ nm, e la frequenza maggiore è compresa nel range tra 350 e 700 nm (Fig. 4.100 A). Le NC AZL 38 AP ($n = 31/\text{foto} = 4$) scure avevano una dimensione media di $531,9 \pm 200,2$ nm con una maggior frequenza nel range tra 350 e 550 nm (Fig. 4.100 B).

L'osservazione al TEM delle **NE AZL 38 APC** ha messo in evidenza che non avevano tutte una forma sferica, e anche quelle sferiche non avevano i contorni ben definiti (Fig. 4.99 B). Inoltre, alcune NE AZL 38 APC sembra stiano perdendo parte del loro materiale (Fig. 4.99 C), mentre altre ancora avevano una forma perfettamente esagonale (Fig. 4.99 D-E).

L'analisi dimensionale ha mostrato che le NE AZL 38 APC ($n = 96/\text{foto} = 12$) avevano una dimensione media di $432,7 \pm 247,8$ nm, con una maggiore frequenza nel range compreso tra 150 e 550 nm (Fig. 4.100 C).

Mettendo insieme l'andamento dimensionale delle NC AZL 38 AP chiare e scure e le NE AZL 38 APC, sembrerebbe che le NC AP hanno dimensioni maggiori delle NE APC, e questo grazie alla presenza del chitosano che porta alla formazione della capsula di rivestimento (Fig. 4.99 D).

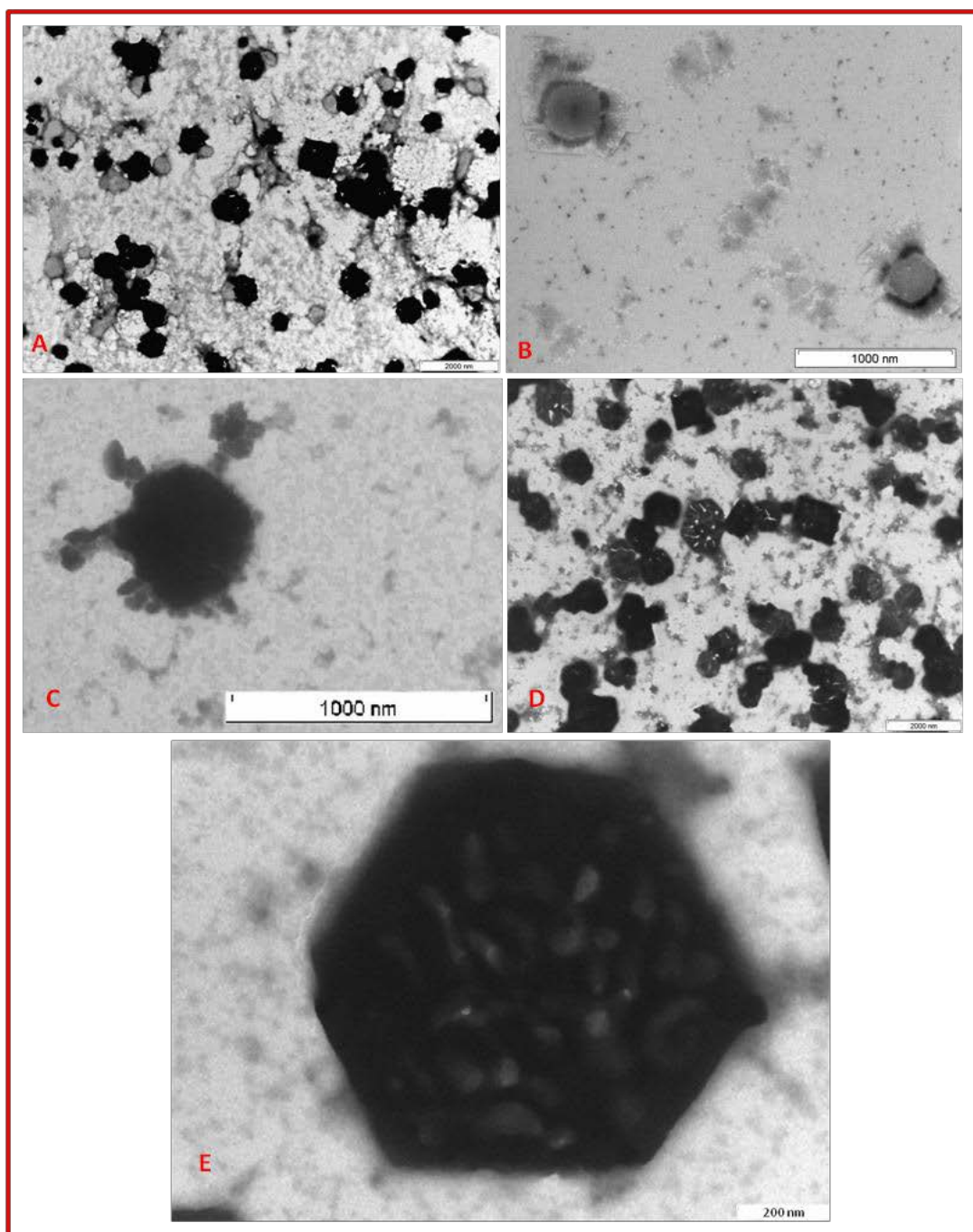


Figura 4.99. Morfologia al TEM delle NC AZL 38 AP e delle NE AZL 38 APC. A) NC AZL 38 AP chiare e scure; B) NE AZL 38 APC con forma non perfettamente sferica; C) Ingrandimento di una NE AZL 38 APC, che sembra stia perdendo parte del materiale; D) NE AZL 38 APC con forma esagonale; E) Ingrandimento di una NE AZL 38 APC con forma perfettamente esagonale.

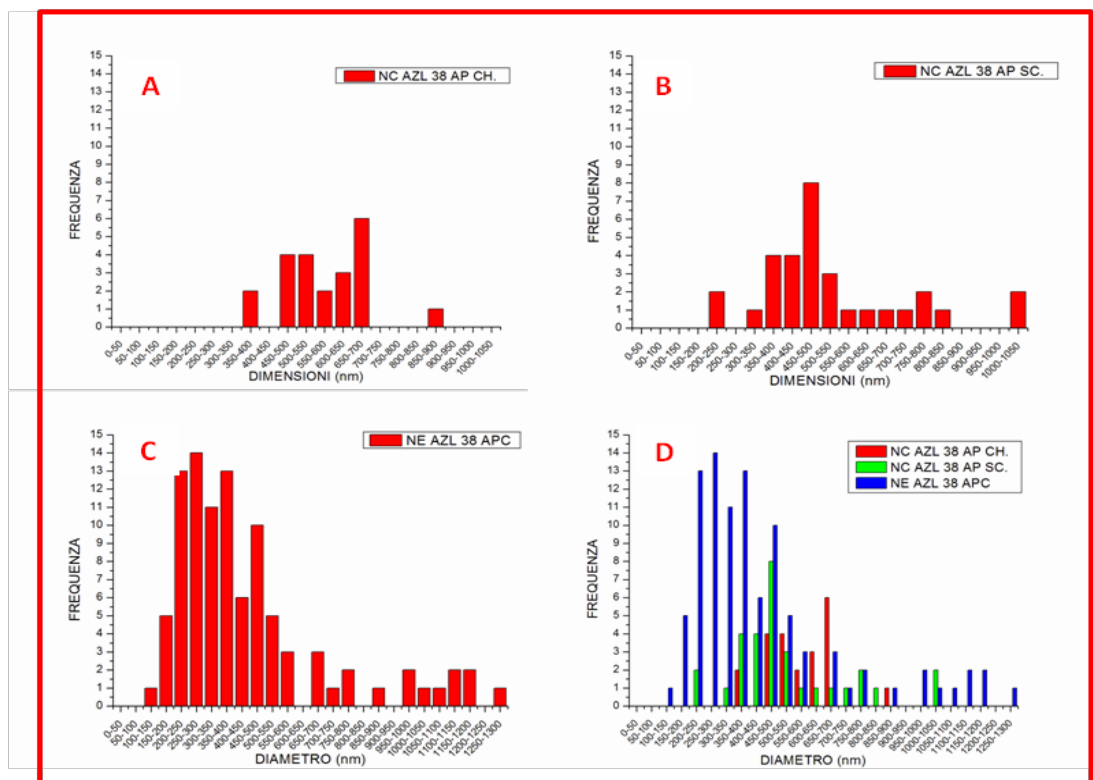


Figura 4.100. Distribuzione dimensionale delle NC e NE AZL 38 AP e APC, con i dati ottenuti dalle misurazioni delle foto fatte al TEM. A) NC AZL 38 AP chiare; B) NC AZL 38 AP scure; C) NE AZL 38 APC; D) NC AZL 38 AP chiare e scure insieme alle NE AZL 38 APC.

Osservando però il grafico D in Figura 4.100 si può notare la presenza di alcune NE AZL 38 APC con dimensioni maggiori di quelle delle NC AZL 38 AP. Questo fenomeno potrebbe essere dovuto alla fase di essiccazione delle NP sul retino, per poi essere osservate al TEM.

4.3.8. NC e NE AZL 38 – dimensioni a confronto

I dati ottenuti dalla analisi dimensionale al TEM delle NC AP e NE AZL 38 AP e APC sono stati confrontati con quelli ottenuti al DLS (Z-Ave) e sono riportati rispettivamente nella Figura 4.101.

Dal confronto è evidente che per quanto riguarda le NC AZL 38 AP, le deviazioni standard del dimensionamento al TEM sono molto maggiori di quelle ottenute al DLS.

Dal punto di vista statistico quindi le dimensioni sono molto differenti.

Il confronto tra le dimensioni delle NE AZL 38 APC ottenute dal dimensionamento al TEM e al DLS, è evidente che le deviazioni standard al TEM sono molto maggiori di

quelle ad DLS. Nonostante questo, le dimensioni sono al di sotto della deviazione standard al TEM (Fig. 4.101 C).

Tuttavia, considerando che al DLS le dimensioni delle NC AZL 38 AP e delle NE AZL 38 AP, a 25°C, sono rispettivamente di ca 186,9 nm e 141,5 nm, si nota come i valori non rientrano in quelli di maggiore frequenza riscontrati al TEM. Si nota, comunque un incremento di ca 208 % per le NC e di ca 206% per le NE.

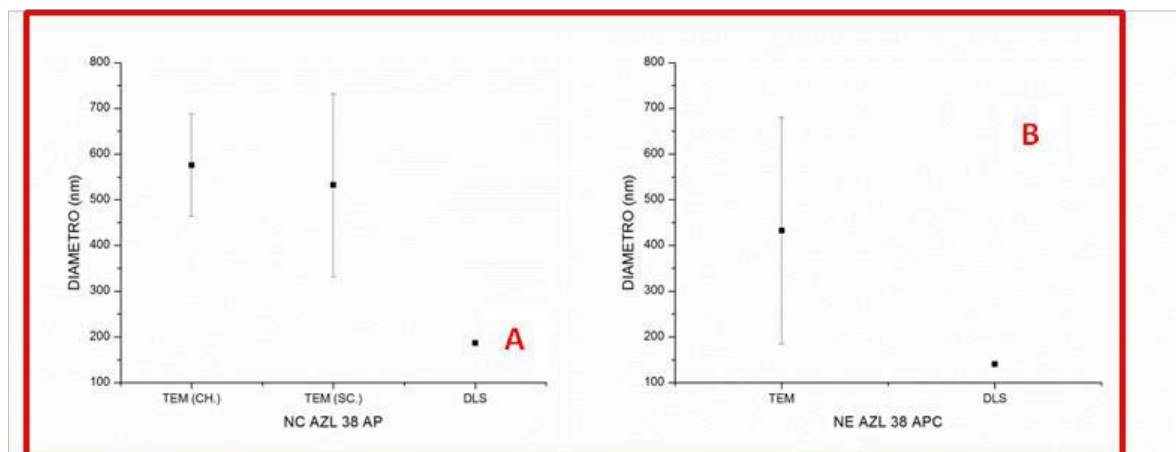


Figura 4.101. Confronto tra le dimensioni ottenute al TEM e al DLS, delle NC e NE AZL 38 AP e APC. A) Confronto tra le dimensioni delle NC AZL 38 AP chiare e scure ottenute al TEM e quelle avute dal DLS; B) Confronto tra le dimensioni delle NE AZL 38 APC ottenute al TEM e al DLS.

4.3.9. NC e NE AZL 6

Le NC AZL 6 AP (10,0 µg/mL) e le NE AZL 6 AP (12,0 µg/mL) sono state osservate con il TEM 1.

L'osservazione al TEM delle **NC AZL 6 AP** ha messo in evidenza la presenza di particolato con forma sferica (Fig. 4.102 A-B). L'analisi dimensionale ha mostrato che le NC AZL 6 AP (n = 122/foto = 12) avevano una dimensione media di $53,6 \pm 17,7$ nm, con una maggiore frequenza nel range compreso tra 0 e 100 nm (Fig. 4.103 A).

L'osservazione al TEM delle **NE AZL 6** ha messo in evidenza la presenza di particolati di diversa forma, alcune quadrate e altre esagonali (Fig. 4.102 C-D). L'analisi dimensionale delle NE sferiche (n = 32/foto = 7) ha mostrato una dimensione media di $130,2 \pm 18,9$ nm, con una maggiore frequenza nel range tra 100 e 150 nm (Fig. 4.103 B), mentre le NE AZL 6 quadrate (n = 9/foto = 3) mostravano una dimensione

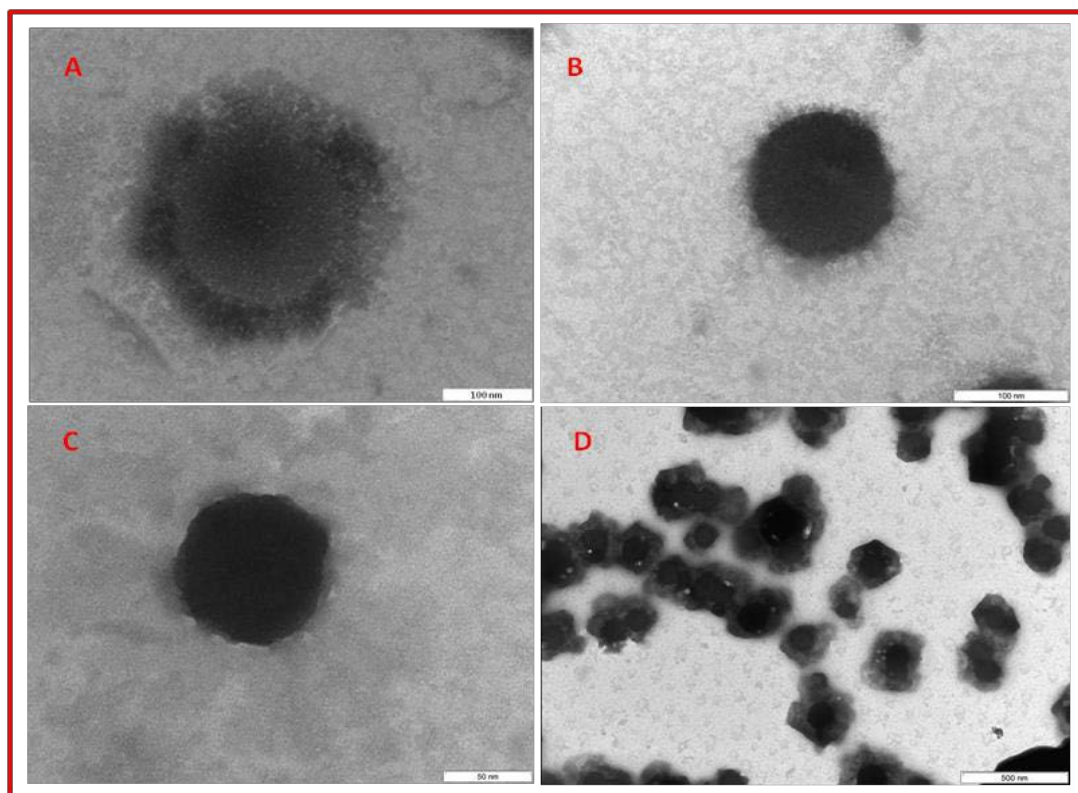


Figura 4.102. Morfologia al TEM delle NC e NE AZL 6 AP. A-B) NC AZL 6 AP con forma sferica; C) NE AZL 6 AP con forma sferica; D) NE AZL 6 AP con forma quadrata o eagonale.

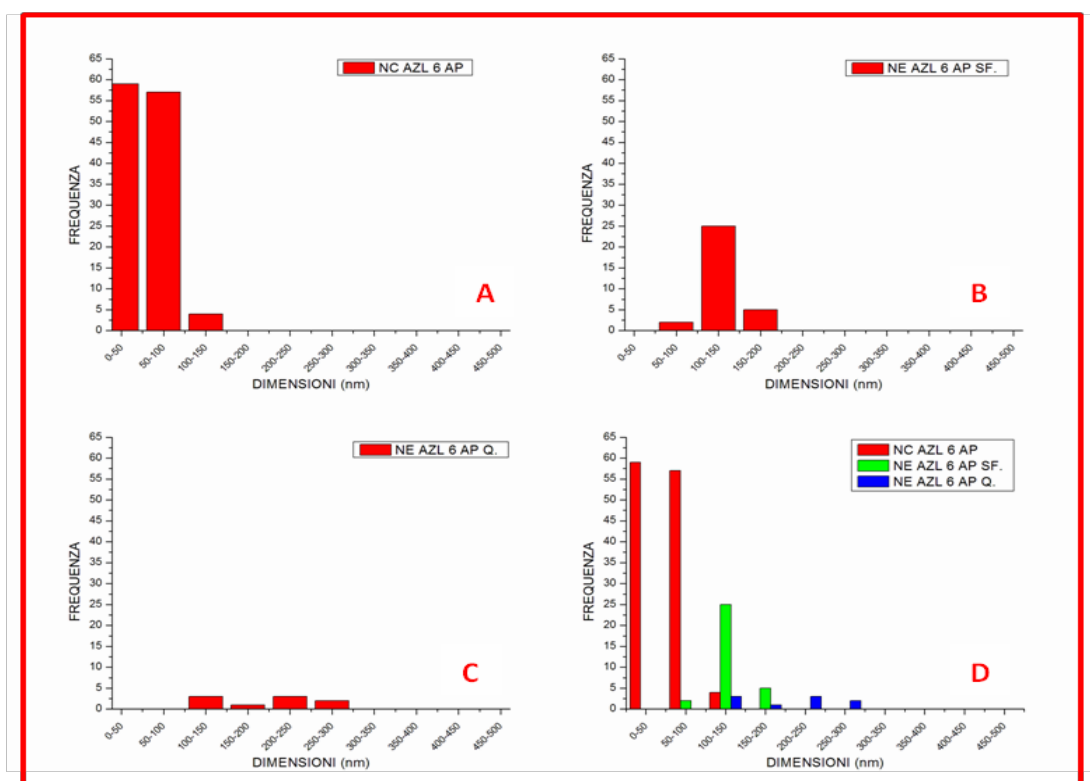


Figura 4.103. Distribuzione dimensionale delle NC e NE AZL 6 AP, con i dati ottenuti dalle misurazioni delle foto fatte al TEM. A) NC AZL 6 AP; B) NE AZL 6 AP sferiche; C) NE AZL 6 AP quadrate; D) NC e NE AZL 6 AP insieme.

media di $199,1 \pm 60,9$ nm, con una maggiore frequenza nel range compreso tra 100 e 300 nm (Fig. 4.103 C).

Mettendo insieme l'andamento dimensionale delle NC e delle NE AZL 6 sferiche e quadrate (Fig. 4.103 D), si vede che alcune NE hanno dimensioni maggiori delle NC.

Come precedentemente detto, la presenza di NE con dimensioni maggiori delle NC può essere che dovuta alla fase di essiccazione del campione sul retino.

4.3.10. NC e NE AZL 6 – dimensioni a confronto

I dati ottenuti dalla analisi dimensionale al TEM delle NC AP e NE AZL 6 AP sferiche e quadrate sono stati confrontati con quelli ottenuti al DLS (Z-Ave) e sono riportati rispettivamente nella Figura 4.104.

Dal confronto è evidente che le dimensioni al TEM delle NC AZL 6 AP sono molto inferiori rispetto a quelle ottenute al DLS (Fig. 4.104 A). Il confronto tra le dimensioni delle NE AZL 6 sferiche ottenute dalla misurazione delle foto al TEM, con le dimensioni ottenute al DLS, ha messo in evidenza che al DLS le dimensioni risultano maggiori (Fig. 4.104 B). Mettendo a confronto le dimensioni delle NE AZL 6 quadrate avute dalla misurazione delle foto fatte al TEM, con quelle ottenute dal DLS, non si osserva una significativa differenza tra le due dimensioni (Fig. 4.104 B).

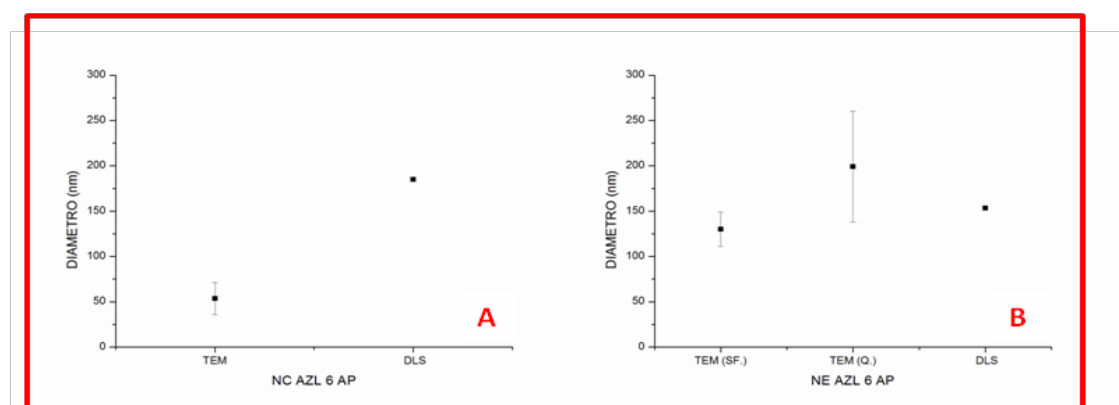


Figura 4.104. Confronto tra le dimensioni ottenute al TEM e al DLS, delle NC e NE AZL 6 AP. A) Confronto tra le dimensioni delle NC AZL 6 AP ottenute al TEM e quelle al DLS; B) Confronto tra le dimensioni delle NE AZL 6AP sferiche e quadrate ottenute al TEM e quelle avute dal DLS.

Tuttavia, considerando che al DLS le dimensioni delle NC AZL 6 AP e delle NE AZL 6 AP, a 25°C, sono rispettivamente di ca 184,9 nm e 153,4 nm, si nota come i valori non

rientrano in quelli di maggiore frequenza riscontrati al TEM. Si nota, comunque una diminuzione di ca 71 e 15 % rispettivamente per le NC e le NE sferiche, e un incremento di ca il 30% per le NE quadrate.

4.4. Caratterizzazione delle NP al Cryo-TEM: dimensioni e morfologia

Tra tutte le NP preparate, solo le NC Ibu Na 2 $\mu\text{g/mL}$, le NC Ibu Na 11,5 $\mu\text{g/mL}$ e le NE Ibu Na 2 $\mu\text{g/mL}$ sono state studiate per forma e dimensione al Cryo-TEM. Queste foto sono state ottenute grazie a una collaborazione con in centro di microscopia dei materiali dell'Università di Friburgo (Germania).

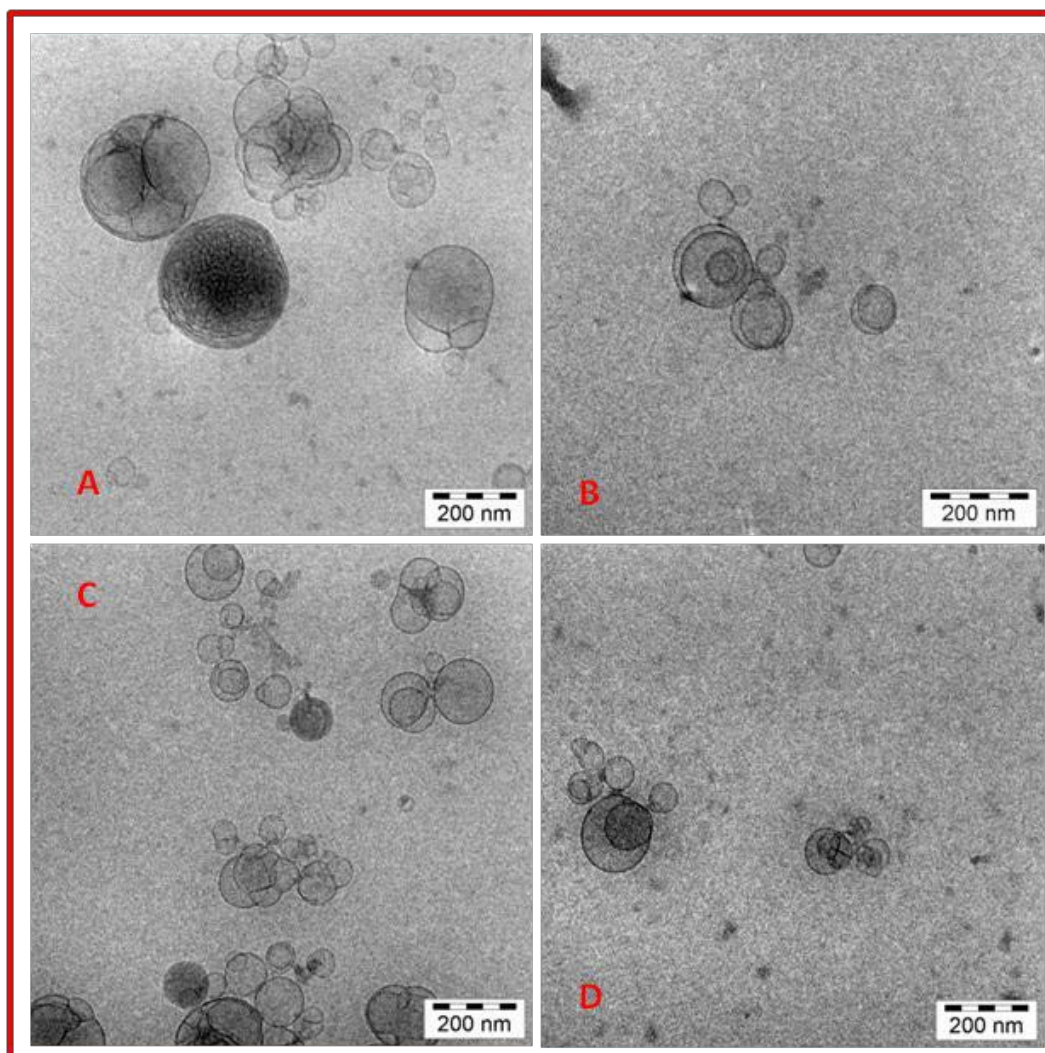


Figura 4.105. La morfologia delle NC Ibu Na (2 $\mu\text{g/mL}$) al Cryo-TEM.

Purtroppo, l'acquisizione delle immagini è stata estremamente lenta e non è stato possibile ottenere tutte le immagini dei differenti campioni spediti. Si ritiene comunque che sia importante mostrare questi risultati, anche se parziali.

La Figura 4.105 mostra un pannello di foto delle NC Ibu Na (2 $\mu\text{g/mL}$) dove si può notare che le NP si mostrano generalmente con un centro chiaro ed un bordo più scuro.

Unica eccezione è rappresentata da quella NP presente nel pannello A che ha un interno maggiormente elettrondenso. Tutte le NP sembrano bolle di sapone e come tali si comportano quando sono vicine. Inoltre si vede chiaramente che co-esistono particelle di dimensioni differenti. Relativamente alla forma, sono tutte sferiche. Queste NP avevano una dimensione media di $131,1 \pm 64,4 \text{ nm}$ ($n = 66/\text{foto} = 8$).

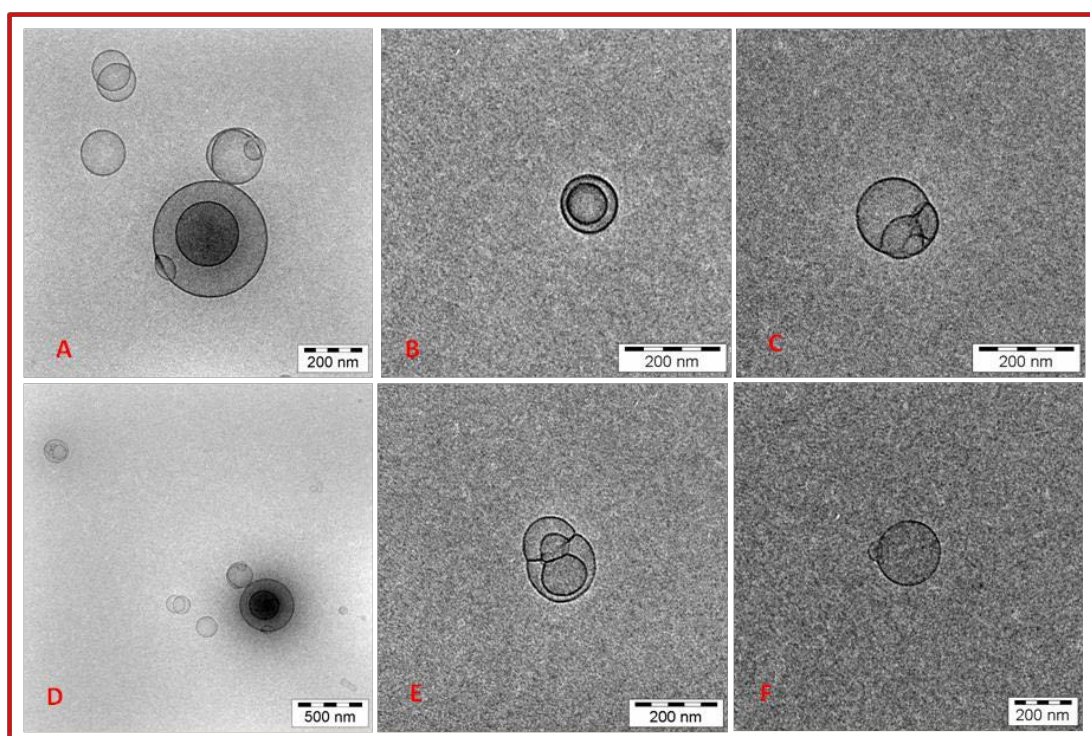


Figura 4.106. La morfologia delle NC Ibu Na (11,5 $\mu\text{g/mL}$) al Cryo-TEM.

La Figura 4.106 mostra un pannello di foto delle NC Ibu Na (11,5 $\mu\text{g/mL}$) dove si vede chiaramente che le particelle hanno tutte una forma sferica, con un centro chiaro ed un bordo netto più scuro. Anche in questo caso le particelle si comportano come delle bolle di sapone quando si trovano vicine. E anche in questo caso sono presenti particelle piccole e grandi (Fig. 4.106 A). È interessante notare che alcune particelle sembrano formate da una doppia capsula concentrica (Fig. 4.106 A, B, E). Il

dimensionamento di queste particelle ha dato un diametro medio di $179,3 \pm 80,8$ nm ($n = 25/\text{foto} = 7$).

La Figura 4.107 mostra un pannello di foto delle NE Ibu Na ($2 \mu\text{g/mL}$) dove si può notare che le NE si mostrano non separate in singole unità ma, facenti parte di una rete eletrondensa al fascio elettronico. Queste fotografie pur non essendo significative per il dimensionamento ($0,51 \pm 0,15 \mu\text{m}$; $n = 21/\text{foto} = 2$) rivelano che quanto visto al TEM (Fig. 4.94) non erano artefatti dovuti all'essicazione. Perché ciò accada, rimane comunque un mistero.

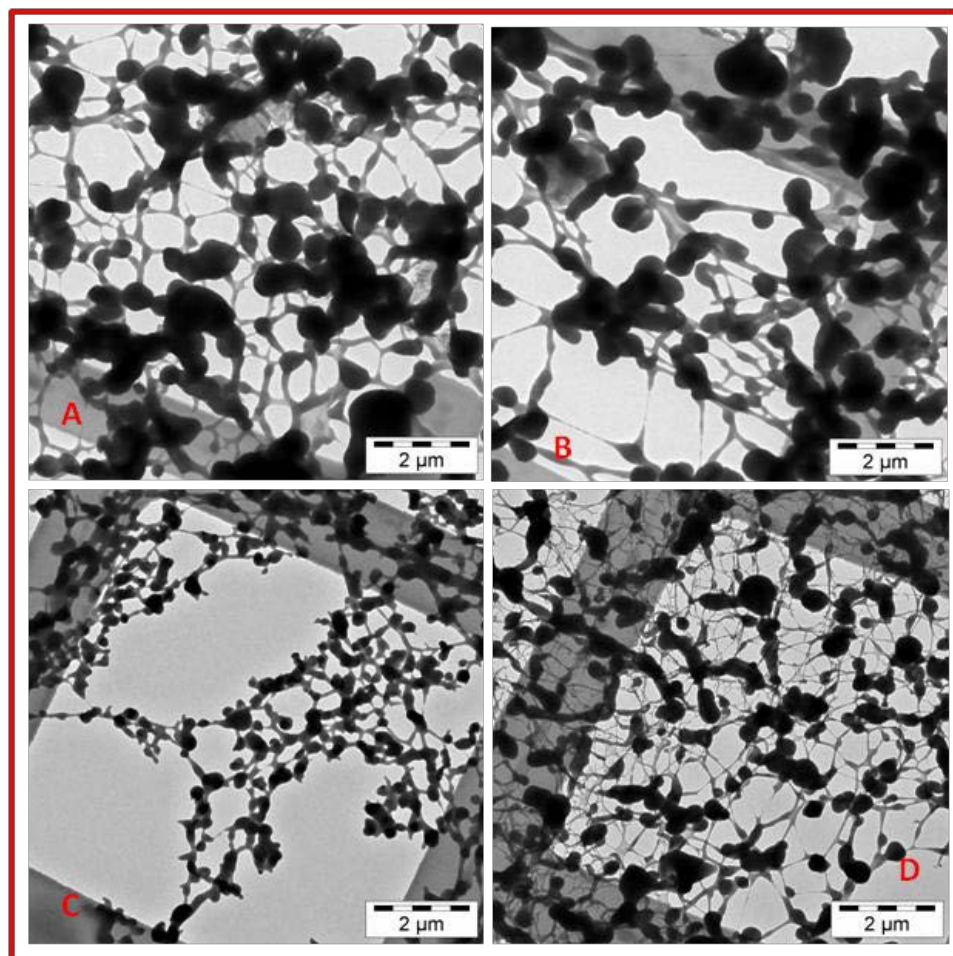


Figura 4.107. La morfologia delle NE Ibu Na ($2 \mu\text{g/mL}$) al Cryo-TEM.

Commenti finali

A causa dei lunghi tempi di analisi delle dimensioni di alcuni campioni, non è stato possibile mettere a confronto le dimensioni ottenute al DLS (Z-Ave), al TEM e al Cryo-TEM di una stessa NP. Tuttavia, nella Figura 4.108 sono mostrate le dimensioni delle NC Ibu Na a diverse concentrazioni, ottenute con le diverse strumentazioni. Le NC Ibu Na 2 e 11,5 $\mu\text{g/mL}$ sono state analizzate solo al Cryo-TEM, quindi non è stato possibile fare un paragone. Comunque, come si può vedere dalla Figura 4.108, nonostante la bassa concentrazione (2 e 11,5 $\mu\text{g/mL}$) delle NC Ibu Na analizzate al cryo-TEM, mostrano dimensioni simili e maggiori di altre NC Ibu Na (22,7 e 72,1 $\mu\text{g/mL}$) a concentrazione maggiore analizzate però al TEM. Le dimensioni ottenute al DLS e al TEM, delle NC Ibu Na 65,8 $\mu\text{g/mL}$ è molto simile. Confrontando le dimensioni ottenute al DLS delle NC Ibu Na 72,1 e 115,7 65,8 $\mu\text{g/mL}$ si può vedere che incrementano di quasi il doppio. Inoltre, si può vedere che nonostante l'aumento della concentrazione, da 65,8 a 72,1 $\mu\text{g/mL}$, le NC Ibu Na mostrano una diminuzione delle dimensioni.

Concludendo, da queste osservazioni sembrerebbe che le dimensioni delle NC non sono sempre influenzate dalla concentrazione del farmaco.

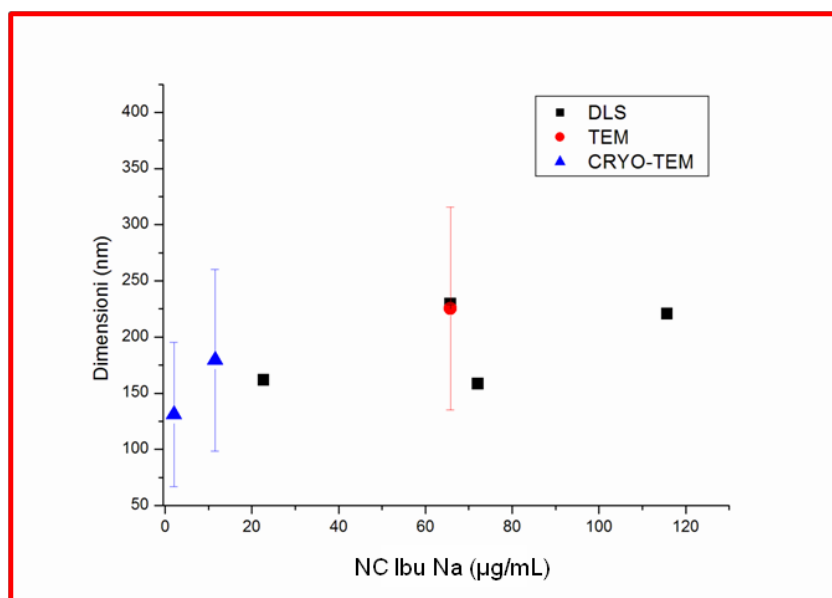


Figura 4.108. Confronto delle dimensioni al DLS, TEM e Cryo-TEM, delle NC Ibu Na a diversa concentrazione.

4.5. Quantificazione spettrofotometrica delle molecole attive

In questa sezione si descrivono gli spettri di assorbimento delle varie molecole attive e l'attendibilità delle rette di calibrazione che si sono ottenute.

4.5.1. Ibu

La Figura 4.109 mostra gli spettri di assorbimento dell'Ibu (soluzione etanolica) a diluizioni crescenti dalla M alla 15 (vedi legenda in Fig. 4.109). Anche se sono presenti diversi picchi dovuti ad interferenza, si può notare che i massimi di assorbimento a 224 e 264 nm decrescono di altezza proporzionalmente all'incremento della diluizione.

L'altezza di questi segnali, normalizzata rispetto allo spettro del bianco è stata usata per la creazione delle curve di calibrazione dell'Ibu, a loro volta ottenute mediante regressione lineare e polinomiale dei dati sperimentali (Figura 4.110).

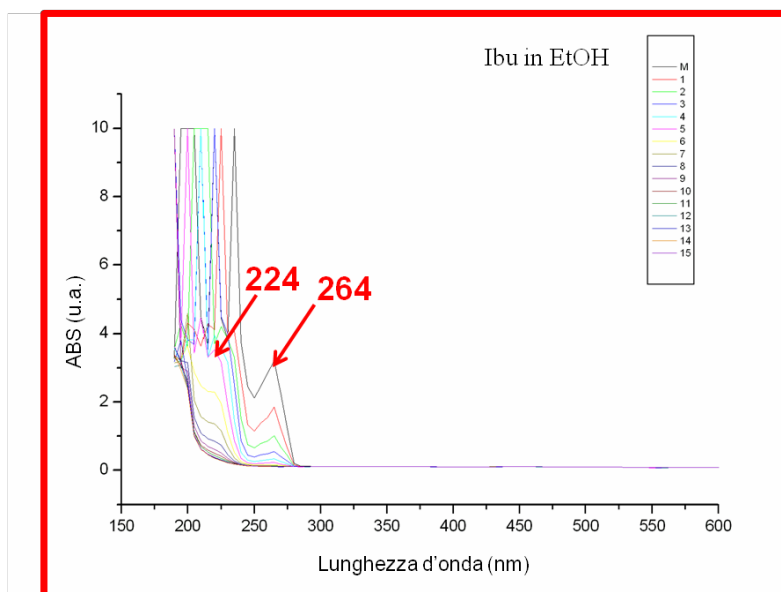


Figura 4.109. Spettri di assorbimento dell'Ibu.

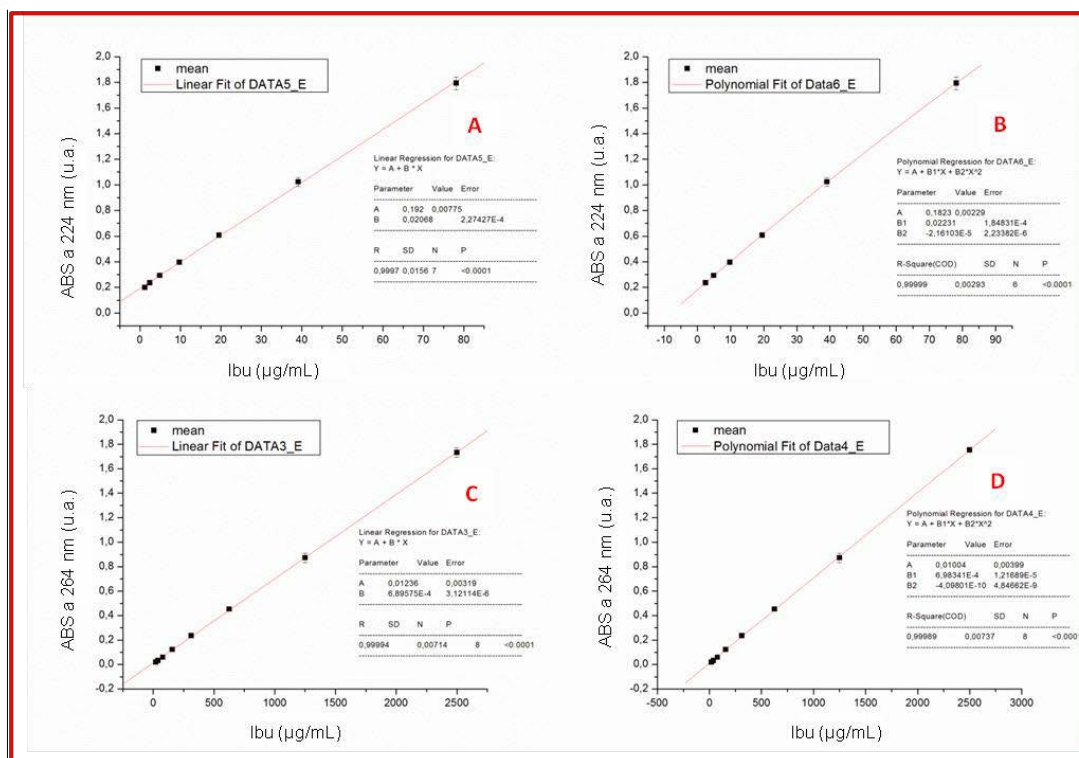


Figura 4.110. Rette di calibrazione dell'Ibu. Rispettivamente regressioni lineari e polinomiali a 224 nm (A-B) e a 264 nm (C-D).

Come mostrato nei grafici in Figura 4.110, tutte le regressioni lineari e polinomiali mostrano una R ed una R-Square pari a 0,999. Inoltre, il limite di risoluzione è di ca 80 e 2.500 $\mu\text{g/mL}$ quando l'Ibu viene quantificato rispettivamente a 224 e 264 nm.

4.5.2. Ibu Na

La Figura 4.111 mostra gli spettri di assorbimento dell'Ibu Na (soluzione etanolica in A e soluzione acquosa in B) a diluizioni crescenti dalla M alla 15 (vedi legenda in Fig. 4.111).

Nonostante la presenza di numerosi picchi dovuti ad interferenza, si può notare che i massimi di assorbimento a 224 e 264 nm decrescono di altezza proporzionalmente all'incremento della diluizione.

L'altezza di questi segnali, normalizzata rispetto allo spettro del bianco è stata usata per la creazione delle curve di calibrazione dell'Ibu Na, a loro volta ottenute mediante regressione lineare e polinomiale dei dati sperimentali (Figura 4.112 e 4.113). Come mostrato nei grafici nelle Figure 4.112 e 4.113, tutte le regressioni lineari e polinomiali mostrano una R ed una R-Square pari a 0,999. Inoltre, il limite di risoluzione è di ca 40

e 160 µg/mL per la soluzione etanolica, e ca 80 e 2.500 µg/mL per la soluzione acquosa, quando l'Ibu Na viene quantificato rispettivamente a 224 e 264 nm.

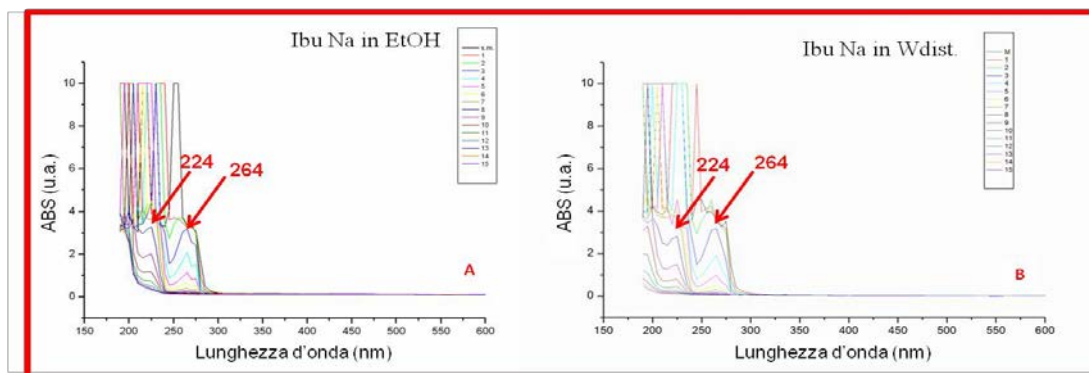


Figura 4.111. Spettri di assorbimento dell'Ibu Na in EtOH (A) e in W dist. (B).

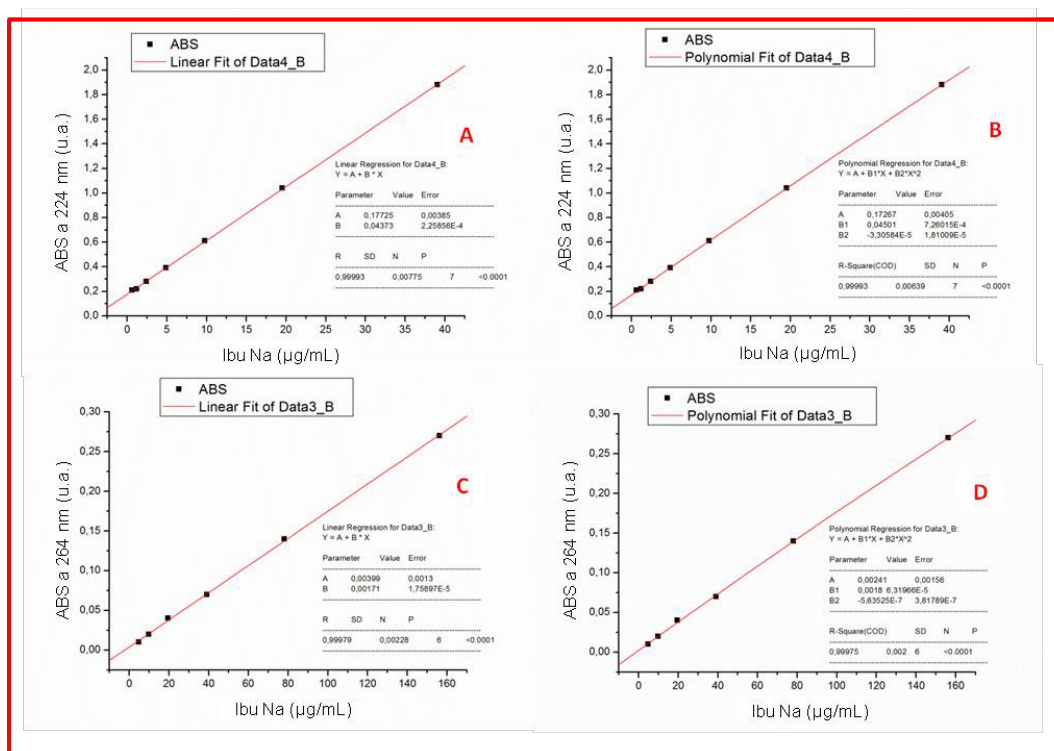


Figura 4.112. Rette di calibrazione dell'Ibu Na in EtOH. Rispettivamente regressioni lineari e polinomiali a 224 nm (A-B) e a 264 nm (C-D).

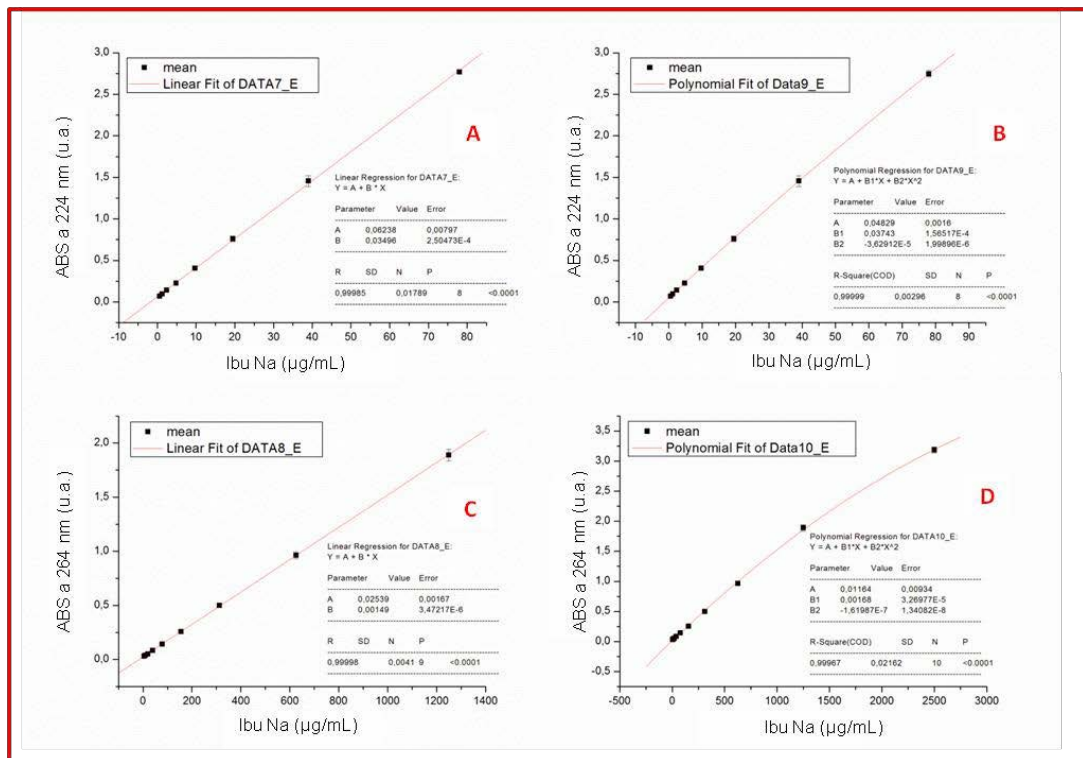


Figura 4.113. Rette di calibrazione dell'Ibu Na in W dist.. Rispettivamente regressioni lineari e polinomiali a 224 nm (A-B) e a 264 nm (C-D).

4.5.3. RA

La Figura 4.114 mostra gli spettri di assorbimento dell'RA (soluzione etanolica) a diluizioni crescenti dalla M alla 20 (vedi legenda in Fig. 4.114). Anche se sono presenti diversi picchi dovuti ad interferenza, i massimi di assorbimento a 350 nm decrescono di altezza proporzionalmente all'incremento della diluizione. L'altezza di questi segnali, normalizzata rispetto allo spettro del bianco è stata usata per la creazione delle curve di calibrazione dell'RA, a loro volta ottenute mediante regressione lineare e polinomiale dei dati sperimentali (Figura 4.114).

Come mostrato nei grafici in Figura 4.115, le regressioni lineari e polinomiali mostrano una R ed una R-Square pari a 0,999. Inoltre, il limite di risoluzione è di ca 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$.

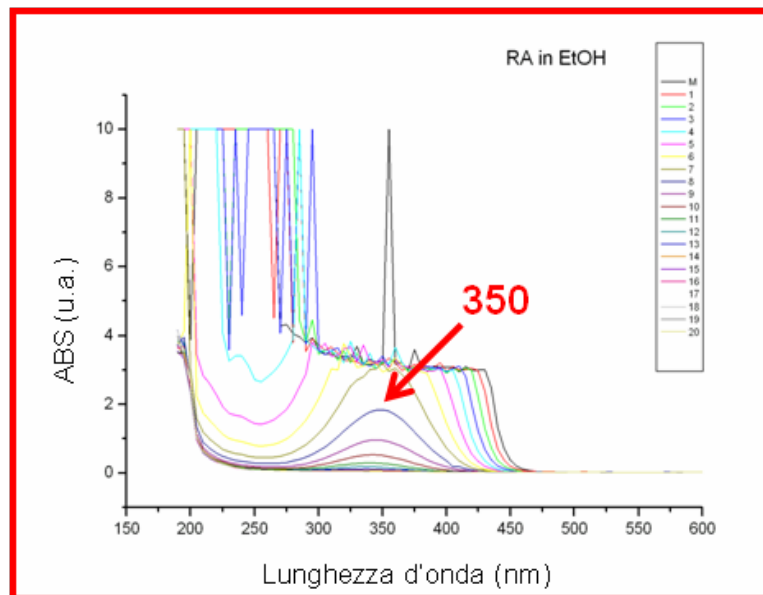


Figura 4.114. Spettri di assorbimento dell'RA.

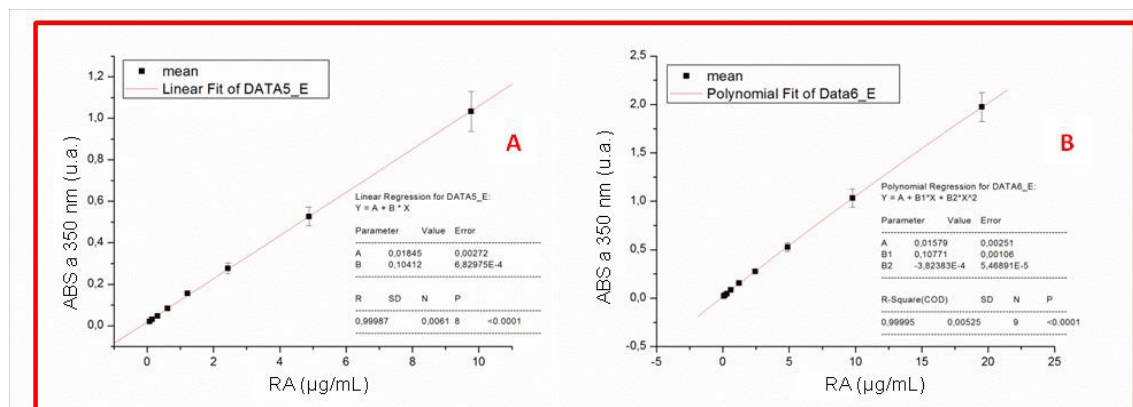


Figura 4.115. Rette di calibrazione dell'RA. Rispettivamente le regressioni lineari e polinomiali, a 350 nm (A e B).

4.5.4. AZL 38

La Figura 4.116 mostra gli spettri di assorbimento dell'AZL 38 (soluzione etanolica) a diluizioni crescenti dalla M alla 20 (vedi legenda in Fig. 4.116). È possibile notare che i massimi di assorbimento a 284 nm decrescono di altezza proporzionalmente all'incremento della diluizione.

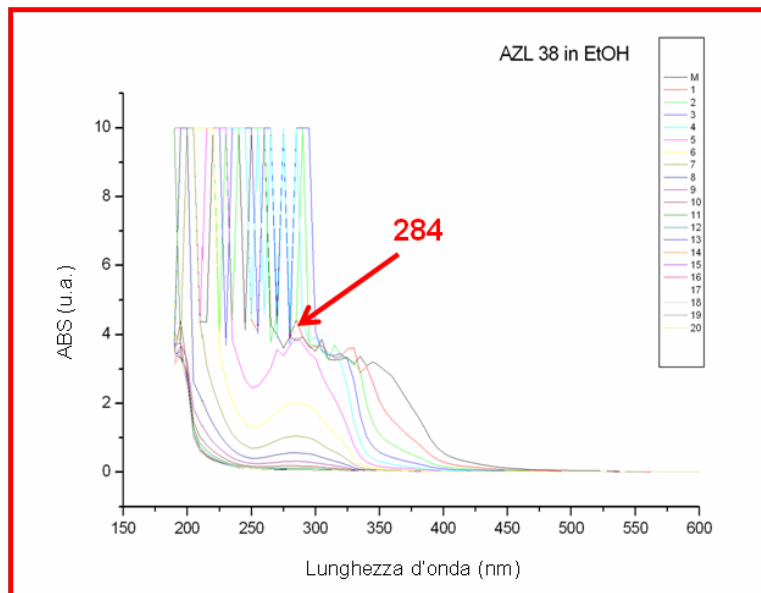


Figura 4.116. Spettri di assorbimento dell'AZL 38.

L'altezza di questi segnali, normalizzata rispetto allo spettro del bianco è stata usata per la creazione delle curve di calibrazione dell'AZL 38, a loro volta ottenute mediante regressione lineare e polinomiale dei dati sperimentali (Figura 4.117). Come mostrato nei grafici in Figura 4.117, le regressioni lineari e polinomiali mostrano una R ed una R-Square pari a 0,999. Inoltre, il limite di risoluzione è di ca 40 e 80 $\mu\text{g/mL}$.

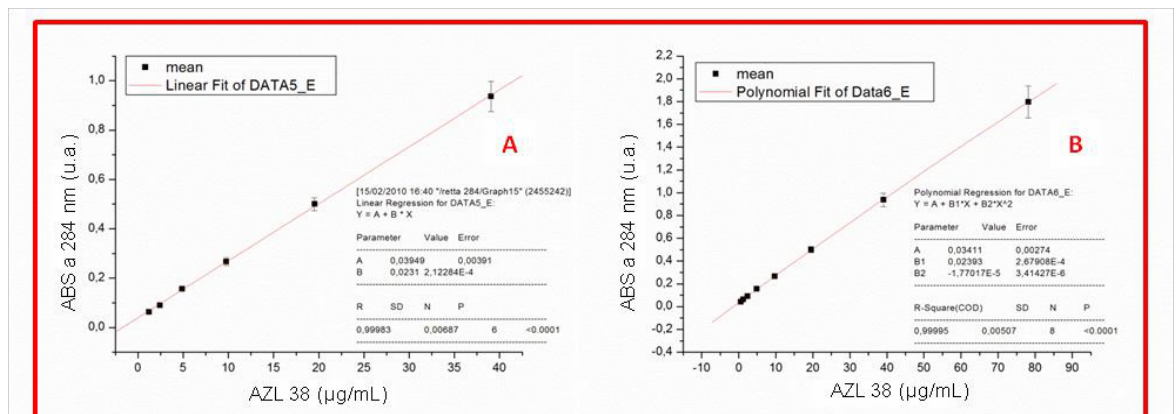


Figura 4.117. Rette di calibrazione dell'AZL 38. Rispettivamente le regressioni lineari e polinomiali, a 280 nm (A e B).

4.5.5. AZL 6

La Figura 4.118 mostra gli spettri di assorbimento dell'AZL 6 (soluzione etanolica) a diluizioni crescenti dalla M alla 20 (vedi legenda in Fig. 4.118).

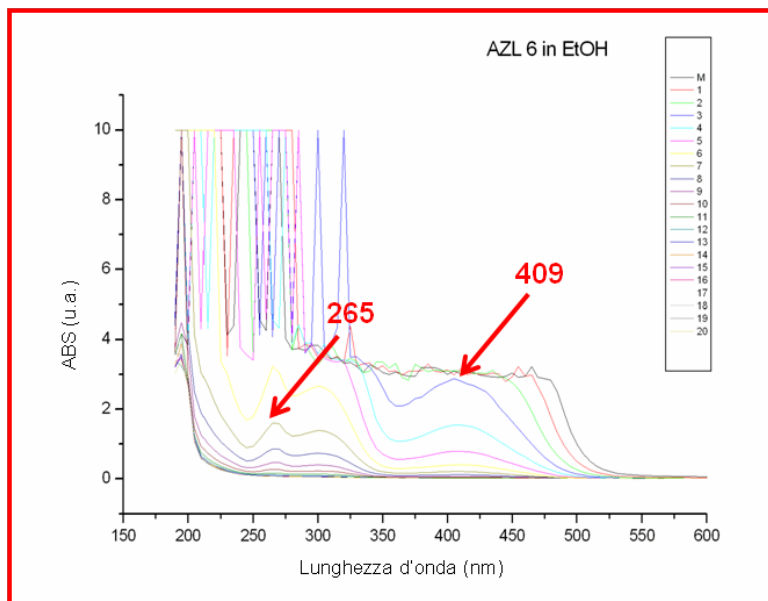


Figura 4.118. Spettri di assorbimento dell'AZL 6.

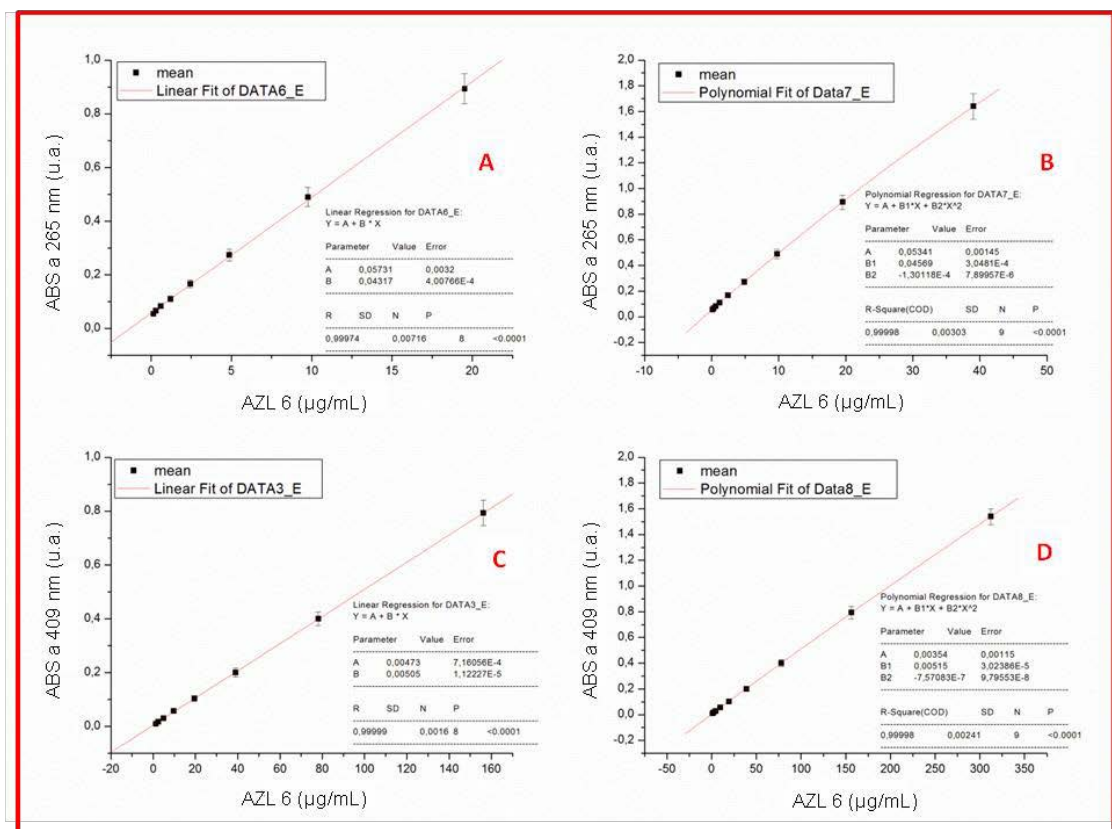


Figura 4.119. Rette di calibrazione dell'AZL 6. Rispettivamente le regressioni lineari e polinomiali, a 265 nm (A-B) e a 409 nm (C-D).

Anche se sono presenti diversi picchi dovuti ad interferenza, si può notare che i massimi di assorbimento a 265 e a 409 nm decrescono di altezza proporzionalmente all'incremento della diluizione.

L'altezza di questi segnali, normalizzata rispetto allo spettro del bianco è stata usata per la creazione delle curve di calibrazione dell'AZL 6, a loro volta ottenute mediante regressione lineare e polinomiale dei dati sperimentali (Figura 4.119).

Come mostrato nei grafici in Figura 4.119, le regressioni lineari e polinomiali mostrano una R ed una R-Square pari a 0,999. Inoltre, il limite di risoluzione è di ca 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$ e 160 e 350 $\mu\text{g/mL}$ quando l'AZL 6 viene quantificato rispettivamente a 265 e 409 nm.

4.6. Percentuale di incapsulazione

Sino a questo punto è stata spiegata la preparazione e la caratterizzazione delle NC e delle NE contenenti le differenti molecole con attività farmacologica. Oltre alle caratteristiche dimensionali e morfologiche, si è voluta studiare anche la capacità delle diverse NP prodotte di incapsulare le differenti molecole con attività farmaceutica, calcolando quindi la loro percentuale di incapsulazione.

Nella Figura 4.120 sono mostrati gli spettri di assorbimento dei filtrati delle NC e NE contenenti l'Ibu (101,6 e 56,6 $\mu\text{g/mL}$) (A), l'RA (64,3 e 63,4 $\mu\text{g/mL}$) (B), l'AZL 38 (12,6 e 11,2 $\mu\text{g/mL}$) (C) e l'AZL 6 (10,0 e 12,0 $\mu\text{g/mL}$) (D). Osservando la Figura si nota che gli spettri delle diverse molecole mostrano lo stesso andamento. Inoltre è possibile osservare la presenza di un piccolo picco di assorbimento intorno a 260 nm (freccie rosse).

Per contro, gli spettri di assorbimento dei filtrati delle NC e NE Ibu Na (65,8 e 96,2 $\mu\text{g/mL}$) mostrano un picco di assorbimento intorno a 265 nm, mentre lo spettro delle NE Ibu Na presenta un altro picco intorno a 220 nm, come mostrato nella Figura 4.121.

Nella sezione precedente si è potuto constatare che le uniche molecole che presentano un assorbimento nell'intorno dei 260 nm sono l'Ibu e l'Ibu Na (224 e 264 nm), e l'AZL 6 (265 nm). Pertanto, questa osservazione insieme con quella che gli spettri presenti nella Figura 4.120 sono molto simili fra loro, e che tutte le molecole presenti in questa figura sono lipofiliche ci ha indotto a ritenere che forse stavamo guardando gli spettri di qualche componente delle NP.

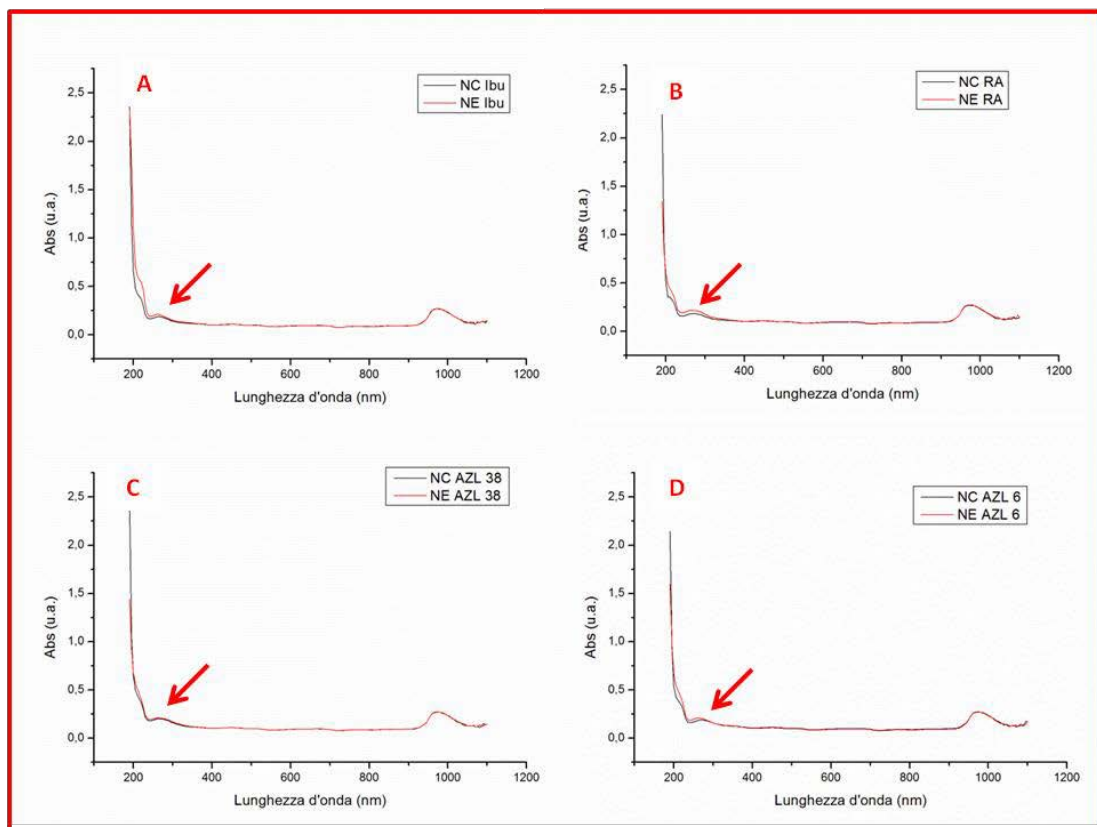


Figura 4.120. Spettri dei assorbimento dei filtrati delle NC e NE Ibu (A), RA (B), AZL 38 (C) e AZL 6 (D). In tutti e quattro gli spettri è presente un picco di assorbimento intorno a 260 nm (freccette rosse).

Pertanto, si sono voluti osservare gli spettri dei filtrati di NP che non contenessero farmaci. Questi sono mostrati nella figura 4.122. Da questi spettri si può vedere la presenza di un picco di assorbimento intorno a 260 nm. È possibile ipotizzare che, questo picco di assorbimento a 260 nm, rilevato in tutti gli spettri dei filtrati, essendo presente anche negli spettri delle NC e NE vuote, non appartiene a molecole non incapsulate, ma probabilmente a qualche componente delle NP. Tra le varie componenti delle nostre nanoparticelle infatti, alcune hanno dimensioni inferiori ai 3000 Da, come i vari trigliceridi del miglyol, ma anche il pluronic. Quest'ultimo infatti nonostante sia grande 8350 Da non ha una forma globulare, e grazie alla forza della centrifuga potrebbe aver attraversato i pori della membrana (così come capita agli spaghetti in uno scolapasta).

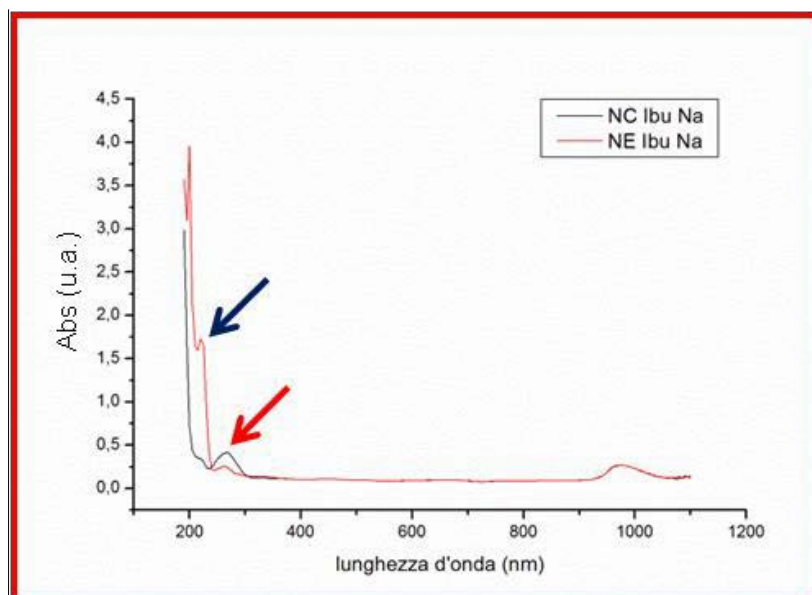


Figura 4.121. Spettri di assorbimento dei filtrati delle NC e NE Ibu Na, in entrambi si osserva un picco a 260 nm (freccia rossa), mentre solo nelle NE Ibu Na si ha un altro picco intorno a 220 nm (freccia blu).

Per quanto riguarda lo spettro del filtrato delle NE Ibu Na, è probabile che il picco di assorbimento rilevato intorno a 220 nm sia in effetti dell'Ibu Na anche se shiftato di 4 nm.

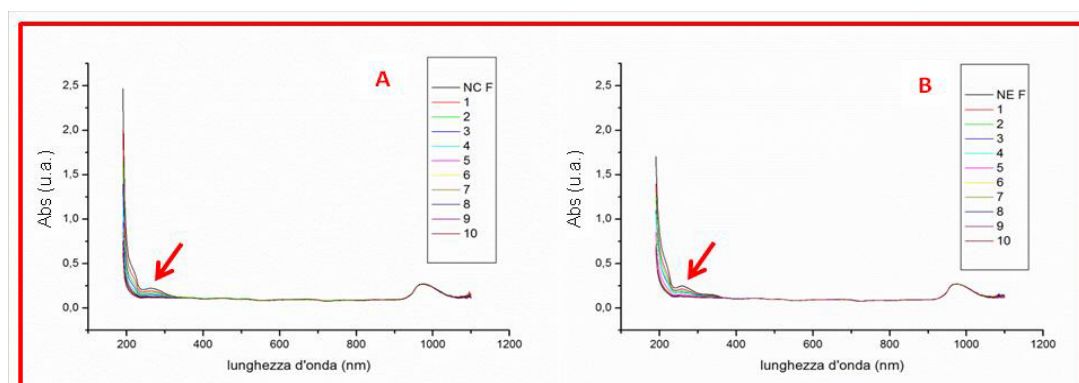


Figura 4.122. Spettri di assorbimento dei filtrati delle NC (A) e NE (B) vuote. In entrambi gli spettri si osserva un picco a 260 nm (freccie rosse).

Da tutti questi dati è possibile dedurre che le molecole Ibu, RA, AZL 38 e AZL 6 sono state completamente incapsulate, sia nelle NC che nelle NE. Inoltre, queste molecole sono lipofile, quindi sarebbe stato difficile trovarle nel filtrato (acquoso).

L'Ibu Na non è stato invece completamente incapsulato e la molecola libera, avendo una dimensione di 228,29 Da, potrebbe essere passata attraverso i pori della membrana filtrante, ed essendo idrofila è rimasta nella soluzione acquosa del filtrato.

È stata calcolata una percentuale di incapsulazione delle NC Ibu Na di 92,6 %, mentre nelle NE Ibu Na la percentuale di incapsulazione era pari a 20,4 %.

CONCLUSIONI

Durante il periodo di dottorato sono state preparate diverse NP lipidiche, NC e NE, e sono state studiate alcune loro proprietà, come le dimensioni, la forma e la carica superficiale. Dal momento che le NP possono essere utilizzate per la veicolazione direzionata di farmaci all'interno dell'organismo, studiarle risulta essere fondamentale.

I risultati del dimensionamento al DLS, delle diverse NC e NE contenenti le varie molecole con attività farmacologica, hanno messo in evidenza che le NC avevano sempre dimensioni maggiori delle NE. Questo è in accordo con quanto da noi ipotizzato, dal momento che le NC presentano una capsula di rivestimento. Inoltre, l'analisi dimensionale delle NC in seguito ai vari trattamenti subiti, a prescindere dalla molecola contenuta, ha rilevato un loro significativo aumento. Questo comportamento può essere dovuto alla presenza sia del chitosano che del pluronic. È possibile infatti che alcune molecole di pluronic non si siano assemblate con le altre, e non avendo una forma globulare durante la centrifugazione e le diverse dialisi, potrebbero fuoriuscire dai pori delle membrane filtranti. Questa perdita di molecole di pluronic potrebbe determinare una ulteriore deposizione del polimero chitosano negli strati più esterni della particella, aumentandone le dimensioni. Al contrario, le NE, a prescindere dalla molecola contenuta, in seguito ai vari trattamenti subiti, mostravano una diminuzione molto contenuta delle dimensioni.

È risaputo che i dimensionamenti al DLS e al TEM possono mettere in evidenza risultati differenti, e questo è accaduto anche con le nostre NP. La maggior parte delle NP analizzate al DLS e al TEM, mostravano le dimensioni maggiori al TEM. Questo è probabilmente dovuto alla fase di essiccazione, necessaria per l'osservazione dei

campioni al TEM. Questo comportamento è risultato essere più marcato nelle NE, che non avendo la capsula di rivestimento possono tendere maggiormente ad espandersi. L'analisi delle NP al TEM ha messo spesso in evidenza la presenza di NE con dimensioni molto maggiori delle NC. Anche questo fenomeno è da attribuire alla fase di essiccazione.

In accordo con le nostre previsioni, l'analisi del potenziale zeta ha mostrato che le NC avevano sempre una carica positiva, mentre le NE avevano sempre una carica negativa.

Per quanto riguarda la morfologia, l'osservazione delle NP al TEM ha rilevato che non tutte hanno una forma perfettamente sferica. Al contrario, sono state osservate diverse NP con forma cubica o poliedrica con base esagonale. Queste strutture sono state rilevate maggiormente tra le NE, è infatti probabile che la capsula di rivestimento forzi il mantenimento della struttura sferica nelle NC.

Anche gli esperimenti sulla capacità di incapsulazione hanno dato i risultati previsti, infatti tra tutte le molecole utilizzate, solo l'Ibu Na essendo idrofilo non è stato completamente incapsulato, ed è stato infatti ritrovato nel filtrato acquoso.