

CAPITOLO 2 Materiali e metodi

2.1 Materiali

2.1.1 Chitosano

Il chitosano è un polisaccaride di origine animale ottenuto dalla deacetilazione della chitina, componente principale degli esoscheletri dei crostacei; è costituito da unità monometriche di 2-amino-2-deossi-D-glucopiranosio legate con legami (1-4) β , è strutturalmente simile alla cellulosa da cui però si discosta in quanto gli idrossili presenti sul C2 sono sostituiti con gruppi amminici come si può osservare dalle formula di struttura riportata (Figura 1). Successivamente, attraverso il processo di deacetilazione, vengono rimossi gli acetili dalla molecola e viene ottenuto il chitosano (a seconda dell'efficienza del processo si può ottenere un differente grado di deacetilazione). Il chitosano è insolubile in H₂O, ma è relativamente solubile in soluzioni diluite di acidi. Le soluzioni acquose ottenute presentano valori di pH inferiori a 7. A valori di pH minori di 6,5 il polimero esibisce una netta carica positiva; questo gli permette di interagire con molecole o superfici caricate negativamente e di formare legami di natura ionica (1).

Da anni trova applicazione nell'agricoltura, nell'industria alimentare e nella filtrazione delle acque, è un composto naturale, biodegradabile e biocompatibile con effetti reversibili quindi non tossico. Più recentemente ha ricevuto notevoli attenzioni come eccipiente per applicazioni biomediche e come potenziale componente nella tecnica farmaceutica. Dal punto di vista biofarmaceutico in particolare si è dimostrato un enhancer di permeazione dalle caratteristiche peculiari che lo rendono un candidato ideale nella somministrazione transmurale (2). Negli ultimi anni ha ricevuto notevoli attenzioni come eccipiente per applicazioni biomediche e come potenziale componente nella tecnica farmaceutica. Da anni trova applicazione nell'agricoltura, nell'industria alimentare e nella filtrazione delle acque, è un composto naturale, biodegradabile e biocompatibile con effetti reversibili quindi non tossico (3).

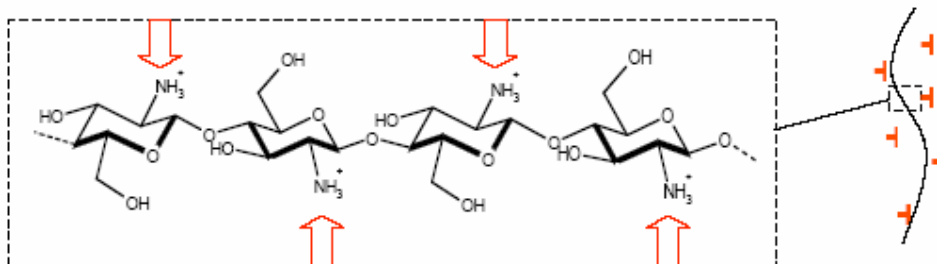


Fig1 dettaglio di una catena di chitosano

Le informazioni accumulate negli ultimi anni lo descrivono come un materiale unico per quanto riguarda la sua potenziale applicabilità in campo farmaceutico, specialmente per la somministrazione di molecole delicate come peptidi, proteine e acidi nucleici. In particolare, è interessante il suo utilizzo per la preparazione di sistemi nanoparticellari al posto di altre sostanze come PLGA, PLA-PEG, che pur offrendo promettenti risultati(4,5), richiedono nei processi produttivi dei nanosistemi, condizioni spesso drastiche (solventi organici, sonicazione, ecc.). In questo modo non solo si compromette la stabilità delle macromolecole attive, ma la tossicità, eventualmente derivante dai solventi residui, risulta l'ostacolo più rilevante (6).

Il chitosano possiede caratteri di mucoadesività, permettendo al farmaco veicolato, una volta a contatto con la mucosa, di essere rilasciato in situ per un tempo più lungo rispetto sistemi prodotti con materiali polimerici (7). Inoltre, è stato dimostrato in vitro, mediante studi su linee cellulari Caco-2 (cellule di adenocarcinoma umano usate come modello dell'epitelio intestinale), che il chitosano è capace di favorire il passaggio di molecole polari, alterando il trasporto paracellulare per dilatazione transitoria delle giunzioni serrate (8,9).

Lotti di chitosano ChitoClear® sono stati forniti dalla ditta PRIMEX (Siglufjordur, Islanda). I lotti del polimero TM 1874 TM 1961 e TM 1703 presentano valori di viscosità pari a 103 cPs, 715cPs, 8cPs e con una percentuale di deacetilazione pari a 95%, 99% e 92% rispettivamente.

2.1.2 Lecitina di soia

La Lecitina, contenuta nella soia, è un una sostanza complessa in grado di emulsionare i grassi, presente in tutte le cellule vegetali ed animali. Per lo più è composta da fosfolipidi (principalmente fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositolo), glicolipidi, sfingolipidi, trigliceridi, steroli, carboidrati e piccole quantità di acidi grassi.

La lecitina è considerata essere una surfattante ben tollerato e non tossico (suoi componenti sono parte integrante delle membrane cellulari), approvato dalla Food and Drug Administration per l'assunzione da parte dell'uomo.

La lecitina LIPOIDS45 lotto n° 745260-3 è stata fornita dalla LIPOID AG (Cham, Svizzera). Tale miscela di fosfolipidi risulta, secondo quanto indicato dalla ditta fornitrice, essere costituita per il 47,6% da fosfatidilcolina e per il 16,4% da fosfatidiletanolamina. Le altre frazioni lipidiche non sono state analizzate.

2.1.3 Isopropilmiristato (IPM)

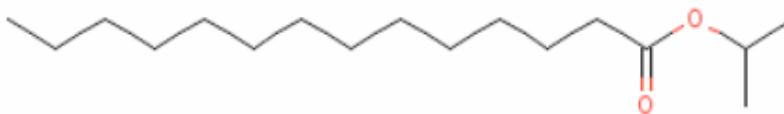


FIG.2 formula di struttura dell'isopropilmiristato

L'isopropilmiristato è una sostanza liquida, limpida, incolore, inodore con una bassa viscosità, il suo punto di congelamento è 5°C e ha delle spiccate caratteristiche idrofobiche. Questo consiste di un estere del 2-propanolo con un acido grasso a catena lunga come l'acido miristico (Figura 2). Questa molecola è comunemente usata come eccipiente nelle formulazioni per uso topico, infatti è adottato come promotore nella penetrazione di un farmaco in formulazioni topiche o transdermiche, e associata a ionoforesi o ultrasuoni. L'isopropilmiristato utilizzato per la produzione di nanoparticelle nella misura del 2.5% p/v, è stato fornito da ACEF s.p.a. (Fiorenzuola d'Arda, Italy), con una purezza superiore al 95%.

2.1.4 Progesterone

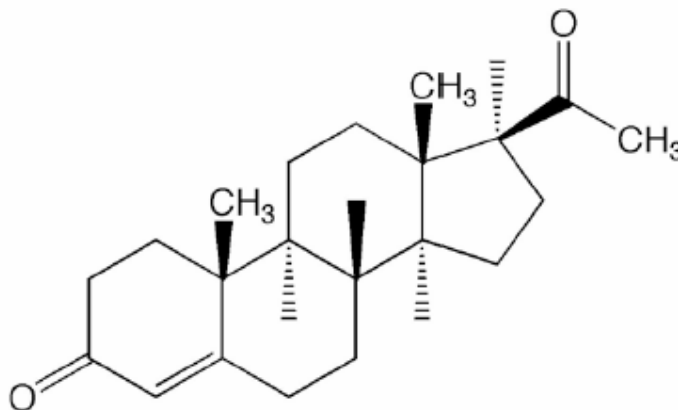


FIG. 3 formula di struttura del progesterone

Il progesterone (Pregn-4-ene-3,20-dione) ha un peso molecolare di 314,5 e si presenta sotto forma di cristalli incolori o polvere cristallina bianca o leggermente giallognola. La sostanza può esistere in due forme cristalline di cui una fonde a circa 121° e l'altra a circa 128° C (Figura 3). Il farmaco è praticamente insolubile in acqua ($C_s = 11,91 \mu\text{g/ml}$), solubile in etanolo (rapporto 1 a 8 p/p), molto

solubile in cloroformio e solubile in etere, il progesterone utilizzato è stato fornito dalla ditta Fluka (Buchs, Svizzera).

2.1.5 Tamoxifene citrato

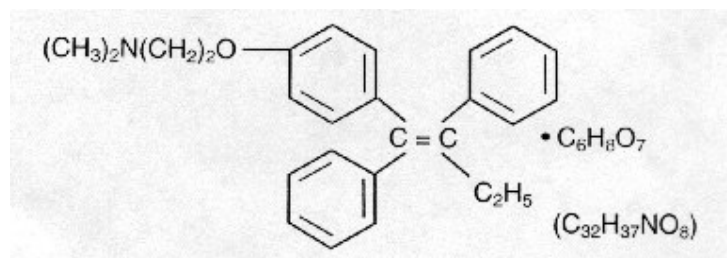


FIG. 4 formula di struttura del tamoxifene citrato

Il Tamoxifene citrato è un trans-isomero di un trifeniletilene derivato ((Z)-2-[4-(1,2-difenil-1-butenil) fenossi]-N, N-dimetiletanamina 2- idorxi-1,2,3-propanetricarboxilato (1:1)); il peso molecolare è 563.62, la pKa è 8.85, the la solubilità in acqua a 37°C è 0.5 mg/mL e a 0.02 N HCl at 37°C, è di 0.2 mg/mL. Solitamente viene utilizzato nella terapia dei tumori alla mammella.

2.2 Metodi

2.2.1 Preparazione della soluzione etanolica di lecitina e isopropilmiristato

La lecitina è stata sciolta in EtOH mediante breve sonicazione fino all'ottenimento di una soluzione di 25 mg/ml. Successivamente è stato aggiunto isopropilmiristato fino ad ottenenre una soluzione omogenea con concentrazione pari a 16,5 mg/ml. Tale soluzione è stata conservata a temperatura ambiente in atmosfera di azoto onde evitare fenomeni di ossidazione dei lipidi.

2.2.2 Preparazione della soluzione di chitosano all'1%

1 g di polimero chitosano è stato sciolto in HCl 1% (p/v) per ottenere una soluzione all'1% (p/v). La soluzione è stata mantenuta in agitazione per 24 ore per la completa dissoluzione del polimero. Tale soluzione, così ottenuta (10 mg/ml), è stata conservata a 4° C fino all'utilizzo.

2.2.3 Produzione delle nanoparticelle di lecitina chitosano e isopropilmiristato

La produzione delle nanoparticelle di chitosano e lecitina, denominate NCL IPM, è stata ottenuta mediante aggiunta della soluzione etanolica di lecitina e isopropilmiristato (IPM), alla soluzione di chitosano 1% appropriatamente diluita con acqua distillata filtrata (vedi Figura 5).



FIG. 5 schema del metodo utilizzato per la produzione delle NLC

La soluzione etanolica di lecitina e IPM è stata aggiunta tramite un sistema di iniezione automatico (Model 200, KD Scientifics Inc., Holliston, MA, USA), che prevede l'uso di una siringa di plastica di diametro 28,6 mm il cui stantuffo è sospinto da un motore; la siringa è collegata tramite un tubo di silicone ad un iniettore di vetro con ugello da 0,5 mm (Figura 6). In questo modo sono stati controllati automaticamente velocità (40 ml/min) e volume di iniezione (8 ml).



FIG. 6 sistema di iniezione automatica KD Scientific

La soluzione di chitosano, durante la fase di iniezione della lecitina e IPM è stata mantenuta in costante agitazione tramite agitatore ULTRA-TURRAX® T 25 basic (IKA Labortechnik, Staufen, Germania) equipaggiato con testa S 25 NK- 19G avente diametro di 2 cm e velocità fissata a 11000 RPM. Le quantità di chitosano e lecitina aggiunte sono state scelte in base al rapporto ponderale lecitina/chitosano (L/C) desiderato. Questo rapporto è stato precedentemente studiato, mettendo in

luce che i risultati più promettenti si ottenevano con il rapporto 20:1 (L/C), in quanto queste particelle, oltre a carica superficiale positiva, possiedono anche buone caratteristiche di dimensioni e stabilità. Nelle preparazioni in cui veniva aggiunto isopropilmiriristato al fine di aumentare il carico di progesterone, le quantità di lecitina e chitosano sono state mantenute fisse. In tutti i lotti prodotti il volume totale della sospensione è stato di 100 ml, mantenendo costante il volume della soluzione etanolica di lecitina (8 ml) e i volumi di acqua e di soluzione di chitosano 1% aggiunti.

2.2.4 Produzione di NCL caricate con progesterone

La produzione delle NCL IPM caricate con progesterone (NCLP IPM) è stata realizzata sciogliendo un'opportuna quantità del farmaco nella soluzione etanolica di lecitina. Sono state realizzate differenti soluzioni di progesterone a concentrazione tale per cui il volume iniettato mediante il sistema di iniezione contenesse la quantità di progesterone desiderata. I lotti di NCLP IPM prodotti avevano un volume di 100 mL, rapporto L/C 20/1 e concentrazione di IPM 5mM; le concentrazioni di progesterone prese in esame sono state 250-300-350- 400-600-800-1000-1500 $\mu\text{g/mL}$.

2.2.5 Produzione di NCL caricate con Tamoxifene citrato

Nel caso del tamoxifene citrato, la soluzione alcoolica di principio attivo e lecitina è stata realizzata con del metanolo in cui il tamoxifene è maggiormente solubile. Sono state realizzate soluzioni con diverse concentrazioni di farmaco, in modo tale da ottenere 10mg/100ml, 60mg/100ml, 120mg/100ml di tamoxifene citrato nella sospensione finale di nanoparticelle caricate.

2.2.6 Apparato di light scattering e analisi dati

Le misure di scattering statico e dinamico sono state eseguite sul medesimo strumento il cui schema è riportato in Figura 7. (nello schema non sono riportati le lenti e i diaframmi, ma solo le sorgenti, il portacampione e il rivelatore)

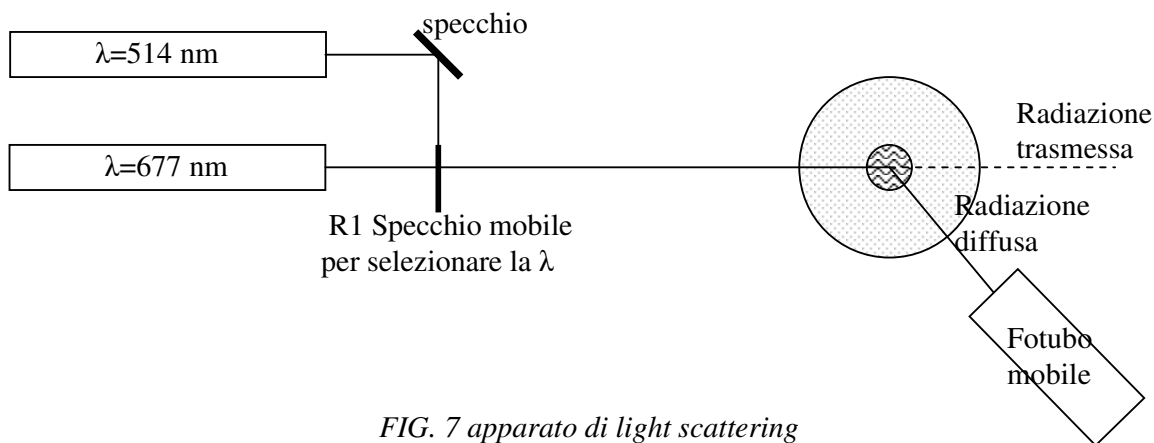


FIG. 7 apparato di light scattering

L' apparato sperimentale utilizzato, è costituito da una parte meccanico-ottica di rivelazione ed una elettronica di controllo ed elaborazione.

Dallo schema del banco ottico (Fig. 7) si può vedere che lo strumento è dotato di due sorgenti luminose: un laser He-Ne da 25 mW con $\lambda = 677$ nm ed un laser ad Argon (6.5 W in multiline) con lunghezza d'onda variabile (da 514.5 nm a 363.8 nm). Il primo viene utilizzato quando la soluzione diffonde abbastanza luce perché è stabile, a basso consumo di energia e di lunga durata. Il laser ad Argon viene usato nel visibile quando occorre la massima sensibilità, per tre motivi: primo perché è più potente, secondo perché la sezione d'urto del processo di diffusione della luce dipende inversamente dalla lunghezza d'onda alla quarta potenza e infine perché i fotomoltiplicatori sono più sensibili nel verde e nel blu che nel rosso.

Il laser ad Argon è stato utilizzato alla lunghezza d'onda di 514 nm: dato che a parità di angolo di diffusione, una minore lunghezza d'onda della sorgente implica un vettore d'onda q più grande, utilizzando due lunghezze d'onda è possibile accedere ad un maggiore numero di q fissato un range di angoli di diffusione, ottenendo così, un profilo dell'intensità diffusa (in funzione di k) più completo.

Grazie alla posizione dello specchio R1 (FIG. 7) è possibile selezionare la λ desiderata e sovrapporre il cammino ottico dei raggi luminosi provenienti dai due laser.

La cella utilizzata è cilindrica di capacità 10ml e fornita di un sistema di riempimento che mediante filtri a porosità controllata, tubi di teflon e un flusso d'azoto, permette sia il riempimento che lo svuotamento senza aprire la cella, evitando le contaminazioni. La cella è alloggiata in un contenitore (Wat) riempito di decalina, liquido con lo stesso indice di rifrazione del vetro: questo accorgimento permette di minimizzare gli effetti dovuti a rifrazioni e riflessioni spurie, aumentando fittiziamente lo spessore della cella portacampione.

La luce diffusa è raccolta da un fotomoltiplicatore posto su di un braccio mobile, per poter accedere ad un grande numero di angoli di diffusione.

Le misure di scattering dinamico e statico sono state ottenute mediante software Brookhaven a differenti angoli di diffusione. In particolare le misure di scattering statico sono state acquisite su un ampio range di angoli di scattering (da 10° a 150°) e con due lunghezze d'onda (677 e 514 nm) per ottenere un profilo dell'intensità diffusa il più completo possibile. Alla misure dell'intensità diffusa dal campione è stato sottratto il contributo dovuto al background (solvente, cella, decalina,...), ottenuto mediante una misura di scattering statico sulla cella contenente solo il solvente, eseguita nelle medesime condizioni di misura adottate per il campione (temperatura, range di angoli, potenza del laser, apertura diaframmmi). Le misure di scattering dinamico sono state svolte su tre angoli di misura

(30°, 60°, 90°) in modo da non tralasciare il contributo di oggetti di grandi dimensioni che diffondono solamente a piccoli angoli, non portando alcun contributo all'intensità diffusa già a 90°.

Analisi dati

Le sospensioni di nanoparticelle studiate, non sono sistemi monodispersi; per determinare la distribuzione delle dimensioni delle varie tipologie di campioni, occorre saper trattare la polidispersità dei sistemi. Il metodo più conosciuto per analizzare la polidispersità è quello dei cumulanti, di seguito esposto.

Per una soluzione monodispersa, la componente time-dependent della funzione di autocorrelazione dell'intensità $G_2(\tau)$ (determinata da misure di scattering dinamico) è un singolo esponenziale decrescente. Diversamente, per una soluzione polidispersa, la componente time dependent della $G_2(\tau)$ non è un esponenziale e il suo scostamento da tale funzione, contiene le informazioni sulla funzione di distribuzione delle dimensioni particellari. La funzione di autocorrelazione di campo normalizzata:

$$g_1(\tau) = \frac{G_1(\tau)}{G_1(0)} \quad 1)$$

consiste in una somma di esponenziali:

$$|g_1(\tau)| = \sum_i G(\Gamma_i) \exp[-\Gamma_i \tau] \quad 2)$$

dove $\Gamma = Dk^2$ (k vettore di scattering) e $G(\Gamma_i)$ è la frazione dell'intensità diffusa totale, dovuta a quelle particelle con coefficiente di diffusione traslazionale D_i (D definito dalla formula di Stokes-Einstein, vedi cap. 3 formula 15) e larghezza Γ_i ; quindi, per definizione $\sum_i G(\Gamma_i) = 1$.

Dedurre la $G(\Gamma)$ dalla funzione di autocorrelazione dell'intensità misurata ($G_2(\tau)$) non è assolutamente banale. Un metodo tra i maggiormente conosciuti è quello dei cumulanti. I cumulanti della $G(\Gamma)$ sono calcolati dai dati acquisiti. Il primo cumulante da' il valor medio del coefficiente di diffusione del sistema, il secondo da' la larghezza della distribuzione.

Dai dati sperimentali si ottiene direttamente la quantità:

$$\{G_2(\tau) - B/B\}^2 = \sqrt{b} |g_1(\tau)| \quad 3)$$

dove $B = \langle I_s \rangle^2$ è il background (I_s è l'intensità diffusa) e b è un coefficiente che dipende dalla coerenza temporale e spaziale del laser e delle ottiche del detector. Espandendo il termine $\exp[-\Gamma_i \tau]$ presente nell'equazione 2 intorno a $\bar{\Gamma} = \sum_i \Gamma_i G(\Gamma_i)$ si ottiene:

$$\exp[-\Gamma \tau] = \exp[-\bar{\Gamma} \tau] \exp[-(\Gamma - \bar{\Gamma}) \tau] = \exp[-\bar{\Gamma} \tau] \cdot \left[1 - (\Gamma - \bar{\Gamma}) \tau + \frac{(\Gamma - \bar{\Gamma})^2}{2!} \tau^2 + \dots \right] \quad 4)$$

inserendo l'equazione 4 nell'equazione 2 si ottiene:

$$|g_1(\tau)| = \exp[-\bar{\Gamma} \tau] \cdot \left[1 + \frac{(\mu_2)^2}{2!} \tau^2 - \frac{(\mu_3)^2}{3!} \tau^3 + \dots \right] \quad 5)$$

infine ricordando che $\ln(1+x) = x - \frac{1}{2}x^2 + \frac{1}{3}x^3 \dots$

$$\ln \sqrt{b} |g_1(\tau)| = \frac{1}{2} \ln b - \bar{\Gamma} \tau + \frac{1}{2} \mu_2 \tau^2 - \frac{1}{3!} \mu_3 \tau^3 + \dots \quad 6)$$

i coefficienti $(1/m!)(-\tau)^m$ sono i cumulanti della funzione $G(\Gamma)$, la polidispersità è il secondo cumulante.

Un altro metodo di analisi dei dati consiste nel modellizzare la $G(\Gamma)$ con delle funzioni analitiche caratterizzate da uno o più parametri che vengono determinati mediante fit dei minimi quadrati sulla funzione di correlazione misurata. Sono utilizzati diversi tipi di funzioni contenenti più decadimenti esponenziali, ad esempio la distribuzione bimodale (duble exponential) o la Non-Negative Least Square (NNLS).

2.2.7 Apparato SAXS (Small Angle X-ray Scattering)

Il sincrotrone dell'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) è in grado di produrre raggi X ad alta brillantezza, cioè un fascio sottile e molto intenso. I sincrotroni consistono in una camera a vuoto troidale intorno alla quale sono sistemati due tipi di magneti: i magneti di focalizzazione e i magneti di curvatura (FIG. 8). Nel dettaglio i *Bending magnets*, o magneti di curvatura, deflettono l'elettrone dal suo cammino rettilineo di alcuni gradi, il loro cambiamento di direzione causa l'emissione di radiazione di sincrotrone, (FIG.8); gli *Undulators* (ondulatori), costituiti da complessi array di magneti, forzano gli elettroni a seguire una traiettoria ondulatoria. Il campo di radiazione emesso è il risultato della sovrapposizione delle diverse curvature e dalla loro interferenza. Il fascio di radiazione così generato è più intenso di quello dei soli magneti di

curvatura (FIG: 8); i *Focusing magnets* (magneti di focalizzazione) posti nei settori rettilinei dell'anello di accumulazione, sono utilizzati per focalizzare il fascio di elettroni e mantenerlo piccolo e ben definito in modo da poter produrre raggi X molto brillanti.

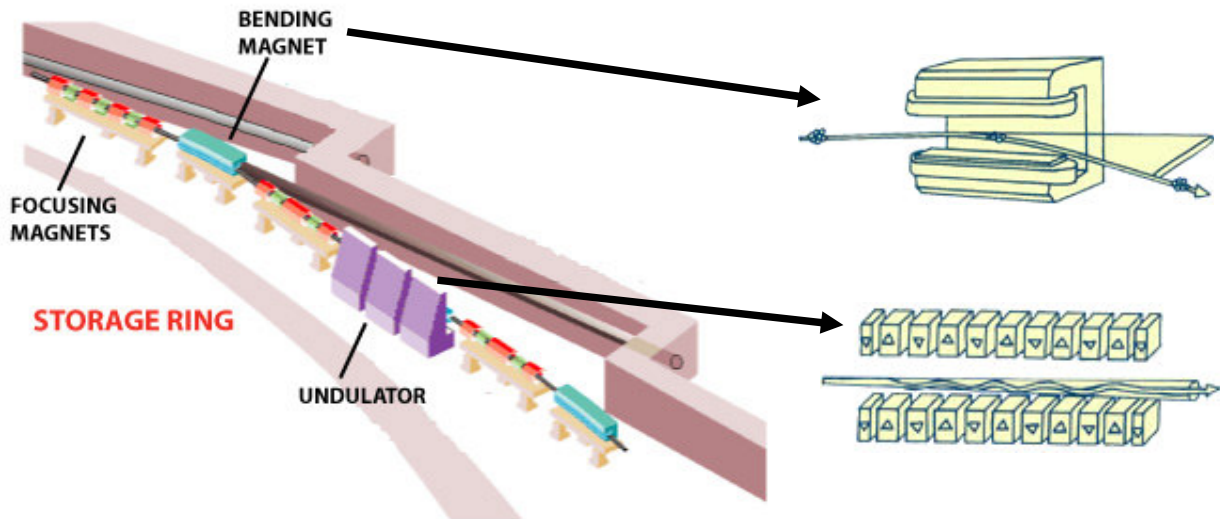


FIG. 8 Magneti lungo il percorso del fascio di elettroni.

La radiazione prodotta dagli elettroni che curvano sotto l'azione di campi magnetici emerge in linee di fasci tangenziali alla traiettoria. La camera a vuoto anulare attraversa anche una o più cavità a radiofrequenza, i cui campi riforniscono gli elettroni dell'energia persa sotto forma di radiazione di sincrotrone, o se necessario, provvedono ad innalzare l'energia del fascio. Le cavità a radiofrequenza, inoltre, dividono il fascio in "gruppi" della lunghezza di alcuni centimetri.

Le componenti fondamentali del sincrotrone dell'ESRF sono: un acceleratore lineare (linac), un acceleratore circolare (booster synchrotron) e un anello di accumulazione (storage ring) (FIG. 9)

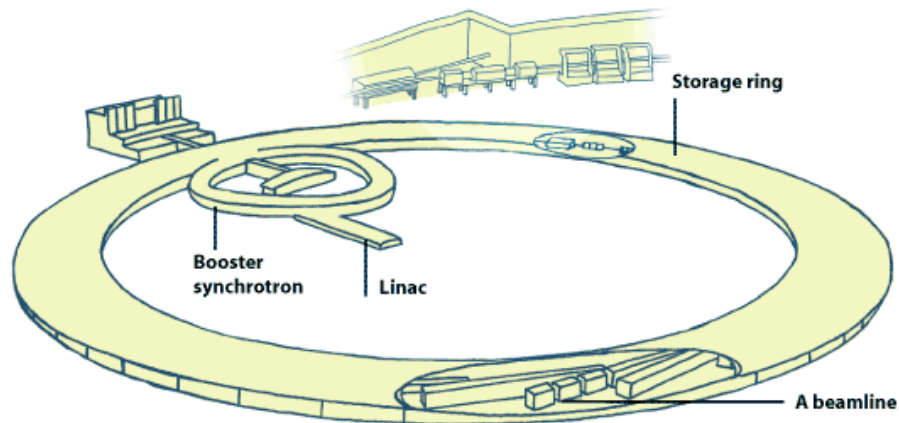


FIG. 9 Componenti fondamentali del sincrotrone

Gli elettroni emessi dalla sorgente vengono prima accelerati nell'acceleratore lineare e poi trasmessi nell'acceleratore circolare dove vengono accelerati per avere una energia di 6 GeV; vengono poi iniettati nell'anello di accumulazione avente la circonferenza di 844 m (ossia raggio di 134 m) dove circolano in vuoto (per ridurre al minimo le dispersioni di energia), per molte ore, fino alla successiva immissione.

La radiazione di sincrotrone emessa dagli elettroni è diretta alle "beamlines" che circondano l'anello di accumulazione. Ogni "beamline" è disegnata per poter utilizzare una ben precisa tecnica e un preciso tipo di ricerca. Ogni "beamline" possiede una *optics cabin* in cui è posto il sistema ottico che consente di ottenere le caratteristiche sperimentali desiderate. Una *experimental cabin* in cui sono posti i portacampioni e i detector per registrare le informazioni prodotte dell'irraggiamento dei campioni. E una *control cabin* da cui poter controllare gli esperimenti e raccogliere i dati grazie all'alta informatizzazione delle linee. (FIG. 10).

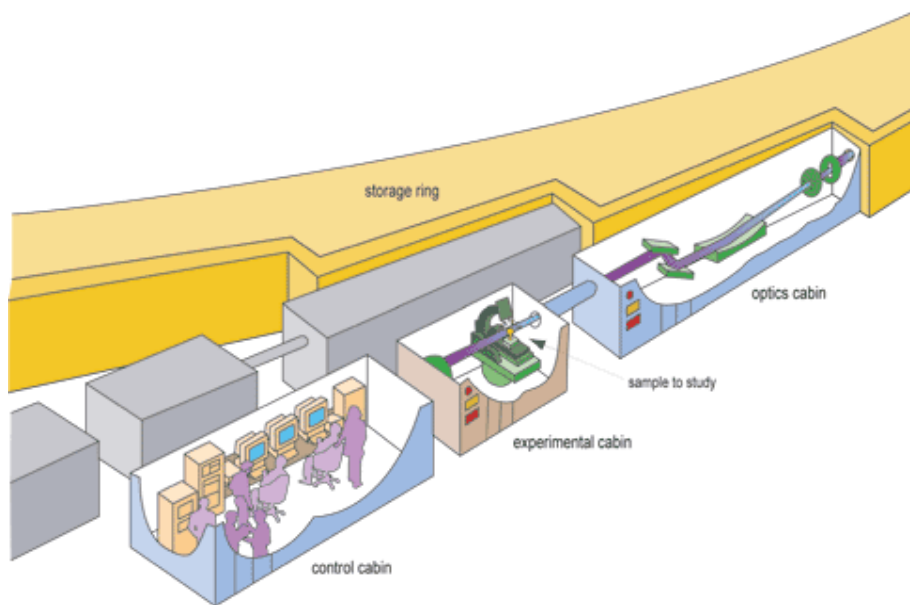


FIG. 10 Schema di una beamline

Gli esperimenti condotti presso l'ESRF sono stati svolti sulla linea ID02. Si tratta di una linea ondulatoria caratterizzata da un'alta brillantezza. La beamline possiede un alto flusso di fotoni monocromatici con una bassa divergenza attraverso la sezione d'urto del campione tipicamente di $100\ \mu\text{m} \times 300\ \mu\text{m}$ e viene utilizzato solo il cono centrale della radiazione dell'ondulatore. Le ottiche sono ottimizzate per usi sperimentali con una lunghezza d'onda fissa di circa 0.1nm ($12.4\ \text{KeV}$), ma sono accessibili lunghezze d'onda comprese tra $0.073\ \text{nm}$ e $0.155\ \text{nm}$. Con l'apparato della linea ID02 è possibile compiere contemporaneamente misure di SAXS (Small-Angle X Scattering) e di WAXS (Wide-Angle X Scattering)(FIG. 11). Negli esperimenti condotti, le misure sono state svolte solamente nella configurazione SAXS (FIG 12).

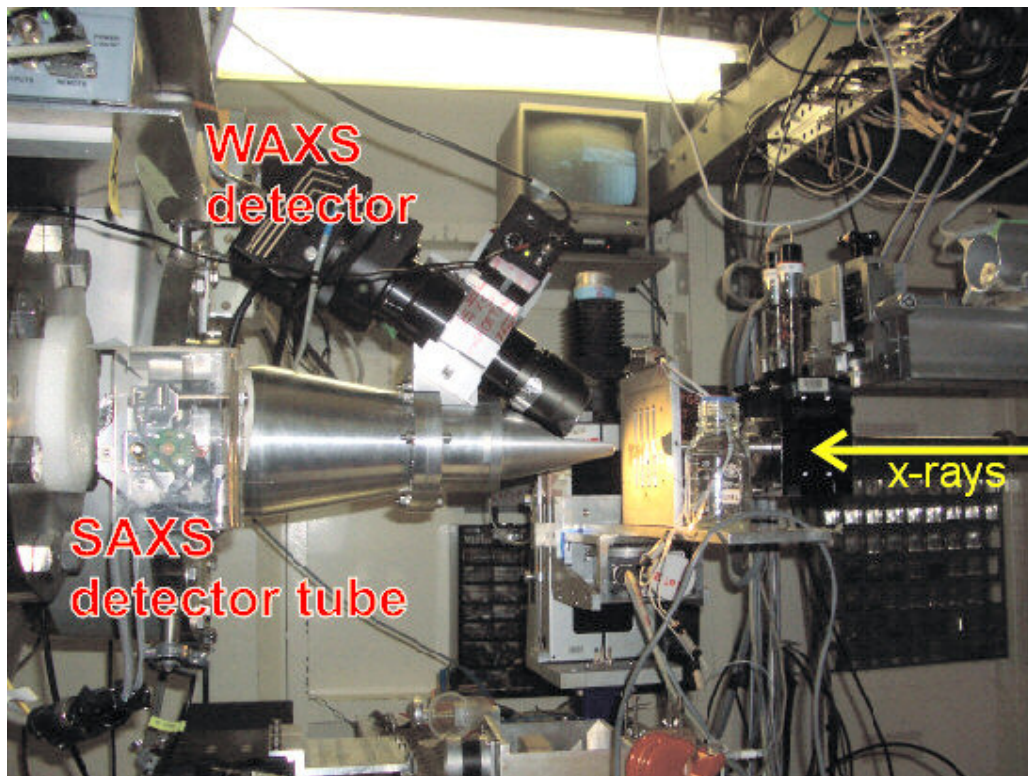


FIG. 11 Rivelatori SAXS e WAXS

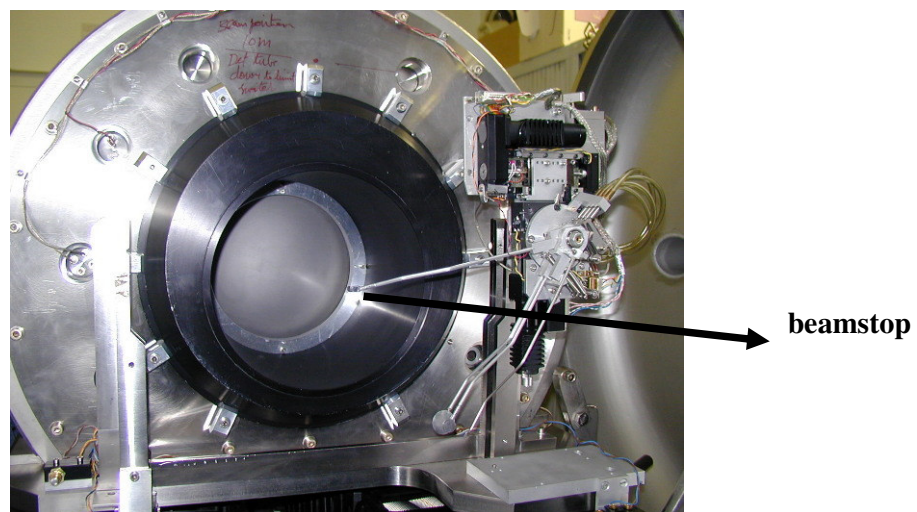


FIG. 12 Dettaglio del rivelatore SAXS; si nota prima dell'ingresso del rivelatore, il beamstop.

La camera del SAXS consiste in tre fenditure e due collimatori, uno dopo lo specchio a 34 m ed un altro a 50 m. Due protezioni della fenditura sono posti a 52 m e direttamente davanti al campione a 54 m. Usualmente le fenditure sono entrambe poste in modo tale che tutta l'ampiezza sia nel massimo del fuoco del fascio monocromatico. Le fenditure confinano la regione attorno al fascio primario in cui si può notare la diffusione dello scattering parassito. Questo definisce la dimensione minima del beamstop ed il minimo angolo di scattering osservabile. La posizione del campione è fissata ed il detector può essere mosso automaticamente in un tubo in vuoto da 0.75 m e 10 m dal campione; nel set up sperimentale realizzato, la distanza tra i campioni e il rivelatore era di 1.2 m. Per gli esperimenti svolti le soluzioni sono state poste in capillari di vetro sigillati aventi il diametro di 2mm. Il porta campioni è realizzato in alluminio, materiale trasparente alla radiazione X, è composto da due piastre parallele e permette di alloggiare fino a 23 capillari per volta aventi altezza massima di 7 cm. Il controllo del porta campioni avviene dalla stanza di controllo mediante terminale, da cui è possibile spostare il porta campioni lungo l'asse x, in modo da cambiare il capillare irraggiato, e lungo l'asse z per effettuare misure a diversa altezza, utile accorgimento qualora si voglia esporre un medesimo campione per un tempo di misura che lo potrebbe: in questo caso basta eseguire più misure in diverse posizioni sul medesimo capillare in modo da irraggiare il medesimo campione in diverse posizioni.

2.2.8 Apparato cryo-Tem



FIG. 13 Microscopio elettronico a trasmissione

Lo strumento utilizzato è uno Zeiss LIBRA-120 (FIG.13), in modalità cyro: i campioni vengono posti su film di policarbonato con una ben definita porosità, viene eliminato il materiale in eccesso e, quindi, attraverso una rapidissima immersione in un liquido congelante, il campione viene vetrificato, posto su una normale griglia per microscopia elettronica e osservato in questo stato, mantenendolo alla temperatura del'azoto liquido. Ulteriori dettagli sulla tecnica sono presentati nel capitolo 3.

2.2.9 Apparato zetaPALS



FIG. 14 Apparato zeta PALS

Le particelle ottenute sono state tutte caratterizzate come carica superficiale mediante PALS utilizzando un apparecchio Brookhaven ZetaPALS (Brookhaven Instrument Co., Holtsville, NY, USA) (FIG.).

L'analisi del potenziale zeta è stata condotta mantenendo i campioni nel mezzo di produzione come tali senza ricorrere ad alcuna diluizione sfruttando la tecnologia PALS che permette misurazioni di potenziale zeta anche in mezzi ad elevata conduttanza quale il mezzo di produzione delle NCL IPM. Tale accorgimento ha permesso di non alterare l'intorno ionico delle particelle determinando quindi

misurazioni più precise del potenziale zeta. Anche in questo caso le misurazioni sono state condotte analizzando almeno tre lotti previo controllo dell'efficienza dello strumento mediante il pigmento colloidale standard BI-ZR3 (Brookhaven Instrument Co., Holtsville, NY, USA).

2.2.10 Calorimetro

Le misure di calorimetria sono state eseguite utilizzando un calorimetro non commerciale (MASC) costruito presso i laboratori dell'IPCF del CNR di Pisa, che può lavorare sia in modalità DSC (Differential Scanning Calorimetry) che in modo TMDSC (Temperature Modulated Scanning Calorimetry). Le misure di calorimetria svolte, hanno riguardato la caratterizzazione di diverse tipologie di miscele controllate di lipidi puri; questa parte del lavoro, ancora in fase preliminare, ha lo scopo di realizzare dei vettori modello simili ma strutturalmente più semplici delle nanoparticelle, per comprendere meglio le interazioni tra i vari costituenti delle nanoparticelle, principi attivi compresi. Le misure sono state condotte solamente nella modalità DSC con il fine di analizzare il picco di transizione di fase delle miscele e ottenere informazioni sia sul mixing dei lipidi, sia sullo stato delle catene lipidiche alle varie temperature, specie quelle fisiologiche.

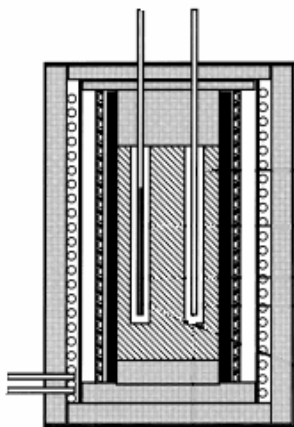


Figura 15 Testa del calorimetro.

L'intervallo di temperatura accessibile al calorimetro si estende da 250K a 470K, mentre le frequenze di modulazione della temperatura sono comprese tra 1 e 10 mHz.

Le componenti fondamentali dello strumento sono:

- ✓ La testa calorimetrica (FIG.15), costituita da uno schermo termico attivo, che contiene la cella di misura dove si posiziona il capillare porta-campione (di capacità 200 μ l). La

simmetria è cilindrica. La cella di misura è in acciaio e lunga 100mm. La testa è posizionata all'interno di un blocco di alluminio, immerso in un bagno termico, dotato di una grande capacità termica e controllato in temperatura. Il bagno termico rappresenta l'ambiente verso cui la testa calorimetrica scambia calore.

- ✓ I moduli elettronici di misura della temperatura di cella e schermo (voltmetri) e di erogazione della potenza (generatori di potenza programmabili).
- ✓ Software acquisizione di gestione/analisi dati che gestisce l'acquisizione dei dati degli strumenti, la conversione in temperatura delle grandezze fisiche misurate, l'erogazione della potenza necessaria a realizzare i profili di temperatura/potenza richiesti dal modo operativo e dal tipo di esperimento, l'elaborazione e il salvataggio dei dati, ecc.

Le caratteristiche di costruzione dello strumento, in particolare la presenza di uno stadio intermedio (schermo), controllabile indipendentemente, tra la cella e il bagno termico, sono studiate per consentire la misura nel caso sia necessario fornire grandi quantità di calore in un piccolo intervallo di temperatura.

La tecnica DSC prevede che cella e schermo realizzino un profilo di temperatura lineare predeterminato. L'operatore definisce la temperatura di partenza e di arrivo ed il tempo di esecuzione della scansione. Il programma provvede, dopo un'opportuna fase di termalizzazione, ad erogare la potenza necessaria affinché cella e schermo realizzino il profilo di temperatura teorico.

La potenza di cella P_c utilizzata è il segnale acquisito. Dalla potenza misurata e tramite la relazione $P_c = \beta C_p$, con β velocità di scansione della temperatura, si ricava la capacità termica incognita C_p del sistema.

Per incrementare la sensibilità (ovvero il rapporto segnale-rumore), al fine di poter rilevare segnali deboli, si possono aumentare la massa del campione, o la velocità di scansione. Questo però a discapito della risoluzione, per incrementare la quale sono utili campioni con masse piccole e basse velocità di scansione.

La preparazione del campione è molto semplice: con l'ausilio di una siringa, vengono inseriti circa 200 μ l di campione in un capillare di pirex (lunghezza di 100mm diametro interno di 1,6mm) saldato ad un'estremità. Tale capillare viene in seguito chiuso ermeticamente utilizzando una fiamma ossidrica. In questo modo si ha la certezza che non si avranno cambiamenti di concentrazione del campione, dovuti all'evaporazione dell'acqua durante i processi di riscaldamento del sistema.

Prima di essere inserito nel calorimetro, il pirex contenente il campione viene pulito per evitare che eventuali residui falsino la misura.

E' possibile seguire l'andamento delle varie rampe di temperatura e potenza fornite a cella e schermo attraverso una finestra del programma software di gestione dello strumento. Tramite

un'altra finestra è possibile visualizzare il valore medio su un periodo della potenza erogata alla cella e le componenti in fase e opposizione di fase, oppure il valore della capacità termica del sistema cella porta campione + capillare di vetro + campione e le sue componenti in fase e opposizioni di fase.

All'inizio e alla fine di ogni scansione è stata imposta un'isoterma per un certo Δt : questa procedura ha lo scopo di determinare e correggere eventuali derive termiche strumentali che potrebbero sovrapporsi alla misura. In condizione di isoterma l'unico contributo alla potenza erogata è dato dal termine che rappresenta gli scambi della cella con lo schermo e che tiene conto della conducibilità termica del sistema e della differenza di temperatura tra cella e schermo.

Una volta eseguita la misura si prosegue con l'analisi dei dati per ottenere il calore specifico della soluzione studiata.

I campioni in esame sono soluzioni acquose di fosfolipidi; per poter determinare il calore specifico del soluto da quello della soluzione, informazione che si ottiene dalla misura effettuata, si procede considerando il calore specifico della soluzione e quello dell'acqua.

Il calore specifico dell'acqua è stato ottenuto dalla seguente formula teorica(11):

$$C_p = 4.2165 - 3.469e^{-3}T + 1.556e^{-4}T^2 - 1.8557e^{-6}T^3 + 1.5194e^{-8}T^4 - 4.7386e^{-11}T^5$$

con T temperatura espressa in °C e C_p in J/gK; il motivo di questa scelta sta nel voler considerare un andamento del calore specifico dell'acqua libero da errori e disturbi di misura, si è comunque sempre proceduto ad un controllo del corretto valore del calore specifico dei riferimenti acquosi utilizzati. Tramite una procedura di dosaggio si determina la concentrazione dei fosfolipidi presenti in soluzione, ottenendo, infine il calore specifico proprio della miscela fosfolipidica.