

Politecnico di Torino

Corso di Laurea Magistrale A.A. 2022/2023 Sessione di Laurea Marzo 2023

Analisi termofisica dei multilayer di Langmuir-Blodgett per validazione di un prodotto di combinazione farmacodispositivo:

Un nuovo dispositivo per l'home therapy

Relatori: Umberto Lucia Roberta Cavalli Giulia Grisolia Candidata: Roberta Stacchini, s289322

Alla mia famiglia, ai miei amici e anche a chi non c'è più ma continua a rimanermi vicino

Sommario

| 1 | ASPETTI INTRODUTTIVI E TEORICI | | | 7 | |
|---|---|--|---|--|--|
| | 1.1 | 1 TRASPORTO DI FARMACI ANTITUMORALI | | 7 | |
| | 1.2 | RAT | IONAL DELLA TESI E L'HOME THERAPY | 8 | |
| | 1.2.1 LA DIRETTIVA DEI PRODOTTI MEDICINALI E IL REGOLAMENTO DEI | | | | |
| | 1 2 2 | | | 15 | |
| | 12 | ۱۸، | | 13 | |
| | 1.J | | | 10 | |
| | 1.4 | | NUCLEAZIONE ASPETTI GENERALI E INTRODUTTIVI [25] | 13 | |
| | 1.5 | 151 | | 21 | |
| | 16 | | | 20 29 | |
| | 1.0 | GU | | 31 | |
| | 1.7 | | | 39 | |
| | 1.0 | 181 | | 40 | |
| | 19 | MO | NOLAYER DI LANGMUIR-BLODGETT' ASPETTI INTRODUTTIVI[41] | 41 | |
| | 1.10 CHITOSANO COME SHELLE INTERAZIONE CON LMONOLAYER DI LANGMU | | | | |
| | BLODGETT | | | | |
| 2 | A | ANALIS | DELLA TENSIONE INTERFACCIALE: OTTIMIZZAZIONE DEI MODELLI | 53 | |
| | 2.1 | MO | DELLO DI PITT[40] | | |
| | 2 | 0 1 1 | | | |
| | | 2.1.1 | IPOTESI DI PARTENZA | 55 | |
| | 2 | 2.1.1 | IPOTESI DI PARTENZA DERIVAZIONE DEL MODELLO | 55 56 | |
| | 2 2 | 2.1.1 2.1.2 2.1.3 | IPOTESI DI PARTENZA DERIVAZIONE DEL MODELLO RISULTATI | 55 56 66 | |
| | 2 2 2.2 | 2.1.1 2.1.2 2.1.3 MO | IPOTESI DI PARTENZA DERIVAZIONE DEL MODELLO RISULTATI DELLO DI FUJIKAWA-AKAMATSU[56] | 55 56 66 67 | |
| | 2 2 2.2 2 | 2.1.1 2.1.2 2.1.3 MC 2.2.1 | IPOTESI DI PARTENZA DERIVAZIONE DEL MODELLO RISULTATI DELLO DI FUJIKAWA-AKAMATSU[56] IPOTESI DI PARTENZA | 55 56 66 67 67 | |
| | 2 2 2.2 2 2 | 2.1.1 2.1.2 2.1.3 MO 2.2.1 2.2.2 | IPOTESI DI PARTENZA DERIVAZIONE DEL MODELLO RISULTATI DELLO DI FUJIKAWA-AKAMATSU[56] IPOTESI DI PARTENZA DERIVAZIONE DEL MODELLO | 55 56 66 67 67 68 | |
| | 2 2 2.2 2 2 2 2 | 2.1.1 2.1.2 2.1.3 MO 2.2.1 2.2.2 2.2.2 | IPOTESI DI PARTENZA DERIVAZIONE DEL MODELLO RISULTATI DELLO DI FUJIKAWA-AKAMATSU[56] IPOTESI DI PARTENZA DERIVAZIONE DEL MODELLO RISULTATI | 55 56 66 67 67 68 79 | |
| | 2 2.2 2 2 2 2 2.3 | 2.1.1 2.1.2 2.1.3 MO 2.2.1 2.2.2 2.2.3 MO | IPOTESI DI PARTENZA DERIVAZIONE DEL MODELLO RISULTATI DELLO DI FUJIKAWA-AKAMATSU[56] IPOTESI DI PARTENZA DERIVAZIONE DEL MODELLO RISULTATI DELLO UTILIZZATO NELLE SPERIMENTAZIONI | 55 56 66 67 67 68 79 80 | |
| 3 | 2 2.2 2 2 2 2 2.3 F | 2.1.1 2.1.2 2.1.3 MO 2.2.1 2.2.2 2.2.3 MO RACCOI | IPOTESI DI PARTENZA DERIVAZIONE DEL MODELLO RISULTATI DELLO DI FUJIKAWA-AKAMATSU[56] IPOTESI DI PARTENZA DERIVAZIONE DEL MODELLO RISULTATI DELLO UTILIZZATO NELLE SPERIMENTAZIONI TA DATI SPERIMENTALI | 55 56 66 67 67 68 80 84 | |
| 3 | 2 2.2 2 2 2 2 2.3 F 3.1 | 2.1.1 2.1.2 2.1.3 MO 2.2.1 2.2.2 2.2.3 MO RACCOI | IPOTESI DI PARTENZA DERIVAZIONE DEL MODELLO RISULTATI DELLO DI FUJIKAWA-AKAMATSU[56] IPOTESI DI PARTENZA DERIVAZIONE DEL MODELLO RISULTATI DELLO UTILIZZATO NELLE SPERIMENTAZIONI TA DATI SPERIMENTALI TERIALI | 55 56 66 67 67 68 80 84 84 | |

| 3.2.1 | Spettroscopia a correlazione fotonica | |
|----------|---------------------------------------|-----|
| 3.2.2 | Tensiometro ad anello | 92 |
| 3.2.3 | Spettrofotometro UV-Visibile | 93 |
| 3.2.4 | Microscopia ottica | 95 |
| 3.3 PRI | EPARAZIONE NANOBOLLE | 97 |
| 3.3.1 | CARATTERIZZAZIONE NANBOLLE | |
| 3.4 RIS | ULTATI | |
| 4 CONCL | USIONE | 129 |
| 5 BIBLIO | GRAFIA | 131 |
| | | |

RINGRAZIAMENTI

Desidero iniziare i miei ringraziamenti esprimendo la mia profonda gratitudine alla mia famiglia, che mi ha sostenuto in ogni momento del mio percorso e mi ha incoraggiato a perseguire i miei obiettivi con determinazione e passione, anche quando ero io la prima a non crederci, anche quando eravate distanti per lavoro, anche quando purtroppo ci avete lasciato, siete e rimarrete i miei principali sostenitori, vi voglio bene.

Vorrei poi ringraziare il mio relatore, Umberto Lucia, che mi ha guidato e supportato durante tutto il processo della mia tesi. Le sue competenze, la sua disponibilità e il suo entusiasmo per la ricerca mi hanno ispirato e motivato ad affrontare le sfide che ho incontrato lungo il percorso. Sempre disponibile e con un occhio di riguardo per il mio futuro. Un ringraziamento speciale anche a Giulia Grisolia.

Vorrei ringraziare la professoressa Cavalli, sempre pronta ad aiutarmi in tutto il percorso sperimentale di questa tesi, grazie per aver messo a mia disposizione il suo laboratorio e la sua equipe e per aver creduto in me durante tutti questi mesi di lavoro insieme.

Un ringraziamento speciale va anche ai miei amici, che hanno condiviso con me le gioie e dolori di questo percorso di studi, anche tutti quelli che alla parola "ingegneria" hanno rabbrividito. La loro presenza costante e il loro supporto morale mi hanno aiutato a superare i momenti più difficili e ad andare avanti, oltre ad avermi portato felicità assoluta in questi cinque intensi anni, le sensazioni che mi avete dato mi rimarranno per sempre addosso.

Grazie di cuore a tutti voi!

ABSTRACT

La soluzione più utilizzata dopo una diagnosi di tumore associata alla rimozione chirurgica è la terapia chemioterapica. Tuttavia, si tratta di una terapia che si porta dietro numerosi effetti collaterali e, soprattutto, il problema di essere un trattamento sistemico e quindi non selettivo, con un efficacia ridotta rispetto a un sistema di drug delivery e che non mira solo al tessuto cancerogeno, ma mette a rischio anche il tessuto sano. Per questo motivo lo studio di questo progetto si è indirizzato verso una nuova terapia di somministrazione di farmaci più efficace, selettiva e sicura: le nanobolle. L'obbiettivo della tesi è quello di validare un nuovo prodotto di combinazione farmaco-dispositivo che sfruttasse l'interazione tra gli ultrasuoni e le nanobolle per promuovere il rilascio di un farmaco antitumorale per l'home therapy. Si è studiata la validazione di uno strumento ultrasonoro portatile a basso costo per uso estetico come strumento valido a livello clinico per l'effettivo rilascio del farmaco. Questo ha permesso di promuovere la possibilità di un trattamento terapeutico semplice ed economico fruibile a casa grazie alla trasportabilità dello strumento.

I vantaggi dell'utilizzo di un sistema mediato da ultrasuoni sono molteplici e sono spesso conseguenza di un fenomeno chiamato cavitazione acustica che coinvolge l'uso degli ultrasuoni per indurre cambiamenti pressori e di temperatura che promuovono la formazione di bolle. Nel nostro studio si è sfruttata la cavitazione stabile che vede l'oscillazione, lineare e non lineare, della parete della bolla attorno a un punto di equilibrio e che permette il rilascio di un eventuale farmaco incapsulato all'interno del sistema, evitando l'implosione della bolla che potrebbe causare danni ai tessuti circostanti.

Per ottenere delle bolle di dimensioni nanometriche si è ricorsi alla tecnica dell'ADV (Acoustic Droplet Vaporization) e quindi alla formazione di nanogocce che incapsulano un core di perfluorocarburo, questo possiede un basso punto di ebollizione, rimane liquido alla temperatura corporea e può entrare nella microcircolazione tumorale, ma una volta irradiato da un'onda ultrasonora subisce un cambiamento di fase e vaporizza. Per rendere il sistema più stabile, ma allo stesso tempo abbastanza flessibile, si è pensato di ricorrere alla tecnica del multilayer di Langmuir-Blodgett per rivestire le nanobolle e sfruttare l'interazione che si ha tra uno strato di fosfolipidi e uno strato di chitosano in modo da promuovere la stabilità rispetto alla dissoluzione del gas e alla coalescenza. È importante inoltre ottenere uno shell che sia abbastanza flessibile da permettere l'oscillazione della parete durante l'insonazione e quindi il rilascio mirato del farmaco, per fare ciò l'idea di ottenere un bilayer governato da interazioni elettrostatiche e idrofobiche risulta la scelta più sensata.

In generale, grazie ai risultati ottenuti si è stati in grado di porre le basi per lo sviluppo e la validazione di un nuovo dispositivo portatile ed efficace per il trattamento tumorale e si è stati in grado di formulare delle nanobolle stabili, con una bassa tensione superficiale e in grado di rilasciare in modo efficace il farmaco incapsulato.

CAPITOLO 1

1 ASPETTI INTRODUTTIVI E TEORICI

1.1 TRASPORTO DI FARMACI ANTITUMORALI

La chemioterapia viene utilizzata come trattamento primario per tutta quella sfera di tumori maligni che non possono essere rimossi chirurgicamente, tuttavia nonostante la sua fama questo trattamento si porta dietro numerosi effetti collaterali e soprattutto il principale problema di essere un trattamento sistemico e quindi non selettivo, con un efficacia ridotta rispetto a un sistema di drug delivery e soprattutto il trattamento mira non solo al tessuto cancerogeno ma mette a rischio anche il tessuto sano [1].

Tra i principali effetti collaterali vediamo immunodepressione, nausea, vomito, alopecia, problemi cardiovascolari, problemi del sistema nervoso [2] [3]. Inoltre determinati tumori non sono facilmente raggiungibili dal trattamento a causa di un alta pressione interstiziale, la presenza della matrice cellulare, una vascolarizzazione non completa dell'ambiente tumorale e in generale un ambiente ipossico [4].

Per combattere tutti gli effetti collaterali associati, migliorare il trattamento rendendolo più efficace, più selettivo e più sicuro la ricerca si è concentrata nel sviluppare nuovi sistemi di drug delivery caratterizzati principalmente da nanoparticelle che sfruttassero semplicemente l'effetto EPR (Enhanced Permeability and Retention) oppure che rispondessero in modo "intelligente" agli stimoli, i quali possono essere la variazione di PH, la variazione di temperatura, la presenza di uno specifico enzima ecc. Le principali nanoparticelle studiate sono state nanoparticelle metalliche, lipidiche e polimeriche. Ognuna di esse porta con sé vantaggi e svantaggi principalmente legati alla loro biocompatibilità e biodegradabilità. Per questo motivo la ricerca si sta indirizzando verso lo studio di micro e nanobolle associate all'utilizzo di ultrasuoni perché sono in grado di fornire un sistema di drug delivery biocompatibile, efficace e in grado di essere monitorato in real time.



Figura 1.1.1 difetti della vascolarizzazione tumorale [eseguita con Biorender]

1.2 RATIONAL DELLA TESI E L'HOME THERAPY

Lo scopo della tesi è quello di studiare ed ottimizzare un metodo alternativo alla classica terapia chemioterapica sistemica, focalizzandosi sull'interazione tra un sistema di trasporto di farmaco basato su nanobolle e gli ultrasuoni. Nel mondo della ricerca, lo studio sulle nanobolle come drug delivery system ha preso sempre più piede, grazie alla loro capacità di essere visualizzate in real-time, alla loro biocompatibilità e biodegradabilità. Tuttavia, il loro utilizzo è confinato in ospedale in quanto questo sistema di trasporto è mediato da ultrasuoni per poter funzionare, quindi per svolgere la terapia il paziente è costretto a recarsi in reparto e attendere la fine del trattamento. Numerosi studi[5][6][7] hanno dimostrato che il benessere psicologico è essenziale per ottimizzare un trattamento antitumorale, l'obbligo del paziente di recarsi più volte a settimana in ospedale per ricevere il trattamento adeguato incide sulla qualità della vita in modo notevole, se poi consideriamo quella sfera di pazienti che sono impossibilitati a muoversi con facilità per complicazioni della malattia, come può essere un tumore alle ossa, la possibilità di ricevere un trattamento comodamente a casa potrebbe dare un notevole beneficio alla cura del paziente. Da qui è nata l'idea di validare uno strumento portatile e di basso costo, nato per uso estetico, come dispositivo ottimizzato e studiato per il trattamento specifico con la formulazione di nanobolle trovata nelle sperimentazioni e di conseguenza porre le basi per autenticarlo come un prodotto di combinazione per uso oncologico.

Un prodotto di combinazione è un prodotto diagnostico e terapeutico che combina l'uso di farmaci, dispositivi e/o prodotti biologici. Secondo il 21 CFR 3.2(e)[8] un prodotto di combinazione include:

- 1. Un prodotto compreso di due o più componenti regolabili che sono fisicamente, chimicamente o in altro modo combinati o mixati e prodotti come singola entità
- Due o più prodotti separati confezionati insieme come unità caratterizzati dalla presenza di un farmaco e un dispositivo, dispositivo più prodotto biologico o prodotto biologico e farmaco.
- 3. Un farmaco, un dispositivo o un prodotto biologico confezionati separatamente che in accordo con il piano sperimentale si intendono per uso esclusivo con un farmaco, dispositivo o prodotto biologico specifico approvati individualmente, dove entrambi devono soddisfare i requisiti d'intento d'uso, di indicazione e di effetto e laddove viene approvato il prodotto proposto, l'etichetta dei singoli componenti viene modificata in modo da riflettere il cambiamento dell'uso, della dose, della strada di somministrazione...
- 4. Ogni farmaco, dispositivo o prodotto biologico sperimentale confezionato separatamente che in accordo con la propria etichetta è per l'uso esclusivo con

9

altri specifici farmaci, dispositivi o prodotti biologici sperimentali individuali, dove entrambi devono soddisfare i requisiti di intento d'uso, indicazione o effetto

Questi tipi di prodotti si possono classificare come integrali o non integrali, i primi si caratterizzano come segue[9]:

- 1. Dispositivi che incorporano una sostanza come parte integrante e che questa se usata separatamente verrebbe considerata un medicinale
- Dispositivi adibiti alla somministrazione di farmaci e destinati a non essere riutilizzati, tendenzialmente hanno funzione di somministrazione, dosaggio e misurazione

I dispositivi non integrali sono formati da due o più parti separate, quindi dispositivo e farmaco, e non sono fisicamente integrati durante la loro produzione.

L'importanza dei prodotti di combinazione è stata valutata già a partire dagli anni 2000, dove l'industria iniziò a considerare che il futuro delle invenzioni terapeutiche non era limitato alle semplici categorie di farmaco, dispositivo o prodotto biologico. La vera innovazione, che poteva aprire le porte ad un aumento del valore terapeutico, arrivava da un approccio transdisciplinare: lo sviluppo sempre più in espansione della combinazione complessa di prodotti risultante dall' avanzamento tecnologico nella ricerca di nuovi farmaci, combinato a quello dell'ingegneria.

Questi prodotti hanno la potenzialità di aumentare la sicurezza, l'efficacia e la tollerabilità di un trattamento attraverso il controllo di rilascio di farmaco, facilità d'uso o il trasporto selettivo del farmaco. In molti casi sono sviluppati per migliorare la funzione di prodotti clinicamente approvati.

Tuttavia, questa categoria di prodotti non ha una definizione ufficiale nei regolamenti europei, i prodotti di combinazione hanno numerose difficoltà dal punto di vista regolatorio. Questo tipo di sistemi sono regolati sia dal regolamento EU 2017/745 [10] (regolamentazione dei dispositivi medici) sia dalla direttiva 2001/83/CE [11] in base al loro principale metodo di azione. Di conseguenza un prodotto di combinazione viene presentato o come farmaco o come dispositivo e l'intero processo dipende dal principale metodo d'azione, definito come l'azione terapeutica che dà il maggior contributo sull'intento terapeutico del prodotto.

L'unione europea gestisce i prodotti di combinazione e borderline separando le differenti componenti, che sono governate da differenti documentazioni. L'UE segue approcci complementari dove il prodotto di combinazione non è governato completamente da un regolamento o l'altro e la determinazione del PMOA (Principal Mode of Action) gioca un ruolo dominante nel decidere quale documentazione seguire, senza escludere altri requisiti rilevanti. Per garantire l'entrata in commercio sicura del prodotto, l'applicazione del regolamento o direttiva è associata al soddisfacimento di requisiti specifici di altre legislazioni rilevanti.

Negli USA i regolamenti per i dispositivi combinati sono differenti, l'FDA gestisce un DDC come un prodotto unico, controllato da un ufficio interno dedicato, mentre nell'unione europea i componenti vengono validati separatamente.

1.2.1 LA DIRETTIVA DEI PRODOTTI MEDICINALI E IL REGOLAMENTO DEI DISPOSITIVI MEDICI

Il percorso di approvazione di un prodotto combinato richiede l'intervento di due agenzie. La prima è un organismo notificato, un'organizzazione designata dall'UE per accedere alla conformità di determinati prodotti prima di immetterli in commercio, che gestisce le parti costituenti del device. La seconda è un autorità responsabile in primis dell'autorizzazione di medicinali. In base alla natura della sostanza, che definisce quale procedura seguire, questa autorità può essere un'autorità competente o l'EMA.

In relazione ai DDC ci sono due possibili vie di regolazione, in base al principale componente del dispositivo.

I prodotti medicinali per l'uomo sono governati dalla direttiva 2001/83/CE che gestisce tutte le combinazioni di azioni farmacologiche, immunologiche e metaboliche. Tutti i requisiti per la produzione, distribuzione, classificazione, etichettatura, vendita e pubblicizzazione del prodotto sono stabiliti da questa direttiva. Questa include i requisiti per compilare il dossier tecnico del prodotto: le informazioni di somministrazione e di prescrizione, i riassunti tecnici, i problemi di qualità e i report clinici e non clinici, ma non fornisce altri dettagli del prodotto di combinazione. Principalmente esplora il significato di "parte integrale" del sistema e quindi stipula che il dispositivo va combinato con uno specifico farmaco nel momento della produzione, applicazione e somministrazione del prodotto finito. La direttiva, inoltre, introduce il concetto di uso medico ben stabilito, molto utile quando si ha a che fare con dispositivi medici che incorporano sostanze note con un applicazione ben stabilita (i quali hanno un dossier a parte dove vanno riportate le bibliografie scientifiche in modo dettagliato). L'organismo notificato che gestisce la pratica può chiedere un opinione sul farmaco dall'autorità competente nazionale o dall'EMA, laddove l'agenzia avesse già valutato tale sostanza. Questo velocizza i tempi perché se il prodotto contiene una sostanza nota i dati di sicurezza originali su quella sostanza non sono richiesti se si fa riferimento a ricerche in letteratura, esperienza o informazioni attendibili.

La legge 2017/745, anche conosciuta come **regolamentazione dei dispositivi medici**, gestisce i prodotti di combinazione con un metodo d'azione principale fisico. La definizione di un prodotto di combinazione, secondo tale regolamentazione, consiste di un device che incorpora una sostanza come parte integrante. Questa sostanza deve soddisfare tre requisiti: (1) se usato separatamente, viene considerato un prodotto

12

medicinale col il significato dell'articolo 1 della direttiva sui prodotti medicinali, (2) deve essere affidabile nell'agire sul corpo umano, (3) deve essere ausiliario. Osservando la parte del dispositivo medico in sé, la sua valutazione è sotto la responsabilità dell'organismo notificato e dell'autorità competente, ma solo l'organismo notificato può approvare il device. Questo determina se il prodotto va incontro ai requisiti di applicabilità del marchio CE, fornendo una valutazione di conformità pre-marketing. La richiesta di autorizzazione di marketing deve includere un certificato CE e un'opinione dal corpo notificato sulla propria conformità. Questo costituisce la prova necessaria sulla conformità della pare di device con requisiti di sicurezza generale e performance. Quando il prodotto ha il permesso di porre il marchio CE è a un passo dall'immissione sul mercato.

Oltretutto, la legge distingue due tipi di prodotti integrali: il primo consiste di un device che incorpora sostanze medicinali come parte integrale, ma quando l'azione della sostanza medicinale incorporata è primaria il prodotto combinato è governato dalla direttiva 2001/83/CE unita ai requisiti di performance e sicurezza della regolamentazione dei dispositivi medici, invece se l'azione del medicinale è secondaria il prodotto è regolato come device medico e quindi deve essere certificato CE. Nel secondo caso, i dispositivi medici che somministrano farmaci sono gestiti dalla direttiva 2001/83/CE solo se il prodotto medicinale e il device di somministrazione sono messi in commercio come unico prodotto integrale e non riutilizzabile.



Grafico 1.2.1.1 Riassunto per la classificazione dei prodotti di combinazione

Il nostro dispositivo è un sistema di drug delivery combinato con lo strumento specifico portatile che genera ultrasuoni, quindi potrebbe essere trattato come prodotto medicinale o come dispositivo medico a seconda che consideriamo il principale metodo d'azione del nostro sistema sia fisico/meccanico (nel nostro caso gli ultrasuoni) o metabolico/farmacologico (nel nostro caso la somministrazione di un farmaco antitumorale). Nello specifico il nostro sistema è costituito da due parti, medicinale e device, che sono separate ma ottimizzate se lavorano insieme, inoltre il principale metodo d'azione è il trasposto di farmaco antitumorale quindi ci troviamo nella categoria in cui il PMOA è farmacologico e dove i dispositivi non sono integrali di conseguenza il regolamento a cui fare affidamento è quello della direttiva 2001/83/EC, ricordando comunque che il device da solo deve seguire le norme del regolamento sui dispositivi medici.

1.2.2 SPECIFICHE DISPOSITIVO

Il dispositivo usato per generare gli ultrasuoni è della Dermasystem, modello B-730. È un device che possiede 3 probe di utilizzo che lavorano alle seguenti frequenze: 1MHz, 2MHz e 3MHz. Nel pannello di controllo si possono settare tre differenti parametri: l'intensità espressa in W/cm², il pulse che va da 0% a 90% e il tempo espresso in min. Il prezzo attuale in commercio del dispositivo è 26.300,00 \$.



Figura 1.2.2.1 Pannello di utilizzo del dispositivo



Figura 1.2.2.2 Dispositivo ultrasonoro B-730 Dermasystem

Per selezionare il giusto dosaggio si è studiato il manuale del dispositivo, il quale obbliga di usare delle intensità comprese tra 0,2W/cm² e 3W/cm², inoltre stabilisce che per poter generare ultrasuoni continui bisogna settare il pulse al 90% altrimenti otteniamo ultrasuoni impulsivi, infine imposta il tempo massimo di un trattamento a 15 min.

Nel manuale troviamo anche i parametri consigliati per specifici trattamenti estetici, questi non vengono riportati perché non inerenti allo scopo della tesi, e i metodi di pulizia dello strumento.

Per quanto riguarda le specifiche tecniche:

- Alimentazione: 220V-240V
- Potenza/60Hz
- Frequenza di lavoro automatica: 1MHz
- Tempo di lavoro: 30 min
- Potenza di uscita: 0.2-0.3 W

L'obbiettivo della tesi è quello di valutare la stabilità delle nanobolle e l'efficacia di rilascio del farmaco incapsulato in base ai diversi parametri scelti per gli ultrasuoni, mantenendosi nei range di tempo e intensità definiti dal manuale. In questo modo noi ottimizziamo lo strumento sulla formulazione di nanobolle specifica e poniamo le basi per validare lo strumento, nato per uso estetico, per uso clinico esclusivo per mediare le nanobolle che abbiamo formulato appositamente in laboratorio.

1.3 LA CAVITAZIONE

Il fenomeno della cavitazione è associato alla formazione di bolle, contenenti gas disciolto o vapore, e avviene nel momento in cui la pressione scende al di sotto della pressione di vapore o la temperatura supera la temperatura di ebollizione. La cavitazione acustica coinvolge l'uso degli ultrasuoni per indurre cambiamenti pressori e di temperatura e permettere la formazione di bolle all'interno del liquido. La fase di partenza della cavitazione si chiama nucleazione, questo infatti è il primo processo per cui vengono a formarsi delle cavità nel liquido. [5] [6][14]

Quando un liquido viene irradiato da un'onda ultrasonora, si vengono a formare tante piccole bolle, questo perché nella fase di rarefazione dell'onda, la pressione locale diventa negativa. Una pressione negativa è possibile unicamente nei liquidi e nei solidi, mentre risulta impossibile nei gas, come risultato otteniamo che il gas dissolto nel liquido diventa una bolla perché non è più in grado di dissolversi al di sotto di pressioni negative. Come detto in precedenza, durante la fase di rarefazione, le bolle si espandono man mano che la pressione alla parete della bolla si mantiene maggiore rispetto alla pressione del liquido, durante la fase di compressione alcune di queste bolle collassano violentemente portando alla formazione di un'onda d'urto nel liquido. La formazione di bolle e il loro eventuale collasso è il fenomeno che viene chiamato cavitazione acustica [13].

Quindi, in generale, quando un liquido è sottoposto ad onde pressorie (ultrasuoni) caratterizzate da picchi positivi e negativi e, se l'intensità dell'ultrasuono è abbastanza forte, si è in grado di vaporizzare il liquido formando bolle di cavitazione che si restringono e crescono a seconda della porzione positiva o negativa di pressione dell'onda [15].

Esistono due tipi di cavitazione acustica: la cavitazione non inerziale o stabile che vede l'oscillazione, lineare e non lineare, della bolla attorno a una dimensione di equilibrio e la cavitazione inerziale che vede la bolla crescere almeno il doppio rispetto alla dimensione originale e generalmente durante un singolo ciclo di pressione acustica, in questo caso le bolle sono caratterizzate poi da un violento collasso [12].

Durante la cavitazione stabile, abbiamo una diffusione di gas verso l'interno durante il ciclo di espansione, mentre una diffusione verso l'esterno durante il ciclo di compressione. Nel caso di oscillazioni simmetriche, il flusso netto di gas risulta nullo, tuttavia a più alte intensità gli ultrasuoni causano una non linearità nel comportamento della bolla, promuovendo un allungamento della fase espansiva dal momento che le bolle sono maggiormente resistenti alla compressione. Quindi quando la fase espansiva permane abbiamo un flusso netto di gas verso l'interno della bolla, questo fa sì che le bolle crescano fino al raggiungimento della dimensione di risonanza che crea un tipo di oscillazione stabile, responsabile della formazioni di microflussi di liquido attorno alla bolla con velocità di taglio proporzionale all'ampiezza dell'onda [15][16][17][18]. Ad alte pressioni, ci troviamo di fronte alla cavitazione inerziale, le bolle implodono violentemente dopo pochi cicli e queste si frammentano in bolle più piccole che serviranno da nuclei di cavitazione ed eventualmente collasseranno. Questo fenomeno porta la pressione e la temperatura a centinaia di MPa e K, concentrando l'energia in un volume molto piccolo.

I risultati della cavitazione sono: l'effetto di sonoporazione, cioè l'apertura di buchi transitori all'interno della membrana cellulare, l'aumento di temperatura che influenza la fluidità della membrana fosfolipidica, l'assorbimento dell'energia meccanica da parte delle proteine che potrebbe alterare la loro conformazione strutturale e funzionale, la rottura delle bolle e il rilascio dei farmaci in esse contenute che viene notevolmente favorito grazie alla formazione dei microflussi attorno alle bolle stesse[15].

1.4 LA SONOPORAZIONE

Gli ultrasuoni sono in grado, quindi, di innescare cambiamenti nelle proprietà fisiche dei materiali e allo stesso tempo la cavitazione acustica è in grado di perturbare l'integrità strutturale delle cellule, massimizzando l'uptake cellulare di molecole ad alto e basso PM e il rilascio controllato di farmaci. L'uso degli ultrasuoni permette un meccanismo di rilascio efficiente e sicuro grazie all'effetto della sonoporazione e permette un sistema di monitoraggio in real-time durante il rilascio di farmaci.

È importante sottolineare che l'interazione degli ultrasuoni con i tessuti può indurre diversi effetti (meccanici, chimici e termici) in base ai parametri scelti per il setting degli ultrasuoni[16]. La cavitazione stabile è indotta da ultrasuoni di bassa intensità ed è proprio questo fenomeno a causare la contrazione ripetuta delle microbolle e induce la formazione di microflussi attorno alle bolle stesse. Questo avvenimento induce uno stress di taglio sulle membrane cellulari, andando ad influenzare la permeabilità della membrana. La sonoporazione è il termine che descrive la formazione di pori all'interno della membrana in seguito all'esposizione di ultrasuoni. Di conseguenza la sonoporazione è uno strumento essenziale e promettente per il trasferimento di geni o farmaci all'interno delle cellule usando microbolle mediate da ultrasuoni che possono temporaneamente permeabilizzare le membrane cellulari.

La sonoporazione può interferire con l'integrità del citoscheletro dei microtubuli e indurre una disorganizzazione transitorio nella rete α -tubulina. Il citoscheletro dei microtubuli ha numerosi ruoli all'interno dei processi cellulari, tra questi vi è il supporto strutturale; il suo disassemblaggio permette di aumentare la permeabilizzazione della membrana. La sonoporazione risulta, quindi un atto di traumatizzazione della membrana acuto ma transitorio. [19][20]. Le alterazioni transitorie della membrana si possono notare nella variazione della forma delle cellule e in particolare nella deformazione dello spessore e del piano del doppio strato lipidico, attivando canali ionici ed alterando la distribuzione intracellulare degli elettroliti (Ca2+) [21]._In letteratura è stato riportato che a basse intensità di US vengono associati due meccanismi che promuovono l'uptake cellulare: la creazione di pori nella membrana e un riarrangiamento della membrana che porta all'endocitosi, un processo di trasporto attivo ottenuto tramite modificazione della membrana che forma una vescicola [16][22].

In base ai parametri degli ultrasuoni i pori indotti nella membrana cellulare si riassorbono nel tempo con cinetiche differenti, ovviamente il periodo di apertura dei pori determinerà il quantitativo di farmaco assorbito e le sue dimensioni così come la viabilità delle cellule. Zhao et al [24] hanno dimostrato che la cavitazione indotta dagli US è in grado di aprire pori di 200/300 nm e la maggior parte di questi si è richiusa nelle 24 h preservando la viabilità cellulare[16].

Dalla letteratura, inoltre, si è notato che la forza radiante acustica porta le microbolle a muoversi in modo traslazionale, queste, infatti, quando cavitano assorbono una parte di energia ultrasonora sottoforma di gradiente pressorio e sono portate a seguire la direzione del fascio ultrasonoro. Ovviamente questo meccanismo può aiutare le bolle ad aderire a target specifici e può essere usato per spingere le bolle verso la superficie delle cellule e promuovere un trasporto di farmaco selettivo[16][23].

20



Figura 1.4.1 Gli effetti della sonoporazione sulle membrane cellulari [eseguita con Biorender]

1.5 LA NUCLEAZIONE ASPETTI GENERALI E INTRODUTTIVI [25]

Una trasformazione di fase è un cambiamento discontinuo della microstruttura di un materiale. Questa avviene quando è possibile riconfigurare il materiale in modo da abbassarne il potenziale termodinamico, sia a livello cinematico che termodinamico

La driving force per una trasformazione a temperatura e pressione fisse è un abbassamento dell'energia libera di Gibbs.

$$G = E - TS + PV = \mu N \tag{1}$$

Consideriamo un sistema caratterizzato da due fasi: $\alpha \in \beta$, dove l'equilibrio del sistema è posto nella struttura α ad alta temperatura e nella struttura β a bassa temperatura. Come

si vede dal grafico è possibile mantenere la struttura α in uno stato metastabile al di sotto della temperatura T₀



Figura 1.5.1 Diagramma di stato T-G

Come abbiamo detto in precedenza la trasformazione più favorevole è quella che abbassa il potenziale termodinamico del sistema. La trasformazione consiste in quella che richiede il minor disturbo della fase metastabile α , quindi che prevede la formazione di un nucleo di fase β all'interno della fase α . Quando un nucleo stabile si forma, l'energia libera decresce continuamente mentre il nucleo cresce e consuma α .

Questo processo si chiama nucleazione: fluttuazione finita nella quale piccoli elementi della fase di partenza spontaneamente diventano uno stato che sarà simile al prodotto. Le fluttuazioni che portano alla nucleazione sono locali. Quando i nuclei si formano in posizioni randomiche si parla di nucleazione omogenea, quando sono confinati in siti catalitici si parla di nucleazione eterogenea.

Dal momento che la nucleazione richiede un significante cambiamento nella fase di partenza, la trasformazione può essere repressa o ritardata raffreddando il materiale a sufficiente velocità. Tuttavia, la fase α non può essere raffreddata indefinitamente, sotto una certa temperatura diventa termodinamicamente instabile e si trasforma (si vede la fine della curva α).

L'energia libera del nucleo è la somma di due contributi: il nucleo introduce un piccolo volume di fase prodotto (dal momento che la fase prodotta è più stabile il cambiamento di energia libera è negativo), inoltre la formazione del nucleo crea un'interfaccia e la sua energia è necessariamente positiva e aumenta l'energia libera.

Quando il nucleo è tanto piccolo r²>r³ e domina il termine superficiale (nucleazione aumenta l'energia), quando il nucleo è più grande domina il termine di volume (nucleazione diminuisce l'energia).



Figura 1.5.2 Digramma che mette in relazione il raggio con la variazione di energia libera

La variazione di energia legata al volume è legata all'intero sistema più che al singolo nucleo:

$$\Delta G = V^{\beta} \Delta G_{V} \tag{2}$$

Quando le due fasi sono incomprimibili, ΔG_V è l'energia libera per unità di volume per la trasformazione $\alpha \rightarrow \beta$

L'interfaccia aggiunge la seguente energia:

$$\Delta G = \sigma^{\alpha\beta} S^{\beta} \tag{3}$$

 $\sigma^{\alpha\beta}$ >0 tensione interfacciale, S^{β} area

Segue che la variazione di energia libera nella formazione di un nucleo sferico è

$$\Delta G = \frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_V + 4\pi r^2 \sigma \tag{3}$$

L'energia libera cambia in base alla dimensione dei nuclei e raggiunge un massimo che corrisponde all'energia di attivazione necessaria da superare per formare i nuclei. Al massimo corrisponde la dimensione critica del nucleo.

Il massimo si raggiunge così:

$$\frac{d(\Delta G)}{dr} = 4\pi r^2 \Delta G v + 8\pi r \sigma = 0$$
⁽⁴⁾

Il raggio critico:

$$r_c = -\frac{2\sigma}{\Delta G v}$$
(5)

Ne consegue che l'energia di attivazione è:

$$\Delta G_H = -\frac{16\pi\sigma^3}{3(\Delta G \mathbf{v})^2} \tag{6}$$



Figura 1.5.3 Diagramma che rappresenta la variazione dell'energia interfacciale, dell'energia libera di volume e della variazione di energia libera di Gibbs in relazione al raggio

Man mano che le particelle crescono $\Delta G(r)$ aumenta (principalmente dominata dal rapido aumento dell'energia di superficie) implicando che la crescita della particella o la formazione continua di nuclei non è termodinamicamente favorevole, quindi la maggior parte di particelle dissolve. Poi nel momento in cui qualche particella raggiunge la dimensione critica e supera la barriera, la crescita delle particelle conduce a una diminuzione di $\Delta G(r)$ e quindi una tendenza favorevole alla continua nucleazione, tuttavia $\Delta G(r)$ è ancora maggiore di 0. Superato r0, $\Delta G(r)$ diventa negativa e la crescita delle particelle è altamente favorevole e porta alla formazione della nuova fase.

È stato determinato teoricamente che un liquido puro può vaporizzare solo alla spinodale (90% della temperatura critica) a causa della barriera energetica della nucleazione omogenea. Quindi il momento translazionale delle particelle subatomiche deve fornire abbastanza energia cinetica per provocare la vaporizzazione sopra 0.9 Tc.[26]

1.5.1 TERMODINAMICA DELLA NUCLEAZIONE

Abbiamo detto che la variazione di energia libera nel formare un nucleo omogeneo è

$$\Delta G = V^{\beta} \Delta G_{\nu} + \sigma^{\alpha \beta} S^{\beta} \tag{7}$$

 ΔG_V è la variazione di energia del sistema (α + nucleo) quando il nucleo si forma.

Le condizioni di equilibrio meccanico di un materiale incapsulato in una superficie sferica di raggio r e tensione $\sigma^{\alpha\beta}$ richiedono che la pressione soddisfi tale equazione:

$$P^{\beta} - P^{\alpha} = \frac{2\sigma^{\alpha\beta}}{r} \tag{8}$$

La differenza di pressione è molto grande quando il raggio è piccolo, quando $\alpha \in \beta$ sono soluzioni la composizione del nucleo β è variabile e si aggiusterà per minimizzare il potenziale termodinamico.

Immaginiamo un confine immaginario tra il nucleo e la fase circostante, dal momento che il nucleo è molto più piccolo la temperatura, la pressione e il potenziale chimico nella fase α non cambiano con la formazione del nucleo. La fase α agisce come riserva termodinamica. La regione all'interno del confine imamginario è un sistema aperto quindi il potenziale termodinamico che governa l'equilibrio è la funzione lavoro:

$$\Omega = E - PV - \sum_{K} \mu_{K} N_{K}$$
(9)

Questa ha un minimo quando il sistema raggiunge l'equilibrio, la sua variazione in seguito alla formazione del nucleo è:

$$\delta\Omega = \Delta\Omega_V V^\beta + \sigma^{\alpha\beta} S^\beta \tag{10}$$

 $\Delta \Omega_V$ è la variazione della funzione lavoro per unità di volume del nucleo.

Dal momento che:

$$\Omega_V = -\frac{PV}{V} = -P \tag{11}$$

Il cambiamento nella funzione lavoro per unità di volume è il negativo della variazione di pressione:

$$\Delta\Omega_V = -(P^\beta - P^\alpha) \tag{12}$$

quindi la driving force termodinamica per la nucleazione è uguale alla variazione del valore della funzione lavoro per il nucleo singolo:

$$\Delta G_V = \Delta \Omega_V = -(P^\beta - P^\alpha) \tag{13}$$

Come visto in precedenza, la barriera di attivazione che si oppone alla nucleazione omogenea e il raggio critico sono riportati sotto:

$$\Delta G_H = \frac{16\pi\sigma^3}{3(\Delta P)^2} \qquad r_c = \frac{2\sigma}{\Delta P} \tag{14}$$

Il raggio critico soddisfa la condizione dell'equilibrio meccanico per la caduta di pressione attraverso l'interfaccia.

Per calcolare l'energia di attivazione per formare un nucleo di dimensione critica, bisogna stimare la differenza di pressione tra le due fasi alla temperatura e potenziale chimico ambiente. La quantità che è facilmente misurabile è la variazione di energia libera di Gibbs in una trasformazione a temperatura e pressione costante:

$$\Delta g^{\alpha\beta} = \tilde{g}^{\beta} (T, P, \{x^{\beta}\}) - \tilde{g}^{\alpha} (T, P, \{x^{\alpha}\})$$
(15)

Con g densità molare dell'energia libera di Gibbs.

Quando il volume molare v^{β} della fase prodotto è indipendente da pressione e composizione chimica è possibile relazionare questa quantità alla variazione di pressione ΔP . La relazione è più semplice per un sistema ad una componente.

Quando la fase β nuclea dalla fase α la condizione di equilibrio chimico richiede che il potenziale chimico sia lo stesso

$$\mu^{\alpha}(P^{\alpha}) = \mu^{\beta}(P^{\beta}) \tag{16}$$

L'energia libera di Gibbs per un sistema a una componente è:

$$G = E - TS + PV = \mu N \tag{17}$$

Di conseguenza l'energia libera molare è:

$$g = \frac{G}{N} = \mu \tag{18}$$

La variazione di energia libera per mole per una trasformazione nella quale una fase omogena α è rimpiazzata da β alla pressione ambientale (P^{α}):

$$\Delta g^{\alpha\beta} = \Delta \mu^{\alpha\beta}(P^{\alpha}) = \mu^{\beta}(P^{\alpha}) - \mu = \mu^{\beta}(P^{\alpha}) - \mu^{\beta}(P^{\beta})$$
(19)

Che può essere scritta come:

$$\Delta g^{\alpha\beta} = -v^{\beta} \left(P^{\beta} - P^{\alpha} \right) \tag{20}$$

Dal momento che $\left[\frac{\partial \mu}{\partial P}\right]_T = \frac{v}{N} = v$ con v: volume molare

Assumendo che la fase β è incomprimibile, otteniamo:

$$-\Delta P \approx \frac{\Delta g^{\alpha\beta}(P^{\alpha})}{\nu^{\beta}} = \Delta G_{\nu}^{\alpha\beta}$$
(21)

Con $\Delta G_V^{\alpha\beta}$ si intende il cambiamento di energia libera per unità di volume, quando la fase α è rimpiazzata da β alla pressione ambiente.

1.6 LE NANOBOLLE E I LORO VANTAGGI

Le microbolle sono bolle di dimensioni micrometriche caratterizzate da due principali componenti: un nucleo gassoso detto core e un guscio esterno detto shell. Nel corso degli anni sono stati studiati vari materiali per la formulazione del sistema, andando ad ottimizzare la stabilità, la biocompatibilità e la risposta acustica. Come gas core vengono spesso usati I perfluorocarburi per via della loro bassa solubilità e il loro alto peso molecolare che ne promuove la circolazione[27][28]. Inoltre, la compressibilità del core gassoso permette al sistema di oscillare in risposta alla rarefazione e compressione del ciclo acustico di un'onda ultrasonora, nello specifico sono in grado di risonare alle frequenze diagnostiche. Per questo motivo le microbolle sono state usate principalmente come agenti diagnostici di contrasto[29].

Per quanto riguarda lo shell, questo è principalmente costituito da polimeri o lipidi e prevede spesso l'uso di tensioattivi. Infatti, un fattore importante della composizione dello shell è prediligere la stabilità. La diffusione del gas facilita le bolle più grandi ad espandersi rispetto a quelle più piccole, questo è un fenomeno definito come Ostwald ripening[30] e

ne compromette la stabilità. L'aggiunta di surfattanti[31] permette la formazione di un monolayer molecolare all'interfaccia che riduce la tensione interfacciale, parametro caratteristico della bolla, e limita la differenza di pressione tra l'esterno e l'interno della bolla. L'interazione molecolare tra il gas core interno e il liquido circostante è governata dalla tensione interfacciale, la differenza tra la pressione della bolla e l'esterno è detta pressione di Laplace ed è governata dalla seguente formula:

$$\Delta P = P_{in} - P_{out} = \frac{2\sigma}{R}$$

Dove σ è la tensione superficiale e R il raggio della bolla. Dal momento che la pressione di Laplace è inversamente proporzionale al raggio della bolla, le bolle di dimensioni minori avranno necessariamente un valore di pressione maggiore. Quando il gas dissolve dal core verso l'esterno, in seguito al gradiente pressorio, la bolla si restringe aumentando la pressione di Laplace. Il processo, quindi, accelera la velocità di dissipazione del gas promuovendo la rottura del sistema. Risulta, quindi, necessario cercare di ridurre il più possibile la tensione superficiale delle bolle per rendere il sistema più stabile possibile[32][33].

In generale le microbolle sono un sistema formato da uno shell e da un core gassoso che insieme all'uso di US viene usato per aumentare l'imaging di contrasto e fornire meccanismi efficienti per il trasporto e il rilascio di farmaci. Le microbolle si sono dimostrate agenti diagnostici e terapeutici di successo, tuttavia a causa delle loro dimensioni non sono in grado di penetrare effettivamente nella microcircolazione dell'ambiente tumorale né di sfruttare l'effetto EPR. Di conseguenza la necessità di scendere alla scala nanometrica è sempre più forte, in modo da massimizzare l'efficienza del trasporto dei farmaci antitumorali. Oltre al fatto che i pori all'interno del sistema vascolare tumorale vanno dall'ordine dei centinaia di nanometri a pochi micrometri [34], all'interno dell'ambiente tumorale tumorale vi è un alta pressione interstiziale che non facilita

l'utilizzo delle microbolle, tutto ciò risulterebbe in un inefficiente uptake cellulare del farmaco e in una ridotta penetrazione.

Ultimamente per ottenere delle bolle di dimensioni nanometriche si è ricorsi alla tecnica dell'ADV (Acoustic Droplet Vaporization) e quindi alla formazione di nanogocce che incapsulano un core di perfluorocarburo, questo possiede un basso punto di ebollizione e rimane liquido alla temperatura corporea e può entrare nella microcircolazione tumorale, ma una volta irradiato da un'onda ultrasonora è in grado di avere un cambiamento di fase e vaporizzare così da ottenere effettivamente delle nanobolle[1][35].



Figura 1.6.1 Schema di una nanobolla [eseguita con Biorender]

1.7 GLI ULTRASUONI

Gli ultrasuoni sono radiazioni non ionizzanti e quindi non pericolose per il corpo umano e possono essere assorbite ripetutamente, infatti non sono in grado di causare effetti biologici negativi significativi né nell'immediato né nel lungo periodo. Possiedono un elevata risoluzione temporale e quindi sono in grado di seguire fenomeni in rapida evoluzione, questa caratteristica risulta molto importante per il nostro caso studio perché sono in grado di monitorare in real time l'evoluzione spaziale e temporale delle nanobolle oltre a permettere il rilascio in loco del farmaco in modo sicuro ed efficace.

Gli ultrasuoni non sono onde elettromagnetiche ma radiazioni acustiche che trasportano energia meccanica. Un'onda acustica è la propagazione di un'oscillazione di pressione in un mezzo alla velocità della luce. Gli ultrasuoni sono caratterizzati da una frequenza di oscillazione maggiore di 20kHz, la lunghezza d'onda dell'ultrasuono è definita come la lunghezza tra un'oscillazione pressoria e la successiva, mentre il periodo è definito come il tempo per compiere un'oscillazione pressoria, di conseguenza la frequenza viene definita come il numero di oscillazioni per l'unità di tempo. [13]

La formula che descrive nello spazio e nel tempo l'onda acustica è la seguente:

$$A sin(kx - wt)$$

Dove A si riferisce all'ampiezza dell'onda, k è il numero d'onda che corrisponde all'inverso della lunghezza d'onda e definisce il numero di oscillazioni di un'onda nell'unità di lunghezza e w corrisponde alla pulsazione: ossia una grandezza che misura la velocità con cui viene effettuata un'oscillazione completa nel moto armonico e si calcola come $2\pi/T$ dove T corrisponde al periodo.

Gli ultrasuoni sono onde meccaniche di compressione o rarefazione che permettono la propagazione nel tessuto, trasferendo a quest'ultimo energia meccanica andando ad eccitarne le molecole. Sono onde focalizzate con una velocità di propagazione che dipende dall'elasticità dei tessuti e il legame tra velocità e frequenza è il seguente:

$$v = \lambda f$$

Dove λ è la lunghezza d'onda.

Ogni mezzo è caratterizzato da un'impedenza acustica data dalla seguente relazione:

$$z = \rho v$$

Dove ρ è la densità del mezzo e v è la velocità di propagazione del mezzo.

L'impedenza è l'unica caratteristica che gli ultrasuoni sono in grado di vedere, è proprio la variazione di impedenza tra vari mezzi che genera il fenomeno della riflessione e ne permette una visualizzazione.

Il segnale ultrasonoro sfrutta le proprietà piezoelettriche di alcuni cristalli, cioè la loro capacità di contrarsi ed espandersi sotto l'azione di un campo elettrico. Possiamo avere un effetto inverso laddove applicando una variazione di tensione tra le facce di un cristallo ottengo compressione o dilatazione, mentre possiamo avere un effetto diretto quando al variare delle dimensioni del cristallo si viene a creare un campo elettrico. Con l'effetto piezoelettrico inverso pilotiamo i cristalli piezoelettrici con una tensione e generiamo l'onda ultrasonora, con l'effetto diretto invece siamo in grado di misurare e rilevare gli ultrasuoni. Le vibrazioni del cristallo producono onde elastiche di frequenza ultrasonora, purché il campo elettrico alternato eccitante possegga la frequenza adatta, detta frequenza di risonanza. Le onde ultrasonore si propagheranno nel materiale da esaminare con la stessa frequenza del generatore e con una velocità che dipende dal materiale attraversato come abbiamo spiegato in precedenza.

Quando l'onda ultrasonica attraversa i tessuti, è soggetta a determinate interazioni. Le caratteristiche più importanti sono le seguenti:

- Riflessione
- Scatter
- Assorbimento



Figura 1.7.1 Schema che rappresenta l'onda riflessa, incidente e trasmessa con i rispettivi orientamenti tra due mezzi di impedenza z1 e z2 [eseguita con Biorender]

Nell'attraversare l'interfaccia tra due mezzi abbiamo un'onda trasmessa e un'onda riflessa che sono caratterizzate rispettivamente dall'angolo di trasmissione e di riflessione che ne determinano l'orientamento. Il fenomeno segue la legge di Snell dove gli angoli di incidenza e riflessione coincidono

coefficiente di riflessione
$$R = \frac{z1\cos(t) - z2\cos(i)^2}{z1\cos(t) - z2\cos(i)}$$

coefficiente di trasmissione T = 1 - R

Per gli ultrasuoni ipotizzando gli angoli nulli otteniamo:

coefficiente di riflessione
$$R = \frac{z1 - z2^2}{z1 - z2}$$

 $coefficiente\ di\ trasmissione\ T = 1 - R$

Il coefficiente di riflessione è proporzionale all'energia acustica che torna indietro e permette la rilevazione e visualizzazione degli ultrasuoni. Da queste formule si può notare che se l'ultrasuono attraversa due mezzi con impedenza acustica simile si ha una trasmissione totale e quindi non otteniamo alcuna onda riflessa e non siamo in grado di rilevare nessun ultrasuono di ritorno. Nel momento in cui uno dei due mezzi è l'aria, la variazione di impedenza è elevatissima e il fascio ha una componente riflessiva molto alta, è proprio questo il motivo alla base della scelta di bolle come mezzo di contrasto ottimale per gli ultrasuoni.

Il fenomeno dello scattering invece vede la deviazione di moto dell'onda in qualsiasi direzione nel momento in cui incontra un mezzo eterogeneo, tuttavia questo fenomeno è nettamente inferiore rispetto all'intensità dell'onda riflessa e trasmessa.

I tessuti quando vengono colpiti dall'onda ultrasonora assorbiranno energia e vibreranno emettendo onde elastiche di frequenza tipica della propria risonanza. L'assorbimento dell'onda dipende:

- dalla densità ρ del tessuto
- dalla frequenza v dell'onda
- dall'impedenza Z del tessuto
- dall'ampiezza p dell'onda
- dall'intensità I dell'onda

Questo assorbimento di energia crea un'attenuazione del fascio ultrasonoro legato alla seguente formula:

$$A(z) = A_0 e^{-\alpha z}$$

Dove α è il coefficiente di attenuazione e z è l'impedenza. In generale l'attenuazione è proporzionale alla frequenza e possiamo misurarla in decibel con la seguente formula:
$$I = 20 \log_{10} \frac{A}{A_0}$$

In generale il fascio si attenua di 1 dB ad ogni cm di profondità e per ogni MHz di frequenza.

L'assorbimento del fascio converte l'energia in calore, di conseguenza un possibile effetto che abbiamo sui tessuti è l'aumento locale di calore. In seguito a questo effetto entra in gioco la dosimetria, il settore della fisica che si occupa di definire i limiti e misurare la dose somministrata di una terapia. Il danno biologico legato all'assorbimento di ultrasuoni può essere l'innalzamento locale di temperatura per incapacità del tessuto di dissipare l'energia in eccesso nello stesso tempo con cui gli viene fornita.

Le grandezze fondamentali che si introducono in dosimetria sono:

- la densità di correnti indotte
- l'assorbimento specifico (SA, Specific Absorption)
- la velocità di assorbimento specifico (SAR, Specific Absorption Rate): grandezza dosimetrica di riferimento

Gli effetti termici rappresentano l'interazione primaria tra le radiazioni elettromagnetiche ad alta frequenza (> 1 MHz) ed i tessuti biologici. Al di sotto del MHz l'effetto principale è rappresentato dalle correnti indotte mentre a basse frequenze il fenomeno che si sviluppa maggiormente è quello delle correnti parassite generate dal campo magnetico variabile. Il risultato di queste interazioni risulta in un trasferimento di energia ai tessuti.

Gli effetti dell'interazione delle onde elettromagnetiche con i tessuti biologici sono considerati il risultato di tre principali fenomeni: la penetrazione delle onde, l'interazione primaria con i tessuti biologici, i possibili effetti secondari prodotti dall'interazione primaria. Gli effetti biologici all'esposizione a campi possono essere classificati come effetti di alto livello (termici), livello intermedio (atermici) e basso livello (non termici). Uno degli aspetti più importanti di questo campo è il considerare la variazione termica dovuta all'esposizione in relazione al tempo di esposizione. Il modello fisico-matematico per valutare l'efficacia del trattamento termico è l'unità di dose termica ossia i minuti equivalenti cumulati (CEM = Cumulative Equivalent Minutes) di esposizione a 43°C. Per temperature superiori a 43°C si generano danni biologici alle cellule e ai tessuti.

$$CEM_{43} = \begin{cases} \sum_{i=1}^{N} R_{CEM}^{43-T_i} t_i & \text{per esposizioni discrete} \\ \\ \int_{0}^{\tau} R_{CEM}^{43-T_i} dt & \text{per esposizioni continue} \\ \\ t_i \ e \ l'i - esimo \ tempo \ di \ esposizione \ e: \\ \\ R_{CEM} = \begin{cases} 0.50 & \text{per} \quad T \ge 43 \ C \\ \\ 0.25 & \text{per} \quad T < 43 \ C \end{cases} \end{cases}$$

Per quanto riguarda la dose assorbita specifica (SAR = Specific Absorption Rate) ⇒ potenza assorbita o dissipata per unità di massa di un tessuto nell'interazione con un'onda elettromagnetica:

$$SAR = \frac{d}{dt} \left(\frac{dW}{dm} \right) = \frac{d}{dt} \left(\frac{dW}{\rho \, dV} \right) = \frac{1}{\rho} \frac{d}{dV} \left(\frac{dW}{dt} \right) =$$
$$= \frac{1}{\rho} \frac{d}{dV} \int_{V} \langle P_{cp} \rangle \, dV = \sigma \, \frac{|E_0|^2}{2\rho} = c \frac{dT}{dt}$$

W energia trasferita al tessuto dall'onda elettromagnetica ρ densità di massa.

La velocità di variazione della temperatura nei tessuti sottocutanei si determinata dal SARRR:

$$SARRR = \frac{SAR + P_m - P_c - P_p}{c}$$

Dove P_m è la potenza termica metabolica, P_c è la densità di potenza termica scambiata per conduzione e P_b è la densità di potenza termica scambiata con il flusso di sangue che permea il tessuto o l'organo.

I tessuti viventi hanno una grande capacità di compensare gli effetti indotti da perturbazioni esterne, campi compresi. In relazione alla struttura biologica e ai meccanismi di adattamento, cellule e tessuti biologici sono in grado di sopravvivere a moderati innalzamenti di temperatura.

Per caratterizzare l'effetto termico degli ultrasuoni sui tessuti si introduce l'indice termico TI (Thermal Index)

$$TI = \frac{\dot{W}_p}{\dot{W}_{deg}}$$

Dove \dot{W}_p è la potenza acustica nella zona del tessuto di interesse e \dot{W}_{deg} è la potenza acustica necessaria per innalzare di 1°C la temperatura del tessuto. Per i tessuti molli TIS (Soft Tissue Thermal Index)

$$TIS = \frac{v_c \dot{W}_{01}}{210}$$

Dove v_c è la frequenza centrale del treno d'onde e \dot{W}_{01} è la potenza dell'onda acustica misurata a 1 cm di apertura.

1.8 L'ADV (ACOUSTIC DROPLET VAPORIZATION)

Come spiegato in precedenza, un liquido a temperatura costante, e soggetto a un abbassamento di pressione al di sotto della pressione di vapore, si dice che subisce l'effetto della cavitazione. Grazie alle onde pressorie ultrasonore ci sono fluttuazioni di pressione positive e negative che oscillano attorno alla pressione atmosferica. Quando il ciclo refrattario va al di sotto della pressione di vapore, per un tempo sufficientemente lungo, avviene l'evaporazione e si formano delle bolle di gas. Nel momento in cui la somma della pressione locale e di Laplace va al di sotto della pressione di vapore, il potenziale di sub-pressurizzazione farà nucleare la fase gassosa (la sub-pressurizzazione è la differenza tra la pressione di vapore e la pressione locale), tuttavia se il ciclo acustico è troppo corto o la sub-pressurizzazione è inadeguata non si formerà alcuna fase gassosa. Questo meccanismo, anche noto come Acoustic Droplet Vaporization, viene sfruttato per ottenere delle nanobolle a partire da nanogocce quando queste vengono sottoposte ad un'onda acustica.

In seguito alla pressione di Laplace aggiuntiva, dovuta alla tensione superficiale delle gocce, la pressione all'interno del sistema è maggiore rispetto alla pressione di vapore, questo rende le nanogocce metastabili. In quanto tali non sono in grado di vaporizzare alla temperatura corporea, ma se esposte a un'energia acustica supplementare avviene il cambiamento di fase: queste crescono grazie un trasferimento di calore rettificato durante la fase di espansione del ciclo quando la pressione è sufficientemente bassa, la minima pressione acustica necessaria per vaporizzare le gocce è chiamata soglia ADV [36]

Il principale motivo per cui viene prediletto in questo progetto è legato al fatto di poter produrre bolle di scala nanometrica stabili e poter superare l'utilizzo delle microbolle che di per sé non sono in grado di immettersi nel microambiente tumorale e hanno una vita breve all'interno dell'organismo. Da un punto di vista tecnico, nella somministrazione di

39

farmaci questi si trovano spesso allo stato liquido e risulta più facile lavorare e mixare liquidi piuttosto che un liquido e un gas. [37] [38]

L'ADV può essere impiegato con ogni liquido che abbia un punto di ebollizione vicino o al di sotto della temperatura corporea, inoltre la fisica alla base del processo è legata alla tensione di vapore del liquido, che è funzione della temperatura e non della chimica del liquido stesso, tuttavia in campo biomedico bisogna considerare che il liquido deve essere biocompatibile e immiscibile in acqua. Per questo motivo si ricorre all'uso dei perfluorocarburi, caratterizzati bassa solubilità e bassa tossicità. Il migliore in termini di alta pressione di vapore, bassa solubilità, prezzo e disponibilità è il perfluoropentano (T di ebollizione=29.2°, pressione di vapore a 37°C di 135.05kPa) [39].

1.8.1 L'ADV E GLI ULTRASUONI

Pitt et al [40] hanno condotto vari esperimenti per valutare l'effetto degli ultrasuoni sul fenomeno dell'ADV, di seguito sono riportate le loro considerazioni.

Studiando gli effetti dell'**ampiezza** dell'onda pressoria sulle nanobolle hanno notato che il raggio massimo della bolla corrisponde alla pressione massima esercitata, così come la velocità di collasso. I dati hanno mostrato che quando la soglia di formazione del gas viene sorpassata, il raggio massimo e la velocità di collasso sono funzioni lineari e che le gocce di dimensioni minori producono un'inclinazione più ripida indicando che l'espansione è maggiormente sensibile alla pressione, questo può essere attribuito a una più alta pressione di Laplace che richiede più alte ampiezze per creare la driving force pressoria.

Inoltre, hanno notato che quando emulsioni di differenti dimensioni di partenza sono esposte alla stessa onda pressoria e temperatura le gocce più piccole non crescono come quella più large, anche questo da attribuirsi alla pressione di Laplace. Le bolle iniziano a crescere a differenti tempistiche, quelle più grandi iniziano prima perché meno affette da Laplace e crescono maggiormente. In termini di **temperatura** hanno visto che quando la temperatura aumenta la pressione di vapore aumenta e quindi l'espansione inizia precedentemente e le bolle diventano più grandi. A basse temperatura la pressione di vapore non è sufficiente a sorpassare quella di Laplace. Una volta superata la soglia il raggio massimo aumenta linearmente con la temperatura e la soglia di temperatura è funzione dell'ampiezza acustica: aumenta al diminuire dell'ampiezza. A temperature maggiori la driving force per il movimento attraverso la parete (differenza tra pressione di Laplace e pressione locale) aumenta.

Per quanto riguarda la **frequenza** vicino a 500kHz il raggio max e la velocità di collasso iniziano a decrescere all'aumentare della frequenza dell'onda questo perché la finestra temporale di crescita è minore.

1.9 MONOLAYER DI LANGMUIR-BLODGETT: ASPETTI INTRODUTTIVI[41]

I monolayer di Langmuir è un particolare film che si forma depositando monostrati di molecole anfifiliche da una superficie liquida a un substrato solido, quando le molecole anfifiliche e insolubili diffondono attraverso una soluzione di solventi organici e volatili (come ad esempio il cloroformio). Quando il solvente evapora si va a formare un film di molecole anfifiliche che può avere diversi gradi di impacchettamento a seconda della densità superficiale molecolare del film stesso. Spesso questi monolayer vengono usati per investigare le interazioni intermolecolari, mimando le biointerfacce come metà di una membrana cellulare e i tessuti biologici. [42]

Langmuir si basò sugli studi di Pockles per sviluppare un bacino avente barriere mobili in cui depositare le molecole anfifiliche e l'acqua. Se le molecole vengono lasciate libere si dispongono in maniera indipendente occupando la maggior area possibile, se queste vengono compresse mediante le barriere mobili, viene ridotta l'area e viene variata la tensione superficiale fino alla formazione del film sottile di molecole.

La tecnica di Langmuir- blodgett consiste in un movimento verticale di un substrato attraverso un'interfaccia aria-monolayer. L'obiettivo è la creazione di un film, depositando strati di molecole organiche anfifiliche, ancorato a un supporto rigido. Il metodo descritto in precedenza viene modificato e sfrutta l'immersione di un supporto rigido di vari materiali come vetro, ossido di indio-stagno, silica, quarzo e mica. Ad ogni immersione e conseguente estrazione si vede la deposizione di un singolo strato di film [43]. I 3 metodi tipici di estrazione sono i seguenti:

- Y-type: Si immerge il substrato idrofilico in maniera veloce (non vediamo assorbimento) e si estrae lentamente in modo che le teste polari interagiscano con esso, segue poi una lenta immersione in modo da far interagire le code idrofobiche del liquido con le code idrofobiche che spuntano dal substrato. Si ottiene un'interazione testa-testa/coda-coda. Possiamo partire da un substrato idrofobico che vede una prima lenta immersione.
- X e Z-type: nel film X il substrato è idrofobico e vede una lenta immersione per permettere l'interazione con le code poi viene rapidamente estratto e immerso lentamente, nel film Z il substrato è idrofilico e quindi nella prima immersione non vediamo assorbimento, vediamo l'assorbimento delle teste polari con una lenta estrazione e con una successiva veloce immersione otteniamo un'interazione testa-coda, invece di ottenere un'interazione di tipo Y.
- Super reticolo: prevede una sovrapposizione di layer di materiali diversi.

Nel nostro progetto l'utilizzo di questa tecnica verrà impiegato per la creazione di una membrana che ricoprirà le nanobolle al fine di ottimizzare la stabilità e il rilascio di farmaci.

Da un punto di vista termodinamico alcune molecole organiche si orientano all'interfaccia tra una fase liquida e gassosa in modo da poter minimizzare l'energia libera, il risultato è la creazione di un film che possiede uno spessore di una molecola e che viene chiamato layer monomolecolare. L'interfaccia che si crea tra la fase liquida e la fase solida segna una transizione tra la composizione e le proprietà delle due fasi di bulk ed avrà proprietà differenti da entrambe. A livello microscopico l'interfaccia non è statica ma vede una diffusione molecolare dinamica, per essere in equilibrio le molecole che diffondono dalla fase liquida alla superficie devono essere pari a quelle che lasciano la superficie. Inizialmente ci saranno più molecole che diffondono dalla superficie, aumentando la separazione atomica media tra le molecole superficiali. Successivamente l'energia di attivazione legata alla diffusione dalla superficie. La linea di forza che agisce sulle molecole superficiali si chiama tensione superficiale y:

$$\gamma = \left(\frac{\partial F}{\partial A}\right)_{T,V,n_i} = \left(\frac{\partial G}{\partial A}\right)_{T,P,n_i}$$

Essa è legata alle derivate parziali della funzione di energia libera rispetto all'area.

- F: funzione di Helmholtz F = U TS.
- G: funzione di Gibbs G = H TS.

La tensione superficiale è una proprietà che opera lungo l'interfaccia di separazione tra due diverse sostanze, nel nostro caso si tratta di un'interfaccia gas-liquido. Le forze di coesione del liquido fanno sì che le molecole superficiali siano influenzate da una forza diversa da zero che le spinge all'interno, questo porta le molecole a sfuggire dalla superficie e questa tende ad occupare l'estensione minima possibile. Le molecole superficiali, quindi, sono caratterizzate da un energia potenziale superiore rispetto a quelle più interne, quindi abbiamo un energia libera superficiale che caratterizza proprio la tensione superficiale[44].

Le variabili di stato estensive delle due fasi di bulk si assumono costanti fino a una superficie immaginaria che le divide e le quantità in eccesso descrivono le proprietà della superficie. Ad esempio, per un liquido puro in equilibrio con il vapore saturo, ad una interfaccia planare, possiede una tensione superficiale uguale all'energia libera di Helmholtz eccedente per unità di area: $\gamma = \frac{F^s}{4}$.

C'è un altro approccio che spiega la termodinamica della superficie nel quale la regione superficiale è considerata come fase separata con i propri valori di variabili estensive.

La tensione superficiale è un analogo alla pressione di vapore, rimane costante per le due fasi in equilibrio se la T è costante, ma varia con il variare di quest'ultima. Tuttavia, a differenza della pressione di vapore, la tensione superficiale decresce all'aumentare della temperatura fino a raggiungere un punto critico il cui valore diventa 0. La presenza di un monolayer su una superficie liquida influisce sulla tensione superficiale, che in questo caso possiamo chiamare pressione superficiale. Quest'ultima è uguale alla riduzione della tensione superficiale del liquido puro (γ_o) dovuta al film:

$$\pi = \gamma_o - \gamma$$

La pressione superficiale può essere calcolata mediante il piatto di Wilhelmy [43], il sistema è formato da un piatto aventi le seguenti dimensioni: t,l,w e immerso in un liquido. La forza totale che agisce sul piatto è la seguente:

$$\mathbf{F} = F_g + F_\gamma - F_b$$

 F_g : forza di gravità

 F_{γ} : forza impressa dalla tensione superficiale

 F_b : spinta idrostatica del liquido



Figura 1.9.1 Piatto di Wilhelmy con grandezze caratteristiche

Se indichiamo con θ l'angolo di contatto tra piatto e liquido, l'unica forza agente come componente di tensione superficiale è la forza tangente quindi:

$$F = mg + \gamma P \cos \theta - m_l g$$

m: massa del piatto

P: perimetro del piatto

 m_l : massa spostata dall'immersione del piatto

Se deriviamo rispetto alla pressione superficiale otteniamo:

$$\frac{\partial F}{\partial \gamma} = 2(t+w)cos\theta$$

Se consideriamo la superficie perfettamente bagnabile allora l'angolo di contatto sarà nullo e passando al differenziale otteniamo:

$$\frac{\Delta F}{\Delta \gamma} = 2(t+w) \rightarrow \pi = -\Delta \gamma = -\frac{\Delta F}{2(t+w)} \approx -\frac{\Delta F}{2w}$$

L'ultima approssimazione è possibile farla se consideriamo t<<w. Quindi possiamo risalire alla variazione di pressione superficiale a partire da una variazione di forza che agisce sul piatto

Le molecole di materiale che tendenzialmente formano il monolayer sono composte da una parte idrofilica (parte solubile) e una parte idrofobica (parte insolubile), quindi sono molecole anfifiliche. Normalmente i materiali vengono applicati alla superficie di subfase dissolvendoli inizialmente in un solvente opportuno e quando questo evapora le molecole organiche sono compresse a formare un solido 2D flottante. Le terminazioni idrofiliche e idrofobiche assicurano che durante il processo le molecole si allineano nello stesso modo. Quando il materiale per creare il monolayer viene posizionato sulla superficie, tenderà ad espandersi fino a che la pressione superficiale non raggiunge un equilibrio, quando questo verrà superato il monolayer comincerà a formare cristalli.

Mentre il monolayer viene compresso sulla superficie liquida incorrerà in numerose trasformazioni di fase, quest'ultime possono essere controllate andando a monitorare la pressione superficiale come funzione dell'area occupata dal film, questa è l'equivalente all'isoterma volume vs pressione nel caso 2D. in questo grafico è usuale dividere l'area del film A per il numero totale di molecole sulla superficie liquida per ottenere l'area per molecola:

$$a = \frac{AM}{CN_aV} = \frac{A}{cN_aV}$$

Dove M corrisponde al peso molecolare del materiale per formare il monolayer, C è la concentrazione della soluzione che diffonde nella massa per unità di volume, c e la concentrazione specifica e V il volume.

Nella fase gassosa, le molecole sono abbastanza lontane dalla superficie acquosa da percepire una forza molto piccola tra di loro e quindi non viene modificata la tensione superficiale, come l'area superficiale del monolayer si riduce le catene idrocarburiche inizieranno ad interagire e si formerà una fase "liquida" che normalmente viene chiamata fase espansa. In questa fase, le molecole sono disposte in modo randomico con i gruppi polari in contatto con la subfase e vediamo che la tensione superficiale cresce. Continuando a ridurre l'area molecolare inizia ad apparire una fase condensata, in questa fase le molecole sono impacchettate e orientate con le catene idrocarburiche che puntano all'esterno della superficie. La pressione superficiale continua a crescere anche oltre all'equilibrio fino a raggiungere un punto definito collasso, in questo caso le molecole vengono forzate ad uscire dal monolayer.



Figura 1.9.2 Diagramma equivalente all'isoterma volume vs pressione nel caso 2D

A livello termodinamico, la fase gassosa può essere modellata usando la teoria cinetica convenzionale di variazioni bidimensionali: le molecole nel film si assumono che si muovono con una energia cinetica translazionale media di kT/2 per ogni grado di libertà. In questo caso l'equazione del monolayer gassoso:

$$\pi a = kT$$

Quando inizia ad apparire la fase espansa, si può notare la formazione di una regione a pressione costante sull'isoterma, nella quale il film che galleggia è un mix tra le due fasi. La transizione di fase è considerata una transizione del primo ordine.

La transizione tra la fase espansa e quella condensata è grandemente affetta dalla lunghezza delle catene idrocarburiche e dalla temperatura, un aumento di T e una diminuzione della lunghezza delle catene aumenta la pressione superficiale. Si assume che le forze di van der Waals tra le catene sono largamente responsabili per la transizioni:

$$U = E_{intra} + E_{disp} + \pi a$$

Il primo termine è legato all'energia interna della catena singola, il secondo da l'interazione delle catene col vicinato.

L'equazione dei gasi ideale usata in precedenza non è più valida, bisogna usare un'approssimazione in cui l'interazione è favorita da un'agitazione termica e dove si considera il gas reale, affetto da variazione di area e pressione dovuta alla presenza di molecole reali:

$$(\pi - \pi_0)(a - a_0) = kT$$

Quando ci avviciniamo alla formazione della fase condensata con una pressione di vapore superiore a 25 mN m⁻¹, il monolayer galleggiante inizia a diventare incompressibile e appare una fase solida, compressioni seguenti portano alla formazione di uno stato definito close-packed che eventualmente può collassare. Le varie transizioni sono accompagnate spesso da piccole regioni a pressione costante associate con una variazione di energia del primo ordine.

Una componente importante delle fasi del monolayer è la sua compressibilità C definita come:

$$C = -\frac{1}{a} \left(\frac{\partial a}{\partial \pi} \right)_{T,P,n_i}$$

Con n il numero di moli del materiale. C può essere valutata direttamente dall'inclinazione dell'isoterma pressione superficiale vs area.

Quando il monolayer è altamente rigido, si comporta come un solido quando uno stress viene applicato e deformato elasticamente, altrimenti è più simile a un liquido e il layer fluirà in risposta a uno stress di taglio. Un parametro importante per quantificare il comportamento è il coefficiente di viscosità superficiale:

 $(shear stress) = \eta_s \times (rate of flow)$

Questi film di monolayer possono essere usati per ricoprire le nanobolle ottimizzando i parametri di tensione superficiale e sfruttando sinergicamente l'interazione tra materiali diversi come il chitosano e i fosfolipidi[45][46]. Questi ultimi sono i principali protagonisti delle membrane cellulari, sono formati da due catene idrocarburiche, dove una di queste non è satura. La doppia catena è essenziale per la corretta geometria che permette ai lipidi di formare la membrana, mentre la catena non satura aiuta a mantenerne la fluidità. La testa polare dei fosfolipidi è un gruppo fosfato che è collegata a un unità di glicerolo, collegato alle due catene da legami esterei. Tutti i fosfolipidi hanno una carica negativa sul gruppo fosfato a pH fisiologico e proprio questa carica negativa verrà sfruttata per ottenere un'interazione con il chitosano, di carica positiva, per rivestire le nanobolle.

1.10 CHITOSANO COME SHELL E INTERAZIONE CON I MONOLAYER DI LANGMUIR-BLODGETT

Il chitosano è un biopolimero che si trova in natura come materiale strutturale di alcuni funghi, ma principalmente si ottiene dalla deacetilazione della chitina che si estrae dal guscio di crostacei e molluschi[42].



Figura 1.10.1 Struttura del chitosano rappresentata mediante le proiezioni di Haworth.

Il chitosano è un ottimo candidato per formare lo shell della nanobolla, in quanto questo polisaccaride policationico è un sicuro mezzo di trasporto grazie alla sua bassa tossicità, la bassa immunogenicità, l'alta biocompatibilità e l'alta densità di carica positiva[47][48].

Il chitosano in soluzione, però, possiede una pochissima attività superficiale [42][49], questa aumenta con derivati modificati del chitosano come il carboxilmetilchitosano, chitosano alchilato oppure complessi chitosano-surfattanti [50]. Nel nostro progetto abbiamo scelto quest'ultima opzione per migliorare le proprietà superficiali del sistema e ridurre la tensione superficiale. Inoltre, l'uso del chitosano all'interno di un monolayer di Langmuir quando interagisce con una sostanza di carica opposta ha portato a un notevole aumento di attività superficiale.

L'alta densità di carica positiva permette al chitosano di avere molta affinità con i fosfolipidi che formano la membrana che ricopre la nanobolla, infatti si hanno una combinazione di interazioni elettrostatiche e idrofobiche. A livello molecolare, il chitosano disturba il packing della membrana. In base alle caratteristiche della membrana il chitosano ha un effetto diverso, se ci troviamo di fronte a un alto rapporto area/molecola il chitosano penetra tra le catene, permettendo interazioni elettrostatiche e idrofobiche con le teste polari, portando a un'espansione della membrana e soprattutto riducendo la tensione superficiale, parametro essenziale per la stabilità della nanobolla. Se il rapporto area/molecola è piccolo il chitosano non riesce a penetrare e va a formare una subsuperficie interagendo con le teste polari dei fosfolipidi e aumentando la pressione superficiale. Questo si spiega perché gli effetti di fluttuazione della membrana favoriscono interazione con alcune molecole, nello stesso modo il chitosano aumenta l'elasticità dinamica che distrugge l'integrità della membrana, promuovendo una distorsione locale delle code dei fosfolipidi. [50][51]



Figura 1.10.2 Schema illustrativo di come si dispose il chitosano in base all'area molecolare

Molti studi sono stati fatti sull'interazione tra chitosano e un monolayer di Langmuir, uno da prendere in considerazione è quello svolto da Pereira et al. in cui si sono concentrati sullo studio del chitosano e sul suo effetto su di un monolayer di Langmuir basato su raft lipidici. Queste sono regioni della membrana cellulare morfologicamente identificabili e rappresentate da accumuli di proteine e lipidi che conferiscono uno spessore maggiore (spesso formate da colesterolo, sfingolipidi e proteine di membrana), normalmente sono regioni molto dinamiche che vanno a reclutare altre proteine e lipidi. Lo studio ha concluso che usando i raft lipidici si ottengono effetti significativi a concentrazioni di chitosano minore rispetto alla sua interazione con semplici fosfolipidi [52].

Nello studio della professoressa Cavalli et al. [47], la formulazione utilizzata aveva lo scopo di ottenere un modello di trasporto piccolo. Hanno utilizzato un materiale polimerico per stabilizzare le bolle, andando a scegliere proprio il chitosano per via del suo riconosciuto utilizzo durante gli anni come rivestimento perché permette un sistema di delivery sicuro.

Nel nostro progetto l'uso del chitosano è molto importante, l'obbiettivo è andarne a sfruttare la forte interazione che ha con il layer di fosfolipidi e ottenere un coating delle nanobolle che ne promuovesse la stabilità rispetto alla dissoluzione del gas e alla coalescenza, andando ad abbassare la tensione superficiale del sistema. Inoltre, avendo un bilayer formato dal polimero positivo e dai fosfolipidi negativi siamo in grado di incapsulare diversi tipi di farmaci in modo efficiente, potendo sfruttare l'ambivalenza di carica del nostro sistema di trasporto. Vari studi hanno dimostrato che le bolle liposomiali hanno un'alta tendenza a degradarsi o aggregarsi e fondersi con la perdita risultante dalla conservazione del farmaco o dopo la somministrazione, portando a una scarsa stabilità i n vivo. Di conseguenza ricoprire le nanobolle con un layer di fosfolipidi non sarebbe la soluzione ottimale, al contrario il coating con il chitosano permette la formulazione di un sistema più stabile e resistente e permette di controllare meglio il rilascio del farmaco incapsulato. [53][42]. Nella review di Pavinatto et al è stata riportata un'importante caratteristica del bilayer chitosano-fosfolipidi, in quanto è in grado di rallentare il rilascio di farmaco, caratteristica essenziale per un trattamento antitumorale.

Inoltre, nel nostro caso è importante ottenere uno shell che sia abbastanza flessibile da permettere l'oscillazione della parete durante l'insonazione e quindi il rilascio mirato del farmaco, per fare ciò l'idea di ottenere un bilayer governato da interazioni elettrostatiche e idrofobiche risulta la scelta più sensata, così da sfruttare la capacità del chitosano di deformare la membrana e conferirne maggiore elasticità.

CAPITOLO 2

2 ANALISI DELLA TENSIONE INTERFACCIALE: OTTIMIZZAZIONE DEI MODELLI

L'obbiettivo della tesi è quello di ottenere una formulazione che puntasse a ridurre la tensione superficiale, per conferire stabilità, e ad ottimizzare il rilascio di farmaco in relazione ai parametri ultrasonori dello strumento utilizzato. Lo studio si concentra sull'analisi delle nanobolle rivestite da un monolayer di Langmuir per valutare la stabilità e il rilascio di farmaci antitumorali. Per dare un supporto matematico alla raccolta dei dati si è svolta una ricerca approfondita per presentare due dei modelli più accreditati e veritieri che descrivono la dinamica di una bolla quando viene insonata da onde acustiche, facendo riferimento alla *phase change emulsion* ossia quella situazione tipica dell'ADV dove abbiamo un liquido all'interno di nanogocce che vaporizza e si trasforma in gas.

Di seguito viene presentato un modello che rivisita l'equazione di Rayleigh-Plesset[54] per adattare questa teoria anche alla tecnica dell'ADV, tuttavia risulta un modello approssimato che non considera la comprimibilità del liquido e gli effetti diffusivi e termici. Per questo motivo verrà messo a confronto con il modello di Fujikawa-Akamatsu che rispecchia la complessità del problema, ma si porta dietro le problematiche della complessità computazionale.

Partendo dalla teoria che governa la dinamica di una bolla più accreditata e quindi il modello di Rayleigh-Plesset, svolgiamo un analisi comparativa dei modelli che si sono

basati su questa teoria e che hanno sviluppato equazioni più complesse per poter rispecchiare al meglio la realtà dinamica di una nanobolla. In meccanica dei fluidi la legge che governa la dinamica di una bolla sferica in un corpo fluido infinito e incompressibile è l'equazione di Rayleigh-Plesset. Essa è formulata come segue:

$$R\frac{d^{2}R}{dt^{2}} + \frac{3}{2}\left(\frac{dR}{dT}\right)^{2} + \frac{4\nu_{L}dR}{Rdt} + \frac{2\gamma}{\rho_{L}R} + \frac{\Delta P(t)}{\rho_{L}} = 0 +$$
(1)

R(t) è il raggio della bolla

 ρ_L è la densità del liquido circostant

 v_L è la viscosità cinematica del liquido circostante

 γ è la tensione superficiale dell'interfaccia bolla-liquido

 $\Delta P(t) = P_b(t) - P_{\infty}(t) \text{ con } P_b(t) \text{ pressione all'interno della bolla, e } P_{\infty}(t) \text{ pressione del liquido}$

Le assunzioni del modello proposto sono le seguenti: il liquido possiede una temperatura costante e una pressione nota variabile nel tempo che va a regolare la dinamica della bolla, la bolla viene considerata sferica, la densità del liquido è costante in quanto il liquido è considerato incomprimibile, la viscosità dinamica è costante e uniforme, la temperatura e pressione della bolla si considerano uniformi e non vi è trasporto di massa attraverso la superficie della bolla. Questo modello risulta molto semplice e approssimato, non considerando il trasferimento di massa e calore attraverso l'interfaccia o non prendendo in considerazione gli effetti termici e assumendo la composizione del gas, la tensione di vapore e l'incomprimibilità del liquido costanti.

È necessario implementare nuovi modelli che rappresentano in modo più reale la dinamica della bolla, nello specifico il modello implementato da Pitt modifica l'equazione di Rayleigh considerando la pressione interna della bolla come funzione della temperatura oltre che del tempo e considerando la presenza di trasferimento di calore conduttivo dalla e verso la bolla. Questo permette di ampliare il modello alla formulazione di una nanogoccia che si converte in nanobolla grazie all'applicazione di un campo di US permettendo l'uso dell'ADV.[55]

2.1 MODELLO DI PITT[40]

2.1.1 IPOTESI DI PARTENZA

Quando viene applicato un campo acustico a una nanoemulsione di gocce, si forma una fase gassosa. Di conseguenza il gas va incontro a una rapida espansione, seguita da un rapido collasso quando la pressione circostante inizia a crescere durante il ciclo acustico. Nel momento in cui il liquido inizia a evaporare, la superficie liquida si raffredda così come durante la condensazione del gas la superficie si riscalda. Quindi abbiamo un trasferimento di calore conduttivo da e verso il liquido circostante. Per spiegare il seguente modello bisogna riportare alcune assunzioni:

- La bolla è simmetrica sfericamente
- La dimensione piccola della fase gassosa rende i gradienti di pressione all'interno della fase trascurabili.
- La bolla inizia a crescere immediatamente all'applicazione del primo ciclo acustico non appena la pressione locale va al di sotto della pressione di vapore del liquido
- La fase gassosa esista come shell sferico concentri con la goccia del liquido tra la fase di PFC e l'acqua
- La goccia e la bolla non hanno interazione con altre gocce o bolle, quindi si considera la singola goccia/bolla all'interno di un mezzo infinito
- Il liquido si assume incomprimibile, la viscosità cinematica costante e uniforme
- Il liquido e il gas sono considerati fluidi newtoniani

- PFC è insolubile in acqua

2.1.2 DERIVAZIONE DEL MODELLO

La pressione che agisce lontano dalla nanogoccia è la somma della pressione atmosferica, idrostatica e acustica. La pressione idrostatica è $\rho_w gh$, con h si indica la posizione della goccia sotto la superficie dell'acqua e con ρ_w si indica la densità del liquido. La pressione locale dovuta al campo acustico viene descritta da $Asin(\omega t)$ con A ampiezza dell'onda, ω velocità angolare e t il tempo. La pressione che agisce sulla nanogoccia è data dalla pressione di Laplace $\frac{2\gamma}{R_L}$ con γ tensione superficiale e R_L raggio della nanogoccia. Quando è presente una fase gassosa, il gas è in equilibrio con l'interfaccia liquida in modo che la pressione all'interno della fase gassosa P_g sia semplicemente la pressione di vapore dell perfluorocarburo liquido $P_{vap,PFC}(T_{s,PFC})$ sommata alla pressione di vapore dell'acqua $P_{vap,H2O}(T_{s,H2O})$

La pressione appena al di fuori della goccia P_0 è la pressione della fase gassosa meno la pressione di Laplace.

Le equazioni che governano la pressione sono le seguenti:

$$P_{\infty} = P_{atm} + \rho_w gh + Asin(\omega t) \tag{2}$$

$$P_g = P_{vap,PFC}(T_{s,PFC}) + P_{vap,H2O}(T_{s,H2O})$$
(3)

$$P_0 = P_g - \frac{2\gamma}{R_L} \tag{4}$$

le pressioni di vapore dei perfluorocarburi possono essere trovate da equazioni empiriche del tipo $P_{vap}(T_s) = \exp \left(A + \frac{B}{T_s} + Cln(T_s) + DT_s^E\right)$ dove i coefficienti sono raccolti in apposite tabelle.

La pressione della fase gassosa è funzione della temperature all'interfaccia delle fasi liquide adiacenti, se queste temperature sono dissimili allora esiste un gradiente termico. Una temperatura media viene definita assumendo il gradiente lineare tra le due superfici:

$$\overline{T}_{g} = \frac{\int_{R_{L}}^{R} 4\pi r^{2} T(r) \rho_{g} \overline{C_{p} M_{w}} dr}{\int_{R_{L}}^{R} 4\pi r^{2} \rho_{g} \overline{C_{p} M_{w}} dr} =$$
(5)

$$= T_{s,PFC} + \frac{3}{4} \frac{\left(T_{s,H20} - T_{s,PFC}\right)\left(R^4 - R_L^4\right)}{(R - R_L)\left(R^3 - R_L^3\right)} - \frac{\left(T_{s,H20} - T_{s,PFC}\right)R_L}{(R - R_L)}$$

Con ρ_g , $\overline{C_p}$, $\overline{M_w}$ la densità, la capacità di calore media e il peso molecolare medio della fase gassosa.

Dal momento che la fase gassosa è a una pressione abbastanza bassa la densità è data dalla legge dei gas ideale:

$$\rho_g = \frac{P_g \overline{M_w}}{R_g \overline{T_g}} \tag{6}$$

 $\operatorname{Con} \overline{M_w} = X_{PFC} M_{PFC} + (1 - X_{PFC}) M_{H2O}$

Dove X_{PFC} è la frazione molare del perfluorocarburo data dall'equazione:

$$X_{PFC} = \frac{P_{vap,PFC}}{P_g} = \frac{P_{vap,PFC}(T_{s,PFC})}{P_{vap,PFC}(T_{s,PFC}) + P_{vap,H2O}(T_{s,H2O})}$$
(7)

Considerando che il numeratore e il denominatore di questa equazione cambiano similmente con la temperatura, la frazione molare è una funzione molto debole della temperatura. Quindi la derivata di $\overline{M_w}$ e di X_{PFC} rispetto a $\overline{T_g}$ sono assumibili nulle, questo porta a considerare che il rapporto della velocità di evaporazione di PFC e acqua rimane costante per piccoli cambiamenti termici:

$$\frac{dm_{PFC}}{dm_{H20}} = \frac{X_{PFC}M_{PFC}}{(1 - X_{PFC})M_{H20}}$$
(8)

Dal momento che la pressione di vapore cambia lentamente con la temperatura media del gas, la variazione di densità del gas rispetto a $\overline{T_g}$ può essere approssimata a:

$$\frac{d\rho_g}{d\overline{T_g}} = -\frac{P_g \overline{M_w}}{R_g \overline{T_g}^2} \tag{9}$$

E in rispetto al tempo:

$$\frac{d\rho_g}{dt} = -\left(\frac{P_g \overline{M_w}}{R_g \overline{T_g}^2}\right) \frac{d\overline{T_g}}{dt}$$
(10)

La velocità dell'acqua all'interfaccia è data da $u(R, t) = \frac{dR}{dt}$ trascurando la piccola quantità di acqua che evapora all'interfaccia.

La rapporto di massa dell'evaporazione del PFC liquido e dell'acqua nella fase gassosa produce una variazione di massa della fase gassosa come segue:

$$\frac{dm_g}{dt} = -\frac{dm_{PFC}}{dt} - \frac{dm_{H2O}}{dt} = \frac{d(V_g\rho_g)}{dt}$$
$$= \rho_g \left[4\pi R^2 \frac{dR}{dt} - 4\pi R_L^2 \frac{dR_L}{dt} \right] + \frac{4}{3}\pi (R^3 - R_L^3) \frac{d\rho_g}{dt}$$

La parte sinistra dell'equazione può essere riscritta come segue

$$\frac{dm_g}{dt} = -\frac{dm_{PFC}}{dt} - \frac{dm_{H2O}}{dt} = -\frac{dm_{PFC}}{dt} \left[1 + \frac{(1 - X_{PFC})M_{H2O}}{X_{PFC}M_{PFC}} \right]$$
(12)

Inoltre la variazione di evaporazione del PFC è legata alla variazione del diametro della goccia da:

$$-\frac{dm_{PFC}}{dt} = -\rho_{PFC} 4\pi R_L^2 \frac{dR_L}{dt} = M_{PFC} \frac{d(X_{PFC}N)}{dt}$$
(13)

Con N numero totale di moli della fase gassosa

La variazione di moli della fase gassosa si scrive

$$\frac{dN}{dt} = \frac{1}{\overline{M_w}} \frac{dm_g}{dt} = \frac{4\pi\rho_g}{\overline{M_w}} \left[R^2 \frac{dR}{dt} - R_L^2 \frac{dR_L}{dt} \right] + \frac{4\pi}{3\overline{M_w}} (R^3 - R_L^3) \frac{d\rho_g}{dt}$$
(14)

Sostituendo la variazione di densità, la variazione di massa del gas e del PFC otteniamo

$$4\pi\rho_g R^2 \frac{dR}{dt} - \frac{4}{3}\pi (R^3 - R_L^3) \left(\frac{P_g \overline{M_w}}{R_g \overline{T_g}^2}\right) \frac{d\overline{T_g}}{dt} = \left[\overline{M_w} - \frac{\rho_g}{\rho_{PFC}} X_{PFC} M_{PFC}\right] \frac{dN}{dt}$$
(15)

Il termine sulla destra corrisponde a un peso molecolare modificato, infatti se consideriamo che la densità del gas è molto più piccola di quella del liquido di PFC il termine con il rapporto tra le densità è trascurabile.

Ritornando alla velocità dell'acqua all'interfaccia, ora può essere scritta come segue

$$u(R,t) = \frac{dR}{dt} = \frac{R_g \overline{T}_g}{4\pi R^2 P_g} \frac{dN}{dt} + \frac{(R^3 - R_L^3)}{3\overline{T}_g R^2} \frac{d\overline{T}_g}{dt}$$
(16)

Considerando inoltre che $u(r,t) = \frac{F(t)}{r^2} = \frac{R^2 \frac{dR}{dt}}{r^2}$ otteniamo che per $r \ge R$ la velocità nella fase liquida è:

$$u(r,t) = \frac{R_g \overline{T_g}}{4\pi r^2 P_g} \frac{dN}{dt} + \frac{(R^3 - R_L^3)}{3r^2} \frac{dln\overline{T_g}}{dt}$$
(17)

E la funzione F(t) legata ad R(t) da condizioni al contorno cinematiche risulta

$$F(t) = R^2 \frac{dR}{dt} = \frac{R_g \overline{T_g}}{4\pi P_g} \frac{dN}{dt} + \frac{(R^3 - R_L^3)}{3} \frac{dln\overline{T_g}}{dt}$$
(18)

Il bilancio del momento si ottiene derivando dalla equazione di Napier-Stokes il bilancio di massa appena ottenuto così da ottenere la distribuzione di velocità della fase acquosa. Prima di tutto si deriva la velocità rispetto ad r:

$$\frac{\partial u(r,t)}{\partial r} = -\frac{R_g \overline{T_g}}{2\pi r^3 P_g} \frac{dN}{dt} - \frac{2(R^3 - R_L^3)}{3r^3} \frac{dln\overline{T_g}}{dt}$$
(19)

Poi si deriva rispetto a t ottenendo l'accelerazione:

$$\frac{\partial u(r,t)}{\partial t} = -\frac{R_g \overline{T_g}}{4\pi r^2 P_g} \frac{d^2 N}{dt^2} + \frac{(R^3 - R_L^3)}{3r^2} \frac{d^2 ln \overline{T_g}}{dt^2}$$
(20)

L'equazione di Napier-stokes in coordinate sferiche per il moto dell'acqua in direzione radiale è:

$$-\frac{1}{\rho_L}\frac{\partial P}{\partial r} = \frac{\partial u}{\partial t} + u\frac{\partial u}{\partial r} - \nu_L \left[\frac{1}{r^2}\frac{\partial^2}{\partial r^2}(r^2u)\right]$$
(21)

Per $r \ge R$ e con v_L viscosità cinematica della fase liquida

Combinando le relazioni sulla variazione di velocità lungo r e lungo t otteniamo:

$$-\frac{1}{\rho_L}\frac{\partial P}{\partial r} = \frac{1}{r^2} \left[\frac{R_g \overline{T_g}}{4\pi r^2 P_g} \frac{d^2 N}{dt^2} + \frac{(R^3 - R_L^3)}{3} \frac{d^2 ln \overline{T_g}}{dt^2} \right]$$

$$-\frac{2}{r^5} \left[\frac{R_g^2 \overline{T_g}^2}{16\pi^2 P_g^2} \left(\frac{dN}{dt} \right)^2 + \frac{R_g \overline{T_g}}{6\pi P_g} (R^3 - R_L^3) \frac{dN}{dt} \frac{dln \overline{T_g}}{dt} \right]$$

$$+ \frac{(R^3 - R_L^3)^2}{9} \left(\frac{dln \overline{T_g}}{dt} \right)^2 \right]$$
(22)

Si può notare che il termine nelle parentesi quadre moltiplicato per la viscosità cinematica è sparito

Unendo quest'ultima equazione e quella che descrive F(t):

$$-\frac{1}{\rho_L}\frac{\partial P}{\partial r} = \frac{1}{r^2}\frac{\partial F}{\partial t} - \frac{2F^2}{r^5}$$
(23)

E integrando rispetto a r tra i limiti i $P = P_0$ per r=R e i limiti $P = P_{\infty}$ per r= ∞ :

$$\frac{P_0 - P_\infty}{\rho_L} = \frac{1}{R} \frac{dF}{dt} - \frac{1}{2} \frac{F^2}{R^4}$$
(24)

Dove P_0 è la pressione dell'acqua appena fuori all'interfaccia.

Per considerare le condizioni al contorno dinamiche sulla superficie, la forza netta per unità di area su di una lamina sottile contenente un segmento di gas/acqua interfaccia è:

$$\left(\frac{F}{A}\right)_{net} = \pi_{rr}|_{r=R} + P_g - \frac{2\gamma}{R}$$
(25)

Con π_{rr} la componente radiale del tensore di stress molecolare in direzione radiale uscente come la direzione della forza netta.

Questa componente è data da $\pi_{rr} = -P_0 + 2\mu_L \frac{\partial u}{\partial r}$

Quindi la forza diventa:

$$\left(\frac{F}{A}\right)_{net} = -P_0 + 2\mu_L \frac{\partial u}{\partial r} + P_g - \frac{2\gamma}{R}$$
(26)

Sapendo che $\left(\frac{\partial u}{\partial r}\right)_{|r=R} = -\frac{2}{R}u(r,t) = -\frac{2}{R}\frac{dR}{dt}$

Otteniamo:

$$\left(\frac{F}{A}\right)_{net} = -P_0 + \frac{4\mu_L}{R}\frac{dR}{dt} + P_g - \frac{2\gamma}{R}$$
(27)

In assenza di trasporto di massa al confine la forza netta per unità di area deve essere nulla:

$$0 = -P_0 + \frac{4\mu_L}{R}\frac{dR}{dt} + P_g - \frac{2\gamma}{R}$$
⁽²⁸⁾

Sostituendo quest'ultima con le due equazioni (18) e (24) otteniamo:

$$\frac{P_g(T,t) - P_\infty(t)}{\rho_L} = R^2 \frac{dR}{dt} + \frac{3}{2} \left(\frac{dR}{dt}\right)^2 - \frac{4\nu_L}{R} \frac{dR}{dt} + \frac{2\gamma}{R\rho_L}$$
(29)

Come si può notare corrisponde ad un equazione di Rayleigh-Plesset modificata dove la pressione all'interno della bolla è funzione della temperatura.

Quando l'ultrasuono fa nucleare una bolla di PFC, l'evaporazione dalla superficie liquida di PFC decresce la sua temperatura superficiale, andando a creare un gradiente di temperatura. Similmente il piccolo quantitativo di evaporazione dall'interfaccia crea un raffreddamento e un gradiente termico.

Dal momento che la pressione e la composizione della fase gassosa sono funzioni della temperatura all'interfaccia, è necessario valutare un bilanciamento di energia per tracciare tale temperatura.

L'equazione che governa la distribuzione di temperatura nella goccia è data da:

$$\rho_{PFC} C_{P,PFC} \frac{dT}{dt} = -\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 q_{int,PFC} \right) \ per \ r < R_L$$
(30)

 $C_{P,PFC}$: capacità di calore del PFC liquido $q_{int,PFC}$: flusso di energia all'interno della goccia liquida di PFC

L'equazione è soggetta a una condizione al contorno del flusso di energia del tipo $r = R_L$ e in questo caso il flusso di calore interfacciale in superfice ($q_{s,PFC}$) eguaglia il flusso alla superficie della fase PFC ($q_{int,PFC}$) che a sua volta eguaglia il flusso al di fuori della superficie nella parte gassosa:

$$q_{int,PFC} = q_{s,PFC} = q_{c,gas} + q_{rad} + q_{evap}$$
(31)

Come si può notare $q_{c,gas}$ è il calore trasferito dall'interfaccia attraverso la fase gassosa per conduzione, q_{rad} per irraggiamento, q_{evap} è il calore latente trasferito dall'interfaccia liquida grazie al cambiamento di fase.

I flussi vengono dati dalle seguenti equazioni:

$$q_{s,PFC} = -k_{PFC} \frac{\partial T}{\partial r} \Big|_{r=R_L}$$
(32)

$$q_{c,gas} = -k_{gas} \frac{\partial T}{\partial r} \Big|_{r > R_L} \cong -\theta h \big(T_{s,H20} - T_{s,PFC} \big)$$
(33)

$$q_{c,gas} = -\varepsilon \sigma f \left(T_{s,H20}^{4} - T_{s,PFC}^{4} \right)$$
(34)

$$q_{evap} = \frac{M_{PFC}\Delta H_{PFC}}{4\pi R_L^2} \frac{dN_{PFC}}{dt} = \frac{M_{PFC}\Delta H_{PFC}X_{PFC}}{4\pi R_L^2} \frac{dN}{dt}$$
(35)

con k_{gas} la conduttività termica media della fase gassosa, h il coefficiente di trasferimento di calore locale all'interfaccia, θ è il fattore di blowing, ε emissività all'interfaccia, σ è la costante di Stefan-Blotzman, f è il fattore di vista all'interfaccia del PFC, ΔH_{PFC} e k_{PFC} sono l'entalpia di vaporizzazione e la conduttività termica del PFC liquido.

L'equazione del calore trasferito per conduzione è un'approssimazione perché il vero profilo termico potrebbe non essere lineare, per le considerazioni seguenti però la deviazione dalla linearità sarà considerata trascurabile.

Per una sfera con una convezione non trasversa il numero di Nusselt è 2 quindi $h = k_{gas} / R_L$. Il fattore di blowing in questo modello è dato da:

$$\theta = \frac{\Phi}{e^{\Phi} - 1} \operatorname{con} \Phi = \frac{X_{PFC}C_{p,PFC}}{4\pi R_L k_{gas}} \frac{dN}{dt}$$
(36)

Il fattore di vista f è considerato unitario.

L'equazione che descrive $q_{s,PFC}$ non è calcolabile in uno step, la temperatura superficiale non può essere calcolata esattamente, possiamo approssimare il risultato reale attraverso alcune considerazioni: da una parte possiamo assumere che la diffusività termica del PFC è abbastanza alta, la distanza spaziale abbastanza bassa e la scala di tempo è lunga abbastanza da far rimanere la goccia in equilibrio termico. Ne risulta che $T_s = -T_{droplet}$.

La variazione di temperatura nella goccia corrisponde al flusso interfacciale diviso dalla capacità di calore e dalla massa della goccia:

$$\frac{dT_{droplet}}{dt} = \frac{dT_{s,PFC}}{dt}$$

$$= \frac{3}{\rho C_{p,PFC} R_L} \left[\theta h (T_{s,H20} - T_{s,PFC}) + \varepsilon \sigma f (T_{s,H20}^4 - T_{s,PFC}^4) - \frac{M_{PFC} \Delta H_{PFC} X_{PFC}}{4\pi R_L^2} \frac{dN}{dt} \right]$$
(37)

Dal momento che la goccia di PFC ha sempre una temperatura uniforme a livello spaziale questa approssimazione può essere denominata "modello di temperatura uniforme"

Dall'altra parte possiamo considerare la temperatura superficiale in una situazione in cui la lunghezza di diffusione termica è abbastanza piccola, il raggio della goccia abbastanza grande, e il tempo abbastanza corto in modo che la goccia appaia un volume semi infinito con una variazione termica imposta al contorno che si muove all'interno della goccia liquida di PFC nel tempo. Questa approssimazione la possiamo chiamare "modello penetrativo". Per poter calcolare questo modello dobbiamo ottenere una funzione $\frac{dT_s}{dt}$

Si osserva che la distanza di penetrazione termica in una fase semi infinita con una temperatura superficiale costante aumenta proporzionalmente al quadrato della radice del tempo. Quindi la variazione della temperatura superficiale varia proporzionalmente come segue:

$$T_s(t) - T_0 = \frac{q_0}{k} \sqrt{\frac{4\alpha t}{\pi}}$$
(38)

Con $\alpha = \frac{k_{PFC}}{\rho C_{p,PFC}}$ la diffusività termica, $T_0 \in k$ la temperatura iniziale e la conduttività termica della fase semi infinita (la goccia liquida di PFC), q_0 è il flusso applicato all'interfaccia. In questo modello dell'evaporazione del PFC dalla superficie della goccia, il flusso non sarà costante durante l'intero ciclo di evaporazione e condensazione, quindi l'uso di questa equazione non è propriamente accurato, ma usando un q_0 che varia otteniamo una buona stima.

Come si può notare dalle equazioni riportate fino ad adesso, si tratta di un modello basato su equazioni differenziali ordinarie del secondo ordine, nello specifico l'equazione principale matematica che descrive il modello è la seguente:

$$\frac{P_g(T,t) - P_{\infty}(t)}{\rho_L} = R^2 \frac{dR}{dt} + \frac{3}{2} \left(\frac{dR}{dt}\right)^2 - \frac{4\nu_L}{R} \frac{dR}{dt} + \frac{2\gamma}{R\rho_L}$$

2.1.3 RISULTATI

Per poter ottenere dei risultati è necessario implementare una routine in MATLAB, Pitt et al hanno sfruttato la subroutine ODE45, basata sulla routine Runga-Kutta che usa una approssimazione del quarto ordine per calcolare la soluzione e un'approssimazione del quinto ordine per troncare la soluzione.

Una volta implementata la routine Pitt et al hanno raggiunto dei buoni risultati, scoprendo che i due modelli di temperatura spiegati in precedenza sono ottime stime della realtà ma che producono dei risultati leggermente differenti. Infatti, la reale temperatura superficiale, necessaria per implementare l'equazione soprastante, sta a metà dei risultati ottenuti dai due modelli. Nello specifico si può notare che nel modello penetrativo la superficie non si raffredda o riscalda così tanto come nel modello a temperatura uniforme, ma tutto ciò non produce una differenza significativa nella dinamica della bolla.

In generale hanno sperimentato il modello in diverse situazione, comparando i due modelli termici come appena spiegato, valutando gli effetti dell'ampiezza acustica e della frequenza, analizzando gli effetti della tensione superficiale e della temperatura. I risultati ottenuti in generale mostrano che una emulsione con gocce più larghe porta alla formazione di bolle maggiori, similmente diminuire la frequenza porta alla formazione di bolle più grandi perché fornisce maggior tempo per l'espansione. Un'emulsione più grande, inoltre, porta a una velocità di collasso maggiore. In generale il modello mostra che il raggio della bolla cresce quasi linearmente con l'ampiezza acustica e la temperatura. L'aumento della tensione superficiale riduce il raggio massimo delle bolle in modo abbastanza lineare e riduce anche la velocità di collasso.

2.2 MODELLO DI FUJIKAWA-AKAMATSU[56]

2.2.1 IPOTESI DI PARTENZA

Per contrastare le problematiche riportate soprastante, analizziamo il modello di Fujikawa-Akamatsu in cui vengono presi in conto gli effetti di evaporazione e condensazione e temperatura considerati non lineari all'interfaccia, la conduzione di calore all'interno della bolla e nel liquido circostante e la compressibilità del liquido.

Per poter descrivere il modello bisogna riportare le seguenti assunzioni:

- La bolla è sfericamente simmetrica
- Gli effetti dell'interazione tra la compressibilità e la viscosità sono trascurabili
- Gli effetti della gravità e della diffusione sono trascurabili
- La pressione all'interno della bolla è uniforme
- Il vapore e il gas non condensabile sono immiscibili e seguono la legge dei gas ideali
- La temperatura del vapore e del gas non condensabile sono uguali
- Lo strato limite termico è sufficientemente piccolo rispetto al raggio della bolla
- C'è una piccola ma finita regione di non equilibrio all'interfaccia dovuta al continuo processo di cambiamento di fase
- Le proprietà fisiche del liquido e del gas sono costanti

La pressione uniforme all'interno della bolla rimane valida finché la velocità della parete della bolla rimane al di sotto della velocità della luce nella miscelazione vapore-gas. L'assunzione sull'idealità e immiscibilità del gas e del vapore smette di esistere nel momento in cui si raggiunge il punto critico. L'assunzione sulla temperatura del gas e del vapore è valida approssimativamente se il peso molecolare del vapore e del gas non sono estremamente differenti. Il calcolo di Hickling suggerisce che sia possibile usare l'approssimazione del sottile strato limite per la parte del gas così come per il contenuto della bolla.

2.2.2 DERIVAZIONE DEL MODELLO

Sotto queste assunzioni possiamo definire come segue le equazioni che governano la fase liquida, gassosa e le condizioni al contorno.

Nella **regione esterna** occupata dal liquido abbiamo le seguenti equazioni, rispettivamente l'equazione di continuità, il bilancio del momento, il bilancio energetico e l'equazione di stato:

$$\frac{\partial \rho_l}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial r} (\rho_l u_l) + \frac{2\rho_l u_l}{r} = 0$$
⁽¹⁾

$$\frac{\partial u_l}{\partial t} + u_l \frac{\partial u_l}{\partial r} = -\frac{1}{\rho_l} \frac{\partial p_l}{\partial r}$$
(2)

$$\frac{\partial T_l}{\partial t} + u_l \frac{\partial T_l}{\partial r} = D\left(\frac{\partial^2 T_l}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial T_l}{\partial r}\right)$$
(3)

$$\frac{p_l + B}{p_{l\infty} + B} = \left(\frac{p_l}{p_{l\infty}}\right)^n \tag{4}$$

Nelle equazioni t e r sono rispettivamente il tempo e il raggio radiale della bolla, il suffisso l si riferisce al liquido, come il suffisso ∞ indica che la proprietà in questione si riferisce all'infinito, ρ è la densità, u è la velocità radiale delle particelle, p è la pressione, T è la temperatura, D è la diffusività termica del liquido. Per quanto riguarda i coefficienti B=3010 atm e n= 7 · 15 per l'acqua.

Nella **regione interna** occupata dalla miscela di vapore e gas non condensabile abbiamo la seguente equazione di continuità rispettivamente per il vapore e per il gas non condensabile:

$$\frac{d}{dt} \int_{V} \rho_{v} dV = \int_{S} \dot{m} dS$$
⁽⁵⁾

$$\frac{d}{dt} \int_{V} \rho_g dV = 0 \tag{6}$$

V ed S sono il volume e la superficie della bolla, l'espressione \dot{m} corrisponde alla velocità di evaporazione e condensazione e si esprime come segue:

$$\dot{m} = \frac{\alpha_m}{(2\pi R_v)^{\frac{1}{2}}} \left(\frac{p_{eq,v}}{(T_{li})^{\frac{1}{2}}} - \Gamma \frac{p_v}{(T_{vi})^{\frac{1}{2}}} \right)$$
(7)

 α_m è il fattore di accomodamento per evaporazione e condensazione uguale al rapporto tra le molecole di vapore che aderiscono all'interfaccia di fase e coloro che vi urtano. p_v è la pressione di vapore di vapore, $p_{eq,v}$ è la pressione di vapore all'equilibrio, T_{li} e T_{vi} sono rispettivamente le temperature del liquido e del vapore all'interfaccia di fase e R_v costante dei gas per il vapore.

Il fattore di correzione Γ si esprime come segue:

$$\Gamma = e^{-\Omega^2} - \Omega \sqrt{\pi} \left(1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \right) \int_{\Omega} e^{-x^2} dx \text{ dove } \Omega = \frac{m}{p_v} \left(\frac{R_v T_{vl}}{2} \right)^{\frac{1}{2}}$$
(8)

Il bilancio energetico per lo strato limite termico è il seguente:

$$\rho_m \left(\frac{\partial e}{\partial t} + u_m \frac{\partial e}{\partial r} \right) = -\frac{p_m}{J} \left(\frac{\partial u_m}{\partial r} + \frac{2u_m}{r} \right) - \left(\frac{\partial q}{\partial r} + \frac{2q}{r} \right) \tag{9}$$

Il bilancio energetico per il contenuto totale all'interno della bolla:

$$\frac{dE}{dt} + \frac{p_m}{J}\frac{dV}{dt} + \int_V \nabla \cdot q dV - h \int_S \dot{m} dS = 0$$
(10)

Con il suffisso m si intende la miscela vapore-gas, e è l'energia interna specifica, E l'energia interna globale del contenuto della bolla, h l'entalpia specifica del vapore e J l'equivalente meccanico del calore.

Il flusso di calore q è espresso come segue:

$$q = -\lambda_m \frac{\partial T_m}{\partial r} \tag{11}$$

Dove $\lambda_m \in T_m$ sono la conduttività termica e la temperatura della miscela. Il contenuto globale della bolla viene considerato come un sistema aperto termodinamico.

L'equazione di stato viene formulata come segue, per quanto riguarda il vapore:

$$p_{\nu} = \rho_{\nu} R_{\nu} T_m \tag{12}$$

Per quanto riguarda il gas:

$$p_g = \rho_g R_g T_m \tag{13}$$

E per quanto riguarda la miscela:

$$p_m = \rho_m R_m T_m \tag{14}$$

All'interfaccia di fase, invece, abbiamo la seguente equazione di continuità:

$$\left[\rho_l(u_l - \dot{R})\right]_R = -\dot{m} \quad per \ il \ liquido \tag{15}$$

$$\left[\rho_m (u_m - \dot{R})\right]_R = -\dot{m} \quad per \ la \ miscela \tag{16}$$
Con *R* il raggio della bolla e \dot{R} la velocità della parete.

Per quanto riguarda il momento abbiamo:

$$p_{l,R} + \frac{2\sigma}{R} = p_{v} + p_{g} + \left[\rho_{m}\left(u_{m} - \dot{R}\right)\left(u_{m} - u_{l}\right)\right]_{R} + \frac{4\mu_{l}}{3}\left(\frac{\partial u_{l}}{\partial r} - \frac{u_{l}}{r}\right)_{R}$$
(17)

Dove $p_{l,R}$ è la pressione del liquido alla parete della bolla e σ è la tensione interfacciale.

Per quanto riguarda l'energia si ha:

$$\lambda_l \left(\frac{\partial T_l}{\partial r}\right)_R = \lambda_m \left(\frac{\partial T_m}{\partial r}\right)_R + \dot{m}L \tag{18}$$

Dove λ_l è la conduttività termica del liquido e L il calore latente di evaporazione o condensazione

L'equazione della pressione di equilibrio secondo Clausius-Clapeyron

$$p_{eq,v} = p_c exp\left(\frac{JL}{R_v T_c} \left(1 - \frac{T_c}{T_{li}}\right)\right)$$
(19)

 p_c, T_c sono la pressione e la temperatura allo stato critico, per l'acqua sono 218,40 e 647,31.

Infine c'è bisogno di un ultima equazione che definisce la discontinuità di temperatura all'interfaccia. La discontinuità di un flusso di un gas all'interno di un layer di Knudsen nelle vicinanze dello strato limite è la seguente:

$$T_m - T_{li} = \frac{(2 - 0.827\alpha_T)k_m\mu_m}{4(k_m - 1)\alpha_T P\rho_m} \left(\frac{2\pi}{R_m T_{li}}\right)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{\partial T_m}{\partial r}\right)$$
(20)

 α_T è il termine di accomodamento termico, P è il numero di Prandtl per la miscela, μ_m è la viscosità di taglio, k_m è il rapporto dei calori specifici.

Ora analizziamo l'equazione del moto del liquido circostante una bolla che collassa, nonostante nel nostro caso la bolla non debba collassare questo risulta essere un buon modello che approssima anche il nostro caso studio.

 $\Phi(r, t)$ è il potenziale di velocità del liquido, di conseguenza l'equazione di continuità e di momento assumono le seguenti forme:

$$\frac{\partial \rho_l}{\partial t} + \rho_l \left(\frac{\partial^2 \Phi}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial \Phi}{\partial r} \right) + \left(\frac{\partial \Phi}{\partial r} \right) \left(\frac{\partial \rho_l}{\partial r} \right) = 0$$
⁽²¹⁾

$$\frac{\partial \Phi}{\partial t} + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \Phi}{\partial r}\right)^2 + \int \frac{\partial p_l}{\rho_l} = const$$
(22)

Dall'equazione (4) e le condizioni al contorno $\Phi = 0$, $p_l = p_{l\infty} per r \to \infty$, il termine a destra dell'equazione sul momento diventa $const = \frac{c_{\infty}^2}{n-1}$. La velocità della luce nel liquido all'infinito è definita come segue:

$$c_{\infty} = \left(\left(\frac{\partial p_l}{\partial \rho_l} \right)_{\infty} \right)^{\frac{1}{2}} = \left(\frac{n(p_{l\infty} + B)}{\rho_{l\infty}} \right)^{\frac{1}{2}}$$
(23)

 $ho_{l^{\infty}}$ è la densità del liquido all'infinito

Unendo l'equazione (4) e (22) otteniamo la seguente formula per la velocità della luce:

$$c^{2} = c_{\infty}^{2} - (n-1) \left[\frac{\partial \Phi}{\partial t} + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \Phi}{\partial r} \right)^{2} \right]$$
(25)

Di conseguenza dall'equazione (21), (22), (25) otteniamo un equazione alle derivate parziali riguardante il potenziale di velocità

$$\frac{\partial^2 \Phi}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial \Phi}{\partial r} - \frac{1}{c_{\infty}^2} \frac{\partial^2 \Phi}{\partial t^2}$$

$$= \frac{1}{c_{\infty}^2} \left[2 \frac{\partial \Phi}{\partial r} \frac{\partial^2 \Phi}{\partial r \partial t} + \frac{2(n-1)}{r} \frac{\partial \Phi}{\partial r} \frac{\partial \Phi}{\partial t} + (n-1) \frac{\partial^2 \Phi}{\partial r^2} \frac{\partial \Phi}{\partial t} \right]$$

$$+ \frac{n+1}{2} \left(\frac{\partial \Phi}{\partial r} \right)^2 \frac{\partial^2 \Phi}{\partial r^2} + \frac{n-1}{3} \left(\frac{\partial \Phi}{\partial r} \right)^3 \right]$$
(26)

Le condizioni al contorno sono le seguenti:

- 1) Continuità all'interfaccia di fase: $\left(\frac{\partial \Phi}{\partial r}\right)_R = \dot{R} \frac{\dot{m}}{\rho_l}$
- 2) L'equazione della pressione all'interfaccia nel liquido:

$$\left[\frac{\partial \Phi}{\partial t} + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \Phi}{\partial r}\right)^2\right]_R = \frac{c_\infty^2}{(n-1)} \left[1 - \left(\frac{p_{l,R} + B}{p_{l,\infty} + B}\right)^{\frac{n-1}{n}}\right]$$

3) All'infinito: $\Phi = 0 \ per \ r \to \infty$

Le condizioni iniziali sono le seguenti:

$$R = R_0 \tag{27}$$

$$\dot{R}_{+0} = \frac{2c_{\infty}^2}{(n-1)} \left[\left(\frac{p_{l,R} + B}{p_{l\infty} + B} \right)^{\frac{n-1}{2n}} - 1 \right]$$
(28)

Entrambe per t = 0

Adesso and and a considerare la caratteristica uscente $\eta(r, t) = const$ in modo che:

$$dt = (u_l + c)^{-1} dr \quad per \ \eta(r, t) = const$$
⁽²⁹⁾

In accordo con il metodo PKL abbiamo il seguente sistema:

$$\Phi(r,\eta) = \Phi_0(r,\eta) + \frac{1}{c_{\infty}} \Phi_1(r,\eta) + \frac{1}{c_{\infty}^2} \Phi_1(r,\eta) + \dots$$
(30)

$$r = r, (31)$$

$$t = \eta + \frac{1}{c_{\infty}} t_1(r,\eta) + \frac{1}{c_{\infty}^2} t_2(r,\eta) + \cdots$$
(32)

 η è il tempo iniziale della caratteristica uscente e soddisfa la condizione $\eta = t \ per \ r = R$

Ora andiamo a considerare una serie di perturbazioni per ottenere l'equazione finale:

Prima perturbazione

L'approssimazione del primo ordine $\Phi_1 = \Phi_0 + \frac{1}{c_{\infty}} \Phi_1$ è determinata da $\frac{\partial^2 \Phi_1}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial \Phi_1}{\partial r} + \frac{1}{c_{\infty}^2} \frac{\partial^2 \Phi_1}{\partial t^2} = 0$ grazie alle condizioni al contorno

Quindi la soluzione può essere scritta così:

$$\Phi(r,\eta) = -\frac{f(\eta)}{r}$$
(33)

E dall'equazione (28) otteniamo:

$$t = \eta + \frac{r - R(\eta)}{c_{\infty}}$$
(34)

La funzione sconosciuta $f(\eta)$ può essere determinata dalle condizioni al contorno (24) usando quest'ultima equazione:

$$f(\eta) = R^2 \left(\dot{R} - \frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}} \right) - \frac{R^2}{c_{\infty}} \left[2\dot{R} \left(\dot{R} - \frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}} \right) + R \left(\ddot{R} - \frac{\ddot{m}}{\rho_{l\infty}} \right) \right]$$
(35)

Dall'equazione (35) e dalle condizioni al contorno otteniamo l'equazione del moto della bolla con la correzione del primo ordine della compressibilità del liquido e l'effetto di vaporizzazione e condensazione di non equilibrio:

$$R\ddot{R}\left(1-\frac{2\dot{R}}{c_{\infty}}+\frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}c_{\infty}}\right)+\frac{3}{2}\dot{R}^{2}\left(1+\frac{4\dot{m}}{3\rho_{l\infty}c_{\infty}}-\frac{4\dot{R}}{3c_{\infty}}\right)$$

$$-\frac{\ddot{m}R}{\rho_{l\infty}}\left(1-\frac{2\dot{R}}{c_{\infty}}+\frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}c_{\infty}}\right)-\frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}}\left(\dot{R}+\frac{\dot{m}}{2\rho_{l\infty}}\right)+\frac{p_{l\infty}-p_{l1,R}}{\rho_{l\infty}}$$

$$-\frac{R\dot{p}_{l1,R}}{\rho_{l\infty}c_{\infty}}=0$$
(36)

Dove

$$p_{l1,R} = -\frac{2\sigma}{R} + p_{\nu} + p_{g} - \frac{\dot{m}^{2}(\rho_{\nu i} + \rho_{g i} - \rho_{l\infty})}{\rho_{l\infty}(\rho_{\nu i} + \rho_{g i})} - \frac{4\mu_{l}}{R} \left(\dot{R} - \frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}}\right)$$
(37)

 ρ_{vi} e ρ_{gi} sono le densità del vapore e del gas non condensabile all'interfaccia

Seconda perturbazione

Ora la parte destra dell'equazione (26) è ottenuta dalla soluzione del primo ordine Φ_1 , la correzione di secondo ordine Φ_2 si ottiene come segue:

$$\frac{\partial^2 \Phi_2}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial \Phi_2}{\partial r} + \frac{2f^3}{r^7} = 0$$
(38)

Con le condizioni al contorno per cui $\varPhi_2=0\ per\ r \to \infty$ otteniamo:

$$\Phi_2 = -\frac{F(\eta)}{r} - \frac{R^6 \left(\dot{R} - \frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}}\right)^3}{10r^5}$$
(39)

Inoltre, dall'equazione (29) otteniamo:

$$t = \eta + \frac{r - R(\eta)}{c_{\infty}} + \frac{f(\eta)}{c_{\infty}^2} \left[\frac{1}{r} - \frac{1}{R(\eta)} \right]$$
(40)

 $F(\eta)$ è una funzione incognita che può essere determinata dalle condizioni al contorno usando l'equazione (40):

$$F(\eta) = \frac{1}{2}R^2 \left(\dot{R} - \frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}} \right)^3 - 2R^2 \dot{R} \left(\dot{R} - \frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}} \right)^2 - 2R^2 \left(\dot{R} - \frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}} \right) \left(\dot{R}^2 + R\ddot{R} \right)$$

$$- R^3 \left(\ddot{R} - \frac{\ddot{m}}{\rho_{l\infty}} \right) \left[\left(5\dot{R} - \frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}} \right) - R^4 \left(\ddot{R} - \frac{\ddot{m}}{\rho_{l\infty}} \right) \right]$$

$$(41)$$

In questo modo possiamo ottenere la soluzione di Φ per l'approssimazione del secondo ordine:

$$\begin{split} \Phi_{2}(r,\eta) &= -\frac{1}{r} \Biggl[R^{2} \left(\dot{R} - \frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}} \right) - \frac{R^{2}}{c_{\infty}} \Biggl\{ 2\dot{R} \left(\dot{R} - \frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}} \right) + R \left(\ddot{R} - \frac{\ddot{m}}{\rho_{l\infty}} \right) \Biggr\} \\ &+ \frac{1}{c_{\infty}^{2}} \Biggl\{ -\frac{1}{2} R^{2} \left(\dot{R} - \frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}} \right)^{3} + 2R^{2} \dot{R} \left(\dot{R} - \frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}} \right)^{2} \\ &+ 2R^{2} \left(\dot{R} - \frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}} \right) \left(\dot{R}^{2} + R\ddot{R} \right) + R^{3} \left(\ddot{R} - \frac{\ddot{m}}{\rho_{l\infty}} \right) \left(5\dot{R} - \frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}} \right) \\ &+ R^{4} \left(\ddot{R} - \frac{\ddot{m}}{\rho_{l\infty}} \right) + \frac{R^{6} \left(\dot{R} - \frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}} \right)^{3}}{10r^{4}} \Biggr\} \Biggr] \end{split}$$

Finalmente otteniamo l'equazione del moto della bolla con la correzione del secondo ordine per un liquido compressibile e considerando gli effetti di non equilibrio di evaporizzazione e condensazione:

$$R\left(\ddot{R} - \frac{\ddot{m}}{\rho_{l\infty}}\right) \left[1 - \frac{1}{c_{\infty}} \left(2\dot{R} - \frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}}\right) + \frac{1}{c_{\infty}^{2}} \left(\frac{23}{10}\dot{R}^{2} - \frac{31}{10}\frac{\dot{m}\dot{R}}{\rho_{l\infty}} - \frac{1}{5}\frac{\dot{m}^{2}}{\rho_{l\infty}^{2}}\right)\right]$$

$$+ \frac{3}{2} \left(\dot{R} - \frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}}\right) \left[\left(\dot{R} - \frac{\dot{m}}{3\rho_{l\infty}}\right) - \frac{4}{3}\frac{\dot{R}^{2}}{c_{\infty}} \right]$$

$$+ \frac{1}{c_{\infty}^{2}} \left(\frac{7}{5}\dot{R}^{3} - \frac{49}{30}\frac{\dot{m}\dot{R}^{2}}{\rho_{l\infty}} - \frac{14}{15}\frac{\dot{m}^{2}\dot{R}}{\rho_{l\infty}^{2}} - \frac{1}{6}\frac{\dot{m}^{3}}{\rho_{l\infty}^{3}}\right) \right]$$

$$+ \frac{1}{\rho_{l\infty}} \left[\left(p_{l\infty} - p_{l2,R}\right) - \frac{Rp_{l1,R}}{c_{\infty}} \right]$$

$$+ \left(p_{l\infty} - p_{l1,R}\right) \left[\frac{1}{2}\dot{R}^{2} - \frac{3}{2}\frac{\dot{m}\dot{R}}{\rho_{l\infty}} - \frac{\dot{m}^{2}}{\rho_{l\infty}^{2}} + \frac{3}{2}\frac{\left(p_{l\infty} - p_{l1,R}\right)}{\rho_{l\infty}} \right] \right\} = 0$$

$$(43)$$

Dove

$$p_{l2,R} = p_{l1,R} + \frac{4\mu_l}{3c_{\infty}^2} \left[\frac{3\dot{m}}{2\rho_{l\infty}R} \left(\dot{R} - \frac{\dot{m}}{\rho_{l\infty}} \right)^2 - \frac{p_{l1,R}}{\rho_{l\infty}} + \frac{m(p_{l\infty} - p_{l1,R})}{\rho_{l\infty}^2 R} \right]$$
(44)

I disturbi sulla parete della bolla si propagano alla velocità della luce lungo la caratteristica uscente.

La pressione che attraversa il liquido, infine, può essere trovata attraverso le equazioni (4), (22) e (42):

$$p_l(r,t) = -B \left[1 - \frac{p_{l\infty} + B}{B} \left\{ 1 - \frac{(n-1)}{c_{\infty}^2} \left[\frac{\partial \Phi_2}{\partial t} + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \Phi_2}{\partial r} \right)^2 \right] \right\}^{\frac{n}{n-1}} \right]$$
(45)

2.2.3 RISULTATI

Anche questo modello prevede un'analisi accurata della temperatura della bolla, questo modello prevede 3 formulazioni della temperatura in base al caso in cui ci si trova all'interno della bolla, all'interfaccia nella parte liquida e all'interfaccia nella parte solida. Rimandiamo all'articolo completo se si è interessati allo studio di temperatura della bolla[56].

Il seguente modello, quindi, studia il comportamento dinamico di una bolla di cavitazione prendendo in considerazione gli effetti di compressibilità del liquido, la condensazione di non equilibrio del vapore, gli effetti conduttivi e diffusivi e la discontinuità della temperatura all'interfaccia di fase. È stato trovato che il gradiente di temperatura si sviluppa all'interno della bolla in seguito alla conduzione di calore verso l'interfaccia e che

la combinazione di gas non condensabile e vapore acqueo ha una forte influenza sul comportamento della bolla quando raggiunge il collasso, mentre è trascurabile nella semplice fase di oscillazione della parete. Tuttavia come spiegato in precedenza questo modello si porta dietro un alto costo computazionale e non è di facile risoluzione, in ogni caso il suo studio è stato essenziale, insieme allo studio del modello di Pitt, per comprendere al meglio il comportamento della bolla e avere un supporto fisicomatematico alla base della raccolta dei dati sperimentali

2.3 MODELLO UTILIZZATO NELLE SPERIMENTAZIONI

L'obbiettivo di questo progetto tesi, tuttavia, è quello di ottimizzare i parametri usando un modello semplice e risolvibile analiticamente, in quanto lo scopo dell'applicazione è l'effettivo rilascio del farmaco e il mantenimento della parete della bolla dopo l'insonazione in modo che permetta un rilascio mirato e progressivo, e non lo studio termodinamico del comportamento della bolla durante l'insonazione o durante la fase di collasso. Infatti, noi andremo a studiare la bolla come un sistema stabile prima e dopo l'insonazione, andando a valutare parametri di facile acquisizione come il raggio della bolla, la sua tensione superficiale e le proprietà chimico-fisiche dei materiali coinvolti. Utilizzare modelli termodinamici così fini e complessi ha un costo computazionale molto alto che non va a rispecchiarsi con le necessità del nostro caso.

Il processo di formazione della bolla è descritto dalla variazione del potenziale di Gibbs tra lo stato liquido e quello vapore

$$\Delta G = -\Delta G_{lv} + \Delta G_t = -(N - n)(\mu_V - \mu_l) + 4\pi r^2 \sigma$$

Dove N è il numero totale di molecole, n è il numero di molecole legate nello stato liquido, μ è il potenziale chimico, r il raggio della bolla, σ è la tensione superficiale.

Il numero di molecole nello stato di vapore (N-n) può essere determinato come segue:

$$\frac{4}{3}\pi r^{3} = (N - n)V_{vmol} \to (N - n) = \frac{\frac{4}{3}\pi r^{3}}{V_{vmol}} = \xi$$

Dove ξ è il rapporto tra il volume della bolla e il volume occupato dalla singola molecola nello stato di vapore e V_{vmol} è il volume occupato da una molecola nello stato di vapore.

Il vapore nel nostro caso si trova in uno stato surriscaldato e può essere trattato come gas ideale quindi:

$$v_v e_v = k_B T$$

Dove v_v è il volume specifico di vapore, e_v è l'energia per volume specifico di vapore. Inoltre la variazione di potenziale chimico tra liquido e vapore segue la seguente relazione:

$$(\mu_V - \mu_l) = k_B T ln(\frac{P}{P_{sat}})$$

Dove P_{sat} è la pressione di saturazione alla temperatura di lavoro.

Di conseguenza otteniamo che:

$$\Delta G = \frac{\frac{4}{3}\pi r^3}{V_{vmol}}k_BTln\left(\frac{P}{P_{sat}}\right) + 4\pi r^2\sigma$$

Con questa equazione siamo in grado di trovare il raggio critico andando a porre la derivata della variazione di energia uguale a zero e otteniamo:

$$r_{c} = \frac{2\sigma V_{vmol}}{k_{B}Tln\left(\frac{P}{P_{sat}}\right)}$$

L'obiettivo è quello di mettere in relazione l'efficacia di rilascio del farmaco con i parametri ultrasonori, ma prima di fare questo bisogna studiare le bolle nel loro stato stazionario. Le bolle stabili e non soggette a un campo acustico sono regolate dalla legge di Laplace come detto in precedenza:

$$P_g - P_0 = \frac{2\gamma}{R}$$

Dove P_0 è la pressione che agisce appena al di fuori dell'interfaccia, P_g è la pressione all'interno del gas, mentre l'ultimo termine non è nient'altro che la pressione di Laplace.

Analizzando i vari termini notiamo che P_0 possiamo interpretarlo come la pressione esercitata sulla bolla dall'esterno e quindi:

$$P_0 = p_{atm} + \rho_w gh$$

Se consideriamo L come l'altezza complessiva della provetta in cui la sospensione di nanobolle è stata versata allora h = L/2 perché si ipotizza che le nanobolle occupino metà della provetta utilizzata. Dal momento che le nanobolle sono sospese in acqua si considera la densità della formulazione pari alla densità dell'acqua ρ_w .

Mentre P_g sarà il modello che descrive il gas all'interno della bolla ed è data da:

$$P_g = \frac{nRT}{V}$$

Dove *n* è il numero di moli contenute in una bolla, *R* è la costante universale dei gas e vale $8,314 \frac{J}{mol \cdot K}$, *T* è la temperatura di lavoro ossia 298,15 *K* e *V* è il volume della bolla.

Nella raccolta dei dati sperimentali si è misurato tramite un tensiometro la tensione superficiale della formulazione, in modo da avere un parametro fisico misurabile per poter ottimizzare la scelta e la concentrazione dei materiali. La tensione superficiale effettiva del chitosano a basso peso molecolare tuttavia è la seguente:

$$\gamma = 2 \cdot 10^{-3} \ \frac{N}{m}$$

Risolvendo l'equazione di Laplace con questo valore di tensione e con i parametri caratteristi dei materiali coinvolti troviamo il seguente valore teorico di raggio medio:

| Shell NBs | Raggio medio [nm] | |
|-----------|----------------------|--|
| Chitosano | 320 | |

I dati raccolti nella sperimentazione verranno confrontati con questo raggio medio teorico per verificarne l'attendibilità.

CAPITOLO 3

3 RACCOLTA DATI SPERIMENTALI

3.1 MATERIALI

Ditta fornitrice

| Acqua distillata | / |
|-----------------------|----------------|
| Chitosano a basso PM | Sigma-Aldrich |
| Chitosano a PM medio | Sigma-Aldrich |
| Etanolo | Sigma-Aldrich |
| Acido Palmitico | Sigma-Aldrich |
| Decafluoropentano | Sigma-Aldrich |
| Epikuron 200 | Meyer |
| Acetato di sodio | Sigma-Aldrich |
| Acido Acetico | Sigma-Aldrich |
| Cumarin 6 | Sigma-Aldrich |
| Curcumina | Sigma-Aldrich |
| Membrana di cellulosa | Carl Roth GmbH |
| DMSO | Sigma-Aldrich |

Strumentazione

Ditta fornitrice e modello

| Agitatore magnetico | Falc – R20 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| Bagno a ultrasuoni | Branson - 3150 |
| Bilancia analitica | Mettler Toledo – AG245 |
| Cappa a flusso laminare | Atlantic - 900 |
| Laser light scattering | Brookhaven – 90 plus instrument |
| Microscopio ottico/fluorescente | Leica – DM 2500 |
| pHmetro | Orion – Model 420A |
| Spettrofotometro | Beckman Countler – Du-730 |
| Tensiometro ad anello | Kruss – K10 |
| Turboemulsore | Ultra-turrax – T 25 Ika |

I materiali utilizzati per la formulazione delle nanobolle sono i seguenti: Epikuron 200, decafluoropentano, acido palmitico, acqua distillata, chitosano a basso peso molecolare e curcumina. Di seguito vengono riportate le specifiche dei vari materiali:

Decafluoropentano [57]

Molecular Formula: C₅H₂F₁₀ Molecular Weight: 252.053412 g/mol XLogP3-AA: 3.9 H-Bond Donor: 0 H-Bond Acceptor: 10 Index of Refraction: 1.253 Molar Refractivity: 26.66 cm³ Molar volume: 166.4 cm3/mol Surface Tension: 11.4 dyne/cm Viscosity: 0.67cPs Density: 1.514 g/cm³ Enthalpy of Vaporization: 28.4 kJ/mol Boiling Point: 53.1 °C at 760 mmHg Vapour Pressure: 272 mmHg at 25 °C Melting Point: -80 °C Water Solubility: 2.204 mg/L at 25 °C



Figura 3.1.1 Struttura chimica del decafluoropentano

<u>Chitosano [</u>58]

Molecular Formula: C₅₆H₁₀₃N₉O₃₉

Molecular Weight: 161.16 g/mol

XLogP3-AA: -21.4

H-Bond Donor: 29

H-Bond Acceptor: 47

Density: 1,75 g/cm^3

Melting Point: 88 °C

Water Solubility: low



Figura 3.1.2 Struttura chimica del chitosano

Acido palmitico [59]

Molecular Formula: C₁₆H3₂O₂ Molecular Weight: 256.424 g/mol index of rarefaction: 1.454 XLogP3-AA: 6.4 H-Bond Donor: 1 H-Bond Acceptor: 2 Surface Tension: 28.2 mN/m a 70°C Density: 0.9 g/cm³ Viscosity: 7.80 cP at 70 °C Enthalpy of Vaporization: 96.28 kJ/mole at 200 °C Boiling Point: 340.6 °C at 760 mmHg Vapour Pressure: 0.0±0.8 mmHg at 25°CC Melting Point: 61-62.5 °C Water Solubility: low 0,04 mg/ml pKa: 4.75



Figura 3.1.3 Struttura chimica dell'acido palmitico

Epikuron 200 (DPPC) [60]

Molecular Formula: C40H80NO8P

Molecular Weight: 734,0 g/mol

XLogP3-AA: 13,5

H-Bond Donor: 0

H-Bond Acceptor: 8

Relative Density: 0,95-1,1

Viscosity: 10 mPa·s at 25°C

Boiling Point: 60.5-61.5°C at 760 mmHg

Melting Point: -63°C

Water Solubility: low

CMC: 4.6 ± 0.5 x 10–10 M



Grafico 3.2.4 Struttura chimica dell'Epikuron

<u>Curcumina [</u>61]

La curcumina è un pigmento fitopolifenolico isolato dalla pianta Curcuma Longa, comunemente nota come curcuma, con diverse proprietà farmacologiche. La curcumina previene la generazione di specie reattive dell'ossigeno, ha proprietà antinfiammatorie attraverso l'inibizione della cicloossigenasi (COX) e di altri enzimi coinvolti nell'infiammazione e interrompe la segnalazione cellulare attraverso diversi meccanismi, inclusa l'inibizione della protein chinasi C. Questi effetti possono avere un ruolo nella le proprietà antineoplastiche osservate dell'agente, inclusa l'inibizione della proliferazione delle cellule tumorali e l'inibizione della cancerogenesi indotta chimicamente e della crescita tumorale in modelli animali di cancro.

Molecular weight: 368.38 Melting point: 183 ° C Boiling point: 418.73 ° C (rough estimate) Relative density: 0.93 Vapour pressure: 3.08X10-12 mm Hg at 25 °C Refractive index: 1.4155-1.4175 Flash point: 208.9 ± 23.6 ° C Storage condition: 2-8 ° C Solubility ethanol: 10mg / ml Acidity coefficient (PKA): 8.09 (AT25 °C) Henry's Law constant = 7.04X10-22 atm-cu m/mol at 25 °C (est) Index of rarefraction: 1.5118 @ 20 °C

3.2 STRUMENTAZIONE UTILIZZATA

3.2.1 Spettroscopia a correlazione fotonica

La spettroscopia di fotocorrelazione permette di analizzare il profilo di distribuzione del diametro medio oltre alla misura media della carica superficiale di piccole particelle sospese in soluzione. [62] La spettroscopia ha come principale protagonista la luce, quando questa colpisce piccole particelle va a disperdersi in tutte le direzioni, fenomeno noto come dispersione di Rayleigh. Questo fenomeno avviene purché le particelle siano sufficientemente piccole rispetto alla lunghezza d'onda della luce che le colpisce. Se la sorgente di luce è un laser, quindi monocromatica e coerente, si può osservare che l'intensità di dispersione fluttua nel tempo. Queste fluttuazioni sono causa del moto browniano cui sono sottoposte le piccole particelle, la diffusione dinamica della luce si basa proprio sul moto browniano dove le particelle più piccole si muovono più velocemente di quelle grandi, di conseguenza la luce che viene diffusa dalle particelle contiene informazioni sulla velocità di diffusione e di conseguenza sulla distribuzione dimensionale di tali particelle.

Il metodo convenzionale per analizzare la luce diffusa è la spettroscopia a correlazione di fotoni, questa necessita la presenza di un autocorrelatore e fornisce una dimensione media della popolazione di particelle, sono necessari algoritmi di adattamento della curva per stimare la distribuzione. Questa tecnica misura il movimento registrando otticamente il segnale di luce diffusa ad un angolo fisso ma la parte che si porta dietro l'informazione delle dimensioni è legata alla fluttuazione temporale del segnale luminoso perché contiene le informazioni sul movimento delle particelle. Le particelle che disperdono la luce si muovono una rispetto all'altra, determinando interferenze che cambiano continuamente all'interno della diffusione di luce totale. La velocità delle variazioni di intensità di luce diffusa viene misurata grazie ad un autocorrelatore che va a calcolare il coefficiente di diffusione delle particelle tramite una funzione di correlazione, in questo modo siamo in grado di definire un diametro medio con l'equazione di Stokes Einstein:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d_p}$$

Dove k è la costante di Boltzmann, T è la temperatura nota, η è la viscosità del liquido nota, d_p è il diametro idrodinamico e quindi contenente lo strato d'acqua che circonda le particelle in superficie, mentre D è il coefficiente di diffusione. Lo strumento fornisce in uscita anche un indice di polidispersità che è una misura dell'uniformità di distribuzione dei pesi molecolari del sistema, sostanzialmente fornisce un idea di quanto sia omogenea la distribuzione dei diametri della popolazione di particelle. Quando otteniamo un valore sopra lo 0,3/0,5 vuol dire che ci troviamo davanti a una popolazione polidispersa e non omogenea.

Per l'analisi della carica superficiale si sa che una particelle dispersa in un liquido è caratterizzata dalla presenza di un doppio strato elettrico formato degli ioni presenti nel sistema. Questo succede proprio perché la particella possiede una carica superficiale che attira a sé gli ioni circostanti. Se la particella si muove nel liquido anche il doppio strato elettrico si muove con lei, lungo il cosiddetto piano di scivolamento ossia l'interfaccia del doppio strato elettrico con il liquido circostante. Il potenziale elettrico lungo questo piano è chiamato potenziale Z ed è compreso in genere tra i -200 mV e i 200 mV.

Se si applica un campo elettrico al mezzo liquido le particelle disperse si muoveranno verso il polo di carica opposta; pertanto, la direzione dello spostamento indica chiaramente il segno della carica sulla superficie. La velocità con cui si muovono le particelle è proporzionale alla grandezza della carica e misurando sia la velocità sia la direzione dello spostamento in un campo elettrico noto è possibile calcolare la Mobilità Elettroforetica e da qui il Potenziale Zeta del sistema.

Il potenziale Zeta è quindi determinato dall'analisi dello spettro di potenza modulato del movimento browniano combinato e del movimento guidato dal campo elettrico (velocità delle particelle). Il potenziale zeta è proporzionale alla mobilità. Per convertire la mobilità elettroforetica in potenziale zeta, devono essere considerati i seguenti parametri: costante dielettrica e coefficiente Henry.

Il potenziale zeta può essere calcolato tramite modelli teorici che lo collegano direttamente alla mobilità elettroforetica a partire dall'equazione di Smoluchowski:

91

$$U_e = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta}$$

 U_e indica la mobilità elettroforetica, ζ è il potenziale zeta, f(ka) indica la funzione di Henry e ε è la costante dielettrica.

Un alto potenziale z, in valore assoluto, è indice di buona stabilità del sistema in quanto le particelle non tenderanno a formare aggregati perché si respingono con forza presentando la stessa alta carica superficiale.

3.2.2 Tensiometro ad anello

Un tensiometro ad anello è uno strumento utilizzato per misurare la tensione superficiale di una sospensione. Si tratta di un dispositivo che in genere è costituito da un anello metallico sottile e flessibile, solitamente in platino o nichel-cromo, che viene immerso nella sospensione da analizzare, collegato a un sensore di forza o a una bilancia e a un meccanismo per sollevare o abbassare lentamente l'anello dentro e fuori dal liquido da testare. [63]

Il tensiometro ad anello funziona sfruttando la proprietà fisica della tensione superficiale, ovvero la tendenza dei liquidi a minimizzare l'area superficiale quando sono posti in contatto con una fase gassosa, come l'aria. Quando l'anello viene immerso nella sospensione, la tensione superficiale del liquido inizia a tirare sull'anello, provocando una deformazione del suo profilo. La tensione superficiale può quindi essere misurata in base alla forza necessaria per deformare l'anello. La forza necessaria per sollevare l'anello è legata alla tensione superficiale dalla seguente equazione:

$$F = w_{ring} + 4\pi R\gamma$$

Dove w_{ring} è il peso dell'anello meno la forza di galleggiamento dovuta alla parte dell'anello al di sotto della superficie liquida, R è la media tra il raggio interno ed esterno dell'anello. Per i calcoli viene utilizzata la forza massima e sono necessari fattori di correzione determinati empiricamente per eliminare l'effetto causato dal diametro finito dell'anello:

$$F = w_{ring} + 4\pi R\gamma f$$

Il tensiometro ad anello è uno strumento molto sensibile e preciso, in grado di misurare tensioni superficiali nell'intervallo tra 0,01 e 500 mN/m. Viene utilizzato in molti settori, tra cui la chimica, la biologia, la farmaceutica e l'industria alimentare, per studiare le proprietà delle sospensioni e dei materiali a contatto con le interfacce liquido-aria.



Figura 3.2.2.1 Stadi differenti dell'immersione dell'anello per il calcolo della tensione

3.2.3 Spettrofotometro UV-Visibile

La spettroscopia ultravioletta/visibile è una tecnica analitica che utilizza la luce visibile e ultravioletta per studiare le proprietà molecolari dei composti chimici. In particolare, la spettroscopia UV/vis consente di determinare la struttura elettronica di un composto, ovvero l'organizzazione degli elettroni nei suoi orbitali atomici e molecolari. Quando una molecola viene irradiata con luce UV/vis, gli elettroni presenti nei suoi orbitali atomici e molecolari possono essere eccitati, ovvero saltare a orbitali più energetici. Ciò produce una serie di transizioni elettroniche che possono essere rilevate come assorbimenti di luce a specifiche lunghezze d'onda. Questi assorbimenti sono specifici per ogni composto chimico e dipendono dalla sua struttura elettronica. [64]

Uno spettrofotometro UV/visibile è uno strumento utilizzato per misurare l'assorbimento di luce di un campione a diverse lunghezze d'onda nell'intervallo UV e visibile dello spettro elettromagnetico. L'apparecchio è composto da una sorgente di luce UV/visibile, una cella di campionamento in cui viene inserito il campione da analizzare, un monocromatore, un rivelatore elettronico, un amplificatore di segnale e un computer per la gestione dei dati. La sorgente di luce UV/visibile può essere costituita da una lampada a gas o una lampada al tungsteno, che emette luce a diverse lunghezze d'onda nell'intervallo UV/visibile. La cella di campionamento è realizzata in vetro o quarzo e ha una forma rettangolare con due finestre trasparenti, in modo che la luce possa passare attraverso il campione. Il monocromatore è un dispositivo che separa la luce in diverse lunghezze d'onda, ciò viene fatto utilizzando una griglia di diffrazione o un prisma, che riflette o rifrange la luce in modo che solo una lunghezza d'onda specifica raggiunga il rivelatore. In questo modo, lo spettrofotometro può eseguire misurazioni selettive delle proprietà di assorbimento del campione a una determinata lunghezza d'onda. Il rivelatore elettronico è un dispositivo che converte l'energia luminosa in un segnale elettrico e, in genere, lo spettrofotometro utilizza un fotodiodo o un fotomoltiplicatore come rivelatore. Il segnale elettrico generato dal rivelatore viene amplificato utilizzando un amplificatore di segnale per migliorare la sensibilità dell'apparecchio. Il computer gestisce i dati generati dallo spettrofotometro e consente all'operatore di visualizzare gli spettri di assorbimento e le concentrazioni delle soluzioni analizzate.

Lo spettro UV/vis può essere utilizzato per determinare la concentrazione di un composto in soluzione, poiché l'assorbimento di luce è proporzionale alla concentrazione del composto. Inoltre, lo spettro può fornire informazioni sulla struttura del composto e sulle sue proprietà chimiche, come la presenza di gruppi funzionali specifici. Per poter avere peò una correlazione tra l'assorbanza misurata e la concentrazione della sostanza è necessario tarare una retta di calibrazione, ossia prepararsi il composto da analizzare a diverse concentrazioni note e misurarne l'assorbanza. In questo modo siamo in grado di ottenere un'equazione che segue la legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon_{\lambda} l C$$

Dove ϵ_{λ} è il coefficiente di assorbimento molare, *C* è la concentrazione molare ed *l* è il cammino ottico, ossia il percorso del raggio luminoso lungo lo spessore del campione.

3.2.4 Microscopia ottica

Un microscopio ottico è uno strumento che permette di ingrandire l'immagine di un oggetto attraverso l'uso della luce visibile. Esso è costituito da diverse parti, tra cui:

- Obiettivo: l'obiettivo è la lente principale del microscopio ottico e ha il compito di ingrandire l'immagine dell'oggetto osservato.
- Oculare: l'oculare è la lente attraverso cui l'osservatore guarda l'immagine ingrandita dell'oggetto.
- Tubo: il tubo è la struttura che collega l'obiettivo all'oculare e che contiene i prismi e le lenti necessarie a mantenere l'immagine in fuoco.
- Stativo: lo stativo è la struttura principale del microscopio e ha il compito di supportare il tubo e gli altri componenti del microscopio.

- Platina: la platina è la superficie piana sulla quale viene posizionato l'oggetto da osservare.
- Illuminatore: l'illuminatore è la sorgente di luce che illumina l'oggetto da osservare.
- Diaframma: il diaframma è un dispositivo che regola l'intensità e l'angolo di illuminazione dell'oggetto.
- Regolazione di messa a fuoco: la regolazione di messa a fuoco permette di regolare la distanza tra l'obiettivo e l'oggetto da osservare, in modo da mantenere l'immagine in fuoco.
- Condensatore: il condensatore è una lente che concentra la luce sull'oggetto da osservare, aumentando così la nitidezza dell'immagine.

La microscopia ottica è una tecnica di analisi che utilizza un microscopio ottico per ingrandire e visualizzare oggetti di dimensioni microscopiche, invisibili ad occhio nudo. Questa tecnica sfrutta la luce visibile per generare l'immagine dell'oggetto e permette di osservare e studiare strutture biologiche, minerali, materiali, tessuti e altri campioni in modo dettagliato. Il microscopio ottico funziona attraverso l'uso di lenti e un sistema di illuminazione. La luce passa attraverso l'oggetto, viene distorta dalle variazioni di densità del campione e viene conversa dal sistema di lenti dell'obiettivo del microscopio. L'immagine viene poi ingrandita ulteriormente attraverso l'uso di lenti oculari e resa visibile all'osservatore. Esistono diverse tecniche di microscopia ottica, tra cui la microscopia a campo chiaro, la microscopia a contrasto di fase, la microscopia a fluorescenza e la microscopia confocale. Ognuna di queste tecniche sfrutta diversi principi fisici e si adatta a differenti tipi di campioni e applicazioni.

Nel nostro caso si è utilizzata la microscopia a fluorescenza [65], essa sfrutta la capacità di alcune sostanze (chiamate fluorofori o coloranti fluorescenti) di emettere luce quando sono eccitate da una sorgente di luce a una lunghezza d'onda specifica. Nello specifico un fluoroforo assorbe fotoni di una certa lunghezza d'onda e mostra come effetto la fluorescenza. Quando gli elettroni passano da uno stato eccitato a uno stato di riposo, perdono energia, questa perdita si traduce in un cambiamento dello spettro di emissione del fluoroforo a lunghezze d'onda maggiori rispetto allo spettro di assorbimento (eccitazione). Questo fenomeno è noto come legge di Stokes o spostamento di Stokes. Il microscopio a fluorescenza è costituito da una serie di componenti speciali, tra cui:

- Una sorgente di luce a una lunghezza d'onda specifica, che viene utilizzata per eccitare i fluorofori nel campione da analizzare.
- Un obiettivo ad alta apertura numerica, che raccoglie la luce emessa dal campione e la focalizza su un sistema di lenti.
- Un filtro di emissione, che seleziona la lunghezza d'onda della luce emessa dal fluoroforo e blocca la luce incidente.
- Un rivelatore, che trasforma la luce emessa dal fluoroforo in un segnale elettrico che viene poi elaborato e visualizzato su un monitor.

3.3 PREPARAZIONE NANOBOLLE

La produzione delle nanobolle segue il seguente protocollo:

300 microlitri di una soluzione etanolica di Epikuron 200 (3%, w/ v) contenente acido palmitico all'1% w/v sono stati aggiunti a 450 microlitri di decafluoropentano a temperatura ambiente. In seguito, 4.8 ml di acqua distillata sono stati aggiunti goccia a goccia alla miscela fino alla formazione di un'emulsione, il tutto sotto leggera agitazione. Successivamente, il sistema è stato omogeneizzato per 2 minuti a 12.000 rpm utilizzando un omogeneizzatore ad alto taglio (Ultraturrax, IKA, Germania) in un bagno di ghiaccio per evitare l'evaporazione del decafluoropentano. La terza fase consiste nell'aggiunta goccia a goccia di 150 microlitri di soluzione di chitosano (pH = 3,0) a basso peso molecolare all' 1,5 % w/v per formare il guscio polimerico delle nanobolle, il chitosano è stato aggiunto sotto lieve agitazione magnetica e mantenuto per 30 minuti a solubilizzarsi nella formulazione. Il chitosano, prima di essere utilizzato, è stato sciolto in una soluzione tampone acetata, in quanto è necessario un basso pH per garantire la solubilità del materiale.

Il farmaco, in base alle sue caratteristiche, va disciolto nel decafluoropentano se si vuole che sia incapsulato nel core, altrimenti va solubilizzato nei materiali che costituiscono lo shell. Nel nostro caso abbiamo utilizzato la curcumina, che viene integrata nella formulazione come segue: 1 mg di curcumina viene disciolta in 100 μ L di DMSO, successivamente 50 μ L di tale soluzione vengono solubilizzati in 1 ml di decafluoropentano, questa nuova soluzione di decafluoropentano verrà poi utilizzata per produrre le nanobolle con il farmaco incapsulato nel core.

3.3.1 CARATTERIZZAZIONE NANBOLLE

Le nanobolle sono state caratterizzate in termini di diametro medio, indice di polidispersità e potenziale Z mediante spettroscopia a correlazione fotonica.

Le analisi sono state eseguite con un angolo di diffusione di 90 ° e una temperatura di 25 ° C per i primi due parametri, per quanto riguarda il potenziale z si è applicato un campo elettrico di circa 15 V/cm per una conduttanza di circa 500 μ S. I campioni analizzati sono stati formulati come segue: 100 microlitri di nanobolle diluiti in 2,7 millilitri di acqua distillata. Per ogni misurazione effettuata sono stati prelevati tre campioni dalla stessa formulazione in modo da poter avere un parametro medio più affidabile. Per la misurazione del potenziale z la conduttanza della sospensione deve essere maggiore di 100 μ S, di conseguenza è stato necessario aggiungere qualche goccia di KCL 10mM alla sospensione.

La tensione superficiale è stata misurata tramite un tensiometro, in questo caso il campione non è stato diluito. In questo caso per ogni analisi effettuata il campione è stato misurato 5 volte.

Per quanto riguarda la misura del pH si è utilizzato un pHmetro, anche in questo caso il campione non è stato diluito.

Le nanobolle, inoltre, sono state visualizzate in fluorescenza al microscopio andando a marcare sia il decafluoropentano che il chitosano, in questa situazione dal campione sospeso in soluzione viene prelevata una goccia e posizionata sopra il vetrino.

Per gli studi di rilascio del farmaco è stato utilizzato uno spettrofotometro UV-Visibile e, previa formulazione della retta di taratura specifica per il farmaco utilizzato, sono stati analizzati i campioni della fase ricevente prelevando 1 mL di soluzione ad ogni step time.

3.4 RISULTATI

Per l'ottimizzazione della formulazione delle nanobolle siamo partiti dall'analisi della concentrazione di fosfolipidi da utilizzare in modo da ottenere le bolle più piccole possibili e con la tensione superficiale minore, in modo da favorirne la stabilità. Via via abbiamo aggiunto alla formulazione i componenti essenziali come il surfattante acido palmitico e il chitosano, anche per questi materiali abbiamo analizzato le concentrazioni ottimali. Tutti i risultati che seguono vengono riportati come media e deviazione standard.

Abbiamo analizzato la concentrazione di DPPC al 5% e al 3%, i risultati ottenuti sono una media di almeno 10 misurazioni per ogni caso studiato:

| NBS | Diametro medio [nm] | PDI | Potenziale Z [mV] | Tensione superficiale [mN/m] | рН |
|-----|------------------------|---------------|----------------------|---------------------------------|------|
| 5% | 390,6 <u>+</u> 76,6 | 0,202 ± 0,148 | -22,22 ± 5,16 | 49,7 ± 2,6 | 7,33 |
| 3% | 372,3 ± 22,4 | 0,228 ± 0,094 | -20,42 ± 8,68 | 49,3 ± 0,9 | 7,55 |

Tabella 3.4.1 Confronto dei parametri delle nanobolle con shell di DPPC alla concentrazione del 5% e del 3%



Grafico 3.4.2 – Confronto tra il diametro medio della formulazione con DPPC al 5% e al 3%

Come si può notare dai valori ottenuti le due concentrazioni sono compatibili dal punto di vista statistico, tuttavia sembra più ottimale la concentrazione al 3% perché risultate più ripetibili e la deviazione standard attorno al raggio medio è inferiore.

Il passo successivo è stata l'aggiunta dell'acido palmitico per ridurre ulteriormente la tensione superficiale, questo è stato aggiunto con una concentrazione dell'1% a entrambe le formulazioni con il DPPC per vedere se l'interazione tra i due materiali portasse a risultati differenti:

| NBs | Diametro medio [nm] | PDI | Potenziale zeta [mV] | Tensione superficiale [mN/m] | рН |
|-------|------------------------|---------------|-------------------------|---------------------------------|------|
| 5%+AP | 488,8 ± 94,5 | 0,313 ± 0,047 | -25,62 <u>+</u> 8,59 | 30,2 ± 4,0 | 6,94 |
| 3%+AP | 377,7 ± 63,0 | 0,307 ± 0,069 | -28,94 ± 12,60 | 34,2 ± 3,0 | 7,33 |

Tabella 3.4.3 Confronto dei parametri tra le nanobolle con shell di DPPC al 5% e 3% con aggiunta di acido palmitico



3.4.4 Confronto tra il diametro medio della formulazione con DPPC5%+AP1% e DPPC3%+AP1%

In questo caso, nonostante la combinazione acido palmitico e DPPC al 5% è risultata con una tensione superficiale minore, si è optato per la combinazione con il DPPC al 3% favorendo la formazione di bolle di minor raggio e con una dispersione minore.

È seguita l'aggiunta del chitosano a basso peso molecolare, anche in questo caso si sono studiate varie concentrazioni di chitosano prima al 2% che ha portato ai seguenti risultati:

| NBs | Diametro medio [nm] | PDI | Potenziale zeta [mV] | Tensione superficiale [mN/m] | рН |
|-----|------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------------------|------|
| 2% | 581,5 <u>+</u> 134,78 | 0,359 <u>+</u> 0,039 | 20,50 <u>+</u> 8,40 | 29,9 ± 0,9 | 3,79 |

Tabella 3.4.5 Tabella riassuntiva dei parametri delle nanobolle con shell in DPPC al 3%, acido palmitico all'1% e chitosano a basso PM al 2%

Come si può notare con l'aggiunta del chitosano il pH è sceso drasticamente perché il chitosano per essere solubilizzato e di carica positivo deve essere disciolto all'interno di un buffer acetico, inoltre si noti come il potenziale zeta sia diventato positivo. Per quanto riguarda la tensione superficiale questa è leggermente diminuita ma il raggio è aumentato così come la deviazione standard, questo probabilmente è dovuto al fatto che la concentrazione di chitosano utilizzata non è ottimale.

Si è provato a utilizzare una concentrazione all'1,5% e i risultati sono nettamente migliorati, a questo punto si è provato a inserire all'interno della formulazione diversi quantitativi in μ L di chitosano:

| NBs | Diametro medio [nm] | PDI | Potenziale zeta [mV] | otenziale zeta Tensione [mV] superficiale [mN/m] | |
|--------|------------------------|----------------------|-------------------------|---|------|
| 200 µL | 677,8 <u>+</u> 106,4 | 0,242 <u>+</u> 0,155 | 28,45 ± 10,99 | 30,4 ± 1,4 | 3,31 |
| 150 μL | 374,5 <u>+</u> 30,1 | 0,312 ± 0,031 | 18,23 <u>+</u> 9,53 | 28,7 ± 0,6 | 3,35 |
| 100 µL | 546,3 <u>+</u> 75,9 | 0,251 ± 0,081 | 24,92 ± 6,41 | 30,2 ± 0,4 | 3,37 |

Tabella 3.4.6 Tabella con i parametri delle nanobolle a diverse concentrazioni di chitosano al 2%



Grafico 3.4.7 Confronto tra il diametro medio delle formulazioni con l'aggiunta di 200, 150 e 100 μL di chitosano a basso peso molecolare all' 1,5%

La formulazione con l'aggiunta di 150 μ L è quella che ha dato risultati migliori con raggio e tensione superficiali minori. Si può notare che a livello statistico la formulazione con l'aggiunta di 150 μ L è statisticamente differente dalle altre due formulazioni, quest'ultime inoltre da un punto di vista statistico sono considerabili uguali perché le barre d'errore si sovrappongono.

Si è proseguito valutando il chitosano a peso molecolare medio sempre solubilizzato in un acetic buffer all'1,5% e andando a valutare diversi volumi aggiunti alle nanobolle:

| NBs | Diametro medio [nm] | PDI | Tensione superficiale [mN/m] | рН |
|--------|------------------------|---------------|---------------------------------|------|
| 300 µL | 922,2 ± 288,8 | 0,401 ± 0,048 | 27,9 ± 0,4 | 3,73 |
| 250 μL | 1221,7 <u>+</u> 350,2 | 0,214 ± 0,181 | 27,7 ± 0,8 | 3,74 |
| 200 µL | 789,6 <u>+</u> 479,0 | 0,346 ± 0,140 | 29,7 ± 0,5 | 3,74 |
| 150 μL | 791,6 <u>+</u> 119,3 | 0,382 ± 0,044 | 30,2 ± 0,3 | 3,77 |
| 100 µL | 635,3 <u>+</u> 93,2 | 0,325 ± 0,122 | 27,7 ± 0,3 | 3,79 |

Tabella 3.4.8 riassunto dei parametri delle nanobolle con chitosano all'1.5% a varie concentrazioni



Grafico 3.4.9 Confronto tra il diametro medio delle formulazioni con l'aggiunta di 300,250,200, 150 e 100 μ L di chitosano a medio peso molecolare all' 1,5%

Come si nota dai risultati il chitosano a medio peso molecolare peggiora notevolmente le nanobolle, i raggi medi sono caratterizzati da un'alta dispersione indice del fatto che si formano diverse popolazioni di bolle. Inoltre, l'alta dispersione non permette di valutare quale concentrazione di chitosano sia quella ottimale perché le formulazioni risultano praticamente uguali da un punto di vista statistico. La tensione superficiale è diminuita ma comunque questo tipo di formulazione non può essere presa in considerazione.

La formulazione scelta per svolgere i test con gli ultrasuoni e ottimizzare il modello teorica risulta essere quella con DPPC al 3%, acido palmitico all'1% e 150 µL di chitosano all'1,5% a basso peso molecolare, in seguito sono stati svolti dei test di ripetibilità quindi la stessa formulazione è stata ripetuta e caratterizzata 3 volte, mettendo a confronto i diametri medi prima e dopo l'aggiunta del chitosano:

| NBs w/o chitosano | diametro medio [nm] | PDI |
|----------------------|------------------------|---------------|
| 1 | 447,2 ± 46,7 | 0,326 ± 0,040 |
| 2 | 472,8 <u>+</u> 57,5 | 0,134 ± 0,128 |
| 3 | 389,4 ± 49,3 | 0,295 ± 0,122 |

Tabella 3.4.10 Test sulla ripetibilità delle nanobolle senza chitosano

| NBs + chitosano | diametro medio [nm] | PDI | Potenziale zeta [mV] | Tensione superficiale [mN/m] |
|--------------------|------------------------|---------------|-------------------------|---------------------------------|
| 1 | 478,3 ± 62,2 | 0,307 ± 0,034 | 18,23 ± 9,53 | 30,5 ± 1,7 |
| 2 | 466,6 <u>+</u> 83,1 | 0,300 ± 0,062 | 35,53 <u>+</u> 12,75 | 27,0 ± 0,3 |
| 3 | 381,7 <u>+</u> 35,1 | 0,310 ± 0,032 | 16,54 ± 5,85 | 26,8 ± 0,5 |
| media | 442,2 ± 52,7 | 0,306 ± 0,005 | 23,43 ± 10,51 | 28,1 ± 2,1 |

Tabella 3.4.11 Test sulla ripetibilità delle nanobolle con chitosano all'1.5% aggiunto con un volume di 150 μL



Grafico 3.4.12 – Test sulla ripetibilità, confronto del diametro medio su 3 formulazioni distinte prima e dopo l'aggiunta

Come si può vedere le tre formulazioni sono risultate compatibili visto che le barre di errore sono confrontabili, i diametri medi dopo l'aggiunta del chitosano sono rimasti stabili e i valori di tensione superficiale e potenziale zeta sono coerenti.

Ottenuta la ripetibilità della formulazione scelta abbiamo svolto dei test preliminari per controllare la stabilità delle bolle dopo l'insonazione con un probe di ultrasuoni per aerosol con frequenza di 1MHz in continua e insonando per 30s e 60s abbiamo ottenuto seguenti risultati riportati in tabella. Le sperimentazioni sono state fatte su 3 formulazioni distinte e mediate mettendo a confronto le nanobolle prima e dopo l'insonazione e confrontando le bolle rivestite da quelle non:

| NBs | Diametro medio [nm] PE | | PDI | DI potenziale Z [mV] | | | Tensione superficiale [mN/m] | |
|------------------------|---------------------------|------------------------|------------------|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------------------|----------------------|
| | 30s | 60s | 30s | 60s | 30s | 60s | 30s | 60s |
| US w/o chitosano | 404,0 ± 62,2 | 396,6 <u>+</u> 49,8 | 0,285 ± 0,101 | 0,303 ± 0,066 | -31,33 ± 17,93 | -27,32 ± 15,52 | 33,1 <u>+</u> 1,8 | 33,6 <u>+</u> 4,4 |
| US + chitosano | 481,9 ± 69,3 | 396,1 <u>+</u> 60,7 | 0,316 ± 0,094 | 0,318 ± 0,060 | 27,21 <u>+</u> 5,46 | 33,34 <u>+</u> 9,43 | 35,4 ± 5,4 | 36,7 <u>+</u> 1,1 |
| No US + chitosano | 444,2 - | <u>+</u> 78,9 | 0,306 | ± 0,44 | 20,70 <u>+</u> | 13,20 | 28,1 <u>-</u> | <u>+</u> 2,0 |
| No US w/o chitosano | 377,7 - | ± 63,0 | 0,307 - | ± 0,069 | -28,94 <u>-</u> | <u>+</u> 12,60 | 34,2 - | ± 3,0 |

Tabella 3.4.13 Tabella riassuntiva dei parametri delle nanobolle insonate a 30 e 60 secondi con i controlli non insonati.


Grafico 3.4.13 Confronto tra le tensioni superficiali delle bolle non rivestite



Grafico 3.4.14 Confronto tra le tensioni superficiali delle bolle rivestite col chitosano

Come si può vedere in tabella con l'insonazione le bolle sono rimaste stabili in termini di diametro, indice di polidispersità e potenziale Z. Per quanto riguarda la tensione superficiale per le bolle non rivestite è rimasta simile post insonazione, invece per le bolle con il chitosano vi è un visibile aumento, molto probabilmente dovuta a una

riorganizzazione del monolayer di Langmuir che ricopre la bolla. Dal grafico si può notare come la durata dell'insonazione non influenzi significativamente la variazione di tensione, i risultati a 30s o 60s si considerano uguali dal punto di vista statistico.

Per valutare meglio gli effetti degli ultrasuoni sul sistema siamo ricorsi all'uso di uno strumento modulabile, nato per uso estetico, in grado di generare ultrasuoni a differenti frequenze e intensità.

Lo strumento in questione è in grado di modulare la frequenza disponendo di 3 probe diversi (1 MHz, 2MHz, 3MHz) e potendo settare l'intensità dell'onda e il pulse da 0 al 90%. Per le nostre sperimentazioni l'intensità massima utilizzabile deve essere di 3W/cm² (normativa CEI 601-2-5), quindi verranno valutate intensità di 0.5 W/cm², 1.5 W/cm² e 3 W/cm². Inoltre il pulse verrà settato sempre al 90% in modo da avere un'onda continua.

Ricordando che l'intensità di onda acustica si misura come segue in relazione alla potenza massima e ampiezza:

$$I = \frac{P_{max}^{2}}{2\rho v} = \frac{P_{eff}^{2}}{\rho v}$$
$$I = \frac{1}{2}\rho v \omega^{2} A^{2}$$

Dove ρ è la densità del mezzo e v è la velocità del suono nel mezzo, nel nostro caso la formulazione viene approssimata all'acqua quindi i due valori saranno rispettivamente 1000 kg/m³ e 1500 m/s. Inoltre, ω è la pulsazione e dipende dalla frequenza dell'onda acustica. In questo modo sappiamo che un limite di intensità massimo di 3W/cm² corrispondono a 300 kPa.

I valori di frequenza utilizzati sono 1MHz, 2MHz e 3MHz mentre le intensità analizzate sono 0.6 W/cm², 1 W/cm², 1.6 W/cm² e 2 W/cm². Di seguito vi è la tabella riassuntiva dei risultati ottenuti:

| Intensità [W/cm²] | no US | 0.6 | 1 | no US | 1.6 | 2 |
|----------------------|-------------|-------------|----------------------|-------------|---------------------|---------------------|
| Diametro | 438,7±57,7 | 621,6±155,9 | 577,7 <u>±</u> 138,1 | 386,7±63,4 | 379,0 <u>±</u> 82,7 | 502,6 <u>+</u> 90,3 |
| Δ% | | 41,69% | 31,68% | | -1,99% | 29,97% |
| PDI | 0,318±0,112 | 0,326±0,142 | 0,339±0,101 | 0,366±0,126 | 0,342±0,160 | 0,320±0,110 |
| Δ% | | 2,52% | 6,60% | | -6,56% | -12,57% |
| Pot. Z | 36,22±3,14 | 27,61±7,34 | 26,43 <u>+</u> 4,18 | 21,97±4,50 | 22,10±4,22 | 23,06±9,31 |
| Δ% | | -23,77% | -27,03% | | 0,59% | 4,96% |
| γ | 29,3±0,2 | 41,4±0,9 | 38,2 <u>+</u> 3,0 | 30,3±0,6 | 41,5±0,7 | 40,5±0,3 |
| Δ% | | 41,30% | 30,71% | | 36,96% | 33,66% |

1 MHz

Tabella 3.4.15 tabella riassuntiva dei parametri delle bolle post insonazione a varie intensità e alla frequenza di 1MHz, vengono riportati anche gli incrementi percentuali rispetto al controllo

| Intensità [W/cm²] | no US | 0.6 | 1 | no US | 1.6 | 2 |
|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Diametro | 461,2±66,7 | 526,1 <u>+</u> 98,3 | 459,2±100,4 | 461,9 <u>+</u> 93,3 | 541,4 <u>±</u> 80,7 | 557,2 <u>+</u> 55,3 |
| Δ% | | 14,07% | -0,43% | | 17,14% | 20,63% |
| PDI | 0,342±0,120 | 0,341±0,051 | 0,339±0,033 | 0,368±0,033 | 0,323±0,068 | 0,344±0,034 |
| Δ% | | -0,29% | -0,88% | | -12,23% | -6,52% |
| Pot. Z | 22,25 <u>+</u> 5,24 | 22,10±4,22 | 23,06 <u>+</u> 9,31 | 34,56±15,90 | 34,88±5,24 | 31,63±5,72 |
| Δ% | | -0,67% | 3,64% | | 0,93% | -8,48% |
| γ | 30,7±0,3 | 38,8±1,1 | 37,6 <u>+</u> 0,7 | 30,4±0,4 | 34,9±0,9 | 32,9±0,4 |
| Δ% | | 26,38% | 22,46% | | 14,80% | 8,22% |

2MHz

Tabella 3.4.16 tabella riassuntiva dei parametri delle bolle post insonazione a varie intensità e alla frequenza di 2MHz, vengono riportati anche gli incrementi percentuali rispetto al controllo

| Intensità [W/cm²] | no US | 0.6 | 1 | no US | 1.6 | 2 |
|----------------------|---------------------|---------------------|-------------|----------------------|-------------|-------------|
| Diametro | 521,7 <u>+</u> 69,9 | 584,8 <u>+</u> 74,7 | 519,0±79,9 | 490,1 <u>±</u> 140,7 | 339,3±49,0 | 565,8±59,5 |
| Δ% | | 12,10% | -0,51% | | -30,77% | 15,45% |
| PDI | 0,295±0,156 | 0,340±0,044 | 0,347±0,038 | 0,279±0,110 | 0,314±0,034 | 0,282±0,117 |
| Δ% | | 15,25% | 17,63% | | 12,54% | 1,08% |
| Pot. Z | 18,04±5,04 | 35,99 <u>±</u> 8,11 | 32,70±7,99 | 18,45±8,92 | 24,52±13,88 | 31,38±8,19 |
| Δ% | | 99,50% | 81,26% | | 32,90% | 70,08% |
| γ | 28,2±1,0 | 34,8±0,9 | 37,6±1,2 | 30,3±1,0 | 40,1±0,3 | 36,6±2,0 |
| Δ% | | 23,40% | 33,33% | | 32,34% | 20,79% |

Tabella 3.4.17 tabella riassuntiva dei parametri delle bolle post insonazione a varie intensità e alla frequenza di 3MHz, vengono riportati anche gli incrementi percentuali rispetto al controllo

Dai risultati ottenuti si può notare che la frequenza in cui si ottengono delle bolle più stabili sono 2MHz, in questo caso infatti abbiamo la formulazione con la tensione superficiale minore. Questo valore è indice del fatto che siamo ad una frequenza prossima alla frequenza di risonanza delle bolle.



Grafico 3.4.18 Confronto tra le tensioni superficiali a diverse intensità e frequenza

Si può notare che in generale dopo l'applicazione degli ultrasuoni la tensione superficiale aumenta in media tra l'8,22 % e il 41,30 % a seconda dei parametri. Per quanto riguarda gli aumenti percentuali degli altri valori, questi non sono significativi da un punto di vista statistico in quanto le deviazioni standard sono compatibili, di conseguenza gli altri parametri vengono considerati stabili.

Per andare a spiegare l'aumento della tensione superficiale si è svolta un'analisi al microscopio fluorescente andando a marcare con il Coumarin 6 il decafluoropentano. Le nanobolle, successivamente, sono state trattate con ultrasuoni alle frequenze di 1MHz, 2MHz e 3MHz e con un'intensità di 1.6 W/cm².

I risultati sono riportati nelle immagini seguenti:



Figura 3.4.19 – Immagine delle nanobolle sottoposte alla frequenza di 2 MHz e intensità di 1.6 W/cm^2



Figura 3.4.20 – Immagine delle nanobolle non sottoposte ad ultrasuoni



Figura 3.4.21 – Confronto tra le nanobolle sottoposte ad ultrasuoni (sx) e non sottoposte (dx)

Come si può notare dalle immagini, quando le nanobolle vengono sottoposte ad ultrasuoni si ha l'evaporazione del decafluoropentano e di conseguenza il Coumarin precipita all'interno della bolla come ci si poteva aspettare.

Sono state svolte delle analisi di controllo con le nanobolle non rivestite di chitosano per poterle comparare a quelle caratterizzate dal monolayer e valutare come il chitosano si riarrangi post trattamento.

| NBs | diametro medio [nm] | PDI | Potenziale zeta [mV] | Tensione superficiale [mN/m] |
|-----------------|------------------------|---------------|----------------------------|------------------------------------|
| No US | 370,2 ± 25,0 | 0,327 ± 0,026 | -15,24 ± 5,41 | 32,3 ± 0,9 |
| 2MHz, 1W/cm² | 492,4 ± 77,6 | 0,323 ± 0,049 | -15,36 ± 3,05 | 35,1 ± 0,3 |
| Incremento% | 33,01% | -1,22% | 0,78% | 8,67% |

Tabella 3.4.22 Confronto tra nanobolle non rivestite prima e dopo l'insonazione

| | 1MHz | 2MHz | 3MHz |
|--------------------------|----------|------------|------------------|
| Tensione superficiale | 356+10 | 351+03 | 31 7+0 7 |
| [mN/m] | <u> </u> | 00)1 - 0)0 | <u>01), ÷0),</u> |

Nello specifico si ha analizzato la tensione superficiale a tutte e tre le frequenze

Tabella 3.4.23 Tensioni superficiali di nanobolle non rivestite post insonazione a diverse frequenze

Come si può notare dai dati, la tensione superficiale delle bolle senza il chitosano risulta sempre minore della tensione misurata sulla nanobolla con il chitosano, indipendentemente dalla frequenza. Questo indica una netta riorganizzazione del monolayer.

Se andiamo a studiare la pressione superficiale relativa, che si calcola come segue:

$$\pi^* = \pi_{lipid-polimer} - \pi_{lipid}$$

- > Valori positivi π^* : il polimero viene assorbito all'interfaccia e contribuisce ad aumentare la pressione superficiale
- Negative π*: il polimero interagisce attivamente aumenta l'impacchettamento delle molecole lipidiche andando ad abbassare la pressione superficiale

Nei casi precedenti ci siamo sempre trovati nella condizione in cui l'aggiunta del chitosano abbassava la tensione superficiale e quindi nel caso in cui si ottiene un valore negativo di pressione superficiale relativa, ora siamo nel caso opposto. Il trattamento con gli ultrasuoni ha fatto sì che il monolayer cambiasse organizzazione e il chitosano si assorbisse all'interfaccia entrando della situazione in cui viene chiamato "subsuperficie" (nella figura ci troviamo nella situazione c) [50].



Figura 3.4.24 Disposizione del chitosano all'interfaccia

Sono stati svolti dei test al microscopio ottico a fluorescenza per poter valutare questo riarrangiamento del chitosano, per farlo si è utilizzato un chitosano fluorescente.

I test sono stati condotti sulle nanobolle non insonate, sulle nanobolle insonate alla frequenza e potenza che conferiscono una tensione superficiale minore e quindi più simili alle nanobolle non trattate (2W/cm², 2MHz) e sulle nanobolle alla frequenza di 1MHz e all'intensità di 0,6W/cm² dove invece si vede un aumento significativo della tensione superficiale.





Figura 3.4.25 Confronto tra le nanobolle non insonate (sx) e le nanbolle insonate a 2W/cm² e 2MHz (dx) con chitosano fluorescente



Figura 3.4.26 Nanobolla insonata a 1MHz e 0,6W/cm² con chitosano fluorescente

Come si può notare dalle precedenti immagini le nanobolle non insonate presentano un'organizzazione dello shell tale per cui il chitosano subentra nella membrana fosfolipidica e ne abbassa la tensione superficiale, il seguente fenomeno si mantiene per i parametri ultrasonori che mantengono bassa la tensione superficiale. Laddove la tensione superficiale, con l'aggiunta del chitosano aumenta, fa sì che il chitosano si disponga in subsuperficie e viene assorbito senza immettersi nella membrana fosfolipidica e aumentando così la pressione superficiale della bolla. In generale possiamo supporre che attorno ai 2 MHz ci troviamo di fronte alla frequenza di risonanza del sistema, garantendo la situazione più stabile possibile che vede un aumento dell'energia interna. Nelle altre frequenze, gli ultrasuoni hanno riorganizzato la membrana portando il sistema al minimo energetico, che vede la disposizione più ordinata possibile.

È importante andare a studiare il comportamento che ha il rilascio del farmaco in base ai parametri ultrasonori, ma soprattutto come l'organizzazione del monolayer influenzi la fuoriuscita di farmaco.

In seguito, si ha incorporato nella formulazione il farmaco antitumorale, nel nostro caso si è scelta la curcumina che verrà disciolta nel decafluoropentano prima di procedere alla formazione delle nanobolle. L'obbiettivo è quello di ottimizzare i parametri degli ultrasuoni per ottenere il rilascio più efficiente possibile in base al caso specifico che si desidera. Prima però di procedere allo studio sul rilascio abbiamo condotto dei test per verificare che con l'aggiunta del farmaco i valori di diametro, potenziale z, PDI e tensione superficiale rimangano coerenti con quelli trovati in precedenza in assenza di farmaco.

| NBs | diametro medio [nm] | PDI | Potenziale zeta [mV] | Tensione superficiale [mN/m] |
|---------|------------------------|---------------|-------------------------|---------------------------------|
| No drug | 442,2 ± 52,7 | 0,306 ± 0,005 | 23,43 ± 10,51 | 28,1 ± 2,1 |
| + drug | 530,8 ± 70,5 | 0,320 ± 0,092 | 27,85 <u>+</u> 11,89 | 29,4 ± 0,7 |

Tabella 3.4.27 confronto dei parametri della nanobolle prima e dopo l'incapsulamento del farmaco



Grafico 3.4.28 confronto tra i diametri di nanobolle che incapsulano il farmaco e non incapsulano il farmaco



Grafico 3.4.29 confronto tra le tensioni superficiali tra nanobolle che incapsulano il farmaco e non incapsulano il farmaco

Come si può notare dai grafici i parametri prima e dopo l'aggiunta del farmaco sono statisticamente confrontabili sia in termini di diametro che di tensione superficiale.

Si sono analizzati i parametri delle nanobolle anche post insonazione per verificare che il trend fosse lo stesso ottenuto in precedenza quando le bolle non incapsulavano il farmaco. Le sperimentazioni sulle nanobolle sono state condotte alla frequenza di 1MHz e alle intensità di 0.6 W/cm², 1 W/cm², 1.6 W/cm², 2 W/cm².

| Intensità [W/cm²] | no US | 0.6 | 2 | no US | 1 | 1.6 |
|----------------------|-------------|---------------------|---------------------|-------------|----------------------|----------------------|
| Diametro | 501,7±37,10 | 572,7 <u>+</u> 99,5 | 619,0 <u>+</u> 96,1 | 560,0±85,4 | 575,2 <u>+</u> 112,3 | 572,9 <u>±</u> 134,6 |
| Δ% | | 14,15% | 23,38% | | 2,71% | 2,84% |
| PDI | 0,317±0,057 | 0,365±0,028 | 0,356±0,034 | 0,323±0,120 | 0,344±0,053 | 0,342±0,100 |
| Δ% | | 15,14% | 12,30% | | 6,50% | 5,88% |
| Pot. Z | 30,05±13,08 | 32,61±6,26 | 22,36±10,62 | 25,66±11,93 | 29,07±16,24 | 31,27±16,37 |
| Δ% | | 8,52% | 22,59% | | 13,29% | 21,86% |
| γ | 28,8±0,2 | 43,0±0,6 | 38,7 <u>+</u> 0,7 | 30,0±0,3 | 36,2±0,5 | 38,3±0,8 |
| Δ% | | 49,31% | 34,38% | | 20,67% | 27,67% |

1MHz

Tabella 3.4.30 Riassunto dei parametri delle nanobolle che incapsulano il farmaco post insonazione a diverse intensità per la frequenza di 1MHz

Come si può notare dai dati riportati in tabella i parametri delle nanobolle con il farmaco incapsulato risultano coerenti con i valori trovati in precedenza. Di conseguenza si è proceduto a svolgere il test sul rilascio del farmaco.

I test sono stati svolti come segue: la curcumina è stata solubilizzata all'interno del core delle nanobolle e la concentrazione di farmaco teorica incapsulata è di 40 µg/ml. Dopo aver incapsulato il farmaco, le nanobolle vengono trattate agli ultrasuoni a diverse frequenze (1,2,3 MHz) e intensità (0.6, 1, 1.6 e 2 W/cm²) e poi il rilascio viene effettuato sempre inserendo la formulazione di 2 ml all'interno di una membrana di cellulosa sospesa in una soluzione acquosa di etanolo al 30% di 20 ml e sotto agitazione di 900 rpm, la scelta dell'etanolo è stata necessaria in quanto la curcumina ha una scarsissima solubilità in acqua. A step time prestabiliti è stato prelevato un campione di fase ricevente e analizzato allo spettrofotometro, ogni volta dopo un prelievo la fase ricevente è stata riportata a volume iniziale. Gli step time di prelievo sono i seguenti: 15 min, 30 min, 45 min, 1h, 2h e 6h.

Per prima cosa è stata calcolata la retta di taratura della curcumina per lo spettrofotometro UV-Vis ritrovando un'equazione per il calcolo della concentrazione di

 $A = 0,0551 \cdot C$

Sono stati svolti degli studi di rilascio di controllo per le nanobolle non insonate:



Grafico 3.4.31 Test di rilascio di curcumina per le nanobolle non trattate con US

I risultati ottenuti di farmaco % rilasciato nella fase ricevente per 1 MHz sono i seguenti:



Grafico 3.4.32 Rilascio di curcumina a diverse intensità e alla frequenza di 1MHz

Come si può notare a questa frequenza vediamo che le Intensità minori delle onde acustiche hanno prodotto un lieve picco iniziale di rilascio di farmaco mentre le intensità maggiori permettono un rilascio più lento e controllato, in generale aumentando l'intensità dell'onda il rilascio diminuisce. La fuoriuscita del farmaco con questo set di parametri risulta, però, meno contenuta rispetto alle nanobolle non insonate. I risultati per la frequenza di 2MHz sono i seguenti:



Grafico 3.4.33 Rilascio di curcumina a diverse intensità e alla frequenza di 2MHz

Anche a questa frequenza notiamo che aumentando l'intensità dell'onda acustica il rilascio diminuisce, le curve di rilascio presentano un plateau iniziale più accentuato quando ci troviamo a basse intensità. In generale appare che il rilascio a questa frequenza risulta minore rispetto alla frequenza di 1MHz, è da notare che alla frequenza di 2MHz avevamo trovato un aumento percentuale della tensione superficiale in media minore rispetto alle altre frequenza, di conseguenza ci troviamo di fronte al caso in cui la parete della bolla si è riorganizzata il meno possibile mantenendo intatto il multilayer di Langmuir e promuovendo un rilascio più controllato.



I risultati per la frequenza di 3MHz sono i seguenti:

Grafico 3.4.34 Rilascio di curcumina a diverse intensità e alla frequenza di 3MHz

Qui possiamo vedere che tutte le intensità sono caratterizzate da un picco di rilascio nella prima ora che varia a seconda delle intensità, in questo caso le intensità maggiori hanno un picco di rilascio che si piazza intorno alla prima mezz'ora mentre le intensità minori hanno il picco intorno ai sessanta minuti. In generale la % di farmaco rilasciata è minore rispetto alle nanobolle trattate a 1 MHz ma la curva di rilascio risulta meno controllata rispetto ai 2Mhz e al controllo non insonato.



Andando a comparare le diverse frequenze otteniamo i seguenti grafici:

Grafico 3.4.35 Rilascio di curcumina a diverse frequenze e all'intensità di 0,6W/cm²



Grafico 3.4.36 Rilascio di curcumina a diverse frequenze e all'intensità di 1W/cm²



Grafico 3.4.37 Rilascio di curcumina a diverse frequenze e all'intensità di 1,6W/cm²



Grafico 3.4.38 Rilascio di curcumina a diverse frequenze e all'intensità di 2W/cm²

Come si può notare dai grafici, a tutte le intensità la frequenza di 2 MHz permette un rilascio minore e più controllato nel tempo, risultando la frequenza ottimale per il rilascio di farmaci antitumorali. Per quanto riguarda l'intensità dell'onda acustica, quella che ha prodotto risultati migliori è l'intensità di 2 W/cm² la quale evita picchi di rilascio, fatta eccezione per i 3 MHz, o abbassamenti ma permette un rilascio quasi costante nel tempo e ci si aspetta più prolungato.

4 CONCLUSIONE

La formulazione con i parametri di raggio, indice di polidispersità e tensione superficiale migliore risulta essere quella formata da un layer di Epikuron al 3% e acido palmitico all'1% e un altro layer di chitosano a basso peso molecolare all'1,5% aggiunto alla formulazione con un volume di 150 µL.

In generale gli studi con gli ultrasuoni per le bolle non caricate hanno mostrato che in termini di raggio vediamo in media un aumento, ma a livello statistico sono considerabili invariati prima e dopo insonazione. La tensione superficiale ha visto sempre un aumento percentuale significativo anche a livello statistico, dove la frequenza di 2 MHz è stata l'unica a produrre un aumento contenuto e quindi è stata considerata la frequenza più stabile per le bolle, nonostante l'insonazione lo shell è rimasto intatto e con carica superficiale positiva come avevamo previsto.

L'obbiettivo è quello di cercare di ottenere la curva di rilascio migliore in relazione ai parametri degli ultrasuoni selezionati, il rilascio più costante possibile nel tempo è quello ottenuto a una frequenza di 2MHz e a un'intensità di 2W/cm². Se si va a riprendere la tabella 3.4.16 si nota che in questo setting di parametri otteniamo la formulazione più stabile della nanobolla non caricata in termini di raggio e tensione superficiale, di conseguenza questa scoperta ci fa ben sperare di aver trovato dei parametri validi per poter utilizzare tale macchinario per uso clinico e accoppiato alla formulazione di nanobolle studiata. È importante notare la correlazione che c'è tra la curva di rilascio e la tensione superficiale, nel corso di questo studio abbiamo notate che dopo l'insonazione la pressione superficiale relativa è diventata positiva, di conseguenza il chitosano si è disposto come subfase aumentando in generale il rilascio di farmaco rispetto alla situazione in cui il chitosano è penetrato nella membrana di fosfolipidi riducendo la tensione superficiale, in questo caso il rilascio di farmaco risulta più controllato.

Ovviamente altri studi più approfonditi vanno condotti sia sul design e sintesi delle nanobolle sia sull'ottimizzazione dei parametri ultrasonori per poter validare questo prodotto di combinazione, tuttavia le basi per poter compiere questo lavoro ci sono e sono promettenti.

5 BIBLIOGRAFIA

- [1] D. V. B. Batchelor *et al.*, "Nanobubbles for therapeutic delivery: Production, stability and current prospects," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 54, p. 101456, 2021, doi: 10.1016/j.cocis.2021.101456.
- [2] C. L. Shapiro and A. Recht, "Side effect of adjuvant treatment of breat cancer," J. *Med.*, vol. 344, no. 26, pp. 1997–2008, 2001.
- [3] J. A. Wargo, A. Reuben, Z. A. Cooper, K. S. Oh, and R. J. Sullivan, "Immune Effects of Chemorapy, Radiation, and Targeted rapy and Opportunities for Combination with Immunorapy," *Semin. Oncol.*, vol. 42, no. 4, pp. 601–616, 2015, doi: 10.1053/j.seminoncol.2015.05.007.
- [4] A. I. Minchinton and I. F. Tannock, "Drug penetration in solid tumours," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, no. 8, pp. 583–592, 2006, doi: 10.1038/nrc1893.
- P. S. Chandra *et al.*, "Psychological well-being among cancer patients receiving radiotherapy--a prospective study.," *Qual. life Res. an Int. J. Qual. life Asp. Treat. care Rehabil.*, vol. 7, no. 6, pp. 495–500, Aug. 1998, doi: 10.1023/a:1008822307420.
- [6] L. Ross, E. H. Boesen, S. O. Dalton, and C. Johansen, "Mind and cancer: does psychosocial intervention improve survival and psychological well-being?," *Eur. J. Cancer*, vol. 38, no. 11, pp. 1447–1457, 2002, doi: https://doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00126-0.
- [7] L. L. Northouse, M. C. Katapodi, A. M. Schafenacker, and D. Weiss, "The Impact of Caregiving on the Psychological Well-Being of Family Caregivers and Cancer Patients," *Semin. Oncol. Nurs.*, vol. 28, no. 4, pp. 236–245, 2012, doi: https://doi.org/10.1016/j.soncn.2012.09.006.
- [8] U. S. FDA, "Combination Products," *New Drug Approval Process, Fifth Edition*, 2016. https://www.fda.gov/combination-products.
- M. E. Reis, A. Bettencourt, and H. M. Ribeiro, "The regulatory challenges of innovative customized combination products.," *Front. Med.*, vol. 9, p. 821094, 2022, doi: 10.3389/fmed.2022.821094.

- [10] Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, "Atto legislativo, REGOLAMENTO (UE) 2017/ 745 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO - del 5 aprile 2017
 relativo ai dispositivi medici, che modifica la direttiva 2001/ 83/ CE, il regolamento (CE) n. 178/ 2002 e il regola," pp. 1–175, 2017, [Online]. Available: https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0745&from=EN.
- [11] Commissione Europea, "DIRETTIVA 2001/83/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO Codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano.," Gazz. Uff. delle Comunità Eur., 2001, [Online]. Available: https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/IT/TXT/?uri=OJ:L:2001:311:TOC.
- [12] M. L. Fabiilli, K. J. Haworth, N. H. Fakhri, O. D. Kripfgans, P. L. Carson, and J. B. Fowlkes, "The role of inertial cavitation in acoustic droplet vaporization," *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 56, no. 5, pp. 1006–1017, 2009, doi: 10.1109/TUFFC.2009.1132.
- [13] A. A. Atchley and L. A. Crum, Acoustic cavitation and bubble dynamics. 1985.
- [14] W. Lauterborn, T. Kurz, R. Geisler, D. Schanz, and O. Lindau, "Acoustic cavitation, bubble dynamics and sonoluminescence," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 14, no. 4, pp. 484–491, 2007, doi: 10.1016/j.ultsonch.2006.09.017.
- [15] H. D. Liang, J. Tang, and M. Halliwell, "Sonoporation, drug delivery, and gene therapy," *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.*, vol. 224, no. 2, pp. 343–361, 2010, doi: 10.1243/09544119JEIM565.
- [16] I. Lentacker, I. De Cock, R. Deckers, S. C. De Smedt, and C. T. W. Moonen, "Understanding ultrasound induced sonoporation: Definitions and underlying mechanisms," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 72, pp. 49–64, 2014, doi: 10.1016/j.addr.2013.11.008.
- [17] S. Hernot and A. L. Klibanov, "Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery," Adv. Drug Deliv. Rev., vol. 60, no. 10, pp. 1153–1166, 2008, doi: 10.1016/j.addr.2008.03.005.
- [18] E. Quaia, "Physical Basis and Principles of Action of Microbubble-based Contrast Agents," *Contrast Media Ultrason.*, no. 1, pp. 15–30, 2005, doi: 10.1007/3-540-27214-3_2.
- [19] A. Zeghimi, J. M. Escoffre, and A. Bouakaz, "Involvement of cytoskeleton in

sonoporation and drug delivery," *IEEE Int. Ultrason. Symp. IUS*, pp. 850–853, 2014, doi: 10.1109/ULTSYM.2014.0209.

- [20] M. Wang, Y. Zhang, C. Cai, J. Tu, X. Guo, and D. Zhang, "Sonoporation-induced cell membrane permeabilization and cytoskeleton disassembly at varied acoustic and microbubble-cell parameters," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-22056-8.
- [21] S. Giantulli, I. Silvestri, and I. Screpanti, "'Effetti biologici e meccanismi molecolari indotti dagli ultrasuoni a bassa intensità su cheratinociti e melanoma umano," Università di Roma Sapienza, 2021.
- [22] G. Peruzzi, G. Sinibaldi, G. Silvani, G. Ruocco, and C. M. Casciola, "Perspectives on cavitation enhanced endothelial layer permeability," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 168, pp. 83–93, 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.02.027.
- J. J. Rychak, S. Member, A. L. Klibanov, J. A. Hossack, and S. Member, "Acoustic Radiation Force Enhances Targeted Delivery of Ultrasound Contrast Microbubbles : In Vitro Verification," vol. 52, no. 3, pp. 421–433, 2005.
- [24] Y. Z. Zhao *et al.*, "Phospholipids-based microbubbles sonoporation pore size and reseal of cell membrane cultured in vitro," *J. Drug Target.*, vol. 16, no. 1, pp. 18–25, 2008, doi: 10.1080/10611860701637792.
- [25] M. S. Fall, "Part Ii : Thermochemical Properties Chapter 7 : Thermodynamics Chapter 8 : Simple Solids Chapter 9 : Phases and Phase Equilibrium," 2008.
- [26] P. A. Mountford and M. A. Borden, "On the thermodynamics and kinetics of superheated fluorocarbon phase-change agents," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 237, pp. 15–27, 2016, doi: 10.1016/j.cis.2016.08.007.
- P. S. Sheeran, S. H. Luois, L. B. Mullin, T. O. Matsunaga, and P. A. Dayton, "Design of ultrasonically-activatable nanoparticles using low boiling point perfluorocarbons," *Biomaterials*, vol. 33, no. 11, pp. 3262–3269, 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.021.
- [28] M. L. Fabiilli, K. J. Haworth, I. E. Sebastian, O. D. Kripfgans, P. L. Carson, and J. B. Fowlkes, "Delivery of chlorambucil using an acoustically-triggered perfluoropentane emulsion," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 36, no. 8, pp. 1364–1375, 2010, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2010.04.019.

- [29] K. Ferrara, R. Pollard, and M. Borden, "Ultrasound microbubble contrast agents: Fundamentals and application to gene and drug delivery," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 9, pp. 415–447, 2007, doi: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095852.
- [30] P. W. Voorhees, "The theory of Ostwald ripening," J. Stat. Phys., vol. 38, no. 1, pp. 231–252, 1985, doi: 10.1007/BF01017860.
- [31] T. M. Krupka, L. Solorio, R. E. Wilson, H. Wu, N. Azar, and A. A. Exner, "Formulation and characterization of echogenic lipid-pluronic nanobubbles," *Mol. Pharm.*, vol. 7, no. 1, pp. 49–59, 2010, doi: 10.1021/mp9001816.
- [32] M. MATSUMOTO, "Surface Tension and Stability of a Nanobubble in Water: Molecular Simulation," J. Fluid Sci. Technol., vol. 3, no. 8, pp. 922–929, 2008, doi: 10.1299/jfst.3.922.
- [33] V. Agrahari and A. K. Mitra, "Therapeutic Delivery," *Ther. Deliv*, vol. 7, no. 2, pp. 117–138, 2016.
- [34] H. Hashizume *et al.*, "Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness," *Am. J. Pathol.*, vol. 156, no. 4, pp. 1363–1380, 2000, doi: 10.1016/S0002-9440(10)65006-7.
- [35] O. D. Kripfgans, J. B. Fowlkes, D. L. Miller, O. P. Eldevik, and P. L. Carson, "Acoustic droplet vaporization for therapeutic and diagnostic applications," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 26, no. 7, pp. 1177–1189, 2000, doi: 10.1016/S0301-5629(00)00262-3.
- [36] M. Ghasemi, A. C. H. Yu, and S. Sivaloganathan, "An enhanced, rational model to study acoustic vaporization dynamics of a bubble encapsulated within a nonlinearly elastic shell.," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 83, p. 105948, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.ultsonch.2022.105948.
- [37] D. R. Evans, D. F. Parsons, and V. S. J. Craig, "Physical Properties of Phase-Change Emulsions," no. 13, pp. 9538–9545, 2006.
- [38] D. Nimander, "Acoustic Droplet Vaporization of Perfluorocarbon Filled Microdroplets Akustisk evaporation av mikrodroppar fyllda med perfluorokarbon," Università di Stoccolma, 2019.
- [39] C. Y. Lin and W. G. Pitt, "Acoustic droplet vaporization in biology and medicine," *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/404361.

- [40] W. G. Pitt, R. N. Singh, K. X. Perez, G. A. Husseini, and D. R. Jack, "Phase transitions of perfluorocarbon nanoemulsion induced with ultrasound: A mathematical model," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 21, no. 2, pp. 879–891, 2014, doi: 10.1016/j.ultsonch.2013.08.005.
- [41] M. C. Petty, "Langmuir-Blodgett films: An introduction." p. 243, 1996.
- [42] F. J. Pavinatto, L. Caseli, and O. N. Oliveira, "Chitosan in nanostructured thin films," *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 8, pp. 1897–1908, 2010, doi: 10.1021/bm1004838.
- [43] L. Stefano and P. D. Student, "Ingegnerizzazione delle Interfacce : Film sottili Molecolari," pp. 1–35, 2012.
- [44] A. Scarpa, "Sensori nano-gravimetrici: riduzione del fattore umidità mediante polimeri porosi superficiali," Università degli studi di Roma "tor vergata," 2010.
- [45] G. Ma and H. C. Allen, "DPPC Langmuir monolayer at the air-water interface: Probing the tail and head groups by vibrational sum frequency generation spectroscopy," *Langmuir*, vol. 22, no. 12, pp. 5341–5349, 2006, doi: 10.1021/la0535227.
- [46] A. Pavinatto et al., "Experimental evidence for the mode of action based on electrostatic and hydrophobic forces to explain interaction between chitosans and phospholipid Langmuir monolayers," Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016. http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.001.
- [47] R. Cavalli *et al.*, "New chitosan nanobubbles for ultrasound-mediated gene delivery: Preparation and in vitro characterization," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 3309– 3318, 2012, doi: 10.2147/IJN.S30912.
- [48] B. Patel, R. Manne, D. B. Patel, S. Gorityala, A. Palaniappan, and M. Kurakula, "Chitosan as functional biomaterial for designing delivery systems in cardiac therapies," *Gels*, vol. 7, no. 4, pp. 1–21, 2021, doi: 10.3390/gels7040253.
- [49] Y.-Y. Li, X.-G. Chen, L.-M. Yu, S.-X. Wang, G.-Z. Sun, and H.-Y. Zhou, "Aggregation of hydrophobically modified chitosan in solution and at the air–water interface," J. Appl. Polym. Sci., vol. 102, no. 2, pp. 1968–1973, 2006, doi: https://doi.org/10.1002/app.24485.
- [50] F. J. Pavinatto *et al.*, "Interaction of chitosan with cell membrane models at thr airwater interface," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 5, pp. 1633–1640, 2007, doi:

10.1021/bm0701550.

- [51] L. Gargallo, A. Leiva, M. Urzúa, L. Alegría, B. Miranda, and D. Radić, "Modification of the air-water interface by a chitosan adsorption process. Effect on an amphiphilic polymer monolayer," *Polym. Int.*, vol. 53, no. 11, pp. 1652–1657, 2004, doi: 10.1002/pi.1474.
- [52] A. R. Pereira, A. Fiamingo, R. de O. Pedro, S. P. Campana-Filho, P. B. Miranda, and O. N. Oliveira, "Enhanced chitosan effects on cell membrane models made with lipid raft monolayers," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 193, no. February, p. 111017, 2020, doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111017.
- [53] H. Takeuchi, H. Yamamoto, T. Toyoda, H. Toyobuku, T. Hino, and Y. Kawashima, "Physical stability of size controlled small unilameller liposomes coated with a modified polyvinyl alcohol," *Int. J. Pharm.*, vol. 164, no. 1, pp. 103–111, 1998, doi: https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00404-3.
- [54] A. Prosperetti, "A generalization of the Rayleigh-Plesset equation of bubble dynamics," *Phys. Fluids*, vol. 25, no. 3, pp. 409–410, 1982, doi: 10.1063/1.863775.
- [55] E. Paissoni, C. Manes, L. Ridolfi, and R. Vesipa, "Dinamica di bolle di gas e vapore in un campo di pressione stocastico," Politecnico di Torino, 2018.
- [56] S. Fujikawa and T. Akamatsu, "Effects of the non-equilibrium condensation of vapour on the pressure wave produced by the collapse of a bubble in a liquid," J. Fluid Mech., vol. 97, no. 3, pp. 481–512, 1980, doi: 10.1017/S0022112080002662.
- [57] LookChem, "Decaphluoropentane," 2022. https://www.lookchem.com/2H-3H-Decafluoropentane/.
- [58] ChemSrc, "Chitosan," 2023. https://www.chemsrc.com/en/cas/9012-76-4_599526.html.
- [59] PubChem, "Palmitic Acid," 2020. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Palmitic-acid.
- [60] ThermoFisher, "Safety Data Sheet Lecithin," pp. 1–10, 2021.
- [61] PubChem, "Curcumin," 1992. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Curcumin 1/50.

- [62] Microtrac, "Dynamic Light Scattering." pp. 2–7, 2017, [Online]. Available: https://www.microtrac.it/it/prodotti/analisi-granulometrica-e-dellaforma/scattering-dinamico-della-luce/.
- [63] S. Laurén, "Surface tension measurement by the ring method," *Biolin Scientific*. 2020, doi: 10.1126/science.63.1641.599.
- [64] Uniroma2, "Spettroscopia UV e Visibile," 2018. https://didattica-2000.archived.uniroma2.it/MA2/deposito/spettroscopia_UV.pdf.
- [65] U. degli studi del S. Dipartimento di Scienze e Tecnologie, "Microscopio a fluorescenza." pp. 1–4.