

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale

**Sintesi di nanoparticelle di chitosano per
veicolare RNA**



Relatori

Prof. Davide Fissore

Prof.ssa Francesca Bosco

Candidato

Valeria Petrachi

Dicembre 2024

Indice

1	Introduzione	1
1.1	Nanocarriers: funzione ed effetti	1
1.2	Nanoparticelle polimeriche	3
1.3	Nanoparticelle di chitosano per veicolare acidi nucleici	6
1.3.1	Nanoparticelle di chitosano	6
1.3.2	Metodi di sintesi di nanoparticelle di chitosano veicolanti acidi nucleici	8
1.3.3	Complessi chitosano RNA	9
1.4	Tecniche di caratterizzazione delle nanoparticelle	10
1.4.1	Tecniche per lo studio delle proprietà chimico-fisiche	11
1.4.2	Metodi per l'analisi dell'efficacia di incapsulamento	11
1.4.3	Studi sul rilascio	12
1.5	Scopo della Tesi	14
2	Materiali e Metodi	15
2.1	Piano sperimentale	15
2.2	Coltura di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
2.3	Estrazione di RNA da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2.3.1	Procedura di estrazione	16
2.4	Materiali per la sintesi di nanoparticelle di chitosano	18
2.4.1	Chitosano	18
2.4.2	Tampone acetato di sodio	19
2.4.3	Tampone solfato di sodio	20
2.4.4	Acqua priva di nucleasi	20
2.5	Apparato sperimentale e metodologia di sintesi di nanoparticelle	20
2.6	Tecniche di caratterizzazione	22
2.6.3	Spettrofotometria	26
2.6.4	Retta di calibrazione spettrofotometro MultiSkan SkyHigh	27
2.6.5	Centrifugazione	29
2.6.6	Agitatore a disco rotante	29
2.6.7	Agitatore magnetico multiposizione	29
2.7	Studio del rilascio di RNA da nanoparticelle di chitosano	29
3	Sintesi di nanoparticelle di chitosano	31
3.1	Sintesi di nanoparticelle a diverse concentrazioni di chitosano	31
3.2	Sintesi di nanoparticelle di chitosano incorporanti RNA	33
4	Studio relativo al rilascio di RNA dalle nanoparticelle di chitosano	37
4.1	NP a varie concentrazioni di chitosano senza RNA	37
4.2	Addizione di RNA a NP con differente concentrazione di chitosano	39

4.3	Analisi dell'interazione tra RNA, nanoparticelle e buffer	41
4.4	Sostituzione del buffer acido di sintesi delle NP e addizione di RNA	48
4.5	Rilascio di RNA da NP immerse in 2 mL di PBS pH 7.4	55
4.5.1	Variazione del valore di OD ₂₆₀ del controllo nel tempo	58
4.5.2	Rilascio nel tempo da NP in 2 mL di PBS pH 7.4 su rotatori di dischi	59
4.6	Rilascio di RNA da NP immerse in acido acetico all' 1%	60
4.6.1	Variazione del valore di OD ₂₆₀ del controllo nel tempo	60
4.6.2	Rilascio da NP in 2 mL di acido acetico su agitatore a disco rotante	61
4.7	Rilascio di RNA da NP immerse in 4 mL di acido acetico 1%	68
4.7.2	NP inglobanti 10 μg di RNA immerse in 4 mL di acido acetico 1%	68
4.7.3	Valutazione del valore di OD ₂₆₀ del controllo nel tempo	73
4.7.4	NP inglobanti 30 μg di RNA immerse in 4 mL di acido acetico 1%	74
5	Conclusioni	79
	Abbreviazioni	81
	Bibliografia	82
	Ringraziamenti	85

1 Introduzione

1.1 Nanocarriers: funzione ed effetti

Lo sviluppo di sistemi di trasporto per acidi nucleici, quali RNA e DNA, è uno degli obiettivi principali che la terapia genica si prefigge di raggiungere con lo scopo di prevenire e curare malattie e di veicolare principi attivi in maniera mirata all'interno di una specifica cellula bersaglio (Rossi, 2022). In generale le nanoparticelle sono utilizzate come veicoli di somministrazione di farmaci e sono sistemi che vengono ad essere ottenuti grazie a competenze derivanti da diversi campi scientifici come la scienza dei polimeri, la farmaceutica e la biologia molecolare.

I *nanocarriers* sono sistemi di nanomateriali e nanostrutture all'avanguardia per il trasporto e rilascio controllato di principi attivi in siti specifici all'interno dell'organismo. Tramite questo sistema di trasporto e rilascio, noto anche con il nome di *drug delivery*, è possibile effettuare il rilascio del farmaco in un preciso punto all'interno del corpo, aspetto molto importante per il trattamento di malattie in ambito oncologico dal momento che in questo modo si vanno a colpire solo ed esclusivamente le cellule tumorali (Cozzi, 2021). Un'altra caratteristica importante delle nanoparticelle, contenenti al loro interno il principio attivo, è l'essere in grado di minimizzare il degrado e la perdita di farmaco, garantendo così il raggiungimento dell'obiettivo prestabilito. I *nanocarriers* sono particelle colloidali molto piccole di dimensioni comprese tra i 10 e i 1000 nm.

Tali nanoparticelle possono essere sintetizzate a partire da materiali di origine differente e possono dunque presentarsi in una varietà di forme tra cui:

- le **micelle**, costituite da tensioattivi anfifilici, ovvero che presentano un gruppo idrofilo polare ed una catena apolare idrofobica o lipofila. Tali tensioattivi sono in grado di formare spontaneamente vescicole sferiche in acqua e possono trasportare in modo affidabile farmaci lipofili in concentrazioni superiori rispetto a quella che è la loro normale solubilità in acqua. Le micelle vengono spesso utilizzate per incapsulare pesticidi nel tentativo di prevenire l'adsorbimento di tale principio attivo sul terreno di coltura (Gressler, et al., 2024)
- i **liposomi** sono vescicole unilamellari, multilamellari e plurilamellari, costituite da vari tipi di fosfolipidi, chiusi in forme sferoidali, al cui interno sono solubilizzati i farmaci. Grazie alla loro natura anfifilica, i liposomi possono trasportare sostanze sia idrofile che idrofobe. La loro stabilità dipende strettamente dalle dimensioni, dalla carica superficiale e dalla modifica con ligandi o polimeri. Le nanoparticelle lipidiche molto spesso sono utilizzate per inglobare agenti chemioterapici per la cura del cancro, ma anche agenti antifungini, antibiotici, ormoni e durante la pandemia nel 2019 sono stati utilizzati per la produzione di vaccini a mRNA contro il COVID-19 (Gressler, et al., 2024)
- le **nanoparticelle solide lipidiche** sono costituite da un nucleo solido idrofobo all'interno del quale un farmaco è disciolto o disperso. Vengono ottenute tramite omogeneizzazione di lipidi biocompatibili, possono entrare facilmente nel circolo sanguigno e, grazie alla loro superficie lipofila, attraversano facilmente le cellule della barriera emato-encefalica (Gorgoglione, 2022)

- i **dendrimeri** sono macromolecole polimeriche strutturate in modo da realizzare un *core* centrale, che determina le proprietà di solubilizzazione del farmaco, intorno a cui si sviluppano unità ripetitive ramificate orientate radialmente e che terminano in gruppi funzionali responsabili delle interazioni chimiche e biologiche della particella (Neuroscienze Pharmaness Scarl, et al., 2006)
- i **nanotubi di carbonio** si presentano sottoforma di struttura cilindrica. Si distinguono tra di loro per il numero di strati che li caratterizza: parete singola, doppia o multipla. Oltre alle qualità tipiche dei *nanocarriers*, come la possibilità di essere funzionalizzati con polimeri, migliorare la dispersione di un principio attivo, la biocompatibilità e la ridotta tossicità, i nanotubi di carbonio presentano vantaggi unici tra cui: ampia area superficiale, elevata stabilità, capacità di legare un'ampia varietà di prodotti terapeutici (DNA, enzimi, anticorpi e farmaci). Da alcuni studi è emerso che i nanotubi di carbonio a parete singola sono buoni vettori per piccoli RNA interferenti mentre quelli a parete multipla possono essere funzionalizzati con polimeri termosensibili e dunque possono essere utilizzati per la somministrazione di sostanze bioattive sensibili alla temperatura (Gressler, et al., 2024)
- le **nanoparticelle polimeriche** sono particelle colloidali ottenute da polimeri sintetici biodegradabili come i poliacrilati o da polimeri naturali come chitosano, alginato, albumina, collagene.

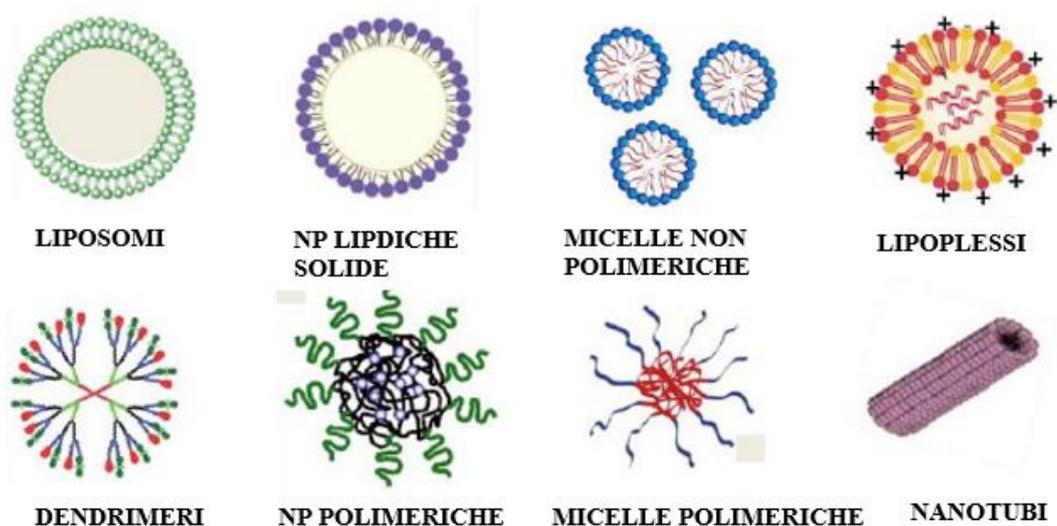


Figura 1.1: Rappresentazione di alcune tipologie di nanocarriers- Figura tratta da (Lai, 2020) con modifiche

I *nanocarriers* offrono diversi vantaggi rispetto alle terapie farmacologiche tradizionali. Permettono infatti di ottenere il controllo e la messa a punto dell'assorbimento, della biodistribuzione, del *targeting* e dell'eliminazione del principio attivo modulando la loro dimensione, carica, proprietà di superficie e gruppi di *targeting*. Possono essere somministrati tramite diverse vie come quella parenterale, nasale, orale.

Alcuni effetti che derivano dall'utilizzo di nanoparticelle come veicoli di farmaci sono:

- accumulo del farmaco in un determinato distretto, organo, tessuto in modo da svolgere così un'azione mirata (*targeting*);
- riduzione degli effetti collaterali e della tossicità;

- migliore assorbimento del principio attivo;
- protezione del farmaco da sistemi di degradazione come agenti fisici, chimici, biologici
- funzione di sistema di riserva: ovvero l'opportunità di modulare il rilascio del farmaco che può così essere rilasciato più lentamente. (Lai, 2020)

1.2 Nanoparticelle polimeriche

In questo lavoro di Tesi è stata posta particolare attenzione nella sintesi di nanoparticelle polimeriche di chitosano.

Le nanoparticelle polimeriche sono tra i sistemi più utilizzati per il trasporto di farmaci all'interno dell'organismo dal momento che risultano stabili in ambiente fisiologico e presentano un'elevata capacità di carico di principi attivi, sia idrofobi che idrofili.

Considerando la loro elevata applicabilità in campo biomedico, queste nanoparticelle vengono sintetizzate utilizzando polimeri caratterizzati da diverse qualità come: elevata purezza; elevata efficacia di caricamento del farmaco, buona biodegradabilità, buon profilo tossicologico.

È estremamente importante che le nanoparticelle siano caratterizzate dalle qualità suddette per non indurre risposte indesiderate da parte del sistema immunitario una volta entrate nell'organismo.

Nella sintesi di nanoparticelle polimeriche sono spesso utilizzati polimeri naturali, come il chitosano, albumina o sodio alginato, poiché sono caratterizzati da un'elevata biocompatibilità e biodegradabilità oltre ad avere un costo basso e un'elevata disponibilità. Tuttavia, spesso si preferisce lavorare con polimeri sintetici in quanto i polimeri naturali sono molto più sensibili ad attacchi da parte di agenti patogeni e non hanno una composizione costante. I polimeri sintetici, inoltre, possono essere più facilmente controllati nella struttura e nella composizione e possono essere funzionalizzati con specifici ligandi (Gorgoglione, 2022).

1.2.1 Metodi di sintesi delle nanoparticelle polimeriche

Sono diversi i metodi che possono essere adottati per la preparazione di nanoparticelle polimeriche. Le nanoparticelle possono essere sintetizzate a partire da singoli monomeri, in questo caso le tecniche di preparazione vengono definite di polimerizzazione, oppure a partire da polimeri già esistenti attraverso il metodo di evaporazione del solvente, emulsificazione spontanea (metodo della diffusione del solvente), *salting out*, gelificazione o nanoprecipitazione. (Soppimath, et al., 2000)

Le nanoparticelle si formano in seguito ad un processo comprende tre fasi: nucleazione, crescita e aggregazione. La prima fase, quella di nucleazione, è raggiunta quando la concentrazione del polimero uguaglia il limite critico di saturazione. La condizione di sovrasaturazione può essere raggiunta in due modi: rimuovendo il solvente, in modo da ottenere una soluzione più concentrata, o aggiungendo un antisolvente che abbassi la solubilità del soluto.

Durante la prima fase si ha la nascita dei primi nuclei e in seguito la crescita di quest'ultimi. La grandezza e il numero di particelle ottenute dipendono dal rapporto tra la velocità di crescita, velocità con cui i cristalli aumentano di dimensioni, e la velocità di nucleazione ovvero il numero di nuclei che si formano per unità di tempo e volume. Se l'effetto predominante è quello della velocità di nucleazione, si ottengono tante particelle di piccole dimensioni, mentre se prevale la velocità di crescita, si hanno poche particelle, ma grandi. Le nanoparticelle sono soggette a collisioni tra di loro e nel momento in cui le forze

attrattive prevalgono su quelle repulsive si ha il fenomeno dell'aggregazione. Durante l'aggregazione è importante mantenere il controllo delle dimensioni tramite un qualche tipo di agitazione, che aiuterà a omogeneizzare le nanoparticelle e a raggiungere l'uniformità. Anche la temperatura influisce direttamente sulla velocità di aggregazione. (Lipari, 2021)

- Polimerizzazione interfacciale

È una tecnica che consiste nella reazione di polimerizzazione monomerica in cui due tipi di monomeri vengono disciolti in due tipi di solventi insolubili tra di loro. I due solventi vengono versati insieme generando una reazione di policondensazione irreversibile all'interfaccia tra le due fasi liquide. I prodotti della reazione di polimerizzazione sono insolubili nel solvente e precipitano formando così le nanoparticelle. Il principio attivo può essere disciolto nel mezzo di polimerizzazione prima dell'aggiunta del monomero o alla fine della reazione di polimerizzazione. Tramite ultracentrifugazione o risospesione le nanoparticelle in mezzo isotonicò è possibile effettuare un processo di purificazione della sospensione. (Ricci, 2002)

- Metodo dell'evaporazione con solvente

Il polimero preformato viene sciolto in un solvente organico come diclorometano, cloroformio o acetato di etile. Il principio attivo è disciolto o disperso in un polimero preformato e questa miscela viene poi emulsionata in una soluzione acquosa. Le emulsioni sono caratterizzate dalla presenza di una fase dispersa, in forma di goccioline, in una fase disperdente. Le due fasi sono stabilizzate grazie ad un film interfacciale di tensioattivo che si crea attorno alle goccioline disperse. L'emulsione è ottenuta con trattamenti ad alta velocità di omogeneizzazione o sonicazione. Una volta formatosi un'emulsione stabile, si deve favorire l'evaporazione del solvente organico. Ciò lo si raggiunge aumentando la temperatura, lavorando a pressione ridotta o effettuando un'agitazione magnetica continua. (Soppimath, et al., 2000)

- Emulsificazione spontanea o metodo della diffusione del solvente

È una tecnica simile a quella dell'evaporazione con solvente, ma in questo caso la fase oleosa è un solvente miscibile con acqua. La precipitazione delle nanoparticelle è causata dal fenomeno di diffusione dei solventi che porta ad una turbolenza interfacciale e alla conseguente formazione di nanoparticelle. Maggiore è la concentrazione di solvente miscibile con l'acqua, più piccole sono le nanoparticelle che si ottengono. (Gorgoglione, 2022)

- Gelificazione ionica

Con il metodo di gelificazione ionica, le nanoparticelle si formano in seguito all'interazione di polielettroliti con cariche opposte collocati in mezzi acquosi. I polielettroliti possono essere di origine naturale o semisintetica come alginato, chitosano, acido ialuronico, pectina. Sono macromolecole polimeriche che presentano unità ripetitive ionizzabili con polianioni o policazioni.

La tecnica di gelificazione consiste, dunque, nella miscelazione di una soluzione contenente il farmaco con una soluzione acquosa di ioni, con carica opposta rispetto a quella del farmaco, con la conseguente reticolazione tridimensionale delle catene polimeriche e formazione di complessi stabili. (Grassi, 2013-2014)

- *Salting out*

Con questa tecnica il polimero e il farmaco vengono disciolti in solventi solubili in acqua come acetone, etanolo, e metanolo. Il mezzo acquoso contiene un'elevata concentrazione di agenti di *salting-out* come cloruro di magnesio, cloruro di calcio e acetato di magnesio. Tramite agitazione meccanica è possibile emulsionare il polimero e il principio attivo in un gel acquoso. L'emulsione è il risultato della presenza di sali nel mezzo acquoso che all'inizio impediscono la miscibilità della fase organica in soluzione acquosa determinando così la miscela delle due sostanze. Successivamente, per favorire la formazione delle nanosfere polimeriche incapsulanti il farmaco è necessario favorire la diffusione del solvente organico nell'acqua diluendo la soluzione tramite aggiunta di acqua. (Dubey, et al., 2016)

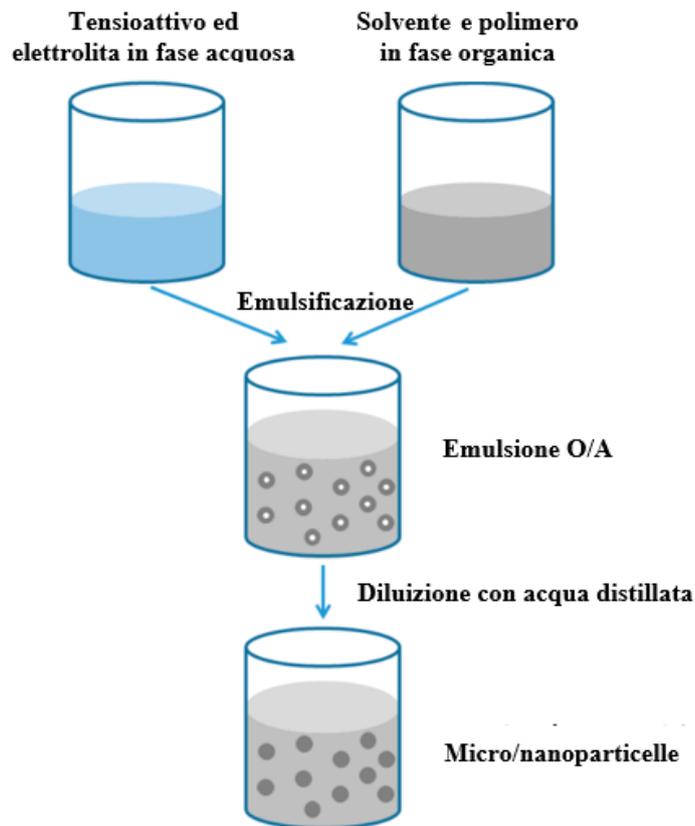


Figura 1.2: Descrizione del processo di salting-out per la preparazione di nanoparticelle veicolanti principi attivi- Figura tratta da (Yichao, et al., 2016) con modifiche

- Nanoprecipitazione

La tecnica della nanoprecipitazione richiede la presenza di una fase organica e una fase acquosa (antisolvente).

La fase organica comprende un solvente, miscibile o parzialmente miscibile nella fase acquosa, e un polimero sintetico o naturale responsabile della creazione della matrice polimerica delle nanoparticelle. Il polimero deve essere solubile nel solvente e quindi insolubile nella fase acquosa. Il principio attivo utilizzato deve essere solubile nel solvente e deve avere una certa interazione con la matrice polimerica. La fase acquosa sarà costituita esclusivamente da acqua e un tensioattivo. La tecnica di nanoprecipitazione può essere realizzata mantenendo un'agitazione magnetica e introducendo la fase organica, goccia a goccia, all'interno della fase acquosa. Un'altra alternativa, alla modalità appena descritta, è quella di aggiungere

rapidamente la fase acquosa alla fase organica, realizzando così una precipitazione istantanea nell'ordine dimensionale della scala nanometrica.

Una volta che la fase solvente inizia a diffondere, il polimero tende automaticamente a precipitare formando nanoparticelle o microparticelle che possono incapsulare un principio attivo. Affinché avvenga il processo di precipitazione è necessario che il polimero sia insolubile nella fase acquosa. L'aumento della diffusione del solvente nell'antisolvente provoca una diminuzione della tensione interfacciale tra le due fasi e un aumento dell'area superficiale, determinando la formazione di goccioline di solvente organico e la precipitazione del polimero in forma di nanoparticelle. Infine, il solvente viene rimosso o sotto pressione ridotta o lasciando il sistema in agitazione per diverse ore. (Barreras-Urbina, et al., 2016)

In questo studio di Tesi le nanoparticelle sono state preparate secondo la tecnica di nanoprecipitazione. Questo metodo, descritto in letteratura (Bozkir & Saka, 2004) prevede la formazione di complessi di nanoparticelle-acidi nucleici che avviene spontaneamente addizionando la soluzione contenente il polimero alla soluzione contenente il principio attivo e mantenendo il sistema sotto agitazione. In particolare, durante l'attività sperimentale, il solvente utilizzato è stato il tampone acetato di sodio in cui è stato sciolto il polimero chitosano, mentre come antisolvente è stato utilizzato il tampone solfato di sodio e il principio attivo l'RNA.

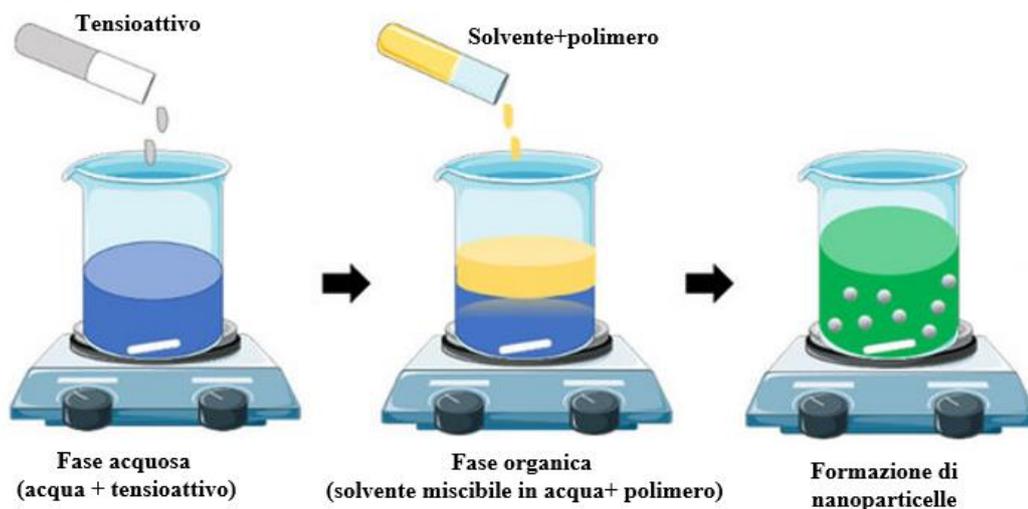


Figura 1.3: Passaggi per la produzione di nanoparticelle tramite nanoprecipitazione-
Figura tratta da (Samrot, et al., 2021) con modifiche

1.3 Nanoparticelle di chitosano per veicolare acidi nucleici

1.3.1 Nanoparticelle di chitosano

Il chitosano è un polimero caratterizzato da una serie di proprietà ideali per le applicazioni nel campo biotecnologico. Presenta infatti una struttura biocompatibile, biodegradabile e non tossica oltre a proprietà antimicrobiche e mucoadesive. Le nanoparticelle di chitosano hanno una vasta applicabilità dal momento che combinano le proprietà intrinseche del chitosano con la versatilità e i vantaggi tipici delle particelle polimeriche nanometriche. Sono facilmente sintetizzabili e inoltre grazie all'elevata solubilità del chitosano in

soluzioni acquose acide è possibile evitare l'utilizzo di solventi organici tossici (Karaianni, et al., 2023).

Tra i vari impieghi in campo medico le nanoparticelle di chitosano risultano sistemi di somministrazione fondamentali nelle terapie geniche; gli acidi nucleici nudi, infatti, non sono in grado di attraversare le membrane cellulari poiché risultano facilmente degradabili dalle nucleasi presenti nei fluidi fisiologici. Il chitosano, grazie alla sua natura cationica, è in grado di dare vita ad un'interazione elettrostatica con i gruppi negativi degli acidi nucleici di DNA e RNA, generando complessi di chitosano-acidi nucleici noti con il nome di poliplessi (Karaianni, et al., 2023).

Esistono tre diversi modi di incorporazione del materiale genetico nel chitosano: incapsulamento, adsorbimento e interazione elettrostatica.

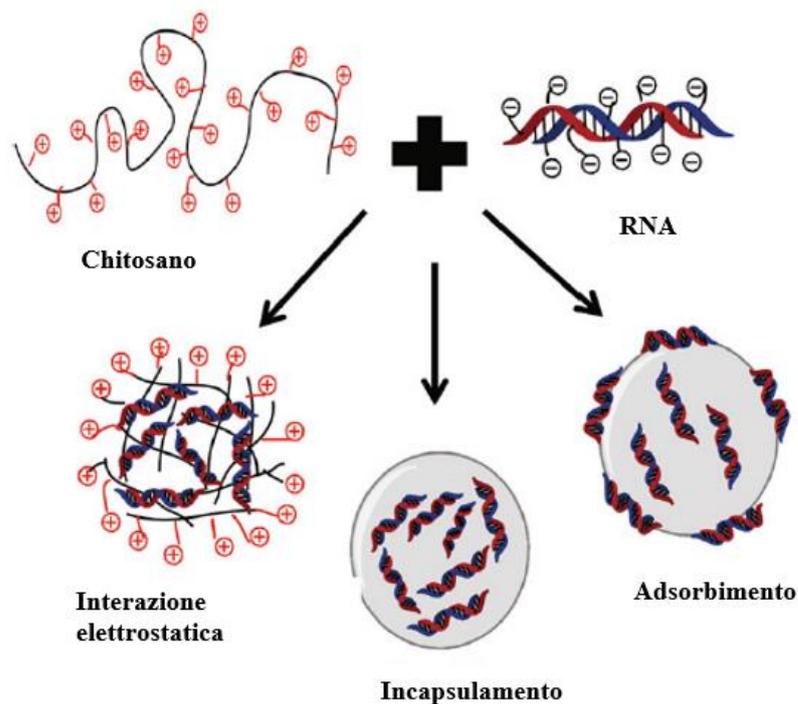


Figura 1.4: Modi di incorporazione di acidi nucleici in nanoparticelle di chitosano-Figura tratta da (Dobhal, et al., 2017) con modifiche

In ambiente alcalino o neutro il chitosano ha una leggera carica positiva e l'incorporazione avverrà per incapsulamento o adsorbimento, dato che le interazioni tra polimero e acido nucleico sono di tipo non elettrostatico. In caso di incapsulamento il farmaco è introdotto durante la sintesi delle nanoparticelle e sono due le configurazioni che si possono ottenere: nanosfere e nanocapsule.

Le nanosfere sono costituite da una matrice all'interno della quale è disperso in maniera uniforme il farmaco (Ricci, 2002).

Le nanocapsule sono vescicole composte da una cavità centrale, detta *core*, in cui è incapsulato il farmaco disciolto in soluzione o in forma solida, e da un guscio polimerico esterno che circonda il *core* (Gorgoglione, 2022).

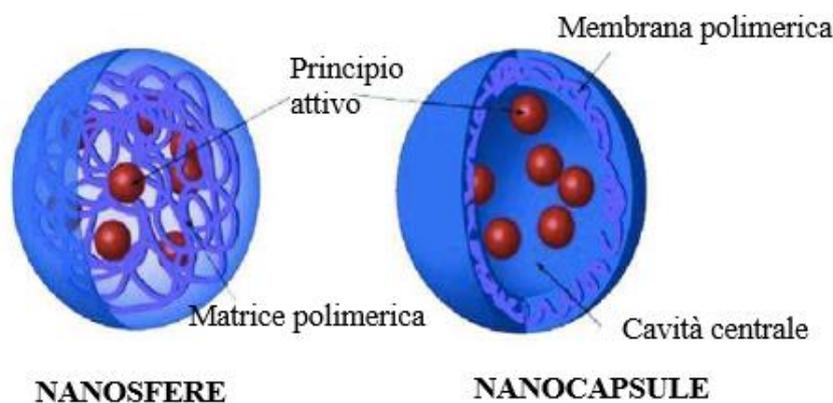


Figura 1.5 Rappresentazione di nanoparticelle a sinistra sottoforma di nanosfere e a destra come nanocapsule-Figura tratta da (Lai, 2020) con modifiche

In caso di adsorbimento, il farmaco è introdotto post sintesi delle nanoparticelle e lasciato in incubazione per un certo periodo di tempo con quest'ultime (Gorgoglione, 2022).

Nel caso invece di valori di pH del mezzo leggermente acidi l'interazione tra chitosano e acidi nucleici è di tipo elettrostatico (Dobhal, et al., 2017).

1.3.2 Metodi di sintesi di nanoparticelle di chitosano veicolanti acidi nucleici

Sono diversi i metodi adottati per la sintesi di nanoparticelle di chitosano tra cui: complessazione semplice, gelificazione ionica, coacervazione (nanoprecipitazione), evaporazione del solvente, microemulsione ed emulsificazione (diffusione del solvente) (Boroumand, et al., 2021)

- Il metodo di **complessazione semplice** si basa sull'aggiunta della soluzione polimerica direttamente alla soluzione contenente l'acido nucleico. Il campione preparato è sottoposto ad agitazione magnetica con la conseguente formazione spontanea di complessi di chitosano-acidi nucleici (Carrillo, et al., 2014).
- La **gelificazione ionica** prevede la sintesi di nanoparticelle tramite interazione elettrostatica del chitosano con un polianione. Il chitosano viene disciolto nel *buffer* acetato di sodio e la sospensione ottenuta viene sottoposta ad agitazione e poi filtrata. Dal momento che il chitosano a pH fisiologico è parzialmente protonato, per favorire il processo di gelificazione ionica si aggiunge goccia a goccia il polianione sodio tripolifosfato (TPP). Quest'ultimo legandosi covalentemente ai gruppi amminici del chitosano induce un cambio strutturale e una migliore protonazione con la conseguente formazione di complessi chitosano-TPP. Questo metodo di sintesi può prevedere due modi differenti di aggiunta dell'acido nucleico alle nanoparticelle. In un caso il plasmide è aggiunto insieme al TPP ed è dunque intrappolato nella matrice chitosano-TPP; nell'altro invece il plasmide è incubato a temperatura ambiente con le nanoparticelle chitosano-TPP e sarà quindi adsorbito sulla superficie del complesso (Carrillo, et al., 2014).
- La tecnica di **coacervazione complessa** è ottenuta sciogliendo il chitosano in una soluzione di acido acetico all'1% a pH 5.5. L'acido nucleico è invece disciolto nel tampone solfato di sodio 50 mM. Le due soluzioni di acido nucleico e chitosano

sono unite in ugual volume, preriscaldare a 50-55°C e agitate tramite *vortex* per 45 secondi (Bozkir & Saka, 2004). Il *vortex* è un dispositivo dotato di una piattaforma, ospitante le provette, a cui viene impresso un movimento circolare. La velocità di rotazione, regolata in modo opportuno, genera un vortice all'interno della provetta e garantendo una miscelazione rapida ed uniforme.

- Il metodo dell'**evaporazione del solvente** si basa sulla dissoluzione di un agente condensante in un composto organico come l'etanolo. La soluzione di agente condensante è addizionata a quella di acido acetico all' 1%, pH 5.5, contenente il chitosano. La miscela ottenuta sino ad ora è poi unita alla soluzione di acido nucleico e al fine di formare le nanoparticelle viene eseguita una rapida aggiunta di etanolo sotto agitazione magnetica. Successivamente la sospensione di nanoparticelle formate è diluita con acqua e il solvente è rimosso a pressione ridotta. (Bozkir & Saka, 2004)
- Il processo di **microemulsione** prevede la miscelazione di chitosano con glutraldeide in una soluzione di acido acetico. Questa viene poi miscelata con un tensioattivo disciolto in un solvente organico, come l'esano e il tutto viene mantenuto in agitazione continua durante la notte a temperatura ambiente. Successivamente si passa alla rimozione del solvente organico tramite evaporazione sottovuoto, mentre il tensioattivo in eccesso viene rimosso tramite precipitazione con cloruro di calcio e centrifugazione. Gli svantaggi di questo metodo sono legati all'utilizzo di solvente organico, al tempo di reazione prolungato e a una fase di lavaggio che consiste in processo di dialisi (Boroumand, et al., 2021).
- La tecnica di **emulsificazione** consiste nella formazione di un'emulsione di olio in acqua. L'emulsione viene realizzata miscelando una soluzione acquosa di chitosano e stabilizzante in un solvente organico, tramite agitazione magnetica e omogenizzazione in pressione e il processo di precipitazione viene favorito grazie all'aggiunta di acqua nell'emulsione. Questo metodo è ideale per caricare molecole idrofobe (Boroumand, et al., 2021).

1.3.3 Complessi chitosano RNA

Il chitosano è risultato essere un polimero adatto per realizzare *carriers* per il trasporto di acidi nucleici, quali l'RNA, nella terapia genica. I vettori genici realizzati mediante chitosano hanno dimostrato di essere in grado di soddisfare i requisiti necessari per ottenere una buona efficienza di somministrazione genica come: capacità di *targeting* cellulare, bassa citotossicità, elevata efficienza di somministrazione, protezione del carico genico dalle nucleasi sieriche, rilascio genico sostenuto, capacità di fuga endosomiale, tramite rottura della membrana endosomiale e rilascio del principio attivo direttamente nel citoplasma, ed elevata efficienza di trasfezione.

In particolare, la somministrazione genica è influenzata dalle dimensioni e dalla morfologia dei complessi chitosano-RNA. Le caratteristiche di quest'ultimi sono una conseguenza di parametri come il peso molecolare del chitosano, il grado di deacetilazione, il rapporto tra atomi di azoto del chitosano e atomi fosforici dell'RNA (rapporto N/P) (Karaiani, et al., 2023).

- Il **peso molecolare** del chitosano influenza in maniera significativa l'interazione tra RNA e nanoparticelle. Bisogna scegliere in maniera adeguata il peso molecolare del

chitosano in funzione anche dell'acido nucleico con cui interagisce. Se da una parte un peso molecolare basso favorisce la solubilità del chitosano in mezzi acquosi dall'altra rende i complessi chitosano-RNA meno stabili. Al contrario un peso molecolare alto da una parte garantisce la formazione di complessi con maggiore stabilità, dall'altra induce un aumento delle dimensioni delle nanoparticelle e quindi un rilascio di RNA più limitato a causa delle forti interazioni elettrostatiche che si vengono a creare tra nanoparticelle e acido nucleico. (Antoniou, et al., 2024)

Alcuni studi hanno dimostrato che un peso molecolare di 10 kDa è il valore minimo che garantisce poliplessi stabili in mezzi acquosi e che pesi molecolari che si aggirano intorno ai 60-140kDa sono valori che restituiscono particelle ottimali dal punto di vista delle dimensioni, dell'aggregazione, della capacità di complessazione, della stabilità e della trasfezione (Karaïanni, et al., 2023).

- Il **grado di deacetilazione (DD)** è un parametro che influenza il numero di gruppi amminici di chitosano che possono interagire con RNA e quindi l'efficienza di complessazione. Più è elevato il grado di deacetilazione, maggiore saranno i gruppi amminici interagenti con RNA. Alcuni studi hanno dimostrato che il grado di deacetilazione ha un'influenza anche sulla trasfezione e ad un DD maggiore del 90% corrisponde un'efficienza di trasfezione dell'80% (Karaïanni, et al., 2023).
- Il **pH** e la **forza ionica** del mezzo circostante influenzano la protonazione dei gruppi amminici e quindi la formazione dei poliplessi che sono favoriti da valori di pH acidi. Un aumento del valore del pH diminuisce la carica del chitosano e causa un indebolimento delle interazioni elettrostatiche e quindi problemi di dissociazione degli acidi nucleici dai complessi (Antoniou, et al., 2024).
- Il rapporto **N/P** è espressione dei gruppi amminici liberi e determina lo stato carico del poliplesso. Maggiore è il rapporto, maggiore sono i punti di legame per l'RNA al polimero, permettendo così una maggiore disperdibilità e trasfezione. Nello specifico tale rapporto deve essere superiore a 1 in modo da evitare una carica neutra e la formazione di grossi aggregati che inducono alla precipitazione (Karaïanni, et al., 2023).
- L'aggiunta di **gruppi idrofili e idrofobi** sulle molecole di chitosano come glutatione, mannosio, galattosio, acido folico inducono una modifica chimica dei gruppi laterali del chitosano permettendo così di realizzare un *targeting* specifico. Sono diverse le modifiche a cui la catena polimerica del chitosano può essere sottoposta come: la PEGilazione che permette di aumentare l'idrofilia, la stabilità, la biodisponibilità e ridurre la tossicità; il chitosano N,N,N-trimetil(TMC) con cui si raggiunge una buona stabilità e trasfezione oltre ad una solubilità dei poliplessi formati in un ampio range di valori di pH; un'aggiunta di tripolifosfato (TPP) permette di raggiungere una migliore stabilità e interazione tra chitosano ed RNA durante il processo di sintesi di gelificazione ionica (Karaïanni, et al., 2023).

1.4 Tecniche di caratterizzazione delle nanoparticelle

La necessità di un utilizzo sempre più crescente di *nanocarriers* è strettamente legata all'esigenza di far fronte, in maniera mirata, a molteplici malattie. Per questo motivo diventa sempre più importante adottare diverse tecniche di caratterizzazione per controllare e

prevedere il comportamento dei *nanocarriers* e determinarne le proprietà chimico-fisiche, l'efficacia di incapsulamento, la velocità di rilascio, la possibile tossicità.

1.4.1 Tecniche per lo studio delle proprietà chimico-fisiche

Le varie proprietà chimico-fisiche delle nanoparticelle che si è soliti studiare sono: la dimensione, la carica superficiale, l'idrofobicità, la morfologia, la distribuzione dimensionale. Quest'ultimo parametro è un indice dell'eterogeneità delle particelle in termini di dimensione ed è espresso tramite l'indice di polidispersità, PDI.

In particolare, per quanto riguarda la determinazione delle dimensioni delle nanoparticelle e della polidispersità sono diverse le strategie utilizzate. La spettroscopia di diffusione dinamica della luce (DLS) è una delle tecniche in grado di determinare il diametro delle particelle; si basa sul moto Browniano e sulle proprietà di diffusione della luce e richiede quindi la conoscenza precisa dell'indice di rifrazione del solvente.

Bisogna considerare che le particelle di grandi dimensioni potrebbero non essere individuate dal metodo DLS poiché il loro movimento potrebbe essere troppo lento, ed è inoltre necessario che i campioni siano in uno stato liquido, in una soluzione o in una sospensione diluita di viscosità nota e che la temperatura e il pH potrebbero influire sull'accuratezza delle misurazioni. Inoltre, questa tecnica è sensibile alle impurità ed è in grado di rilevarle quando sono presenti con dimensione comprese tra 1 nm e 10 μm . Le misurazioni restituite dal DLS potrebbero non essere del tutto esatte se:

- viene ipotizzata una sfericità dei campioni che potrebbe, poi, non essere vera;
- si lavora con campioni torbidi, in cui l'assorbimento della luce da parte delle particelle disperse potrebbe interferire con il rilevamento;
- si hanno particelle aggregate che potrebbero non essere distinte dalle particelle individuali.

Invece la tecnica utilizzata per lo studio della carica superficiale e del potenziale zeta (ζ), che ci permette di risalire alla stabilità delle nanoparticelle, è quella di velocimetria laser Doppler. Tale tecnica consiste nell'applicazione di una corrente elettrica al campione in esame da cui è possibile determinare la diffusione elettroforetica della luce e quindi monitorare il movimento delle nanoparticelle. Dallo studio della diffusione elettroforetica della luce si ottiene il valore del potenziale zeta e quindi una valutazione della carica superficiale delle nanoparticelle. Quest'ultima restituisce un'idea delle possibili interazioni elettrostatiche tra i vari *nanocarrier* e dunque della loro tendenza ad aggregarsi o meno (Alshawwa, et al., 2022).

1.4.2 Metodi per l'analisi dell'efficacia di incapsulamento

I metodi che permettono di determinare l'efficacia di incapsulamento (EE), variabile che consente di descrivere il quantitativo di principio attivo che viene incapsulato all'interno delle nanoparticelle sintetizzate, sono due: uno diretto e l'altro indiretto.

Nel metodo indiretto l'EE viene misurata risalendo alla concentrazione del farmaco non intrappolato presente nel surnatante dopo l'operazione di centrifugazione. Grazie all'operazione di centrifugazione ad elevate velocità è possibile, infatti, far sedimentare le nanoparticelle insieme al principio attivo incorporato, separandoli da quello libero che rimarrà appunto nel surnatante. Noto il quantitativo iniziale di farmaco Q_p , introdotto durante la sintesi della nanoparticella, sarà sufficiente sottrarre a quest'ultimo il valore del

quantitativo di farmaco libero Q_s ritrovato nel surnatante, per ottenere la quantità di farmaco intrappolata. Dividendo il quantitativo di farmaco intrappolato per quello iniziale e moltiplicando per 100 si ottiene l'efficacia di incapsulamento in percentuale. (Alshawwa, et al., 2022)

$$EE\% = \frac{Q_p - Q_s}{Q_p} 100 \quad (1.1)$$

Nel metodo diretto, invece, si misura direttamente la concentrazione del farmaco intrappolato all'interno delle nanoparticelle e per far ciò è necessario effettuare la solubilizzazione dei *nanocarriers* tramite l'utilizzo di un appropriato solvente. Una volta effettuata la solubilizzazione nel solvente è necessario eseguire un'operazione di filtrazione in modo da poter separare il farmaco dalla nanoparticella solubilizzata nel solvente. Il valore di EE% è dato dal rapporto tra la quantità di farmaco intrappolato Q_e e la quantità di farmaco iniziale introdotta durante la procedura di sintesi Q_p , tutto moltiplicato per 100. (Alshawwa, et al., 2022)

$$EE\% = \frac{Q_e}{Q_p} 100 \quad (1.2)$$

1.4.3 Studi sul rilascio

Attraverso lo studio delle metodologie e dei tempi di rilascio di principi attivi da nanoparticelle è possibile controllare la farmacocinetica, la farmacodinamica cercando di migliorarne l'efficienza e far fronte, così, a malattie debilitanti.

Grazie ai sistemi di *drug delivery* è possibile prevenire gli effetti collaterali tossici ed aumentare la biodisponibilità del principio attivo al sito di rilascio. Un sistema di trasporto di un farmaco deve presentare delle caratteristiche fondamentali quali: capacità di incapsulare, rilascio ottimale, stabilità a lungo termine, bassa tossicità. Il rilascio di un farmaco può essere sostenuto, ovvero continuo nel tempo, oppure pulsato (Neuroscienze Pharmaness Scarl, et al., 2006).

Nei sistemi a rilascio continuo il farmaco è rilasciato a velocità controllata mediante il processo di diffusione del farmaco attraverso la matrice polimerica, è un meccanismo di rilascio tipico di polimeri non biodegradabili.

Un altro meccanismo di rilascio continuo è una conseguenza del processo di degradazione del polimero nel tempo e dunque avviene solo nel caso di matrice polimerica biodegradabile. Un altro tipico rilascio che si ha in presenza di polimeri biodegradabili consiste nella dissoluzione e diffusione del farmaco attraverso i canali che si formano nella matrice, come conseguenza dell'erosione di quest'ultima (Neuroscienze Pharmaness Scarl, et al., 2006).

Il rilascio pulsato è preferibile a quello continuo perché simula le modalità di produzione naturale biologica. Ad esempio, l'insulina, ormone endocrino prodotto nel pancreas, viene sintetizzata in modo continuo dall'organismo umano, ma a questa produzione basale si sommano picchi di secrezione in risposta ad uno stimolo esterno quale l'assunzione di carboidrati tramite l'alimentazione. Allo stesso modo quando si parla di rilascio pulsato si indica un meccanismo di rilascio che necessita di uno stimolo esterno per avvenire. Questo meccanismo può essere ottenuto addizionando, nella formulazione di sintesi delle nanoparticelle, un polimero in grado di rispondere ad uno stimolo specifico quale un'esposizione alla luce, cambi di pH o di temperatura. (Neuroscienze Pharmaness Scarl, et al., 2006)

Sono ancora tante le difficoltà tecniche che si incontrano durante lo studio del rilascio *in vitro*, dovute alla necessità di separare le nanoparticelle dal mezzo di rilascio. Alcuni metodi attuati per lo studio del rilascio di principi attivi da nanoparticelle prevedono l'utilizzo di: celle di diffusione *side-by-side*; sacca da dialisi; sacca da dialisi inversa; ultracentrifugazione; ultrafiltrazione. (Soppimath, et al., 2000).

- Le **celle di diffusione *side-by-side*** sono costituite da due compartimenti separati da una membrana artificiale o biologica. Uno dei due contenitori viene chiamato donatore, ovvero quello contenente le nanoparticelle incorporanti il farmaco, mentre l'altro, noto come ricevitore, è quello che raccoglie il farmaco rilasciato che attraversa la membrana (Soppimath, et al., 2000). Questo metodo si basa sulla creazione di una forza spingente di gradiente di composizione che induce il principio attivo a diffondere fuori dalla nanoparticella verso il mezzo circostante.
- Il processo di **dialisi** prevede l'introduzione delle nanoparticelle all'interno della sacca da dialisi. Quest'ultima è caratterizzata da una membrana con uno specifico *cut-off* molecolare, ovvero una dimensione massima delle molecole che possono attraversarla. Nel caso di separazione del principio attivo da nanoparticelle la membrana da dialisi permette la diffusione del principio attivo verso la soluzione esterna. È sufficiente misurare periodicamente la concentrazione del farmaco nel *buffer* per risalire al quantitativo di farmaco rilasciato nel tempo (Soppimath, et al., 2000)
- La **dialisi inversa** si differenzia dalla dialisi tradizionale per la direzione del flusso: ovvero questa volta le nanoparticelle sono immerse all'esterno della sacca da dialisi, caratterizzata da un *cut-off* molecolare che permette solo la diffusione del principio attivo dal tampone esterno verso l'interno della sacca (Soppimath, et al., 2000).
- L'**ultracentrifugazione** è un processo che si basa sull'applicazione di una forza centrifuga che permette di separare sostanze di diversa forma o densità presenti all'interno di una soluzione. Dopo il processo di ultracentrifugazione il materiale più denso, noto con il nome di *pellet*, sedimenterà sul fondo della provetta, mentre il surnatante, costituito da tutto ciò che non sedimenta, si troverà sopra il *pellet*. Nel caso di nanoparticelle incorporanti il principio attivo, rilasciato post centrifugazione, avverrà una separazione tra il farmaco non legato alle nanoparticelle, che sarà presente nel surnatante, e quello incorporato ad esse che si depositerà sul fondo.
- L'**ultrafiltrazione** è una tecnica che si basa sull'utilizzo di una membrana con un determinato *cut-off* che la rende permeabile al farmaco, ma non alle nanoparticelle. Applicando una sovrappressione è possibile spingere la soluzione contro la membrana garantendo il passaggio del farmaco e trattenendo le nanoparticelle.

Lo studio del rilascio di principi attivi da nanoparticelle *in vitro* è spesso anche effettuato trattando le nanoparticelle inglobanti il farmaco con tamponi fosfati salini, ad es. PBS (Masotti, et al., 2008). In particolare, nello studio condotto da Masotti et al. è stato analizzato il rilascio di DNA da nanosfere di chitosano incubate in PBS a differenti valori di pH quali 7.4; 5.6 e 6.5, e mantenute sotto agitazione magnetica per 72 ore. Ad ogni campionamento il campione di nanoparticelle e DNA è stato centrifugato per 10 minuti a 16 000 g per poi effettuare la sostituzione del surnatante con PBS fresco e misurare il quantitativo di DNA rilasciato (Masotti, et al., 2008).

1.5 Scopo della Tesi

Lo scopo di questo lavoro di Tesi è lo studio del rilascio di RNA da nanoparticelle di chitosano.

Una parte iniziale dell'attività sperimentale è stata dedicata alla coltivazione del lievito *Saccharomyces cerevisiae* e alla successiva estrazione di RNA mediante l'utilizzo del kit "RiboPure™ – Yeast Kit".

Sono state, poi, sintetizzate nanoparticelle di chitosano tramite l'agitatore *Vortex Mixer* seguendo il metodo di nanoprecipitazione. È stato, inoltre, condotto uno studio relativo all'efficacia di incapsulamento delle nanoparticelle al variare della percentuale in peso di chitosano disciolto nel solvente, e del rapporto RNA/CHITOSANO scelto per effettuarne la sintesi.

Lo studio del rilascio è stato eseguito utilizzando due metodi di agitazione differenti: disco rotatore e piastra magnetica. Le nanoparticelle sono state, inoltre, sospese in diverse soluzioni e diversi volumi in modo da poter studiare l'effetto che soluzioni e pH differenti possono avere nel processo di rilascio. In particolare, le soluzioni adottate sono state: 2 mL di PBS a pH 7.4 e 2 e 4 mL di acido acetico 1%.

2 Materiali e Metodi

2.1 Piano sperimentale

L'obiettivo di questo lavoro di Tesi è stato lo studio del rilascio di RNA da nanoparticelle di chitosano.

Per questo motivo in una prima fase è stata eseguita la coltura del lievito *Saccharomyces cerevisiae* da cui è stato estratto RNA totale. Successivamente sono state sintetizzate delle nanoparticelle di chitosano, a diverse concentrazioni (0.02%; 0.025%;0.05%;0.1% e 0.2%) nella soluzione solvente, prive di RNA, di cui sono state valutate le dimensioni e il potenziale zeta. In un secondo momento sono state sintetizzate nanoparticelle di chitosano con RNA di cui è stata valutata anche l'efficacia di incapsulamento oltre ai valori dimensionali e di potenziale zeta. Nello specifico sono state preparate nanoparticelle allo 0.02% di chitosano nella soluzione solvente e con vari rapporti di RNA/CHITOSANO pari a 0.014; 0.046;0.2 e 0.6.

In una fase successiva, si è passati allo studio del rilascio di RNA da nanoparticelle di chitosano. Per effettuare lo studio relativo al rilascio sono state adottate diverse procedure operative al fine di capire le condizioni ideali in cui il rilascio si verifica, se si verifica, e i tempi in cui esso avviene. Nello specifico, durante l'analisi del rilascio si è prima investigato quale potesse essere la soluzione tra il tampone fosfato salino e l'acido acetico 1% che consentisse di avere un quantitativo di RNA rilasciato maggiore e in un tempo più breve. Una volta trovata la soluzione migliore si è passati ad analizzare quali fossero i volumi e i tipi di agitazione ottimali. Prima di effettuare lo studio vero e proprio del rilascio di RNA sono state condotte delle analisi preliminari in cui si è voluto studiare:

- l'influenza che le nanoparticelle prive di RNA hanno sulla lettura del valore di assorbanza a 260 nm dei campioni sottoposti a rilascio, studio che è stato ulteriormente approfondito analizzando come variasse lo spettro di assorbanza nel caso in cui il campione fosse costituito solo da RNA o da RNA+ nanoparticelle a diversa concentrazione di chitosano
- le diverse interazioni che si instaurano tra RNA, nanoparticelle e vari *buffer* introdotti in soluzione. In particolare, sono stati analizzati gli effetti che i diversi *buffer* in cui vengono sospese le nanoparticelle e l'RNA hanno nella lettura di assorbanza a 260 nm.

2.2 Coltura di *Saccharomyces cerevisiae*

Al fine di eseguire la sintesi di nanoparticelle di chitosano veicolanti RNA è necessario l'estrazione di quest'ultimo da cellule di lievito *Saccharomyces cerevisiae*.

Le cellule di lievito sono state fatte crescere su terreno Malt Extract Agar (MEA).

Il terreno MEA è così costituito:

- 20 g/L Estratto di malto;
- 20 g/L Glucosio;
- 20 g/L di Agar;
- 2 g/L di Peptone.

Dopo circa 20 h di crescita ad una temperatura controllata di 30°C, il lievito è stato inoculato all'interno di una provetta Falcon contenente 25 mL di terreno liquido di composizione uguale a MEA, ma privato di Agar, avendo quest'ultimo una funzione gelificante. La

provetta Falcon è stata riposta in un termostato a 30°C e mantenuta in agitazione a 120 rpm per altre 20 ore.

2.3 Estrazione di RNA da *Saccharomyces cerevisiae*

Per poter eseguire l'estrazione di RNA dalle cellule di lievito è stato adoperato il kit "RiboPure™ -Yeast Kit".

Durante la procedura di estrazione è necessario lavorare con soluzioni contenenti al massimo 3×10^8 cellule di lievito. Per questo motivo è stato fondamentale misurare con lo spettrofotometro *MultiSkan SkyHigh* la densità ottica a 600 nm (OD_{600}) della soluzione costituita dal terreno liquido e dalle cellule di lievito accresciutevi. La densità ottica, nota anche come assorbanza, permette infatti di risalire alla concentrazione di una sostanza presente in soluzione; maggiore è la concentrazione di una soluzione, maggiore sarà la sua capacità di assorbire. Una volta determinato il valore di OD_{600} , tramite la retta di taratura reperibile in letteratura (Thermo Fisher Scientific, s.d.) e l'equazione (2.1), è stato possibile calcolare il valore delle unità formanti colonia (CFU) presenti nella soluzione misurata. Note le CFU per mL di soluzione è stato possibile preparare le provette Eppendorf contenenti il quantitativo adeguato di cellule per poter proseguire così con l'estrazione dell'RNA.

$$OD_{600} = 0.064 \times Cellule \left[10^6 \frac{CFU}{mL} \right] + 0.018 \quad (2.1)$$

2.3.1 Procedura di estrazione

La prima operazione, nel processo di estrazione di RNA da cellule di lievito, ha previsto una centrifugazione, con micro-centrifuga *MiniSpin Plus Eppendorf IVD 033207*, per 3 minuti a 12000g delle varie provette contenenti l'adeguato quantitativo di CFU di lievito, precedentemente preparate. Tramite questa operazione è stato possibile separare le cellule di lievito sottoforma di corpo di fondo dal surnatante. A questo punto il surnatante è stato scartato mentre il corpo di fondo è stato conservato e sottoposto a una serie di fasi di estrazione quali:

Fase 1: lisi cellulare

-addizione al *pellet* ottenuto dalla precedente centrifugazione dei seguenti reagenti: 480 μL di *Lysis Buffer*; 48 μL di 10% di sodio dodecil solfato (SDS); 480 μL di fenolo; e miscelazione tramite *vortex* per 10-15 secondi

-introduzione delle sospensioni in provette contenenti un volume di *Zirconia Beads* pari a 750 μL . Un volume di 750 μL di *Zirconia* in Eppendorf è stato ottenuto ricoprendo un'altezza pari a circa 2.5 cm dall'estremità inferiore della provetta stessa, come mostrato in Figura 2.1

-miscelazione delle provette contenenti le *Zirconia Beads* e le sospensioni tramite *vortex*, alla massima velocità, per 10 minuti. Questo passaggio ha permesso di ottenere la lisi cellulare

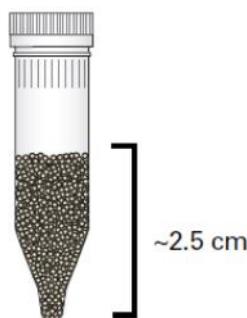


Figura 2.1: Indicazioni per la quantità di sfere di zirconio da introdurre in provetta-Figura tratta da (Thermo Fisher Scientific, s.d.)

Fase 2: procedure di purificazione

- centrifugazione delle provette per 5 minuti a 16100 g al fine di separare una fase acquosa dal resto
- recupero della fase acquosa, contenente l'RNA pari a circa 530 μL , e introduzione in una Falcon da 15 mL
- addizione di 1900 μL di *Binding Buffer* e 1250 μL di etanolo al 100% e miscelazione tramite micropipetta. Il volume complessivo ottenuto è pari a 3680 μL
- addizione di volta in volta di 700 μL , dei 3680 μL ottenuti, in una provetta contenente una cartuccia da filtrazione e centrifugazione per 1 minuto a 16000 g. Il filtrato ottenuto è stato prelevato e conservato all'interno di una Falcon da 15 mL. Ripetizione di questi passaggi fino ad esaurire completamente il volume iniziale di 3680 μL .

Fase 3: lavaggio del filtro

- introduzione di 700 μL di *Wash solution 1* (primo lavaggio) e centrifugazione per 1 minuto a 16000 g. Il filtrato raccolto è stato conservato in una Falcon differente da quella usata nel passaggio precedente.
- introduzione di 500 μL di *Wash solution 2/3* (secondo lavaggio) e centrifugazione per 1 minuto a 16000 g. Quest'ultima operazione viene ripetuta in tutto due volte e il filtrato prelevato è stato poi introdotto in una nuova Falcon diversa da quella utilizzata per il primo lavaggio. È stato opportuno, inoltre, centrifugare il filtro ulteriormente per 1 minuto a 16000 g per rimuovere eventuali residui del lavaggio.

Fase 4: eluizione di RNA legato al filtro

- introduzione del filtro in una nuova Eppendorf e addizione di 50 μL di *Elution solution*, precedentemente riscaldata a 95°C. La provetta è stata centrifugata a 16000 g per 1 minuto
- addizione di altri 50 μL di *Elution solution* e centrifugazione
- recupero del filtrato, pari a 100 μL , contenente gli acidi nucleici.

La soluzione estratta contiene tutti gli acidi nucleici e al fine di ottenere RNA puro privo di contaminazioni di DNA è stato necessario eseguire ulteriori passaggi di purificazione. Si è passati dunque al trattamento con DNase I.

Fase 5: reazione di digestione tramite enzima DNase

- addizione ai 100 μL di filtrato di: 4 μL di DNase I e 10 μL di 10X *DNase I Buffer* (1/10 del volume da trattare)

- incubazione del campione a 37°C per 30 minuti
- introduzione di 11 μL di *DNase Inactivation Reagent*, precedentemente risospeso mediante agitazione; l'aggiunta di quest'ultimo ha permesso di interrompere il processo di digestione da parte dell'enzima DNase.
- agitazione tramite agitatore *vortex* con successivo riposo a temperatura ambiente per 5 minuti
- centrifugazione a 10000 g per 2-3 minuti e recupero del surnatante contenente RNA.

Infine, è stato necessario condurre un'analisi allo spettrofotometro per determinare la concentrazione e la purezza dell'estratto, e per fare ciò si è eseguita la lettura alle due lunghezze d'onda pari a 260 nm e 280 nm in modo da poter valutare rispettivamente la quantità di RNA e di proteine all'interno del campione in esame.

Dal valore di assorbanza trovato si è risaliti al valore di concentrazione di RNA tramite l'equazione (2.2).

$$C_{RNA} = A_{260} \times 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \text{fattore di diluizione} \quad (2.2)$$

Tramite la formula (2.2) si esprime la concentrazione in termini di $\mu\text{g/mL}$. All'interno dell'equazione compare, inoltre, il fattore $40 \mu\text{g/mL}$ che indica che ad un valore di assorbanza a 260 nm pari ad 1 corrispondono $40 \mu\text{g}$ di RNA per ml di soluzione.

Per quanto riguarda, invece, la stima della purezza del campione di RNA estratto, è stato necessario eseguire un rapporto delle assorbanze lette rispettivamente a 260 nm e 280 nm.

$$\text{Purezza} = A_{260}/A_{280} \quad (2.3)$$

Per definire il campione puro, il valore di purezza calcolato secondo l'equazione (2.3), deve essere compreso tra 1.8-2.1. La purezza del campione contenente acidi nucleici viene misurata in funzione delle quantità di contaminanti presenti come per l'appunto le proteine che assorbono ad una lunghezza d'onda pari a 280 nm.

Una volta effettuate queste valutazioni è stato possibile conservare l'RNA estratto a -20°C.

2.4 Materiali per la sintesi di nanoparticelle di chitosano

2.4.1 Chitosano

Il chitosano è un polisaccaride lineare composto dai residui di glucosamina (N-acetil-2ammino-2-deossi-D-glucosio) e N-acetil-glucosamina (2ammino-2-deossi-D-glucosio), legati tra di loro da legami $\beta 1 \rightarrow 4$. Il chitosano deriva dalla chitina tramite un processo di deacetilazione. La chitina è un biopolimero abbondante in natura che si può trovare nell'esoscheletro dei crostacei, nelle cuticole degli insetti, nelle alghe e nella parete cellulare dei funghi.

Il chitosano è un policatione e la sua densità di carica dipende dal grado di acetilazione e dal pH del mezzo. A differenza della chitina, ha un numero di residui acetilati inferiori e ciò lo rende molto più solubile in mezzi acidi acquosi.

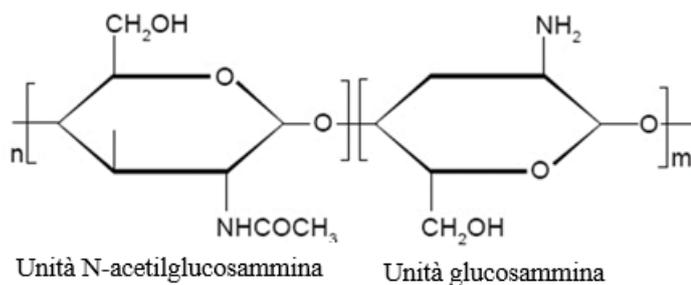


Figura 2.2: Struttura chimica chitosano-Figura tratta da (Ahmed & Aljaeid, 2016) con modifiche

Il processo di deacetilazione consiste nella conversione di alcune frazioni di N-cetilglucosamina in unità di glucosamina. L'ottenimento di grandi quantità di gruppi $-NH_2$ protonati sulla struttura permette di aumentare la solubilità in mezzi acquosi acidi; in particolare quando circa il 50% di tutti i gruppi amminici sono protonati, il chitosano diventa solubile, dal momento che il pKa è approssimativamente intorno a 6.5. Dunque, il grado di acetilazione, insieme ad altri parametri come il pH, la temperatura, il peso molecolare e la cristallinità del polimero, influenzano la solubilità del chitosano. La deacetilazione, con trattamento alcalino a $0^\circ C$, consente la produzione di polimeri solubili in soluzioni acquose di acido acetico. (Aranaz, et al., 2021)

2.4.2 Tampone acetato di sodio

È necessario preparare una soluzione di acetato di sodio a pH 4.5 al fine di poter sciogliere il chitosano utile nel processo di sintesi delle nanoparticelle. La soluzione tampone è dunque utilizzata come solvente, e viene preparata partendo da acetato di sodio 0.1 M ($C_2H_3NaO_2$) e acido acetico 0.1 M (CH_3COOH) fino a raggiungere una soluzione tampone con pH pari a 4.5.

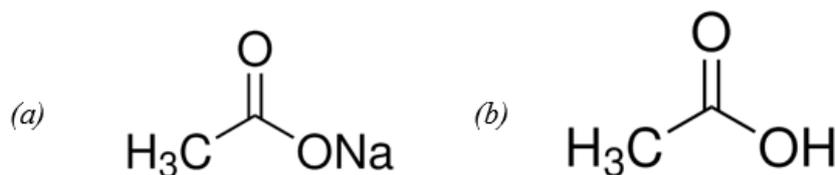


Figura 2.3: Struttura chimica di (a) acetato di sodio e (b) acido acetico-Figura tratta da (Sigma-Aldrich, s.d.) con modifiche

Il tampone acetato di sodio è costituito da 0,1M di acido acetico (glaciale), con densità pari a $1,049 \text{ g/cm}^3$ a $25^\circ C$, ed una soluzione 0,1M di acetato di sodio (anidro), con massa molare pari a $82,03 \text{ g/mol}$. Per conoscere i quantitativi dei due composti chimici da introdurre in soluzione al fine di ottenere il *buffer* a pH 4.5, viene utilizzata l'equazione di Henderson-Hasselbach (2.3) da cui nota la costante di dissociazione acida dell'acido acetico pari a $1.8 \times 10^{-5} \text{ M}$ si calcolano le quantità di acetato di sodio e acido acetico.

$$pH = pKa + \log \frac{[Acetato\ di\ sodio]}{[Acido\ acetico]} \quad (2.4)$$

In particolare, per preparare 100 mL di solvente sono state prelevate le quantità indicate in tabella 2.1.

Tabella 2.1 : Composizione delle soluzioni di acido acetico e acetato di sodio da miscelare per ottenere 100 mL di tampone di acetato di sodio a pH 4.5

SOLUZIONI	VOLUME	QUANTITÀ PRELEVATA
Acetato di sodio	36.27 [mL]	0.298 [g]
Acido acetico	63.7 [mL]	0.364 [mL]

2.4.3 Tampone solfato di sodio

La soluzione di solfato di sodio 0.05 M (Na₂SO₄) ha la funzione di antisolvente e consente dunque la precipitazione delle nanoparticelle di chitosano che risultano poco solubili in tale soluzione.

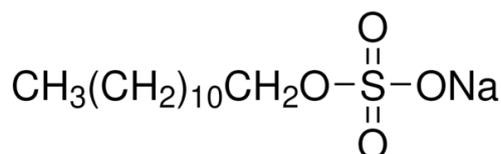


Figura 2.4: Struttura chimica del solfato di sodio - Figura tratta da (Sigma-Aldrich, s.d.)

Per la preparazione di 100 mL di *buffer* è stato utilizzato solfato di sodio 0.05 M e peso molecolare pari a 142.02 g/mol e sono state prelevate le quantità riportate in tabella 2.2.

Tabella 2.2: Composizione per ottenere 100 mL di soluzione di solfato di sodio 0.05 M

SOLUZIONE	VOLUME	QUANTITÀ PRELEVATA
Solfato di sodio	100 [mL]	0.7102 [g]

2.4.4 Acqua priva di nucleasi

L'acqua priva di nucleasi è un'acqua che è stata sottoposta a trattamenti tali da renderla libera da enzimi come le nucleasi, che potrebbero degradare gli acidi nucleici. Per tale ragione ogni volta che si sintetizzano sostanze che coinvolgono l'utilizzo di acidi nucleici, come nel caso in cui si vogliono preparare delle nanoparticelle di chitosano che inglobano RNA, è di fondamentale importanza adoperare tale acqua in modo da evitare eventuali degradazioni legate alla presenza di enzimi RNAsi.

2.5 Apparato sperimentale e metodologia di sintesi di nanoparticelle

Nella prima fase di sperimentazione sono state sintetizzate delle nanoparticelle di chitosano prive di RNA al fine di poter individuare quale fosse la concentrazione di chitosano ideale che consentisse di ottenere una dimensione media di nanoparticelle più bassa possibile e potenziale zeta più alto. In particolare, sono state preparate nanoparticelle a partire da soluzioni con concentrazione di chitosano variabile tra 2 g/l e 0.2 g/l.

Una volta individuata la concentrazione di chitosano migliore con cui poter lavorare, si è proceduto con la sintesi di nanoparticelle che inglobassero RNA. Anche in questo caso sono stati preparati diversi campioni di nanoparticelle costituiti da diversi rapporti di RNA/CHITOSANO.

Le nanoparticelle di chitosano sono state prodotte per nanoprecipitazione utilizzando un agitatore *Vortex*.

La sintesi delle nanoparticelle avviene direttamente all'interno di una provetta Eppendorf con un volume pari a 1.5 mL.

La scelta di sintetizzare direttamente in provetta riduce il rischio di perdita di RNA e di contaminazione dell'intero sistema poiché subito dopo l'introduzione dei reagenti la provetta viene chiusa e riaperta solo al termine dell'operazione di centrifugazione.

Si eliminano così le operazioni di trasferimento e si garantisce l'introduzione delle stesse quantità di RNA all'interno di ciascun campione.

Procedura di sintesi dei *nanocarriers*:

1. Preparazione della soluzione antisolvente, solfato di sodio 0.05 M, e del solvente, acetato di sodio pH 4.5.
Nella soluzione solvente è stato introdotto il quantitativo di chitosano nella concentrazione scelta. La dissoluzione del chitosano all'interno della soluzione tampone non è stata immediata, seppur questo fosse presente in quantità veramente ridotte comprese tra i 20 e i 200 mg . Per facilitarne la solubilizzazione del polimero all'interno del solvente è stato utilizzato un agitatore magnetico e si è lasciata la soluzione sotto miscelazione per un paio di minuti.
L'antisolvente è stato, invece, utilizzato per disciogliere l'RNA. Per limitare i trasferimenti di RNA, quest'ultimo invece di essere introdotto nel becher contenente l'antisolvente è stato addizionato direttamente in Eppendorf, nelle quantità previste dalla procedura di sintesi.
2. I due tamponi vengono introdotti, in egual volume 1:1, all'interno di una provetta Eppendorf da 1.5 mL, in cui è avvenuta la sintesi dei *nanocarriers* di chitosano.
In Eppendorf sono stati introdotti i seguenti componenti nelle seguenti quantità:
 - 250 μ L di solvente con chitosano disciolto;
 - 250 μ L di solvente e RNA (si addizionano i μ L di RNA previsti e tali μ L sono sottratti ai 250 μ L complessivi previsti. I μ L ottenuti per differenza corrispondono al quantitativo di antisolvente da introdurre).
3. La provetta, contenente le soluzioni, è stata riscaldata per 2 minuti a 55°C in un bagno termostato.
4. Dopo il riscaldamento le provette sono state miscelate con un agitatore *vortex* per 30 secondi alla massima velocità. La rapida miscelazione tra la soluzione solvente, in cui il chitosano è solubile, e l'antisolvente, in cui invece il polimero è scarsamente solubile, ha garantito l'aggregazione del chitosano in nanoparticelle.
5. Subito dopo l'operazione di miscelazione con *vortex* è stata eseguita un'operazione di *quench*. L'operazione di *quench* consiste nell'introduzione di un certo volume di acqua nella sospensione in cui si sono appena sintetizzate le nanoparticelle. Nel caso specifico è stato introdotto un volume di acqua pari a 500 μ L e dunque si è eseguito un *volumetric quench ratio* pari a 1:1. Si è raggiunto, così, un volume complessivo in Eppendorf pari ad 1 mL. L'operazione di *quench* ha permesso di avere un controllo del processo di aggregazione delle nanoparticelle in quanto con essa si è riusciti a bloccare i fenomeni di aggregazione.

2.6 Tecniche di caratterizzazione

Per caratterizzare le nanoparticelle è necessario analizzare diversi aspetti come:

- dimensione media;
- indice di polidispersità che restituisce un'idea dell'omogeneità delle dimensioni delle nanoparticelle;
- potenziale zeta che caratterizza la carica superficiale delle particelle;
- l'efficacia di incapsulamento, ovvero la quantità di RNA che si è riusciti ad inglobare all'interno delle nanoparticelle.

Le analisi di tali caratteristiche permettono di monitorare gli effetti che le varie condizioni operative hanno sulla stabilità delle nanoparticelle.

2.6.1 Dynamic Light Scattering (DLS)

È possibile determinare la dimensione media e la distribuzione di dimensione di una popolazione di nanoparticelle tramite l'utilizzo dell'analizzatore di dimensioni *Nano Zetasizer ZS90 (Nanoseries ZS90 DLS Zetasizer, Malvern Instrument, UK)* dotato di laser a diodi da 4 mW a 633 nm.

L'analizzatore dimensionale si basa sul moto browniano delle particelle in sospensione. Ogni volta che una particella è immersa all'interno di un fluido questa è soggetta ad un movimento caotico e casuale senza fine dovuto allo scontro della particella con le molecole di solvente che la circondano: questo fenomeno prende il nome di moto Browniano. Tale moto della particella si verifica ogni volta che una particella è dispersa in un fluido indipendentemente dalla natura del fluido ma con una velocità proporzionale alla viscosità del fluido in esame.

L'analisi dimensionale delle particelle è effettuabile a diverse temperature e a diversi tempi, ma è necessario un controllo della temperatura poiché quest'ultima influenza la viscosità e dunque il moto della particella.

Il DLS si occupa di misurare le particelle sospese in un liquido mettendo in relazione il moto browniano con la dimensione dei *nanocarriers*. Normalmente più è grande una particella più è lento il moto Browniano mentre più sono piccole le particelle più queste si muovono velocemente all'interno del solvente. Il diametro misurato tramite la tecnica DLS caratterizza come una particella si muove nel fluido e per questo motivo è definito diametro idrodinamico e lo si ottiene tramite la formula (2. 5) (Ranieri, 2021-2022).

$$d_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (2. 5)$$

Con d_h corrispondente al diametro idrodinamico; D coefficiente di diffusione traslazionale $\frac{m^2}{s}$; k =costante di Boltzmann pari a $1.380 * 10^{-23} \frac{J}{K}$ T temperatura assoluta in Kelvin e η viscosità del solvente $\frac{kg}{m s}$.

Il diametro idrodinamico ricavato dal DLS è il diametro di una sfera che ha la stessa velocità di diffusione traslazionale, ovvero che diffonde allo stesso modo della particella campionata (Ranieri, 2021-2022).

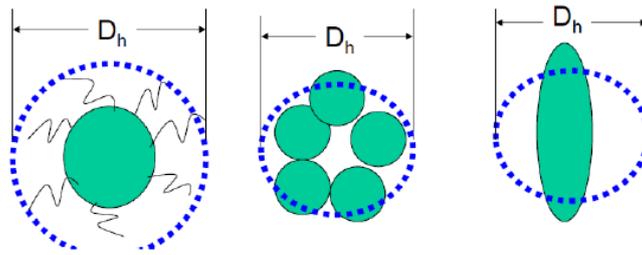


Figura 2.5: Rappresentazione dell'approssimazione del diametro del campione misurato con quello di una sfera- Figura tratta da (Ranieri, 2021-2022) con modifiche

Il DLS comprende la presenza di un laser, di un detector e di un correlatore. Il campione da analizzare è collocato all'interno di cuvette in quarzo o polistirene, che vengono riempite fino ad 1 ml, facendo le opportune diluizioni. La cuvette viene investita dal raggio luminoso emesso dal laser. La luce che colpisce le particelle viene diffusa in tutte le direzioni generando il fenomeno dell'interferenza costruttiva o distruttiva. La velocità di diffusione delle particelle dovute al moto Browniano viene misurata tenendo conto della velocità con cui l'intensità della luce diffusa fluttua. La velocità con cui le fluttuazioni di intensità avvengono dipende dalla dimensione delle particelle, dove quelle piccole determinano una fluttuazione più rapida di quelle grandi. Se le particelle fossero ferme, all'interno della sospensione, l'intensità luminosa risultante sarebbe costante, ma ciò non accade mai proprio per la presenza dei moti Browniani che sono eterni e spontanei (Ranieri, 2021-2022). La misurazione delle fluttuazioni di intensità nel tempo è eseguita utilizzando un *detector* collocato a 90° rispetto al laser. Le misurazioni effettuate dal *detector* vengono inviate ad un auto-correlatore digitale (Anton Paar, s.d.)

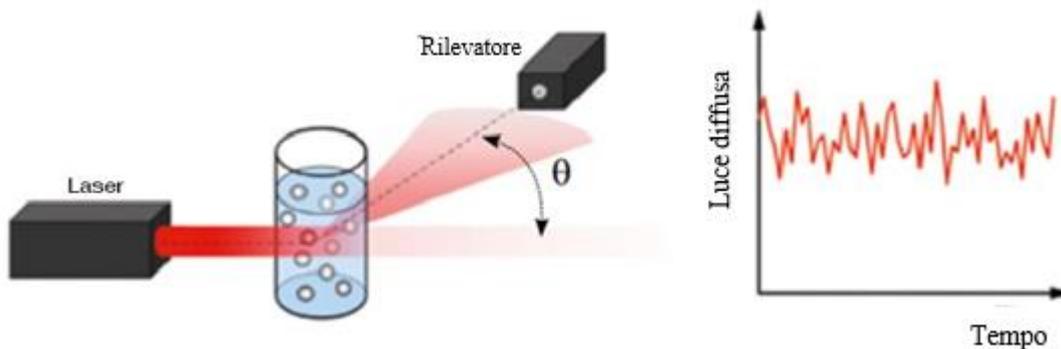


Figura 2.6: Configurazione base di un DLS. Il campione è contenuto in una cuvette e la luce diffusa dal laser è rilevata con un'angolazione pari a 90° -Figura tratta da (Anton Paar, s.d.) con modifiche

Un correlatore è un comparatore di intensità di segnali e dunque compara istante per istante i segnali luminosi rilevati dal *detector* con la misura d'intensità iniziale eseguita al tempo zero e da questo confronto si ottiene una funzione di autocorrelazione che descrive per quanto tempo una particella si trova allo stesso punto all'interno del campione. La funzione di autocorrelazione al tempo zero è pari ad 1 ed è lineare: ciò vuol dire che la particella non ha modificato la propria posizione rispetto all'istante precedente. Con il passare del tempo si osserva un decadimento esponenziale della funzione di autocorrelazione e non c'è più somiglianza con il punto iniziale dato che la particella si sta muovendo (Anton Paar, s.d.). La funzione di autocorrelazione descrive le fluttuazioni della luce diffusa e quindi da

quest'ultima è possibile determinare il coefficiente di diffusione traslazionale (Ranieri, 2021-2022).

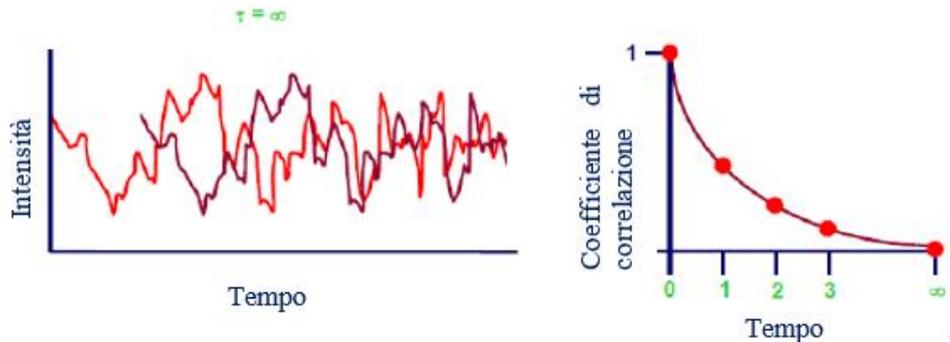


Figura 2.7: Rappresentazione delle fluttuazioni dell'intensità luminosa e della funzione di correlazione. L'intensità della luce diffusa in un tempo t viene confrontata con l'intensità della stessa traccia traslata nel tempo di un certo ritardo τ . Facendo ciò per diversi tempi di ritardo si ottiene la funzione di correlazione desiderata. In figura il confronto di intensità è mostrato solo con il tempo di ritardo $\tau = \infty$ -Figura tratta da (Ranieri, 2021-2022) con modifiche

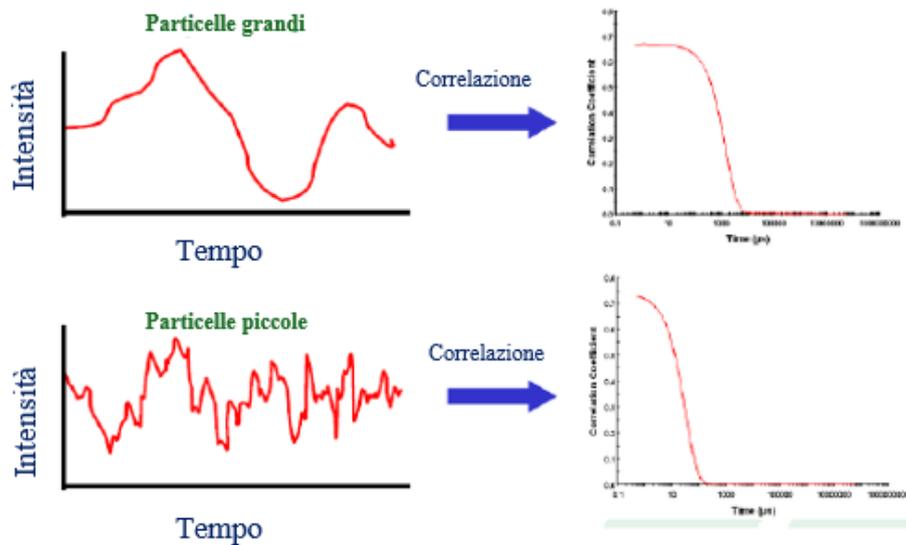


Figura 2.8: Confronto tra una traccia e una funzione di correlazione di particelle grandi e piccole. Le particelle piccole mostrano fluttuazioni più rapide della luce diffusa e un decadimento più rapido della funzione di correlazione. Grafico con tempo in scala logaritmica -Figura tratta da (Ranieri, 2021-2022) con modifiche

2.6.2 Laser Doppler Micro-electrophoresis

Tramite la tecnica di *Laser Doppler Micro-electrophoresis* è possibile misurare il potenziale zeta delle nanoparticelle. La misura del potenziale zeta, ζ , serve per predire la stabilità delle dispersioni o le interazioni elettrostatiche tra le particelle. Per le nanoparticelle il calcolo del potenziale zeta permette di valutare la stabilità di quest'ultime. Un elevato valore di potenziale zeta, ovvero minore di -30 mV e maggiore di +30 mV, garantisce che le nanoparticelle si respingano reciprocamente. Questa repulsione elettrostatica impedisce così fenomeni di agglomerazione, aggregazione e flocculazione. (Cerini, 2024)

Il potenziale zeta restituisce informazioni sulla carica superficiale di un materiale. Ogni volta che un materiale entra in contatto con un liquido, i gruppi funzionali presenti sulla sua superficie interagiscono con il mezzo circostante, attirando contro-ioni che si organizzano

in uno strato detto doppio strato elettrochimico. Il potenziale zeta è dato dalla somma della carica superficiale iniziale e del doppio strato (Ranieri, 2021-2022).

Lo strato liquido che circonda la particella può essere suddiviso in due zone che costituiscono il cosiddetto *double layer*:

- Strato di Stern: in cui gli ioni sono fortemente legati alla particella;
- Strato diffusivo: zona più lontana dalla nanoparticella in cui gli ioni risultano legati meno saldamente.

Gli ioni all'interno del doppio strato si muovono insieme con la particella e tale confine è detto piano di scivolamento; il potenziale zeta è il potenziale a livello di questo strato (Ranieri, 2021-2022).

Le molecole di RNA, cariche negativamente, tendono a far diminuire il potenziale zeta delle nanoparticelle di chitosano che sono, invece, cariche positivamente. Dunque, lo studio del potenziale zeta fornisce anche un'idea della tipologia di RNA incapsulato o adsorbito.

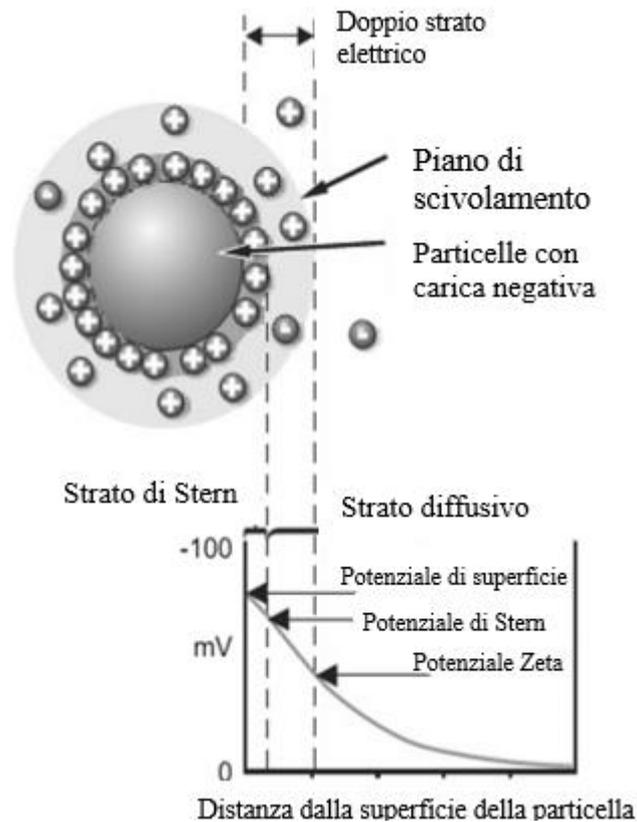


Figura 2.9: Interazioni elettrostatiche che circondano la particella- Figura tratta da (Bukackova, et al., 2018) con modifiche

Per determinare la misura del potenziale zeta della particella è necessario collocare il campione all'interno di una cella capillare dotata di elettrodi ai capi dei quali viene applicata una differenza di potenziale. Attraverso l'utilizzo di questa cella con elettrodi è possibile ricreare un sistema di microelettroforesi in cui le particelle, per effetto del campo elettrico, si muovono verso l'elettrodo di carica opposta con una velocità, detta velocità elettroforetica. È presente, inoltre, un laser che fornisce una fonte di luce che viene divisa in fascio incidente e fascio di riferimento (Cerini, 2024). Quando il fascio incidente incontra le particelle viene diffuso in tutte le direzioni. A questo punto la luce deflessa ha una frequenza differente da quella iniziale e si ha l'effetto Doppler. Lo scostamento delle

frequenze è tanto maggiore quanto più è grande la velocità delle particelle. Noto il valore dello scostamento si risale alla mobilità elettroforetica e quindi al valore del potenziale zeta. (Ranieri, 2021-2022)

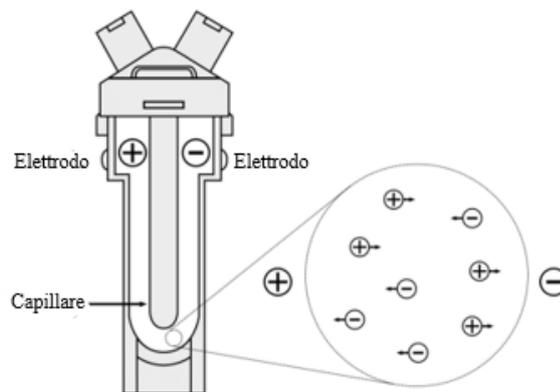


Figura 2.10: Rappresentazione della cella capillare con elettrodi per la misura del potenziale zeta-
Figura tratta da (Lazaro Garcia, 2014) con modifiche

È importante diluire i campioni in maniera adeguata sia per effettuare il calcolo del potenziale zeta che la misurazione della dimensione media. Una diluizione eccessiva del campione potrebbe non garantire una rilevazione da parte del *detector* dell'intensità della luce, mentre un campione troppo concentrato potrebbe portare a problemi di *multiple scattering* ovvero i fotoni dispersi dalla particella vengono dispersi nuovamente dalle particelle limitrofe prima che raggiungano il rivelatore dello strumento (Malvern Panalytical, s.d.).

2.6.3 Spettrofotometria

Lo spettrofotometro UV-visibile è uno strumento in grado di misurare la quantità di luce assorbita da un composto chimico o materiale. Nota l'assorbanza di una soluzione a diverse lunghezze d'onda è possibile determinare la quantità di una sostanza presente nel composto (Sinergica soluzioni su misura, 2023).

Uno spettrofotometro è costituito da una fonte di luce, un monocromatore e un rivelatore.

- La fonte di luce è utilizzata per emettere un raggio di luce ad una specifica lunghezza d'onda compresa nello spettro UV-visibile.
- Il monocromatore è responsabile della separazione delle diverse lunghezze d'onda della luce, dunque, è in grado di scomporre un raggio proveniente da una sorgente luminosa e lasciar passare solo quello corrispondente ad una specifica lunghezza d'onda a cui la molecola d'interesse assorbe.
- Il rivelatore misura l'intensità della luce che passa attraverso il monocromatore.

La soluzione che si vuole analizzare è riposta all'interno di un'apposita cella detta *cuvette*. Il raggio luminoso, nell'attraversare la cella contenente il campione, diminuisce la sua intensità luminosa. L'intensità luminosa diminuisce perchè viene assorbita dalla soluzione da analizzare e viene assorbita in maniera proporzionale alla concentrazione della molecola di interesse. Il rivelatore misura l'intensità luminosa che attraversa il campione che viene convertita in segnale elettrico e questi dati vengono inviati ad un computer che elabora i risultati restituendo così il valore di assorbanza del materiale in analisi. (Betti, 2018)

L'assorbanza si calcola come il rapporto tra l'intensità luminosa della luce assorbita dalla soluzione e l'intensità della luce incidente sulla soluzione, misurate a una determinata lunghezza d'onda (Sinergica soluzioni su misura, 2023). Il valore di assorbanza misurata

deve sempre essere sottratto con quella di un campione noto come bianco. Il bianco è una soluzione priva dell'analita di interesse che azzerava l'assorbimento del solvente eliminando in questo modo l'influenza dei componenti non desiderati.

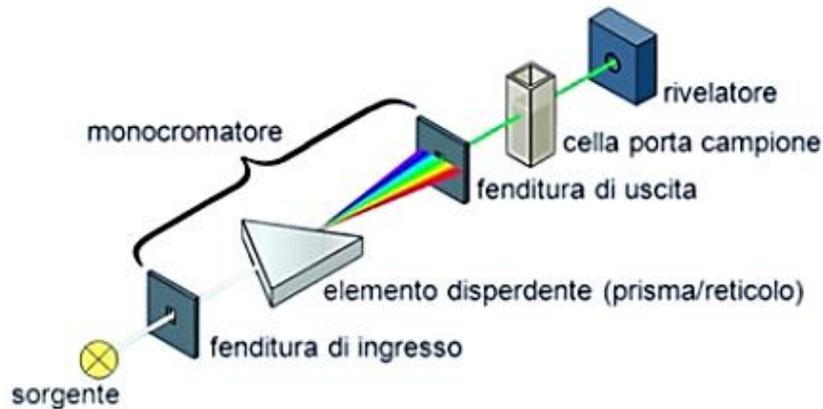


Figura 2.11: Schema dei componenti spettrofotometro- Figura tratta da (Mele, 2016) con modifiche

In laboratorio le analisi spettrofotometriche sono state eseguite tramite: *MultiSkan SkyHigh*: è un lettore di micropiastre UV/Vis. La sorgente luminosa è una lampada flash allo xeno che attraversa il campione, collocato all'interno dei pozzetti della piastra, dal basso verso l'alto. La gamma di lunghezza d'onda va da 200 a 1000 nm con incrementi di 1 nm. Le piastre sono costituite da 96 pozzetti, ognuno dei quali è identificato da una lettera e un numero e può essere riempito con un volume massimo della soluzione da analizzare pari a 300 μL (Labcompare, s.d.).

In questo lavoro di Tesi la sostanza ricercata è principalmente l'RNA e per questo motivo durante le misurazioni spettrofotometriche si lavora con una lunghezza d'onda pari a 260 nm. Nota l'assorbanza è possibile risalire al valore di concentrazione di RNA tramite l'equazione (2.2) e dunque condurre le analisi relative al rilascio di RNA nel tempo in soluzioni e il calcolo dell'efficacia di incapsulamento.

Per determinare l'efficacia di incapsulamento delle nanoparticelle è stato eseguito il metodo indiretto proprio come descritto nel paragrafo 1.4. È stato, dunque, necessario effettuare una procedura di centrifugazione della sospensione in modo da separare il surnatante, contenente l'RNA non incapsulato e non adeso, dalle nanoparticelle di chitosano che sedimentano sul fondo. Il surnatante viene recuperato ed analizzato allo spettrofotometro in modo da poter risalire al valore di concentrazione di RNA e da quest'ultimo, noto il volume di campione all'interno della cuvetta, è possibile risalire al quantitativo in massa di RNA che non è stato incapsulato durante il processo di sintesi Q_s . Essendo noto il quantitativo di RNA introdotto in Eppendorf Q_p , al momento del processo di sintesi delle nanoparticelle, è possibile determinare l'efficacia di incapsulamento secondo l'equazione (1.1).

2.6.4 Retta di calibrazione spettrofotometro MultiSkan SkyHigh

La retta di calibrazione, nota anche come retta di taratura, permette di risalire alla concentrazione o alla massa di un campione incognito per interpolazione. Per costruire la retta di calibrazione è necessario partire da una soluzione madre a concentrazione nota. La soluzione madre verrà poi diluita ottenendo così diversi campioni a concentrazione nota e differente per ognuno di loro. I campioni preparati verranno

analizzati tramite lo spettrofotometro per determinare il valore di assorbanza. Noto il valore di concentrazione di un campione e il relativo valore di assorbanza è possibile tracciare una retta interpolante i vari dati ottenendo, così, un'equazione che descrive l'assorbanza in funzione della concentrazione.

Nel caso in esame si è partiti da una soluzione madre di RNA con concentrazione nota e pari a 0.0495 g/l che è stata poi diluita. In particolare, la soluzione madre è stata diluita: 1:2; 1:10; 1:100.

Le varie soluzioni di RNA, a concentrazione nota, sono state analizzate allo spettrofotometro *Thermo Scientific SkyHigh* per poter determinare il valore di assorbanza relativo.

I valori ottenuti sono stati diagrammati e tramite un'interpolazione dei dati, mediante un foglio di calcolo, si è determinata l'equazione (2.6) della retta di calibrazione.

Tabella 2.3: Valori di assorbanza e concentrazione misurati per l'ottenimento della retta di calibrazione

Abs 260 nm	Concentrazione [$\mu\text{g}/\text{mL}$]
1.238	49.52
0.651	26.05
0.183	7.34
0.077	3.07

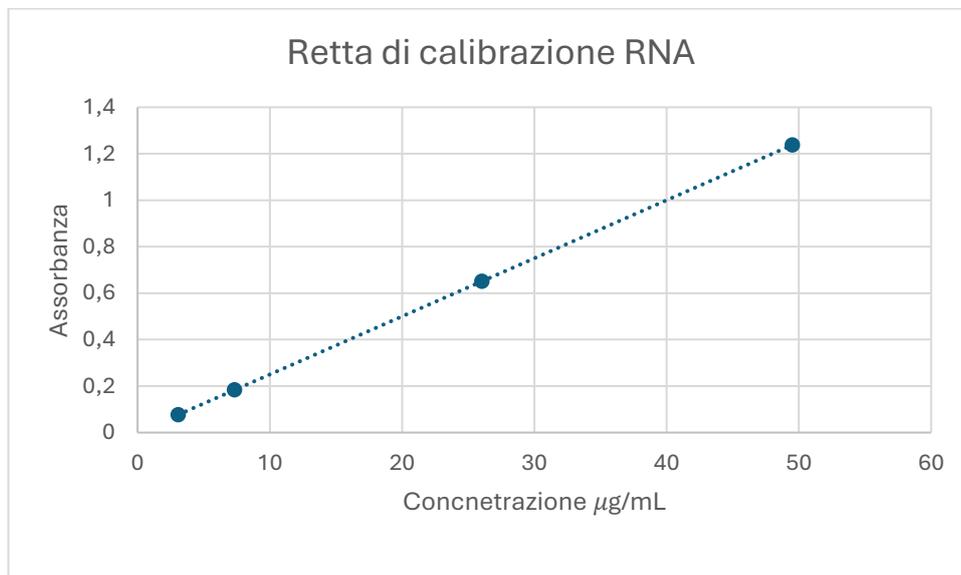


Figura 2.12: Retta di calibrazione RNA lettore multiwell

$$Abs = 0.025 C \quad (2.6)$$

dove Abs è il valore di assorbanza e C il valore di concentrazione in $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.6.5 Centrifugazione

Come detto nel paragrafo precedente 2.5.3, il processo di centrifugazione è stato eseguito per poter effettuare il calcolo di efficacia di incapsulamento tramite l'analisi del quantitativo di RNA presente nel surnatante.

La centrifugazione è stata eseguita a temperatura costante pari a 20°C: tramite un controllo della temperatura si evitano eventuali azioni degradative sugli acidi nucleici. La centrifuga utilizzata in laboratorio è *Heraeus Megafuge 8* della *Thermo Fisher Scientific*. Le provette Eppendorf sono state alloggiare all'interno del rotore ad angolo fisso *MicroClick 30x2*. Per garantire una separazione efficace tra le nanoparticelle e il surnatante si è lavorato ad una velocità pari a 16000 rpm per un tempo di 15 minuti.

Terminata la centrifugazione, le nanoparticelle di chitosano sono sedimentate sul fondo della provetta costituendo così il corpo di fondo (o *pellet*) che è stato separato dal surnatante e risospeso nuovamente in un volume di acqua, priva di nucleasi, introdotta in quantità tali da raggiungere un volume in Eppendorf pari a 1 mL. La separazione del surnatante dal *pellet* è stata eseguita tramite l'utilizzo di una micropipetta facendo attenzione a non aspirare il *pellet* contenente le nanoparticelle di chitosano.

2.6.6 Agitatore a disco rotante

Il agitatore a disco rotante analogico garantisce una miscelazione delicata ed efficace dei campioni. È costituito da un disco rotante di dimensione 220x300x310 mm che può compiere una rotazione che va da 0 giri al minuto fino ad 80 giri al minuto. Ha una capacità massima di carico di circa 2 kg. Il piatto presenta delle incisioni in cui è possibile inserire dei morsetti per provette da 2 mL, 15 mL e 50 mL (LLG Labware, s.d.). Tale strumento è stato adoperato per effettuare gli studi relativi al rilascio di RNA dalle nanoparticelle di chitosano sintetizzate.

2.6.7 Agitatore magnetico multiposizione

L'agitatore magnetico multiposizione è in grado di agitare il contenuto di fino a 15 becher. Per effettuare l'agitazione è sufficiente introdurre un magnetino all'interno del becher ospitante la soluzione che si vuole miscelare. È possibile modificare la velocità di agitazione regolando così i giri al minuto. Durante lo studio del rilascio è stato adoperato l'agitatore magnetico in alternativa al agitatore a disco rotante in modo da poter analizzare gli effetti che differenti miscelazioni possono avere sui tempi e i modi di rilascio.

2.7 Studio del rilascio di RNA da nanoparticelle di chitosano

Per condurre uno studio relativo al rilascio di RNA da nanoparticelle di chitosano, ciascun campione di nanoparticelle dopo il processo di sintesi è stato sottoposto a centrifugazione a 16000 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente in modo da poterle separare dal *buffer* acido di sintesi e re-disperderle nella soluzione scelta. Per effettuare il rilascio, infatti, le nanoparticelle sono state introdotte in soluzioni differenti. In particolare, le nanoparticelle sintetizzate con una concentrazione di chitosano allo 0.02% e 10 μ g di RNA sono state introdotte in 2 mL di tampone fosfato salino (PBS) a pH 7.4 e agitate tramite agitatore a disco rotante. Visto i risultati ottenuti si è deciso di proseguire lo studio del rilascio sostituendo il PBS con 2 mL di soluzione di acido acetico 1% e questa volta alcuni dei campioni sono stati agitati tramite agitatore magnetico multiposizione, altri con l'agitatore a disco rotante al fine di analizzare l'influenza che il tipo di miscelazione ha su tempi e

modi di rilascio. Ad un certo punto, per osservare l'effetto che il volume della soluzione ha sul processo di rilascio, sono stati addizionati ad un campione agitato tramite agitatore magnetico multiposizione, già immerso da circa 26 ore in 2 mL di acido acetico 1%, altri 2 mL di acido acetico 1% fresco raggiungendo così un volume complessivo pari a 4 mL. Si è poi proseguito lo studio immergendo in 4 mL di acido acetico all'1% nuove nanoparticelle sintetizzate con chitosano allo 0.02% e incorporanti alcune 10 μg di RNA e altre 30 μg , agitandole tramite agitatore magnetico multiposizione.

Per tutte le condizioni operative sopra citate lo studio del rilascio è stato eseguito effettuando dai prelievi dei vari campioni a tempi prestabiliti, i quali sono stati poi analizzati allo spettrofotometro per determinare il valore di assorbanza a 260 nm. Dal valore di assorbanza è stato possibile risalire al quantitativo in massa di RNA rilasciato nel tempo. I campioni sono stati inoltre sottoposti ad un'analisi dimensionale (DLS) in modo da monitorare le dimensioni delle nanoparticelle nel tempo e come quest'ultime potessero essere influenzate dalla modalità di agitazione e dalla tipologia e volume di solvente utilizzati.

Tabella 2.4: Modalità di agitazione, tipologia e volume di solvente adottati nell'eseguire le varie prove di rilascio di RNA da nanoparticelle di chitosano

Modalità di agitazione	Solvente	Volume solvente
Agitatore a disco rotante	PBS	2 mL
Agitatore a disco rotante	Acido acetico 1%	2 mL
Agitatore magnetico multiposizione	Acido acetico 1%	2 mL
Agitatore magnetico multiposizione	Acido acetico 1%	4 mL

3 Sintesi di nanoparticelle di chitosano

3.1 Sintesi di nanoparticelle a diverse concentrazioni di chitosano

Durante la prima fase dello studio sperimentale si è voluto analizzare il comportamento delle nanoparticelle in termini dimensionali e di potenziale zeta al variare della percentuale di chitosano disciolta nel solvente.

La sintesi delle nanoparticelle di chitosano è stata condotta seguendo la procedura riportata nel paragrafo 2.5 e dunque seguendo la tecnica di nanoprecipitazione tramite miscelatore *Vortex*.

Sono state preparate 5 diverse soluzioni contenenti chitosano a diversi valori di concentrazione pari a 0.02%; 0.025%; 0.05%; 0.1% e 0.2%. Inoltre, per ogni concentrazione di chitosano sono stati preparati 3 diversi campioni in modo da poter lavorare con più repliche.

Ciascun campione ottenuto è stato analizzato allo *ZetaSizer* ed è stata fatta la media dei valori di dimensione e di potenziale zeta di ogni campione, avente stessa concentrazione di chitosano, restituiti dallo strumento.

Tabella 3.1: Dimensione media delle nanoparticelle al variare della concentrazione di chitosano

Chitosano	Dimensione media, nm
0.020%	510.5± 162.6
0.025%	550.5±69.6
0.050%	702.3±149.8
0.1%	915.8±97.9
0.2%	979.4±34.4

In Tabella 3.1 sono riportati i valori di dimensione media accompagnati dalla banda di variazione del valore minimo e massimo trovato per ogni concentrazione di chitosano.

Dall'analisi dimensionale dei vari campioni al DLS si evince che a parità di procedura di sintesi, all'aumentare della percentuale di chitosano nella soluzione di partenza il valore dimensionale medio delle nanoparticelle aumenta.

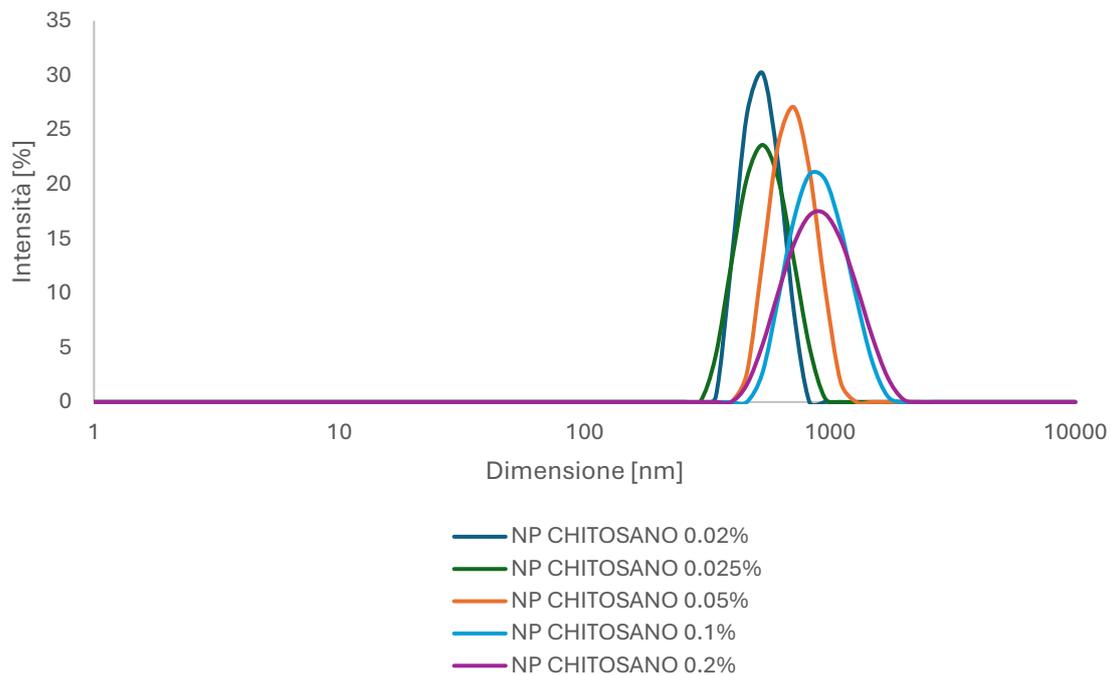


Figura 3.1: Confronto delle varie distribuzioni granulometriche di nanoparticelle con diversa concentrazione di chitosano nella soluzione di partenza

La Figura 3.1 mostra la distribuzione granulometrica delle varie nanoparticelle al variare della concentrazione di chitosano nella soluzione di partenza. Si può osservare che all'aumentare della concentrazione le curve distributive tendono a spostarsi verso valori dimensionali maggiori e l'ampiezza delle curve tende a diventare maggiore, con picchi che raggiungono valori di intensità più bassi.

Tabella 3.2: Potenziale ζ medio delle nanoparticelle al variare della concentrazione di chitosano

Chitosano	Potenziale ζ medio, mV
0.020%	7.3± 7.7
0.025%	3.9±3.4
0.050%	5.5±5.9
0.1%	3.5±2.1
0.2%	1.1±1.06

Come si può notare dalla Tabella 3.2, le nanoparticelle che hanno restituito un valore maggiore di potenziale ζ , sono quelle ottenute a partire da una concentrazione di chitosano pari a 0.02% disciolta in soluzione solvente. In generale, si è registrato una diminuzione del potenziale ζ all'aumentare della concentrazione di chitosano nella soluzione di partenza, simbolo di una potenziale maggiore instabilità delle nanoparticelle; infatti, più il valore del potenziale ζ è vicino a valori positivi pari a +30 o a valori negativi pari a -30, minore è la tendenza delle particelle ad aggregarsi.

3.2 Sintesi di nanoparticelle di chitosano incorporanti RNA

La fase successiva dello studio ha previsto l'introduzione di RNA durante la sintesi di NP di chitosano.

Dallo studio relativo alla sintesi di nanoparticelle di chitosano senza RNA si è individuato che la concentrazione di chitosano (CS) nella soluzione di partenza, che ha restituito i valori di dimensione media più bassi e potenziale ζ maggiore, è pari allo 0.02%. Anche secondo gli studi riportati da (Puccio, 2024) le dimensioni delle nanoparticelle aumentano all'aumentare della concentrazione di chitosano disciolta nella soluzione solvente. In particolare, le concentrazioni di chitosano nella soluzione solvente e i rapporti di RNA/CHITOSANO, adottati da (Puccio, 2024) sono i seguenti:

- Caso 1: 0.5 g/L Chitosano – 30 μg RNA (RNA/Chitosano: 0.12)
- Caso 2: 0.5 g/L Chitosano – 10 μg RNA (RNA/Chitosano: 0.04)
- Caso 3 :0.5 g/L Chitosano – 75 μg RNA (RNA/Chitosano: 0.3)
- Caso 4: 0.2 g/L Chitosano – 30 μg RNA (RNA/Chitosano: 0.30)
- Caso 5: 0.2 g/L Chitosano – 10 μg RNA (RNA/Chitosano: 0.1)

Si è scelto quindi di lavorare con una concentrazione di chitosano più bassa, pari a 0.02%, e con differenti quantitativi di RNA (2.3 μg e 0.72 μg) ottenendo così dei rapporti di RNA/CHITOSANO pari a 0.014 e 0.046. Si è deciso di lavorare con quantitativi di RNA più bassi rispetto a quelli utilizzati nel lavoro di Tesi di (Puccio, 2024) al fine di analizzare come potesse cambiare l'efficacia di incapsulamento e la stabilità delle nanoparticelle al variare del quantitativo di RNA utilizzato.

Le nanoparticelle sintetizzate sono state sottoposte a centrifugazione a 16000 rpm per 15 minuti a 20°C al fine di valutare l'efficacia di incapsulamento di RNA secondo il metodo indiretto descritto nel paragrafo 1.4.2. Infatti, tramite centrifugazione è possibile separare l'RNA non legato alle nanoparticelle, che si ritrova nel surnatante, dalle nanoparticelle incorporanti l'RNA che precipitano come corpo di fondo. Nel mentre è stata condotta un'analisi dimensionale e del potenziale ζ prima e dopo il processo di centrifugazione che ha permesso di ottenere delle informazioni relative alla dimensione media delle nanoparticelle e alla loro stabilità.

Tabella 3.3: Dimensione media delle nanoparticelle con concentrazione di chitosano nella soluzione solvente pari a 0.02% e rapporto RNA/CHITOSANO pari a 0.014 e 0.046 prima del processo di centrifugazione

NO centrifuga	Dimensione media, nm
CS=0.02%; RNA/CS=0.046	543.0 \pm 55.1
CS=0.02%; RNA/CS=0.014	710.0 \pm 40.9

Tabella 3.4: Dimensione media delle nanoparticelle con concentrazione di chitosano nella soluzione solvente pari a 0.02% e rapporto RNA/CHITOSANO pari a 0.014 e 0.046 dopo il processo di centrifugazione

Corpo di fondo risospeso in acqua	Dimensione media, nm
CS=0.02%; RNA/CS=0.046	990.9 \pm 14.4
CS=0.02%; RNA/CS=0.014	1254.0 \pm 13.0

In Tabella 3.3 e in Tabella 3.4 sono riportati rispettivamente i valori dimensionali delle nanoparticelle prima e post centrifugazione per ciascun rapporto RNA/CHITOSANO

investigato, ovvero 0.046 e 0.014. Si può osservare che in seguito al processo di centrifugazione la dimensione media delle nanoparticelle aumenta in maniera considerevole come conseguenza del fenomeno di aggregazione.

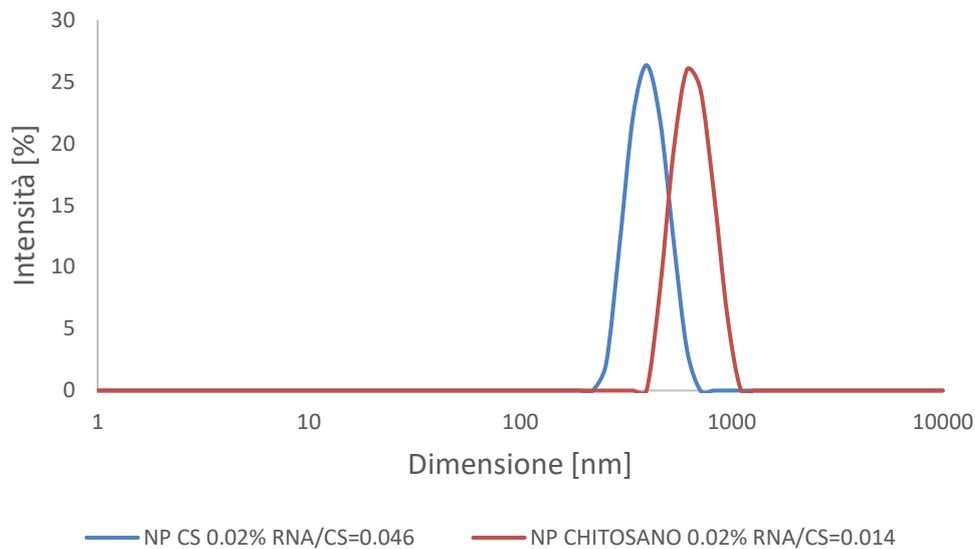


Figura 3.2: Confronto della distribuzione granulometrica delle nanoparticelle di chitosano ottenute a partire da una concentrazione pari allo 0.02% nella soluzione solvente e diversi rapporti di RNA/CHITOSANO pari a 0.014 e 0.046 prima del processo di centrifugazione

La Figura 3.2 riporta gli andamenti delle curve distributive dimensionali, prima del processo di centrifugazione, delle nanoparticelle sintetizzate con la stessa concentrazione di chitosano pari allo 0.02% nella soluzione solvente, ma con rapporti RNA/CHITOSANO differenti e pari a 0.046 e 0.014. Si nota come le curve tendano a spostarsi verso valori dimensionali maggiori al diminuire dei rapporti RNA/CHITOSANO. Nel caso del lavoro di Tesi di (Puccio, 2024), invece, a parità di concentrazione di chitosano disciolta in soluzione solvente, le nanoparticelle hanno mostrato una dimensione media maggiore all'aumentare del quantitativo di RNA introdotto.

In seguito al processo di centrifugazione, le nanoparticelle di chitosano hanno aumentato le dimensioni in maniera significativa. Tuttavia, il processo di centrifugazione non è uno *step* che rientra tra le varie fasi di sintesi delle nanoparticelle polimeriche di chitosano, ma è un'operazione che è stata eseguita solo al fine di valutare l'efficacia di incapsulamento. Di conseguenza l'aumento dimensionale osservato non risulta essere un problema da un punto di vista di stabilità delle nanoparticelle.

Tabella 3.5: Potenziale ζ delle nanoparticelle di chitosano ottenute a partire da una concentrazione pari allo 0.02% nella soluzione solvente e rapporto RNA/CHITOSANO pari a 0.014 e 0.046 prima del processo di centrifugazione

NO centrifuga	Potenziale ζ medio, mV
CS=0.02%; RNA/CS=0.014	4.4±4.9
CS=0.02%; RNA/CS=0.046	3.8±3.9

Per quanto riguarda il potenziale ζ si può osservare, come riportato in Tabella 3.5, che i valori di potenziale ζ delle nanoparticelle di chitosano incorporanti RNA sono più bassi rispetto a quelli delle nanoparticelle senza RNA, riportati in Tabella 3.2: Potenziale ζ medio delle nanoparticelle al variare della concentrazione di chitosano. Infatti, la presenza di RNA

avente gruppi fosfato con carica negativa induce ad un abbassamento della carica positiva tipica della superficie di chitosano che si riflette in una diminuzione del valore complessivo del potenziale ζ . Si può inoltre notare che all'aumentare di RNA introdotto nella fase di sintesi e, quindi, all'aumentare del rapporto RNA/CHITOSANO, i valori di potenziale ζ diminuiscono.

Tabella 3.6: Potenziale ζ delle nanoparticelle di chitosano ottenute a partire da una concentrazione pari allo 0.02% nella soluzione solvente e rapporto RNA/CHITOSANO pari a 0.014 e 0.046 dopo il processo di centrifugazione

Corpo di fondo risospeso in acqua	Potenziale ζ medio, mV
CS=0.02%; RNA/CS=0.014	20,2±13,3
CS=0.02%; RNA/CS=0.046	24.6±9.7

In Tabella 3.6: Potenziale ζ delle nanoparticelle di chitosano ottenute a partire da una concentrazione pari allo 0.02% nella soluzione solvente e rapporto RNA/CHITOSANO pari a 0.014 e 0.046 dopo il processo di centrifugazione sono riportati i valori di potenziale ζ dei *pellet* re-dispersi in acqua post centrifugazione e si nota un aumento rilevante dei valori per entrambi i campioni a diversi rapporti di RNA/CHITOSANO rispetto ai valori pre-centrifugazione riportati in Tabella 3.5.

Come spiegato in precedenza dopo aver studiato l'andamento delle dimensioni e il valore del potenziale zeta si è passati al calcolo dell'efficacia di incapsulamento. Da un'analisi allo spettrofotometro del surnatante, dei campioni di nanoparticelle con rapporto RNA/CHITOSANO pari a 0.014 e 0.046, si è ricavato il valore di OD₂₆₀, lunghezza d'onda a cui assorbe l'RNA. Dal valore di assorbanza è stato poi possibile risalire al quantitativo di RNA libero, correlabile a quello non incorporato dalle nanoparticelle, e quindi al calcolo dell'efficacia di incapsulamento seguendo il metodo indiretto riportato nel paragrafo 1.4.2, utilizzando l'equazione (1.1). Durante lo studio dell'efficacia, sono state eseguite in tutto due operazioni di centrifugazione a 16000 rpm per 15 minuti, 20°C.

Tabella 3.7: Valori di efficacia di incapsulamento di nanoparticelle di chitosano ottenute a partire da una concentrazione pari allo 0.02% in soluzione solvente e rapporto RNA/CHITOSANO pari a 0.014 e 0.046

Rapporto RNA/CHITOSANO	0.014	Rapporto RNA/CHITOSANO	0.046
CHITOSANO	0.02% (50 μ g)	CHITOSANO	0.02% (50 μ g)
RNA in Eppendorf [μ g]	0.724	RNA in Eppendorf [μ g]	2.3
RNA in surnatante 1° centrifugazione [μ g]	0.404	RNA in surnatante 1° centrifugazione [μ g]	1.11
Efficacia di incapsulamento [%] dopo 1° centrifugazione	44%	Efficacia di incapsulamento [%] dopo 1° centrifugazione	52%
RNA in surnatante 2° centrifugazione [μ g]	0.212	RNA in surnatante 2° centrifugazione [μ g]	0,82
Efficacia di incapsulamento [%] dopo 2° centrifugazione	71%	Efficacia di incapsulamento [%] dopo 2° centrifugazione	64%
Efficacia di incapsulamento [%] globale	15%	Efficacia di incapsulamento [%] globale	16%

I valori riportati in Tabella 3.7 mostrano che le nanoparticelle di chitosano hanno restituito un valore di efficacia globale molto simile e molto basso sia nel caso di rapporto RNA/CHITOSANO pari a 0.014 che in quello pari a 0.046.

Come verrà approfondito nel capitolo 4, nella seconda parte di attività sperimentale si è posta l'attenzione sullo studio di rilascio *in vitro* di RNA da nanoparticelle di chitosano. Da alcune analisi preliminari, come riportato nel paragrafo 4.3, è emersa la necessità di lavorare con un quantitativo di RNA superiore rispetto a quelli utilizzati sino ad ora. Le nuove nanoparticelle sintetizzate sono state caratterizzate da un quantitativo di chitosano pari a 0.02% nella soluzione solvente e quantità di RNA in massa pari a 10 μg e 30 μg e rapporto RNA/CHITOSANO pari rispettivamente a 0.2 e 0.6. Le nanoparticelle sintetizzate sono state poi sottoposte ad analisi dimensionale, potenziale ζ ed efficacia di incapsulamento.

Tabella 3.8: Dimensione media e potenziale ζ delle nanoparticelle con concentrazione di chitosano pari allo 0.02% nella soluzione solvente e rapporto RNA/CHITOSANO pari a 0.2 e 0.6 prima del processo di centrifugazione

	Dimensione media, nm	Potenziale ζ medio, mV
CS=0.02% e RNA/CS=0.2	396.06	4.78 \pm 1.1
CS=0.02% e RNA/CS=0.6	458.67	4.0 \pm 2.3

Dai dati riportati in Tabella 3.8 si osserva ancora una volta una diminuzione del potenziale ζ all'aumentare dei rapporti RNA/CHITOSANO e quindi all'aumentare di RNA introdotto al momento di sintesi delle nanoparticelle.

Tabella 3.9: Valori di efficacia di incapsulamento di nanoparticelle con concentrazione di chitosano pari allo 0.02% nella soluzione solvente e rapporto RNA/CHITOSANO pari a 0.2 e 0.6

Rapporto RNA/CHITOSANO	0.2	Rapporto RNA/CHITOSANO	0.6
CHITOSANO	0.02%	CHITOSANO	0.02%
RNA in Eppendorf [μg]	10	RNA in Eppendorf [μg]	30
RNA in surnatante 1° centrifugazione [μg]	0.416	RNA in surnatante 1° centrifugazione [μg]	2.6
Efficacia di incapsulamento [%] dopo 1° centrifugazione	95.84%	Efficacia di incapsulamento [%] dopo 1° centrifugazione	91.3%
RNA in surnatante 2° centrifugazione [μg]	0	RNA in surnatante 2° centrifugazione [μg]	1.74
Efficacia di incapsulamento [%] dopo 2° centrifugazione	100%	Efficacia di incapsulamento [%] dopo 2° centrifugazione	94.2%
Efficacia di incapsulamento [%] globale	95.84%	Efficacia di incapsulamento [%] globale	85.5%

La Tabella 3.9 mostra i valori di efficacia di incapsulamento che risultano maggiori rispetto ai rapporti di RNA/CHITOSANO pari a 0.014 e 0.046 riportati in Tabella 3.7.

4 Studio relativo al rilascio di RNA dalle nanoparticelle di chitosano

Prima di eseguire le prove di rilascio di RNA dalle nanoparticelle di chitosano è stato necessario svolgere degli studi preliminari.

In particolare, come descritto nel paragrafo 4.1, è stato analizzato lo spettro di assorbanza delle nanoparticelle con diversa concentrazione di chitosano e prive di RNA in modo da poter valutare come varia il valore di assorbanza a 260 nm delle nanoparticelle al variare della concentrazione di chitosano. Questo studio è stato fondamentale per la scelta del valore del bianco e quindi per eseguire una calibrazione dello spettrofotometro necessaria per la lettura dell'assorbanza del solo RNA rilasciato (analita di interesse), senza alcun contributo degli altri componenti presenti nel campione, dal momento che risulterebbe problematico andare ad avere un bianco esattamente corrispondente al sistema in studio.

Sono stati inoltre condotti altri studi al fine di osservare la variazione dello spettro di assorbanza nel caso in cui il campione fosse costituito solo da RNA o da RNA+ nanoparticelle a diversa concentrazione di chitosano (paragrafo 4.2). Questo studio ha restituito ulteriormente un'idea di quella che potesse essere l'influenza delle nanoparticelle nella lettura di assorbanza a 260 nm dei vari campioni.

Infine, si è voluto analizzare le diverse interazioni che si instaurano tra RNA, nanoparticelle e vari *buffer* (acqua libera di nucleasi, PBS pH 7.4, *buffer* pH 4.3). Per condurre tale studio sono state eseguite analisi spettrofotometriche e centrifugazioni come riportato nel paragrafo 4.3 e 4.4. Si è poi potuti passare allo studio del rilascio vero e proprio, i cui risultati sono illustrati nei paragrafi 4.5, 4.6 e 4.7.

4.1 NP a varie concentrazioni di chitosano senza RNA

Con l'obiettivo di analizzare come varia il valore di assorbanza a 260 nm al variare della concentrazione di chitosano nella soluzione solvente, a partire dalla quale sono state sintetizzate le nanoparticelle, sono stati preparati diversi campioni di nanoparticelle senza RNA e con concentrazione differente di chitosano:

1. Concentrazione di chitosano pari a 0.02% (50 μ g di chitosano);
2. Concentrazione di chitosano allo 0.06% (150 μ g di chitosano);
3. Concentrazione di chitosano pari a 0.1% (250 μ g di chitosano).

Tali campioni sono stati valutati allo spettrofotometro MultiSkan SkyHigh.

Tabella 4.1: Valori di assorbanza a 260 nm di nanoparticelle a diverse concentrazioni di chitosano nella soluzione solvente

CONTROLLLO	ABS 260 medio
NP senza RNA e chitosano= 0.02%	0.0913
NP senza RNA e chitosano= 0.06%	0.1930
NP senza RNA e chitosano= 0.1%	0.3293

Dai dati riportati in Tabella 4.1 si può osservare che all'aumentare della concentrazione di chitosano si ha un aumento del valore di assorbanza a 260 nm.

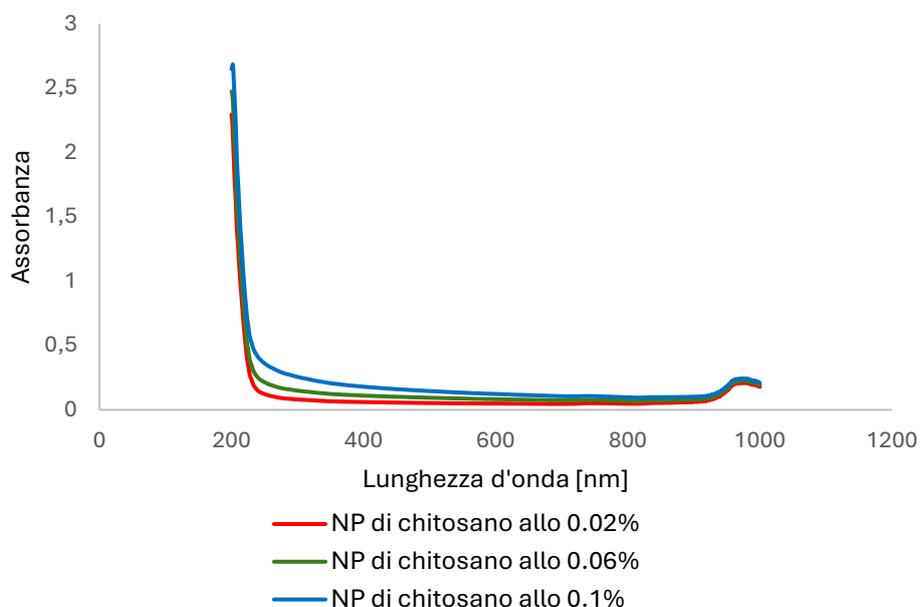


Figura 4.1: Spettri di assorbanza di nanoparticelle a diverse concentrazioni di chitosano nella soluzione solvente e senza RNA

La Figura 4.1 riporta gli spettri di assorbanza delle nanoparticelle al variare della concentrazione di chitosano introdotto nella soluzione solvente. Il valore di assorbanza a 260 nm aumenta all'aumentare della concentrazione percentuale del polimero così come riportato in Tabella 4.1.

È stata inoltre eseguita un'analisi dimensionale e del potenziale ζ dei vari campioni preparati.

Tabella 4.2: Dimensione media e potenziale ζ di nanoparticelle sintetizzate a diverse concentrazioni di chitosano nella soluzione solvente

	Dimensione media, nm	Abs 260 nm	Potenziale Zeta, mV
NP chitosano 0.02% senza RNA	421.3	0.0913	5.03
NP chitosano 0.06% senza RNA	893.4	0.193	2.17
NP chitosano 0.1% senza RNA	1170.3	0.3293	1.16

In Tabella 4.2 sono riportati i valori di dimensione media, assorbanza a 260 nm e potenziale zeta al variare della concentrazione di chitosano. I valori di dimensione media e assorbanza tendono ad aumentare all'aumentare del polimero. Inoltre, con l'aumento delle dimensioni delle nanoparticelle, cresce la probabilità di aggregazione a causa di un incremento delle forze attrattive. Questo fenomeno riduce la stabilità delle particelle e ciò si riscontra in una diminuzione del potenziale zeta, che ha appunto un andamento opposto rispetto alle dimensioni.

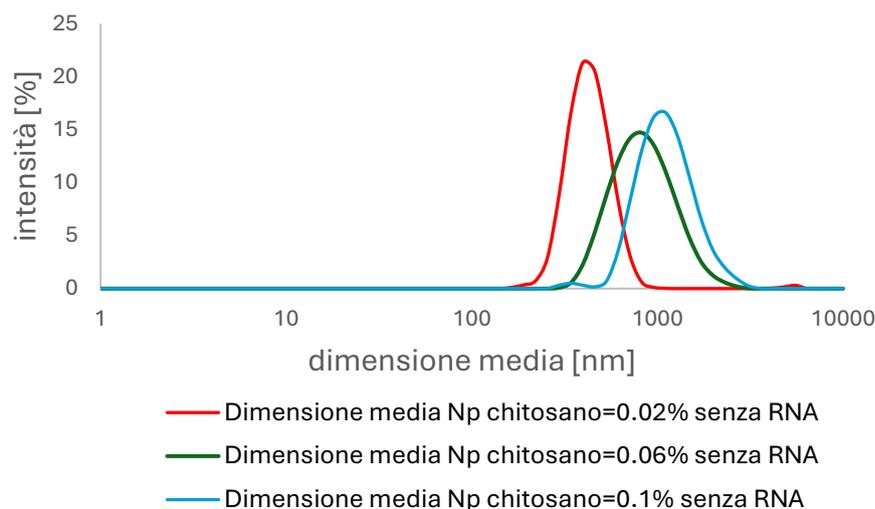


Figura 4.2: Confronto della distribuzione granulometrica delle nanoparticelle preparate a diverse concentrazioni di chitosano nella soluzione solvente

La Figura 4.2 mostra gli andamenti della distribuzione granulometrica al variare della concentrazione di chitosano. I dati ottenuti sono conformi a quelli analizzati nel paragrafo 3.1, dove sono state analizzate le dimensioni di nanoparticelle senza RNA preparate utilizzando cinque diverse concentrazioni di chitosano (0.02%; 0.025%; 0.05%; 0.1% e 0.2%). I risultati mostrano un aumento della dimensione media all'aumentare della concentrazione di chitosano disciolto nella soluzione solvente e una diminuzione del potenziale ζ all'aumentare della concentrazione del polimero.

4.2 Addizione di RNA a NP con differente concentrazione di chitosano

Per poter studiare ancora una volta quanto il chitosano potesse influenzare sulla lettura di assorbanza a 260 nm, sono stati preparati diversi campioni alcuni contenenti solo RNA, altri RNA addizionato a nanoparticelle sintetizzate con diversa concentrazione di chitosano e altri ancora contenenti solo nanoparticelle di chitosano senza RNA. In tutti i campioni contenenti RNA questo è stato introdotto mantenendo sempre la stessa concentrazione. Le diluizioni dei vari campioni sono state effettuate con il *Buffer*. Per *Buffer* si intende la soluzione costituita da 250 μL di acetato di sodio e 250 μL di solfato di sodio, ovvero le soluzioni di sintesi delle nanoparticelle.

Sono stati, dunque, preparati 5 campioni con la seguente composizione:

1. 4.48 μg di RNA+285 μL di *Buffer* (diluizione RNA in *buffer* 1:20)
2. 4.48 μg di RNA+ 285 μL di nanoparticelle con concentrazione di chitosano allo 0.02% nella soluzione solvente (diluizione RNA in *buffer* 1:20)
3. 4.48 μg di RNA+ 285 μL di nanoparticelle con concentrazione di chitosano allo 0.05% nella soluzione solvente (diluizione RNA in *buffer* 1:20)
4. 15 μL di *Buffer*+ 285 μL di nanoparticelle con con concentrazione di chitosano allo 0.02% nella soluzione solvente
5. 15 μL di *Buffer*+ 285 μL di nanoparticelle con con concentrazione di chitosano allo 0.05% nella soluzione solvente

Tabella 4.3: Valori di assorbanza a 260 nm ottenuti nei campioni preparati con solo RNA, con RNA addizionato a nanoparticelle con concentrazioni di chitosano nella soluzione solvente pari allo 0.02% o pari allo 0.05% e con nanoparticelle con concentrazione di chitosano nella soluzione solvente pari a 0.02% o a 0.05% diluite nel *buffer*

	RNA	RNA+NP di CS allo 0.02%	RNA+NP di CS allo 0.05%	NP di CS allo 0.02% diluito con Buffer	NP di CS allo 0.05% diluito con Buffer
Abs 260 nm	0.8621	0.962	1.0291	0.1107	0.1703

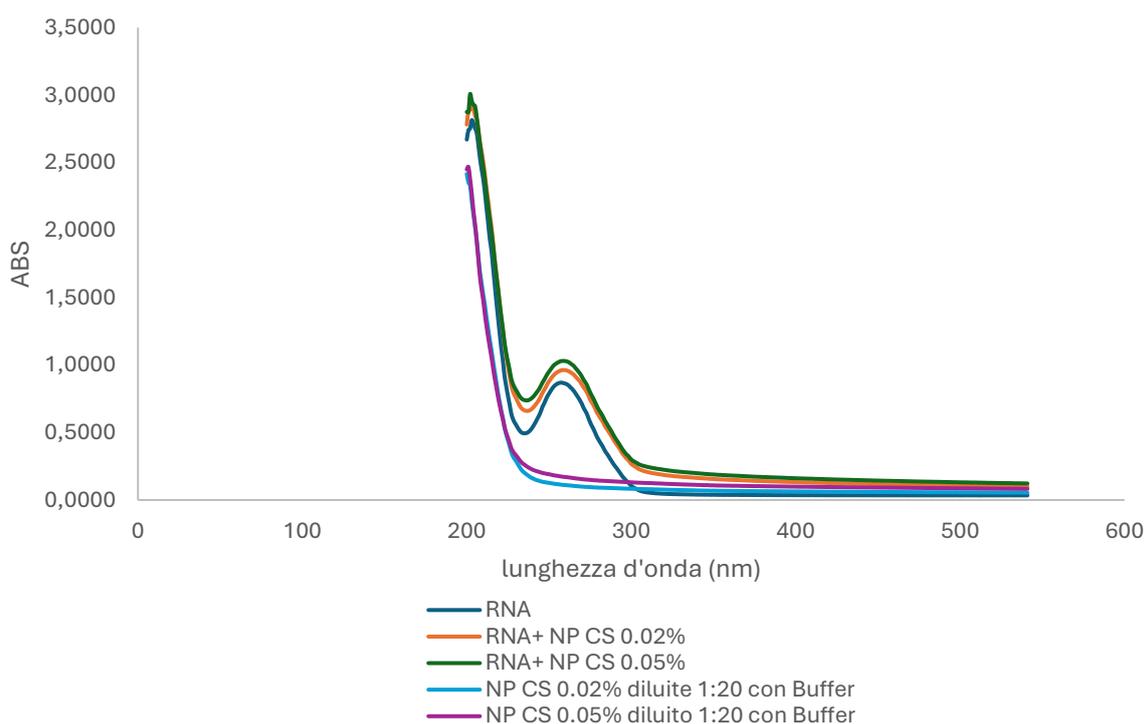


Figura 4.3: Confronto tra gli spettri di assorbanza a 260 nm dei campioni preparati con: solo RNA, RNA addizionato a nanoparticelle con concentrazioni di chitosano nella soluzione solvente pari allo 0.02% o pari allo 0.05% e campioni di nanoparticelle con concentrazione di chitosano nella soluzione solvente pari a 0.02% o a 0.05% diluite nel *buffer*

In Tabella 4.3 e in Figura 4.3 sono riportati rispettivamente i valori di assorbanza a 260 nm e gli spettri di assorbanza di nanoparticelle con concentrazione di chitosano nella soluzione solvente pari a 0.02% o a 0.05% e diluite nel *buffer* di sintesi, di solo RNA e di RNA addizionato a nanoparticelle con concentrazione di chitosano nella soluzione solvente pari a 0.02% o a 0.05%. Dai risultati riportati in Tabella 4.3 e in Figura 4.3 si può osservare come, nonostante la concentrazione di RNA introdotto nei vari campioni sia sempre la stessa, il valore di assorbanza a 260 nm aumenti nei campioni in cui l'RNA è addizionato a nanoparticelle di chitosano rispetto a quando l'RNA è presente in campioni contenenti solo il *buffer*. Da ciò si deduce che la soluzione di nanoparticelle di chitosano ha un'influenza sulla lettura di assorbanza a 260 nm. Si può, inoltre, notare come i campioni costituiti da RNA addizionato a nanoparticelle ottenute a partire da una soluzione con concentrazione di chitosano disciolto in soluzione solvente pari a 0.05% abbiano restituito

dei valori di assorbanza maggiori, pari a 0.1703, rispetto a quelli preparati con nanoparticelle ottenute a partire da una soluzione con concentrazione di chitosano inferiore e pari a 0.02% che hanno registrato un valore di OD₂₆₀ pari a 0.9620. Inoltre, se si sottrae il valore ottenuto con NP CS diluite con *buffer* dai corrispondenti campioni contenenti RNA si ottiene un valore di assorbanza corrispondente a quello del campione costituito da solo RNA. Questo risultato è coerente con i valori riportati in Tabella 4.1 in cui si evidenzia un aumento di assorbanza a 260 nm all'aumentare della concentrazione di chitosano disciolto in soluzione solvente a partire dalla quale sono state sintetizzate le nanoparticelle. Dalla Figura 4.3 si evince anche che il contributo delle nanoparticelle è piccolo rispetto a quello dell'RNA, scarsamente influenzato dalla concentrazione di chitosano nella soluzione solvente.

4.3 Analisi dell'interazione tra RNA, nanoparticelle e buffer

Tramite analisi spettrofotometrica si è voluto investigare l'effetto che i diversi *buffer* in cui vengono sospese le nanoparticelle e l'RNA hanno sulla lettura di assorbanza a 260 nm.

La prima analisi è stata eseguita su nanoparticelle con concentrazione di chitosano nella soluzione solvente pari a 0.02% disperse nel *buffer* acido di sintesi (250 μ L di acetato di sodio, 250 μ L di solfato di sodio e 500 μ L di acqua priva di nucleasi) e addizionate con RNA pari a 0.5 μ g e 1 μ g. Le nanoparticelle, prima di essere addizionate con RNA, non sono state rimosse dal *buffer* acido di sintesi, ma sono rimaste sospese nella soluzione di sintesi il cui volume è pari ad 1 mL.

Sono stati preparati quindi i seguenti campioni contenenti:

1. **CONTROLLO:** Nanoparticelle di chitosano senza RNA (soluzione pari ad 1 mL);
2. **NP+0.5 μ g RNA:** Nanoparticelle di chitosano (soluzione pari ad 1 mL)+0.5 μ g RNA;
3. **NP+1 μ g RNA:** Nanoparticelle di chitosano (soluzione pari ad 1 mL) + 1 μ g RNA;

Tabella 4.4: Valori di OD₂₆₀ del controllo e di nanoparticelle con concentrazione di chitosano nella soluzione solvente pari allo 0.02% e addizionate con diversi quantitativi di RNA prima e dopo il processo di centrifugazione

PRIMA DELLA CENTRIFUGAZIONE	
CAMPIONE	Abs 260 nm
CONTROLLO	0.1058
NP+0.5 μ g RNA	0.1266
NP+1 μ g RNA	0.1314
POST CENTRIFUGAZIONE: 16000 rpm, 15 min, 20°C	
CAMPIONE	
Surnatante CONTROLLO 1	0.0645
Surnatante NP+0.5 μ g RNA	0.0688
Surnatante NP+1 μ g RNA	0.0678
Surnatante NP+1 μ g RNA	0.0645

Dai risultati ottenuti e riportati in Tabella 4.4 si evince che le nanoparticelle a cui è stato addizionato RNA restituiscono valori di assorbanza a 260 nm maggiori rispetto a quelle prive di RNA. Tuttavia, non si nota una differenza di assorbanza significativa tra le nanoparticelle addizionate con un quantitativo di RNA maggiore, il cui OD₂₆₀ è pari a 0.1314, e quelle che ne contengono meno, ovvero la metà, che presentano un OD₂₆₀ di 0.1266.

Da qui si deduce che per effettuare uno studio relativo al rilascio di RNA da nanoparticelle di chitosano sarebbe opportuno lavorare con quantitativi di RNA superiori in modo da ottenere un'assorbanza di RNA che sia distinguibile da quella dovuta alle nanoparticelle.

Nel caso di nanoparticelle di chitosano addizionate con 0,5 μg , calcolando la concentrazione, a partire dai valori di assorbanza letti in Tabella 4.4, risulta un quantitativo di RNA in massa leggermente maggiore di quello introdotto. Questo potrebbe essere attribuito al valore di assorbanza del controllo (bianco), utilizzato per il calcolo del quantitativo in massa di RNA secondo le equazioni (4.1) e (4.2), il quale presenta sempre una certa variabilità per ogni sintesi eseguita.

$$C_{\text{RNA}_{\text{NP}+0.5 \mu\text{g}}} = (0,1266 - 0,1058) * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 0,832 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} (0,5 \mu\text{g}); \quad (4.1)$$

$$C_{\text{RNA}_{\text{NP}+1 \mu\text{g}}} = (0,1314 - 0,1058) * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 1,024 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} (1,0 \mu\text{g}); \quad (4.2)$$

I campioni preparati sono poi stati sottoposti ad una centrifugazione a 16000 rpm per 15 minuti a 20°C e si è eseguita una nuova lettura allo spettrofotometro del surnatante recuperato da ciascun campione.

Dai valori di assorbanza a 260 nm post centrifuga riportati in Tabella 4.4 sembra come se l'RNA non fosse presente nel surnatante. È stato infatti calcolato il quantitativo di RNA nel surnatante tramite le equazioni (4.3) e (4.4).

$$C_{\text{RNA}_{\text{NP}+0.5 \mu\text{g}}} = (0,0688 - 0,0645) * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 0,172 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \quad (4.1)$$

$$C_{\text{RNA}_{\text{NP}+1 \mu\text{g}}} = (0,0678 - 0,0645) * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 0,132 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \quad (4.2)$$

I dati ottenuti potrebbero essere giustificati dall'impossibilità di valutare allo spettrofotometro concentrazioni così basse; infatti, tramite retta di taratura è risultato necessario avere un OD₂₆₀ minimo pari a 0.0700, oppure da un'interazione elettrostatica tra chitosano e RNA che potrebbe determinare la precipitazione dell'RNA con le nanoparticelle. Prima della centrifugazione, la presenza di RNA è stata rilevata tramite spettrofotometro, in accordo con le equazioni (4.1) e (4.2), che indicano una concentrazione di RNA corrispondente a quella introdotta nei campioni. Questo risultato è inoltre confermato dalle curve (pre-centrifuga) riportate in Figura 4.3, le quali evidenziano un picco a 260 nm.

Visto i risultati dell'analisi precedente si è voluto aumentare il quantitativo di RNA introdotto in ciascun campione. È stata dunque valutata l'interazione di 10 μg di RNA addizionato a diverse soluzioni e a nanoparticelle con concentrazione di chitosano (0.02%) in soluzione solvente.

In particolare, sono state preparate le seguenti sospensioni:

1. 1 ml di acqua libera di nucleasi + 10 μg RNA;
2. PBS pH 7.4 + 10 μg RNA;

3. *Buffer* pH 4.3 + 10 μg RNA;
4. NP di chitosano (non rimosse dal *buffer* acido di sintesi) + 10 μg RNA;
5. CONTROLLO: Nanoparticelle di chitosano senza RNA (non rimosse dal *buffer* acido di sintesi);
6. CONTROLLO: Nanoparticelle di chitosano senza RNA (non rimosse dal *buffer* acido di sintesi);

Le sospensioni elencate nei punti 5 e 6 sono identiche e costituiscono due repliche. Per *Buffer* pH 4.3 si intende una soluzione preparata esattamente come al *buffer* acido di sintesi in cui vengono sintetizzate le nanoparticelle durante il processo di nanoprecipitazione.

Tabella 4.5: Valori di assorbanza a 260 nm di 10 μg di RNA addizionati a varie soluzioni; a tali valori non sono stati sottratti i valori di assorbanza dei relativi bianchi, riportati nella stessa Tabella

PRIMA DELLA CENTRIFUGA	
CAMPIONE	ABS 260 nm
1 ml di acqua libera di nucleasi + 10 μg RNA	0.2782
PBS pH 7.4 + 10 μg RNA	0.2383
<i>Buffer</i> pH 4,3 + 10 μg RNA	0.3653
NP di CS in <i>buffer</i> di sintesi + 10 μg RNA	0.3993
NP di CS in <i>buffer</i> di sintesi senza RNA	0.0918
VALORE DEI BIANCHI	ABS 260 nm
Acqua libera di nucleasi	0.0650
PBS pH 7.4	0.0686
<i>Buffer</i> pH 4,3	0.0720
NP di CS in <i>buffer</i> di sintesi	0.0918

Dalla valutazione spettrofotometrica, i cui dati sono stati riportati in Tabella 4.5, si evince che:

1. le particelle di chitosano hanno un'influenza nella lettura di assorbanza pari a:

$$Abs_{260} = 0.3993 - 0.3653 = 0.034 \quad (4.3)$$
2. vi è una netta differenza di assorbanza tra le nanoparticelle senza RNA e le nanoparticelle di chitosano/soluzioni addizionate di RNA;
3. a partire dai valori di assorbanza del campione e del corrispondente bianco, tramite l'equazione (4.6), è possibile calcolare il quantitativo di RNA presente nel campione. Tuttavia, questo valore risulta leggermente superiore a quello effettivamente introdotto. Tale discrepanza è attribuibile alla variabilità associata al valore di assorbanza del bianco, che può variare in funzione di ogni sintesi eseguita.

$$C_{\text{RNANP}+34\mu\text{L}} = (0,3993 - 0,0918) * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 12,3 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}; \quad (4.4)$$

I campioni sono poi stati sottoposti a centrifugazione (16000 rpm per 15 minuti) per poter analizzare ancora una volta i valori di assorbanza dei surnatanti e dei *pellet* così da determinare la distribuzione del quantitativo di RNA tra le due frazioni.

Tabella 4.6: Valori di assorbanza a 260 nm di 10 μg di RNA addizionati a nanoparticelle con concentrazione di chitosano nella soluzione solvente pari allo 0.02%, sottoposti a centrifugazione. I *pellet* ottenuti sono stati re-dispersi in acqua o in *buffer* acido di sintesi.

POST CENTRIFUGA 16000 rpm, 15 min, 20°C	
CAMPIONE	ABS 260 nm
Surnatante NP+RNA	0.0848
Surnatante del controllo	0.0655
<i>Pellet</i> re-disperso in acqua	0.0691
<i>Pellet</i> re-disperso in <i>BUFFER</i> pH 4.3	0.0703
<i>Pellet</i> controllo re-disperso in acqua	0.0643

Dai valori di assorbanza a 260 nm ottenuti post centrifuga e riportati in Tabella 4.6 si evince che:

1. Anche questa volta, l'RNA sembra non essere presente nel surnatante, come nel caso riportato dalle equazioni (4.3) e (4.4). Infatti, il quantitativo rilevato nel surnatante è di solo 0.772 μg , un valore minore rispetto a quello inizialmente addizionato (10,0 μg):

$$C_{\text{RNA}_{\text{surnatante}}} = (0,0848 - 0,0655) * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 0,772 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}; \quad (4.5)$$

2. Non si riesce ad individuare la presenza di RNA neanche al variare della soluzione utilizzata per re-disperdere il *pellet* (acqua e *buffer*):

$$C_{\text{RNA}_{\text{pellet in acqua}}} = (0,0691 - 0,0643) * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 0,192 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}; \quad (4.6)$$

$$C_{\text{RNA}_{\text{pellet in buffer}}} = (0,0703 - 0,0643) * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 0,240 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}; \quad (4.7)$$

3. La concentrazione di RNA introdotta è di nuovo leggermente superiore:

$$C_{\text{RNANP}+10\mu\text{g}} = (0,3993 - 0,0918) * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 12,3 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} (10,0 \mu\text{g}); \quad (4.8)$$

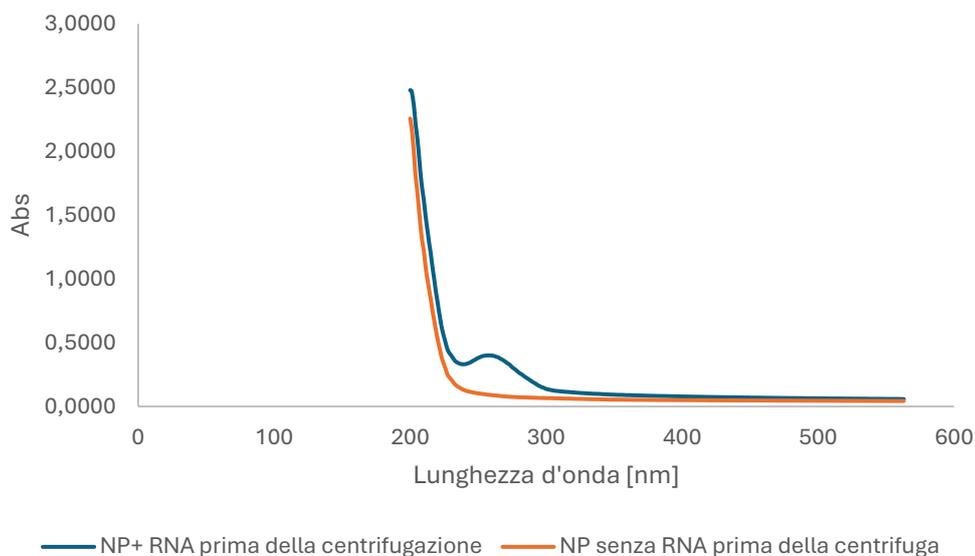


Figura 4.4: Confronto tra gli spettri di assorbanza di nanoparticelle con concentrazione di chitosano nella soluzione solvente pari a 0.02% senza RNA e di nanoparticelle di chitosano nella soluzione solvente pari a 0.02% addizionate con 10 μg di RNA, prima del processo di centrifugazione

La Figura 4.4 mostra un confronto tra gli spettri di assorbanza delle nanoparticelle senza RNA e le nanoparticelle addizionate con 10 μg di RNA prima del processo di centrifugazione. Si osserva un valore di assorbanza a 260 nm maggiore nel caso di nanoparticelle addizionate con RNA dovuto appunto alla presenza di RNA in soluzione.

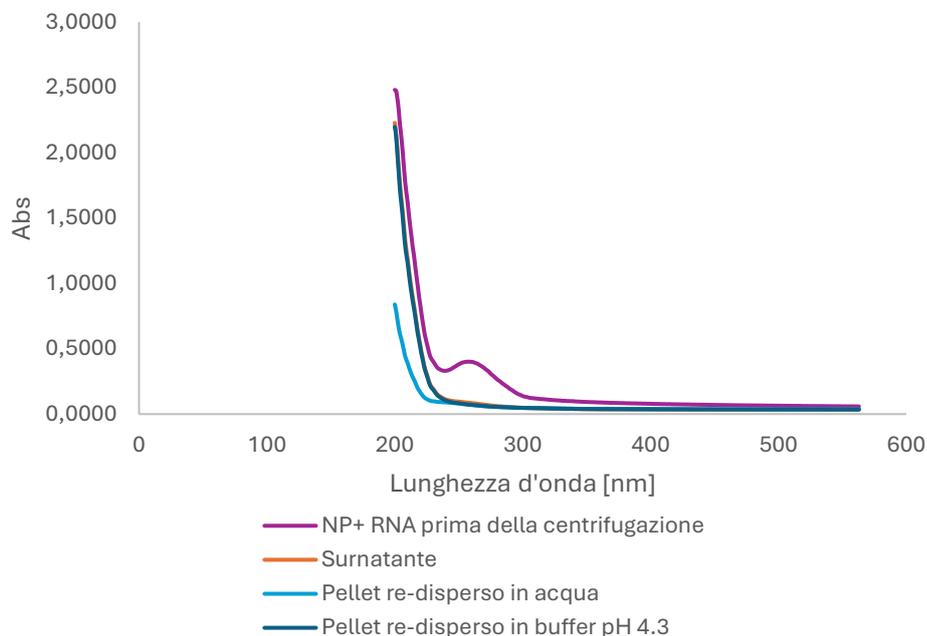


Figura 4.5: Confronto tra gli spettri di assorbanza di nanoparticelle con concentrazione di chitosano nella soluzione solvente pari allo 0.02% addizionate con RNA prima della centrifugazione, del *pellet* re-disperso in acqua, del *pellet* re-disperso in *buffer* e del surnatante ottenuti post centrifugazione.

Con la Figura 4.5 sono stati rappresentati gli spettri di assorbanza delle nanoparticelle addizionate con 10 μg di RNA prima del processo di centrifugazione e del surnatante

e delle sospensioni dei *pellet* post centrifuga. In particolare, post centrifuga, un *pellet* è stato re-disperso in acqua e l'altro in buffer. Dalla Figura 4.5 si nota una sovrapposizione tra la curva del surnatante e quelle delle sospensioni dei *pellet* e un'assenza di picchi di assorbanza in corrispondenza di 260 nm come se la lettura dell'RNA venisse in qualche modo influenzata. Si è così ipotizzato che il *buffer* di sintesi, in cui le nanoparticelle si ritrovano sospese post sintesi, potesse in qualche modo influenzare la lettura allo spettrofotometro. Il *buffer* acido di sintesi è costituito da acetato di sodio 0.1M pH=4, solfato di sodio 0.1 M, introdotti in uguale quantità, e da un volume d'acqua pari al volume complessivo di acetato di sodio + solfato di sodio.

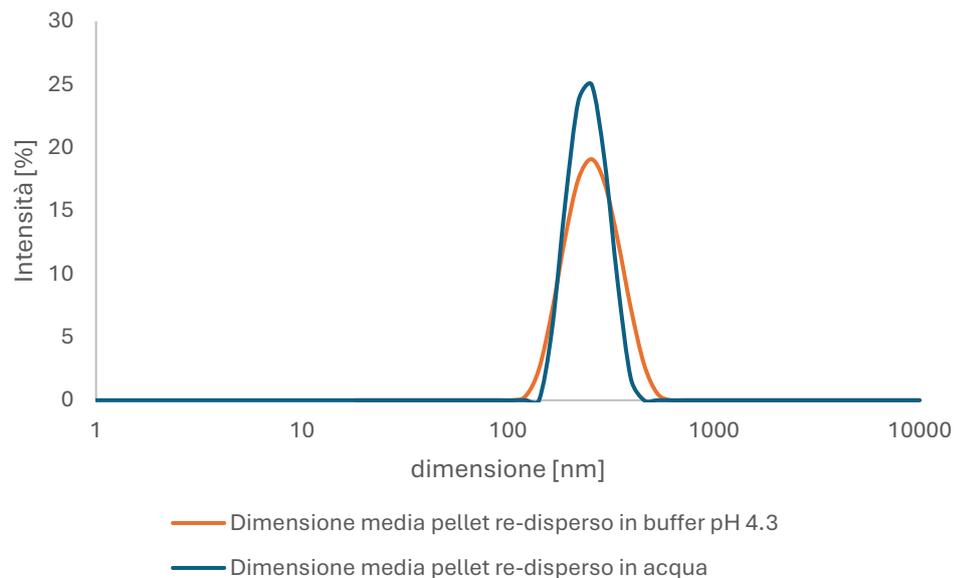


Figura 4.6: Confronto della dimensione media delle sospensioni dei *pellet* re-dispersi uno in *buffer* e l'altro in acqua, post centrifugazione

Tabella 4.7: Valori di dimensione media delle sospensioni dei *pellet* re-dispersi in acqua e in *buffer* a pH 4.3, post centrifugazione

CAMPIONI	Dimensione [nm]
<i>Pellet</i> re-dispersi in acqua	237.5
<i>Pellet</i> re-dispersi in <i>buffer</i> pH 4.3	255.0

La Figura 4.6 mostra le distribuzioni dimensionali delle sospensioni dei *pellet* di nanoparticelle addizionate con 10 μg di RNA e re-dispersi in *buffer* e acqua, post centrifuga. Le dimensioni delle sospensioni dei *pellet* dispersi in acqua e in *buffer* presentano una distribuzione dimensionale simile, con valori rispettivamente di 237.5 nm e 255.0 nm, come indicato nella Tabella 4.7.

Per quanto riguarda l'analisi del surnatante al DLS, questa non ha restituito alcuna dimensione, a dimostrazione che le nanoparticelle post centrifuga sono sedimentate.

Visto i risultati ottenuti, in cui l'RNA sembra non essere presente né nel surnatante né nelle sospensioni dei *pellet* re-dispersi, si è pensato di effettuare una centrifugazione delle nanoparticelle senza RNA a 16000 rpm, 15 minuti a 20°C in modo tale da allontanare le nanoparticelle dal *buffer* di sintesi che è stato poi sostituito con pari volume di acqua libera da nucleasi. Solo dopo la sostituzione del *buffer* di sintesi con acqua, le nanoparticelle sono

state addizionate con un quantitativo in massa di RNA pari a 10 μg e poi nuovamente centrifugate. Sono stati analizzati allo spettrofotometro il surnatante e il *pellet* re-disperso post seconda centrifugazione.

Tabella 4.8: Valori di assorbanza del surnatante e della sospensione del *pellet* delle nanoparticelle con concentrazione di chitosano nella soluzione solvente pari allo 0.02% , post seconda centrifugazione

CAMPIONE	ABS 260 nm
Surnatante	0.2139
<i>Pellet</i> re-disperso in acqua	0.0767

Dai risultati ottenuti e riportati in Tabella 4.8 si nota la presenza di RNA nel surnatante.

$$C_{\text{RNA}_{\text{NP}+34\mu\text{L}}} = 0,2139 * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 8,556 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}; \quad (4.9)$$

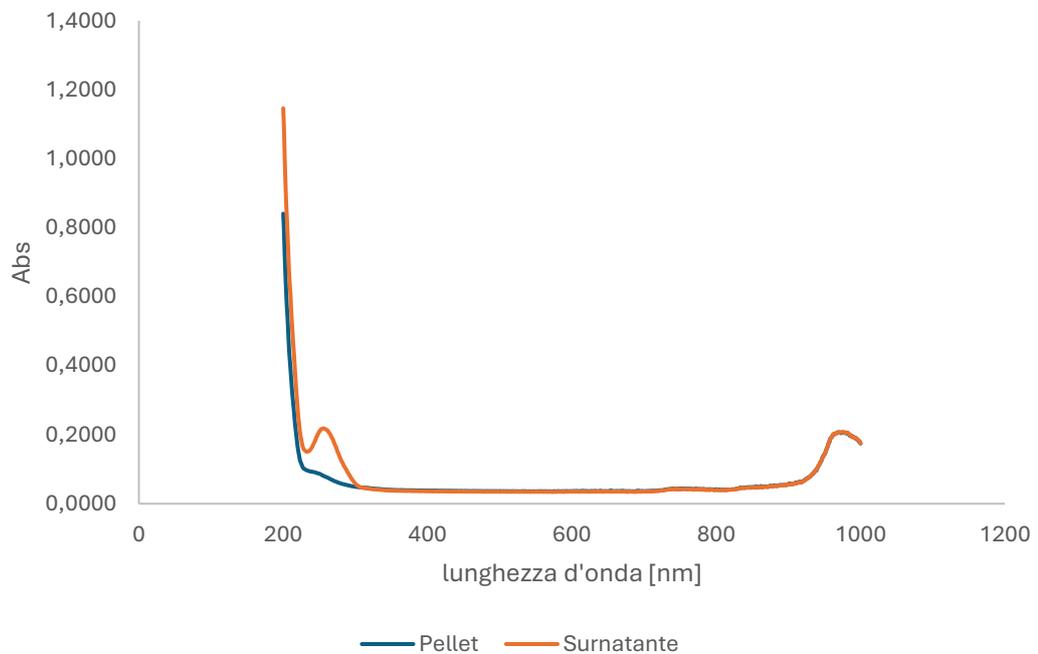


Figura 4.7: Confronto tra gli spettri di assorbanza della sospensione del *pellet* e del surnatante, post seconda centrifugazione,

La Figura 4.7 riporta gli spettri di assorbanza delle nanoparticelle private del *buffer* acido di sintesi, risospese in acqua, addizionate con RNA e centrifugate nuovamente. Questa volta, a differenza della Figura 4.5, è stato possibile notare un picco di assorbanza a 260 nm nel surnatante, dovuto alla presenza di RNA.

È stata poi condotta un'analisi della dimensione media del *pellet* risospeso in acqua al DLS.

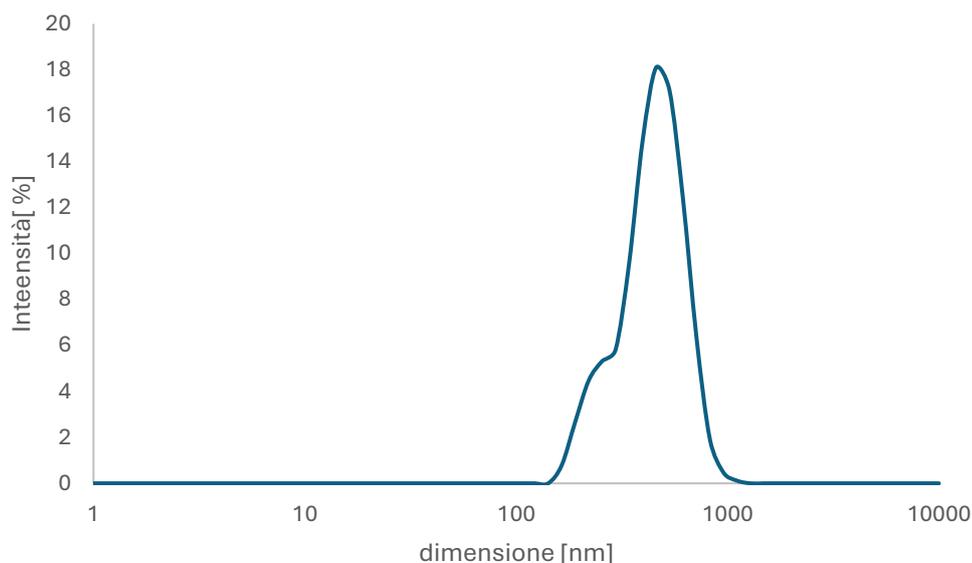


Figura 4.8: Distribuzione granulometrica della sospensione del *pellet* di nanoparticelle, post seconda centrifugazione, addizionate di RNA e re-disperse in acqua

La Figura 4.8 rappresenta la distribuzione granulometrica del *pellet* di nanoparticelle addizionate di RNA e re-disperse in acqua. La dimensione media ottenuta post seconda centrifugazione e risospensione in acqua è maggiore rispetto a quella riportata in Figura 4.6 del *pellet* re-disperso in acqua dopo aver subito una sola centrifugazione.

Tabella 4.9: Dimensione media della sospensione del *pellet* di nanoparticelle, post seconda centrifugazione, addizionate di RNA e re-disperse in acqua

	Dimensione [nm]
<i>Pellet</i> re-dispersi in acqua	458.7

Non è stato possibile condurre l'analisi al DLS del surnatante in quanto lo strumento non è riuscito a portare a termine l'analisi, restituendo un messaggio di errore. Se la concentrazione del campione è troppo bassa, il DLS può restituire messaggi di errore. Questo potrebbe indicare l'assenza o la quantità trascurabile di particelle nel surnatante.

Dai risultati riportati in Figura 4.5 e in Figura 4.7, si può concludere che il buffer di sintesi interferisce con la lettura dell'RNA tramite spettrofotometro. Infatti, è stata rilevata la presenza di RNA nel surnatante del campione solo nelle prove in cui è stato rimosso il buffer acido di sintesi.

4.4 Sostituzione del buffer acido di sintesi delle NP e addizione di RNA

A seguito dei risultati ottenuti (Figura 4.7), si è deciso di ripetere la prova, ma questa volta i *pellet* sono stati re-dispersi non solo in acqua ma anche in PBS a pH 7.4. L'obiettivo era verificare se il PBS potesse avere effetti nella rilevazione dell'RNA tramite spettrofotometria, considerando che il PBS a pH 7.4 sarebbe stato successivamente utilizzato come una delle soluzioni per lo studio del rilascio. Sono stati preparati due campioni di nanoparticelle con concentrazione di chitosano nella soluzione solvente pari a 0.02% e post sintesi sono stati sottoposti ad un processo di centrifugazione a 16000 rpm per 15 minuti a 20°C. Il processo di centrifugazione ha permesso di allontanare il *buffer* acido

di sintesi e di sostituirlo una volta con PBS a pH 7.4 e l'altra con acqua libera di nucleasi; post re-dispersione i campioni sono stati addizionati con 10 μg di RNA.

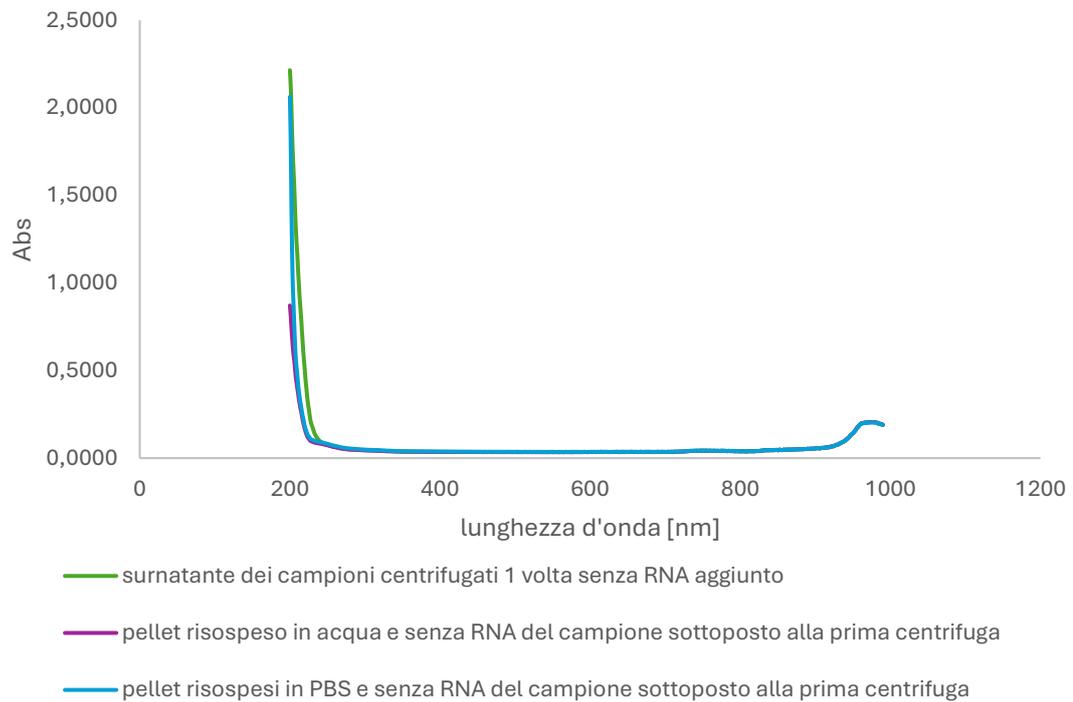


Figura 4.9: Confronto tra gli spettri di assorbanza di surnatante e delle sospensioni di *pellet* di nanoparticelle di chitosano senza RNA. In particolare, un *pellet* è stato re-disperso in acqua e l'altro in PBS.

La Figura 4.9 riporta un confronto degli spettri di assorbanza di surnatante e della sospensione del *pellet* di nanoparticelle di chitosano senza RNA, risospeso post centrifugazione uno in acqua e l'altro in PBS. Le curve relative alle due sospensioni dei *pellet* sono sovrapposte tra di loro a dimostrazione del fatto che le due soluzioni utilizzate, di acqua e PBS, hanno un'influenza simile sulla lettura di assorbanza.

Tabella 4.10: Valori di assorbanza a 260 nm del surnatante e della sospensione del *pellet*, re-disperso in acqua e in PBS, di nanoparticelle con concentrazione di chitosano nella soluzione solvente pari a 0.02%

	Abs 260 nm
surnatante dei campioni centrifugati 1 volta senza RNA aggiunto	0.0643
<i>pellet</i> re-disperso in acqua e senza RNA post 1° centrifugazione	0.0626
<i>pellet</i> re-disperso in PBS e senza RNA post 1° centrifugazione	0.0705

In Tabella 4.10 sono riportati i valori di assorbanza a 260 nm del surnatante e della sospensione del *pellet* re-disperso in acqua e in PBS di nanoparticelle di chitosano senza RNA. Si osservano valori di assorbanza a 260 nm simili tra il surnatante (OD_{260} pari a 0.0643) e il *pellet* re-disperso in acqua (OD_{260} pari a 0.0626). Tuttavia, nel caso del *pellet* re-disperso in PBS, il valore di OD_{260} è superiore, raggiungendo un valore pari a 0.0705.

È stata inoltre condotta un'analisi dimensionale al DLS del surnatante e non risultano essere presenti delle nanoparticelle.

Una volta che i *pellet* sono stati re-dispersi o in acqua o in PBS si è proseguito con l'aggiunta di 34 μL di RNA con concentrazione pari a 0.298 mg/mL (10,0 μg) ed è poi stata effettuata una lettura spettrofotometrica.

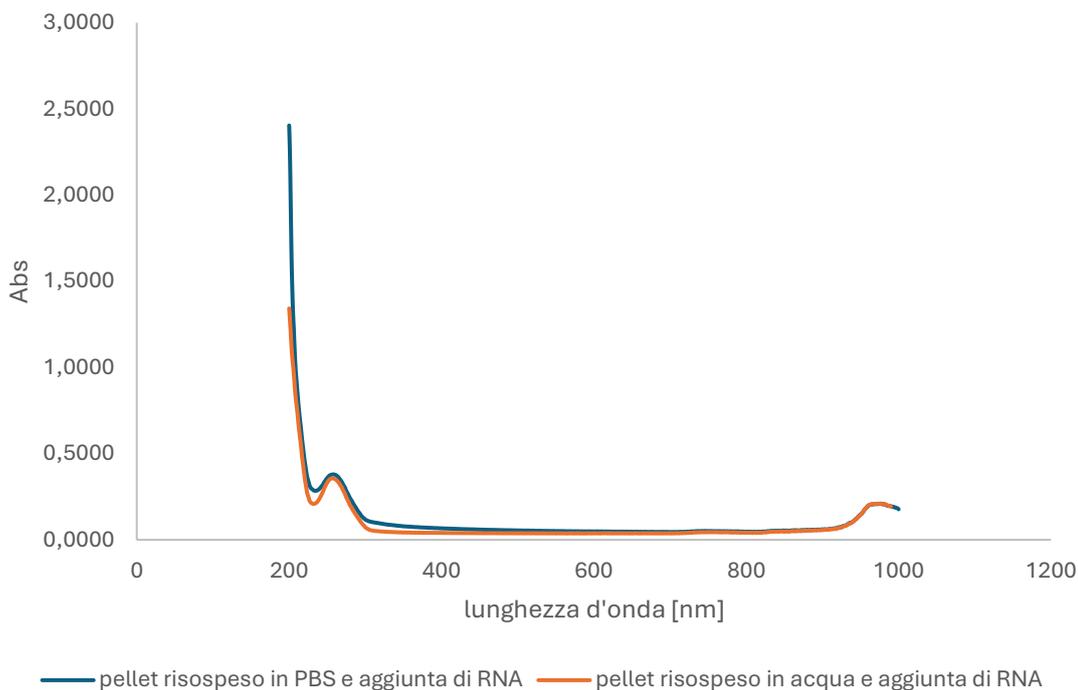


Figura 4.10: Confronto tra gli spettri di assorbanza della sospensione del *pellet* re-disperso in PBS e addizionato con RNA e della sospensione del *pellet* re-disperso in acqua e addizionato con RNA

La Figura 4.10 mostra gli andamenti dello spettro di assorbanza della sospensione dei *pellet* delle nanoparticelle risospesi in acqua e in PBS e addizionati con 10 μg di RNA. Nel caso del *pellet* risospeso in PBS il valore di OD₂₆₀ è risultato pari a 0.378 mentre nel caso della sospensione di *pellet* re-disperso in acqua l'OD₂₆₀ è di 0.353.

Successivamente sono stati sintetizzati altri due campioni che hanno subito le stesse procedure di centrifugazione e re-dispersione in acqua e in PBS, come i campioni suddetti, senza però essere mai addizionati con RNA. Quest'ultimi campioni sono stati preparati con la funzione di controllo (bianco).

Tabella 4.11: Valori di assorbanza a 260 nm della sospensione del *pellet* re-disperso in PBS e in acqua, con e senza aggiunta di RNA

VALORI ABS post lavaggio e aggiunta di RNA	ABS 260 nm
<i>pellet</i> re-disperso in PBS e aggiunta di RNA	0.378
<i>pellet</i> re-disperso in acqua e aggiunta di RNA	0.353
<i>pellet</i> re-disperso in PBS senza RNA (controllo)	0.063
<i>pellet</i> re-disperso in acqua senza RNA (controllo)	0.071

In Tabella 4.11 sono riportati i valori di assorbanza a 260 nm della sospensione dei *pellet* re-dispersi in acqua e in PBS addizionati e non con 10 μg di RNA. Il valore di assorbanza a 260 nm risulta essere maggiore nel caso della sospensione dei *pellet* addizionati con RNA rispetto ai valori di assorbanza delle corrispondenti sospensioni dei *pellet* senza RNA, proprio come ci saremmo aspettati. Dai valori di assorbanza è stato possibile risalire alla concentrazione di RNA presente nei campioni; la quantità di RNA presente risulta leggermente maggiore di quella realmente introdotta e ciò può essere imputabile al valore di bianco sottratto e alla sua variabilità ad ogni sintesi.

$$C_{\text{RNA campione ridisperso in PBS}} = (0,378 - 0,063) * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 12,6 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \quad (4.10)$$

$$C_{\text{RNA campione ridisperso in acqua}} = (0,353 - 0,071) * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 11,28 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \quad (4.11)$$

Inoltre, dai valori ottenuti si può osservare che il PBS non ha un effetto schermante nella lettura di assorbanza a 260 nm. Infatti, il valore di concentrazione di RNA nella sospensione del *pellet* re-disperso in PBS è coerente con quello che ci si aspetterebbe essendo pari a 12.6 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ e quindi vicino al quantitativo di RNA introdotto al momento della sintesi (10 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$).

Dopo il lavaggio e l'aggiunta di RNA i campioni sono stati sottoposti ad una seconda centrifugazione in modo da separare nuovamente surnatante e *pellet*. I *pellet* ottenuti sono stati re-dispersi o in acqua o in PBS. È stata effettuata un'analisi spettrofotometrica sia del surnatante che della sospensione del *pellet*. Stessa procedura è stata applicata per i controlli (campioni senza RNA).

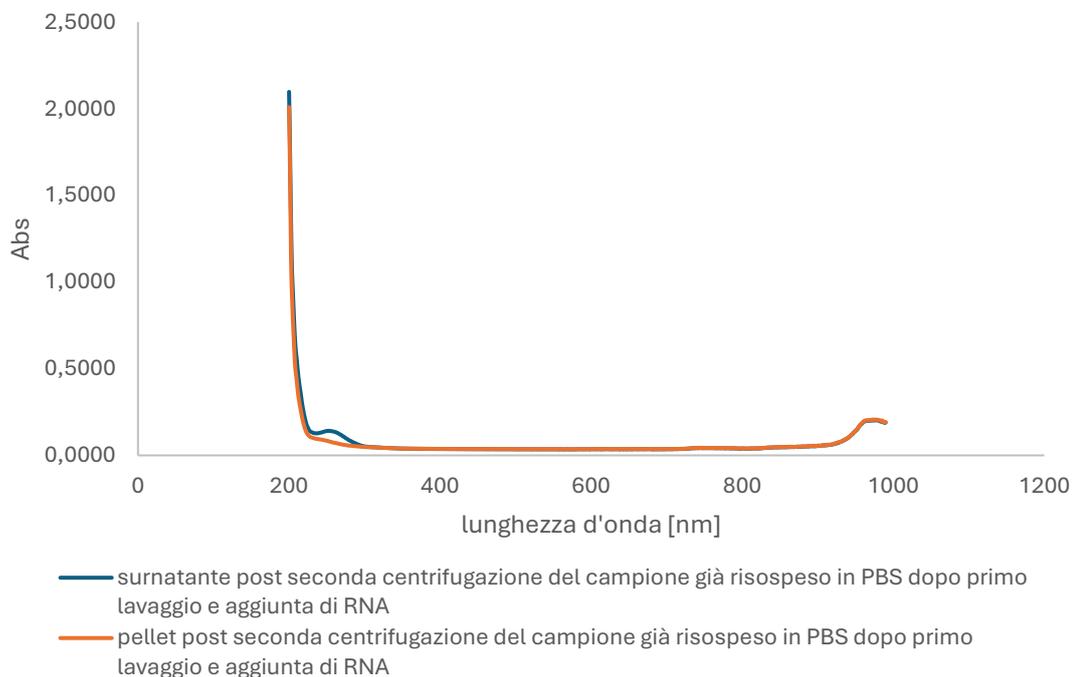


Figura 4.11: Spettro di assorbanza del surnatante e della sospensione dei *pellet* di nanoparticelle post seconda centrifugazione. La seconda centrifugazione è stata effettuata dopo aver sostituito il *buffer* di sintesi con PBS e aver addizionato l'RNA

Nella Figura 4.11 sono riportati gli spettri di assorbanza del surnatante e della sospensione del *pellet* risospeso in PBS post seconda centrifugazione. La seconda centrifugazione è stata effettuata dopo aver sostituito il *buffer* di sintesi con PBS e aver addizionato l'RNA. Si

osserva in corrispondenza della curva del surnatante la presenza di un picco a 260 nm, simbolo della presenza di RNA nel surnatante.

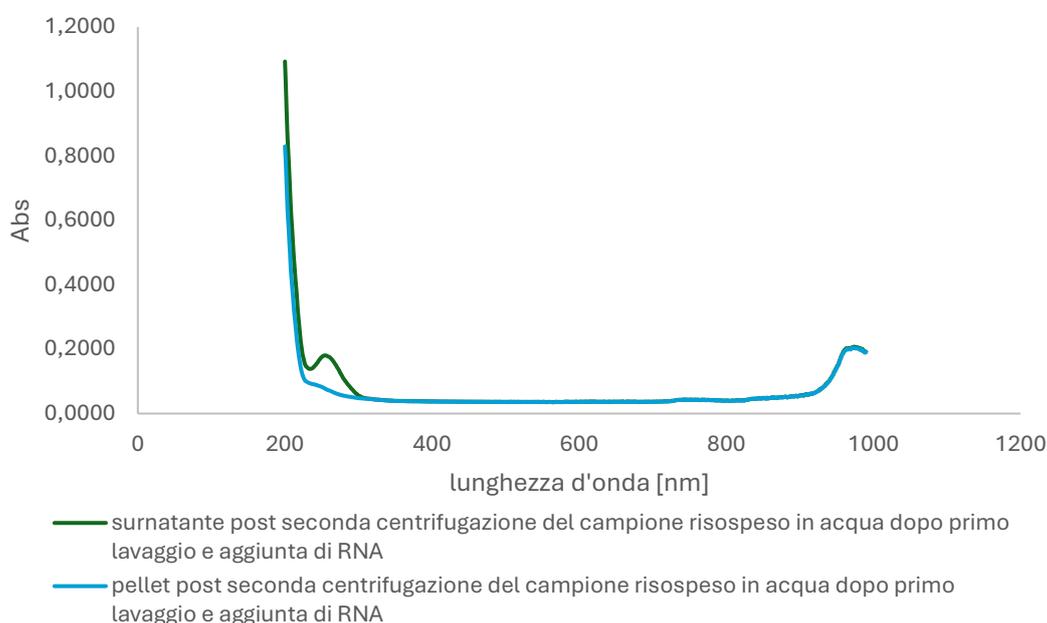


Figura 4.12: Spettro di assorbanza del surnatante e della sospensione del *pellet* di nanoparticelle post seconda centrifugazione. La seconda centrifugazione è stata effettuata dopo aver sostituito il *buffer* di sintesi con l’acqua e aver addizionato l’RNA

Nella Figura 4.12 sono riportati gli spettri di assorbanza di surnatante e della sospensione del *pellet* risospeso in acqua post seconda centrifugazione, effettuata dopo aver sostituito il *buffer* di sintesi con l’acqua e aver addizionato l’RNA. Anche questa volta, come nel caso di re-disperzione in PBS (Figura 4.11) si osserva in corrispondenza della curva del surnatante la presenza di un picco a 260 nm.

Tabella 4.12: Valori di assorbanza a 260 nm di surnatante e della sospensione del *pellet* dopo la seconda centrifugazione, addizionati e non con RNA. La seconda centrifugazione è stata effettuata dopo la sostituzione del *buffer* acido di sintesi con PBS o acqua e l’addizione di RNA. Sono riportati anche i valori del surnatante e della sospensione del *pellet* post seconda centrifugazione dei campioni privi di RNA

VALORI ABS DOPO LAVAGGIO, AGGIUNTA DI RNA E SECONDA CENTRIFUGA	ABS 260 nm
surnatante campione NP + 10 μg RNA in PBS	0.1365
<i>pellet</i> campione NP + 10 μg RNA in PBS	0.0729
surnatante campione NP + 10 μg RNA in acqua	0.1757
<i>pellet</i> campione NP + 10 μg RNA in acqua	0.0719
surnatante controllo in PBS	0.0680
<i>pellet</i> controllo in PBS	0.0669
surnatante controllo in acqua	0.0661
<i>pellet</i> controllo in acqua	0.0635

Dalla Tabella 4.12, si può osservare che i valori di assorbanza delle sospensioni dei pellet di nanoparticelle contenenti RNA, risospesi in acqua e PBS dopo la seconda centrifugazione, risultano molto simili a quelli registrati per il surnatante e per le sospensioni dei pellet dei campioni privi di RNA, anch'essi risospesi in acqua e PBS. Al contrario, i valori di assorbanza più elevati sono stati riscontrati nei surnatanti dei campioni già sottoposti a una prima centrifugazione, risospesi in acqua o PBS e addizionati con RNA, a dimostrazione che la maggior parte dell'RNA si è concentrata nel surnatante e non nel *pellet* dopo la seconda centrifugazione.

Dai valori di assorbanza riportati in Tabella 4.12 si è potuto risalire al valore di concentrazione di RNA nel surnatante dei campioni risospesi in acqua e in PBS.

$$C_{\text{RNA}_{Nps + 10 \mu\text{g NA in PBS}}} = 0,1365 * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 5,46 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \quad (4.12)$$

$$C_{\text{RNA}_{Nps + 10 \mu\text{g NA in acqua}}} = 0,1757 * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 7,03 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \quad (4.13)$$

Si può osservare che la concentrazione di RNA nel surnatante del campione risospeso in acqua ($7,03 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$), è superiore rispetto a quella rilevata nel surnatante del campione risospeso in PBS, ($5,46 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$).

Inoltre, è stata condotta un'analisi dimensionale e del potenziale zeta dei surnatanti e delle sospensioni dei *pellet* ottenuti post seconda centrifugazione.

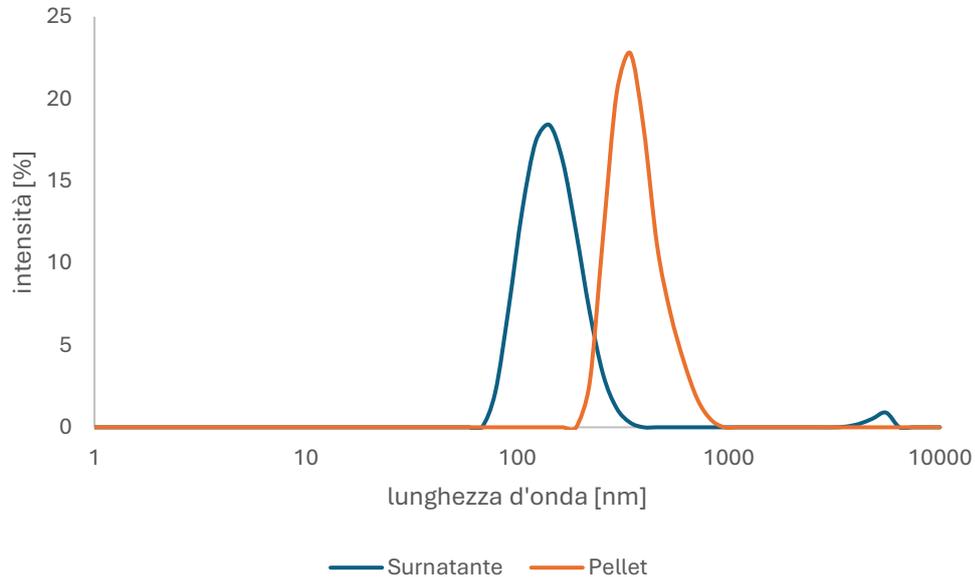


Figura 4.13: Confronto tra le distribuzioni dimensionali del surnatante e della sospensione del *pellet* dopo essere stati sottoposti alla seconda centrifugazione. La seconda centrifugazione è stata effettuata dopo la sostituzione del *buffer* acido di sintesi con PBS e l'aggiunta di RNA.

Nella Figura 4.13 sono riportate le distribuzioni dimensionali della sospensione del *pellet* e del surnatante delle nanoparticelle post seconda centrifugazione, dopo aver già subito una sostituzione del *buffer* acido di sintesi con PBS ed essere state addizionate con RNA. Come si può osservare dalla Figura 4.13 sono state ritrovate delle nanoparticelle anche nel surnatante ma di dimensione media molto piccola (142 nm); probabilmente non sono state

in grado di sedimentare alla velocità di centrifugazione applicata. Inoltre, le dimensioni di quelle nel *pellet* sono maggiori rispetto a quelle del surnatante (142 nm) e pari a circa 342 nm.

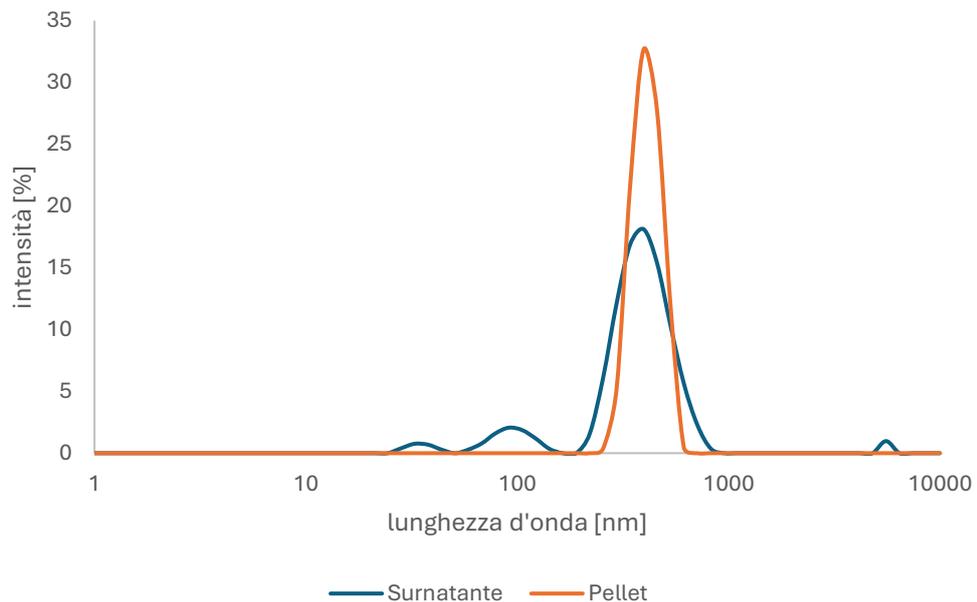


Figura 4.14: Confronto tra le distribuzioni dimensionali del surnatante e della sospensione del *pellet* dopo essere stati sottoposti alla seconda centrifugazione. La seconda centrifugazione è stata effettuata dopo la sostituzione del *buffer* acido di sintesi con acqua e l’aggiunta di RNA.

Nella Figura 4.14 sono riportati gli andamenti dimensionali della sospensione del *pellet* e surnatante della seconda centrifugazione, dopo aver già subito una sostituzione del *buffer* acido di sintesi con acqua ed essere stati addizionati con RNA. *Pellet* e surnatante in questo caso, a differenza del caso di re-disperzione in PBS (Figura 4.13), hanno mostrato un valore di dimensione media uguale e pari a 396 nm. Tuttavia, il surnatante riporta un andamento non del tutto monomodale a differenza del *pellet*. In questo caso non si è stati in grado di effettuare una sedimentazione completa delle nanoparticelle che sono state appunto ritrovate anche nel surnatante.

Tabella 4.13: Valori della dimensione media e del potenziale zeta del surnatante e della sospensione del *pellet* post seconda centrifugazione

	Dimensione media, nm	Potenziale Zeta, mV
surnatante campione NP + 10 µg RNA in PBS	149.4	0.7
pellet campione NP + 10 µg RNA in PBS	374.5	-1.1
surnatante campione NP + 10 µg RNA in acqua	407.1	-21.6
pellet campione NP + 10 µg RNA in acqua	413.2	-8.6

In Tabella 4.13, sono riportate le dimensioni medie ottenute dall’analisi dimensionale da cui si evince la presenza di nanoparticelle anche nel surnatante in entrambi i casi di re-disperzione in acqua e in PBS come riportato già in Figura 4.15. Nel caso della re-

dispersione in PBS il surnatante sottoposto ad un'analisi al DLS restituisce una dimensione media intorno a 149.4 nm, mentre nel caso del surnatante in acqua, i valori di dimensione media sono molto più grandi e intorno a 374.5 nm. È stata condotta inoltre un'analisi del potenziale ζ di ciascun campione. Un valore di potenziale zeta elevato, minore di -30 mV e maggiore di +30 mV, fa sì che le nanoparticelle rimangano lontane le une dalle altre evitando così fenomeni di agglomerazione, aggregazione e flocculazione. Si può osservare che nel caso di surnatante in acqua il potenziale zeta restituisce dei valori vicini a -30 mV, ciò è simbolo di una scarsa tendenza delle nanoparticelle ad aggregarsi e quindi a sedimentare post centrifugazione, mentre nel caso del surnatante in PBS i valori del potenziale zeta indicano un'instabilità e quindi una tendenza all'aggregazione da parte delle nanoparticelle. Ciò può essere dovuto ad un'alta concentrazione di ioni contenuti in PBS. Questi ioni si distribuiscono intorno alle nanoparticelle, schermano la carica superficiale e inducono ad una diminuzione della repulsione elettrostatica facilitando così l'aggregazione.

4.5 Rilascio di RNA da NP immerse in 2 mL di PBS pH 7.4

Visti i risultati riportati nel paragrafo 4.3, si è deciso di sottoporre i campioni a centrifugazione a 16000 rpm per 15 min a 20°C, prima di sospenderli nelle soluzioni per effettuare lo studio sul rilascio, al fine di eliminare il *buffer* acido di sintesi avendo quest'ultimo una certa influenza sulla lettura di assorbanza a 260 nm.

Dopodiché, si è passati al primo studio relativo al rilascio che ha previsto la preparazione di 12 campioni di nanoparticelle. Due di questi sono stati utilizzati come approssimazione del bianco e in quanto tali sono campioni contenenti nanoparticelle con concentrazione di chitosano nella soluzione solvente pari a 0.02% (50 μ g) ma senza RNA. Infatti, per risalire al quantitativo di RNA rilasciato nel tempo, è necessario sottrarre al valore di OD260 del campione contenente nanoparticelle ed RNA, il contributo di assorbanza delle nanoparticelle e del buffer di sintesi. Gli altri campioni sono costituiti da nanoparticelle di chitosano allo 0.02% inglobanti 10 μ g di RNA. In particolar modo sono stati prelevati 31 μ L di RNA con concentrazione pari a 326.96 μ g/mL. Il rapporto RNA/CHITOSANO è pari allo 0.2. Dei campioni incorporanti RNA solo i primi 7 sono stati analizzati mentre gli altri 3 sono stati utilizzati per effettuare altre prove descritte nel paragrafo 4.6.

Post centrifugazione i pellet ottenuti sono stati re-dispersi in un volume complessivo di PBS a pH 7.4 pari a 2 mL.

Per effettuare le prove sul rilascio è necessario campionare a diversi intervalli di tempo le nanoparticelle immerse in PBS in modo da poter effettuare un'analisi allo spettrofotometro.

Tutti i campioni preparati sono stati disposti su un agitatore a disco rotante LLG-uni LOOPMIX 2 al fine di mantenere il campione in agitazione e garantire così una buona miscelazione della sospensione. Il primo prelievo è stato eseguito al tempo $t=0$, ovvero subito dopo la re-dispersione dei campioni in soluzione di PBS. Per ogni campionamento è stata eseguita una valutazione spettrofotometrica sia del controllo che di un campione di nanoparticelle contenenti RNA, e dunque ad ogni tempo prestabilito è stato "sacrificato" un campione di nanoparticelle, in modo che ogni tempo corrispondesse a un valore di assorbanza di un campione distinto. In sintesi, non è stato utilizzato lo stesso campione per più misurazioni temporali. Inoltre, ciascun campione è stato anche analizzato al DLS in modo da monitorare le dimensioni delle nanoparticelle nel tempo.

Subito dopo la centrifugazione, sono stati separati i surnatanti dai pellet ed è stata eseguita una misurazione spettrofotometrica e dimensionale al DLS del surnatante sia di uno dei due campioni di controllo che di 3 campioni di nanoparticelle incorporanti RNA, in particolare

dei campioni 1,3 e 7, scelti in maniera casuale. Queste analisi sono state eseguite per controllare un'eventuale presenza di RNA o di nanoparticelle nel surnatante.

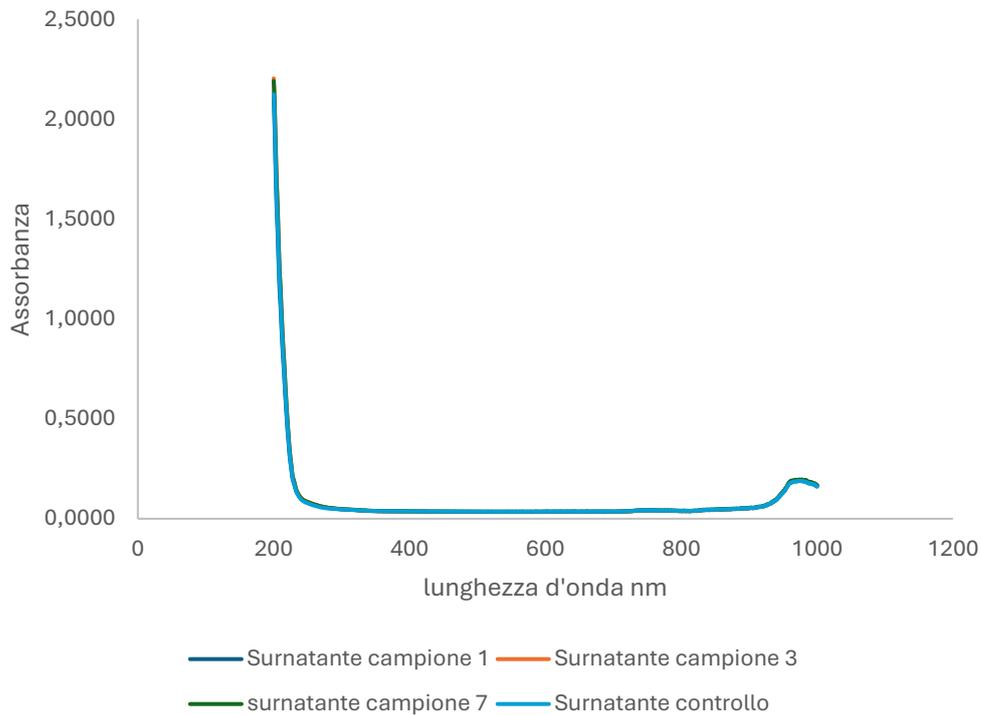


Figura 4.15: Confronto tra gli spettri di assorbanza del surnatante del controllo e del surnatante di alcune nanoparticelle inglobanti RNA

La Figura 4.15 mostra gli spettri di assorbanza dei surnatanti delle nanoparticelle post centrifugazione. Come si può osservare dalla Figura 4.15 gli spettri di assorbanza dei surnatanti dei controlli e quelli delle nanoparticelle con RNA sono sovrapposti tra di loro. Da ciò si può dedurre che non è presente RNA nel surnatante.

Tabella 4.14: Valori di assorbanza a 260 nm del surnatante del controllo e del surnatante di alcune nanoparticelle inglobanti RNA

CAMPIONE	Abs 260 nm
Surnatante campione 1	0.0699
Surnatante campione 3	0.0724
Surnatante campione 7	0.0715
Surnatante controllo 1	0.0655

In Tabella 4.14 sono riportati i valori di assorbanza a 260 nm dei surnatanti dei controlli e delle nanoparticelle incorporanti RNA post centrifugazione.

Durante l'analisi dimensionale dei surnatanti al DLS, nel caso dei due controlli lo strumento non è stato in grado di rilevare la presenza di particelle, mentre per gli altri tre surnatanti si è registrato un valore dimensionale: i surnatanti 1 e 3 hanno restituito dei valori di

dimensione intorno ai 190 nm mentre il surnatante 7 ha riportato dei valori dimensionali superiori e intorno a 280 nm.

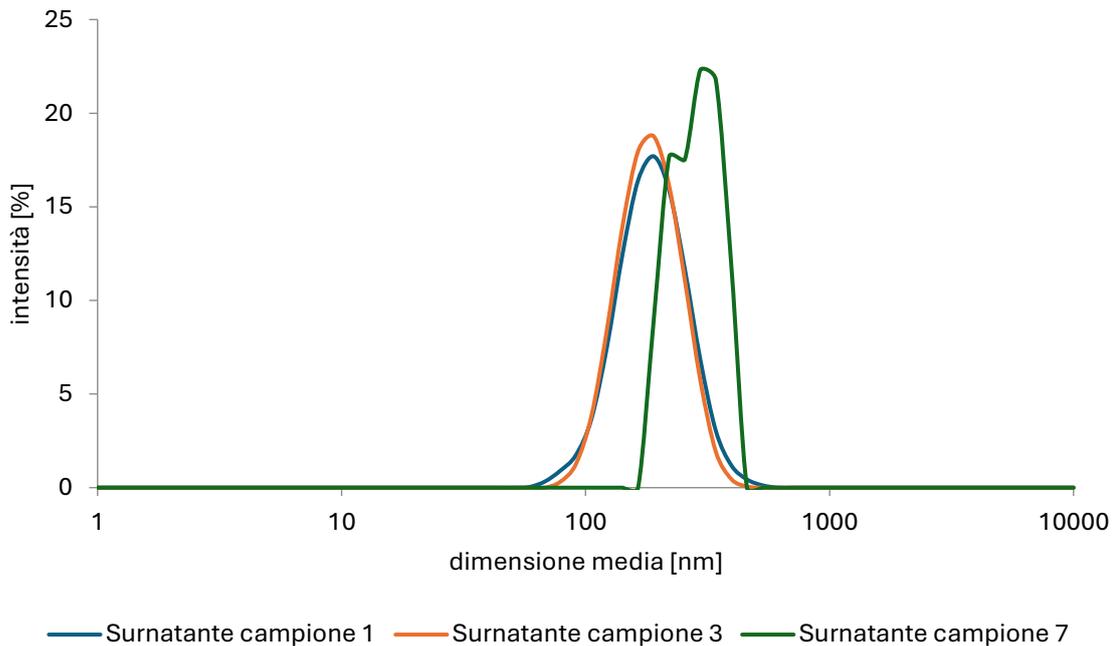


Figura 4.16: Confronto tra le distribuzioni dimensionali dei surnatanti dei campioni 1, 3, 7

In Figura 4.16 sono riportati le distribuzioni dimensionali dei surnatanti delle nanoparticelle centrifugate. Dai valori riportati in Tabella 4.15 si osserva che la dimensione media delle particelle presenti nel surnatante dei campioni 1 e 3 è simile tra loro e leggermente inferiore rispetto a quella rilevata nel surnatante del campione 7. Con concentrazioni di chitosano basse, come lo 0,02%, non sempre si riesce a far sedimentare completamente le nanoparticelle. Di conseguenza, alcune particelle di dimensioni più piccole potrebbero rimanere in sospensione, come osservato nei casi dei surnatanti 1 e 3, in cui le particelle ritrovate nel surnatante avevano una dimensione media di circa 190 nm, e nel caso del surnatante 7, dove la dimensione media è risultata di 287,7 nm.

Tabella 4.15: Valori dimensionali medi dei surnatanti di alcuni campioni di nanoparticelle con RNA e del surnatante del controllo

CAMPIONE	Dimensione [nm]
Surnatante campione 1	196.7
Surnatante campione 3	190.3
Surnatante campione 7	287.7
Surnatante controllo 1	no particelle

È stata inoltre eseguita una valutazione spettrofotometrica e al DLS, nel tempo, dei *pellet* dei vari campioni centrifugati e risospesi in PBS per condurre uno studio del rilascio di RNA da nanoparticelle. Tale studio è stato descritto nel paragrafo 4.5.2.

4.5.1 Variazione del valore di OD₂₆₀ del controllo nel tempo

Per studiare il quantitativo di RNA rilasciato dalle nanoparticelle, una volta letto OD₂₆₀ del campione, bisogna sottrarre il contributo delle nanoparticelle e dei buffer, in modo da avere un'assorbanza che corrisponda soltanto al contributo di RNA. Per fare ciò è necessario sintetizzare delle nanoparticelle aventi la stessa storia e caratteristiche di quelle inglobanti RNA. Tuttavia, è impossibile ottenere una lettura del bianco esatta. Infatti, nonostante bianco e nanoparticelle contenenti RNA subiscano lo stesso processo di sintesi non saranno mai uguali e non presenteranno mai la stessa distribuzione granulometrica poiché quelle inglobanti RNA hanno una dimensione maggiore delle nanoparticelle senza RNA e dunque non si può parlare di bianco vero e proprio.

Ad ogni modo, analizzando le dimensioni e l'assorbanza del controllo re-disperso in 2 mL di PBS a pH 7.4 e agitato tramite agitatore a disco rotante, si è osservato che la dimensione media del controllo nel tempo si mantiene sempre attorno a valori dimensionali a cui corrispondono valori di assorbanza che variano tra 0.069 e 0.0737. Dunque, l'intervallo di assorbanza del controllo nel tempo si discosta di circa il 20% dal valore di assorbanza di nanoparticelle senza RNA e con concentrazione di chitosano nella soluzione solvente pari a 0.02% riportati in . È stato osservato che una variazione significativa dell'assorbanza a 260 nm si verifica solo in presenza di rilevanti variazioni dimensionali, fenomeno che non avviene nel caso del controllo. Per questo motivo per il calcolo del quantitativo in massa di RNA rilasciato, al valore di assorbanza delle nanoparticelle inglobanti RNA nel tempo verrà sottratto il valore di assorbanza del controllo misurato al tempo t_0 , secondo le equazioni (4. 16) e (4. 17).

$$C_{RNA\text{rilasciato}} = (Abs_{260nmNP\text{ con RNA inglobato}} - Abs_{260nmControllo\text{ a }t_0}) * 40 \frac{\mu g}{mL} \quad (4. 16)$$

$$M_{RNA} = C_{RNA\text{rilasciato}} \frac{\mu g}{mL} * V_{\text{soluzione}} \text{ mL} \quad (4. 17)$$

Tabella 4.16: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del controllo re-disperso in 2 mL di PBS a pH 7.4 e le relative dimensioni medie

Controllo in 2 mL di PBS pH 7.4 nel tempo		
Tempo, ore	Dimensione, nm	Abs 260 nm
0	396.0	0.0690
4	381.9	0.0687
6	380.2	0.0708
21	306.6	0.0674
24	395.1	0.0707
43,5	478.7	0.0702
48.5	445.8	0.0737

La Tabella 4.16 riporta i valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del controllo re-disperso in 2 mL di PBS a pH 7.4 e le relative dimensioni medie che non mostrano delle grandi variazioni nel tempo. Ciò vuol dire che le nanoparticelle si sono mantenute stabili nel tempo e non hanno mostrato fenomeni di aggregazione.

4.5.2 Rilascio nel tempo da NP in 2 mL di PBS pH 7.4 su rotatori di dischi

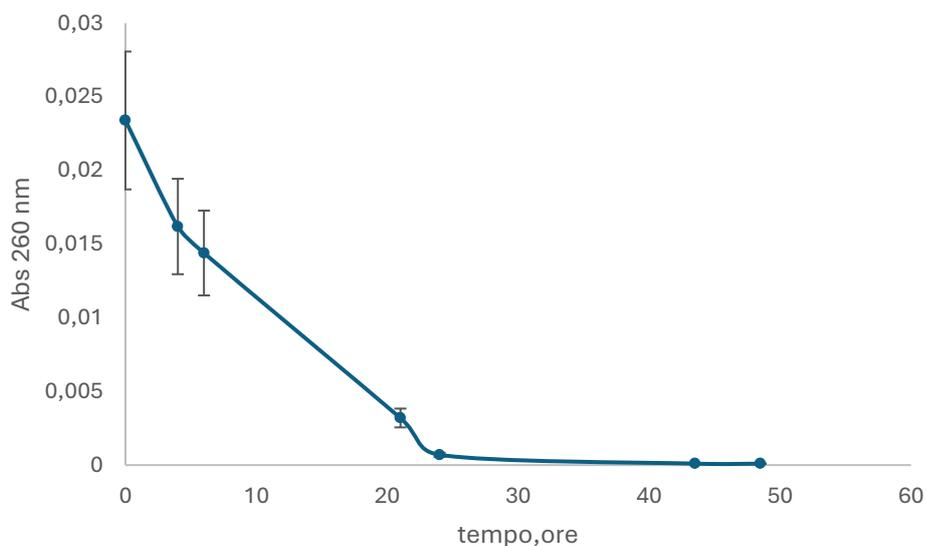


Figura 4.17: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo di nanoparticelle immerse in 2 mL di PBS pH 7.4 agitate tramite agitatore a disco rotante

La Figura 4.17 mostra gli andamenti nel tempo dell'assorbanza a 260 nm delle nanoparticelle immerse in 2 mL di PBS a pH 7.4. I valori di assorbanza riportati diminuiscono nel tempo e mostrano un rilascio immediato al tempo iniziale t_0 . Probabilmente l'RNA rilasciato interagisce elettrostaticamente con le nanoparticelle rilegandosi a quest'ultime e con il passare del tempo l'RNA rilasciato in soluzione diminuisce.

Tabella 4.17: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo di nanoparticelle immerse in 2 mL di PBS a pH 7.4 agitate tramite agitatore a disco rotante e relativi quantitativi in massa di RNA rilasciato

Tempo, ore	Abs 260 nm	M_RNA, μ g
0	0.0234	1.872
4	0.0162	1.296
6	0.0144	1.152
21	0.0032	0.256
24	0.0007	0.056
43.5	0.0001	0.008
48.5	0.0001	0.008

La Tabella 4.17 riporta i valori in massa di RNA rilasciato nel tempo da nanoparticelle immerse in 2 mL di PBS a pH 7.4. Tali valori sono stati calcolati secondo la formula riportata nel paragrafo 4.5.1. Dalla Tabella 4.14 si osserva che, al tempo zero, è stato rilasciato un quantitativo di RNA pari a 1,872 μ g rispetto ai 9,58 μ g inizialmente incorporati. Dopodiché i valori di RNA in massa rilasciato nel campione tende a diminuire, comportamento già osservato nella Figura 4.17.

4.6 Rilascio di RNA da NP immerse in acido acetico all' 1%

I campioni 3,8,9,10 di nanoparticelle immersi in 2 mL di PBS a pH 7.4 e un controllo sono stati centrifugati in modo da sostituire il tampone di PBS con 2 mL di acido acetico all' 1% pH 2.83 .

I campioni sono poi stati miscelati tramite due agitatori differenti in modo da poter vedere l'effetto che il tipo di miscelazione ha su modi e tempi di rilascio. In particolare, i campioni 3 e 10 e il controllo sono stati agitati tramite agitatore a disco rotante mentre i campioni 8 e 9 sono stati sottoposti ad agitazione tramite agitatore magnetico multiposizione.

4.6.1 Variazione del valore di OD₂₆₀ del controllo nel tempo

Analizzando le dimensioni e l'assorbanza del controllo re-disperso in 2 mL di acido acetico all' 1% e agitato tramite agitatore a disco rotante, come nel caso descritto nel paragrafo 4.5.1, si è osservato che quest'ultimo ha mantenuto i valori dimensionali sempre in un range a cui corrispondono valori di assorbanza che variano tra 0.0717 e 0.1008. Dunque, l'intervallo di assorbanza del controllo nel tempo si discosta di circa il 15% dal valore di assorbanza di nanoparticelle con concentrazione di chitosano in soluzione solvente pari a 0.02% e senza RNA riportati in Tabella 4.1. Per questo motivo per il calcolo del quantitativo in massa di RNA rilasciato, anche questa volta come nel caso riportato nel paragrafo 4.5, al valore di assorbanza delle nanoparticelle inglobanti RNA nel tempo verrà sottratto il valore di assorbanza del controllo misurato al tempo t_0 , secondo l'equazione (4.17).

Tabella 4.18: Valori di assorbanza a 260 nm del controllo re-disperso in 2 mL di acido acetico 1% nel tempo e le relative dimensioni medie.

Controllo in acido acetico nel tempo		
tempo,ore	Dimensione, nm	Abs 260 nm
0	342.0	0.0717
4.5	341.9	0.0791
68.5	396.1	0.0771
75.5	458.7	0.0793
93	396.1	0.0824
116	615.1	0.1008
123	531.2	0.0939
140	458.7	0.1010
146	615.1	0.0994
164	531.2	0.1028

La Tabella 4.18 mostra i valori di assorbanza a 260 nm del controllo re-disperso in 2 mL di acido acetico 1% nel tempo e le relative dimensioni medie. Tali valori non seguono un andamento monotono, né crescente né decrescente, nel tempo, ma tendono a variare in modo casuale, alternando diminuzioni e aumenti. Questa variabilità delle dimensioni medie potrebbe essere attribuita alla polidispersità del campione analizzato, che influenza i risultati

ottenuti tramite la tecnica DLS.

4.6.2 Rilascio da NP in 2 mL di acido acetico su agitatore a disco rotante

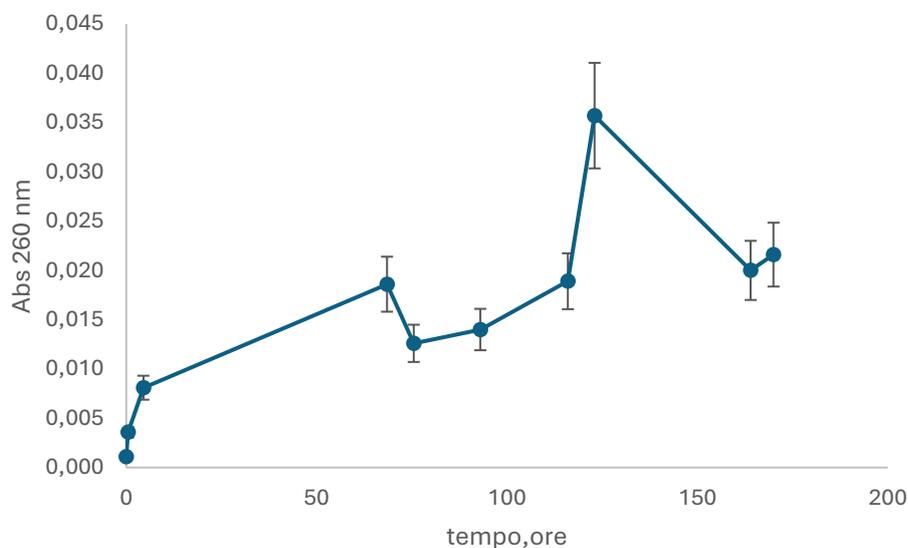


Figura 4.18: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 3, in acido acetico 1%, agitato tramite agitatore a disco rotante

La Figura 4.18 riporta gli andamenti nel tempo delle nanoparticelle immerse in 2 mL di acido acetico 1%, agitate tramite agitatore a disco rotante. Si osserva che la quantità in massa di RNA rilasciata aumenta nel tempo fino a 123 ore, tempo in cui si registra il massimo valore di assorbanza.

Tabella 4.19: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 3, in acido acetico 1%, agitato tramite agitatore a disco rotante e relativa quantità in massa di RNA rilasciato nel tempo

tempo, ore	Abs 260 nm	M_RNA, μg
0	0.001	0.088
0.5	0.004	0.288
4.5	0.008	0.648
68.5	0.019	1.488
75.5	0.013	1.008
93	0.014	1.120
116	0.019	1.512
123	0.036	2.856
164	0.020	1.600
170	0.022	1.728

La Tabella 4.19 riporta i valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 3 in acido acetico 1%, agitato tramite agitatore a disco rotante e la relativa quantità in massa di RNA rilasciata nel tempo. Come già visto con la Figura 4.16 il quantitativo massimo di RNA

rilasciato è stato raggiunto a 123 ore ed è pari a 2.856 μg contro i 10 μg introdotti nel campione al momento della sintesi.

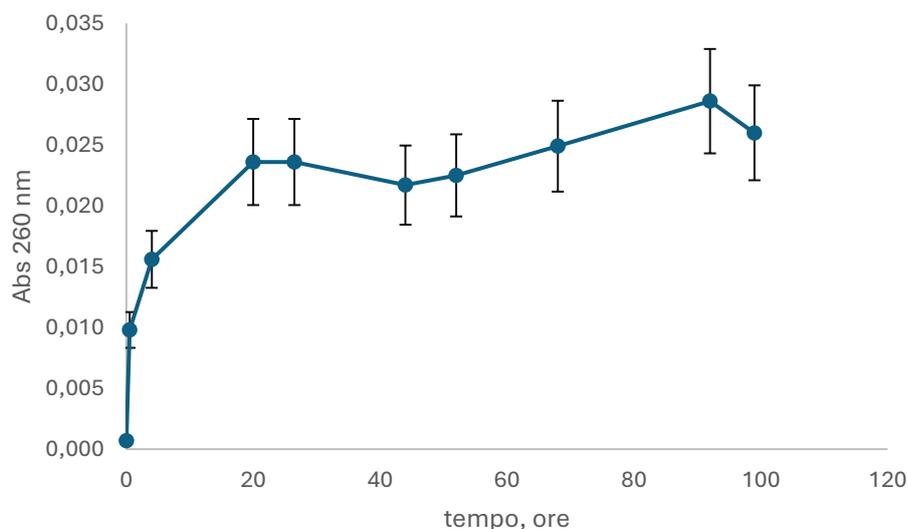


Figura 4.19: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 10 in acido acetico 1%, agitato tramite agitatore a disco rotante

In Figura 4.19 sono riportati gli andamenti di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 10 immerso in 2 mL di acido acetico 1% e agitato tramite agitatore a disco rotante. Si osserva che la quantità in massa di RNA rilasciata aumenta nel tempo.

Tabella 4.20: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 10, in acido acetico 1%, agitato tramite agitatore a disco rotante e relativa quantità in massa di RNA rilasciato nel tempo

tempo, ore	Abs 260 nm	M_RNA, μg
0	0.001	0.056
0.5	0.010	0.784
4	0.016	1.248
20	0.024	1.888
26.5	0.024	1.888
44	0.022	1.736
52	0.023	1.800
68	0.025	1.992
92	0.029	2.288
99	0.026	2.080

La Tabella 4.20 riporta i valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 10 immerso in acido acetico 1% e agitato tramite agitatore a disco rotante e relativa quantità in massa di RNA rilasciata nel tempo. Il campione è stato monitorato per 99 ore, tempo in cui si è raggiunto un quantitativo di RNA libero pari a circa 2 μg contro i 10 μg introdotti durante la procedura di sintesi delle nanoparticelle.

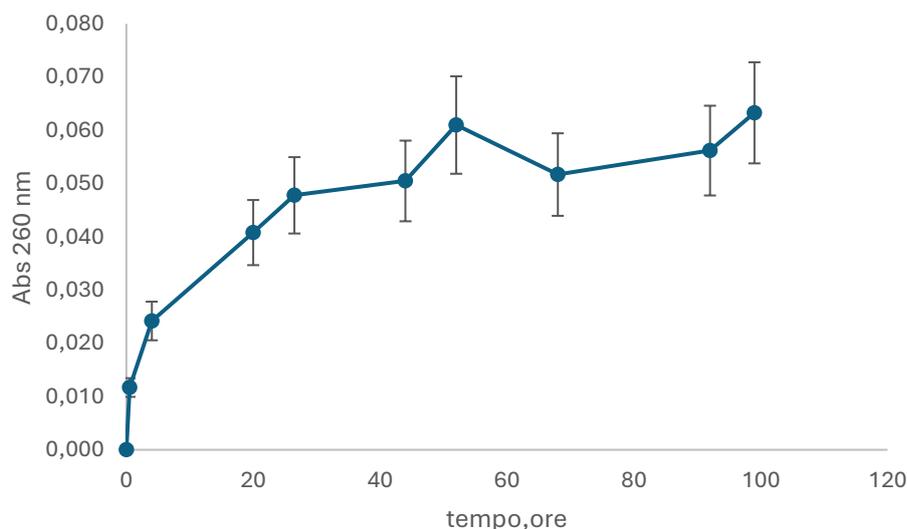


Figura 4.20: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 9 immerso in acido acetico 1% e agitato tramite agitatore magnetico multiplastra

La Figura 4.20 mostra i valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 9 immerso in 2 mL di acido acetico 1 % e agitato tramite agitatore magnetico multiplastra. I valori di assorbanza tendono ad aumentare nel tempo e il quantitativo maggiore di RNA è stato rilasciato a 99 ore.

Tabella 4.21: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 9, in acido acetico 1%, agitato tramite agitatore magnetico multiplastra e relativa quantità in massa di RNA rilasciato nel tempo

tempo, ore	Abs 260 nm	M_RNA, μg
0	0.000	0.000
0.5	0.012	0.936
4	0.024	1.936
20	0.041	3.264
26.5	0.048	3.824
44	0.051	4.040
52	0.061	4.880
68	0.052	4.136
92	0.056	4.496
99	0.063	5.064

La Tabella 4.21 mostra i valori di assorbanza a 260 nm, nel tempo, del campione 9 in acido acetico 1%, agitato tramite piastra magnetica e relativa quantità in massa di RNA rilasciata nel tempo. I valori di assorbanza aumentano nel tempo e la quantità massima di RNA rilasciata è pari a 5.064 μg contro i 10 μg introdotti nel momento di sintesi delle nanoparticelle. La quantità di RNA rilasciata dal campione 9 è maggiore rispetto a quella

dei casi del campione 3 e 10 riportati rispettivamente in Figura 4.18 e Figura 4.19, agitati tramite agitatore a disco rotante.

Dunque, a parità di volume e soluzione utilizzati per effettuare lo studio del rilascio, le nanoparticelle sottoposte ad un'agitazione con agitatore magnetico hanno rilasciato un quantitativo di RNA maggiore rispetto a quelle miscelate con agitatore a disco rotante. Il tipo di agitazione influisce sul processo di rilascio; infatti l'agitazione tramite agitatore magnetico, più intensa rispetto a quella con agitatore a disco rotante, potrebbe aver causato la rottura o l'erosione della matrice polimerica favorendo così un maggior rilascio di RNA.

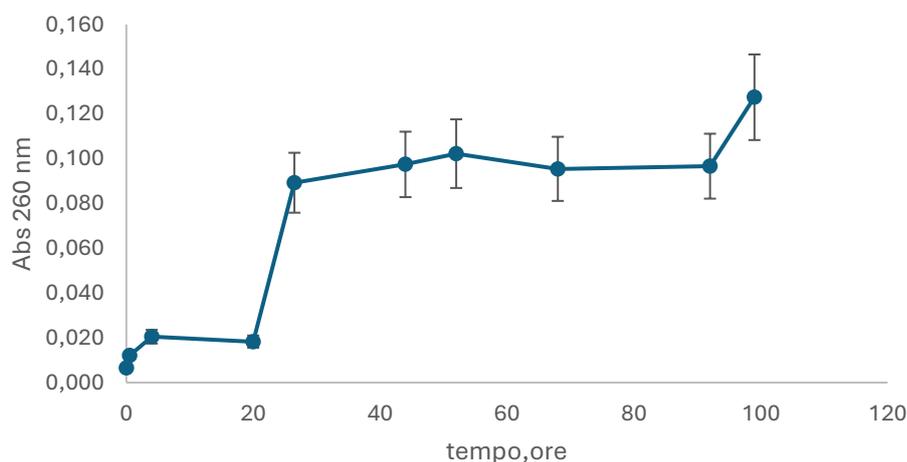


Figura 4.21: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 8 in acido acetico 1%, agitato tramite agitatore magnetico multipiastra. Dopo 26.5 ore sono stati aggiunti 2 mL di acido acetico fresco, raggiungendo, così, un volume totale in becher pari a 4 mL

Tabella 4.22: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 8, in acido acetico 1%, agitato tramite agitatore magnetico multipiastra e relativa quantità in massa di RNA rilasciato nel tempo. Dopo 26.5 ore sono stati aggiunti 2 mL di acido acetico fresco, raggiungendo, così, un volume totale in becher pari a 4 mL

tempo, ore	Abs 260 nm	M_RNA, μg
0	0.007	0.520
0.5	0.012	0.968
4	0.021	1.640
20	0.018	1.464
26.5	0.089	7.144
44	0.098	7.800
52	0.102	8.184
68	0.096	7.640
92	0.097	7.736
99	0.128	10.200

In Figura 4.21 sono riportati i valori di assorbanza a 260 nm, nel tempo, del campione 8 agitato tramite agitatore magnetico multipiastra, mentre in Tabella 4.22 oltre all'assorbanza

sono descritti anche i relativi quantitativi in massa di RNA. Le nanoparticelle sono state immerse per le prime 26.5 ore in 2 mL di acido acetico 1% e hanno riportato un rilascio di RNA pari a 1.464 µg. Successivamente sono stati addizionati 2 mL di acido acetico 1 % fresco, raggiungendo un volume complessivo pari a 4 mL. Dopo l'aggiunta dei 2 mL freschi di acido acetico si è arrivati ad ottenere dopo 72 ore un rilascio di tutto l'RNA che era stato introdotto in Eppendorf.

In conclusione, dai risultati ottenuti si evince che il tipo di agitazione influenza il quantitativo di RNA rilasciato e in particolare l'agitazione tramite agitatore magnetico multipiastra favorisce il processo di rilascio rispetto all'agitatore a disco rotante. Inoltre, si può osservare che nonostante i campioni 8 e 9 siano stati agitati nello stesso modo, tramite agitatore magnetico multipiastra, il campione 8 in seguito all'aggiunta di 2 mL di acido acetico fresco ha rilasciato un quantitativo di RNA significativo e maggiore rispetto al campione 9. Nel caso del campione 8 l'aumento di volume della soluzione di acido acetico genera una maggiore differenza di concentrazione tra nanoparticelle e ambiente esterno, aumentando così la forza spingente e favorendo il processo di rilascio. In alternativa un volume maggiore di acido acetico potrebbe aver favorito il processo di erosione della matrice polimerica favorendo così maggior rilascio di RNA.

Tutti i campioni sono stati sottoposti ad un'analisi dimensionale durante ogni campionamento.

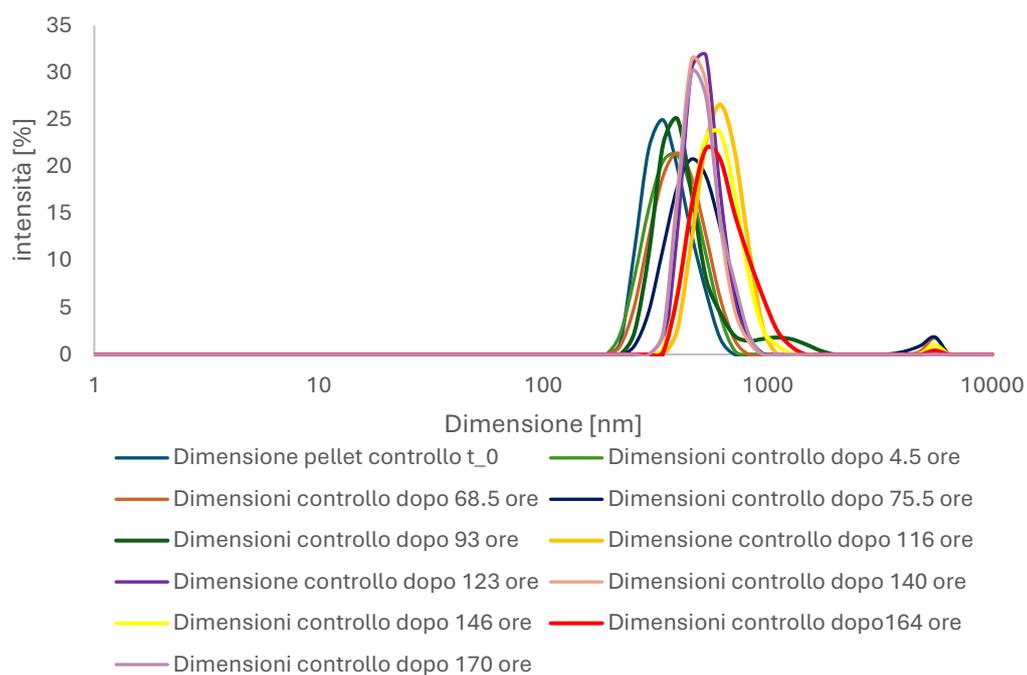


Figura 4.22: Confronto tra le distribuzioni dimensionali nel tempo del controllo agitato su agitatore a disco rotante

In Figura 4.22 sono riportate le distribuzioni dimensionali del controllo nel tempo. Dopo le 116 ore di sospensione del campione in 2 mL di acido acetico le dimensioni del controllo iniziano a spostarsi verso valori dimensionali più alti.

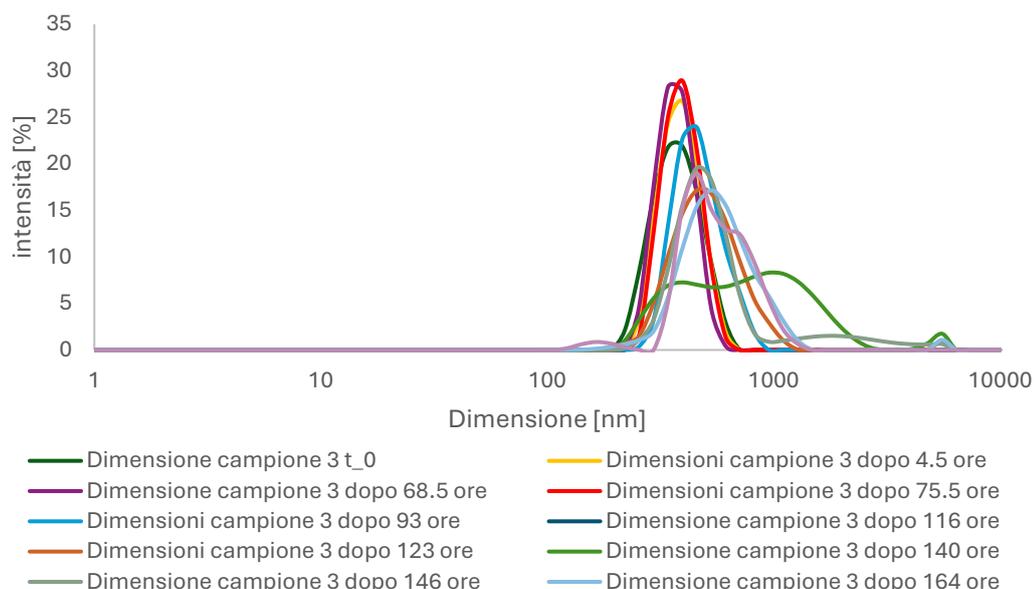


Figura 4.23: Confronto tra le distribuzioni dimensionali nel tempo del campione 3 agitato su agitatore a disco rotante

La Figura 4.23 riporta le distribuzioni dimensionali del campione 3 nel tempo. Il campione 3 dopo circa 93 ore immerso in acido acetico ha mostrato delle distribuzioni dimensionali verso valori maggiori. Inoltre, durante alcuni prelievi si è presentato un andamento che si discosta da quello monomodale, anche se i secondi picchi hanno riportato dei valori di intensità [%] molto bassi.

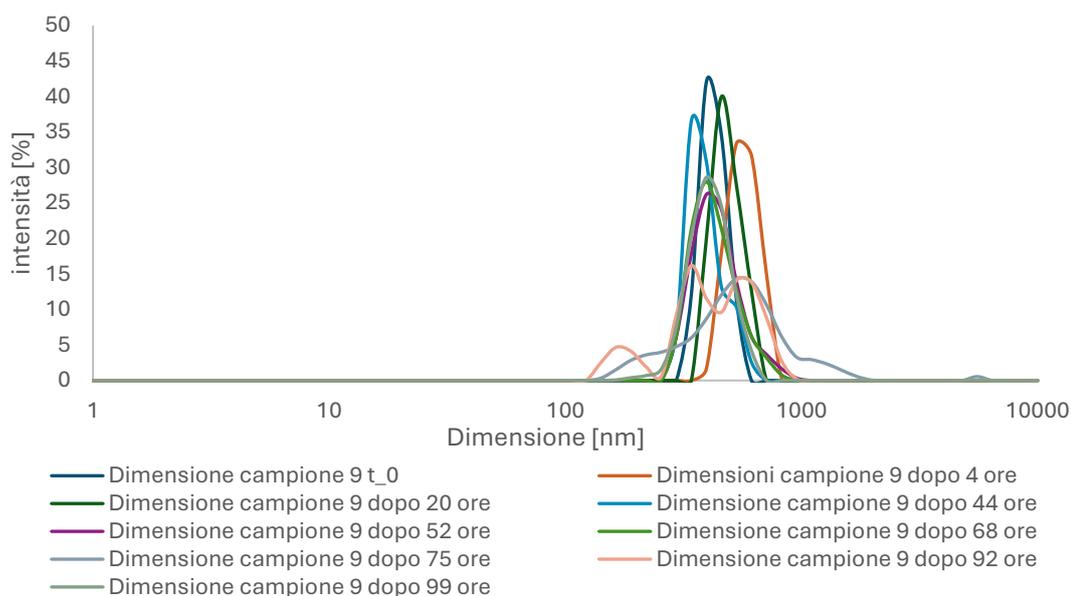


Figura 4.24: Confronto tra le distribuzioni dimensionali nel tempo del campione 9 con agitatore magnetico multipiastra

La Figura 4.24 mostra gli andamenti delle dimensioni del campione 9 nel tempo. Il campione 9 è stato agitato tramite agitatore magnetico multiposizione e a differenza dei campioni

precedenti, che hanno subito un'agitazione tramite agitatore su disco rotante, ha mostrato un andamento della dimensione media non più monomodale già dopo le 75 ore.

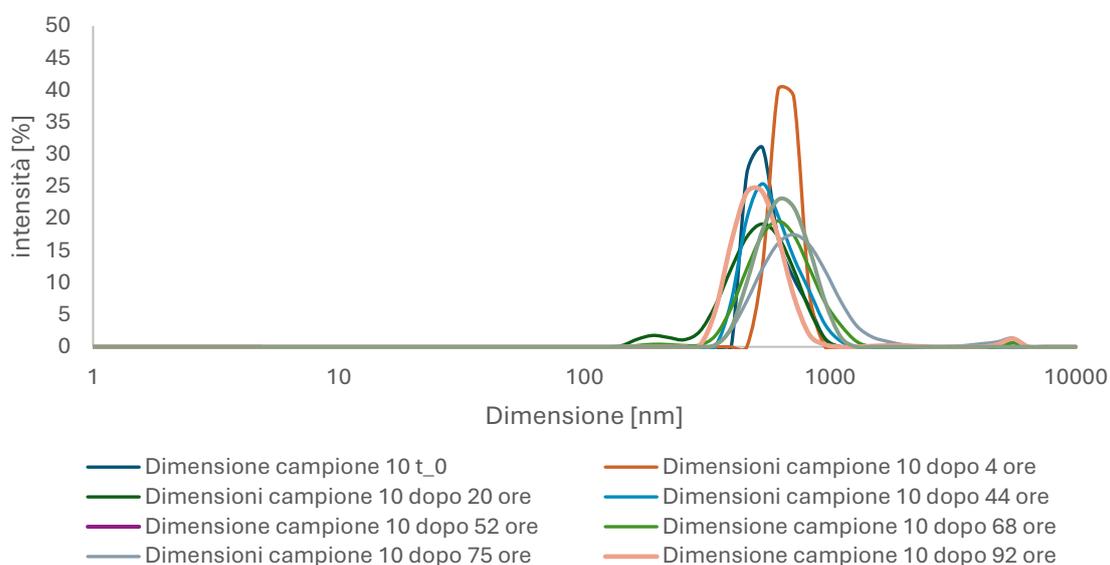


Figura 4.25: Confronto tra le distribuzioni dimensionali nel tempo del campione 10 agitato con rotore di dischi

La Figura 4.25 riporta le distribuzioni granulometriche nel tempo del campione 10, agitato su rotore di dischi, che ha mostrato un andamento della distribuzione media più o meno costante nel tempo.

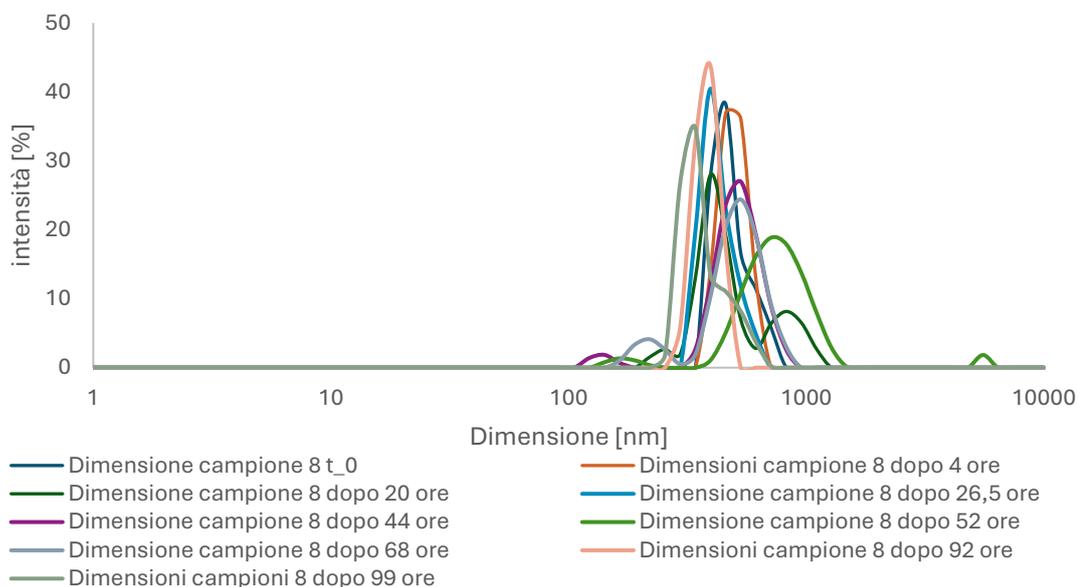


Figura 4.26: Confronto tra le distribuzioni dimensionali nel tempo del campione 8 immerso in 2 mL di acido acetico, agitato tramite agitatore magnetico multipiastra. Dopo 26.5 ore sono stati aggiunti 2 mL di acido acetico 1% fresco raggiungendo un volume complessivo di 4 mL

La Figura 4.26 riporta gli andamenti nel tempo del campione 8 immerso in 2 mL di acido acetico 1%, agitato tramite agitatore magnetico multipiastra. Dopo 26.5 ore sono stati aggiunti 2 mL di acido acetico 1% fresco raggiungendo un volume complessivo pari a 4 mL. Gli andamenti della dimensione media sono più o meno costanti nel tempo. Tuttavia,

con il passare delle ore si è potuto osservare un leggero spostamento delle curve verso sinistra e quindi verso valori dimensionali più bassi. Inoltre, alcune curve hanno riportato la presenza di un secondo picco di intensità bassa intorno al 5-7%.

4.7 Rilascio di RNA da NP immerse in 4 mL di acido acetico 1%

4.7.1 Valutazione del valore di OD₂₆₀ del controllo nel tempo

Analizzando le dimensioni e l'assorbanza del controllo re-disperso in 4 mL di acido acetico 1% e agitato tramite agitatore magnetico multiposizione, come nel caso descritto nel paragrafo 4.5.1, si è osservato che le dimensioni del controllo si sono mantenute nel tempo in un range di valori dimensionali a cui corrispondono valori di assorbanza che variano tra 0.0826 e 0.0941. Dunque, l'intervallo di assorbanza del controllo nel tempo si discosta di circa il 15% dal valore di assorbanza di nanoparticelle senza RNA e concentrazione di chitosano in soluzione solvente pari a 0.02% riportati in Tabella 4.1. Per questo motivo per il calcolo del quantitativo in massa di RNA rilasciato, al valore di assorbanza delle nanoparticelle inglobanti RNA nel tempo verrà sottratto il valore di assorbanza del controllo misurato al tempo t_0 secondo l'equazione (4.17), consapevoli che il quantitativo in massa di RNA calcolato oscilla di \pm il 15 % .

Tabella 4.23: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del controllo re-disperso in 4 mL di acido acetico 1% e le relative dimensioni medie

Controllo in acido acetico nel tempo		
tempo, ore	Dimensione, nm	Abs 260 nm
0	712.4	0.0845
5.5	955.4	0.0912
21	615.1	0.0845
28	712.4	0.0826
45	825.0	0.0941

La Tabella 4.23 riporta i valori di assorbanza a 260 nm del controllo re-disperso in 4 mL di acido acetico 1% nel tempo e le relative dimensioni medie. I valori sono pressoché vicini tra di loro e non mostrano, quindi, una grande variazione nel tempo.

4.7.2 NP inglobanti 10 μ g di RNA immerse in 4 mL di acido acetico 1%

Dato i valori restituiti dal campione 8, descritti nel paragrafo 4.6 si è deciso di condurre un'analisi sul rilascio utilizzando un volume di acido acetico pari a 4 mL e un'agitazione tramite agitatore magnetico multiplastrato. Sono stati preparati 3 campioni di nanoparticelle con concentrazione di chitosano in soluzione solvente pari a 0.02%. (50 μ g) inglobanti 10 μ g di RNA, in particolar modo sono stati prelevati 8 μ L di RNA con concentrazione pari a 1.18 μ g/mL . Il rapporto RNA/CHITOSANO è pari allo 0.2.

I campioni contenenti le nanoparticelle, una volta sintetizzati, sono stati sottoposti ad una procedura di centrifugazione a 16000 rpm per 15 min a 20°C. Il processo di centrifugazione

ha permesso di separare le nanoparticelle sedimentate come corpo di fondo dal buffer acido di sintesi e di re-disperderle in 4 mL di acido acetico 1%.

Il primo prelievo è stato eseguito al tempo $t=0$. Ad ogni intervallo di tempo è stata condotta una valutazione spettrofotometrica di ogni campione di nanoparticelle incorporanti RNA.

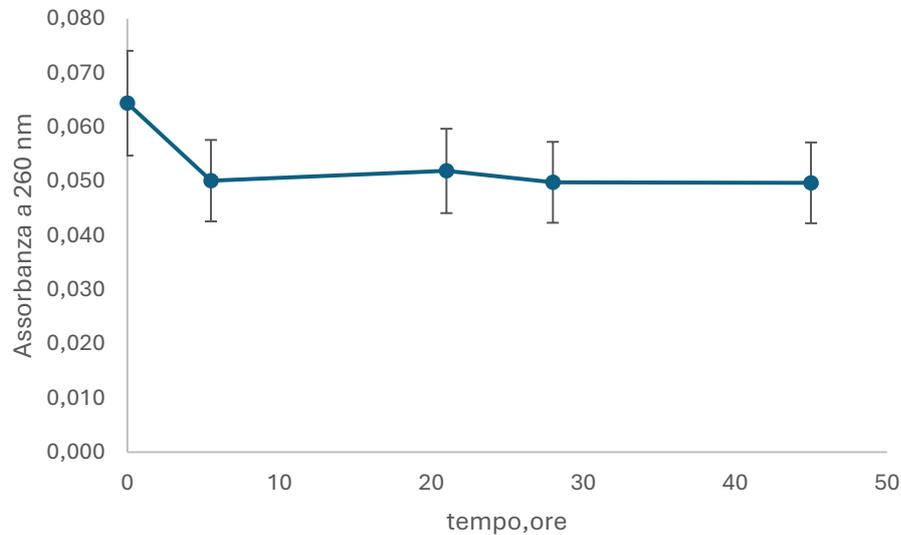


Figura 4.27: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 1 immerso in 4 mL di acido acetico 1% agitato tramite agitatore magnetico multipiastra

In Figura 4.27 sono rappresentati i valori di assorbanza a 260 nm, nel tempo, del campione 1 immerso in 4 mL di acido acetico e agitato tramite agitatore magnetico multipiastra. Dai valori riportati si può osservare un picco di assorbanza al tempo t_0 e poi dei valori di assorbanza che ritornano a diminuire nel tempo.

Tabella 4.24: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 1 in 4 mL di acido acetico 1%, agitato tramite agitatore magnetico multipiastra e relativa quantità in massa di RNA rilasciato nel tempo

tempo, ore	Abs 260 nm	M_RNA, μg
0	0.064	10.304
5.5	0.050	8.016
21	0.052	8.304
28	0.050	7.968
45	0.050	7.952

La Tabella 4.24 mostra i valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 1 in 4 mL di acido acetico 1% agitato tramite agitatore magnetico multipiastra e relativa quantità in massa di RNA rilasciato nel tempo. Come già osservato in Figura 4.27, si ha un rilascio completo di RNA al tempo t_0 pari a circa 10 μg ovvero pari al quantitativo di RNA introdotto in Eppendorf al momento della sintesi. Bisogna considerare che nel calcolo del quantitativo in massa di RNA rilasciato sono state adottate le equazioni (4. 16) e (4. 17) che prevedono l'utilizzo del valore di assorbanza del bianco al tempo t_0 e dunque il calcolo di RNA in massa si porta dietro sempre un certo errore percentuale come descritto nel paragrafo 4.7.1. Quindi i valori in massa

riportati in Tabella 4.24 possono oscillare di un $\pm 15\%$ a seconda del valore di assorbanza di bianco che si adotta per effettuare il calcolo di RNA.

I dati sono coerenti con i valori di efficacia di incapsulamento riportati in Tabella 3.9 dove risulta un'efficacia di incapsulamento globale del 95.84 % di nanoparticelle allo 0.02% di chitosano e rapporto di RNA/CHITOSANO pari a 0.2. In particolare ad un'efficacia del 95.84% corrisponde un quantitativo di RNA incorporato pari a circa 9.6 μg di RNA .

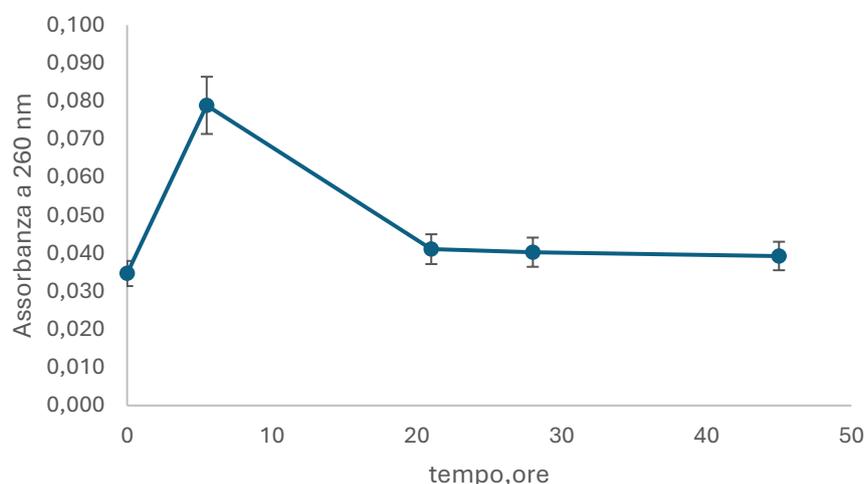


Figura 4.28: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 2 immerso in 4 mL di acido acetico 1% agitato tramite agitatore magnetico multipiastra

La Figura 4.28 mostra gli andamenti dei valori di assorbanza a 260 nm del campione 2 nel tempo immerso in 4 mL di acido acetico 1% e agitato tramite agitatore magnetico multipiastra. Si osserva un picco di rilascio dopo 5.5 ore e poi una diminuzione dei valori di assorbanza.

Tabella 4.25: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 2 immerso in 4 mL di acido acetico 1%, agitato tramite agitatore magnetico multipiastra e relativa quantità in massa di RNA rilasciato nel tempo

tempo, ore	Abs 260 nm	M_RNA, μg
0	0.035	5.552
5.5	0.079	12.624
21	0.041	6.576
28	0.040	6.448
45	0.039	6.288

In Tabella 4.25 sono riportati i valori di assorbanza a 260 nm e i relativi quantitativi in massa di RNA rilasciato nel tempo dal campione 2 immerso in 4 mL di acido acetico all'1% e agitato con agitatore magnetico multiposizione. La quantità di RNA introdotta in Eppendorf è pari a 10 μg , mentre il valore di RNA rilasciato dopo 5.5 ore risulta pari a 12.624 μg e dunque superiore alla quantità realmente introdotta; tuttavia anche in questo caso vale la stessa osservazione fatta per i valori riportati in Tabella 4.26 ovvero che i valori in massa di RNA rilasciato possono oscillare di un $\pm 15\%$ a seconda del valore di assorbanza del controllo che si decide di adottare per effettuare il calcolo di RNA.

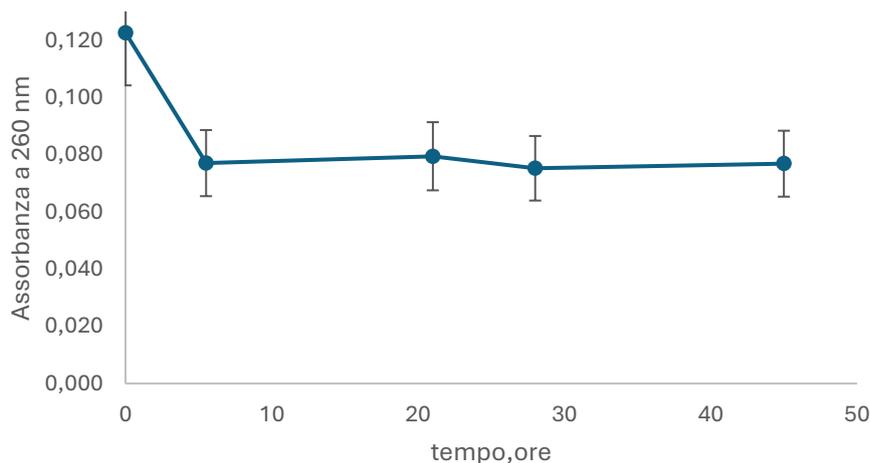


Figura 4.29: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 3, immerso in 4 mL di acido acetico 1% e agitato tramite agitatore magnetico multiplastra

La Figura 4.29 mostra gli andamenti dei valori di assorbanza a 260 nm del campione 3 nel tempo immerso in 4 mL di acido acetico 1% e agitato tramite agitatore magnetico multiplastra. Si osserva un picco di assorbanza al tempo t_0 poi durante il secondo campionamento il valore di assorbanza si abbassa e rimane pressoché costante nel tempo.

Tabella 4.26: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 3 immerso in 4 mL di acido acetico 1%, agitato tramite agitatore magnetico multiplastra e relativa quantità in massa di RNA rilasciato nel tempo

tempo, ore	Abs 260 nm	M_RNA, μg
0	0.123	19.632
5.5	0.077	12.336
21	0.080	12.720
28	0.075	12.048
45	0.077	12.304

Come si può osservare dalla Tabella 4.26, il valore di RNA rilasciato al tempo t_0 è pari a 19.6 μg , quasi il doppio della quantità che è stata introdotta al momento di sintesi; ciò può essere legato ad un campionamento eseguito prima di raggiungere un'omogeneità del sistema. Infatti, generalmente i campionamenti al tempo t_0 vengono effettuati dopo pochi minuti dall'immersione del campione nella soluzione. Questa disomogeneità del sistema al tempo iniziale t_0 si può osservare anche attraverso la distribuzione granulometrica riportata in Figura 4.32, ottenuta tramite analisi al DLS, in cui la curva si presenta con una forma non definita e molto ampia. Nei tempi successivi al t_0 i valori risultano assestarsi attorno ad un quantitativo in massa di RNA pari a 12 μg . Dunque, l'RNA è rilasciato molto velocemente già nelle prime ore e tende poi a rimanere costante nel tempo. Anche in questo caso vale la stessa osservazione fatta per i valori riportati in Tabella 4.24 e Tabella 4.25 ovvero che i valori in massa di RNA rilasciato possono oscillare di un $\pm 15\%$ a seconda

del valore di assorbanza del controllo che si decide di adottare per effettuare il calcolo di RNA.

Anche questa volta è stata eseguita un'analisi dimensionale di tutti i campioni ad ogni intervallo di tempo.

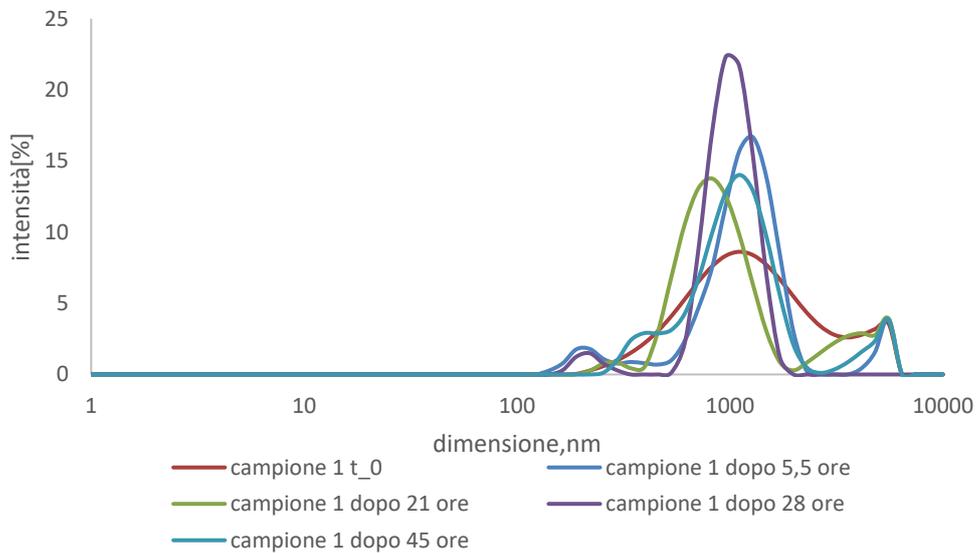


Figura 4.30: Confronto tra le distribuzioni dimensionali del campione 1 nel tempo, immerso in 4 mL di acido acetico 1% e agitato tramite agitatore magnetico multipiastra

In Figura 4.30 sono rappresentate le distribuzioni granulometriche nel tempo del campione 1 immerso in 4 mL di acido acetico agitato tramite agitatore magnetico multiposizione. Le dimensioni risultano essere maggiori rispetto ai casi precedenti, soprattutto ai casi in cui l'agitazione adottata era quella tramite agitatore a disco rotante.

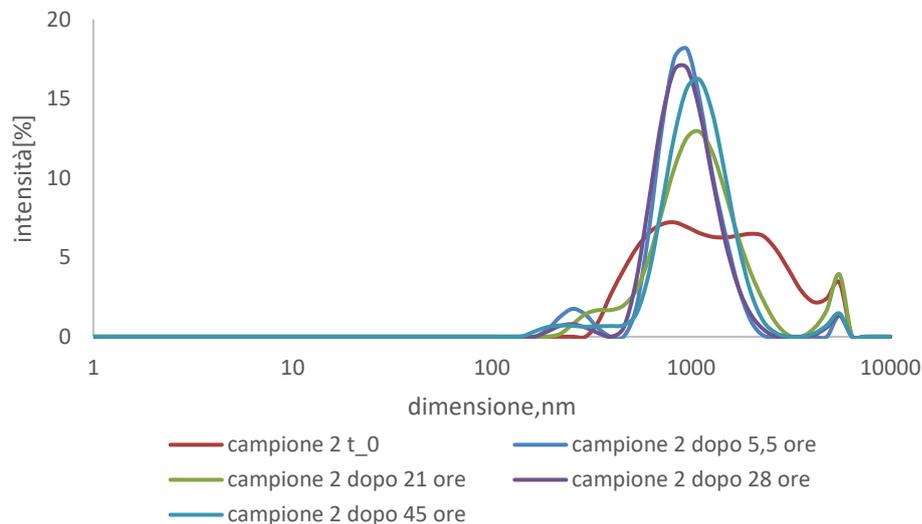


Figura 4.31: Confronto tra le distribuzioni dimensionali del campione 2 nel tempo, immerso in 4 mL di acido acetico 1% e agitato tramite agitatore magnetico multipiastra

La Figura 4.31 mostra gli andamenti dimensionali del campione 2 nel tempo, immerso in 4 mL di acido acetico 1%. Anche nel caso del campione 2 le dimensioni risultano essere maggiori e presentano un andamento non monomodale rispetto ai casi precedenti e soprattutto rispetto ai campioni sottoposti ad agitazione con rotatori di dischi.

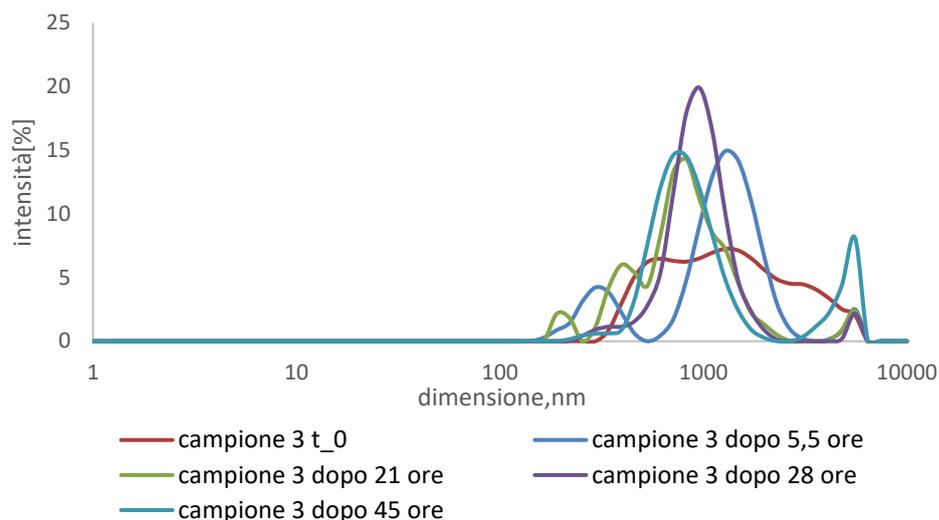


Figura 4.32: Confronto tra le distribuzioni dimensionali del campione 3 nel tempo, immerso in 4 mL di acido acetico 1% e agitato tramite agitatore magnetico multipiastra

La Figura 4.32 riporta le distribuzioni granulometriche del campione 3 nel tempo, immerso in 4 mL di acido acetico 1% e agitato tramite agitatore magnetico multipiastra. Come il campione 1 e il campione 2 anche quest'ultimo campione ha mostrato delle dimensioni non del tutto monomodali e maggiori rispetto ai casi precedenti.

4.7.3 Valutazione del valore di OD₂₆₀ del controllo nel tempo

Si è deciso di effettuare un'ulteriore prova di rilascio, aumentando il quantitativo di RNA incorporato nelle nanoparticelle, che verrà descritta nel paragrafo 4.7.4. Per questo motivo è stato preparato nuovamente un campione privo di RNA e sono stati analizzati i valori di assorbanza e le dimensioni medie nel tempo. Per effettuare il calcolo del valore in massa di RNA rilasciato nel tempo è stato scelto come valore di assorbanza del controllo quello al tempo t₀ e pari a 0.0745. Questo valore di assorbanza si discosta di circa il 18% dal valore di assorbanza di nanoparticelle senza RNA e con concentrazione di chitosano in soluzione solvente pari a 0.02% riportati in Tabella 4.1, di conseguenza bisogna tener conto che i valori in massa di RNA rilasciato nel tempo dai vari campioni analizzati hanno una variabilità di ± 18%.

Tabella 4.27: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del controllo re-disperso in 2 mL di acido acetico 1% e i relativi valori di dimensione

Controllo in acido acetico nel tempo		
tempo, ore	Dimensione, nm	Abs 260 nm
0	458.7	0.0745
5.5	531.2	0.0751
21	458.7	0.0755
28	531.2	0.0748
45	458.7	0.0746

In Tabella 4.27 sono riportati i valori di assorbanza a 260 nm del controllo re-disperso in 2

mL di acido acetico 1% nel tempo agitato tramite agitatore magnetico multiposizione e i relativi valori di dimensione che non variano eccessivamente nel tempo.

4.7.4 NP inglobanti 30 μg di RNA immerse in 4 mL di acido acetico 1%

Sono stati preparati 3 campioni di nanoparticelle con concentrazione di chitosano in soluzione solvente pari a 0.02% (50 μg) inglobanti 30 μg di RNA; in particolare modo sono stati prelevati 37 μL di RNA con concentrazione pari a 804 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Il rapporto RNA/CHITOSANO è pari allo 0.6.

Post centrifugazione a 16000 rpm per 15 min a 20°C è stato possibile sostituire il buffer acido di sintesi con 4 mL di acido acetico 1%. Sono stati effettuati diversi prelievi nel tempo dei campioni preparati che sono poi stati analizzati tramite lo spettrofotometro per individuare un eventuale rilascio di RNA da parte delle nanoparticelle di chitosano.

Tutti i campioni preparati sono stati agitati tramite agitatore magnetico multiposizione.

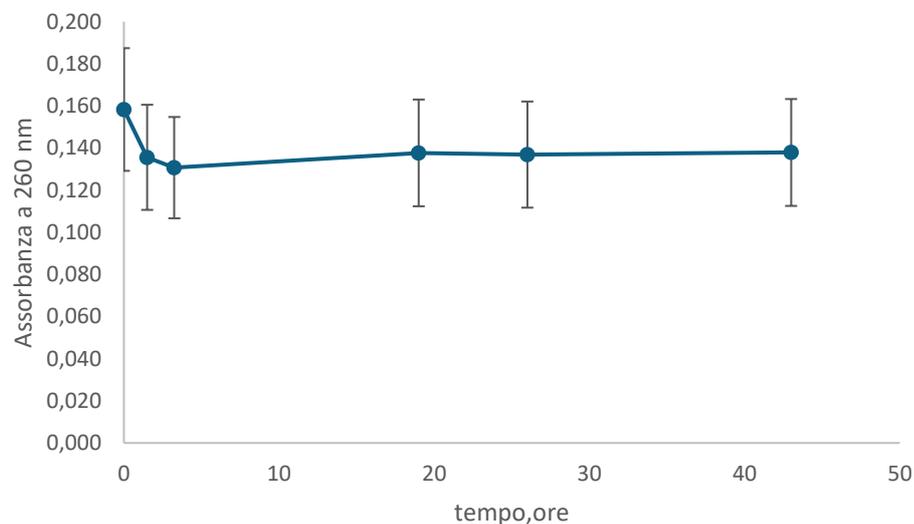


Figura 4.33: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 1, immerso in 4 mL di acido acetico 1% e agitato tramite agitatore magnetico multipiastra

La Figura 4.33 mostra i valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 1 immerso in 4 mL di acido acetico 1% agitato tramite agitatore magnetico multiposizione. L'RNA è stato rilasciato al tempo t_0 e i valori di assorbanza a 260 nm sono poi diminuiti nel tempo.

Tabella 4.28: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 1 immerso in 4 mL di acido acetico 1%, agitato tramite agitatore magnetico multipiastra e relativa quantità in massa di RNA rilasciato nel tempo

tempo, ore	Abs 260 nm	M_RNA, μg
0	0.158	25.3
1.5	0.136	21.7
3.25	0.131	20.9
19	0.138	22.0
26	0.137	21.9
43	0.138	22.1

La Tabella 4.28 riporta i valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 1 in 4 mL di acido acetico 1%, agitato tramite agitatore magnetico multipiastra e relativa quantità in massa di RNA rilasciata nel tempo. Secondo i calcoli di efficacia di incapsulamento riportati in Tabella 3.9 le nanoparticelle sintetizzate con concentrazione di chitosano pari a 0.02% e 30 µg di RNA hanno un'efficacia di incorporamento di RNA pari a l'85,5% a cui corrisponde un quantitativo in massa di RNA pari a circa 25.65 µg. Dunque, osservando i dati in Tabella 4.28, al tempo t_0 il quantitativo in massa di RNA rilasciato è prossimo al quantitativo massimo di RNA incorporato dalle nanoparticelle e dunque è avvenuto un rilascio quasi completo.

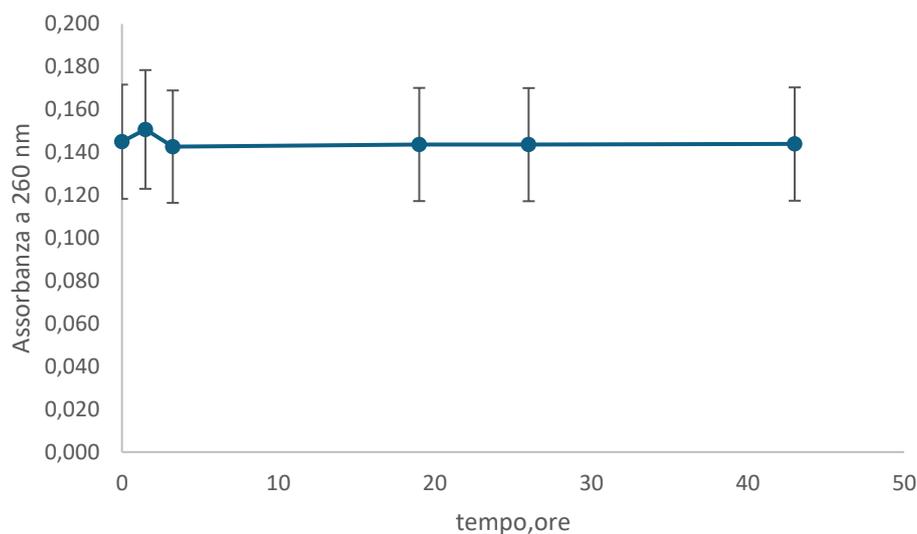


Figura 4.34: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 2 , immerso in 4 mL di acido acetico 1% e agitato tramite agitatore magnetico multipiastra

In Figura 4.34 sono riportati i valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 2 immerso in 4 mL di acido acetico 1% agitato tramite agitatore magnetico multipiastra. Si osserva un picco di rilascio dopo circa 1.5 ore, poi i valori di assorbanza ritornano a diminuire nel tempo.

Tabella 4.29: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 2 immerso in 4 mL di acido acetico 1%, agitato tramite agitatore magnetico multipiastra e relativa quantità in massa di RNA rilasciato nel tempo

tempo, ore	Abs 260 nm	M_RNA, µg
0	0.144	23.1
1.5	0.164	26.2
3.25	0.156	24.9
19	0.152	24.3
26	0.151	24.1
43	0.150	24.0

La Tabella 4.29 riporta i valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 2 in 4 mL di acido acetico 1%, agitato tramite agitatore magnetico multipiastra e relativa quantità in

massa di RNA rilasciata nel tempo. Come già osservato in Figura 4.34, dopo 1.5 ore è stato raggiunto il picco di rilascio corrispondente a un quantitativo in massa di 26.2 μg .

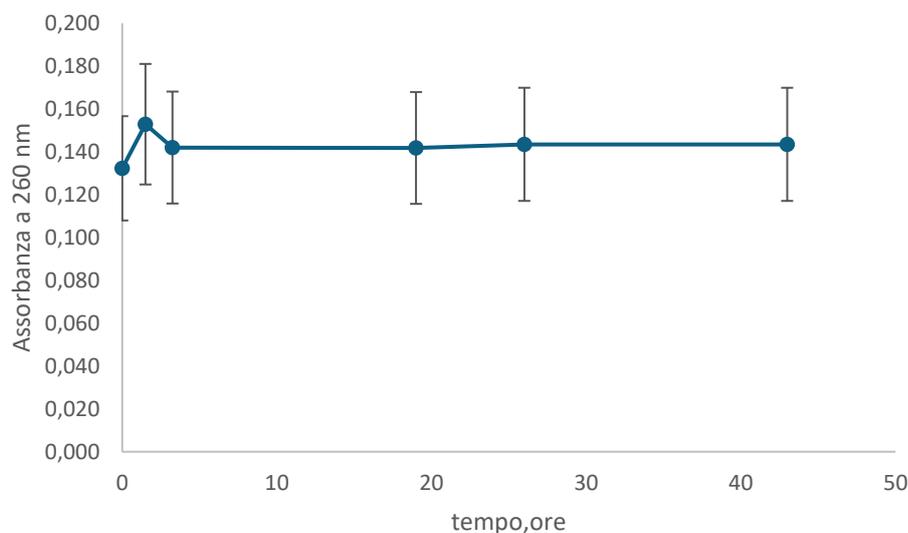


Figura 4.35: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 3, immerso in 4 mL di acido acetico 1% e agitato tramite agitatore magnetico multipiastra

La Figura 4.35 mostra i valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 3, immerso in 4 mL di acido acetico 1% e agitato tramite agitatore magnetico multipiastra. Anche in questo caso come nei casi del campione 1 e 2 si osserva un picco di rilascio dopo circa 1.5 ore, poi i valori di assorbanza ritornano a diminuire nel tempo.

Tabella 4.30: Valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 3 immerso in 4 mL di acido acetico 1%, agitato tramite agitatore magnetico multipiastra e relativa quantità in massa di RNA rilasciato nel tempo

tempo, ore	Abs 260 nm	M_RNA, μg
0	0.132	21.2
1.5	0.153	24.5
3.25	0.142	22.7
19	0.142	22.7
26	0.144	23.0
43	0.144	23.0

La Tabella 4.30 riporta i valori di assorbanza a 260 nm nel tempo del campione 3 in 4 mL di acido acetico 1%, agitato tramite agitatore magnetico multipiastra e relativa quantità in massa di RNA rilasciato nel tempo. Il quantitativo massimo di RNA rilasciato è pari a 24.5 μg molto vicino a quello che le nanoparticelle possono incorporare che è pari a 25.65 μg .

Successivamente sono state eseguite per ogni campionamento delle misure al DLS per monitorare le dimensioni nel tempo dei vari campioni.

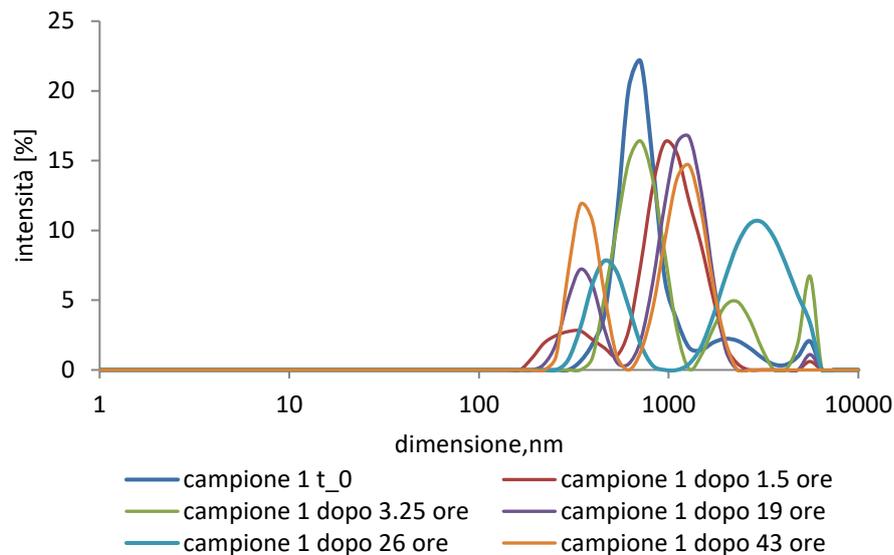


Figura 4.36: Confronto tra le distribuzioni dimensionali del campione 1 nel tempo, immerso in 4 mL di acido acetico 1% e agitato tramite agitatore magnetico multipiastra

Come si può notare in Figura 4.36, le dimensioni delle nanoparticelle del campione 1 nel tempo, immerso in 4 mL di acido acetico 1% e agitato tramite agitatore magnetico multipiastra, sono molto più grandi rispetto a quelle restituite dalle prove eseguite con agitatore a disco rotante e presentano, inoltre, degli andamenti bimodali. L'effetto di agitazione tramite piastra magnetica, già nel caso di nanoparticelle con concentrazione di chitosano pari a 0.02% e 10 µg di RNA aveva riportato degli andamenti dimensionali maggiori e non monomodali (vedi Figura 4.30; Figura 4.31; Figura 4.32), tuttavia in quest'ultima prova in cui sono stati preparati campioni contenenti nanoparticelle con concentrazione di chitosano pari a 0.02% e 30 µg di RNA, l'effetto di agitazione tramite agitatore magnetico multiposizione è molto più accentuato, infatti le dimensioni nel tempo diventano sempre più grandi e bimodali discostandosi da quelle al tempo t_0 .

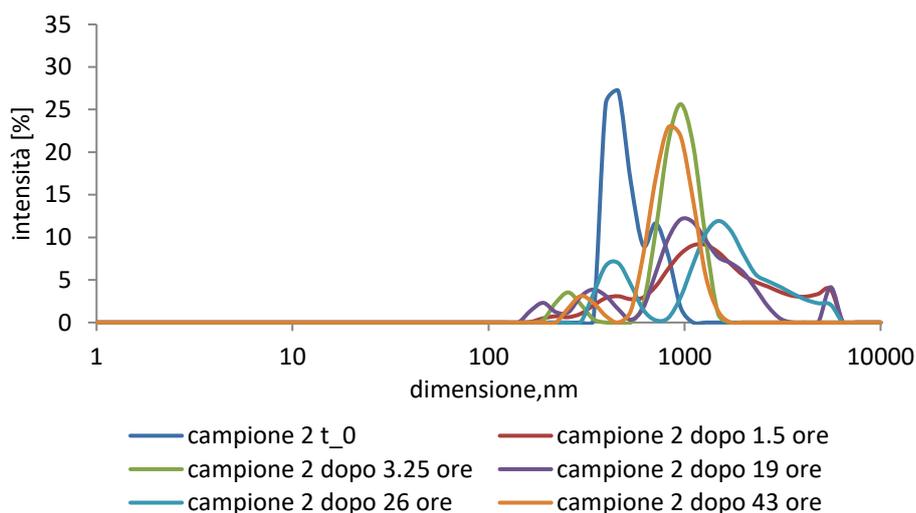


Figura 4.37: Confronto tra le distribuzioni dimensionali del campione 2 nel tempo, immerso in 4 mL di acido acetico 1% e agitato tramite agitatore magnetico multipiastra

In Figura 4.37 sono riportate le distribuzioni dimensionali del campione 2 immerso in 4 mL di acido acetico 1%. Come nel caso del campione 1, anche in questo caso le dimensioni

medie sono maggiori rispetto a tutti gli altri casi riportati nei paragrafi precedenti: 4.5; 4.6 e 4.7.2 e mostrano inoltre andamenti bimodali.

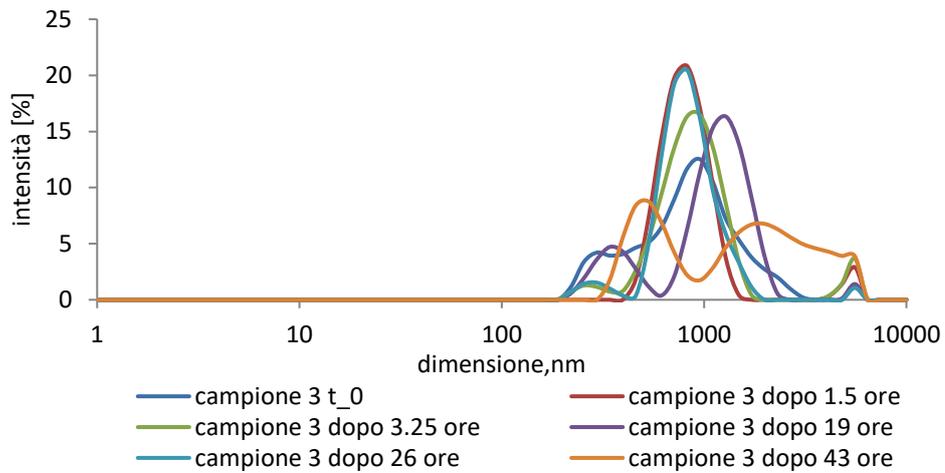


Figura 4.38: Confronto tra le distribuzioni dimensionali del campione 2 nel tempo immerso, in 4 mL di acido acetico 1% e agitato tramite agitatore magnetico multipiastra

La Figura 4.38 mostra le distribuzioni dimensionali del campione 3 immerso in 4 mL di acido acetico 1%. Ancora una volta, come in Figura 4.36 e Figura 4.37, anche in questo caso le dimensioni medie sono maggiori rispetto agli altri casi (vedere paragrafi: 4.5; 4.6 e 4.7.2) e presentano andamenti bimodali.

5 Conclusioni

L'obiettivo di questo lavoro di Tesi è stato quello di studiare il rilascio di RNA da nanoparticelle di chitosano. Attraverso lo studio dei modi e dei tempi in cui avviene il rilascio di principi attivi da nanoparticelle è possibile controllare la farmacocinetica, la farmacodinamica del farmaco al fine di migliorare l'efficienza e di agire in maniera mirata contro malattie debilitanti.

Per prima cosa è stato preparato il terreno di coltura necessario per la crescita del lievito *Saccharomyces cerevisiae* da cui è stato estratto l'RNA tramite l'utilizzo del kit RiboPure™ – Yeast Kit™.

Successivamente si è passati alla sintesi di nanoparticelle di chitosano che sono state preparate seguendo il metodo di nanoprecipitazione mediante l'utilizzo dell'agitatore *Vortex*. Per controllare e prevedere il comportamento delle nanoparticelle è stato necessario condurre delle analisi di caratterizzazione in termini di dimensione media, polidispersità, potenziale zeta ed efficacia di incapsulamento.

In una prima fase è stata eseguita la sintesi di nanoparticelle senza introduzione di RNA al fine di trovare quali potessero essere le migliori concentrazioni di chitosano in grado di restituire nanoparticelle con dimensioni nanometriche più basse e con un valore di potenziale zeta più alto. In particolare, sono state sintetizzate nanoparticelle con concentrazioni di chitosano nella soluzione solvente comprese tra lo 0.02% e lo 0.2%. Da questo studio è emerso che le nanoparticelle ottenute con una concentrazione di chitosano pari a 0.02% hanno restituito dei valori di dimensione media più bassi pari a 500 nm e un potenziale zeta più alto pari a 7.3 mV. Si è proseguito, quindi, con la sintesi di nanoparticelle con concentrazione di chitosano in soluzione solvente pari a 0.02% e con diversi quantitativi di RNA pari a 0.724 μg , 2.3 μg , 10 μg , 30 μg corrispondenti rispettivamente ai seguenti rapporti RNA/CHITOSANO: 0.014; 0.046; 0.2; 0.6.

Relativamente all'analisi dei valori di efficacia di incapsulamento, i risultati più elevati sono stati ottenuti con i rapporti RNA/CHITOSANO più alti, pari a 0,2 e 0,6, che hanno mostrato rispettivamente un'efficacia del 95,8% e dell'85,5%.

La seconda fase del lavoro ha previsto lo studio del rilascio di RNA da nanoparticelle di chitosano. Prima di eseguire le prove di rilascio vero e proprio di RNA, è stato necessario svolgere degli studi preliminari. Sono stati preparati diversi campioni: alcuni contenenti esclusivamente RNA, altri RNA combinato con nanoparticelle di chitosano, e altri ancora costituiti solo da nanoparticelle di chitosano. L'obiettivo è stato quello di valutare l'influenza delle nanoparticelle di chitosano sulla misurazione dei valori di assorbanza a 260 nm. Dalle analisi spettrofotometriche è emerso che le nanoparticelle influenzano la lettura a 260 nm; perciò, è stato necessario sottrarre il loro contributo dal valore totale di assorbanza in modo da poter ottenere un valore che rappresenti esclusivamente il contributo dell'RNA. Il contributo delle nanoparticelle e dei vari *buffer*, in cui esse sono sospese, che deve essere sottratto al valore complessivo di assorbanza prende il nome di bianco. Per determinare il valore del bianco, è stato necessario condurre uno studio aggiuntivo in cui sono stati analizzati i valori di assorbanza e le dimensioni medie delle nanoparticelle prive di RNA, con una concentrazione di chitosano in soluzione solvente pari allo 0,02%, immerse in PBS e acido acetico all'1%. Queste soluzioni sono state poi utilizzate per lo studio del rilascio. I risultati hanno mostrato che l'assorbanza a 260 nm e la dimensione media delle nanoparticelle rimangono pressoché costanti nel tempo. Di conseguenza, è stato scelto come valore del bianco l'assorbanza delle nanoparticelle prive di RNA al tempo iniziale.

Inoltre, sintetizzando nanoparticelle prive di RNA e con concentrazioni di chitosano pari a 0.02%; 0.06% e 0.1%, a cui corrispondono dei valori di assorbanza a 260 nm

rispettivamente di 0.0913; 0.1930; 0.3293, è stato possibile osservare che una variazione significativa di assorbanza a 260 nm si ottiene solo se si registrano delle importanti variazioni dimensionali, cosa che si è verificata utilizzando delle concentrazioni di chitosano nelle soluzioni solventi differenti ma non nel caso delle nanoparticelle prive di RNA e immerse in PBS o acido acetico all'1%.

Dal confronto del valore di assorbanza dei bianchi al tempo iniziale e del valore di assorbanza pari a 0.0913 delle nanoparticelle prive di RNA con concentrazione di chitosano pari allo 0,02%, è emerso che i valori si discostano di circa il 15-20%. Pertanto, ogni volta che dal valore di assorbanza, letto dal campione sottoposto a rilascio, si sottrae quello del bianco per risalire al quantitativo di RNA si commette un errore di $\pm 15-20\%$ dovuto appunto all'incertezza del bianco sottratto per effettuare i calcoli.

L'ultimo studio preliminare eseguito ha evidenziato l'interazione esistente tra RNA, nanoparticelle e diverse soluzioni (buffer acidi di sintesi, PBS e acqua priva di nucleasi). Da qui è emersa l'importanza di rimuovere il buffer acido di sintesi mediante centrifugazione prima di sospendere le nanoparticelle nelle soluzioni destinate al rilascio. Questa procedura si è resa necessaria poiché il *buffer* acido interferisce con la corretta misurazione dell'assorbanza dell'RNA.

Infine, si è passati allo studio sul rilascio in cui le nanoparticelle sono state introdotte in soluzioni differenti. La prima analisi ha previsto la re-disperzione delle nanoparticelle (0.02% di chitosano e incorporanti 10 μg di RNA) in 2 mL di PBS a pH 7.4 e un'agitazione tramite agitatore a disco rotante. I dati ottenuti hanno mostrato un quantitativo di RNA rilasciato molto basso e pari a 1.87 μg . Si è deciso, quindi, di proseguire lo studio del rilascio sostituendo il PBS con 2 mL di soluzione di acido acetico 1% e questa volta alcuni dei campioni sono stati agitati tramite agitatore magnetico multiposizione e altri con agitatore a disco rotante. Utilizzando due metodi di miscelazione differenti è stato possibile osservare l'influenza che il tipo di miscelazione ha su tempi e modi di rilascio. Si può dedurre che le nanoparticelle agitate tramite agitatore magnetico multiposizione rilasciano un quantitativo di RNA maggiore però sono soggette ad un aumento dimensionale nel tempo più significativo e inoltre non restituiscono un andamento monomodale, come avviene invece nel caso di quelle agitate tramite agitatore a disco rotante. In aggiunta, è stato studiato anche l'effetto del volume della soluzione sul processo di rilascio. A tal fine, sono stati addizionati a un campione, agitato tramite agitatore magnetico multiposizione e già immerso da circa 26 ore in 2 mL di acido acetico 1%, altri 2 mL di acido acetico 1% fresco, portando il volume totale a 4 mL. Dopo l'aggiunta della soluzione fresca, si è osservato un rilascio significativo di RNA. Da qui la decisione di re-disperdere le nanoparticelle in 4 mL di soluzione. Infine, si è deciso di condurre un ulteriore studio, mantenendo costante la concentrazione di chitosano disciolto in soluzione solvente pari a 0.02%, e aumentando il quantitativo di RNA incorporato dalle nanoparticelle da 10 μg a 30 μg . I risultati ottenuti in entrambi i casi sono simili, ovvero l'RNA è stato rilasciato abbastanza velocemente già durante le prime ore.

Abbreviazioni

Abs : Assorbanza

CS: Chitosano

DLS: Dynamic Light Scattering

EE: Efficacia di incapsulamento

NP: Nanoparticelle

OD: Densità ottica

PDI: Indice di polidispersità

TMC: N,N,N-trimetil

TPP: Tripolifosfato

Bibliografia

- Ahmed, T. & Aljaeid, B., 2016. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Des Devel Ther*, Volume 10, pp. 483-507.
- Alshawwa, S. Z. et al., 2022. Nanocarrier Drug Delivery Systems: Characterization, Limitations, Future Perspectives and Implementation of Artificial Intelligence. *Pharmaceutics*, 14(4), p. 883.
- Anton Paar, n.d. *The principles of dynamic light scattering*. [Online] Available at: <https://wiki.anton-paar.com/en/the-principles-of-dynamic-light-scattering/> [Accessed 15 ottobre 2024].
- Antoniou, V. et al., 2024. Gene Therapy with Chitosan Nanoparticles: Modern Formulation Strategies for Enhancing Cancer Cell Transfection. *Pharmaceutics*, 16(7), p. 868.
- Aranaz, I. et al., 2021. Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers(Basel)*, 13(19).
- Barreras-Urbina, C. et al., 2016. Nano- and Micro-Particles by Nanoprecipitation: Possible Application in the Food and Agricultural Industries. *International Journal of Food*, 19(9), pp. 1915-1916.
- Betti, V., 2018. Misure ottiche per l'analisi non distruttiva di matrici tridimensionali di alginato. Tesi di laurea, Università di Bologna.
- Boroumand, H. et al., 2021. Chitosan-Based Nanoparticles Against Viral Infections. *Front Cell Infect Microbiol*, Volume 11.
- Bozkir, A. & Saka, O. M., 2004. Chitosan Nanoparticles for Plasmid DNA Delivery: Effect of Chitosan Molecular Structure on Formulation and Release Characteristics. *Drug Delivery*, 11(2), pp. 107-112.
- Bukackova, M., Rusnok, P. & Marsalek, R., 2018. Mathematical Methods in the Calculation of the Zeta Potential of BSA. *J Solution Chem*, Volume 47, pp. 1942-1952.
- Carrillo, C. et al., 2014. Chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery systems: Determination of loading efficiency. *Biomed Pharmacother*, 68(6), pp. 775-783.
- Cerini, S., 2024. Dynamic Light Scattering (DLS). *Dipartimento di chimica industriale "Toso Montanari" Alma Mater Studiorum Università di Bologna*.
- Cozzi, P., 2021. *Dalle nanoparticelle rivestite di membrana cellulare geneticamente modificata, un sistema di drug delivery ancora più circoscritto*. [Online] Available at: <https://tech4future.info/nanotecnologie-ingegneria-genetica-drug-delivery/> [Accessed 17 Ottobre 2024].
- Dobhal, A. et al., 2017. Chitosan-Based Nanoparticulate Systems: Implication Towards Therapeutics Application. *Particulate Technology for Delivery of Therapeutics*, pp. 167-225.
- Dubey, S. et al., 2016. Nanobiomaterials: Novel nanoplatforms for protein and peptide delivery. *Nanobiomaterials in Drug Delivery*, Volume 9, pp. 111-146.
- Gorgoglione, F., 2022. Preparazione e caratterizzazione chimico-fisica di nanoparticelle contenenti quercetina, come potenziali vettori per il trattamento di lesioni uterine maligne. Tesi di laurea, Università politecnica delle Marche.

- Grassi, L., 2013-2014. Preparazione e caratterizzazione di nanoparticelle polimeriche per il rilascio di peptidi ad attività antimicrobica. Tesi di laurea, Università di Pisa.
- Gressler, S., Hipfinger, . C., Pavlicek, A. & Zaf, C., 2024. Overview and categorization of nanocarriers. *Umwelt Bundesamt*, Volume 16.
- Karaianni, M. et al., 2023. Chitosan-Based Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery: Technological Aspects, Applications, and Future Perspectives. *Pharmaceutics*, 15(7).
- Labcompare, n.d. *Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer*. [Online] Available at: <https://www.labcompare.com/106-Spectrophotometer/13426557-Multiskan-Sky-Microplate-Spectrophotometer/> [Accessed 16 Settembre 2024].
- Lai, F., 2020. *Appunti del corso Tecnologia Farmaceutica Applicata, Università degli Studi di Cagliari*.
- Lazaro Garcia, A., 2014. Nano-silice production at low temperatures from the dissolution of olivine-Synthesis, tailoring and modelling. Tesi di dottorato, Eindhoven University of Technology, Paesi Bassi.
- Lipari, M., 2021. Studio sperimentale e modellistico della cristallizzazione di farmaci e biofarmaci. Tesi di laurea, Politecnico di Torino.
- LLG Labware, n.d. *Disc rotator LLG-uniLOOPMIX 2*. [Online] Available at: https://shop.llg-labware.com/info1295-disc-rotator-llg-uniloopmix-2_lang_UK.htm?UID=55006308b1c8000000000000 [Accessed 20 Ottobre 2024].
- Malvern Panalytical, n.d. *What is multiple scattering?*. [Online] Available at: <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/faqs/160719faqmultiplescattering> [Accessed 21 Settembre 2020].
- Masotti, A. et al., 2008. A novel method to obtain chitosan/DNA nanospheres and a study of their properties. *Nanotechnology*, 19(5).
- Mele, S., 2016. Nuova implementazione di un circuito A microcontrollore per la gestione dei parametri illuminotecnici e termici di una sorgente a LED con cromaticità variabile. Tesi di laurea, Università di Padova.
- Neuroscienze Pharmaness Scarl, CSGI-Università di Cagliari & Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, Cagliari, 2006. Progetto Cluster Biomedicina e Tecnologie per la Salute. Documento 2.2 PARTE B Nanotecnologie e biomedicina.
- Ranieri, 2021-2022. Appunti del Corso di Proprietà di biopolimeri, Università degli studi di Trieste.
- Ricci, M., 2002. Nanoparticelle e direzionamento sito-specifico di farmaci-Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco - Università di Perugia. *Presentato all'incontro Le micro/nanotecnologie nei settori biomedicale, farmaceutico, biotecnologico: la rivoluzione industriale appena iniziata?* (Federchimica - Cnr), Milano, maggio 2001 , Volume 84, p. 57.
- Rossi, L., 2022. *Nanoparticelle come sistema di trasporto dell'RNA per la terapia genica*. [Online] Available at: <https://www.fibrosicisticaricerca.it/progresso-di-ricerca/nanoparticelle-come->

sistema-di-trasporto-dellrna-per-la-terapia-genica/

[Accessed 25 settembre 2024].

Samrot, A., Kuppa, S., Nagarajan, S. & Renitta, E., 2021. The Synthesis, Characterization and Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) and PHA-Based Nanoparticles. *Polymers*, 13(19).

Sigma-Aldrich, n.d. *Chloride Cell Test Reagent (109951), Merck..* [Online] Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/mm/10995> [Accessed 28 Settembre 2024].

Sinergica soluzioni su misura, 2023. Spettrofotometro: a cosa serve e come funziona.

Soppimath, K., Aminabhavi, T., Kulkarni, A. & Rudzinski, W., 2000. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70(1-2), pp. 1-20.

Thermo Fisher Scientific, s.d. *RiboPure™-Yeast Kit.* [Online] Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM1926/tabs?defaultTab=2> [Consultato il giorno 4 Maggio 2024].

Yichao, W., Puwang, L., Thao, T. & Juan, Z., 2016. Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomaterials (Basel)*, 6(2), p. 26.

Ringraziamenti

Colgo l'occasione per ringraziare i miei relatori Prof. Davide Fissore e Prof.ssa Francesca Bosco, i quali con attenzione e dedizione mi hanno accompagnato e supportato lungo tutto il percorso di ricerca.

Ringrazio anche la Dottoressa Chiara Mollea per i suoi consigli e insegnamenti.

Un grazie speciale anche alla mia famiglia che mi ha sempre guidata e supportata in ogni mia scelta.