

POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica e
dei Processi Sostenibili



Tesi di Laurea Magistrale

**Uso della Dissipative Particle Dynamics
per simulare l'incapsulamento di farmaci
all'interno di micelle di Pluronic F68**

Relatori

Prof. Daniele Marchisio

Prof. Gianluca Boccardo

Dott.ssa Nunzia Lauriello

Candidato

Edoardo Matta

Ottobre 2025

Sommario

La somministrazione di farmaci nell'organismo umano rappresenta un tema centrale nelle scienze farmaceutiche, che coinvolge spesso l'impiego di composti anfifilici come carriers su scala nanometrica. In questo ambito, i Pluronic sono ampiamente studiati grazie alle loro caratteristiche di biocompatibilità e termosensibilità. Si tratta di copolimeri anfifilici non ionici costituiti da una catena centrale idrofoba di polipropilene ossido (PPO) e da due catene laterali idrofile di polietilene ossido (PEO). Grazie alla loro natura anfifilica, i Pluronic si auto-assemblano in strutture micellari in soluzione acquosa al di sopra di una concentrazione e di una temperatura critiche, note rispettivamente come CMC e CMT. Tra questi, un sistema particolarmente interessante è rappresentato dal Pluronic F68 che, in soluzione acquosa al 45% in peso, mostra una peculiare transizione termosensibile. A temperature elevate, esso si organizza in una struttura sopra molecolare ordinata, in particolare una fase cubica a corpo centrato (BCC), caratterizzata da un comportamento reologico di tipo solido. Questa transizione risulta di particolare interesse per le applicazioni di drug delivery. Questo lavoro di tesi si propone di esplorare l'uso della Dissipative Particle Dynamics per simulare due sistemi di incapsulamento farmaco/polimero, composti rispettivamente da Pluronic F68 e Diclofenac e da Pluronic F68 e Diclofenac sodico, un farmaco antinfiammatorio non steroideo ampiamente utilizzato. L'obiettivo è quello di fornire supporto agli esperimenti analizzando il comportamento strutturale e la capacità di incapsulamento. Per ognuno dei sistemi vengono considerate quattro diverse concentrazioni di farmaco, ossia 0.015 mol/L, 0.020 mol/L, 0.075 mol/L e infine 0.100 mol/L. La Dissipative Particle Dynamics (DPD) è una tecnica di simulazione a scala mesoscopica, in grado di esplorare il mesoscale, una regione non accessibile alle simulazioni pienamente atomistiche, ma fondamentale per descrivere la formazione della microstruttura e il suo impatto sulle proprietà reologiche. Il vantaggio computazionale della DPD deriva dal fatto che questa tecnica adotta un approccio coarse-grained, in cui gruppi di atomi vengono rappresentati come unità più grandi, chiamate beads, semplificando così la descrizione rispetto alle simulazioni atomistiche. Tutte le simulazioni sono state eseguite utilizzando LAMMPS.

Indice

Introduzione	12
1 Introduzione ai Drug Delivery Systems (DDSs)	14
1.1 Introduzione ai Polossameri	15
1.2 Aggregazione e formazione delle micelle	16
1.3 Il Diclofenac, un farmaco anti-infiammatorio non steroideo (FANS)	19
2 Metodologia	22
2.1 La Dissipative Particle dynamics: una tecnica <i>coarse-graining</i>	23
2.2 Equazioni del modello	24
2.2.1 Algoritmi di integrazione temporale	25
2.2.2 Equazione di Fokker-Plank	27
2.2.3 Scelta dei parametri	28
2.2.4 Teoria dei polimeri di Flory-Huggins	30
2.2.5 Fattori di conversione	32
2.3 Dettagli del modello e scelta dei parametri	33
2.3.1 Pluronic F68 in acqua: modello DPD e parametri	33
2.3.2 Parametrizzazione estesa all'intero sistema DDS con Diclofenac	36
2.3.3 Parametrizzazione estesa all'intero sistema DDS con Diclofenac sodico	38
2.4 Interazione elettrostatica nella Dissipative Particle Dynamics	40
2.5 Proprietà analizzate	42
2.5.1 Funzione di distribuzione radiale (RDF)	42
2.5.2 Profili di densità radiale (RDP)	44
2.5.3 Efficienza di incapsulamento	44
3 Dettagli computazionali	46
4 Analisi dei risultati	52
4.1 Sistema acqua e Pluronic F68	52
4.2 Sistema acqua, Pluronic e Diclofenac	56
4.2.1 Analisi profili RDP	58
4.2.2 Analisi efficienza di incapsulamento	62
4.3 Sistema acqua, Pluronic e Diclofenac sodico	63
4.3.1 Analisi profili RDP	65
4.3.2 Analisi efficienza di incapsulamento	70

5 Conclusioni	72
Bibliografia	74
Ringraziamenti	78

Elenco delle figure

1.1	Schema relativo ai sistemi NDDS: nanosospensioni, microemulsioni, nanoliposomi, micelle, nanocapsule e nanoparticelle solide lipidiche (immagine estratta e rielaborata da [2]).	15
1.2	Schema relativo alla struttura di un Polossamero (immagine estratta da [3]).	16
1.3	Diagramma "Pluronic Grid" utilizzato per la classificazione dei Pluronici in base al peso molecolare del segmento di PPO e contenuto di PEO (immagine estratta da [3]).	17
1.4	Diagrammi relativi alla Temperatura Critica Micellare al variare della concentrazione di diversi Pluronici e in funzione del numero di segmenti di EO (immagini estratte da [7]).	17
1.5	Diagramma di fase del Pluronic F68 in soluzione acquosa (immagine estratta da [8])	18
1.6	Illustrazione del sito di azione dei FANS. NSAIDs è il corrispettivo inglese di FANS, ossia "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs" (immagine estratta da [11]).	19
1.7	Illustrazione della struttura chimica del Diclofenac (immagine estratta da [12]).	20
2.1	Andamento relativo all'energia libera e al potenziale chimico secondo il modello di Flory-Huggins per $N_A = N_B = 1$ (immagine estratta e rielaborata da [17]).	30
2.2	<i>Beads</i> ottenute attraverso la procedura di <i>coarse-graining</i> , relative rispettivamente al PEO, PPO e H ₂ O.	34
2.3	Topologia DPD per una macromolecola di F68.	34
2.4	<i>Beads</i> rappresentative del Diclofenac.	36
2.5	Topologia DPD di diverse molecole di Diclofenac.	36
2.6	<i>Beads</i> rappresentative del Diclofenac sodico.	38
2.7	Topologia DPD di diverse molecole di Diclofenac sodico.	38
2.8	Illustrazione dello schema utilizzato per la stima di RDF (immagine estratta e rielaborata da [38]).	43
4.1	Snapshot raffigurante il comportamento di PPO all'interno del <i>dominio computazionale tridimensionale</i> , (immagine ottenuta attraverso il software OVITO [41])	52
4.2	Snapshots raffiguranti l'interazione tra PPO e H ₂ O all'interno del dominio computazionale tridimensionale, (immagine ottenuta attraverso il software OVITO [41]).	53

4.3	Snapshot raffigurante il comportamento del Pluronic F68 all'interno del <i>dominio computazionale tridimensionale</i> , (immagine ottenuta attraverso il software OVITO [41]).	54
4.4	Snapshots raffiguranti due diverse micelle di Pluronic F68, (immagine ottenuta attraverso il software OVITO [41]).	54
4.5	Profili RDF relativi all'interazione tra PPO e H ₂ O e tra PEO e H ₂ O .	55
4.6	Snapshot raffigurante il comportamento dell'intero DDS all'interno del <i>dominio computazionale tridimensionale</i> , alla concentrazione di Diclofenac pari a 0.015 mol/L, (immagine ottenuta attraverso il software OVITO [41]).	56
4.7	Snapshot raffigurante il comportamento dell'intero DDS all'interno del <i>dominio computazionale tridimensionale</i> , alla concentrazione di Diclofenac pari a 0.100 mol/L, (immagine ottenuta attraverso il software OVITO [41]).	56
4.8	Snapshots raffiguranti due diverse micelle di Pluronic (raffigurato solo PPO) e farmaco rispettivamente alla concentrazione di 0.015 mol/L e 0.020 mol/L, (immagini ottenute attraverso il software OVITO [41]).	57
4.9	Snapshots raffiguranti due diverse micelle di Pluronic (raffigurato solo PPO) e farmaco rispettivamente alla concentrazione di 0.075 mol/L e 0.100 mol/L, (immagini ottenute attraverso il software OVITO [41]).	57
4.10	Profili RDP relativi alla micella con A_S pari a 25, alle diverse concentrazioni di Diclofenac esplorate.	58
4.11	Profili RDP relativi alla micella con A_S pari a 32, alle diverse concentrazioni di Diclofenac esplorate.	59
4.12	Profili RDP micella con A_S pari a 25 relativi alle specie A,B,C e D del sistema, al variare della concentrazione di farmaco.	60
4.13	Profili RDP micella con A_S pari a 32 relativi alle specie A,B,C e D del sistema, al variare della concentrazione di farmaco.	61
4.14	Profili relativi all'efficienza di incapsulamento di Diclofenac, al variare della concentrazione di farmaco	62
4.15	Snapshot raffigurante il comportamento dell'intero DDS all'interno del <i>dominio computazionale tridimensionale</i> (vista dall'alto), alla concentrazione di Diclofenac sodico pari a 0.015 mol/L, (immagine ottenuta attraverso il software OVITO [41]).	63
4.16	Snapshot raffigurante il comportamento dell'intero DDS all'interno del <i>dominio computazionale tridimensionale</i> (vista dall'alto), alla concentrazione di Diclofenac sodico pari a 0.100 mol/L, (immagine ottenuta attraverso il software OVITO [41]).	63
4.17	Snapshots raffiguranti due diverse micelle di Pluronic (raffigurato solo PPO) e farmaco rispettivamente alla concentrazione di 0.015 mol/L e 0.020 mol/L, (immagini ottenute attraverso il software OVITO [41]).	64
4.18	Snapshots raffiguranti due diverse micelle di Pluronic (raffigurato solo PPO) e farmaco rispettivamente alla concentrazione di 0.075 mol/L e 0.100 mol/L, (immagini ottenute attraverso il software OVITO [41]).	64
4.19	Profili RDP relativi alla micella con A_S pari a 23, alle diverse concentrazioni di Diclofenac sodico esplorate.	65

4.20	Profili RDP relativi alla micella con A_S pari a 32, alle diverse concentrazioni di Diclofenac sodico esplorate.	66
4.21	Profili RDP micella con A_S pari a 23 relativi alle specie A,B,C,D ed E del sistema, al variare della concentrazione di farmaco.	67
4.22	Profili RDP micella con A_S pari a 32 relativi alle specie A,B,C,D ed E del sistema, al variare della concentrazione di farmaco.	68
4.23	Profili RDP micella con A_S pari a 23 relativi alla specie F del sistema, al variare della concentrazione di farmaco.	69
4.24	Profili RDP micella con A_S pari a 32 relativi alla specie F del sistema, al variare della concentrazione di farmaco.	69
4.25	Profili relativi all'efficienza di incapsulamento di Diclofenac sodico, al variare della concentrazione di farmaco	70

Elenco delle tabelle

2.1	Volumi delle molecole e delle <i>beads</i> relativi a PEO, PPO e H ₂ O, considerando il livello di <i>coarse-graining</i> opportuno. Valori stimati in accordo con l'approccio di Durchschlag e Zipper [33].	33
2.2	Masse molari delle molecole e delle <i>beads</i> relative a PEO, PPO e H ₂ O, considerando il livello di <i>coarse-graining</i> opportuno.	34
2.3	Parametri di repulsione a_{ii} e a_{ij} tra le diverse <i>beads</i> (A, B, W).	35
2.4	Volumi delle molecole e delle <i>beads</i> relativi a PEO, PPO, H ₂ O, DCF-BENZCLORO e DCF-CARBOX, considerando il livello di <i>coarse-graining</i> opportuno. Valori stimati in accordo con l'approccio di Durchschlag e Zipper [33].	36
2.5	Masse molari delle molecole e delle <i>beads</i> relative a PEO, PPO, H ₂ O, DCF-BENZCLORO e DCF-CARBOX, considerando il livello di <i>coarse-graining</i> opportuno.	37
2.6	Valori dei rispettivi raggi di cutoff r_c tra <i>beads</i> della stessa specie e di specie diverse.	38
2.7	Volumi delle molecole e delle <i>beads</i> relativi a PEO, PPO, H ₂ O, DCF-BENZCLORO, DFC-BENZAMINO, DCF-CARBOX e DCF-SODIUM, considerando il livello di <i>coarse-graining</i> opportuno. Valori stimati in accordo con l'approccio di Durchschlag e Zipper [33] e Markéta Havlávová [35].	39
2.8	Masse molari delle molecole e delle <i>beads</i> relativi a PEO, PPO, H ₂ O, DCF-BENZCLORO, DCF-BENZAMINO, DCF-CARBOX e DCF-SODIUM, considerando il livello di <i>coarse-graining</i> opportuno.	39
2.9	Valori dei rispettivi raggi di cutoff r_c tra <i>beads</i> della stessa specie e di specie diverse.	40
3.1	Valori numerici di Concentrazione molare, Frazione massica e Frazione numerica, relative alle specie C+D, quindi al Diclofenac.	48
3.2	Valori numerici di Concentrazione molare, Frazione massica e Frazione numerica, relative alle specie C+D+E+F, quindi al Diclofenac sodico.	48
4.1	Valori di DEE % <i>totale</i> e del <i>core</i> stimati per il sistema acqua, Pluronic e Diclofenac alle diverse concentrazioni di farmaco esplorate	62
4.2	Valori percentuali della specie <i>F</i> (sodio) presenti all'esterno delle micelle	70
4.3	Valori di DEE % <i>totale</i> e del <i>core</i> stimati per il sistema acqua, Pluronic e Diclofenac sodico alle diverse concentrazioni di farmaco esplorate	71

Introduzione

Questo lavoro di tesi si propone di esplorare e investigare la fase di incapsulamento dei cosiddetti *Drug Delivery Systems*, noti con l'acronimo DDSs, sviluppati per potenziare l'efficacia terapeutica dei farmaci, migliorando le proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche di questi ultimi. In genere questi sistemi si basano sull'utilizzo di nanoparticelle, liposomi o di altri materiali come i polossameri (commercialmente noti come Pluronic). In particolare, questo lavoro di tesi si propone di simulare il comportamento di un sistema composto da Pluronic F68 e acqua per l'incapsulamento farmaceutico. Tale sistema presenta delle proprietà significativamente vantaggiose per tale applicazione, come la ridotta tossicità, biocompatibilità e biodegradabilità. Queste soluzioni polimeriche vengono comunemente riconosciute come fluidi strutturati o fluidi complessi, poiché tendono ad aggregarsi e a formare micelle, le quali possono mutare ed evolvere nel tempo. Questi materiali presentano un comportamento complesso che si manifesta su scale spazio-temporali superiori rispetto a quella atomica, dunque difficilmente descrivibili attraverso tecniche di dinamica molecolare, a causa dell'elevato costo computazionale che presenterebbe questo approccio. Per tale ragione, in questo lavoro di tesi, viene impiegata la Dissipative Particle Dynamics (DPD), una tecnica di simulazione mesoscala, appartenente ai modelli *coarse-grained*, nei quali gruppi di atomi o molecole vengono trattati come entità singole, note come *beads*, riducendo significativamente il numero di particelle coinvolte nella simulazione. Seguendo questo approccio si tende a ridurre decisamente il costo computazionale richiesto per la descrizione del comportamento idrodinamico di questi sistemi, a discapito di una descrizione più dettagliata, tipico invece delle tecniche di dinamica molecolare (MD). Le simulazioni sono state tutte eseguite utilizzando LAMMPS, un codice open-source realizzato per eseguire simulazioni di dinamica molecolare su larga scala. L'obiettivo di questo lavoro di tesi è quello di analizzare l'incapsulamento del farmaco Diclofenac, sia nella sua forma neutra che in quella di sale sodico (Diclofenac Sodico), al variare della concentrazione di questi da 0.015 mol/L fino a 0.100 mol/L.

La tesi è organizzata come segue.

Nel Capitolo 1 vengono introdotti i sistemi DDSs, descrivendone le proprietà e caratteristiche principali, con particolare attenzione verso l'utilizzo di micelle polimeriche. Successivamente si analizzano i polossameri, soffermandosi sulla tendenza di questi ultimi a formare strutture micellari. Viene inoltre dedicata una sezione al Diclofenac come farmaco anti-infiammatorio e alle diverse forme in cui si presenta questo farmaco.

Il Capitolo 2 presenta la metodologia: si introduce il modello DPD, con qualche cenno alla sua storia e alle sue caratteristiche, le equazioni tipiche del modello e gli algoritmi di integrazione temporale; successivamente vengono riportati: la parametrizzazione sfruttata, come questa è stata adattata al sistema nella sua interezza, il modello di *coarse-grained* applicato ai diversi sistemi esplorati in questo lavoro e, infine, nell'ultima sezione, vengono descritte le proprietà esplorate.

Nel Capitolo 3 vengono forniti i dettagli computazionali e le condizioni operative considerate, riportando, a titolo d'esempio, alcuni codici utilizzati all'interno di LAMMPS.

Nel Capitolo 4 vengono riportati e discussi i risultati ottenuti per i diversi sistemi analizzati. Gli *snapshots* riportati offrono una prima evidenza qualitativa del comportamento del sistema all'interno del *dominio computazionale tridimensionale* nelle varie condizioni esplorate. La micellizzazione e il fenomeno di incapsulamento vengono invece indagati in modo quantitativo tramite i profili radiali di densità (RDP - *Radial Density Profile*) relativi alle diverse specie. Questi grafici permettono di ricostruire il profilo micellare e quantificare il fenomeno di incapsulamento tramite il calcolo dell'efficienza.

Nel capitolo 5 vengono riportate le conclusioni.

Capitolo 1

Introduzione ai Drug Delivery Systems (DDSs)

I DDSs sono stati sviluppati per potenziare l'efficacia terapeutica dei farmaci, migliorando proprietà come la farmacinetica e la farmacodinamica [1]. Tra le tecnologie più impiegate troviamo i *Novel Nano-Drug Delivery Systems* (NDDS), i quali vengono considerati approcci innovativi in campo farmaceutico. Tra questi si possono distinguere diverse categorie, composte da nanosospensioni, nanoliposomi, micelle, microemulsioni, nanoparticelle solide lipidiche e nanocapsule; tutti questi sistemi presentano delle dimensioni comprese tra 1-100 *nm* [2]. Il concetto di DDS è molto ampio, poiché si riferisce all'intero insieme di tecnologie e metodologie sfruttate per permettere al farmaco di raggiungere la sua destinazione all'interno del corpo umano in modo efficace e preservandone le caratteristiche.

Generalmente i DDSs comprendono quattro step principali [1]:

- **Incapsulamento:** il farmaco per arrivare a destinazione viene incapsulato all'interno di un sistema DDS, fisicamente o chimicamente, per proteggerlo dalla degradazione e assicurarne la stabilità.
- **Targeting:** il sistema DDS viene realizzato per uno specifico *target*, ossia per una cellula o tessuto all'interno del corpo umano. Il *targeting* può essere condotto utilizzando ligandi come peptidi o anticorpi, i quali legano con una cellula recettore presente in superficie o sfruttando proprietà uniche.
- **Rilascio:** il farmaco viene rilasciato dal DDS sia attraverso il meccanismo di diffusione, sia per risposta ad un cambiamento delle condizioni, come temperatura o pH.
- **Effetto farmacologico:** il farmaco una volta rilasciato può esplicare il suo effetto terapeutico interagendo con il *target*.

In questo lavoro di tesi, come anticipato, è stata approfondita la fase di incapsulamento, mediante micelle polimeriche di Pluronic F68 in acqua.

Le micelle polimeriche sono state introdotte per la prima volta nel 1992; esse presentano dimensioni comprese tra 10 e 100 *nm* e sono degli aggregati di copolimeri a blocchi [2]. Queste strutture, presentando un *core* idrofobo e uno *shell* idrofilo,

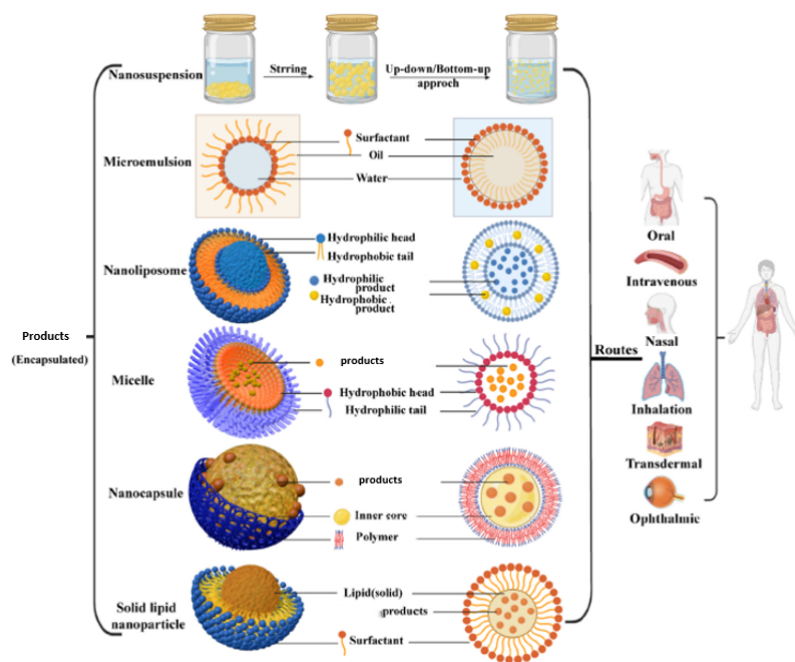


Figura 1.1: Schema relativo ai sistemi NDDS: nanosospensioni, microemulsioni, nanoliposomi, micelle, nanocapsule e nanoparticelle solide lipidiche (immagine estratta e rielaborata da [2]).

permettono di realizzare un ambiente protettivo per eccellenza, in grado di proteggere il prodotto dalla presenza di enzimi in ambienti acquosi e di prevenirne la loro degradazione. Il loro utilizzo permette, inoltre, di incrementare la permeabilità delle membrane cellulari, grazie alla loro natura anfifilica [2].

1.1 Introduzione ai Polossameri

I Pluronic (nome commerciale dei polossameri) sono dei copolimeri non-ionici e anfifilici, i quali presentano una struttura triblocco, composta da un segmento centrale di (poli)-propilene-ossido (PPO) con carattere tendenzialmente idrofobo, circondato da due segmenti laterali di (poli)-etilene-ossido, tendenzialmente idrofilici. Lo schema relativo alla struttura appena descritta viene rappresentata nella Figura 1.2.

Considerando le loro proprietà, vengono impiegati in diversi ambiti di natura differente, partendo dall'ingegneria dei tessuti fino ad arrivare ai drug delivery systems [4]. In base allo stato fisico del polimero e alle dimensioni dei segmenti di PPO e PEO vengono classificati seguendo la presente nomenclatura: viene prima indicato lo stato fisico, con le lettere L,P o F rispettivamente per indicare Liquid, Paste o Flake, il primo numero di una o due cifre moltiplicato per 300 indica il peso molecolare del segmento di PPO e al termine l'ultimo numero moltiplicato per 10 fornisce la percentuale massica di PEO rispetto al polimero totale. A titolo di esempio si riportano L64 e F68: il primo di questi presenta un peso molecolare medio di 2900 g/mol, di cui 1800 g/mol relativi al segmento di PPO e il 40 % in massa di PEO [5]; il secondo invece presenta un peso molecolare medio di 8400 g/mol, di cui 1800

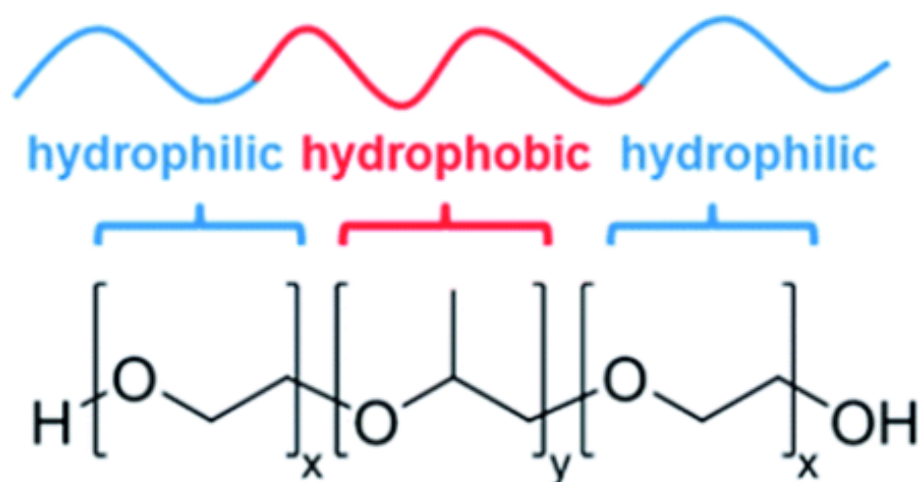


Figura 1.2: Schema relativo alla struttura di un Polossamero (immagine estratta da [3]).

g/mol relativi al segmento di PPO e l'80 % in massa di PEO. In generale tutti i pluronici vengono classificati usando il "Pluronic Grid" (riportato nella Figura 1.3), ossia un diagramma che riporta l'intero sistema di Pluronic in funzione del peso molecolare del segmento di PPO e del contenuto di PEO [4]. I pluronici possono essere solubilizzati in diversi solventi polari e apolari; la temperatura e la concentrazione rivestono un ruolo cruciale nel determinare il comportamento di aggregazione di questi sistemi, influenzando in maniera diretta i processi di micellizzazione e le eventuali transizioni di fase. Variazioni di tali parametri possono infatti modificare sia la struttura che la stabilità delle micelle, con conseguenti effetti sulla performance di incapsulamento.

1.2 Aggregazione e formazione delle micelle

La tendenza di molti pluronici è quella di formare delle strutture solide reversibili ad alte temperature, le quali vengono impiegate in diverse applicazioni biomediche, specialmente per i DDS [6]. Il Pluronic F68 in soluzione tende a cristallizzare reversibilmente all'aumentare della temperatura, potendo formare tre fasi distinte: strutture micellari sferiche disordinate, unimeri individuali o una fase cristallina cubica a corpo centrato (BCC - *Body Cubic Centered*). Il polimero si presenta sottoforma di unimeri individuali quando la temperatura e la concentrazione della soluzione sono rispettivamente inferiori alla *temperatura critica micellare* (CMT) e alla *concentrazione critica micellare* (CMC). La CMC è un indicatore di stabilità micellare: valori bassi sono indice di maggiore stabilità delle micelle.

Quando i valori CMC e CMT vengono superati, le molecole di Pluronic tendono ad aggregarsi e ad organizzarsi in strutture micellari, le quali presentano i segmenti di PPO nel *core* della micella, mentre i segmenti di PEO si riarrangiano sulla superficie. I segmenti idrofili di PEO nel riarrangiarsi realizzano il cosiddetto *shell* della micella, minimizzando il contatto tra PPO e acqua e impedendo ai *cores* di

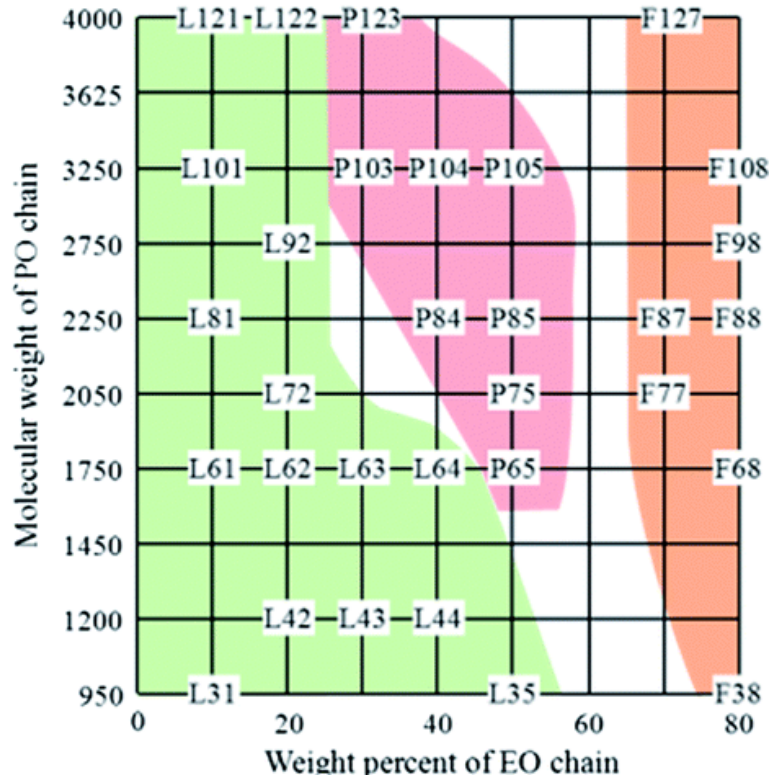
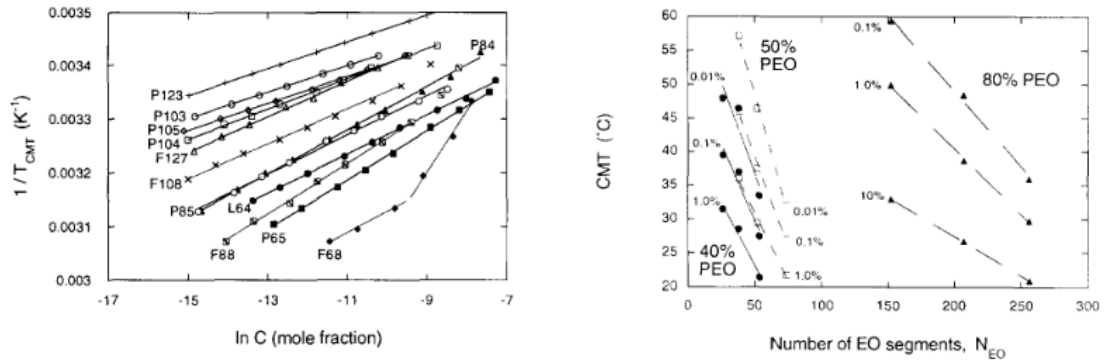


Figura 1.3: Diagramma "Pluronic Grid" utilizzato per la classificazione dei Pluronici in base al peso molecolare del segmento di PPO e contenuto di PEO (immagine estratta da [3]).



(a) Andamento del reciproco della Temperatura Critica Micellare (CMT) rispetto alla concentrazione del copolimero per diversi Pluronici

(b) Temperature critiche Micellari (CMT) a diverse concentrazioni di copolimeri, in funzione del numero di segmenti EO, per copolimeri con un contenuto di PEO pari al 40, 50 e 80%

Figura 1.4: Diagrammi relativi alla Temperatura Critica Micellare al variare della concentrazione di diversi Pluronici e in funzione del numero di segmenti di EO (immagini estratte da [7]).

PPO di interagire tra loro contribuendo a preservare la stabilità della struttura. Aumentando ulteriormente la temperatura, le strutture micellari si organizzano in

un dominio ordinato di tipo BCC, causando un cambiamento nella microstruttura e nella reologia del sistema (vedi Figura 1.5). Quella che avviene è una transizione *liquid-to-solid* che rende questo sistema così interessante da studiare come *drug carrier*.

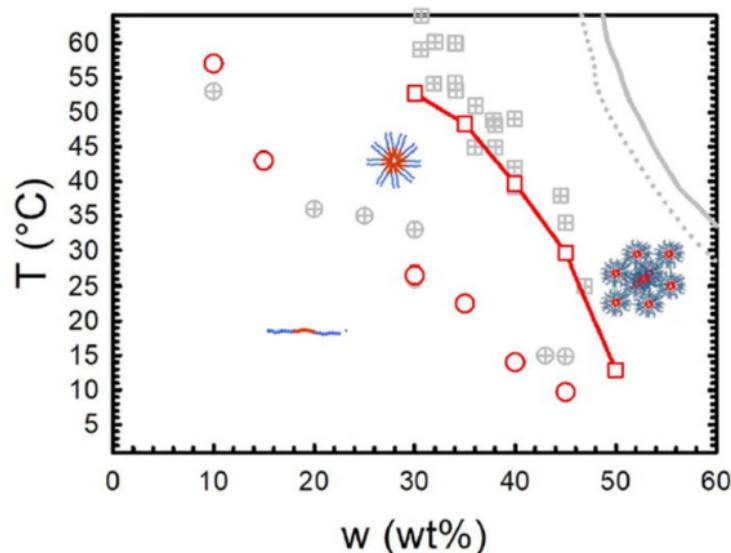


Figura 1.5: Diagramma di fase del Pluronic F68 in soluzione acquosa (immagine estratta da [8])

Inoltre altre grandezze fondamentali del fenomeno di micellizzazione sono: *l'entalpia di micellizzazione* ΔH_{mic} e il *numero di idratazione (hydration number)*, il quale viene definito come il numero di molecole di acqua che si muovono insieme alla micella, come unica entità cinetica [9].

Come spiegato sopra, la natura anfifilica del Pluronic è responsabile della capacità di formare spontaneamente degli aggregati in un solvente selettivo come l'acqua; questa viene descritta attraverso il fattore HLB, il quale indica la percentuale in peso dei gruppi idrofilici rispetto a quelli idrofobici. Questo parametro oscilla tra 1 e 20 e indica il tipo di micella formata: definiamo micelle RM (tensioattivo prevalentemente idrofobo) per valori di HLB < 10 e micelle DM (tensioattivo prevalentemente idrofilo) per valori di HLB > 10 .

Altri fattori che influenzano significativamente la micellizzazione sono la forza ionica e il pH: aumentando la forza ionica, il valore di CMT decresce [9]; l'aggiunta di sali è una operazione molto semplice per modulare le proprietà delle soluzioni di pluronici, in particolare Bahadur et al. [10] hanno osservato l'impatto di sali inorganici (KCNS, KI, KBr, KCl e KF) sul punto di intorbidimento (cloud point) di una soluzione di L64. Il punto di intorbidimento corrisponde alla temperatura sopra la quale si assiste all'aggregazione dei polimeri, a causa della perdita di affinità con l'acqua da parte del PPO. Dunque è stato dimostrato che alcuni anioni inorganici derivanti dai sali utilizzati hanno causato una diminuzione del punto di intorbidimento, mentre altri hanno causato invece un aumento, solo per concentrazioni del sale superiori a 0.05 M.

1.3 Il Diclofenac, un farmaco anti-infiammatorio non steroideo (FANS)

I farmaci anti-infiammatori non steroidei sono tra i medicinali più diffusi al mondo, date le loro proprietà analgesiche e la loro abilità nel ridurre dolore e infiammazione. Il loro meccanismo di azione è basato sull'inibizione della produzione della *prostaglandina* [11] (vedi Figura 1.6), ossia un composto lipidico prodotto localmente nel corpo umano e che svolge un'attività di mediazione di processi fisiologici, tra cui l'infiammazione. Nel dettaglio, l'inibizione è dovuta ad una acetilazione reversibile o irreversibile dell'enzima *ciclossigenasi* (COX), responsabile della sintesi delle prostaglandine. Il COX può presentarsi in due isoforme differenti, denominate COX-1 e COX-2: la prima è l'isoforma costitutiva, la quale induce l'aggregazione piastrinica e stimola la produzione di prostaciclina (composto in grado di proteggere la mucosa gastrica); la seconda è l'isoforma che viene indotta da stimoli pro-infiammatori e dalle citochine e che a sua volta causa febbre, dolore e infiammazione. Bisogna sottolineare che solo la seconda delle due deve essere il bersaglio dei FANS; sarebbe necessario evitare l'inibizione della isoforma COX-1 da parte di FANS non sufficientemente selettivi [11].

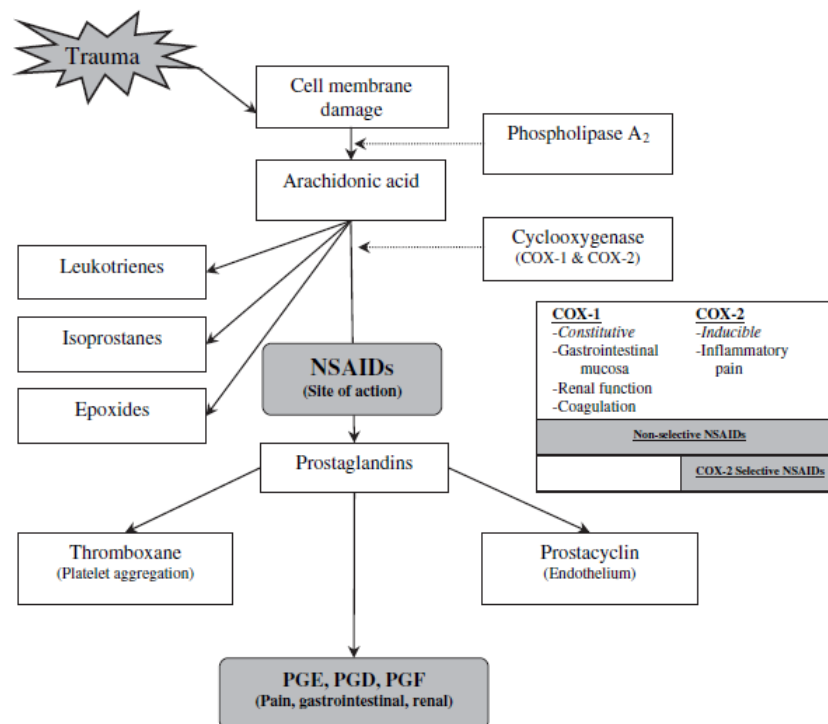


Figura 1.6: Illustrazione del sito di azione dei FANS. NSAIDs è il corrispettivo inglese di FANS, ossia "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs" (immagine estratta da [11]).

Tra questi farmaci spicca il Diclofenac (formula chimica $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$, massa molare di 296.1 g/mol e solubilità in acqua di 2.37 mg/L a $T = 298K$ [12]), il quale è un derivato dell'acido fenilico usato per trattare il dolore cronico, l'infiammazione, in riferimento soprattutto a disturbi muscoloscheletrici [13]. Il meccanismo di azione è basato sull'inibizione sia di COX-1 che COX-2 [11]. Dunque viene considerato come un FANS non completamente selettivo, poiché inibisce sia la COX-1 che la COX-2, ma comunque più selettivo rispetto all'acido acetilsalicilico (commercialmente noto come Aspirina), il quale è noto per la sua bassa selettività. Il Diclofenac ad alte concentrazioni, ha la capacità di bloccare i canali del sodio sulle fibre afferenti nocicettive, ossia le fibre nervose che trasmettono il dolore dalla periferia al cervello. Inoltre alcune evidenze hanno dimostrato che il Diclofenac possa inibire i canali del calcio di tipo L, i quali sono coinvolti nella percezione del dolore [13]. Data la sua

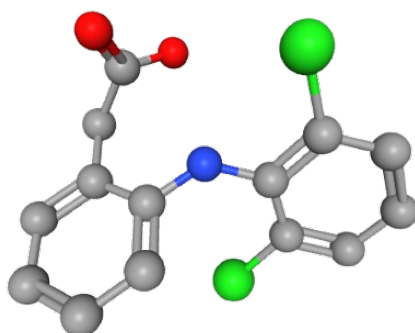


Figura 1.7: Illustrazione della struttura chimica del Diclofenac (immagine estratta da [12]).

struttura, può essere considerato come un composto amminico secondario, un diclorobenzene, un ammina aromatica e un acido monocarbossilico (vedi Figura 1.7). Il Diclofenac è stato approvato dalla FDA nel Luglio 1988, con il nome commerciale di Voltaren (dall'azienda Novartis).

In questo lavoro di tesi è stato studiato l'incapsulamento micellare di Diclofenac, sia nella sua formulazione neutra che sodica (il Diclofenac sodico).

Il Diclofenac è disponibile, generalmente, in due formulazioni, ossia Diclofenac sodico (formula chimica $C_{14}H_9Cl_2NNaO_2$, massa molare di 318.1 g/mol [12]) e Diclofenac potassico (formula chimica $C_{14}H_9Cl_2KNO_2$, massa molare di 334.2 g/mol [12]). Il Diclofenac potassico viene formulato per essere rilasciato e assorbito nello stomaco, mentre il Diclofenac sodico viene comunemente distribuito in compresse gastroresistenti, resistenti alla dissoluzione in ambienti gastrici a basso pH.

In particolare il Diclofenac sodico si presenta come sale sodico derivante dal Diclofenac, anch'esso con attività analgesica, antiepilettica e anti-infiammatoria. Come il Diclofenac, anche il sale sodico è un inibitore non selettivo dell'enzima COX, approvato dalla FDA nel 1988 [12].

Capitolo 2

Metodologia

Dall'osservazione dei sistemi di incapsulamento emerge una caratteristica peculiare: i loro comportamenti caratteristici si collocano su una scala spazio-temporale intermedia tra la scala molecolare/microscopica e quella macroscopica. Si fa riferimento alla mesoscala, ossia una scala spazio-temporale compresa tra $10\text{-}10^4$ nm e $1\text{-}10^6$ ns. La descrizione di comportamenti e fenomeni idrodinamici complessi con tecniche di simulazione classici risulta oneroso e poco pratico [14]. Utilizzare tecniche di dinamica molecolare (MD) permette di analizzare l'interazione tra gli atomi attraverso campi di forza, risolvendo numericamente le equazioni di moto relative ad ogni singolo atomo e potendo ricavare l'entità delle forze agenti, la posizione, velocità e accelerazione. Nello studio di interazione fra particelle vengono considerati i gradi di libertà vibrazionali, rotazionali e traslazionali, ma trascurati quelli elettronici.

Dopo quanto discusso, risulta evidente che l'applicazione di tecniche MD convenzionali alla mesoscala richiederebbe un costo computazionale estremamente elevato. D'altro canto si potrebbe pensare di descrivere questi sistemi o la materia soffice in generale con un approccio continuo, sfruttando le equazioni idrodinamiche di Navier-Stokes. La teoria del continuo si basa su due concetti chiave fondamentali: il limite del continuo, ossia il "punto" dello spazio su cui viene definito il campo di moto è un elemento di volume contenente un numero elevato di atomi e l'assunzione di locale equilibrio, tale per cui gli elementi di volumi sono sufficientemente grandi da poter riprodurre le proprietà termodinamiche dell'intero sistema. Alle scale macroscopiche le grandezze fisiche variano in modo trascurabile da un elemento di volume al successivo, consentendo di descrivere il comportamento del sistema tramite equazioni differenziali che, in molti casi, ammettono soluzioni analitiche. Esistono però fenomeni che si sviluppano su scale intermedie, dove la natura discreta della materia, irrilevante a livello macroscopico, diventa significativa. Per colmare il divario tra le simulazioni atomistiche e quelle su larga scala, si ricorre quindi a tecniche di simulazione intermedie, capaci di operare a lunghezze maggiori di quelle atomistiche, ma inferiori a quelle macroscopiche. Negli anni, in base alla natura del problema, sono state sviluppate molte tecniche per simulazioni mesoscopiche, in particolare per fluidi complessi metodi *grid-based* come la Lattice Gas Automata (LGA) e la Lattice Boltzmann (LB) oppure metodi *off-lattice* come la Smoothed Particle Hydrodynamics (SPH), la Dissipative Particle Dynamics (DPD) e il Fluid Particle Method (FPM). Le tecniche *grid-based* presentano delle restrizioni imposte

dal reticolo e problemi di incompatibilità con metodologie dedicate alla imposizione delle condizioni al contorno [15]. Le tecniche *off-lattice* non risentono delle limitazioni precedentemente illustrate e permettono invece di mantenere specificità chimica nelle simulazioni dei sistemi. In particolare, in queste situazioni, per mantenere la specificità, serve utilizzare un approccio descrittivo *coarse-grained*, il quale permette di raggruppare atomi o molecole in gruppi che prendono il nome di *beads*. Questi gruppi vengono considerati nelle simulazioni come entità singole. I dettagli su come realizzare questi gruppi sono specifici di ogni sistema analizzato e rappresentano un'area di intensa ricerca negli ultimi anni, ciononostante esiste una procedura standard ben definita nota come *non-equilibrium statistical mechanics*, *Mori-Zwanzig theory*, o *theory of coarse-graining* [16]. La simulazione di ogni dettaglio molecolare risulta molto dispendiosa a livello di costo computazionale e inoltre ritenuta non necessaria: nella simulazione di solventi si cerca di ridurre al minimo i dettagli, come ad esempio con l'acqua, la quale richiederebbe simulazioni molto onerose dal punto di vista computazionale. Questo approccio viene invece meno utilizzato con i soluti, poiché si vuole conservare un elevato livello di dettagli, mantenendo così la loro specificità. A tal proposito, tra le tecniche *coarse-graining* la *Dissipative Particle Dynamics* (DPD) risulta essere una tra le più note, soprattutto considerando il suo approccio rapido ed intuitivo. La sua popolarità è dovuta principalmente alla semplicità dell'algoritmo e dalla enorme versatilità presentata [14]. Questa tecnica fu introdotta per simulare fluidi e comportamenti dinamici complessi da parte di Hoogerbrugge e Koelman nel 1992 [15] e in seguito modificata da Español e Warren nel 1995, i quali si occuparono dello studio relativo al teorema di fluttuazione-dissipazione in connessione con questa tecnica [17]. Da quando è stata introdotta agli inizi degli anni 90', la DPD è stata applicata nello studio di numerose proprietà dinamiche e in una vasta tipologia di applicazioni e sistemi, confermandosi come una delle migliori tecniche di simulazione in mesoscala mai realizzate [15].

2.1 La Dissipative Particle dynamics: una tecnica *coarse-graining*

Il modello DPD come metodo *coarse-graining* presenta due aspetti essenziali. Il primo è la possibilità di aggregare diversi atomi/molecole, in modo da descriverli come un'unica entità denominata *bead*. Questo comporta una descrizione *coarse-grained* della struttura molecolare, adatta specialmente a simulazioni mesoscopiche di idrocarburi o polimeri, nelle quali si è maggiormente interessati alla mobilità delle catene più che alla comprensione della posizione degli atomi di idrogeno. Dunque, in questo modo, si considerano molte meno particelle, aspetto che si traduce chiaramente in una velocità di simulazione maggiore. Inoltre, è importante sottolineare come le scale temporali e spaziali cambiano per mezzo di questa aggregazione all'interno delle *beads*. Generalmente una *bead* corrisponde a N_m molecole, in cui questo parametro può essere visto come un *fattore di renormalizzazione spazio-temporale*. L'esperienza con simulazioni DPD di molecole d'acqua suggerisce che, l'utilizzo di questo approccio, comporta una velocità di calcolo aumentata di un fattore $1000N_m^{8/3}$ rispetto alle simulazioni MD. Il secondo fattore cruciale nello *speeding-up* della simulazione de-

riva dalla natura del potenziale di interazione tra le *beads*. Queste sono in grado di scambiarsi *forze soffici* di repulsione per mezzo di un *potenziale soffice*, definito tale perché permette la compenetrazione delle *beads*, consentendo l'impiego di time step maggiori nella simulazione [18]. In questo modello, oltre alle forze conservative di repulsione dovute al *potenziale soffice*, le *beads* interagiscono anche mediante *forze dissipative*, le quali tendono a ridurre le differenze tra velocità radiali delle particelle e *forze stocastiche*, che invece sono dirette lungo una linea che unisce il centro delle diverse particelle. Queste tengono conto dei gradi di libertà rimossi dal sistema tramite la procedura di coarse-graining e sono correlate in modo da garantire il controllo termico del sistema: agiscono simultaneamente da termostato. Inoltre, le forze dissipative e stocastiche possono essere descritte come un *dashpot browniano a coppie*, che permette la conservazione della quantità di moto. Il dashpot browniano è un modello minimale per rappresentare forze viscosi e rumore termico tra le *beads* e, grazie alla conservazione della quantità di moto, il comportamento del sistema diventa idrodinamico su scale sufficientemente grandi [14].

2.2 Equazioni del modello

Nel modello DPD l'evoluzione spazio-temporale di ogni particella viene descritta dalle equazioni di moto di Newton:

$$\frac{d\mathbf{r}_i}{dt} = \mathbf{v}_i, \quad \frac{d\mathbf{p}_i}{dt} = \sum_{j \neq i} \mathbf{F}_{ij}, \quad (2.1)$$

in cui $\mathbf{r}_i$, $\mathbf{v}_i$ e $\mathbf{p}_i$ sono rispettivamente i vettori posizione, velocità e quantità di moto riferite alla particella *i-esima*. Invece la $\mathbf{F}_{ij}$ è la forza interparticellare esercitata sulla particella *i-esima*, la quale è ottenuta come somma delle interazioni con tutte le altre particelle *j-esime*. Pertanto, considerando per semplicità un sistema di particelle interagenti con masse uguali e unitarie:

$$\mathbf{F}_{ij} = \mathbf{F}_{ij}^C + \mathbf{F}_{ij}^D + \mathbf{F}_{ij}^R. \quad (2.2)$$

in cui $\mathbf{F}_{ij}^C$ è la forza conservativa, $\mathbf{F}_{ij}^D$ è la forza dissipativa e $\mathbf{F}_{ij}^R$ è la forza stocastica, le quali vengono espresse come segue:

$$\mathbf{F}_{ij}^C = w^C(r_{ij})\mathbf{e}_{ij}, \quad (2.3)$$

$$\mathbf{F}_{ij}^D = -\gamma w^D(r_{ij})(\mathbf{v}_{ij} \cdot \mathbf{e}_{ij})\mathbf{e}_{ij}, \quad (2.4)$$

$$\mathbf{F}_{ij}^R = \sigma w^R(r_{ij})\theta_{ij}\mathbf{e}_{ij}, \quad (2.5)$$

dove $\mathbf{e}_{ij} = \frac{\mathbf{r}_{ij}}{r_{ij}}$, $\mathbf{r}_{ij} = \mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j$, $r_{ij} = |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|$ e $\mathbf{v}_{ij} = (\mathbf{v}_i - \mathbf{v}_j)$. Invece w^C , w^D e w^R sono rispettivamente le funzioni peso conservativa, dissipativa e randomica tutte dipendenti da r . Il termine θ_{ij} è la funzione Gaussiana di rumore bianco, la quale presenta la proprietà di simmetria $\theta_{ij} = \theta_{ji}$ per assicurare la conservazione totale

del momento angolare. Tutte le forze analizzate agiscono all'interno di una sfera di interazione, o meglio all'interno di un raggio di cutoff r_c , il quale è il parametro di lunghezza scalare del sistema. In particolare, l'interpretazione fisica della forza dissipativa è la seguente: se $\mathbf{v}_{ij} \cdot \mathbf{e}_{ij} > 0$ significa che la particella *i-esima* si sta allontanando dalla *j-esima* e, di conseguenza, sente una forza viscosa diretta verso quest'ultima. Viceversa se si sta avvicinando, la forza viscosa ha direzione opposta [19]. I simboli γ e σ sono rispettivamente i coefficienti delle forze di attrito legato alle forze dissipative e l'ampiezza del rumore relativo a quelle randomiche.

Nel dettaglio la funzione peso dissipativa e randomica:

$$w^D(r) = [w^R(r)]^2 = \begin{cases} (1 - \frac{r_{ij}}{r_c})^s & r_{ij} \leq r_c \\ 0 & r_{ij} > r_c \end{cases} \quad (2.6)$$

$$\sigma^2 = 2\gamma k_B T / m, \quad (2.7)$$

dove k_B corrisponde alla costante di Boltzmann e T alla temperatura di equilibrio. L'esponente s invece è pari ad 1 nell'algoritmo DPD originale, ma possono essere scelti altri valori per aggiustare la viscosità [15]. Nell'equazione 2.6 le funzioni peso sono legate da quella uguaglianza, ma effettivamente viene arbitrariamente scelta una delle due, mentre l'altra verrà successivamente fissata. Questa condizione permette alle equazioni DPD di comportarsi come termostato e poiché l'algoritmo dipende dalle velocità relative e le interazioni tra le particelle sono simmetriche, allora si presenta come un termostato invariante Galileano isotropico. Questa caratteristica permette di preservare l'idrodinamica. Inoltre le funzioni peso w^R e w^D determinano il raggio d'interazione per le forze dissipative e casuali.

La funzione peso conservativa può essere definita come una semplice funzione di decadimento dipendente dalla distanza:

$$w^C(r_{ij}) = \begin{cases} a_{ij}(1 - \frac{r_{ij}}{r_c}) & r_{ij} \leq r_c \\ 0 & r_{ij} > r_c \end{cases} \quad (2.8)$$

dove a_{ij} è il parametro di repulsione tra la particella *i-esima* e la particella *j-esima*, il quale viene considerato come uno dei più significativi nelle simulazioni DPD.

2.2.1 Algoritmi di integrazione temporale

Una difficoltà rilevante è legata allo schema di integrazione temporale utilizzato nell'algoritmo DPD, poiché a differenza della MD, le equazioni DPD sono stocastiche e dunque questo non garantisce la reversibilità nel tempo dei processi di integrazione. Inoltre la forza dissipativa dipende dalla velocità. Tipicamente il semplice algoritmo Euleriano e della velocità di Verlet possono essere utilizzati per integrare le equazioni DPD; queste tecniche sono state utilizzate in studi precedenti da Español e Warren [19] e da Groot e Warren [17] per aggiornare l'insieme delle posizioni e delle velocità. Per un intervallo di tempo arbitrario, l'evoluzione viene calcolata integrando le equazioni del moto su un breve intervallo temporale Δt , durante il quale né le

posizioni né le velocità delle particelle variano in modo significativo. L'algoritmo Euleriano si presenta come segue:

$$\begin{aligned}\mathbf{r}_i(t + \Delta t) &= \mathbf{r}_i(t) + \Delta t \mathbf{v}_i(t), \\ \mathbf{v}_i(t + \Delta t) &= \mathbf{v}_i(t) + \Delta t \mathbf{f}_i(t), \\ \mathbf{f}_i(t) &= \mathbf{f}_i(\mathbf{r}_i(t + \Delta t), \mathbf{v}_i(t + \Delta t)).\end{aligned}\tag{2.9}$$

Bisogna prestare attenzione alla forza randomica, la quale si presenterà come segue:

$$\mathbf{F}_{ij}^R = \sigma w^R(r_{ij}) \zeta_{ij} \Delta t^{-\frac{1}{2}} \hat{\mathbf{r}}_{ij},\tag{2.10}$$

dove ζ_{ij} è un numero casuale con media nulla e varianza unitaria, scelto nuovamente in modo indipendente per ogni coppia di particelle interagenti e a ogni passo temporale. Il termine $\Delta t^{-\frac{1}{2}}$ verrà discusso in seguito. Invece di utilizzare l'algoritmo di Eulero, nel contesto DPD, negli ultimi anni è stata proposta una versione modificata dell'algoritmo della velocità di Verlet:

$$\begin{aligned}\mathbf{r}_i(t + \Delta t) &= \mathbf{r}_i(t) + \Delta t \mathbf{v}_i(t) + \frac{1}{4}(\Delta t)^2 \mathbf{f}_i(t), \\ \tilde{\mathbf{v}}_i(t + \Delta t) &= \mathbf{v}_i(t) + \Delta t \mathbf{f}_i(t), \\ \mathbf{f}_i(t + \Delta t) &= \mathbf{f}_i(\mathbf{r}_i(t + \Delta t), \tilde{\mathbf{v}}_i(t + \Delta t)), \\ \mathbf{v}_i(t + \Delta t) &= \mathbf{v}_i(t) + \frac{1}{2}\Delta t (\mathbf{f}_i(t) + \mathbf{f}_i(t + \Delta t)).\end{aligned}\tag{2.11}$$

Se le forze sono indipendenti dalla velocità, l'algoritmo della velocità di Verlet viene recuperato per $\lambda = 1/2$. Il fattore variabile λ introdotto in modo empirico, tiene conto degli effetti aggiuntivi dovuti alle interazioni stocastiche. Poiché in questo algoritmo la forza non dipende dalla velocità, è possibile fare una previsione per la nuova velocità, la quale viene denotata con $\tilde{\mathbf{v}}_i$ e si corregge questo effetto nell'ultimo passo. In questo algoritmo più sofisticato, la forza viene comunque aggiornata una sola volta per iterazione (dopo il secondo passo), quindi non c'è praticamente alcun aumento del costo computazionale. Tutte le misure fisiche che dipendono dalle differenze di coordinate vengono anch'esse effettuate dopo il secondo passo. La temperatura invece viene misurata dopo l'ultimo passo. Se non ci fossero forze casuali o dissipative, questo algoritmo sarebbe esatto all'ordine $O(\Delta t^2)$ con $\lambda = 1/2$. Ritornando al fattore $\Delta t^{-\frac{1}{2}}$, apparso nell'equazione 2.10 della forza randomica, può essere derivato dalla integrazione delle equazioni differenziali stocastiche di base e in grado di interpretare la forza casuale come un processo di Wiener [19].

Oltre alle difficoltà presentate nel trovare uno schema di integrazione temporale appropriato a causa della natura stocastica dell'algoritmo DPD, dovrebbero essere considerati altri problemi per la simulazione di sistemi complessi. In particolare l'utilizzo del potenziale di Lennard Jones (LJ) per ogni coppia di *beads* di polimeri richiede time-step minori rispetto alla repulsione soffice tipica delle particelle DPD [20]. A causa della presenza di potenziali sia morbidi che non, Symeonidis et al. [21] e Symeonidis e Karniadakis [22] [23] hanno proposto l'uso di algoritmi con passi temporali sfalsati per studiare in modo efficiente le grandezze fisiche dei polimeri (come la distanza end-to-end o il raggio di "gyration").

2.2.2 Equazione di Fokker-Plank

L'equazione di Fokker-Plank, la quale è analoga alla equazione di Liouville per le simulazioni MD, dimostra la connessione teorica tra la Dissipative Particle Dynamics e la meccanica continua dei fluidi [19]. L'equazione di Fokker-Plank governa la funzione di distribuzione delle particelle, la quale permette di stabilire la densità di probabilità delle variabili microscopiche del sistema, ossia posizione e momento angolare di tutte le particelle. Questa equazione è legata alla Dissipative Particle Dynamics (DPD) dalle equazioni di Langevin, le quali sono le equazioni differenziali stocastiche per la dinamica delle particelle soggette a forze conservative, dissipative e randomiche.

Dunque l'equazione di Fokker-Plank descrive l'evoluzione temporale della distribuzione delle variabili microscopiche, presentandosi come di seguito:

$$\frac{\partial f}{\partial t} = \mathcal{L}^C f + \mathcal{L}^D \rho \quad (2.12)$$

$$\mathcal{L}^C = - \left[\sum_i \frac{\mathbf{p}_i}{m_i} \cdot \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_i} + \sum_{i,j \neq i} \mathbf{F}_{ij}^C \cdot \frac{\partial}{\partial \mathbf{p}_i} \right], \quad (2.13)$$

$$\mathcal{L}^D = \sum_{i,j \neq i} \mathbf{r}_{ij} \cdot \frac{\partial}{\partial \mathbf{p}_i} \left[\gamma w^D(r_{ij})(\mathbf{r}_{ij} \cdot \mathbf{v}_{ij}) + \frac{\sigma^2}{2} w^R(r_{ij})^2 \mathbf{r}_{ij} \cdot \left(\frac{\partial}{\partial \mathbf{p}_i} - \frac{\partial}{\partial \mathbf{p}_j} \right) \right] \quad (2.14)$$

Le equazioni 2.13 e 2.14 sono le definizioni degli operatori spazio-temporali $\mathcal{L}^D$ e $\mathcal{L}^C$. L'operatore $\mathcal{L}^C$ è l'operatore di Liouville di un sistema Hamiltoniano che prevede l'interazione delle particelle tramite forze conservative. Invece l'operatore $\mathcal{L}^D$ tiene conto degli effetti delle forze dissipative e randomiche.

La soluzione stazionaria delle equazioni 2.12, 2.13 e 2.14 fornisce la distribuzione di equilibrio f^{eq} [19].

La soluzione di equilibrio non si ottiene risolvendo direttamente l'equazione di Fokker-Planck, ma è una conseguenza naturale della dimostrazione del Teorema H e della verifica che la distribuzione di Gibbs è la soluzione stazionaria dell'equazione di Fokker-Planck. La dimostrazione del Teorema H rappresenta un risultato fondamentale nella meccanica statistica per un sistema dinamico e mostra che le particelle DPD tendono a migrare verso lo stato di equilibrio, il quale corrisponde alla distribuzione di Gibbs. Il Teorema H garantisce la stabilità della soluzione e assicura che tutti gli stati nello spazio delle fasi conducano all'equilibrio [15]. La soluzione di equilibrio, ossia la distribuzione di Gibbs presenta la seguente forma:

$$f^{eq}(\mathbf{r}_i, \mathbf{p}_i) = \frac{1}{Z} \exp \left(-\frac{V(r)}{k_B T} - \sum_i \frac{\mathbf{p}_i^2}{2m_i k_B T} \right) \quad (2.15)$$

dove Z è la funzione di partizione, V è il potenziale del sistema e $\mathbf{r}_i$ è il vettore posizione di ogni particella *i-esima*. La condizione di bilancio dettagliato per il modello DPD, espressa nell'equazione 2.6 (che è la stessa del moto browniano convenzionale), rappresenta il requisito fondamentale per la derivazione del Teorema H. Se questa

condizione non venisse rispettata, il Teorema H non potrebbe essere dimostrato, e la distribuzione di Gibbs non risulterebbe essere una soluzione stazionaria dell'equazione di Fokker-Planck [24].

2.2.3 Scelta dei parametri

Per la scelta del parametro temporale Δt bisogna trovare un compromesso tra le velocità di simulazione e le condizioni di equilibrio. Per tale ragione si monitora la temperatura del sistema; usando l'equazione 2.7, per un valore fissato del parametro σ e ponendo $k_B T = 1$, la temperatura di equilibrio viene misurata dalle velocità delle particelle:

$$k_B T = \frac{\langle v^2 \rangle}{3} \quad (2.16)$$

dove l'operatore $\langle \rangle$ è una semplice media su tutte le particelle della simulazione [17].

Per quanto riguarda la scelta dei parametri di interazione repulsiva bisogna sfruttare la comprimibilità isoterma k . Volendo descrivere correttamente lo stato termodinamico di un liquido arbitrario tramite il modello a sfere morbide, anche le fluttuazioni nel liquido devono essere descritte correttamente. Queste, infatti, vengono determinate dalla comprimibilità del sistema:

$$\kappa^{-1} = \frac{1}{k_B T \rho k_T} = \frac{1}{k_B T} \left(\frac{\partial p}{\partial \rho} \right) \quad (2.17)$$

dove ρ corrisponde alla densità numerica e k_T alla comprimibilità isoterma, la quale viene definita come:

$$k_T = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial p} \right)_T = \frac{1}{\rho} \left(\frac{\partial \rho}{\partial p} \right)_T \quad (2.18)$$

Dunque la comprimibilità isoterma corrisponde alla variazione del volume, rispetto alla variazione della pressione, mantenendo costante la temperatura [25] o in alternativa alla variazione della densità, rispetto alla variazione della pressione, sempre mantenendo costante la temperatura.

Sulla base della teoria sulla perturbazione dei fluidi di Weeks-Chandler-Anderson [26], la comprimibilità isoterma deve rispettare la seguente equazione di *scaling*:

$$\kappa^{-1} = \frac{1}{k_B T} \left(\frac{\partial p}{\partial \rho} \right)_{\text{sim}} = \frac{1}{\rho k_B T k_T} = \frac{1}{k_B T} \left(\frac{\partial p}{\partial n} \right)_{\text{exp}} \quad (2.19)$$

Questa equazione è valida solo per un grado di *coarse-graining* unitario, ossia quando una *bead* corrisponde ad una molecola. L'espressione generale per un grado di *coarse-graining* diverso dall'unità corrisponde a:

$$\frac{1}{k_B T} \left(\frac{\partial p}{\partial \rho} \right)_{\text{sim}} = \frac{1}{k_B T} \left(\frac{\partial p}{\partial n} \right)_{\text{exp}} \left(\frac{\partial n}{\partial \rho} \right) = \frac{N_m}{k_B T} \left(\frac{\partial p}{\partial n} \right)_{\text{exp}} \quad (2.20)$$

Il valore di pressione è ottenuto da simulazioni, come funzione della densità, per

diversi valori del parametro di repulsione. Viene utilizzata a tale scopo la seguente equazione del viriale:

$$p = \rho k_B T + \frac{1}{3V} \left\langle \sum_{j>i} \mathbf{r}_{ij} \cdot \mathbf{F}_{ij}^C \right\rangle = \rho k_B T + \frac{2\pi}{3} \rho^2 \int_0^{r_c} r a \left(1 - \frac{r}{r_c} \right) g(r) r^2 dr \quad (2.21)$$

in cui $g(r)$ corrisponde alla funzione di distribuzione radiale, in grado di descrivere la probabilità di trovare due particelle ad una distanza r . E' possibile determinare una buona approssimazione della pressione per valori di densità $\rho > 2$ [17]:

$$p = \rho k_B T + 0.1 a_{ii} \rho^2 \quad (2.22)$$

la quale sostituita all'interno dell'equazione 2.20, porta alla seguente relazione:

$$k^{-1} = \frac{1}{N_m} + \frac{0.2 a_{ii} \rho}{k_B T} \quad (2.23)$$

Dall'equazione 2.23 è possibile ricavare l'espressione del parametro di repulsione a_{ii} tra *beads* della stessa tipologia:

$$a_{ii} = k_B T \left(\frac{k^{-1} N_m - 1}{0.2 \rho} \right) \quad (2.24)$$

dunque viene ottenuta una relazione che scala linearmente con il grado di *coarse-graining*.

Quest'ultima tesi è stata confutata da Füchslin et al.[27], i quali hanno dimostrato che la relazione precedente, in unità ridotte, non scala rispetto al grado di *coarse-graining*. Per tale ragione Vanya et al. [28] hanno derivato nuovamente la relazione precedente, ottenendo, in unità ridotte, la seguente equazione:

$$a_{ii} = \frac{k^{-1} - k_B T}{2\alpha\rho} \quad (2.25)$$

dove α è una costante, k^{-1} è l'inverso della comprimibilità, ρ indica la densità numerica, k_B la costante di Boltzmann e T la temperatura del sistema.

2.2.4 Teoria dei polimeri di Flory-Huggins

Una delle possibilità fornite dalla DPD è quella di poter simulare diverse interfacce, quindi sistemi multicomponente. Sebbene le interfacce gas-liquido non siano simulabili, è possibile simulare interfacce liquido-liquido o solido-liquido. Il metodo utilizzato si basa sulla teoria dei polimeri di Flory-Huggins, in cui le molecole di diverse dimensioni vengono confinate in un reticolo. L'energia interna viene descritta come una perturbazione rispetto al *mixing* ideale, cioè si considera solo l'eccesso rispetto ai componenti puri. Per due componenti questo porta alla seguente relazione dell'energia libera [17]:

$$\frac{F}{k_B T} = \frac{\phi_A}{N_A} \ln \phi_A + \frac{\phi_B}{N_B} \ln \phi_B + \chi \phi_A \phi_B \quad (2.26)$$

dove ϕ_A e ϕ_B sono le frazioni volumetriche dei componenti A e B generici, mentre N_A e N_B corrispondono al numero di segmenti per le specie A e B. χ corrisponde invece alla solubilità della teoria di Flory-Huggins. Viene riportata la condizione implicita tale per cui $\phi_A + \phi_B = 1$ e dunque $\phi_B = 1 - \phi_A$, il che comporta che ϕ_A abbia solo un grado di libertà. Quando A e B sono due componenti che non si interfacciano spontaneamente il parametro χ risulta positivo, viceversa risulta negativo quando A e B si interfacciano spontaneamente.

Per valori del parametro χ sufficientemente grandi, l'andamento dell'energia libera presenta due punti di minimo, intervallati da un punto di massimo, come mostrato in Figura 2.1

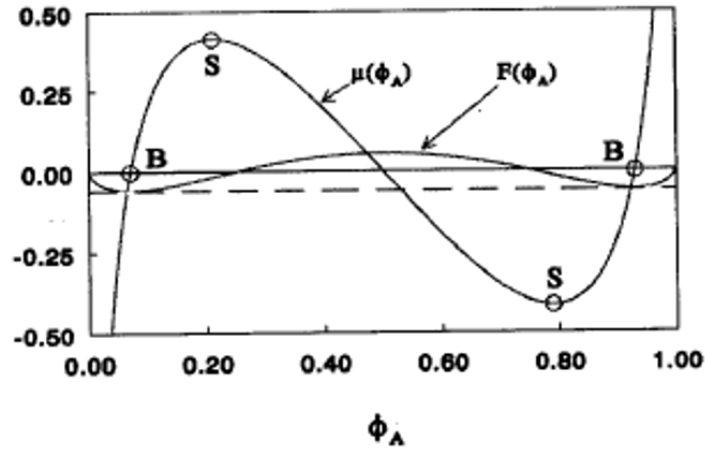


Figura 2.1: Andamento relativo all'energia libera e al potenziale chimico secondo il modello di Flory-Huggins per $N_A = N_B = 1$ (immagine estratta e rielaborata da [17]).

Se $N_A = N_B$ il punto di minimo viene trovato nel punto tale per cui $\mu = \frac{\partial F}{\partial \phi_A} = 0$. La loro posizione segue la seguente equazione implicita:

$$\chi = \frac{\ln(1 - \phi_A)\phi_A}{1 - 2\phi_A} \quad (2.27)$$

Dunque se $\mathcal{X}$ è positivo, ma di valore assoluto basso, non avviene segregazione, a meno che quest'ultimo superi un valore *critico*. Questo valore *critico* corrisponde a:

$$\mathcal{X}^{crit} = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{\sqrt{N_A}} + \frac{1}{\sqrt{N_B}} \right)^2 \quad (2.28)$$

La densità di energia libera corrisponde alla pressione di un componente singolo:

$$\frac{f_v}{k_B T} = \rho \ln \rho - \rho + \frac{\alpha a \rho^2}{k_B T} \quad (2.29)$$

la quale si presenta per un sistema di due componenti:

$$\frac{f_V}{k_B T} = \frac{\rho_A}{N_A} \ln \rho_A + \frac{\rho_B}{N_B} \ln \rho_B - \frac{\rho_A}{N_A} - \frac{\rho_B}{N_B} + \frac{\alpha(a_{AA}\rho_A^2 + 2a_{AB}\rho_A\rho_B + a_{BB}\rho_B^2)}{k_B T} \quad (2.30)$$

Scegliendo $a_{AA} = a_{BB}$ e assumendo che $\rho_A + \rho_B$ sia approssimativamente costante, si ottiene:

$$\frac{f_V}{(\rho_A + \rho_B)k_B T} \approx \frac{x}{N_A} \ln x + \frac{(1-x)}{N_B} \ln(1-x) + \chi x(1-x) + \text{costante}, \quad (2.31)$$

dove viene imposto $x = \rho_A/(\rho_A + \rho_B)$.

Si identifica dunque la seguente relazione in analogia con l'equazione 2.26:

$$\chi = \frac{2\alpha(a_{AB} - a_{AA})(\rho_A + \rho_B)}{k_B T}. \quad (2.32)$$

la quale può essere corretta variando il coefficiente di proporzionalità. Per $\chi > 3$ e $\rho = 3$, è valida la seguente equazione:

$$\chi = (0.231 \pm 0.001)\Delta a \quad (2.33)$$

dove Δa corrisponde all'incremento del parametro di repulsione tra *beads* diverse. Pertanto il coefficiente della forza conservativa repulsiva tra *beads* di due tipologie diverse, rispettivamente i e j , può essere stimato tramite [18]:

$$a_{ij} \approx a_{ii} + \frac{\chi_{ij}}{(0.231 \pm 0.001)} \quad (2.34)$$

2.2.5 Fattori di conversione

Nel modello DPD tutte le variabili e i parametri considerati vengono convertiti in unità "ridotte" e dunque adimensionali. Per eseguire questa procedura vengono definite le unità di riferimento per la massa, lunghezza ed energia:

- **Massa:** l'unità di massa di una singola particella DPD corrisponde ad m
- **Lunghezza:** l'unità di lunghezza corrisponde al raggio di cutoff, r_C
- **Energia:** l'unità di energia corrisponde a $\epsilon = k_B T$

Dalla definizione delle precedenti unità adimensionali è possibile definire l'unità di tempo, come riportato di seguito:

$$\tau = \sqrt{\frac{m}{k_B T}} \quad (2.35)$$

Come presentato da Groot [18], è utile sfruttare, a titolo di esempio, la procedura di conversione delle unità adimensionali rispetto ad una molecola di acqua. Conoscendo i valori reali di una molecola d'acqua, ossia volume di $30 \text{ \AA}^3$, densità di 1000 kg m^{-3} e sfruttando la definizione tale per cui una singola *bead* corrisponde a N_m molecole di acqua, è stato possibile definire il raggio di cutoff r_c , ossia il valore per cui moltiplicare una lunghezza espressa in unità DPD per trasformarla in unità tradizionali:

$$r_c = 3.107(\rho N_m)^{1/3}(\text{\AA}^3) \quad (2.36)$$

Per quanto riguarda il fattore di conversione energetico ϵ , considerando una temperatura del sistema di $298K$, esso risulta numericamente pari a:

$$\epsilon = k_B T = 4.112 \cdot 10^{-21} (J) \quad (2.37)$$

dove la costante di Boltzmann k_B è pari a $1.38 \cdot 10^{-23} J/K$.

Da queste unità si possono esprimere tutte le altre grandezze derivate in unità DPD. Nel fare ciò bisogna definire il grado di *coarse-graining* del modello, ossia il numero N_m di atomi contenuti in una particella DPD.

Di conseguenza, la massa M di una particella DPD è N_m volte la massa di una particella MD:

$$M = m N_m \quad (2.38)$$

mentre la densità numerica del sistema, ossia il numero di *beads* per unità di volume, viene definita come:

$$\rho_{DPD} = 3r_c^{-3} \quad (2.39)$$

Per quanto riguarda il fattore di conversione temporale τ , esso viene determinato attraverso la seguente equazione:

$$\tau = \frac{N_m D_{sim} r_c^2}{D_{water}} \quad (2.40)$$

ottenuta dalla uguaglianza tra il valore sperimentale della diffusione dell'acqua pari a $(2.43 \pm 0.01) \cdot 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$ [29] e il valore di diffusione ottenuto dalle simulazioni [30].

2.3 Dettagli del modello e scelta dei parametri

La sezione seguente è dedicata alla descrizione della topologia DPD del sistema e alla definizione dei parametri di modello per i diversi sistemi analizzati: un sistema semplice costituito da acqua e Pluronic F68, e successivamente i sistemi complessi formati da acqua, Pluronic F68 e, rispettivamente, Diclofenac o Diclofenac sodico (concentrazioni di farmaci esplorate: 0.015mol/L , 0.020mol/L , 0.075mol/L e 0.100mol/L). Per ciascun sistema vengono illustrati il *mapping* adottato e i criteri di scelta dei parametri. Sul sistema acqua–Pluronic F68 è stata condotta una campagna di simulazioni preliminari con l'obiettivo di confrontare diversi mapping e parametri riportati in letteratura [31] [32]. In questa fase, infatti, i parametri del modello sono stati ricavati da letteratura alla temperatura di interesse pari a 308K [32]. Per i sistemi contenenti il farmaco, invece, i parametri sono stati calcolati e validati nell'ambito del presente lavoro.

2.3.1 Pluronic F68 in acqua: modello DPD e parametri

Seguendo l'approccio standard ampiamente adottato in letteratura, è stato scelto un livello di *coarse-graining* in cui tutte le *beads* della soluzione di acqua e F68 rappresentano circa stessi volumi e stesse masse. In questo schema ogni *bead* di PEO è rappresentativa di 4.3 molecole della medesima specie, mentre ogni *bead* di PPO include 3.3 molecole della stessa. Ogni *bead* di acqua rappresenta, invece, 10 molecole. Le *beads* rappresentative di queste tre specie vengono presentate in Figura 2.2. Le Tabelle 2.1 e 2.2 riportano volumi e masse delle diverse specie sia per quanto riguarda le molecole che le *beads* risultanti dal loro *clustering* al livello di *coarse-graining* adottato.

CG BEAD	Volume molecola ($\text{\AA}^3$)	Volume Bead ($\text{\AA}^3$)
H ₂ O·10 (W)	30.0	300
ETIL-OX (PEO)·4.3 (A)	64.6	278
PROP-OX (PPO)·3.3 (B)	96.5	318

Tabella 2.1: Volumi delle molecole e delle *beads* relativi a PEO, PPO e H₂O, considerando il livello di *coarse-graining* opportuno. Valori stimati in accordo con l'approccio di Durchschlag e Zipper [33].

Adottando questo schema, il Pluronic F68 viene rappresentato da 45 *beads* totali, ossia da 36 *beads* di PEO e da 9 *beads* di PPO [32]. Dunque il Pluronic F68 assume la seguente topologia DPD: $A_{18}B_9A_{18}$ (come illustrato in Figura 2.3).

CG BEAD	Massa molare molecola (g/mol)	Massa molare Bead (g/mol)
H ₂ O·10 (W)	18.016	180.160
ETIL-OX (PEO)·4.3 (A)	44.050	189.415
PROP-OX (PPO)·3.3 (B)	58.080	191.160

Tabella 2.2: Masse molari delle molecole e delle *beads* relative a PEO, PPO e H₂O, considerando il livello di *coarse-graining* opportuno.

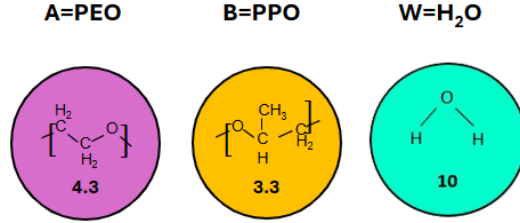


Figura 2.2: *Beads* ottenute attraverso la procedura di *coarse-graining*, relative rispettivamente al PEO, PPO e H₂O.

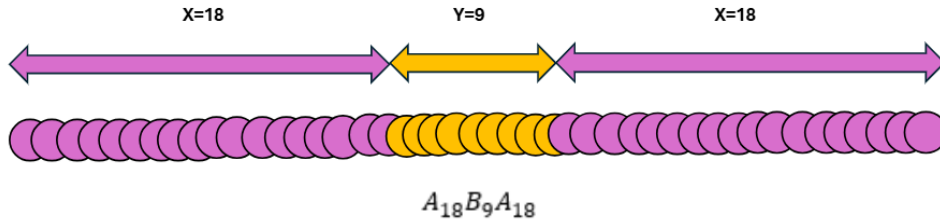


Figura 2.3: Topologia DPD per una macromolecola di F68.

Inoltre, per le *beads* appartenenti alla stessa macromolecola è necessario descrivere i legami chimici. Viene impiegato il cosiddetto modello *bead-and-spring*, dove le *beads* all'interno della catena polimerica interagiscono attraverso un potenziale armonico, caratterizzato da due parametri fondamentali, ossia la lunghezza di equilibrio del legame r_0 e la costante elastica del legame K_b , la quale include al suo interno il fattore $1/2$. Il potenziale armonico viene descritto dalla seguente equazione:

$$E = K_b(r_{ij} - r_0)^2. \quad (2.41)$$

In questo sistema, considerando che tutti i monomeri presenti all'interno della catena di Pluronic F68 formano tra di loro legami di tipo covalente, è stata scelta una singola coppia di valori per K_b e r_0 , tale da non violare la topologia delle catene di Pluronic. Di conseguenza, seguendo questo modello, tutti i legami tra *beads* vengono descritti identicamente, il che viene giustificato dalle scelte sui gradi di *coarse-graining*. Dunque sono stati usati valori di $K_b = 50$ e $r_0 = 0.7$, poiché permettono di descrivere il comportamento atteso [32, 34]; di seguito viene riportato il Codice 2.1 con i comandi utilizzati su LAMMPS:

Codice 2.1: Comandi bond style e bond coeff

```

1    bond_style           harmonic
2    bond_coeff           1 50 0.7

```

dove nel comando *bond_coeff* i numeri riportati rappresentano rispettivamente la tipologia di legame, il valore di K_b e il valore di r_0 .

I coefficienti di repulsione a_{ii} tra *beads* dello stesso tipo sono stati valutati attraverso l'approccio precedentemente illustrato e facendo riferimento all'equazione 2.25. Questi valori sono stati stimati alla temperatura di $308K$, per $k^{-1} = 16$ e $\rho = 3$. I coefficienti di repulsione relativi all'interazione tra *beads* di specie differente alla temperatura simulata sono presi da letteratura [32] e vengono di seguito riportati nella Tabella 2.3:

	A	B	W
A	25.707	49.607	26.707
B	49.607	25.707	39.107
W	26.707	39.107	25.707

Tabella 2.3: Parametri di repulsione a_{ii} e a_{ij} tra le diverse *beads* (A, B, W).

2.3.2 Parametrizzazione estesa all'intero sistema DDS con Diclofenac

Questo paragrafo si propone di descrivere l'inclusione nel modello DPD del Diclofenac nella sua forma neutra. Le *beads* rappresentative di Acqua, PEO e PPO illustrate nel paragrafo precedente (vedi Figure 2.2 e 2.3) restano invariate. In questa fase è necessario modellare il farmaco. Vengono dunque introdotte nuove *beads* per rappresentare il farmaco. Il primo *mapping* adottato divide la molecola di Diclofenac in due *beads* differenti (vedi Figura 2.4), le quali rappresentano circa gli stessi volumi e le stesse masse, ma minori rispetto alle *beads* relative ad acqua e Pluronic. Inoltre, a differenza di queste ultime, le *beads* di Diclofenac presentano un grado di *coarse-graining* più fine, dunque una *beads* è rappresentativa di circa metà molecola di farmaco. In base a quanto appena illustrato il Diclofenac risulta in uno schema *CD* come presentato in Figura 2.5.

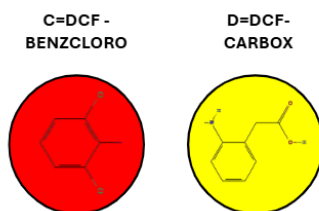


Figura 2.4: *Beads* rappresentative del Diclofenac.

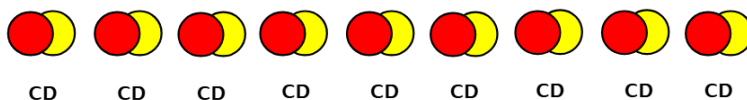


Figura 2.5: Topologia DPD di diverse molecole di Diclofenac.

Le seguenti Tabelle 2.4 e 2.5 riportano i valori dei volumi e delle masse molari di tutte le specie del sistema ora considerato, seguendo l'approccio di Durchschlag e Zipper [33], per la stima dei volumi.

CG BEAD	Volume molecola ($\text{\AA}^3$)	Volume Bead ($\text{\AA}^3$)
H ₂ O·10 (W)	30.0	300
ETIL-OX (PEO)·4.3 (A)	64.6	278
PROP-OX (PPO)·3.3 (B)	96.5	318
DCF-BENZCLORO (C)	171.0	171.0
DCF-CARBOX (D)	196.1	196.1

Tabella 2.4: Volumi delle molecole e delle *beads* relativi a PEO, PPO, H₂O, DCF-BENZCLORO e DCF-CARBOX, considerando il livello di *coarse-graining* opportuno. Valori stimati in accordo con l'approccio di Durchschlag e Zipper [33].

CG BEAD	Massa molare molecola (g/mol)	Massa molare Bead (g/mol)
H ₂ O·10 (W)	18.016	180.160
ETIL-OX (PEO)·4.3 (A)	44.050	189.415
PROP-OX (PPO)·3.3 (B)	58.080	191.160
DCF-BENZCLORO (C)	145.9	145.9
DCF-CARBOX (D)	150.1	150.1

Tabella 2.5: Masse molari delle molecole e delle *beads* relative a PEO, PPO, H₂O, DCF-BENZCLORO e DCF-CARBOX, considerando il livello di *coarse-graining* opportuno.

Le beads di Diclofenac sono legate tra di loro. Anche in questo caso il legame è modellato attraverso il potenziale armonico. Viene adottata la medesima combinazione dei parametri K_b e r_0 già proposta nella precedente sezione (vedi Codice 2.1).

Per quanto riguarda il valore dei parametri di repulsione a_{ii} e a_{ij} tra *beads* dello stesso tipo e di tipo differente (sotto le medesime condizioni mostrate nella precedente sezione) viene seguito il seguente approccio: i valori per le *beads* di PEO, PPO e H₂O sono stati riportati nella sezione precedente. Invece, per quanto riguarda i valori legati alle interazioni con le *beads* rappresentative del Diclofenac è stato seguito l'approccio di seguito spiegato. Il Diclofenac è stato trattato come il PPO. Dunque le *beads* C e D sono state trattate come *beads* di PPO nella definizione dei parametri repulsivi.

Come anticipato prima le *beads* C e D, invece, sono rappresentative di volumi diversi rispetto alle specie del Pluronic. La differenza di volumi viene considerata attraverso la definizione di opportuni raggi di cutoff r_c . Tutte le *beads* rappresentano volumi sferici, il cui volume viene descritto dalla relazione $V = \frac{4}{3}\pi r^3$. Ponendo r_c relativo all'interazione tra due *beads* di acqua, PEO e PPO pari all'unità, ne deriva che, per determinare i valori di r_c relativi all'interazione tra due *beads* della stessa specie di DCF-BENZCLORO oppure di DCF-CARBOX basta definire il volume di queste ultime in funzione del volume di una *bead* di acqua. Successivamente per determinare il valore di r_c relativo all'interazione tra *beads* di specie diverse viene sfruttata una semplice media aritmetica tra i valori precedentemente stimati:

$$r_{c,ij} = \frac{r_{c,ii} + r_{c,jj}}{2} \quad (2.42)$$

I risultati di questa procedura vengono riassunti nella Tabella 2.6

	A	B	W	C	D
A	1.000	1.000	1.000	0.785	0.827
B	1.000	1.000	1.000	0.785	0.827
W	1.000	1.000	1.000	0.785	0.827
C	0.785	0.785	0.785	0.570	0.612
D	0.827	0.827	0.827	0.612	0.654

Tabella 2.6: Valori dei rispettivi raggi di cutoff r_c tra *beads* della stessa specie e di specie diverse.

2.3.3 Parametrizzazione estesa all'intero sistema DDS con Diclofenac sodico

Questa sezione spiega il modello DPD adottato per Pluronic F68 e Diclofenac sodico. In queste simulazioni è stato testato un mapping diverso rispetto a quello della sezione precedente, dove la molecola di Diclofenac sodico viene rappresentata da quattro *beads*, le quali, a differenza delle *beads* di acqua e Pluronic, rappresentano masse e volumi differenti tra loro e minori rispetto a queste ultime (vedi Figura 2.6). Dopo quanto illustrato il Diclofenac sodico viene rappresentato da uno schema *CDEF* come presentato in Figura 2.7

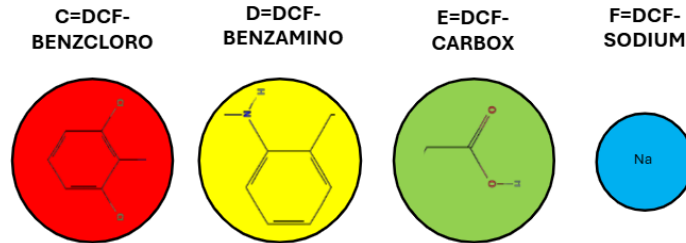


Figura 2.6: *Beads* rappresentative del Diclofenac sodico.

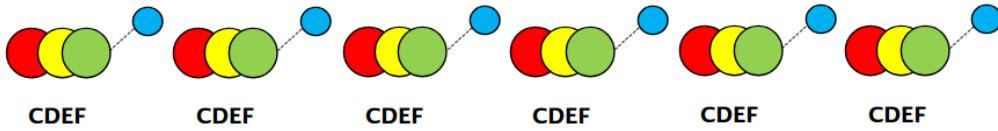


Figura 2.7: Topologia DPD di diverse molecole di Diclofenac sodico.

La scelta di rappresentare una molecola di sodio attraverso un'unica *beads* è da ricondurre alla capacità del sale sodico di dissociarsi in soluzione acquosa. Per quanto una suddivisione del Diclofenac in *beads* rappresentanti volumi e masse uguali permetterebbe una migliore descrizione del sistema, risulta conveniente questa suddivisione per considerare in maniera più efficace l'effetto della dissociazione (ricordiamo che il sodio si dissocerebbe dal gruppo carbossilico).

Vengono di seguito riportati i valori dei volumi e delle masse molari delle diverse specie, rispettivamente nelle Tabelle 2.7 e 2.8. Per la determinazione dei volumi relativi alle *beads* delle specie W, A, B, C, D, E viene nuovamente seguito l'approccio presentato da Durchschlag e Zipper [33], mentre il volume relativo alla *bead* di sodio F viene stimato in accordo con il lavoro di Markéta Havlávová [35].

CG BEAD	Volume molecola ($\text{\AA}^3$)	Volume Bead ($\text{\AA}^3$)
H ₂ O·10 (W)	30.0	300
ETIL-OX (PEO)·4.3 (A)	64.6	278
PROP-OX (PPO)·3.3 (B)	96.5	318
DCF-BENZCLORO (C)	171.0	171.0
DCF-BENZAMINO (D)	138.0	138.0
DCF-CARBOX (E)	53.0	53.0
DCF-SODIUM (F)	78.0	78.0

Tabella 2.7: Volumi delle molecole e delle *beads* relativi a PEO, PPO, H₂O, DCF-BENZCLORO, DCF-BENZAMINO, DCF-CARBOX e DCF-SODIUM, considerando il livello di *coarse-graining* opportuno. Valori stimati in accordo con l'approccio di Durchschlag e Zipper [33] e Markéta Havlávová [35].

CG BEAD	Massa molare molecola (g/mol)	Massa molare Bead (g/mol)
H ₂ O·10 (W)	18.016	180.160
ETIL-OX (PEO)·4.3 (A)	44.050	189.415
PROP-OX (PPO)·3.3 (B)	58.080	191.160
DCF-BENZCLORO (C)	145.9	145.9
DCF-BENZAMINO (D)	91.1	91.1
DCF-CARBOX (E)	58.0	58.0
DCF-SODIUM (F)	22.9	22.9

Tabella 2.8: Masse molari delle molecole e delle *beads* relativi a PEO, PPO, H₂O, DCF-BENZCLORO, DCF-BENZAMINO, DCF-CARBOX e DCF-SODIUM, considerando il livello di *coarse-graining* opportuno.

Viene nuovamente scelta la medesima combinazione di parametri K_b e r_0 già proposta nella precedente sezione, mentre per quanto riguarda la stima dei parametri repulsivi a_{ii} e a_{ij} viene seguito un approccio simile a quello illustrato nella sezione precedente: i valori stimati tra le *beads* di PEO, PPO e H₂O restano invariati; Per quanto riguarda i parametri repulsivi legati alle combinazioni con/tra le *beads* rappresentative del farmaco vengono imposti gli stessi valori relativi all'interazione del PPO con le altre specie, fatta eccezione per le *beads* rappresentative del sodio, i cui parametri repulsivi vengono posti pari a quelli dell'acqua.

Per la stima dei raggi di cutoff viene seguito il medesimo approccio, sfruttando nuovamente l'equazione 2.42, di cui di seguito nella Tabella 2.9 vengono riportati i risultati ottenuti:

	A	B	W	C	D	E	F
A	1.000	1.000	1.000	0.785	0.730	0.589	0.630
B	1.000	1.000	1.000	0.785	0.730	0.589	0.630
W	1.000	1.000	1.000	0.785	0.730	0.589	0.630
C	0.785	0.785	0.785	0.570	0.515	0.374	0.415
D	0.730	0.730	0.730	0.515	0.460	0.319	0.360
E	0.589	0.589	0.589	0.374	0.319	0.177	0.219
F	0.630	0.630	0.630	0.415	0.360	0.219	0.260

Tabella 2.9: Valori dei rispettivi raggi di cutoff r_c tra *beads* della stessa specie e di specie diverse.

2.4 Interazione elettrostatica nella Dissipative Particle Dynamics

Nel sistema costituito da acqua, Pluronic F68 e Diclofenac sodico le interazioni elettrostatiche rivestono un ruolo cruciale, considerando la dissociazione del farmaco e la conseguente formazione di cariche positive e negative all'interno del sistema. Dunque, per considerare tale fenomeno, è stata condotta una ulteriore campagna di simulazioni che ne tenesse conto. L'inclusione e l'analisi di tali interazioni nelle simulazioni DPD è essenziale per descrivere accuratamente fenomeni appartenenti alla scala mesoscopica, quali, ad esempio, la formazione di aggregati polielettrolita-tensioattivo [36]. Nelle simulazioni MD il metodo comunemente più impiegato per il calcolo delle interazioni elettrostatiche a lungo raggio è la somma di Ewald, riconosciuta come la tecnica più accurata per la stima delle forze coulombiane. Tale metodo può essere implementato all'interno di simulazioni DPD standard, senza comportare un aumento significativo del costo computazionale. Tuttavia, tale procedura risulta computazionalmente più esigente rispetto all'approccio proposto da Groot [37], in cui il campo elettrostatico viene risolto localmente su una griglia.

La natura a lungo raggio delle forze elettrostatiche non consente l'utilizzo diretto di un raggio di cutoff r_c come avviene comunemente per la descrizione delle interazioni a corto raggio (vedi $\mathbf{F}_{ij}^C$, $\mathbf{F}_{ij}^D$ e $\mathbf{F}_{ij}^R$). Considerando nel sistema un numero N di particelle, ciascuna con carica q_i , vettore posizione $\mathbf{r}_i$ all'interno di una box cubica di lato pari ad L , l'energia elettrostatica totale del sistema risulta pari a:

$$U^{\text{el}}(\mathbf{r}^N) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \sum_i \sum_{j>i} \sum_{\mathbf{n}} \frac{q_i q_j}{|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}L|} \quad (2.43)$$

dove $\mathbf{n}$ corrisponde ad un vettore numerico, ϵ_0 e ϵ_r le costanti dielettriche relative al vuoto e al mezzo. La somma rispetto ad $\mathbf{n}$ tiene in considerazione le immagini periodiche del sistema studiato e i termini con $i = j$ vengono omessi per $\mathbf{n} = 0$. Ricorrendo alla somma di Ewald, la precedente equazione viene decomposta in due parti differenti: una somma eseguita nello spazio reale e una somma nello spazio

reciproco, noto comunemente come spazio di Fourier:

$$U^{\text{el}}(\mathbf{r}^N) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \left(\sum_i \sum_{j>i} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \text{erfc}(\alpha r_{ij}) + \frac{2\pi}{V} \sum_{\mathbf{k} \neq 0} Q(\mathbf{k}) S(\mathbf{k}) S(-\mathbf{k}) \frac{\alpha}{\sqrt{\pi}} e^{-\frac{k^2}{4\alpha^2}} \right) \quad (2.44)$$

dove:

$$Q(\mathbf{k}) = \frac{1}{k^2} \exp\left(-\frac{k^2}{4\alpha^2}\right); \quad S(\mathbf{k}) = \sum_{i=1}^N q_i \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_i), \quad \mathbf{k} = \frac{2\pi}{L} \mathbf{m} \quad (2.45)$$

in cui α è un parametro che tiene conto del contributo dato dallo spazio reale, k è il modulo del vettore $\mathbf{k}$, m_x, m_y, m_z sono dei numeri integrativi. Il potenziale elettrostatico appena descritto diverge a distanze ridotte, dunque per r che tende a zero, al contrario del potenziale soffic, considerando che nell'equazione 2.3 la $\mathbf{F}_{ij}^C$ è matematicamente definita per $r = 0$. Questo comporterebbe un completa sovrapposizione delle particelle, ossia una fenomeno fisicamente impossibile. Dunque, per risolvere tale problema, Groot [37] ha proposto una strategia secondo la quale la carica puntiforme non viene più trattata come tale, ma viene distribuita in un volume, realizzando così una nuvola di carica. Inizialmente egli propose di descrivere la distribuzione di cariche come mostrato di seguito:

$$\rho_e(r) = \begin{cases} \frac{3}{\pi r_e^3} \left(1 - \frac{r}{r_e}\right) & \text{for } r < r_e \\ 0 & \text{for } r \geq r_e \end{cases} \quad (2.46)$$

dove r_e corrisponde al raggio di distribuzione elettrostatica. Successivamente, M. González-Melchor et al. [36] hanno proposto una distribuzione di carica alternativa, la quale elimina la divergenza del potenziale a $r = 0$. Tale distribuzione, impiegata nel presente lavoro di tesi, è definita come segue:

$$\rho_e(r) = \frac{1}{\pi \lambda_e^3} \exp\left(-\frac{2r}{\lambda_e}\right) \quad (2.47)$$

dove λ_e corrisponde alla distanza di decadimento della distribuzione di cariche di Slater. Considerando quanto proposto, il potenziale di interazione tra due distribuzioni di cariche distanti r_{ij} si presenta come di seguito:

$$U_{ij}^{\text{el}} = \frac{l_B q_i q_j}{r_{ij}} [1 - (1 + \beta r_{ij}) \exp(-2\beta r_{ij})] \quad (2.48)$$

dove $\beta = \frac{5}{8\lambda_e}$ e l_B rappresenta una costante adimensionale pari a 1.1 per una soluzione acquosa. Dalla definizione di potenziale fornita si ottiene, tramite derivazione, l'equazione rappresentativa della forza elettrostatica F_{ij}^{el} [36]:

$$F_{ij}^{\text{el}} = \frac{l_B q_i q_j}{r_{ij}^2} \{1 - \exp(-2\beta r_{ij}) [1 + 2\beta r_{ij} (1 + \beta r_{ij})]\} \quad (2.49)$$

Dalle equazioni presentate si può osservare che la divergenza del potenziale elettrostatico per $r = 0$ viene trascurata. Il potenziale converge ad un valore finito [36]:

$$\lim_{r_{ij} \rightarrow 0} U_{ij}^{\text{el}} = q_i q_j \beta l_B. \quad (2.50)$$

2.5 Proprietà analizzate

In questo lavoro sono state analizzate diverse proprietà come gli andamenti delle funzioni di distribuzioni radiali (RDF), i profili di distribuzione di densità radiale (RDP), dalle quali è stato possibile ricostruire il profilo micellare, esplorare l'effetto della variazione di concentrazione di Diclofenac e stimare l'efficienza di incapsulamento. Dall'analisi comparativa di queste proprietà vengono tratte in seguito delle conclusioni generali sui sistemi analizzati, in particolar modo confrontando i risultati ottenuti alle diverse concentrazioni di farmaco.

2.5.1 Funzione di distribuzione radiale (RDF)

La funzione di distribuzione radiale (RDF), nota come $g(r)$, descrive la probabilità di trovare una particella ad una determinata distanza r rispetto ad una particella di riferimento, all'interno di un sistema omogeneo e isotropico [38]. Conoscere l'andamento di questa funzione è di fondamentale importanza per diverse ragioni: l'analisi della funzione di distribuzione radiale permette di studiare le strutture e le interazioni di sistemi complessi, fornendo una panoramica delle correlazioni tra particelle e di come queste interazioni decadano con la distanza. Inoltre, attraverso lo studio di questa funzione, è possibile legare diverse proprietà termodinamiche macroscopiche alla interazione interparticellare, permettendo in questo modo di poter calcolare proprietà chiave, come la comprimibilità isoterma, energia interna e pressione [38].

Per determinare RDF è necessario selezionare/individuare una particella di riferimento all'interno del sistema; successivamente si costruisce una serie di gusci sferici concentrici attorno a quest'ultima, separati da una distanza fissata dr , come riportato in Figura 2.8. Per stimare matematicamente questa proprietà viene considerato il numero medio di particelle presenti in ogni guscio e questo viene diviso per il volume del guscio corrispondente e normalizzato per la densità media atomica del sistema. In altre parole $g(r)$ si ottiene dividendo la densità locale $\rho(r)$, a diverse distanze dalla particella di riferimento, per la densità media apparente ad una data temperatura T :

$$g(r) = \frac{\rho(r)}{\rho} \quad (2.51)$$

in cui la densità locale ad una data distanza r dalla particella di riferimento viene così definita:

$$\rho(r) = \frac{dN(r)}{dV(r)} = \frac{dN(r)}{4\pi r^2 dr} \quad (2.52)$$

dove $dN(r)$ è il numero di particelle all'interno del guscio sferico infinitesimo alla distanza r e di spessore dr , mentre $dV(r)$ indica il volume infinitesimo del guscio sferico, pari a $4\pi r^2 dr$.

Dunque, è possibile riscrivere l'equazione 2.51, sfruttando la definizione 2.52 come segue:

$$g(r) = \frac{dN(r)}{4\pi r^2 \rho dr} \quad (2.53)$$

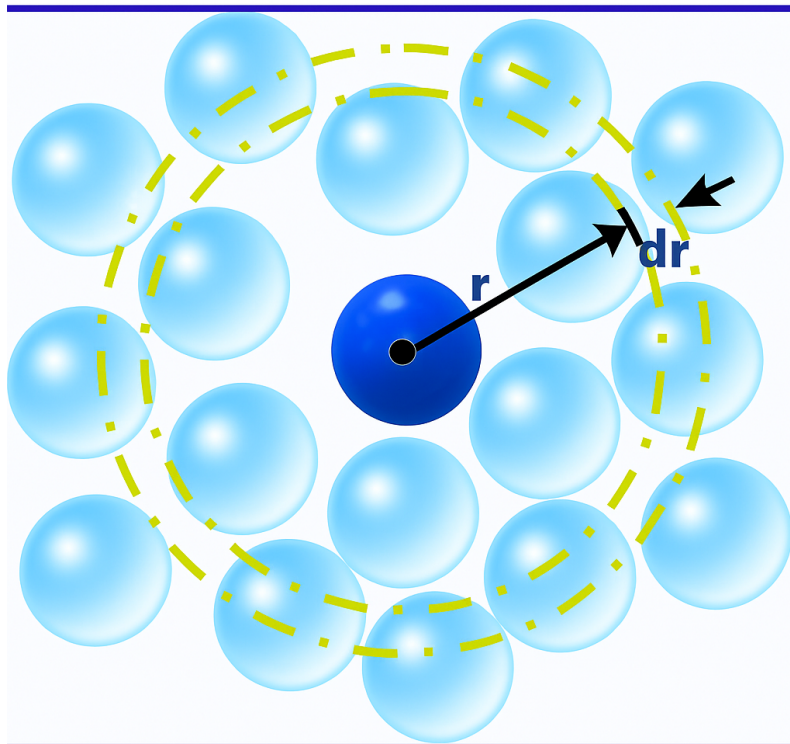


Figura 2.8: Illustrazione dello schema utilizzato per la stima di RDF (immagine estratta e rielaborata da [38]).

In altre parole RDF illustra come la densità delle particelle varia in funzione della distanza r dalla particella di riferimento. Tipicamente nei profili RDF si presentano diversi picchi a differenti valori di r , i quali indicano che le particelle si dispongono secondo gusci concentrici. Quanto appena affermato indica che i picchi rappresentano distanze, rispetto al riferimento, in cui è più probabile trovare particelle.

Tipicamente a bassi valori di r , RDF è pari a zero, poiché le forze repulsive impediscono la sovrapposizione delle particelle, mentre a distanze maggiori RDF tende a crescere, raggiungendo il valore dell'unità (in cui la densità locale è pari alla densità media apparente), oppure valori superiori. Se la funzione assume valori nulli a distanze superiori, significa che nessuna particella si trova a quella distanza.

Bisogna evidenziare che, per un sistema complesso, come ad esempio una miscela o soluzione, la RDF si complica, poiché bisogna considerare l'interazione tra particelle di diversa tipologia. Di conseguenza $g(r)$ non è solo funzione di densità, temperatura e distanza (come in un liquido puro), ma anche della composizione e della natura delle interazioni interparticellari [38].

La funzione di distribuzione radiale (RDF) può essere determinata attraverso tecniche sperimentali, come la diffusione a raggi X o di Neutroni, oppure attraverso tecniche teoriche, come equazioni integrali e simulazioni [38].

2.5.2 Profili di densità radiale (RDP)

La determinazione della densità di distribuzione radiale (RDP) per un aggregato/cluster di massa nota presuppone l'ipotesi di simmetria sferica del cluster stesso. Tale assunzione è giustificata a livello statistico, in quanto è ragionevole considerare che le disomogeneità locali di ogni singolo cluster si annullino attraverso una media statistica, dalla quale viene idealmente generato un cluster di dimensioni medie. In questo contesto, è possibile trattare le particelle localizzate a distanze comprese tra r e $r + dr$ dal centro del cluster come uniformemente distribuite all'interno del guscio sferico di volume $4\pi r^2 dr$. Dunque per stimare RDP viene seguita la seguente procedura: per ogni cluster generato all'interno del sistema viene identificato un centro di riferimento e per ogni distanza compresa tra r e $r + dr$ viene contato il numero di particelle presenti; tale numero viene successivamente normalizzato, dividendo per il volume corrispondente al guscio sferico considerato, pari a $4\pi r^2 dr$. L'operazione viene ripetuta su tutti i valori di r necessari a considerare il cluster nella sua interezza e per tutti i cluster all'interno del sistema [39].

Sia nella stima di RDP, che nella stima di RDF, il punto più critico della procedura è proprio nella scelta del riferimento, ossia del punto centrale del cluster. La scelta non è semplice, poiché il cluster non possiede alcuna simmetria, ciononostante vengono proposte diverse opzioni in letteratura, tra cui la scelta del centro della sfera più piccola che racchiude il cluster, oppure il centro di massa del cluster [39].

2.5.3 Efficienza di incapsulamento

Il *core* idrofobo delle micelle, costituito da segmenti di PPO, agisce da compartimento per incapsulare farmaci lipofili, favorendo l'aumento della loro solubilità e stabilità. Principalmente, i farmaci vengono incapsulati e caricati all'interno del *core* micellare attraverso interazioni idrofobiche e, mediamente, formando legami covalenti o non covalenti. Dunque, non è possibile caricare qualsiasi farmaco all'interno delle micelle polimeriche, in quanto la capacità di incapsulamento non dipende unicamente dalle proprietà steriche, ma soprattutto dalle interazioni idrofobiche che si instaurano. I principali fattori che influenzano l'efficienza di incapsulamento micellare di Pluronic sono i seguenti [40]:

- La natura chimica del soluto;
- La lunghezza e le dimensioni del *core* micellare;
- La natura del *core* micellare;
- Il peso molecolare totale del Pluronic;
- La concentrazione del soluto;
- La natura e la lunghezza dello *shell* micellare;

L'efficienza di incapsulamento viene principalmente misurata attraverso tecniche dirette e sperimentali, come la spettrofotometria UV o la spettrofluorometria. Impiegare metodi computazionali per la stima di questa proprietà risulta di fondamentale

supporto a queste tecniche. In questo lavoro di tesi l'efficienza viene valutata numericamente: il numero di *beads* rappresentative del farmaco all'interno delle micelle viene diviso per il numero totale di *beads* di Diclofenac del sistema.

Per la stima di questa proprietà viene sfruttata la seguente equazione:

$$DEE = \frac{4\pi \int_0^{r_{micella}} \rho(r) r^2 dr}{4\pi \int_0^\infty \rho(r) r^2 dr} \quad (2.54)$$

dove $\rho(r)$ rappresenta la distribuzione di densità radiale, mentre $r_{micella}$ dipende dalla valutazione eseguita: nella stima dell'efficienza di carico relativa al solo *core* micellare questo parametro viene assunto pari al raggio del *core*, mentre nella stima dell'efficienza di carico *totale* questo viene assunto pari al raggio micellare. Dunque, il valore di *DEE totale* rappresenta l'efficienza stimata sull'intera micellare, comprendente sia le *beads* di PPO che di PEO.

Tale distinzione consente di confrontare l'efficienza riferita all'intera micella con quella specifica del *core*, permettendo di valutare in modo più accurato il fenomeno di incapsulamento nella sua globalità.

Capitolo 3

Dettagli computazionali

Tutte le simulazioni sono state eseguite usando il software LAMMPS, definendo un *dominio computazionale tridimensionale* di forma cubica, con lato di lunghezza $L = 40$. Dunque una box di dimensioni 40x40x40, la quale può contenere un numero $\#$ di *beads* pari a 192.000. Nelle prime simulazioni riguardanti il sistema semplice, composto da acqua e Pluronic F68 45wt%, viene impostata una temperatura di 308K. Nelle successive comprendenti anche il Diclofenac e il suo sale sodico viene impostata la medesima temperatura e la frazione massica di Pluronic, ma la concentrazione di farmaco cambia. Vengono infatti esplorati sistemi comprendenti quattro diverse concentrazioni di farmaco e di farmaco sodico, pari a 0.015 mol/L, 0.020 mol/L, 0.075 mol/L e 0.100 mol/L. Viene di seguito riportato il Codice 3.1, relativo alla definizione delle variabili comuni a tutti i sistemi esplorati sopra elencate:

Codice 3.1: Definizione variabili DPD e di simulazione

1	variable ndim equal	3
2	variable xsize equal	40
3	variable ysize equal	40
4	variable zsize equal	40
5	variable rhop equal	3
6	variable kb equal	1
7	variable T equal	1.03/\${kb}
8	variable cutoff equal	1
9	variable dt equal	0.01
10	variable gamma equal	4.5
11	variable plurchain equal	45
12	variable percn equal	0.45
13	variable neql equal	6000000
15	timestep	\${dt}
16	dimension	\${ndim}

dove la variabile *plurchain* indica la lunghezza della catena di Pluronic F68, mentre

la variabile *percn* indica la frazione numerica relativa ad F68 (per questo sistema non è necessario convertire la frazione massica di Plurónico in frazione numerica, poiché queste due coincidono).

A titolo di esempio viene riportato anche il Codice 3.2, relativo al sistema comprendente acqua e Plurónico F68. Per ogni coppia di *beads* interagenti tra loro viene impostato lo stile DPD attraverso il comando *pair_style*, definendo anche nello stesso comando la temperatura del sistema T e il raggio di cutoff r_c relativo a tutte le *beads* del sistema. Attraverso il comando *pair_coeff* vengono definiti i parametri di interazione e il valore di γ per ogni coppia di *beads*, mentre i valori di r_c non vengono riportati perché tutti unitari nel sistema considerato.

Codice 3.2: Comandi pair style e pair coeff

```

1  pair_style dpd ${T} ${cutoff} 928948
2  pair_coeff 1 1 25.707 ${gamma}
3  pair_coeff 1 2 26.707 ${gamma}
4  pair_coeff 2 2 25.707 ${gamma}
5  pair_coeff 1 3 39.107 ${gamma}
6  pair_coeff 2 3 49.607 ${gamma}
7  pair_coeff 3 3 25.707 ${gamma}

```

dove nel comando *pair_style* l'ultimo numero è rappresentativo del *seed* utilizzato in LAMMPS, mentre nel comando *pair_coeff* i primi due numeri sono relativi alla tipologia di *beads* (1 = H₂O, 2 = PEO, 3 = PPO), mentre gli ultimi due si riferiscono al valore dei parametri di repulsione e a γ . Considerando che, nel sistema le *beads* di Diclofenac rappresentano volumi differenti rispetto a quelli relativi ad acqua e Plurónico, è necessario convertire i valori di concentrazioni molari di Diclofenac in frazione numerica (dato da utilizzare come input su LAMMPS).

I valori di concentrazione molare sono prima stati convertiti in frazione massica, facendo riferimento ad 1 L di soluzione e, successivamente, convertiti in frazione numerica sfruttando la seguente relazione:

$$W_{DCF} = \frac{m_{DCF} \cdot \#beads_{DCF}}{m_{DCF} \cdot \#beads_{DCF} + m_W \cdot \#beads_W + m_{F68} \cdot \#beads_{F68}} \quad (3.1)$$

nella quale vengono indicati con m_{DCF} , m_W e m_{F68} rispettivamente le masse molari delle specie C+D (Farmaco), W e A+B (Plurónico), mentre con $\#beads_{DCF}$, $\#beads_W$ e $\#beads_{F68}$ il numero di beads relative alle medesime specie, dunque a Diclofenac, acqua e Plurónico.

Da questa relazione si ottiene:

$$\chi_{DCF} = \frac{W_{DCF}}{0.82 + 0.18 \cdot W_{DCF}} \quad (3.2)$$

Concentrazione molare (mol/L)	Frazione massica (g/g _{tot})	Frazione numerica
0.015	0.004	0.005
0.020	0.006	0.007
0.075	0.022	0.027
0.100	0.030	0.036

Tabella 3.1: Valori numerici di Concentrazione molare, Frazione massica e Frazione numerica, relative alle specie C+D, quindi al Diclofenac.

I valori numerici ottenuti dalla presente conversione vengono riassunti nella Tabella 3.1.

Per le simulazioni relative all’incapsulamento del Diclofenac sodico (effetto delle cariche trascurato) vengono utilizzati i medesimi valori numerici delle variabili di sistema già illustrate, considerando i diversi raggi di cutoff stimati e i parametri repulsivi. Bisogna sottolineare nuovamente la necessità di convertire i valori di concentrazione molari di Diclofenac sodico in frazione numerica, poiché queste rappresentano una massa e un volume diverso rispetto alle altre *beads* del sistema. Dunque, viene sfruttata la relazione 3.1, dalla quale, considerando i diversi rapporti tra le masse molari considerate nel sistema, si ottiene la seguente equazione di conversione:

$$\chi_{DCF} = \frac{W_{DCF}}{\frac{1}{4} \cdot 1.776 + 0.556 \cdot W_{DCF}} \quad (3.3)$$

I valori numerici ottenuti dall’equazione appena illustrata vengono riassunti nella Tabella 3.2:

Concentrazione molare (mol/L)	Frazione massica (g/g _{tot})	Frazione numerica
0.015	0.005	0.011
0.020	0.006	0.014
0.075	0.024	0.052
0.100	0.032	0.069

Tabella 3.2: Valori numerici di Concentrazione molare, Frazione massica e Frazione numerica, relative alle specie C+D+E+F, quindi al Diclofenac sodico.

In questa sezione sono riportati alcuni codici relativi al sistema acqua, Pluronic e Diclofenac sodico, nelle quali viene considerato l’effetto delle cariche. Il Codice 3.3 mostra la definizione delle variabili presenti all’interno del potenziale elettrostatico, i cui valori vengono impostati seguendo l’approccio presentato da M. González-Melchor et al. [36]:

Codice 3.3: Definizione variabili di simulazione

```

1   variable lambdae equal      0.67
2   variable elcutoff equal     0.933
3   variable espilonr equal     78.3

```

Nel Codice 3.4 sono riportati i comandi *atom_style*, *pair_style* e *kpace_style* utilizzati in questo sistema: nel primo comando definendo lo stile *hybrid* vengono combinati diversi *atom_style* come riportato di seguito. Impostando *hybrid/overlay* nel comando *pair_style* vengono considerati contemporaneamente gli stili DPD e coul/slater/long, il secondo dei quali computa interazioni elettrostatiche a lungo raggio in modelli mesoscopici. Nello stesso comando vengono definiti: temperatura del sistema T , raggio di cutoff r_c e raggio di distribuzione elettrostatica r_e , costante per tutte le *beads* cariche. Con lo stile coul/slater/long, le interazioni elettrostatiche vengono computate con la somma di Ewald, inserendo il comando *kpace_style ewald*, in cui viene settata una accuratezza di tale metodo pari a $1e^{-5}$.

Codice 3.4: Comandi atom style, pair style e kspace style

```

1   atom_style hybrid bond dpd charge
2   pair_style hybrid/overlay dpd ${T} ${cutoff} 92997 -
   - coul/slater/long ${lambdae} ${elcutoff}
3   kspace_style ewald 1e-5

```

Il Codice 3.5 mostra l'utilizzo del comando *pair_coeff*, articolato in due sezioni. Nella prima vengono specificate le interazioni DPD, definendo i parametri di repulsione, valori di γ e raggio di cutoff r_c per ogni coppia di *beads*. La seconda sezione è dedicata alla definizione delle interazioni elettrostatiche, in cui il simbolo $*$ viene impiegato per indicare l'insieme di tutte le possibili coppie di *beads* cariche (nel caso specifico le *beads* 6 e 7).

Nel presente lavoro di tesi è stata condotta una campagna di simulazioni preliminari, al fine di esplorare il contributo della modellazione delle interazioni elettrostatiche sui risultati. Tutti i risultati presentati nella tesi sono, però, stati ricavati trascurando questo contributo in prima approssimazione. Ulteriore lavoro è necessario per comprendere l'impatto di questa modellazione più accurata sui risultati e calibrare in maniera opportuna i nuovi parametri coinvolti.

Codice 3.5: Comando pair coeff

```
- INTERAZIONE DPD
1  pair_coeff 1 1 25.707 ${gamma} 1
2  pair_coeff 1 2 26.707 ${gamma} 1
3  pair_coeff 2 2 25.707 ${gamma} 1
4  pair_coeff 1 3 39.107 ${gamma} 1
5  pair_coeff 2 3 49.607 ${gamma} 1
6  pair_coeff 3 3 25.707 ${gamma} 1
7  ...
8  ...
9  ...
.
.
.
28 pair_coeff 7 7 25.707 ${gamma} 0.26

- INTERAZIONE ELETTROSTATICA
29 pair_coeff * * coul/slater/long
```

Capitolo 4

Analisi dei risultati

4.1 Sistema acqua e Pluronic F68

In questa sezione vengono riportati e discussi i risultati ottenuti dalle simulazioni impiegando i modelli e le parametrizzazioni precedentemente illustrati. I primi risultati vengono presentati sotto forma di *snapshots*. Questi hanno l'obiettivo di consentire un'analisi qualitativa delle microstrutture predette dalla simulazione DPD. Visualizzando quanto riportato dalla Figura 4.1, è possibile analizzare il comportamento dei frammenti di PPO all'interno del *dominio computazionale tridimensionale* cubico:

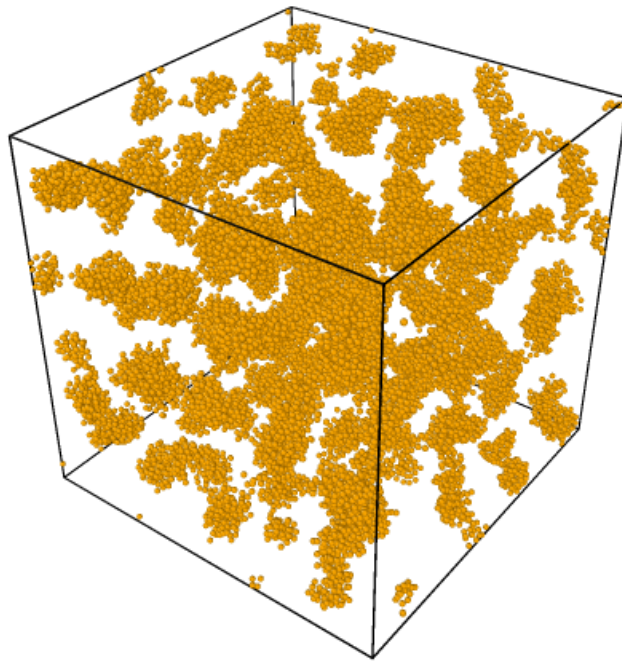
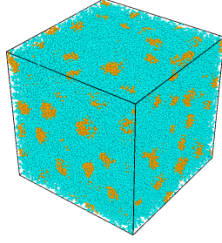


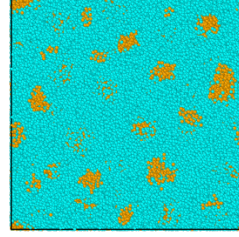
Figura 4.1: Snapshot raffigurante il comportamento di PPO all'interno del *dominio computazionale tridimensionale*, (immagine ottenuta attraverso il software OVITO [41])

Si può notare come il comportamento dei segmenti di PPO venga descritto efficacemente attraverso la parametrizzazione illustrata, poiché è possibile visualizzare la formazione di microstrutture. Inoltre, queste ultime si presentano uniformemente distribuite all'interno del *dominio computazionale tridimensionale*, aspetto essenziale e atteso. La ragione di questi risultati risiede nella scelta dei parametri repulsivi a_{BB} , a_{BW} e a_{AB} , relativi all'interazione reciproca tra *beads* di PPO e con le altre specie del sistema. Questi parametri rientrano nella definizione di funzione peso conservativa e dunque all'interno della definizione di $\mathbf{F}_{ij}^C$, influenzandone la sua natura.

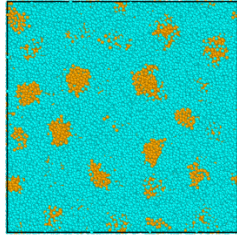
Dunque quanto affermato, sostenuto anche ad una scelta dei parametri K_b e r_0 per la descrizione dei legami chimici tra monomeri secondo il modello *bead-and-spring*, si traduce in quanto mostrato nella precedente figura. Per facilitare la visualizzazione si riportano anche gli snapshots relativi all'interazione delle *beads* di H₂O e PPO (Figure 4.2):



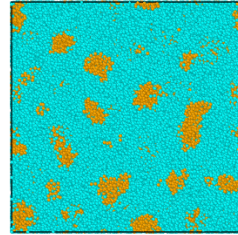
(a) Snapshot con vista prospettica



(b) Snapshot con vista dall'alto



(c) Snapshot con vista frontale



(d) Snapshot con vista laterale

Figura 4.2: Snapshots raffiguranti l'interazione tra PPO e H₂O all'interno del dominio computazionale tridimensionale, (immagine ottenuta attraverso il software OVITO [41]).

Da quanto mostrato dalla Figura 4.2 è evidente quanto la stima del modello riveli

il comportamento atteso a livello sperimentale.

Vengono anche riportati diversi snapshots (Figure 4.3 e 4.4), relativi alla interazione tra *beads* di PPO e PEO, dunque rappresentative del comportamento del Pluronic nella sua interezza, al fine di visualizzare in maniera più appropriata il fenomeno di formazione delle micelle:

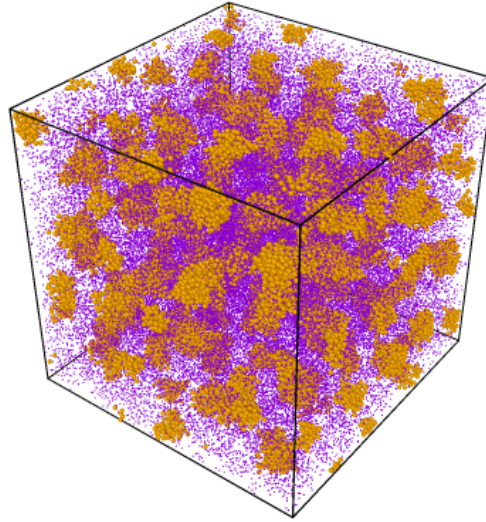
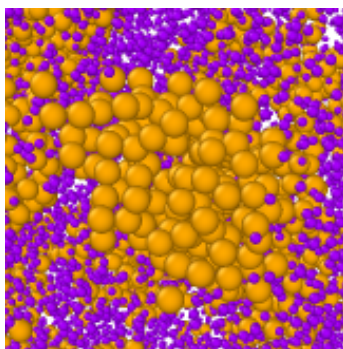
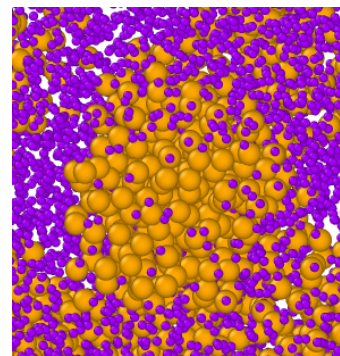


Figura 4.3: Snapshot raffigurante il comportamento del Pluronic F68 all'interno del *dominio computazionale tridimensionale*, (immagine ottenuta attraverso il software OVITO [41]).



(a)



(b)

Figura 4.4: Snapshots raffiguranti due diverse micelle di Pluronic F68, (immagine ottenuta attraverso il software OVITO [41]).

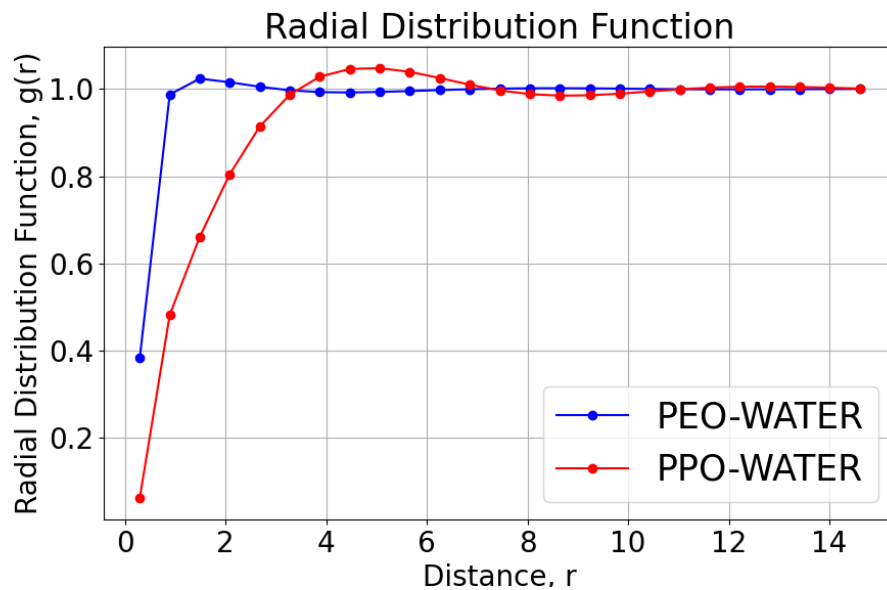


Figura 4.5: Profili RDF relativi all'interazione tra PPO e H₂O e tra PEO e H₂O

Nella Figura 4.5 sono riportati i profili RDF, relativi alle interazioni tra PPO e H₂O e tra PEO e H₂O. Le interazioni Plurónico-acqua sono piuttosto deboli: ciò è dovuto alla forte repulsione tra *beads* rappresentative delle due specie. Sia i profili RDF relativi all'interazione dell'acqua con *beads* idrofile che idrofobe mostrano valori ridotti a corto raggio, considerando che l'interazione con *beads* idrofobe presenta valori minori. Sebbene i valori di RDF mostrati siano ridotti, è possibile riconoscere una lieve interazione tra Plurónico e acqua.

4.2 Sistema acqua, Plurónico e Diclofenac

In questa sezione vengono discussi i risultati ottenuti dalle diverse simulazioni riguardanti il sistema DDS, riportando prima gli snapshots raffiguranti il comportamento dell'intero sistema alle concentrazioni di 0.015mol/L – 0.100mol/L di Diclofenac.

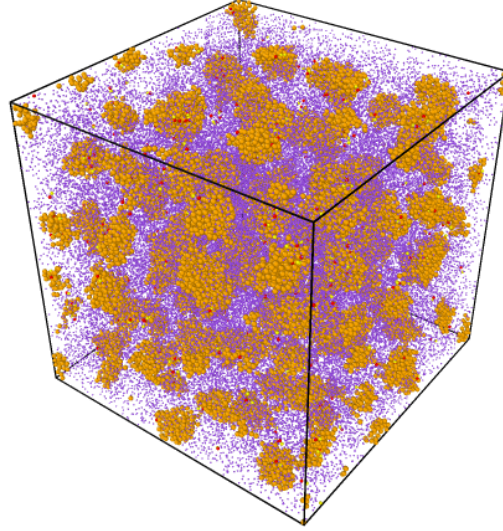


Figura 4.6: Snapshot raffigurante il comportamento dell'intero DDS all'interno del *dominio computazionale tridimensionale*, alla concentrazione di Diclofenac pari a 0.015 mol/L , (immagine ottenuta attraverso il software OVITO [41]).

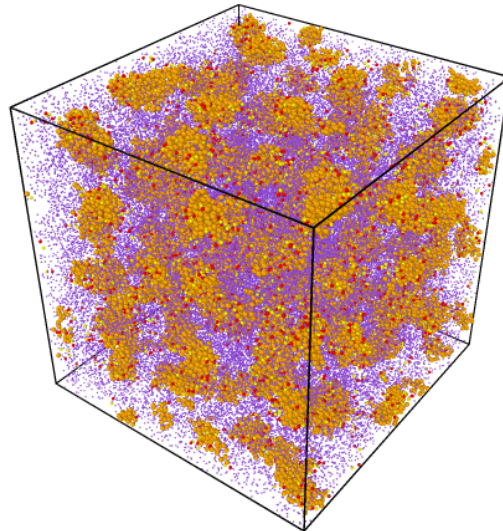


Figura 4.7: Snapshot raffigurante il comportamento dell'intero DDS all'interno del *dominio computazionale tridimensionale*, alla concentrazione di Diclofenac pari a 0.100 mol/L , (immagine ottenuta attraverso il software OVITO [41]).

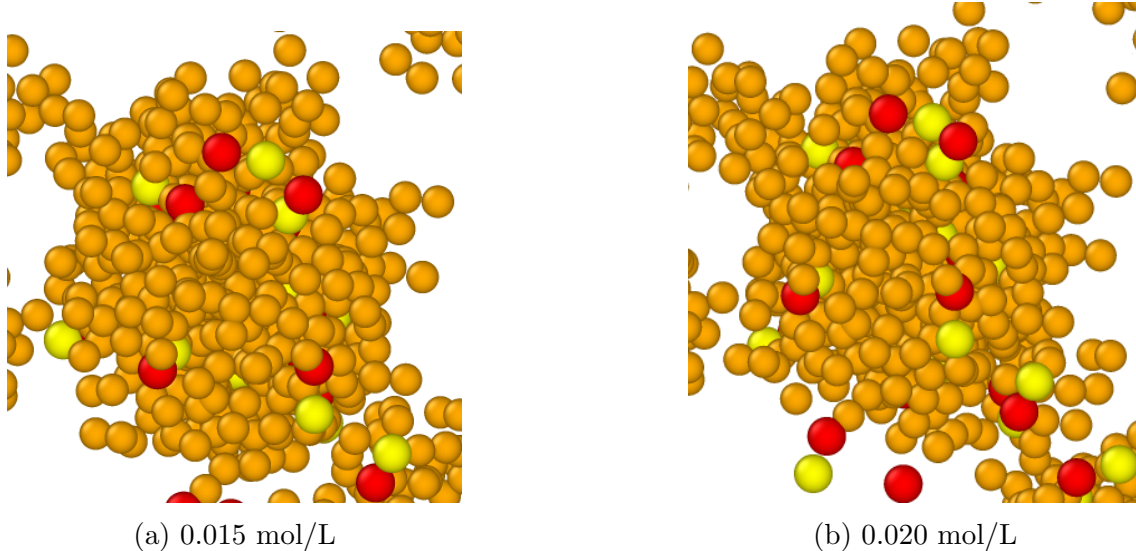


Figura 4.8: Snapshots raffiguranti due diverse micelle di Pluronic (raffigurato solo PPO) e farmaco rispettivamente alla concentrazione di 0.015 mol/L e 0.020 mol/L, (immagini ottenute attraverso il software OVITO [41]).

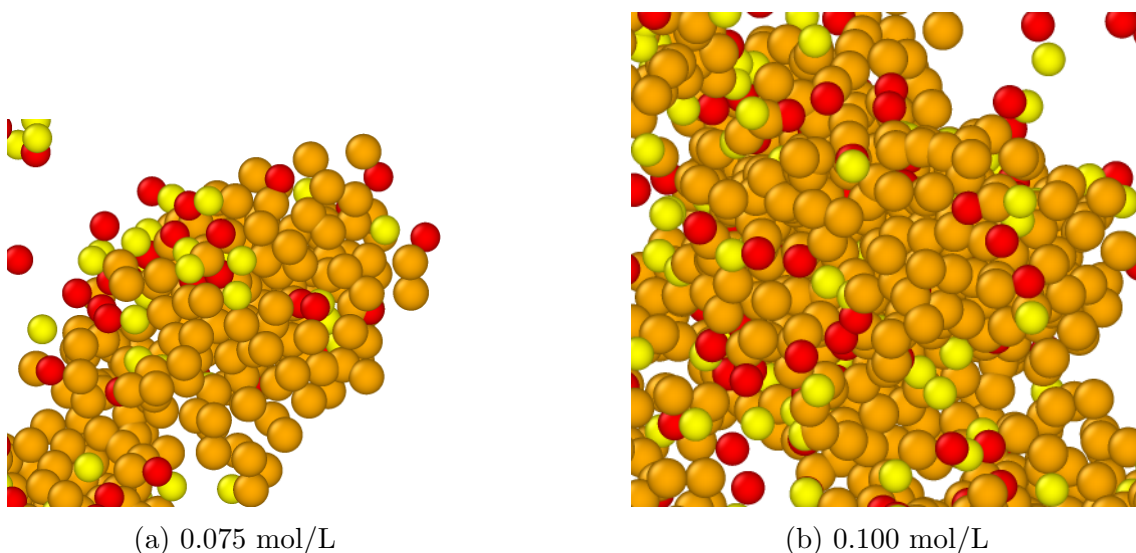


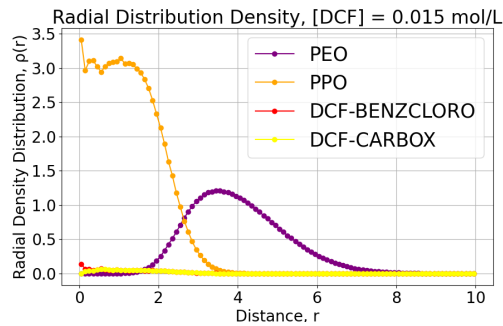
Figura 4.9: Snapshots raffiguranti due diverse micelle di Pluronic (raffigurato solo PPO) e farmaco rispettivamente alla concentrazione di 0.075 mol/L e 0.100 mol/L, (immagini ottenute attraverso il software OVITO [41]).

Dalla Figura 4.6 è possibile osservare le *beads* rappresentative di Diclofenac all'interno delle micelle, in particolare all'interno del bulk generato dai segmenti di PPO. Al crescere della concentrazione si può notare, dallo snapshot successivo (Figura 4.7), un numero di *beads* di Diclofenac decisamente superiore. La motivazione è legata essenzialmente ad un aumento della concentrazione di farmaco, il quale viene tradotto in un aumento della frazione numerica di quest'ultimo e dunque ad un numero superiore di *beads* nel sistema. Dalle figure 4.8 e 4.9 si può notare quanto, all'interno delle micelle, al variare della concentrazione di farmaco, il contenuto di quest'ultimo

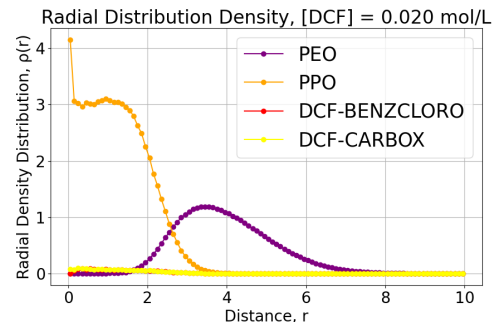
aumenti.

4.2.1 Analisi profili RDP

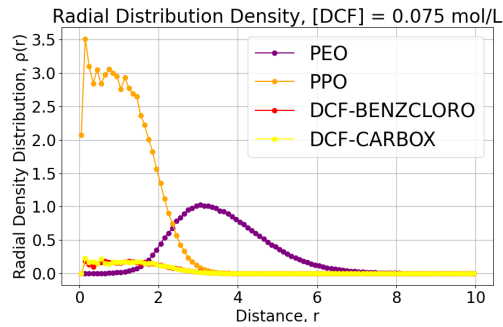
Oltre all'analisi visiva fornita dagli snapshots vengono riportati i profili di RDP, relativi a due micelle considerate, le quali presentano rispettivamente numero di aggregazione A_S pari a 25 e 32. Quest'ultima proprietà fa riferimento al numero di catene e di molecole di farmaco che compongono l'aggregato preso in considerazione. Di seguito, vengono riportati i profili RDP delle diverse specie, alle diverse concentrazioni di farmaco considerate (dunque da 0.015 mol/L fino a 0.100 mol/L) e, successivamente, i profili RDP relativi ad ogni singola specie, apprezzando l'effetto dovuto alla variazione di concentrazione di Diclofenac.



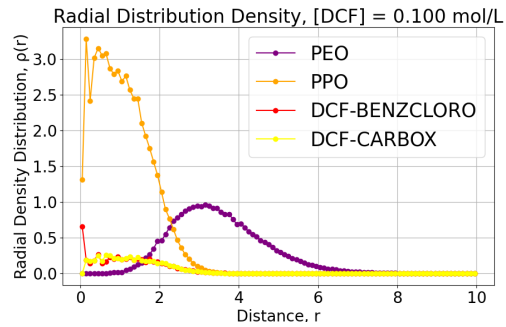
(a) Profilo RDP relativo ad una concentrazione di Diclofenac pari a 0.015 mol/L



(b) Profilo RDP relativo ad una concentrazione di Diclofenac pari a 0.020 mol/L

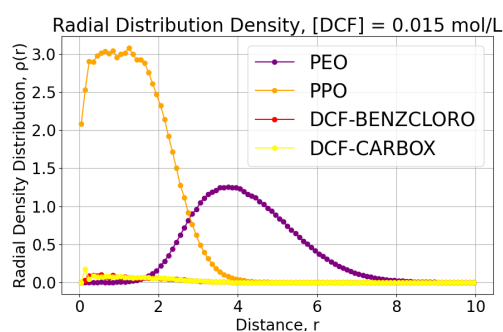


(c) Profilo RDP relativo ad una concentrazione di Diclofenac pari a 0.075 mol/L

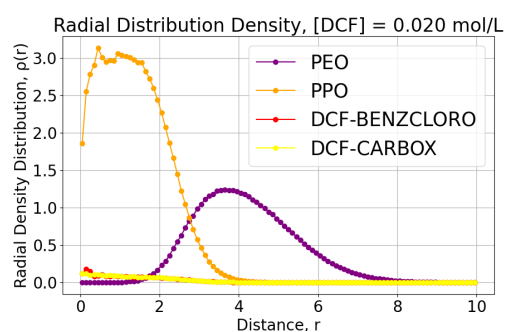


(d) Profilo RDP relativo ad una concentrazione di Diclofenac pari a 0.100 mol/L

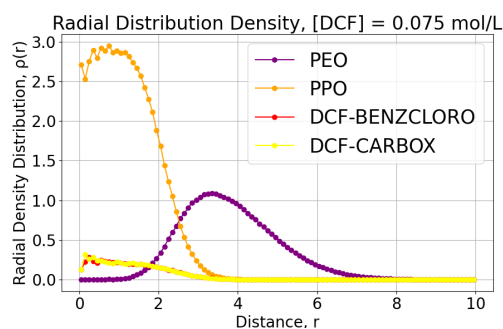
Figura 4.10: Profili RDP relativi alla micella con A_S pari a 25, alle diverse concentrazioni di Diclofenac esplorate.



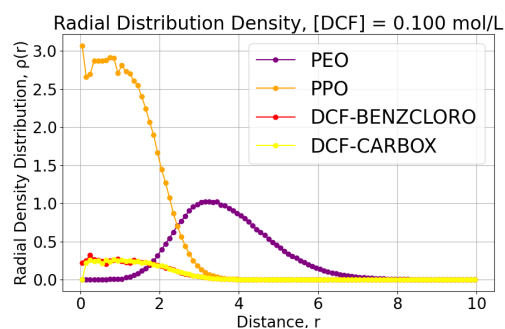
(a) Profilo RDP relativo ad una concentrazione di Diclofenac pari a 0.015 mol/L



(b) Profilo RDP relativo ad una concentrazione di Diclofenac pari a 0.020 mol/L



(c) Profilo RDP relativo ad una concentrazione di Diclofenac pari a 0.075 mol/L

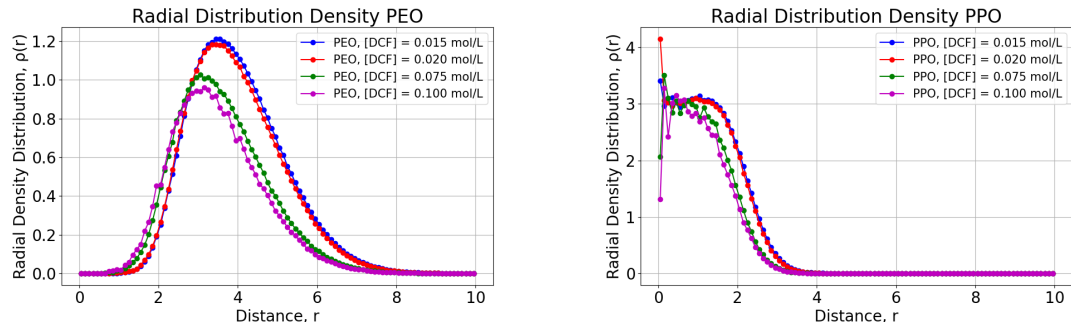


(d) Profilo RDP relativo ad una concentrazione di Diclofenac pari a 0.100 mol/L

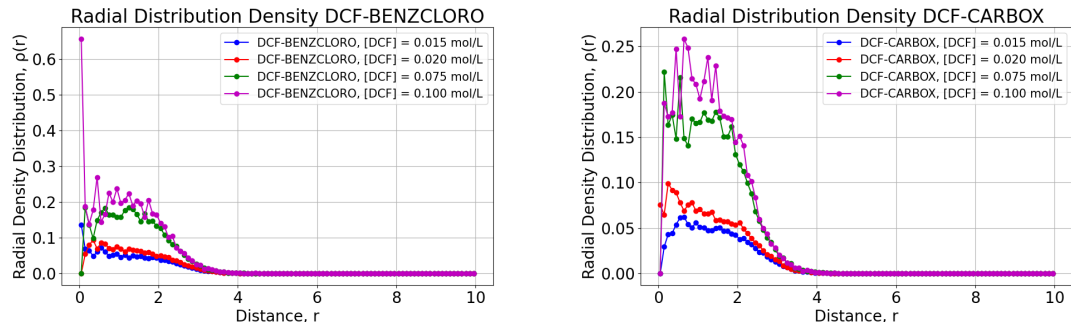
Figura 4.11: Profili RDP relativi alla micella con A_S pari a 32, alle diverse concentrazioni di Diclofenac esplorate.

Da questi primi grafici (Figure 4.10 e 4.11) è possibile visualizzare dei dettagli e formulare delle conclusioni essenziali sul profilo micellare. Si può notare come, a distanze minori dal riferimento, la specie che presenta densità numerica maggiore di particelle è il PPO. Questa caratteristica rispecchia perfettamente la formazione attesa del *core* idrofobo composto da questa specie. Per quanto riguarda il profilo RDP relativo ai segmenti di PEO è possibile osservare un massimo discostato rispetto al medesimo relativo al PPO e questo conferma ulteriormente la corretta disposizione micellare attesa, poiché è evidente la formazione dello *shell* idrofilo attorno al *core* di PPO. Un'ulteriore analisi può essere condotta sui profili RDP relativi alle due specie rappresentanti il Diclofenac: i massimi valori di RDP sono visibili alle medesime distanze a cui si manifesta il massimo relativo al PPO. Questa evidenza dimostra il fenomeno di incapsulamento atteso, poiché è evidente che un significativo numero di particelle farmaco si trovino all'interno del *core* micellare.

Di seguito vengono analizzati gli andamenti di RDP, relativi alle singole specie, al variare della concentrazione di farmaco per le medesime micelle:



(a) Profilo RDP relativo alla specie PEO al variare della concentrazione di Diclofenac (b) Profilo RDP relativo alla specie PPO al variare della concentrazione di Diclofenac

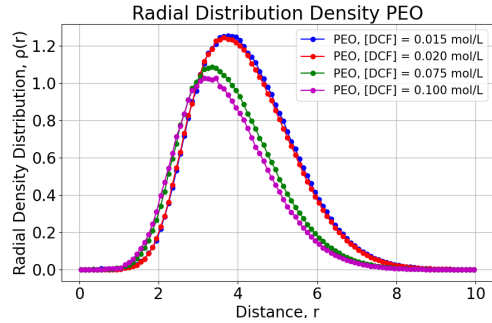


(c) Profilo RDP relativo alla specie DCF-BENZCLORO al variare della concentrazione di Diclofenac (d) Profilo RDP relativo alla specie DCF-CARBOX al variare della concentrazione di Diclofenac

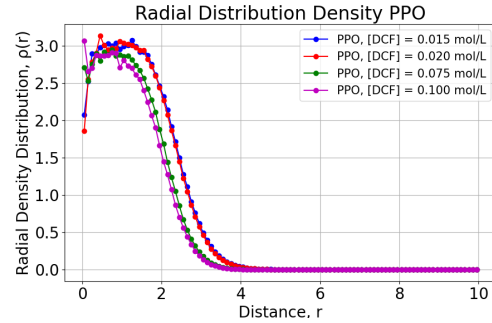
Figura 4.12: Profili RDP micella con A_S pari a 25 relativi alle specie A,B,C e D del sistema, al variare della concentrazione di farmaco.

Dalle Figure 4.12 è evidente sottolineare una tendenza, apprezzabile anche nelle figure sottostanti relative alla micella con A_S pari a 32 (Figure 4.13): i profili RDP relativi ai segmenti di PEO e PPO, all'aumentare della concentrazione di Diclofenac, tendono a presentare i loro punti di massimo a valori inferiori e inoltre discostati verso distanze inferiori; come atteso i profili RDP relativi alle due specie rappresentanti il Diclofenac presentano dei massimi a valori crescenti al crescere della concentrazione di quest'ultimo. Entrambi i trend sono dovuti, essenzialmente, ad una presenza numericamente maggiore di *beads* rappresentanti il farmaco, le quali, come previsto, riescono a disporsi all'interno del *core* di PPO.

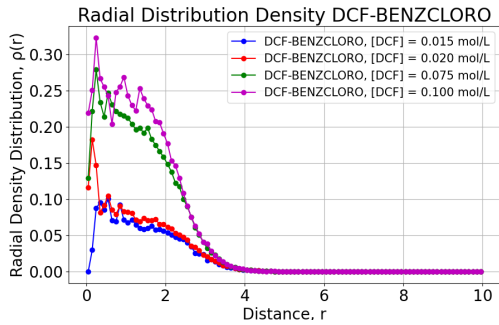
Questi comportamenti vengono influenzati dalle ipotesi sui parametri repulsivi relativi alle specie C e D , i quali sono stati assunti pari ai medesimi relativi all'interazione del PPO con tutte le specie del sistema.



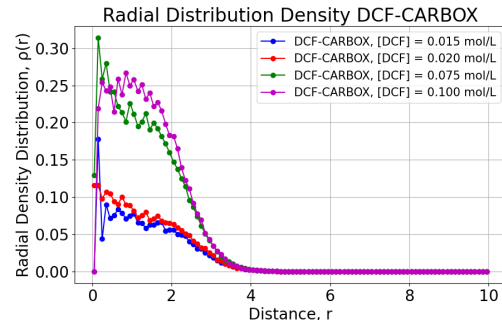
(a) Profilo RDP relativo alla specie PEO al variare della concentrazione di Diclofenac



(b) Profilo RDP relativo alla specie PPO al variare della concentrazione di Diclofenac



(c) Profilo RDP relativo alla specie DCF-BENZCLORO al variare della concentrazione di Diclofenac



(d) Profilo RDP relativo alla specie DCF-CARBOX al variare della concentrazione di Diclofenac

Figura 4.13: Profili RDP micella con A_S pari a 32 relativi alle specie A,B,C e D del sistema, al variare della concentrazione di farmaco.

4.2.2 Analisi efficienza di incapsulamento

In questa sezione sono riportati i valori di Drug Encapsulation Efficiency (DEE) ottenuti per il sistema costituito da acqua, Pluronic F68 e Diclofenac, al variare della concentrazione di quest'ultimo (Tabella 4.1). Nella Figura 4.14 sono mostrati i profili relativi all'efficienza di incapsulamento totale e del core, al fine di consentire un confronto diretto tra i due andamenti. I profili presentano un trend analogo, risultando pressoché sovrapposti, con valori di DEE compresi tra il 20 e il 23%. Tale comportamento indica che le interazioni idrofobiche tra le beads costituenti il core e le beads rappresentanti le molecole di Diclofenac sono adeguatamente descritte dal modello di simulazione adottato e svolgono un ruolo cruciale nel processo di incapsulamento. I valori relativamente bassi di efficienza di incapsulamento osservati possono essere attribuiti alla limitata estensione dei segmenti idrofobici di PPO presenti nel Pluronic F68 [31]. Questa interpretazione è supportata da evidenze presenti in letteratura, che riportano analisi comparative delle efficienze di incapsulamento ottenibili utilizzando differenti Pluronic. In particolare, le analisi condotte da Dalgakiran et al. [31] e Sezgin et al. [42], nelle quali sono state confrontate le efficienze del Pluronic F127, Pluronic F68 e Pluronic P85 con farmaci diversi dal Diclofenac, evidenziano come l'impiego di Pluronic caratterizzati da segmenti PPO idrofobici di maggiore lunghezza consenta di ottenere valori di efficienza significativamente più elevati.

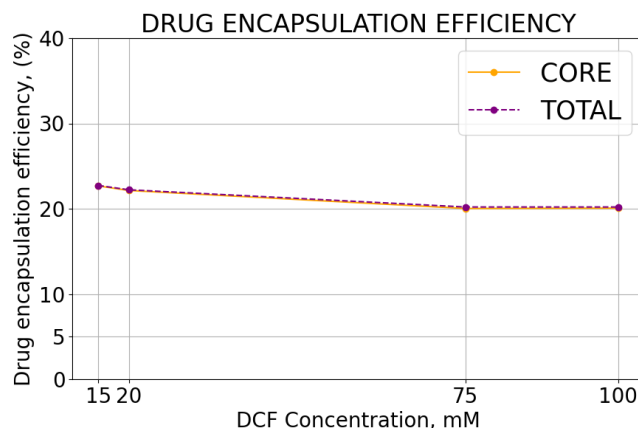


Figura 4.14: Profili relativi all'efficienza di incapsulamento di Diclofenac, al variare della concentrazione di farmaco

Concentrazione molare (mol/L)	0.015 mol/L	0.020 mol/L	0.075 mol/L	0.100 mol/L
DEE core	22.67 %	22.14 %	20.03 %	20.07 %
DEE totale	22.72 %	22.22 %	20.20 %	20.20 %

Tabella 4.1: Valori di DEE % *totale* e del *core* stimati per il sistema acqua, Pluronic e Diclofenac alle diverse concentrazioni di farmaco esplorate

4.3 Sistema acqua, Pluronic e Diclofenac sodico

Nella seguente sezione vengono riportati e discussi i risultati ottenuti dalle diverse simulazioni riguardanti il sistema DDS, riportando prima gli snapshots raffiguranti il comportamento dell'intero sistema alle concentrazioni di $0.015\text{mol/L} - 0.100\text{mol/L}$ di Diclofenac sodico.

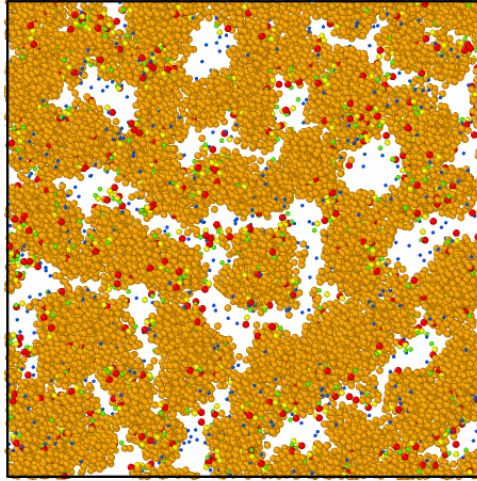


Figura 4.15: Snapshot raffigurante il comportamento dell'intero DDS all'interno del *dominio computazionale tridimensionale* (vista dall'alto), alla concentrazione di Diclofenac sodico pari a 0.015 mol/L , (immagine ottenuta attraverso il software OVITO [41]).

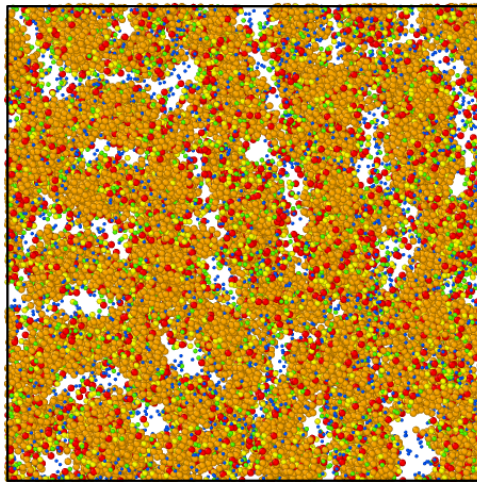
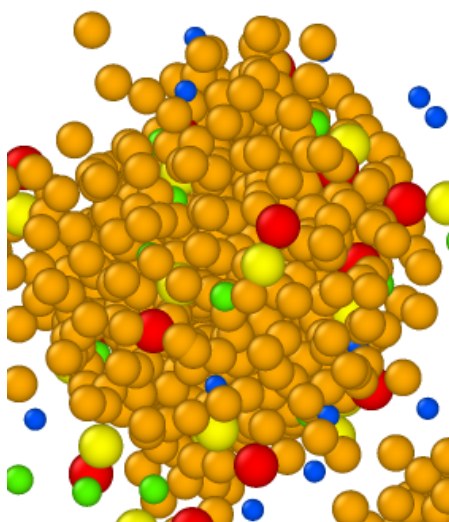
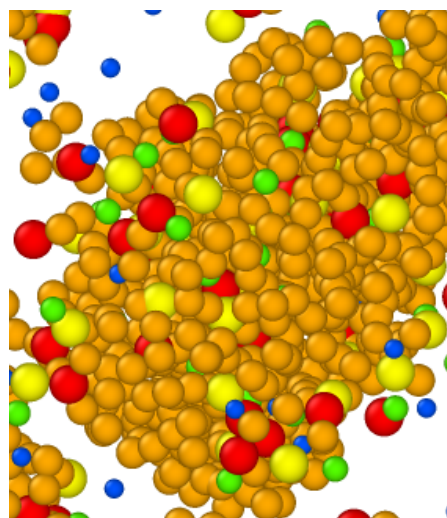


Figura 4.16: Snapshot raffigurante il comportamento dell'intero DDS all'interno del *dominio computazionale tridimensionale* (vista dall'alto), alla concentrazione di Diclofenac sodico pari a 0.100 mol/L , (immagine ottenuta attraverso il software OVITO [41]).

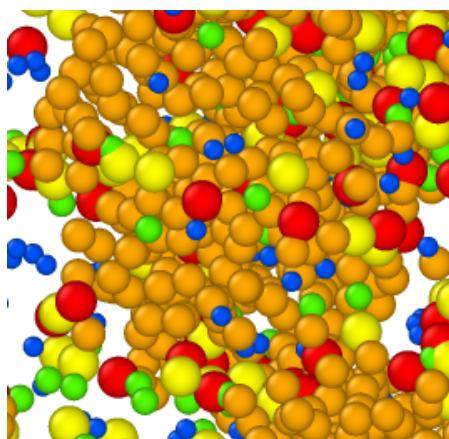


(a) 0.015 mol/L

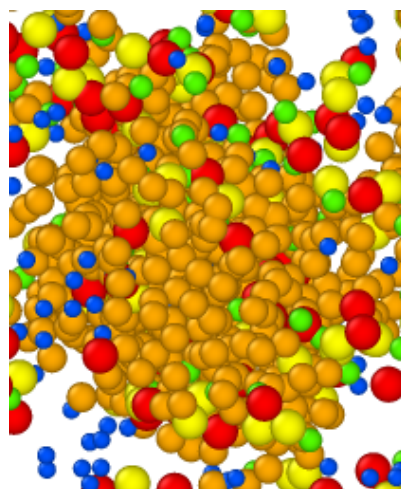


(b) 0.020 mol/L

Figura 4.17: Snapshots raffiguranti due diverse micelle di Pluronic (raffigurato solo PPO) e farmaco rispettivamente alla concentrazione di 0.015 mol/L e 0.020 mol/L, (immagini ottenute attraverso il software OVITO [41]).



(a) 0.075 mol/L



(b) 0.100 mol/L

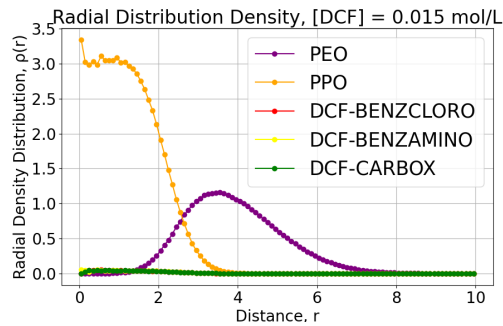
Figura 4.18: Snapshots raffiguranti due diverse micelle di Pluronic (raffigurato solo PPO) e farmaco rispettivamente alla concentrazione di 0.075 mol/L e 0.100 mol/L, (immagini ottenute attraverso il software OVITO [41]).

Dalle Figure 4.15 e 4.16 si può osservare l'effetto legato alla variazione della concentrazione di Diclofenac sodico: il numero di *beads* rappresentanti il farmaco aumenta all'interno del sistema considerato. Inoltre, già da questi snapshots, è possibile osservare un aspetto fondamentale: come atteso, un gran numero di *beads* rappresentanti il sodio si trovano all'esterno del *core* micellare composto da PPO, effetto dovuto al fenomeno di dissociazione e giustificato dall'ipotesi sui parametri repulsivi legati a

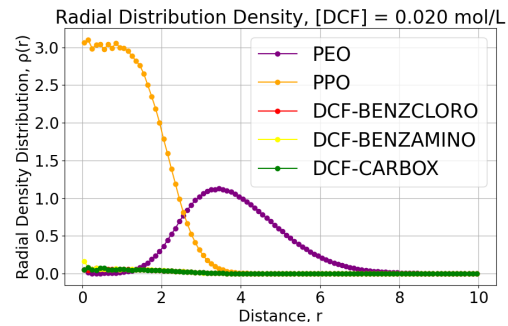
questa specie (vedi Sezione 2.3.3). Le Figure 4.17 e 4.18 rappresentano diverse micelle e mostrano come, all'aumentare della concentrazione di farmaco, il contenuto di quest'ultimo all'interno del *core* aumenti.

4.3.1 Analisi profili RDP

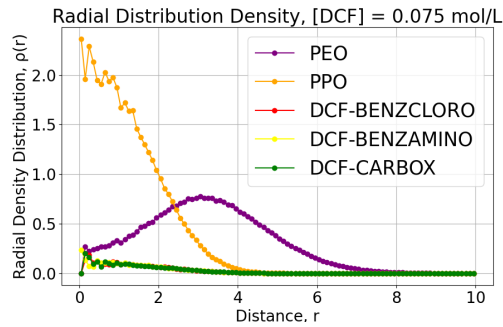
Per questo sistema sono riportati i diversi profili di RDP, relativi a due micelle considerate, le quali presentano rispettivamente numero di aggregazione A_S pari a 23 e 32. Si riportano prima i profili RDP delle diverse specie, alle diverse concentrazioni di Diclofenac sodico (dunque $0.015\text{mol/L} - 0.100\text{mol/L}$) e, successivamente, i profili RDP relativi ad ogni singola specie, apprezzando l'effetto dovuto alla variazione di concentrazione di farmaco.



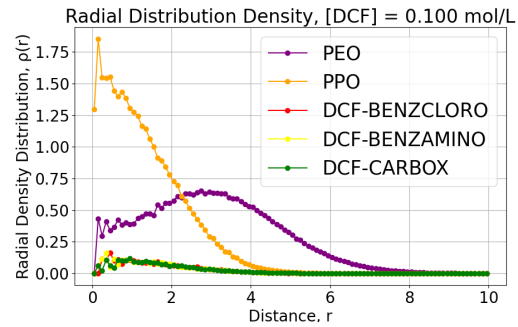
(a) Profilo RDP relativo ad una concentrazione di Diclofenac sodico pari a 0.015 mol/L



(b) Profilo RDP relativo ad una concentrazione di Diclofenac sodico pari a 0.020 mol/L

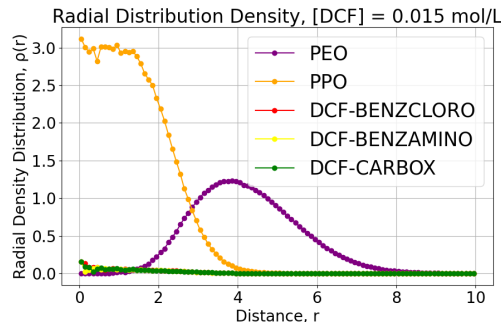


(c) Profilo RDP relativo ad una concentrazione di Diclofenac sodico pari a 0.075 mol/L

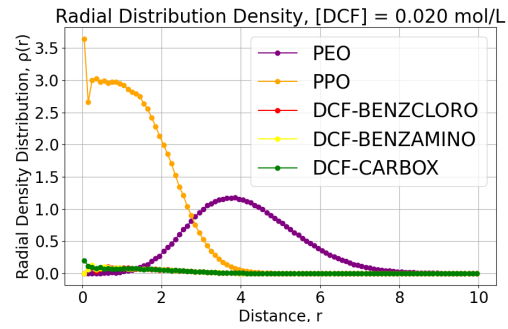


(d) Profilo RDP relativo ad una concentrazione di Diclofenac sodico pari a 0.100 mol/L

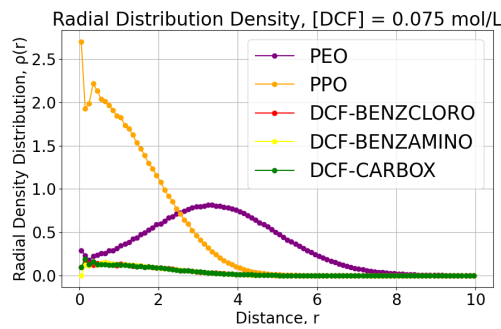
Figura 4.19: Profili RDP relativi alla micella con A_S pari a 23, alle diverse concentrazioni di Diclofenac sodico esplorate.



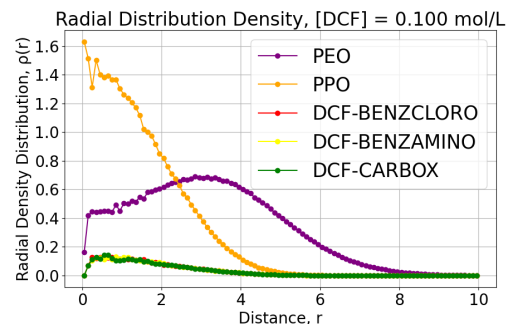
(a) Profilo RDP relativo ad una concentrazione di Diclofenac sodico pari a 0.015 mol/L



(b) Profilo RDP relativo ad una concentrazione di Diclofenac sodico pari a 0.020 mol/L



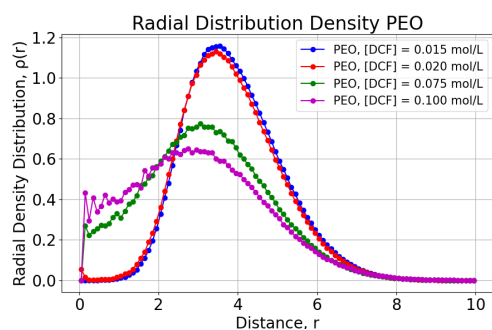
(c) Profilo RDP relativo ad una concentrazione di Diclofenac sodico pari a 0.075 mol/L



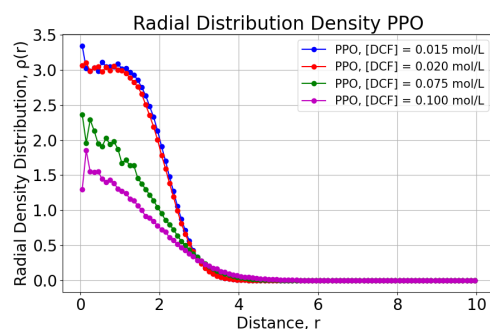
(d) Profilo RDP relativo ad una concentrazione di Diclofenac sodico pari a 0.100 mol/L

Figura 4.20: Profili RDP relativi alla micella con A_S pari a 32, alle diverse concentrazioni di Diclofenac sodico esplorate.

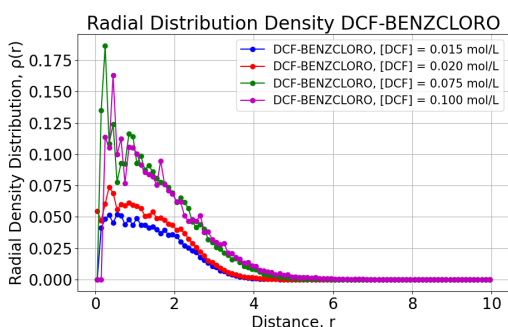
Dalle Figure 4.19 e 4.20 è possibile ricostruire il profilo micellare: a distanze inferiori rispetto al riferimento la specie che presenta densità numerica maggiore di particelle è il PPO, mentre per quanto riguarda il profilo RDP relativo ai segmenti di PEO, è possibile osservare un massimo a distanze maggiori, così come ottenuto per il precedente sistema. Bisogna inoltre analizzare i profili RDP relativi alle specie rappresentanti il Diclofenac sodico: in questi primi grafici vengono riportate solo le specie C , D ed E , poiché, per queste ultime, si attendono valori significativi di RDP in corrispondenza del massimo relativo al profilo RDP del PPO. Quanto appena affermato viene confermato dai risultati rispetto a tutte le concentrazioni di farmaco esplorate. Per quanto riguarda il profilo RDP relativo alla specie F questo viene analizzato in seguito e nel dettaglio, al fine di osservare e apprezzare il fenomeno di dissociazione atteso.



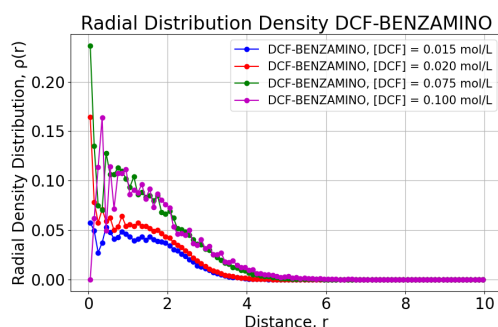
(a) Profilo RDP relativo alla specie PEO al variare della concentrazione di Diclofenac sodico



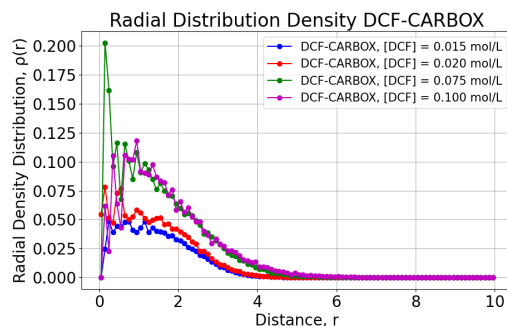
(b) Profilo RDP relativo alla specie PPO al variare della concentrazione di Diclofenac sodico



(c) Profilo RDP relativo alla specie DCF-BENZCLORO al variare della concentrazione di Diclofenac sodico

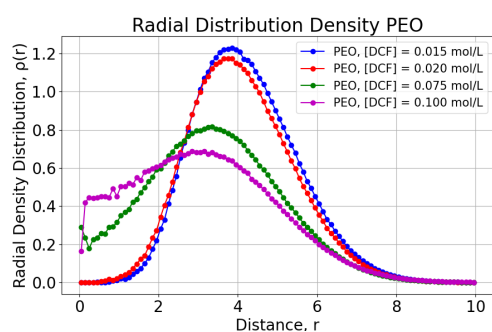


(d) Profilo RDP relativo alla specie DCF-BENZAMINO al variare della concentrazione di Diclofenac sodico

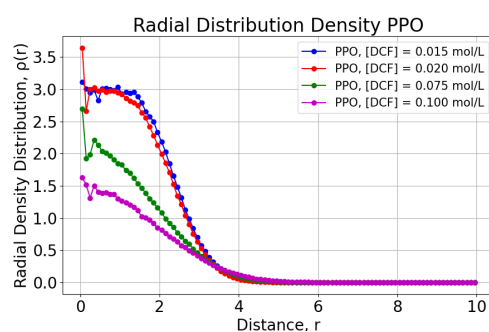


(e) Profilo RDP relativo alla specie DCF-CARBOX al variare della concentrazione di Diclofenac sodico

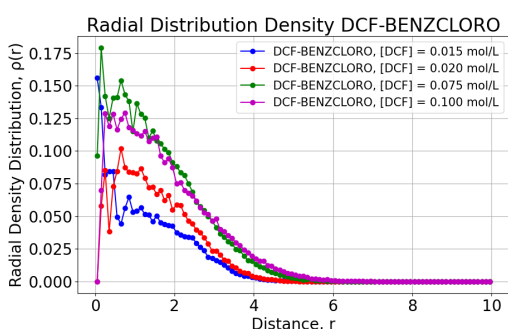
Figura 4.21: Profili RDP micella con A_S pari a 23 relativi alle specie A,B,C,D ed E del sistema, al variare della concentrazione di farmaco.



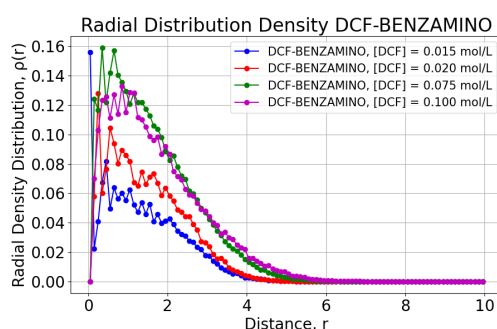
(a) Profilo RDP relativo alla specie PEO al variare della concentrazione di Diclofenac sodico



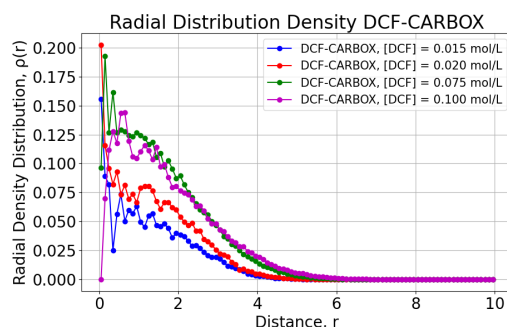
(b) Profilo RDP relativo alla specie PPO al variare della concentrazione di Diclofenac sodico



(c) Profilo RDP relativo alla specie DCF-BENZCLORO al variare della concentrazione di Diclofenac sodico



(d) Profilo RDP relativo alla specie DCF-BENZAMINO al variare della concentrazione di Diclofenac sodico



(e) Profilo RDP relativo alla specie DCF-CARBOX al variare della concentrazione di Diclofenac sodico

Figura 4.22: Profili RDP micella con A_S pari a 32 relativi alle specie A,B,C,D ed E del sistema, al variare della concentrazione di farmaco.

Come riportato nelle Figure 4.12 e 4.13 è possibile evidenziare dei trend comuni anche nelle Figure 4.21 e 4.22: i profili relativi ai segmenti di PEO e PPO, all'aumentare della concentrazione di Diclofenac sodico, tendono a presentare punti di massimo a valori inferiori e inoltre discostati verso distanze inferiori. Per quanto ri-

guarda i profili RDP relativi alle specie rappresentanti il Diclofenac sodico al variare della sua concentrazione, si è scelto di presentare l'andamento relativo alla specie F diviso in due grafici (vedi Figure 4.23 e 4.24), al fine di visualizzare meglio il comportamento atteso, mentre per le altre specie, i quattro andamenti vengono visualizzati in un unico grafico. I profili relativi alle specie C , D ed E presentano dei massimi con valori crescenti al crescere della concentrazione di quest'ultimo. Come nel sistema precedente il motivo è da attribuirsi ad una presenza numericamente maggiore di *beads* rappresentanti il farmaco all'interno del *core* di PPO. Questa spiegazione è valida anche per i trend relativi alle specie che compongono F68.

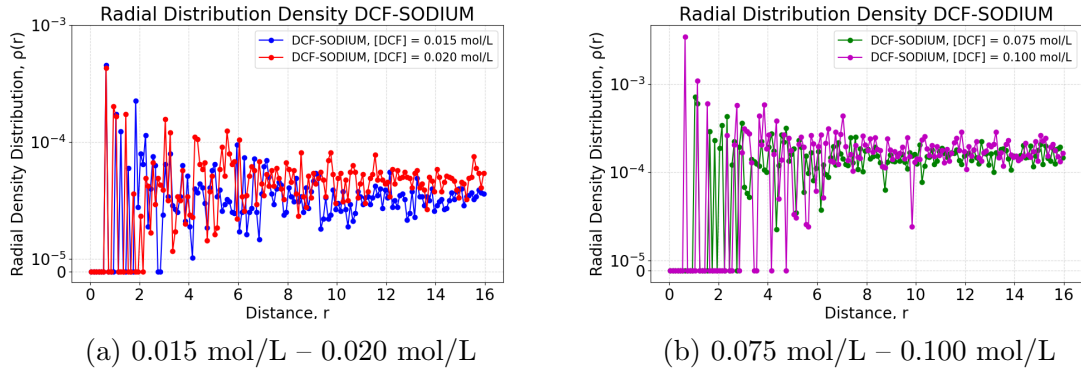


Figura 4.23: Profili RDP micella con A_S pari a 23 relativi alla specie F del sistema, al variare della concentrazione di farmaco.

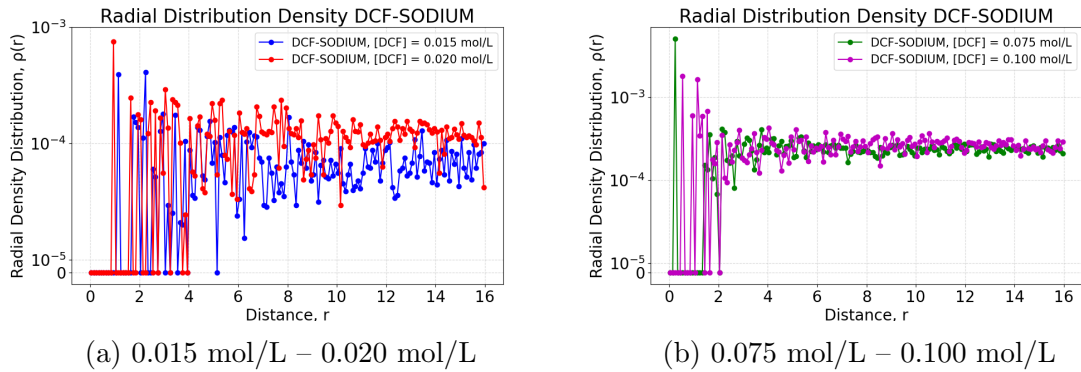


Figura 4.24: Profili RDP micella con A_S pari a 32 relativi alla specie F del sistema, al variare della concentrazione di farmaco.

Nelle Figure 4.23 e 4.24 sono presentati i profili di densità radiale (RDP) relativi alla specie F . Un aspetto rilevante, che conferma e rafforza le osservazioni preliminari relative agli snapshots, è la presenza di valori di RDP prossimi a zero nelle regioni interne rispetto al centro della micella. Tali distanze corrispondono al dominio costituito dal *core* idrofobico di PPO, dunque quanto affermato precedentemente, dimostra la quasi assenza di questa specie all'interno della micella. L'effetto della concentrazione sulla distribuzione radiale risulta evidente: all'aumentare della concentrazione di Diclofenac sodico si osserva un incremento dei valori di RDP della

specie F, che passano da valori inferiori a 10^{-4} , riconducibili ai valori di concentrazione minori, fino a valori superiori, relativi invece a valori maggiori di concentrazione di farmaco. Tale tendenza è coerente con il fenomeno di dissociazione e trova ulteriore conferma nei dati riportati nella Tabella 4.2, la quale mostra le elevate percentuali di *beads* rappresentanti il sodio all'esterno delle rispettive micelle analizzate, al variare della concentrazione di Diclofenac sodico.

Concentrazione molare (mol/L)	0.015 mol/L	0.020 mol/L	0.075 mol/L	0.100 mol/L
%F out micella $A_S = 23$	99.75 %	99.77 %	99.40 %	99.19 %
%F out micella $A_S = 32$	99.42 %	99.53 %	99.23 %	99.00 %

Tabella 4.2: Valori percentuali della specie F (sodio) presenti all'esterno delle micelle

4.3.2 Analisi efficienza di incapsulamento

In questa sezione sono riportati i valori di DEE ottenuti per il sistema costituito da acqua, Pluronic e Diclofenac sodico, al variare della concentrazione di farmaco sodico (Tabella 4.3). Come mostrato in Figura 4.25, si osserva un andamento tendenzialmente crescente dell'efficienza di incapsulamento sia *totale* che del *core*, in contrasto con quanto evidenziato nel sistema precedentemente analizzato, il cui trend risultava circa costante. Analogamente a quanto osservato nel sistema precedente, i profili DEE del *core* e *totale* presentano un andamento pressoché sovrapposto, tranne per l'ultimo valore di concentrazione esplorato. Come già affermato, tale comportamento suggerisce che le interazione idrofobiche tra *beads* di farmaco e di PPO vengono riprodotte in modo coerente e consistente dal modello di simulazione adottato e dalla scelta legata ai parametri repulsivi. Le motivazioni alla base delle quali risultano valori di DEE bassi sono già state discusse nella sezione 4.2.2 e restano valide anche per il presente sistema.

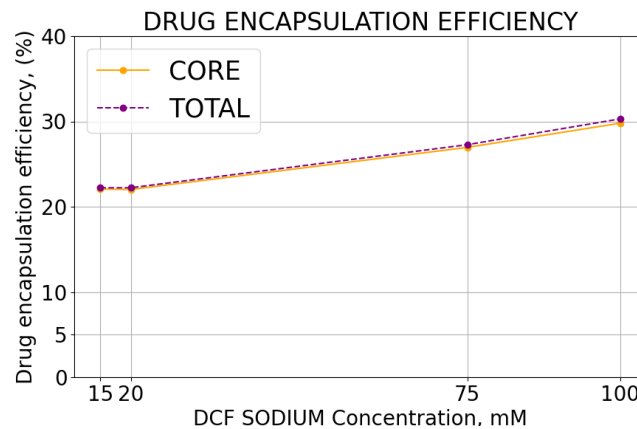


Figura 4.25: Profili relativi all'efficienza di incapsulamento di Diclofenac sodico, al variare della concentrazione di farmaco

Concentrazione molare (mol/L)	0.015 mol/L	0.020 mol/L	0.075 mol/L	0.100 mol/L
DEE core	22.07 %	22.02 %	26.96 %	29.79 %
DEE totale	22.22 %	22.22 %	27.27 %	30.30 %

Tabella 4.3: Valori di DEE % *totale* e del *core* stimati per il sistema acqua, Pluronic e Diclofenac sodico alle diverse concentrazioni di farmaco esplorate

Capitolo 5

Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stato condotto uno studio di tipo modellistico in un ambito rilevante delle scienze farmaceutiche: l'impiego di nanocarriers per l'incapsulamento di farmaci. In particolare, la Dissipative Particle Dynamics, una tecnica di simulazione mesoscala, è stata impiegata per simulare l'incapsulamento di Diclofenac sia nella forma neutra che sodica in micelle di Pluronic F68, al crescere della concentrazione. Il pluronico F68 si presenta come un copolimero anfifilico con struttura triblocco, consistente in un segmento centrale di (poli)-propilen-ossido (PPO), tendenzialmente idrofobo, circondato da due segmenti laterali di (poli)-etilen-ossido, tendenzialmente idrofili. In un solvente selettivo come l'acqua si organizza in microstrutture a seconda della concentrazione e della temperatura. In particolare, l'F68 si presenta sottoforma di unimeri quando la temperatura e la concentrazione della soluzione sono inferiori rispetto alla *temperatura critica micellare* (CMT) e alla *concentrazione critica micellare* (CMC). Quando CMC e CMT vengono superati, il Pluronic tende ad aggregarsi in strutture micellari disordinate. Un ulteriore aumento della temperatura fino a 30–40 °C comporta una transizione di fase liquido-solido: le micelle si organizzano in una struttura ordinata di tipo Cubica a Corpo Centrato, cambiando significativamente il comportamento macroscopico reologico del sistema. Questo comportamento peculiare, combinato alla biocompatibilità, rende l'F68 un sistema di drug delivery promettente, considerando che questo effetto si manifesta a temperature riconducibili a quelle del corpo umano. Per raggiungere tale proposito sono state condotte delle simulazioni mesoscala, sfruttando una modellazione *coarse-grained*. Inizialmente, sono state condotte delle simulazioni su un sistema semplice, composto da acqua e Pluronic F68, al fine di individuare la parametrizzazione tale da descrivere efficacemente il sistema e in grado modellare il fenomeno di micellizzazione tra quelle proposte in letteratura. Successivamente, il modello è stato esteso per simulare l'incapsulamento. Sono stati studiati due sistemi composti rispettivamente da acqua, Pluronic e Diclofenac e da acqua, Pluronic e Diclofenac sodico.

I primi risultati riportati in questo lavoro di tesi sono sotto forma di snapshots, i quali raffigurano il comportamento delle *beads* all'interno del *dominio computazionale tridimensionale*. Queste figure sono relative ai sistemi esplorati e vengono riportate al fine di poter consentire un'analisi qualitativa sul fenomeno di aggre-

gazione micellare e di incapsulamento. Vengono analizzati, inoltre, i profili RDF relativi alle interazioni tra Pluronic e acqua, dimostrando le basse interazioni tra queste due specie. Successivamente, attraverso una routine di post-processing basata su algoritmi di clustering, è stato possibile estrarre e focalizzarsi sui profili di distribuzione di densità radiale (RDP) di diverse micelle all'interno dei sistemi esplorati. Attraverso questi, è stato possibile ricostruire il profilo micellare, visualizzare e quantificare il fenomeno di incapsulamento e esplorare l'effetto legato alla variazione di concentrazione dei due farmaci. L'efficienza di incapsulamento è stata stimata numericamente: il numero di beads rappresentative del farmaco all'interno delle micelle è stato diviso per il numero totale di beads di Diclofenac del sistema. I trend ottenuti vengono giustificati come di seguito: al crescere della concentrazione la frazione numerica di beads di Diclofenac aumenta e dunque questo andamento decrescente sarebbe dovuto ad un effetto saturativo dell'incapsulamento micellare. La sovrapposizione di tali curve dimostra l'incapsulamento del farmaco all'interno del *core*.

Da questo lavoro è stato possibile formulare le seguenti conclusioni: la Dissipative Particle Dynamics si presenta come un valido strumento nel descrivere la morfologia e reologia di soluzioni polimeriche, in questo caso di Pluronic F68. Questo modello è in grado di sostenere e di fornire supporto agli esperimenti, attraverso la sua semplicità e versatilità. La possibilità di stimare in tempi rapidi grandezze chiave, come l'efficienza di incapsulamento, rende questo approccio di modellazione un efficace supporto alla progettazione di smart nanocarrier.

L'accuratezza dei modelli presentati può essere ulteriormente migliorata, per esempio descrivendo il contributo delle forze elettrostatiche. Quest'ultimo è stato implementato nella modellazione del sistema DDS con Diclofenac sodico. Le simulazioni preliminari forniscono risultati ragionevoli. Tuttavia, ulteriore lavoro è necessario, al fine di consolidare la comprensione dell'influenza di questo contributo sui risultati. Tra le prospettive future di questo lavoro rientra lo studio dell'effetto del farmaco non solo sulla morfologia del sistema, ma anche sulle sue proprietà reologiche.

Bibliografia

- [1] I. Salahshoori et al. “Simulation-based approaches for drug delivery systems: Navigating advancements, opportunities, and challenges”. *Journal of Molecular Liquids*, 395:123888, (2024).
- [2] L. Huang et al. “Novel nano-drug delivery system for natural products and their application”. *Pharmacological Research*, 201:107100, (2024).
- [3] A. Pitto-Barry e N. P. E. Barry. “Pluronic block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances”. *Polymer Chemistry*, 5(10):3281–3496, (2014).
- [4] N. A. Di Spirito et al. “Pluronic F68 Micelles as Carriers for an Anti-Inflammatory Drug: A Rheological and Scattering Investigation”. *Langmuir*, 40:1544–1554, (2024).
- [5] G. Kacar. “Molecular understanding of interactions, structure, and drug encapsulation efficiency of Pluronic micelles from dissipative particle dynamics simulations”. *Colloid and Polymer Science*, 297:1037–1051, (2019).
- [6] N. A. Di Spirito et al. “Phase transitions of aqueous solutions of Pluronic F68 in the presence of Diclofenac Sodium”. *International Journal of Pharmaceutics*, 644:123353, (2023).
- [7] P. Alexandridis e T. Alan Hatton. “Poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide)–poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling”. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 96:1–46, (1995).
- [8] N.A. Di Spirito et al. “Self-assembly of Pluronics: A critical review and relevant applications”. *Physics of Fluids*, 36(11):111302, (2024).
- [9] A. Naharro-Molinero et al. “Direct and Reverse Pluronic Micelles: Design and Characterization of Promising Drug Delivery Nanosystems”. *Pharmaceutics*, 14:2628, (2019).
- [10] R. Sharma e P. Bahadur. “Effect of different additives on the cloud point of a polyethylene oxide–polypropylene oxide–polyethylene oxide block copolymer in aqueous solution”. *Journal of Surfactants and Detergents*, 5(3):303–309, (2002).
- [11] B. S. Williams e A. Buvanendran. “Nonopioid Adjuvants in Multimodal Therapy for Acute Perioperative Pain”. *Advances in Anesthesia*, 27:111–142, (2009).

- [12] PubChem. *PubChem Compound Summary for CID 3033, Diclofenac*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. 2004. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diclofenac> (visitato il giorno 24/07/2025).
- [13] B.Nair e R. Taylor-Gjevre. “A Review of Topical Diclofenac Use in Musculoskeletal Disease”. *Pharmaceuticals*, 3:1892–1908, (2010).
- [14] P. Español e P.B. Warren. “Perspective: Dissipative particle dynamics.” *Journal of Chemical Physics*, 146:150901, (2017).
- [15] E. Moeendarbary T. Y. NG e M. Zangeneh. “Dissipative Particle Dynamics: introduction, methodology and complex fluid applications - A Review.” *Journal of chemical physics*, 1(4):737–763, (2009).
- [16] E. Vanden-Eijnden C. Hijón P. Español e R. Delgado-Buscalioni. “Mori–zwanzig formalism as a practical computational tool.” *Faraday Discuss*, 144:301–322, (2010).
- [17] R.D. Groot e P.B. Warren. “Dissipative particle dynamics: Bridging the gap between atomistic and mesoscopic simulation.” *Imperial College Press*, 107:4423–4435, (1997).
- [18] R.D. Groot e K.L. Rabone. “Mesoscopic simulation of cell membrane damage, morphology change and rupture by nonionic surfactants.” *Biophysical journal*, 81:725–736, (2001).
- [19] P. Español e P.B. Warren. “Statistical mechanics of dissipative particle dynamics.” *Reviews in computational chemistry*, 30:191-196, (1995).
- [20] B. Dünweg T.Soddemannand e K. Kremer. “Dissipative particle dynamics: A useful thermostat for equilibrium and nonequilibrium molecular dynamics simulations.” *Phys. Rev. E*, 68 (42):467021–467028, (2003).
- [21] V. Symeonidis, G. E. Karniadakis e B. Caswell. “A seamless approach to multiscale complex fluid simulation.” *Computing in Science and Engineering*, 7(3):39–46, (2005).
- [22] V. Symeonidis e G. E. Karniadakis. “A family of time-staggered schemes for integrating hybrid DPD models for polymers: Algorithms and applications.” *Journal of Computational Physics*, 218(1):82–101, (2006).
- [23] V. Symeonidis, G. E. Karniadakis e B. Caswell. “Schmidt number effects in dissipative particle dynamics simulation of polymers.” *Journal of Computational Physics*, 125(18), (2006).
- [24] P. V. Coveney e P. Español. “Dissipative particle dynamics for interacting multicomponent systems.” *Journal of Physics A: Mathematical and General*, 30(3): 779–784, (1997).
- [25] N. Lauriello et al. “Modeling temperature-dependent transport properties in dissipative particle dynamics: A top-down coarse-graining toward realistic dynamics at the mesoscale”. *Journal of Chemical Physics*, 161:034112, (2024).

- [26] H. C. Andersen, J. D. Weeks e D. Chandler. “Relationship between the hard-sphere fluid and fluids with realistic repulsive forces”. *Physical Review A*, 4:1597–1607, (1971).
- [27] R. M. Fuchsli et al. *The Journal of Chemical Physics*, 130:214102, (2009).
- [28] P. Vanya, J. Sharman e J. A. Elliott. “Invariance of experimental observables with respect to coarse-graining in standard and many-body dissipative particle dynamics”. *The Journal of Chemical Physics*, 150(6):064101, (2019).
- [29] J.R. Partington, R.F. Hudson e K.W. Bagnall. “Self-diffusion of aliphatic alcohols”. *Nature*, 169:583–584, (1952).
- [30] N. Lauriello. et al. “Simulation of high Schmidt number fluids with dissipative particle dynamics: Parameter identification and robust viscosity evaluation”. *Physics of Fluids*, 33:073106, (2021).
- [31] G. Kacar. E.A. Dalgakiran A.D. Ergin. “Properties of Pluronic F68 and F127 micelles interacting furosemide from coarse-grained molecular simulations as validated by experiments.” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 131352, (2023).
- [32] N. Lauriello et al. “Dissipative particle dynamics as a computational tool to detect the morphology-rheology interplay in Pluronic F68/water mixtures: A promising drug carrier”. *Journal of Colloid and Interface Science*, 700:138525, (2025).
- [33] P. Durchschlag e H. Zipper. “Calculation of the partial volume of organic compounds and polymers”. *Progress in Colloid & Polymer Science*, 94:20–39, (1994).
- [34] N. Lauriello et al. “Interpretable machine-learning enhanced parametrization methodology for Pluronic-water mixtures in DPD simulations”. *Soft Matter*, 21:5833–5851, (2025).
- [35] M. Havlávová e V. Dohnal. “Standard partial molar volumes of single aqueous ions composing ionic liquids. Measurement and evaluation of temperature dependent values. Parsing and LSER correlation with molecular descriptors based on DFT/COSMO approach”. *Journal of Molecular Liquids*, 410:125480, (2024).
- [36] M. González-Melchor et al. “Electrostatic interactions in dissipative particle dynamics using the Ewald sums”. *The Journal of Chemical Physics*, 125(22):224107, (2006).
- [37] R.D Groot. “Electrostatic interactions in dissipative particle dynamics—simulation of polyelectrolytes and anionic surfactants”. *The Journal of Chemical Physics*, 118(24):11265–11277, (2003).
- [38] Elaheh K. Goharshadi. “A review on the radial distribution function: Insights into molecular structure, intermolecular interactions, and thermodynamic properties”. *Journal of Molecular Liquids*, 433:127900, (2025).
- [39] M. Morbidelli M. Lattuada H. Wu. “Radial density distribution of fractal clusters”. *Chemical Engineering Science*, 59(20):4401–4413, (2004).

- [40] D. Maysinger C. Allen e A. Eisenberg. “Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 16(1–4):3–27, (1999).
- [41] A. Stukowski. “Visualization and analysis of atomistic simulation data with OVITO—the Open Visualization Tool”. *Modelling and Simulation in Materials Science and Engineering*, 18(1):015012, (2010).
- [42] T. Baykara Z. Sezgin N. Yüksel. “Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs”. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 64:261–268, (2006).

Ringraziamenti

Giunto alla fine di questo percorso vorrei dedicare alcune righe per esprimere la mia gratitudine a tutte le persone che ne hanno fatto parte. Ci tengo a ringraziare il Professor Daniele Marchisio, il Professor Gianluca Boccardo e Nunzia per l'opportunità concessa, per il sostegno durante questo percorso e per i preziosi consigli.

Ringrazio tutti i miei compagni di laboratorio, in particolare Sergio, Jacopo, Vittorio, Martina e Marco. In questi mesi non abbiamo condiviso solo una piccola stanza, ma anche momenti e decisioni importanti per il nostro futuro. Sono molto contento di aver trovato in voi sostegno nei momenti di difficoltà, ma soprattutto di aver trovato degli amici con cui spero di poter vivere altre avventure insieme.

Ringrazio i miei compagni di corso per tutti questi anni passati insieme sia dentro che fuori dall'Università, per le risate, le partite a Poker a casa di Pietro e le serate a casa di Mattia. Grazie per tutto, Vittorio, Mattia, Ciccio, Paola, Daniele, Seba, Alessio, Giada e Melis. Sta arrivando il momento per tutti di noi di lasciarci l'università alle spalle per vivere nel mondo degli adulti; spero di poter ancora ritrovarci insieme nei prossimi anni e di non perderci di vista. Vi auguro ogni bene per tutto.

Un ringraziamento speciale va a Chiara, Simo, Deni e Gibbo. Un tempo passavamo tutte le nostre giornate insieme, ma da quando il liceo è finito non ci è più possibile. Ciononostante, a distanza di anni riusciamo ancora a vederci e a condividere i momenti più importanti delle nostre vite insieme. Chia, Deni siete e siete state delle grandi amiche negli ultimi anni, anni di profondi cambiamenti, delusioni e amori. Serate passate in quarantena a far guidare Chiara al parcheggio delle Gru appena patentati, a confidarci e a sistemare letti aperti in due. Un grazie per tutto quello che abbiamo vissuto e vivremo insieme non basta. Simo, un grazie speciale va anche a te. Sei stata forse la primissima persona a cui ho rivolto la parola il primissimo giorno di liceo, poi da quel momento abbiamo vissuto mille ricordi insieme sia a scuola che fuori, aste del fantacalcio infinite, mille scherzi e confidenze; Gibbo grazie per essere stato il miglior compagno di banco degli ultimi anni, per tutte le avventure passate insieme tra le biblioteche in cui abbiamo lavorato. Siamo riusciti a trasformare ore noiosissime in momenti di grandissimo divertimento, fatto di scherzi, battute e risate.

Un grandissimo grazie va a Simo, Noe e Giulia. Un tempo riuscivamo a passare quasi tutti i fine settimana insieme; non era importante dove fossimo o cosa facessimo, ma solo stare insieme, ridere, scherzare e giocare. Abbiamo passato diverse

vacanze insieme, ricordi dolcissimi che mi porterò nel cuore per sempre. In questi anni, a causa di tutti gli avvenimenti e cambiamenti che noi ben conosciamo, tutto questo è diventato più difficile. Le nostre vite sono cambiate e siamo cresciuti. Noe hai fatto grandissimi passi insieme a Giovanni, una persona fantastica e che ti merita davvero, sono davvero felice per voi. Spero (finalmente) di riuscire con Olga a passare un weekend nella vostra nuova casa. Simo per te sono stati anni di grandi cambiamenti, trasferte, ma adesso ti aspetta una grande sfida da superare in Grecia. Ti ringrazio per tutto e spero di rivederti presto. Giuli, spero nei prossimi anni di poter passare più weekend a Como insieme. Nonostante questo voglio ringraziarti per la tua amicizia, per i momenti passati insieme e per tutte le confidenze. Voi siete stati parte di questo grande percorso che è la mia vita, tutti in modo diverso e ne farete ancora parte. Potrete sempre contare su di me. Per voi un grazie non sarà mai sufficiente.

Un ringraziamento speciale va a Giuseppe. Grazie per i preziosi consigli, le serate e le risate insieme in questo ultimo anno. Ti ringrazio per il sostegno e la sincerità di cui molte volte avevo bisogno.

Un grandissimo grazie a mio cugino Giorgio. Anni fa sognavamo di arrivare dove siamo adesso ed ora eccoci qui: non tutto è andato esattamente come volevamo da piccoli, ma siamo riusciti a realizzare i nostri sogni. Ti ringrazio per la vicinanza, per i consigli, per le notti passate svegli insieme a parlare, confrontarci e a confidarci. Grazie per essere una costante nella mia vita, per sostenermi nei momenti più bui e credere sempre in me e nelle mie capacità.

Ringrazio profondamente Enza e Rodolfo per avermi accolto nella loro famiglia. Grazie per la fiducia e la vicinanza che mi trasmettete dal primo giorno in cui mi avete conosciuto.

I prossimi ringraziamenti sono i più difficili da esprimere attraverso semplici parole. Sono pensieri che mi hanno accompagnato per tutti questi anni nei momenti di maggiore difficoltà, soprattutto quando tutto mi sembrava così difficile da superare. Ringrazio la mia famiglia, i miei nonni, i miei zii, Ludovica: a voi devo tutto. Grazie per avermi tirato su in tutti i momenti di sconforto, per aver creduto in me anche nei momenti più bui. Mamma e Papà, grazie per i vostri sacrifici, per tutti i vostri no che in questi anni mi hanno permesso di crescere e diventare un uomo migliore. Grazie per avermi permesso di raggiungere questo grande traguardo e di averlo reso possibile. Senza il vostro sostegno non sarebbe stato possibile.

Un immenso grazie va alla mia fidanzata, Olga. Grazie per avermi sempre sostenuto, grazie per essermi stata accanto nei momenti peggiori in questi anni e per esserti a volte messa da parte per me. Ti ringrazio profondamente per il percorso che abbiamo e che stiamo condividendo insieme; un percorso di crescita, in anni davvero importanti per le nostre vite. Sono stati anni di immensi cambiamenti per entrambi e accettarli per me non è sempre stato facile; ti ringrazio soprattutto per avermi appoggiato in questi momenti, nonostante tutto. Negli ultimi anni ci siamo

detti no tante volte a causa di tutti gli impegni che abbiamo dovuto affrontare e per i sacrifici che abbiamo dovuto fare. Voglio prometterti che questo cambierà e che potremo goderci un pò di più il frutto dei nostri sforzi. Ti amo, grazie di far parte della mia vita.