

Politecnico di Torino
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Onde d'urto e cavitazione in ambito biomedico-farmaceutico



Relatore: Prof. Umberto Lucia
Correlatore: Prof.ssa Roberta Cavalli

Studente:
Sonia Verduci, 242382

Alla mia famiglia con amore e gratitudine

Indice

Estratto	III
Ringraziamenti	IV
1 La cavitazione in ambito biomedico	1
1.1 Processo e soglie di cavitazione	2
1.1.1 Nucleazione, crescita, oscillazione, collasso e dissoluzione . . .	2
1.1.2 Soglia di nucleazione e soglia di collasso	3
1.2 Nuclei di cavitazione	5
1.3 Cavitazione tensile e cavitazione energetica	11
1.4 Dinamica della bolla di cavitazione	12
1.4.1 Dinamica di una bolla di gas libera in un campo libero	12
1.4.2 Dinamica di una bolla incapsulata in un campo libero	13
1.4.3 Dinamica di una bolla vicino all'interfaccia	15
1.4.4 Dinamica di una bolla all'interno di un vaso costretto	18
1.4.5 Dinamica di una bolla in un tessuto molle	20
2 Le onde d'urto in ambito biomedico	22
2.1 Pressione ed onde d'urto	23
2.2 Potenza e intensità	29
2.3 Zona focale e profondità di penetrazione	30
2.4 Energia e impulso	34
2.5 Registrazione della cavitazione acustica e campi di onde d'urto	38
3 Le nano-bolle	49
3.1 Dalle micro-bolle alle nano-bolle	49
3.2 Aspetti teorici per la formulazione delle nano-bolle	50
3.2.1 Formulazione basata sui perfluoro-carburi	52
3.2.2 Stabilità della nano-bolla	53
3.3 Composizione delle nanobolle	55
3.4 Metodi di preparazione delle Nano-bolle	56
3.5 Gli approcci più attuali per il caricamento di farmaci	58
3.5.1 Formulazione di nano-bolle mirate	60

3.6	Nano-bolle per la somministrazione di farmaci antitumorali	61
3.7	Nano-bolle per la somministrazione di acido nucleico	63
3.8	Nano-bolle per la somministrazione di ossigeno	65
3.9	Nano-bolle per altre applicazioni	66
3.10	Prospettive future e conclusioni	68
4	Modello termodinamico delle nano-bolle	70
4.1	Modello termodinamico della cavitazione	72
4.2	Cavitazione: Espressione matematica della pressione esercitata dall'onda	74
4.3	Modello di nano-bolle create a partire da un'emulsione con fase volatile (PCE)	76
5	Risultati sperimentali	78
5.1	Materiali e metodi	78
5.1.1	Preparazione delle nanobolle	78
5.1.2	Caratterizzazione delle nanobolle	78
5.1.3	Trattamento con onde d'urto	79
5.1.4	Stabilità delle nanobolle nel tempo	80
5.2	Risultati sperimentali	80
5.3	Analisi ed interpretazione dei dati sperimentali	83
5.3.1	Modello semplificato	84
5.3.2	Modello analitico	89
5.3.3	Modello numerico	92
5.3.4	Calcolo incertezza di misura	96
	Bibliografia	97

Estratto

A lungo il nome delle onde d'urto è stato sinonimo della cura elettiva delle calcolosi renali, mediante litotrissia (ESWL, Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy). Alla fine degli anni '80, partendo da rilievi occasionali, l'approfondimento degli studi sulla metodica ha portato alla nascita di un nuovo campo d'applicazione. E' quello dell'E-SWT, in altre parole dell'Extracorporeal Shock Waves Therapy, che ha dimostrato la propria efficacia soprattutto in ambito osteoarticolare e muscolo-tendineo.

Un'onda d'urto è definita come un'onda acustica sul cui fronte di avanzamento la pressione si eleva, nel volgere di frazioni di nanosecondi (10⁻⁹ secondi), dal livello della pressione atmosferica (1,01 -1,02 Bar) sino a valori compresi fra 10 e 100 MegaPascal (1 Mpa = 10 Bar), cioè, sino a 100-1000 volte la pressione atmosferica.

In questo progetto di tesi, in particolare, dopo aver descritto approfonditamente il processo di cavitazione acustica, le onde d'urto sono state associate a bolle di dimensioni nanometriche, le quali, visto il loro crescente impiego in campo biomedico possono essere pensate come innovativi sistemi di somministrazione di farmaci decisamente più efficienti di quelli tradizionali. Progettare e creare nanobolle stabili, tuttavia, è un procedimento critico ed impegnativo, per il quale occorre prendere in considerazione diversi parametri, primi fra tutti la tensione interfacciale e la pressione di Laplace, oltre alle strutture delle fase dispersa e della fase continua.

Si è quindi realizzato un modello termodinamico attraverso il quale riuscire a prevedere, con sufficiente accuratezza, il comportamento della bolla trattata con un generatore di ESW, in termini di raggio finale e potenziale Z raggiunti. I dati sperimentali sembrano incoraggianti e nonostante le importanti assunzioni il modello realizzato sembra funzionare. Questa tesi, pertanto, ha assunto un duplice valore: da un lato si è validato il modello creato, cercando corrispondenza tra i valori teorici previsti dal modello ed i valori reali rilevati con gli esperimenti, e, dall'altro lato, si è provato a spiegare, attraverso il modello, la diversità dei risultati ottenuti a partire da formulazioni di nanobolle diverse, nell'ottica di individuare quella migliore a seconda dell'applicazione desiderata.

Ringraziamenti

Desidero vivamente ringraziare il mio relatore, il professore Lucia, per i confronti costruttivi, gli approfondimenti, gli stimoli, gli spunti forniti, oltre che per la sua disponibilità mai venuta meno per l'intero arco di realizzazione di questo progetto di tesi.

Desidero ringraziare allo stesso modo anche la prof.ssa Cavalli, correlatore di questa tesi, e tutto il suo team per la grande generosità e cortesia dimostratemi, e per tutto l'aiuto fornito durante gli esperimenti e la stesura. Un enorme grazie va anche al dottore Roberto Frairia ed alla dottoressa Maria Graziella Catalano, per il tempo dedicatomi e per la disponibilità dimostrata nel redimere i miei dubbi durante le sperimentazioni. Grazie per avermi seguito costantemente durante il progetto, porterò sempre con me ogni vostro insegnamento.

Un doveroso ringraziamento va a Lina, ad Antonella e a chi, come loro, mi ha sempre fatta sentire a casa. Grazie per avermi accolta e per non avermi mai fatta sentire un'ospite ma parte integrante della vostra famiglia. Grazie per la vostra gentilezza e la vostra immensa disponibilità. Vi porterò sempre nel mio cuore.

Un ringraziamento caloroso va al mio fidanzato Raffaele che con amore, pazienza e fiducia mi ha sempre sostenuta ed ha saputo starmi vicino, con la speranza che continui a farlo sempre. Grazie perché mi regali ogni giorno il tuo tempo.

Un ringraziamento va anche alle mie sorelle ed i miei amici più cari che hanno saputo sostenermi anche da lontano. Grazie per avermi trasmesso le dosi più grandi di coraggio quando ne avevo bisogno. Grazie per le parole di conforto più dolci nei momenti di tristezza e nostalgia e Grazie per aver gioito con me ad ogni nuovo traguardo.

Ed infine il grazie più grande va ai miei genitori: consegno a loro simbolicamente il mio diploma di laurea, in segno di riconoscimento per gli sforzi sostenuti, con il desiderio che questo possa, almeno in parte, ripagarli. Grazie per avermi insegnato a credere nel lieto fine.

Sonia

Capitolo 1

La cavitazione in ambito biomedico

La cavitazione è definita come la formazione di una o più cavità in un liquido. La parola *formazione* può riferirsi, in senso generale, sia alla creazione di una nuova cavità che all'espansione di una tasca di gas preesistente. La cavitazione, solitamente, è l'effetto di una sufficiente riduzione della pressione al di sotto della pressione di vapore del liquido o di una elevazione della temperatura al di sopra del punto di ebollizione.

Diverse sono le tipologie di cavitazione esistenti: cavitazione chimica, elettrica e indotta da radiazioni. In questa trattazione si considera solo il primo caso di formazione di cavità, che si associa a un calo di pressione o ad un notevole aumento della temperatura, in risposta ad un campo acustico. Questo tipo di cavitazione, spesso chiamata, appunto, **cavitazione acustica**, è da intendersi come comprendente qualsiasi attività osservabile che coinvolge una bolla o una popolazione di bolle stimulate da un campo acustico [1].

In biomedicina, la cavitazione acustica è il principale meccanismo fisico mediante il quale gli ultrasuoni forniscono le loro applicazioni terapeutiche, come somministrazione localizzata di farmaci, sonoporazione, trasferimento genico, sonotrombolisi non invasiva, litotripsia e istopatia [2]; la cavitazione può anche migliorare l'ablazione termica di tumori o altri tessuti malati.

I bio-effetti della cavitazione, che derivano dalle alte temperature, dalle pressioni e dalle velocità del fluido includono l'erosione o la lisi cellulare, la degradazione molecolare e la formazione di radicali liberi. L'insorgenza della cavitazione inerziale può anche essere osservata con applicazioni di ultrasuoni diagnostici in vitro, suggerendo che anche la diagnostica può presentare rischi per il danneggiamento del tessuto o la lisi cellulare nel corpo [3] [4].

Le soglie di cavitazione, compresa la pressione acustica minima necessaria per iniziare la cavitazione (chiamata soglia di nucleazione) e la pressione acustica minima

necessaria per indurre il collasso transitorio (chiamata soglia di collasso), sono tra gli aspetti critici della ricerca. Inoltre, poiché i gas hanno una grande compressibilità rispetto ai liquidi, le bolle interagiscono molto fortemente con le pressioni acustiche alternate.

La dinamica delle bolle in un campo acustico è, quindi, un aspetto essenziale della cavitazione acustica. Inoltre, in biomedicina, sono stati introdotti diversi tipi di nuclei di cavitazione, che possiedono funzionalità diverse, sono destinati ad applicazioni diverse e possono comportare anche rischi diversi.

1.1 Processo e soglie di cavitazione

1.1.1 Nucleazione, crescita, oscillazione, collasso e dissoluzione

Il processo di cavitazione comprende due fasi fondamentali: la *nucleazione*, ossia la formazione iniziale della cavità e la successiva *dinamica* delle bolle che implica *crescita, oscillazione e collasso*.

La *nucleazione*, ossia l'inizio della cavitazione, può avvenire in due forme, ad esempio può avvenire a partire da un liquido omogeneo puro che non contiene impurità o gas, in questo caso si formeranno delle cavità quando la pressione acustica imposta sul liquido è maggiore della resistenza a trazione del liquido (*nucleazione omogenea*).

Tuttavia, in sistemi reali o esperimenti pratici, si pensa che quasi tutta la nucleazione si verifichi non perché le molecole liquide vicine vengono separate spontaneamente, ma perché il liquido contiene alcuni siti "deboli" in cui la cavitazione può iniziare più facilmente. I cosiddetti *siti deboli* comprendono i confini tra le interfacce liquido e solido, o liquido-solido-gas (nel caso di *nucleazione eterogenea*).

Un'onda ultrasonica meccanica progredisce attraverso i tessuti causando cicli alternati di pressione: la pressione aumenta e poi si riduce ciclicamente (compressione e rarefazione). Le bolle, quindi, crescono e poi si restringono, cioè oscillano attorno alla loro dimensione di risonanza.

Tuttavia, se le pressioni acustiche sono sufficientemente elevate, le bolle si espandono rapidamente durante il semi-ciclo negativo, ed, a seguito di questo, sul mezzo ciclo di compressione, collassano violentemente, e, spesso, si rompono in molte bolle più piccole, generando picchi di temperatura e di pressione altamente localizzati, che a loro volta generano onde d'urto, radicali liberi e calore locale.

Molte applicazioni biomediche si basano proprio sul collasso della bolla di cavitazione. Tutto ciò è illustrato nella figura 1.1.

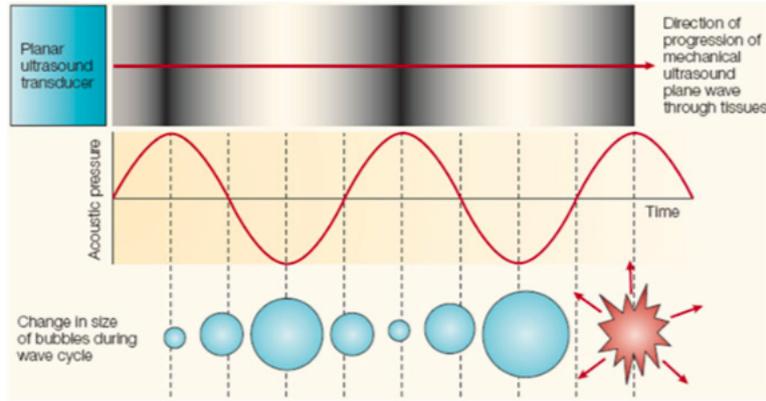


Figura 1.1: Il processo di cavitazione. In ordine, dall'alto verso il basso: Un'onda ultrasonica meccanica attraverso i tessuti, i cicli alternati di pressione (compressione e rarefazione) che portano alla creazione di bolle, ed, infine, il collasso di una bolla.

In conclusione, affinché possa verificarsi la cavitazione acustica, deve essere presente un campo di pressione alternato. Una volta rimosso il campo di pressione, disattivando la trasmissione acustica, le bolle restanti si dissolvono a causa della tensione superficiale, o si dissolvono completamente o si restringono ad una dimensione che può poi essere riportata alla dimensione di risonanza durante il successivo impulso acustico.

1.1.2 Soglia di nucleazione e soglia di collasso

Per *soglia di cavitazione*, generalmente, si intende l'ampiezza di pressione acustica minima necessaria per avviare una bolla e farla collassare violentemente. Tuttavia, questi due eventi si verificano a diversi livelli di pressione: il primo è chiamato *soglia di nucleazione*, e il secondo è chiamato *soglia di collasso*.

1. **Soglia di nucleazione.** La soglia di nucleazione si riferisce alla forza o all'energia richiesta per la nucleazione omogenea ed eterogenea in un liquido. La formazione di bolle a un'interfaccia di particelle liquide è schematizzata nella figura 1.2, e la barriera di energia di nucleazione è data dall'equazione 1.1.

$$\Delta E = \frac{4\pi\sigma^3(2 + 3\cos\theta - \cos^3\theta)}{3P^2} \quad (1.1)$$

dove σ è la tensione superficiale gas-liquido (73 mN / m) e P è la somma della tensione di vapore (P_V), della pressione del gas (P_G) e della pressione acustica (P_A). P_A è almeno 1 atm, che è molto più grande delle altre pressioni parziali; quindi, gli altri contributi risultano trascurabili per questo volume di lavoro.

Il simbolo θ rappresenta l'angolo di contatto apparente di una bolla di nucleazione su una superficie curva a contatto con un liquido (figura 1.2 a). Quando la particella è molto piccola (ad es. 500 nm) θ è superiore a quello che si avrebbe su una superficie di particelle più grande (figura 1.2a, b). Se il diametro delle particelle è sufficientemente grande (ad esempio 50 μ m), la nucleazione di una bolla di 100 nm sulla superficie delle particelle è simile a quella su una superficie planare. Secondo l'equazione 1.2, θ influenza drasticamente l'energia di nucleazione.

La figura 1.2c mostra la barriera di energia di nucleazione in funzione dell'angolo di contatto, che deriva dal massimo o dalla somma dell'energia di superficie e dal lavoro del volume. Si deduce quindi che la barriera di energia di nucleazione aumenta all'aumentare dell'angolo di contatto.

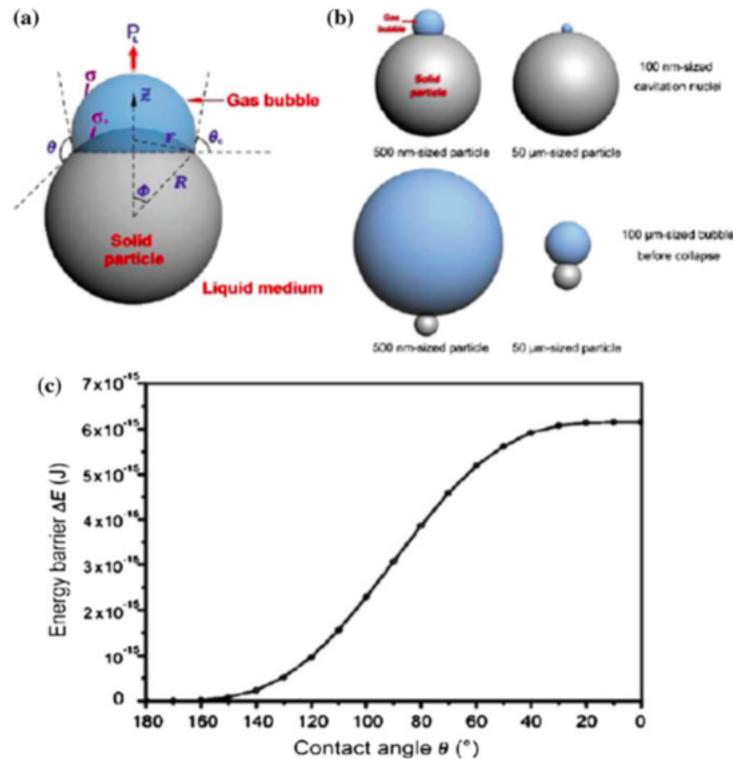


Figura 1.2: a) Schema per la nucleazione e la crescita di una bolla di cavitazione su una superficie di particelle; θ è l'angolo di contatto apparente, θ_0 è un angolo di contatto intrinseco. b) Schema per i nuclei di cavitazione (riga superiore) e bolla prima del collasso (riga inferiore) su particelle piccole (a sinistra) e grandi (a destra). c) Barriera di energia di nucleazione in funzione dell'angolo di contatto θ derivata dal massimo della somma dell'energia di superficie e del volume di lavoro.

2. **Soglia di collasso.** Come già detto, quando la pressione acustica è maggiore del valore che fa entrare in tensione il liquido durante la fase di rarefazione del ciclo, le bolle di gas nel liquido si espandono in maniera esageratamente rapida. Questo, porta poi, nel mezzo ciclo di compressione, ad un violento collasso - implosione - ed all'eventuale rottura in molte bolle più piccole. Questa pressione è chiamata soglia di collasso ed è il valore minimo necessario per avviare la crescita delle bolle e il conseguente collasso adiabatico. La soglia teorica per il collasso delle bolle viene calcolato come segue [5]:

$$R_T = \left\{ \frac{0.3}{f} \left(\frac{P_0}{\rho} \right)^{\frac{1}{2}} \left[\frac{2}{3}(p-1) \right]^{\frac{1}{2}} \right\};$$

La soglia di collasso è espressa inversamente in termini di raggio di soglia della bolla.

1.2 Nuclei di cavitazione

Se un liquido è completamente privo di gas, quando la pressione acustica scende al di sotto della pressione di vapore del liquido, si sviluppano le cavità e crescono molto rapidamente a causa del processo di evaporazione nella cavità di crescita. Tale processo è chiamato cavitazione vaporosa.

Nel caso di un liquido con un gas disciolto, a seconda dell'entità della riduzione di pressione che si sta verificando nel sistema e della velocità di riduzione, le cavità di gas possono inizialmente formarsi a causa della presenza di nuclei adatti (un contaminante, per esempio). Queste cavità crescono lentamente con la diffusione del gas disciolto dal liquido. Questo processo è, invece, chiamato cavitazione gassosa.

Questo tipo di cavitazione, in cui la cavitazione ha origine in un nucleo adatto (chiamato *nucleo di cavitazione*), è molto più comune della cavitazione che si verifica nella massa di un liquido puro. Perché la cavitazione gassosa si verifichi, le molecole di gas devono essere sciolte nel liquido circostante.

Esistono diversi tipi di nuclei di cavitazione, che hanno applicazioni diverse in biomedicina.

- *Microcavità.* Possono essere suddivise in due sottogruppi, entrambi costituiti da bolle fluttuanti di dimensioni micrometriche sospese in un liquido o da cavità in superfici solide a contatto con il liquido [6].

Il termine *microcavità* si riferisce a qualsiasi volume limitato, sia esso vuoto o contenente un gas o vapore, dove almeno una parte del confine è un liquido. Le tecniche a ultrasuoni pulsati hanno utilizzato proprio queste microbolle per

ottimizzare gli effetti di cavitazione nelle applicazioni terapeutiche, industriali e ultrasoniche.

Apparentemente, queste tecniche a ultrasuoni pulsati funzionano impiegando le bolle libere nucleate dall'impulso precedente, probabilmente perché gli ioni idrofobi si possono raccogliere sulla o vicino alla superficie delle bolle libere e aiutano a stabilizzarle [7].

Il primo modello che provò a spiegare perché le bolle libere possono esistere stabilmente fu *the skin model*, proposto nel 1954 da Fox ed Herzfeld [8]. Questi studiosi hanno suggerito che le bolle di gas libere in un liquido potrebbero essere stabilizzate da una strato di molecole organiche come gli acidi grassi. Ovviamente, tali molecole sarebbero solubili in sostanze organiche come alcool e tetracloruro di carbonio, quindi questi liquidi non dovrebbero contenere nuclei e non essere in grado di subire la cavitazione. Tuttavia, la cavitazione può verificarsi in questi liquidi. Così, questa ipotesi fu abbandonata da Herzfeld nel 1964 [9].

Successivamente, lo skin model fu rivisitato (1979) [10] e si assunse che la pelle fosse formata da molecole anfifiliche (sostanze tensioattive) che permettono al gas in una bolla di essere in equilibrio di diffusione con le molecole di gas disciolte nel liquido circostante; la pelle consente alla bolla di resistere al collasso. Nell'acqua, le teste idrofile delle molecole anfifiliche formano legami ad idrogeno con le molecole d'acqua circostanti, mentre le code idrofobiche legano con il contenuto di gas delle bolle, formando così una pelle su ogni superficie di bolla che consente al gas nel vuoto di essere in equilibrio di diffusione con il gas nell'acqua. Il modello di Yount concorda con le osservazioni di Johnson e Cooke (1981), secondo le quali a pressione atmosferica, le bolle di gas nell'acqua di mare possono essere stabilizzate dalla pelle [11].

- *Bolla incapsulata*. Queste bolle sono costituite da un guscio lipidico, polimerico o di albumina che incapsula un nucleo di aria o un gas con una bassa diffusività e hanno un diametro compreso tra 1 e 10 μm [12].

Sebbene le bolle incapsulate abbiano dinamiche diverse in un campo ultrasonico rispetto alle bolle sferiche di dimensioni micrometriche, rispondono ancora ad un'onda di pressione ultrasonica, in termini di espansione e contrazione rispettivamente durante le fasi di rarefazione e compressione. Le microbolle esposte ad un'eccitazione acustica relativamente bassa subiscono oscillazioni stabili ed emettono segnali non lineari [13]; una pressione di trasmissione sufficientemente elevata può causare la rapida distruzione delle microbolle, liberando il loro gas [14].

La rapida distruzione avviene perché, in un impulso, il diametro degli agenti di contrasto diminuisce bruscamente, e questo è spesso accompagnato dalla

separazione dei gusci di microbolle in diversi piccoli frammenti, rilasciando segnali di rumore a banda larga, completa diffusione del gas incapsulato e un grande cambiamento nell'ampiezza dell'eco ricevuta [15].

Molti ricercatori hanno studiato la frammentazione delle microbolle da prospettive sia acustiche che ottiche, ed i risultati sperimentali suggeriscono che la frammentazione delle microbolle si basa su molti fattori, come la pressione di eccitazione acustica, la frequenza centrale, la durata dell'impulso e il diametro di riposo. Le microbolle tendono a frammentarsi con l'aumento della pressione di eccitazione acustica e della durata dell'impulso, ma con frequenze centrali e diametri di riposo decrescenti [14] [15] [16] [17].

Tuttavia, i meccanismi di distruzione per le microbolle rivestite con lipidi e quelle rivestite con polimeri sono diversi [18]. Per le microbolle con rivestimento lipidico, esperimenti ottici ad alta velocità hanno dimostrato che sia il guscio che il suo contenuto vengono frammentati. Viceversa, le microbolle rivestite con polimero rimangono in gran parte intatte e non oscillano significativamente in risposta agli ultrasuoni; invece, il gas contenuto all'interno della microbolla viene estruso ed espulso attraverso un difetto nel guscio polimerico, mentre la microbolla mantiene la sua forma. La figura 1.3 mostra il rispettivo processo di distruzione per microbolle rivestite con lipidi e polimeriche.

Recentemente, la frammentazione intenzionale di microbolle è stata introdotta nelle applicazioni terapeutiche ad ultrasuoni, come il rilascio localizzato di farmaci indotto da ultrasuoni, la trombolisi e l'emolisi per migliorare gli effetti di cavitazione. Non sorprende che gli effetti terapeutici di queste applicazioni ad ultrasuoni derivino da meccanismi di cavitazione e dipendano in gran parte dall'esistenza di bolle di gas.

Quindi, con l'avvento delle microbolle, i bio-effetti della cavitazione per queste terapie potrebbero crescere ulteriormente. Tuttavia, l'uso di microbolle può dare origine a getti ad alta velocità, forti forze di taglio e onde d'urto che possono danneggiare i tessuti circostanti, anche quando gli ultrasuoni sono utilizzati solo a livello diagnostico. Nel complesso, quando le microbolle incapsulate sono esposte ad una pressione acustica con un'ampiezza sufficientemente elevata, possono essere distrutte rapidamente, dando così inizio alla cavitazione inerziale.

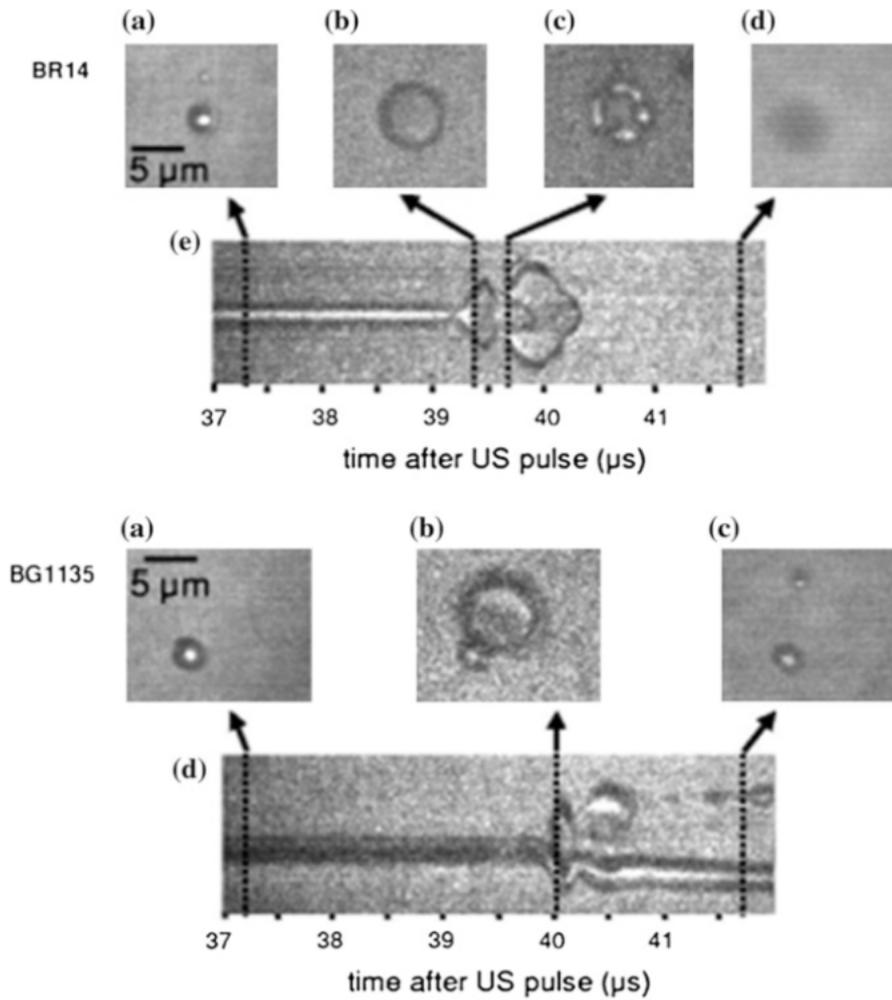


Figura 1.3: Distruzione di una microbolla con rivestimento lipidico (BR 14) e microbolla rivestita di polimero (BG 1135).

- *Phase-Shift Nanodroplet*. Recentemente, diverse applicazioni biomediche hanno iniziato a impiegare la vaporizzazione di gocce acustiche (ADV), in cui nano- o micro gocce vengono attivate e quindi vaporizzate in bolle gassose dopo l'irradiazione mediante ultrasuoni, anche a bassa potenza. L'ADV è un processo fisico in cui le onde di pressione degli ultrasuoni inducono una transizione di fase che causa la formazione di bolle di gas da parte di nano-gocce di liquido surriscaldato.

Dal punto di vista diagnostico, le goccioline hanno la possibilità di fuoriuscire dai vasi sanguigni verso il tessuto interstiziale [19]. Immediatamente dopo la vaporizzazione, le microbolle spargono gli ultrasuoni diagnostici non lineari e quindi possono essere rilevati con tecniche di imaging specifiche [20].

L' ADV è stato studiato per una vasta gamma di applicazioni terapeutiche, come l' emboloterapia [21], il rilascio di farmaci terapeutici [22] e l' ablazione termica ad alta intensità focalizzata (HIFU) [23].

Le goccioline ampiamente utilizzate per l' applicazione biomediche sono i perfluorocarburi (PFC) poiché non sono tossiche, anzi sono biocompatibili e immiscibili con l' acqua.

La Figura 1.4 illustra la variazione di pressione locale quando gli ultrasuoni si propagano in un mezzo liquido [24]. Ci sono fluttuazioni di pressione positive e negative che oscillano intorno alla pressione atmosferica. Quando il ciclo di rarefazione dell' onda acustica riduce la pressione locale fino a valori inferiori alla pressione di vapore del liquido PFC per un tempo sufficiente, forma bolle di gas. *Tempo sufficiente* significa che la pressione locale è inferiore alla pressione del vapore per il tempo necessario a produrre una nucleazione eterogenea o omogenea della fase gassosa.

La pressione all' interno di una goccia di nanoemulsione è maggiore della pressione del liquido circostante a causa del contributo aggiuntivo della pressione di Laplace: $\Delta P_{LP} = \frac{2\gamma}{r}$, dove γ è l' energia interfacciale r è il raggio della goccia di emulsione. Quando la somma della pressione locale e della pressione di Laplace scende al di sotto della tensione di vapore del PFC liquido, esiste un potenziale di pilotaggio di sotto-pressurizzazione per nucleare la fase gassosa. La sotto-pressurizzazione è definita come la differenza tra la tensione di vapore e la pressione locale. Se il ciclo acustico è troppo breve o la sub-depressurizzazione è inadeguata, non si forma alcuna fase gassosa.

È noto che, sebbene abbia una temperatura di ebollizione di 29°C a pressione atmosferica, la transizione da goccia a bolla indotta dal calore non è efficiente a 29 ° C a causa di una pressione aggiuntiva risultante dalla tensione superficiale all' interno delle goccioline, definita come la pressione di Laplace. Tuttavia, ricercatori e studiosi [25] hanno mostrato una vaporizzazione efficace delle goccioline usando energia ultrasonica a, o anche inferiore, al loro punto di ebollizione a causa della diminuzione della pressione ambiente esercitata sulla gocciolina durante la fase di rarefazione degli ultrasuoni, implicando quindi la cavitazione inerziale. Inoltre, la maggior parte degli studi ha dimostrato che l' aumento della durata dell' impulso a ultrasuoni alle frequenze ultrasoniche clinicamente rilevanti non determina una diminuzione significativa della soglia di vaporizzazione, a meno che la durata sia dell' ordine di 1 ms o superiore. L' allungamento della durata dell' impulso ultrasonico a più di 1 ms riduce la soglia di vaporizzazione, probabilmente perché l' energia viene convertita dall' onda ultrasonica incidente al calore assorbito dalle goccioline, il che eleva la temperatura della goccia. La Figura 1.6 illustra il processo ADV per PFC₅[25].

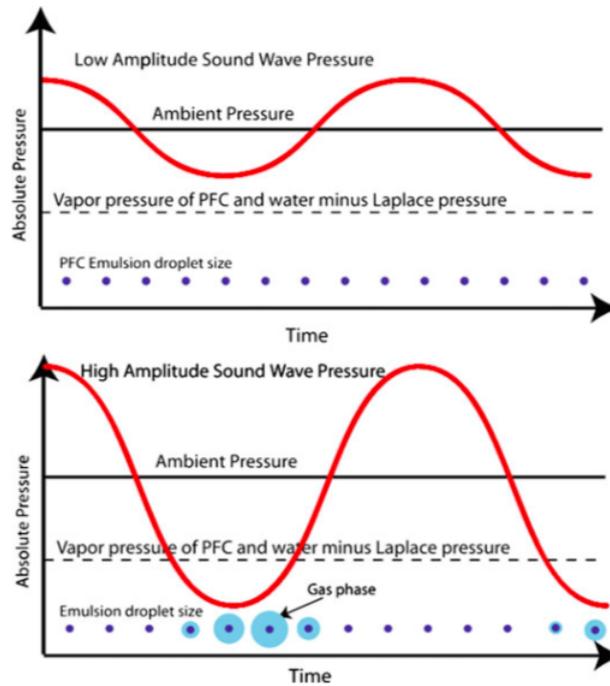


Figura 1.4: Un'onda acustica ultrasonica in emulsione perfluorocarburica. In alto un'onda acustica la cui pressione minima rimane al di sopra della tensione di vapore del PFC meno la pressione di Laplace. In basso si osserva come si forma una fase gassosa intorno alla gocciolina di emulsione quando la pressione dell'onda locale scende al di sotto della pressione di vapore del PFC meno la pressione di Laplace.

Complessivamente, l'assorbimento termico può essere il meccanismo dominante mediante il quale l'ADV si verifica quando l'impulso si trova nell'intervallo del millisecondo, mentre la cavitazione inerziale può essere il meccanismo primario per ADV quando l'impulso è nel range dei microsecondi.

- *Altre micro/nano particelle.* Le nanoparticelle d'oro, che sono minuscoli assorbitori ottici, rappresentano un'altra tipologia di nucleo di cavitazione. Ad esempio, la cavitazione può verificarsi quando le bolle di vapore che circondano le nanoparticelle d'oro collassano a causa dell'esposizione alla luce laser pulsata. Le nanoparticelle d'oro assorbono l'energia del laser, inducendole a riscaldarsi rapidamente, portando alla vaporizzazione del mezzo circostante e alla formazione di una cavità di vapore transiente. La cavitazione attorno alle nanoparticelle riscaldate con il laser produce un'interruzione meccanica forte e localizzata ed è efficace nel produrre la morte cellulare localizzata in cellule bersaglio di nanoparticelle [26]. La dimensione della cavità è determinata principalmente dalla dimensione della particella e l'arrivo dell'impulso laser determina il tempo di nucleazione relativo al ciclo acustico.

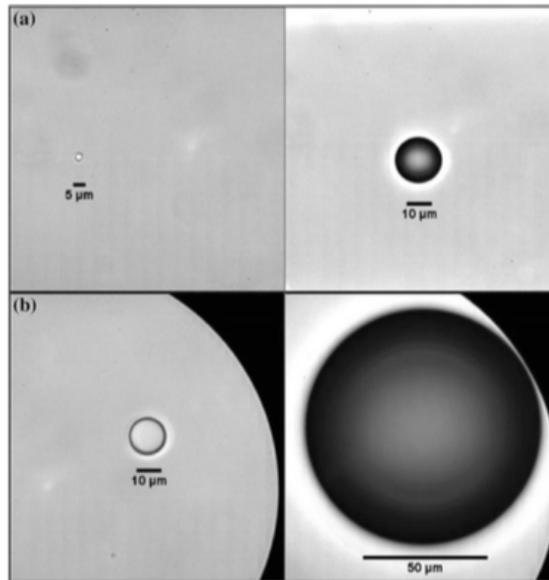


Figura 1.5: Vaporizzazione di goccioline PFC5 a seguito di esposizione a impulsi ultrasonici a 37 ° C. a) Le goccioline originali con diametri di 5 e 10 m; b) bolla di gas indotta dalla vaporizzazione. Il conseguente aumento delle dimensioni dopo la vaporizzazione era vicino a quello previsto dalle leggi del gas ideali (circa 5-6 volte il diametro originale della goccia).

1.3 Cavitazione tensile e cavitazione energetica

Soprattutto in campo biomedico, si distinguono due categorie di cavitazione, in base ai meccanismi fisici che causano la nucleazione delle bolle di cavitazione, riducendo la pressione nel liquido (*cavitazione tensile*) o depositando energia (*cavitazione energetica*).

Infatti la cavitazione acustica non inizia solo quando l'ampiezza di pressione acustica genera un livello di tensione all'interno del liquido che è uguale o maggiore alla resistenza a trazione del liquido, bensì la cavitazione acustica può verificarsi anche sotto forma di cavitazione energetica, derivante dal calore assorbito dopo l'esposizione acustica.

Ad esempio, un certo numero di applicazioni terapeutiche indotte da ultrasuoni sono state usate con un impulso acustico trasmesso a diverse centinaia di cicli o più, ad esempio ablazione tumorale indotta da HIFU [27] e ADV [25]. Poco dopo l'invenzione del laser, sono stati osservati fenomeni di cavitazione anche in campi luminosi ad alta intensità [28] [29]. Questo fenomeno è chiamato *cavitazione ottica* [30] [31] e può essere considerato un'altra forma di cavitazione energetica. Quando gli impulsi laser ad alta potenza vengono focalizzati su un mezzo trasparente, non appena viene superata una certa soglia di irraggiamento, il mezzo diventa improvvisamente opaco alla radiazione laser.

L'improvviso aumento del coefficiente di assorbimento è dovuto alla formazione di un plasma denso, otticamente assorbente. La formazione di plasma, è stata osservata nei gas [32] [33], nei solidi [34] [35] e nei liquidi [36]; tale formazione di plasma porta al rapido riscaldamento del materiale nel volume focale, seguito dall'espansione esplosiva e dall'emissione di un'onda d'urto. L'espansione del volume riscaldato porta inoltre alla formazione di una cavità, se si verifica in un solido, o di una bolla di cavitazione, se avviene in un liquido [37]. Il processo, chiamato *cavitazione fotoacustica* rientra nella cavitazione energetica [38].

1.4 Dinamica della bolla di cavitazione

1.4.1 Dinamica di una bolla di gas libera in un campo libero

Poiché i gas sono molto più compressibili dei liquidi, le bolle reagiscono molto fortemente alle pressioni acustiche alternate. Quindi, la dinamica delle bolle in un campo sonoro è un aspetto essenziale della cavitazione acustica. Il modello più utilizzato per descrivere l'oscillazione della bolla in un campo libero è l'equazione di Rayleigh-Plesset [39]:

$$\ddot{R}R + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{1}{\rho}[P - P_0 - P_{\text{driv}}(t)] \quad (1.2)$$

Qui, si presume che una bolla con un raggio iniziale R_0 oscilli in modo simmetricamente sferico in un liquido infinito, e il gas all'interno della bolla sia omogeneo. La densità ρ del liquido circostante è molto più grande della densità del gas all'interno della bolla e la pressione di vapore all'interno della bolla, P_V , rimane costante durante la sua oscillazione. Inoltre, il raggio della bolla è inferiore alla lunghezza d'onda ($R < \lambda$), e la velocità della parete della bolla è molto più piccola della velocità del suono all'interno del liquido. La viscosità di massa del materiale nella bolla e la comprimibilità del liquido non sono considerate.

L'equazione precedente è stata poi estesa da Noltingk, Neppiras e Poritsky per tenere conto del gas all'interno della bolla, della tensione di vapore, della tensione superficiale e della viscosità del liquido [40]:

$$R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{1}{\rho}$$

Questi tipi di equazioni sono chiamate equazioni di Rayleigh-Plesset o di RPNNP. Si assume che il liquido intorno alla bolla sia incomprimibile. Tuttavia, questa ipotesi diventa falsa quando l'ampiezza dell'oscillazione è relativamente grande. Questo porta a una classe di equazioni del primo ordine, una delle quali è l'equazione di Herring-Trilling [40] [9]:

$$R\ddot{R}\left(1 - 2\frac{\dot{R}}{c}\right) + \frac{3}{2}\dot{R}^2\left(1 - \frac{4}{3}\frac{\dot{R}}{c}\right) = \frac{1}{\rho}\left[P - P_0 - P_{\text{driv}}(t) - \frac{R}{c}\dot{P}\left(1 - \frac{\dot{R}}{c}\right)\right] \quad (1.4)$$

La velocità della bolla non può essere trascurata, per questo motivo è stato inserito un nuovo termine definito come M (numero di Mach). Sulla base di queste equazioni, è stato sviluppato il modello di Herring-Trilling modificato [41]:

$$R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{1}{\rho}\left[P - P_0 - P_{\text{driv}}(t) + \frac{R}{c}\dot{P}\right] \quad (1.5)$$

1.4.2 Dinamica di una bolla incapsulata in un campo libero

Le equazioni riportate nel precedente paragrafo sono valide esclusivamente per le bolle di gas libere e costituiscono la base della dinamica delle bolle.

Tuttavia, la maggior parte delle bolle che si utilizzano nelle applicazioni biomediche sono incapsulate da materiali di shell per renderle più stabili. I materiali del guscio influenzano l'oscillazione e lo scattering delle bolle in due modi principali [41].

Innanzitutto, le bolle incapsulate sono più rigide delle bolle di gas libere della stessa dimensione, dando loro frequenze di risonanza più elevate e un minor numero di effetti non lineari. In secondo luogo, i materiali del guscio rendono le bolle più viscoso, portando ad una maggiore energia acustica trasformata in calore. Di conseguenza, il rapporto tra dispersione e attenuazione diminuisce.

Per la maggior parte delle bolle incapsulate, i parametri più importanti che determinano la loro risposta acustica sono quelli del materiale del guscio. Esistono diversi modelli di bolle incapsulate, come il modello Morgan, il modello Nico de Jong e il modello reologico newtoniano, per citarne alcuni.

Il modello Morgan si basa sul modello modificato di Herring-Trilling [42]:

$$\begin{aligned} \rho R\ddot{R} + \frac{3}{2}\rho\dot{R}^2 = & \left(P_0 + \frac{2\sigma}{R_0} + \frac{2\chi}{R_0}\right)^{3\gamma} \left(1 - \frac{3\gamma\dot{R}}{c}\right) - \frac{4\mu\dot{R}}{R} - \frac{2\sigma}{R} \left(1 - \frac{\dot{R}}{c}\right) \\ & - \frac{2\chi}{R} \left(\frac{R_0}{R}\right)^2 \left(1 - \frac{3}{c}\dot{R}\right) - 12\mu_{\text{sh}}\epsilon \frac{\dot{R}}{R(R-\epsilon)} - (P_0 + P_{\text{driv}}(t)) \end{aligned} \quad (1.6)$$

dove $\frac{2\sigma}{R_0}$ e $\frac{4\mu\dot{R}}{R}$ sono gli effetti della tensione superficiale su quell'interfaccia e sulla viscosità del liquido, rispettivamente.

Il termine $\frac{2\chi}{R} \left(\frac{R_0}{R} \right)^2$ rappresenta l'elasticità dilatativa del guscio [43], e

$12\mu_{\text{sh}}\epsilon \frac{\dot{R}}{R(R-\epsilon)}$ è legato allo smorzamento viscoso del guscio, dove μ e ϵ sono rispettivamente lo spessore e il coefficiente di viscosità del guscio. Poiché questo modello può essere applicato solo ad oscillazioni di piccola ampiezza, si presume sempre che la velocità nello shell non sia molto alta.

Inoltre, sono inclusi sia i coefficienti di viscosità che di elasticità, e si ritiene che il gas interno segua la legge del gas ideale e possa essere compresso all'infinito. Questa ipotesi è soddisfatta quando l'oscillazione della bolla è lieve, ma in realtà il gas non può essere compresso all'infinito. Quando la pressione applicata aumenta in modo significativo e la distanza tra le molecole di gas diminuisce in un certo grado, le molecole di gas si respingono fortemente. Un altro modello per le bolle incapsulate è stato proposto da de Jong [44]:

$$\rho R \ddot{R} + \frac{3}{2} \dot{R}^2 = \frac{1}{\rho} \left\{ P_g 0 \frac{R_0^{3\gamma}}{R} + P_v - \frac{2\sigma}{R} - P_0 - P(t) - S_P \left(\frac{1}{R_0} - \frac{1}{R} \right) - \delta_t \omega \rho R \dot{R} \right\} \quad (1.7)$$

$$\delta_t = \frac{4\mu}{\omega \rho_0 R^2} + \frac{\omega R_0}{c} \frac{1}{1 + (\omega R_0/c)^2} \left(\frac{\omega_0}{\omega} \right)^2 + \frac{S_P}{4\pi R^3 \rho \omega} \quad (1.8)$$

$$S_P = \frac{Et}{1 - \mu} \quad (1.9)$$

Con questo modello sono stati introdotti due parametri, il coefficiente di rigidità (S_P) e il termine di smorzamento (δ_t), per illustrare l'influenza del guscio. Il termine $S_P \left(\frac{1}{R_0} - \frac{1}{R} \right)$ rafforza l'influenza della tensione superficiale. Questo valore diventa negativo per gli agenti tensioattivi, zero per le bolle di gas piene d'aria e positivo per le bolle incapsulate. Durante l'oscillazione della bolla, l'attrito tra le molecole del guscio genera uno smorzamento della viscosità addizionale, che è combinato con smorzamento acustico e smorzamento delle radiazioni, ed è scritto come $\delta_t = \delta_f + \delta_{\text{vis}} + \delta_{\text{th}} + \delta_{\text{ra}}$. Lo spessore della shell non è specificato in questo modello perché le variazioni nello spessore del guscio sono riflesse dalle modifiche dell'indice meccanico e dal termine di smorzamento. Il termine di smorzamento è ottenuto in condizioni lineari senza tenere conto della pressione acustica applicata.

Un altro modello, proposto per la prima volta da Chatterjee e Sarkar, è il modello reologico newtoniano [45] che si concentra sulle interfacce delle bolle incapsulate. Qui, si assume che il materiale di guscio comprenda diversi strati e che lo spessore di ogni strato sia considerato infinitamente piccolo. Sulla base delle caratteristiche reologiche dell'interfaccia e delle caratteristiche reologiche newtoniane del liquido circostante, la dinamica delle bolle può essere scritta come segue:

$$\rho \left(R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 \right) = P_{g0} \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3k} - 4\mu \frac{\dot{R}}{R} - \frac{2\gamma}{R} - \frac{4k^s \dot{R}}{R^2} - P_0 + P_{\text{driv}}(t) \quad (1.10)$$

1.4.3 Dinamica di una bolla vicino all'interfaccia

In questo caso la dinamica delle bolle è molto più complicata che in un campo libero.

È importante studiare cosa succede all'interfaccia perché le interazioni bolla-limite generano getti liquidi ad alta velocità, che sono molto importanti nella pulizia ultrasonica e nelle applicazioni terapeutiche.

Il collasso delle bolle vicino all'interfaccia è molto importante perché può generare cavitazione inerziale e danno meccanico. Il collasso della bolla si verifica quando l'accelerazione della bolla è sufficientemente alta e la bolla può diventare altamente instabile. Molti esperimenti hanno osservato le interazioni ai confini delle bolle e mostrano che l'oscillazione delle bolle è asimmetrica e che i getti liquidi si formano durante le fasi di collasso [46] [47] [48]. Alcuni studi teorici hanno cercato di spiegare queste osservazioni, in particolare il processo di formazione del getto liquido e l'energia che contiene.

Plesset e Chapman hanno presentato un modello teorico per una cavità di vapore inizialmente sferica nelle vicinanze di un solido [49], in cui hanno dimostrato che i getti erano diretti verso il confine solido; i loro risultati sono coerenti con le osservazioni sperimentali di Lauterborn e Bolle [30].

Più tardi, Brujan [50] ha studiato la formazione di getti e l'emissione di onde d'urto durante il collasso della cavitazione indotta da ultrasuoni e hanno calcolato alcuni parametri come la variazione della parete della bolla con il tempo, la velocità massima e l'energia cinetica del getto liquido. Hanno calcolato la pressione della cavità usando la seguente equazione:

$$P_c = P_v + P_0 \left(\frac{V_0}{V} \right)^K \quad (1.11)$$

dove P_v è la pressione di vapore, e P_0 è la pressione del contenuto non condensabile vicino al sito di inizio della cavità. Prima che si formi il getto liquido, l'equazione governativa può essere scritta in termini di equazione integrale:

$$\frac{1}{2}\phi(x') = \int_{\Omega} \left(\frac{\partial\phi(x)}{\partial n} G(x, x') - \phi(x) \frac{\partial G(x, x')}{\partial n} \right) dS \quad (1.12)$$

dove S è la superficie della bolla e $G(x, x')$ è una funzione di Green. Tuttavia, quando la bolla forma una regione doppiamente connessa con il confine, i modelli visti finora non riescono a descrivere il processo. Con opportune modifiche, la formula integrale diventa:

$$\frac{1}{2}\phi(x') = \int_{\Omega} \left(\frac{\partial\phi(x)}{\partial n} G(x, x') - \phi(x) \frac{\partial G(x, x')}{\partial n} \right) dS - \delta\phi \int_c \frac{\partial G(x, x')}{\partial n} dS \quad (1.13)$$

Il valore di $\Delta\phi$ è ottenuto dalla differenza tra ϕ sulla punta del getto liquido e ϕ sulla superficie della cavità opposta. L'energia del getto liquido è così calcolata:

$$E_k = \frac{\rho}{2} \int_{\S} \phi \frac{\partial\phi}{\partial n} dS \quad (1.14)$$

dove S è la superficie del getto liquido. Un altro parametro molto importante è γ , che è il rapporto tra la distanza dal centro della bolla alla sua massima espansione e il raggio massimo della bolla.

La Figura 1.6 mostra i profili delle bolle calcolate quando $\gamma = 1.2$, $R_0 = 8.9\mu\text{m}$ e $R_{\text{max}} = 200\mu\text{m}$. Si presume che il gradiente di pressione alla parete della bolla vicino al confine e la pressione alla parete della bolla lontano dal limite faccia spostare il centro della bolla verso il confine, generando un getto di liquido ad alta pressione, che può raggiungere una velocità di circa 30 m/s. Successivamente, la forma della bolla può persino diventare toroidale.

È importante sottolineare che i risultati teorici sono altamente coerenti con i risultati degli esperimenti. Come menzionato sopra, γ è la distanza normalizzata dal muro ed è definita come $\gamma = d/R_{\text{max}}$. Quando γ è abbastanza grande da far sì che la bolla tocchi appena il limite alla massima espansione, è possibile osservare un contro-getto.

La Figura 1.7 mostra le immagini del collasso delle bolle (scattate con la fotografia ad alta velocità), per cui si sono verificati sia la formazione di getto che la formazione di contro-flussi [49]. Di seguito sono riportate l'equazione di Laplace per ottenere il potenziale di velocità del fluido e l'equazione per valutare l'evoluzione del limite della bolla:

$$v(x) = -\nabla\phi(x) \quad (1.15)$$

$$\frac{dy}{dt} = vy, \quad \frac{d\phi}{dt} = -\frac{P}{\rho} + \frac{1}{2}|V|^2 \quad (1.16)$$

1.4. Dinamica della bolla di cavitazione

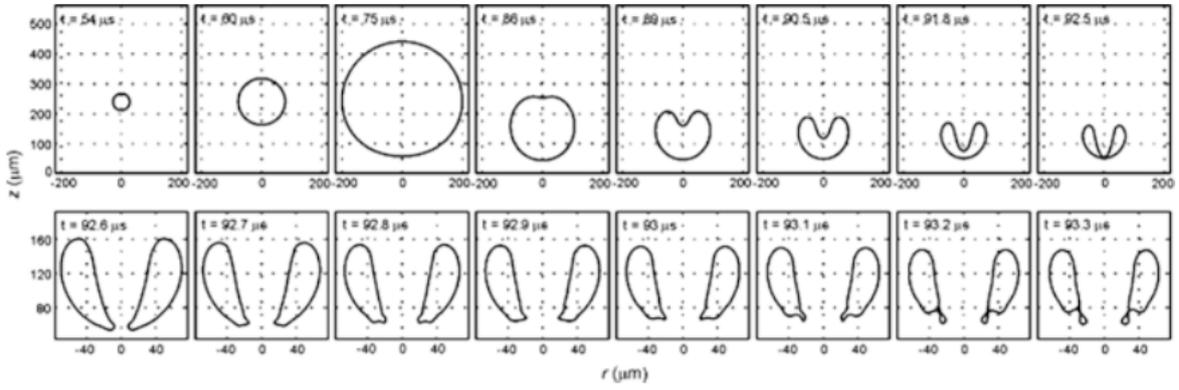


Figura 1.6: Profili delle bolle calcolate per $\gamma = 1.2$, $R_0 = 8.9 \mu\text{m}$ e $R_{\text{max}} = 200 \mu\text{m}$.

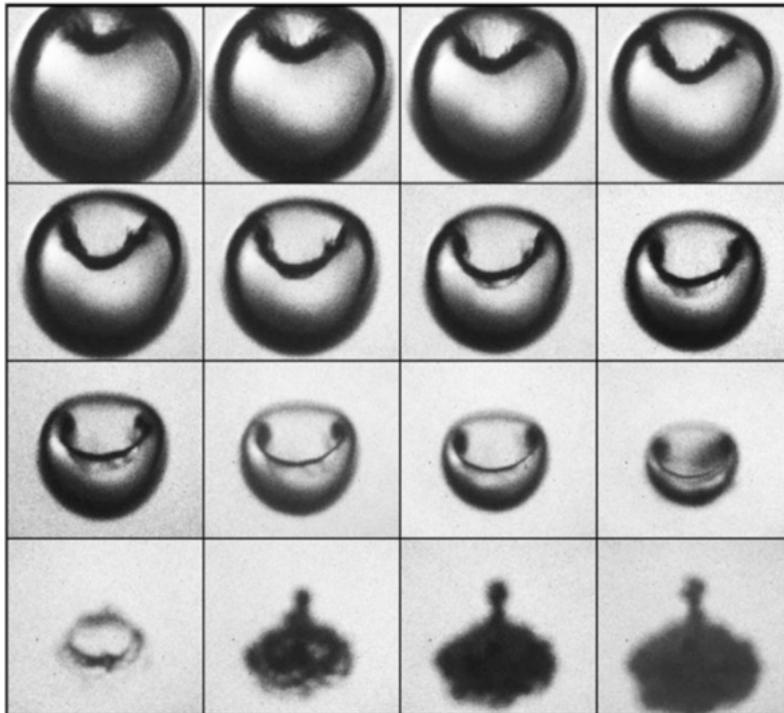


Figura 1.7: Collasso della bolla con formazione di getto, bolla toroidale e contro-getto. Dimensione massima della bolla $R_{\text{max}} = 1.5 \text{ mm}$, $\gamma = 2,6$.

1.4.4 Dinamica di una bolla all'interno di un vaso costretto

Poiché le microbolle hanno un grande potenziale per le applicazioni biomediche, come la somministrazione di farmaci e l'imaging medico, molti studi hanno modellato la dinamica delle bolle nei vasi.

All'interno di un vaso che è molto più grande del diametro della bolla, l'equazione di Rayleigh-Plesset che descrive la pulsazione delle bolle in un campo libero può essere utilizzata come riferimento. Tuttavia, quando la bolla è costretta in un piccolo vaso, il cui diametro è dello stesso ordine di quello della bolla, l'oscillazione della bolla dipenderà dalle caratteristiche del vaso e dall'interazione tra la bolla e la parete del vaso. In questo caso, l'oscillazione della bolla è limitata dalla parete del vaso, una condizione che è stata studiata sia teoricamente che sperimentalmente.

Per esempio, Oguz e Prosperetti [51] hanno studiato bolle di gas libere all'interno di diversi vasi rigidi, mentre Miao ed i suoi collaboratori [52] hanno utilizzato un metodo ad elementi finiti accoppiati (FME) per stimolare l'oscillazione della bolla all'interno di un tubo deformabile. Hay ha sviluppato un modello che può prevedere con precisione la pulsazione e la traslazione di una bolla di gas tra due strati elastici molli e sottili e può anche approssimare la deformazione della parete.

La geometria e il sistema di coordinate utilizzato da Hay [53] è presentato in Fig. 1.8.

Gli strati, con i moduli di taglio μ_1 e μ_2 e gli spessori finiti h_1 e h_2 , sono stati immersi in un liquido incomprimibile. Ha usato l'equazione di Lagrange per descrivere le dinamiche del sistema. L'equazione che ha dedotto per descrivere il raggio efficace della bolla è la seguente:

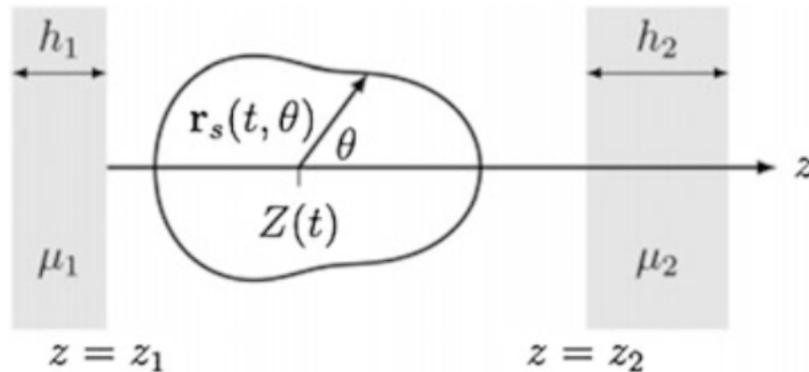


Figura 1.8: Geometria e sistema di coordinate per una bolla sferica con perturbazioni di forma.

$$\begin{aligned}
 R_e \ddot{R}_e + \frac{3}{2} \dot{R}_e^2 = & \frac{P_1}{\rho} + \frac{1}{4} U^2 + \frac{1}{2} \left(\frac{s_2^2}{3} \frac{s_3^2}{4} \right) + \frac{s_2 \ddot{s}_2}{15} + \frac{s_3 \ddot{s}_3}{14} + \frac{\ddot{R}_e}{R_e} \left(\frac{2}{15} s_2^2 + \frac{1}{7} s_3^2 \right) \\
 & + \frac{\dot{R}_e^2}{R_e^2} \left(\frac{s_2^2}{15} \frac{s_3^2}{14} \right) + \frac{2\dot{R}_e}{R_e} \left(\frac{2}{15} s_2 \dot{s}_2 + \frac{s_3 \dot{s}_3}{7} \right) - \frac{11}{70} \frac{s_2 s_3}{R_e} \dot{U} \\
 & - \frac{U}{R_e} \left(\frac{1}{5} s_2 \dot{s}_3 + \frac{3}{14} \dot{s}_2 s_3 \right) - \frac{U^2}{10R_e} \left(s_2 + \frac{17}{98} \frac{s_3^2}{R_e} - \frac{19}{70} \frac{s_2^2}{R_e} \right) \\
 & - \sum_{j=1}^2 \frac{\beta_j}{2} \left[\frac{R_e^3}{(Z - z_j)^4} - \frac{4R_0^3}{(Z_0 - z_j)(Z - z_j)(Z_0 + Z - 2z_j)^2} \right]
 \end{aligned} \tag{1.17}$$

Piuttosto che le bolle di gas libere, le microbolle incapsulate sono più utilizzate in applicazioni diagnostiche e terapeutiche all'interno di microvasi. Poiché la parete del vaso è sensibile ad intense microincisioni e onde d'urto e può facilmente subire danni meccanici, è importante comprendere il processo di oscillazione delle microbolle incapsulate e i fenomeni meccanici coinvolti.

Per fare questo, Hosseinkhah e Hynynen hanno sviluppato un modello numerico tridimensionale di una microbolla incapsulata all'interno di un microvaso [54], che spiega gli effetti del materiale del guscio, della viscosità del fluido e della curvatura della parete del vaso. Poiché le caratteristiche del fluido influenzano l'oscillazione della bolla e il movimento del fluido stesso può causare la deformazione della parete del vaso, è stato introdotto un modello che riflette un accoppiamento a due vie tra la parete della bolla e il fluido circostante, nonché un accoppiamento a due vie tra il fluido e il muro del vaso.

La Figura 1.9 è un'illustrazione schematica della geometria tridimensionale di una bolla ($2\mu m$), sangue e un microrecipiente ($5\mu m$ di raggio, $2\mu m$ di spessore e $204\mu m$ di lunghezza). Il moto del sangue nel vaso può essere descritto dall'equazione di Naver-Stokes:

$$\rho + \left(\frac{\partial V}{\partial t} + v \nabla v \right) = -\nabla p + \mu \nabla^2 v \tag{1.18}$$

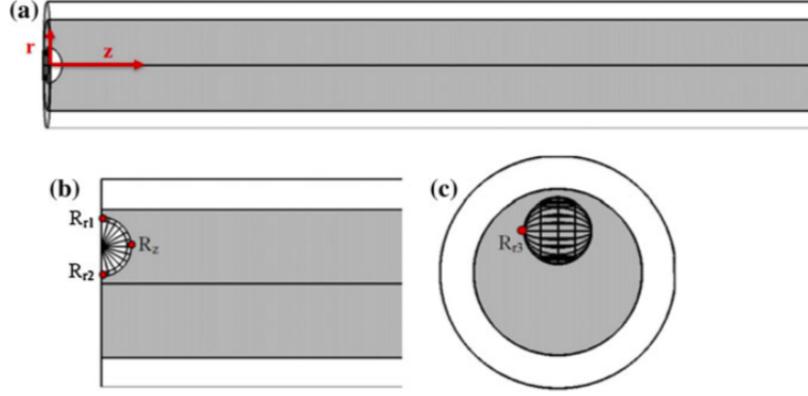


Figura 1.9: Un'illustrazione schematica della geometria tridimensionale di bolla, sangue e un microvaso. a) una bolla al centro del vaso, b) una microbolla decentrata e c) una vista laterale di una bolla decentrata.

L'oscillazione di una bolla dovrebbe soddisfare la seguente equazione:

$$P_L = \left(P_0 + \frac{2\sigma}{R_0} - P_V \right) \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3K} + P_V - \frac{2\sigma}{R} - \frac{4\nu\dot{R}}{R} - \frac{4k_s\dot{R}}{R^2} = 4\chi \left(\frac{1}{R_0} - \frac{1}{R} \right) - P(t) \quad (1.19)$$

dove P_L indica la pressione del fluido sulla parete della bolla. L'equazione del potenziale di pilotaggio del vaso sanguigno segue il seguente modello viscoelastico:

$$P_i + \frac{\nu_1}{E_1} = E_2 e + \nu_1 \left(1 + \frac{E_2}{E_1} \right) \dot{e} \quad (1.20)$$

dove P_i indica la pressione intravascolare ed e è il diametro di strain. E_1 ed E_2 sono i coefficienti elastici con le dimensioni della pressione e ν_1 rappresenta un coefficiente viscoso con le dimensioni di una pressione su tempo.

1.4.5 Dinamica di una bolla in un tessuto molle

Allen e Roy hanno studiato la dinamica delle bolle nei fluidi viscoelastici con viscoelasticità lineare e non lineare. Per il mezzo viscoelastico lineare è stato derivato un sistema di equazioni differenziali non lineari accoppiate che descrive la dinamica della bolla radiale. Le piccole oscillazioni di ampiezza della bolla sono governate dall'equazione di Rayleigh-Plesset e per descrivere il mezzo viscoelastico è usato il modello lineare di Jeffreys [55] [56]:

$$\tau_{rr} + \lambda_1 \frac{\partial \tau_{rr}}{\partial t} = -2\eta_0 \left(\zeta + \lambda_2 \frac{\partial \zeta}{\partial t} \right) \quad (1.21)$$

$$\zeta = \frac{\partial u}{\partial r} = -\frac{2\dot{R}R^2}{r^3} \quad (1.22)$$

$$u = \frac{\dot{R}R^2}{r^2} \quad (1.23)$$

dove λ_1 è il tempo di rilassamento, λ_2 è il tempo di ritardo, ζ è il tasso di deformazione o tensore di deformazione, η_0 è la viscosità a velocità di taglio zero. Accoppiando il modello lineare di Jeffreys con l'equazione iniziale della bolla, è possibile ottenere la seguente dinamica delle bolle:

$$R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{1}{R^{3K}} - w\frac{1}{R} - (1-w)(1-a\cos\Omega t) - \frac{3}{Re} \int_R^\infty \frac{\tau_{rr}(r,t)}{r} \quad (1.24)$$

I parametri possono essere definiti come segue:

$$w = \frac{2\hat{\sigma}}{p_{g0}R_0}; \quad \Omega = R_0\sqrt{\frac{\rho}{p_{g0}}}\omega; \quad Re = \frac{\eta_0}{\sqrt{p_{g0}\rho}R_0}; \quad a = \frac{p_a}{p_0} \quad (1.25)$$

dove Re indica il numero di Reynolds, w è la pressione di Laplace adimensionale, e ω è il rapporto tra la frequenza della forzante acustica e la frequenza di risonanza naturale della bolla. L'oscillazione non lineare di una bolla sferica, acusticamente forzata, è stata studiata anche in un mezzo viscoelastico non lineare. Qui, l'oscillazione della bolla è anche descritta dall'equazione di Rayleigh-Plesset, mentre il modello Maxwell (UCM) è stato usato per semplificare il mezzo viscoelastico non lineare. L'equazione può essere scritta come segue:

$$\tau + \lambda_1\tau_{(1)} = -\eta_0\dot{\gamma} \quad (1.26)$$

Dove $\tau_{(1)}$ è:

$$\tau_{(1)} = \frac{D}{Dt}\tau - \left((\nabla u)^t \cdot \tau + \tau \cdot (\nabla u) \right) \quad (1.27)$$

L'apice t indica la trasposizione e D/Dt è la derivata materiale. L'equazione di Rayleigh-Plesset riscritta per l'oscillazione non lineare di una bolla in un mezzo viscoelastico non lineare è la seguente:

$$R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{p_0}{\rho\omega^2R_0^2} \left[\left(1 + \frac{2\sigma}{p_0R_0}\right) \left(\frac{1}{R}\right)^{3K} - \left(1 + \frac{2\sigma}{p_0R_0}\right) \left(\frac{1}{R}\right) - (1 + a\sin(t)) \right] - \frac{2}{Re} \frac{1}{\omega R_0} \sqrt{\frac{p_0}{\rho}} \int_R^\infty \left(\frac{T_{11} - T_{\theta\theta}}{r} \right) dr \quad (1.28)$$

Capitolo 2

Le onde d'urto in ambito biomedico

Le onde d'urto giocano un ruolo importante in diversi campi, come l'acustica, la fisica, l'aerodinamica, le scienze dei materiali e la medicina; tuttavia, le loro proprietà e alcune definizioni possono notevolmente variare da un campo all'altro.

Da un'indagine preliminare della letteratura si osserva come, nella maggior parte dei casi, le onde d'urto sono correlate agli aerei supersonici. Se un oggetto come un aeroplano o un proiettile viaggia ad una velocità supersonica, le onde davanti all'oggetto interferiscono in modo costruttivo, producendo un fronte di shock conico, noto come *bow wave*. Ciò si verifica perché, quando l'oggetto accelera, le onde di pressione che lo precedono si avvicinano, finché non riescono a fuggire dalla fonte (oggetto) e si accumulano di fronte ad esso, causando l'esplosione sonora che viene tipicamente udita al passaggio di un velivolo supersonico. La velocità del suono, divisa per la velocità dell'oggetto, è nota come *numero Mach*. Il numero di Mach delle onde d'urto nei fluidi utilizzati per le applicazioni biomediche è basso (circa pari ad uno). Questo è il motivo per cui, a volte, questo tipo di onde vengono anche chiamate onde d'urto deboli (*weak shock waves*). Le onde di prua generate da velivoli supersonici e le onde d'urto utilizzate nelle applicazioni biomediche presentano alcune somiglianze; tuttavia, il loro meccanismo di generazione è diverso.

I parametri fisici presentati nei prossimi paragrafi possono essere utili per valutare l'output delle sorgenti di onde di pressione; tuttavia, al momento è ancora acceso il dibattito sulla loro correlazione con la litotrissia extracorporea ad onde d'urto (SWL) o con la terapia extracorporea ad onde d'urto (ESWT), il danno tissutale, gli effetti biologici e l'eventuale esito del trattamento.

Prima di confrontare le misure di pressione o i valori di energia ottenuti da queste misurazioni, è importante descrivere la metodologia seguita, poiché i risultati possono variare molto a seconda delle definizioni, dell'idrofono e del mezzo di accoppiamento utilizzato. Lo standard più comune per caratterizzare le sorgenti di onde

d'urto è lo standard internazionale IEC 61846 (Ultrasonics / Lithotripters / Characteristic of Fields per impulsi a pressione, International Electrotechnical Commission, Ginevra, Svizzera, prima edizione 1998). È stato sviluppato da un'organizzazione mondiale per la standardizzazione che comprende numerosi comitati elettrotecnici nazionali. Anche se lo standard è stato sviluppato per i litotrittori extracorporei, cioè i dispositivi utilizzati in SWL, può essere utilizzato anche per i sistemi ESWT, purché non sia disponibile alcun altro standard internazionale.

Il confronto tra le sorgenti di onde d'urto cliniche dovrebbe prendere in considerazione diversi parametri. Fondamentali sono anche il meccanismo fisico della generazione di onde d'urto e lo scopo per il quale sono stati progettati i dispositivi. Alcune sorgenti di onde d'urto sono state sviluppate per provocare microscopicamente risposte interstiziali ed extracellulari che portano alla rigenerazione dei tessuti. Questi sistemi producono energie inferiori rispetto a quelle necessarie per ridurre i calcoli. Importanti definizioni necessarie per caratterizzare un'onda d'urto sono la pressione di picco positiva, la pressione picco negativa, il tempo di salita, la durata dell'impulso, l'energia per impulso, la densità del flusso energetico (EFD) e le zone focali.

2.1 Pressione ed onde d'urto

Dal 1971 l'unità ufficiale con cui viene misurata la pressione è il pascal (Pa). È uguale a un newton (N) per metro quadrato. A causa di ragioni storiche e pratiche, molte altre unità, come l'atmosfera (atm), il bar e la libbra per pollice quadrato (psi), sono ancora popolari. Nelle specifiche delle sorgenti di onde di pressione radiali, chiamate anche sorgenti balistiche, il bar che è equivalente a 105 Pa, viene utilizzato per segnalare la pressione del compressore d'aria. Il MegaPascal (1 MPa = 10⁶ Pa = 10 bar) viene normalmente utilizzato per riportare le ampiezze di pressione nei campi di pressione generati da sorgenti di onde d'urto biomediche. Poiché la pressione a volte viene misurata dalla sua capacità di spostare una colonna di mercurio in un manometro, è anche espressa in millimetri di mercurio (1 mmHg \approx 133.3 Pa); un tipico esempio è la pressione sanguigna.

La pressione istantanea (p) è definita come la differenza tra la pressione e la pressione ambiente in un determinato punto.

La pressione corrispondente al picco positivo ($p +$) è il valore massimo della pressione di compressione in qualsiasi punto di un campo di pressione. Analogamente, la pressione corrispondente al picco negativo ($p -$) è il valore assoluto del massimo della pressione di rarefazione in qualsiasi punto del campo di pressione (Fig. 2.1). È anche comune chiamare $p-$ pressione massima negativa o pressione del picco di rarefazione.

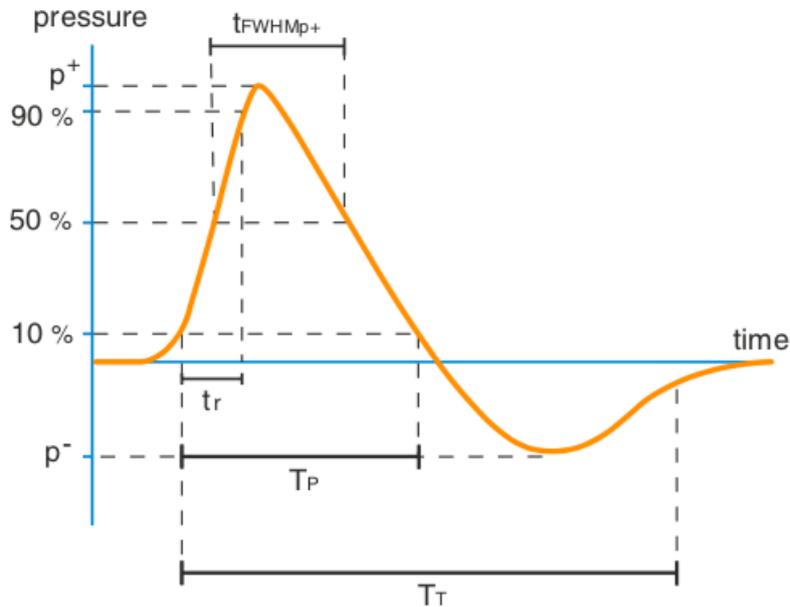


Figura 2.1: Esempio della forma d'onda di un impulso di pressione in cui è stata segnalata la pressione picco-positiva (p^+), la pressione picco-negativa (p^-), il tempo di salita (t_r), la durata dell'impulso di compressione (t_{FWHMp^+}), i limiti di integrazione temporale positiva (T_p) e i limiti di integrazione temporale totale (T_T).

Nelle applicazioni biomediche che si occupano di onde d'urto, la pressione viene generalmente considerata negativa se il suo valore è inferiore alla pressione prima dell'arrivo dell'onda d'urto, cioè la depressione che appare dopo l'impulso di pressione positiva iniziale è considerata negativa. Il valore assoluto di p^- generato dall'apparecchiatura SWL è inferiore a quello di p^+ ; tuttavia, l'impulso di pressione di rarefazione dura generalmente più a lungo dell'impulso positivo (figura 2.2). Se la pressione negativa massima supera le forze di coesione del fluido o le forze di adesione sviluppate nel fluido, compaiono delle bolle. Questo fenomeno è chiamato *cavitazione acustica*. Nelle applicazioni biomediche, la cavitazione comunemente si forma da piccoli nuclei di cavitazione o microbolle.

Quando si riporta un valore di pressione come p^+ , è importante menzionare se si riferisce alla pressione di picco positiva registrata in un punto specifico, cioè, se è il valore di picco di un singolo record di pressione come quello mostrato in Fig. 2.2, o se si riferisce alla massima pressione positiva di picco nell'intero campo di pressione di una sorgente di onde d'urto (figura 2.3). Un ragionamento analogo vale anche per p^- . La durata dell'impulso positivo, la durata dell'impulso di compressione o l'ampiezza dell'impulso positivo (t_{FWHMp^+}) è definita come il tempo dall'istante in cui la pressione supera il 50% di p^+ per la prima volta, all'istante in cui la pressione scende nuovamente a questo valore (Fig. 2.1). Il pedice "FWHM" sta per *full*

width at half maximum (ampiezza a metà massimo). Dovrebbe essere seguito da un piccolo segno più o da un "p +", per distinguerlo da (tFWHMP-), che si riferisce alla durata dell'impulso negativo. La durata dell'impulso negativo è raramente riportata perché, come verrà spiegato nell'ultima sezione di questo capitolo, è difficile ottenere registrazioni affidabili della fase di trazione.

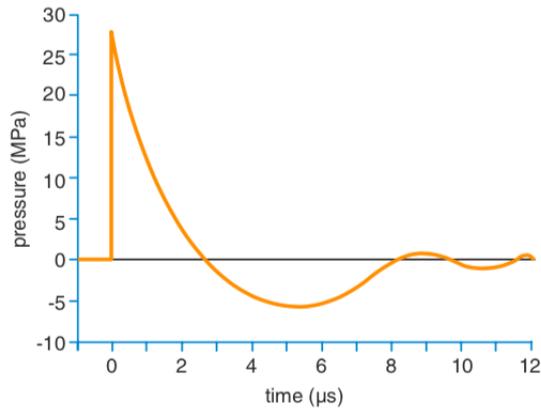


Figura 2.2: Profilo di pressione di una tipica onda d'urto, registrato nel punto focale di un litotritore elettroidraulico di onde d'urto extracorporee.

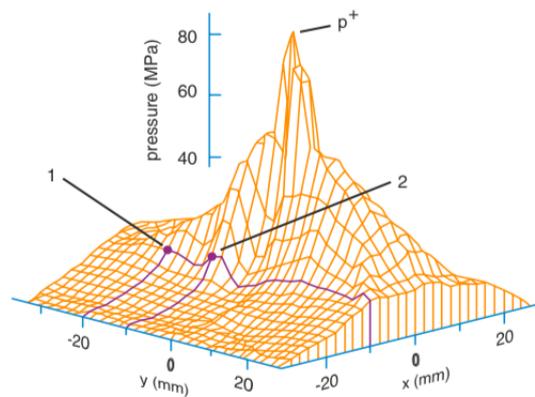


Figura 2.3: Grafico dei valori medi di pressione di picco positivo registrati su un piano xy perpendicolare all'asse del fascio di una sorgente di onde d'urto. Il fuoco geometrico della sorgente d'onda d'urto si trova in (0,0). In questo grafico $p^+ = 80$ MPa rappresenta la pressione massima del picco positivo mediata sull'intero campo di pressione, (1) corrisponde alla pressione media di picco misurata nel punto (-10 mm, -20 mm) e (2) rappresenta la pressione media di picco positiva a (-10 mm, -10 mm). Secondo la norma IEC 61846, l'EFD viene misurato nel punto in cui p^+ è massimo nel campo sonoro, cioè nella messa a fuoco acustica o nel punto focale. La messa a fuoco geometrica e il punto focale non coincidono necessariamente.

Il *tempo di salita* (t_r) è una misura della pendenza della parte colpita dell'onda ed è definito come il tempo impiegato dalla pressione positiva per salire dal 10% al 90% di $p +$ (Fig. 2.1). I valori di $p +$, $p -$, $t_{FWHM_p +}$ e t_r dipendono da diversi fattori, come il principio di generazione dell'onda d'urto, il meccanismo di messa a fuoco e l'energia iniziale. Tutte le registrazioni sono limitate dagli strumenti di misurazione e dalla procedura utilizzata.

Gli impulsi non lineari ad alta pressione con breve tempo di salita e un ampio spettro di frequenza generato da litotrittori extracorporei (Fig. 2.2) sono generalmente chiamati onde d'urto, sia che si tratti tecnicamente di onde d'urto o meno. In realtà, è solo il brusco salto di pressione positiva che dovrebbe essere chiamato *shock front*. Il picco negativo non è così repentino come il picco positivo. In molte pubblicazioni, le onde di pressione generate da sorgenti balistiche per la terapia con onde di pressione extracorporee sono indicate come onde d'urto, anche se la loro ampiezza di pressione è inferiore e il loro tempo di salita è molto più lungo di quello tipico di un'onda d'urto.

A rigor di termini, **gli impulsi di pressione sono *onde d'urto*, fintanto che le forze che causano la perturbazione dell'onda vengono istantaneamente bilanciate dalle forze che tentano di bloccarla**, cioè finché esiste un equilibrio tra assorbimento di energia ed effetti non lineari. Per un'onda d'urto in acqua il tempo di salita può essere espresso come ([57]):

$$t_r = \frac{5}{\Delta p} nsMPa, \quad (2.1)$$

dove Δp è la variazione di pressione in MPa e t_r è espresso in nanosecondi (ns). All'aumentare del salto di pressione, il tempo di salita si riduce. Secondo questa equazione, il tempo di salita per un'onda d'urto subacquea da 50 MPa è di 0,1 ns. La corrispondente estensione spaziale Δx , cioè la separazione spaziale tra due punti con separazione temporale Δt può essere ottenuta mediante:

$$\Delta x = \Delta t c_0, \quad (2.2)$$

dove c_0 è la velocità del suono in acqua (circa 1500 m/s). Secondo questa equazione, l'estensione spaziale di un tempo di salita di 0.1 ns ($\Delta t = t_r$) sarebbe 0.15μ m. Se, per esempio, l'impulso positivo di una forma d'onda di pressione come quello mostrato in Fig. 2.2 dura $2.6\mu s$, la sua estensione spaziale sarà di 3,9 mm. Nei tessuti molli, le forme d'onda di pressione vengono distorte e la loro estensione spaziale aumenta ([58]).

Il tipico profilo d'onda d'urto emesso dalle sorgenti di onde d'urto per SWL consiste in un impulso di compressione da $0.5 - 3\mu s$ e una pressione positiva tra circa 10 e 150 MPa, seguito da un impulso di rarefazione da $2 - 20\mu s$ fino a -30 MPa (Fig. 2.2). Teoricamente, t_r può variare da meno di un nanosecondo a circa 500 ns. Nei dispositivi ESWT dura molto più a lungo. Rispetto agli ultrasuoni, le

onde d'urto hanno un'ampiezza di pressione molto più alta (figura 2.4). Per questo motivo, deve essere considerata la propagazione non lineare.

L'asse del fascio *beam axis* è una linea immaginaria dal centro dell'apertura dell'onda d'urto al fuoco geometrico *F geometrical focus*. Nella maggior parte degli articoli analizzati, l'asse del raggio viene etichettato come asse z e il piano x-y viene preso come un piano perpendicolare a z, che contiene F al suo centro. Per le sorgenti di onde d'urto elettro-idrauliche dotate di riflettore para-ellissoidale per concentrare l'energia, l'asse del fascio è una linea che attraversa entrambi i fuochi dell'ellisse (Fig. 2.5).

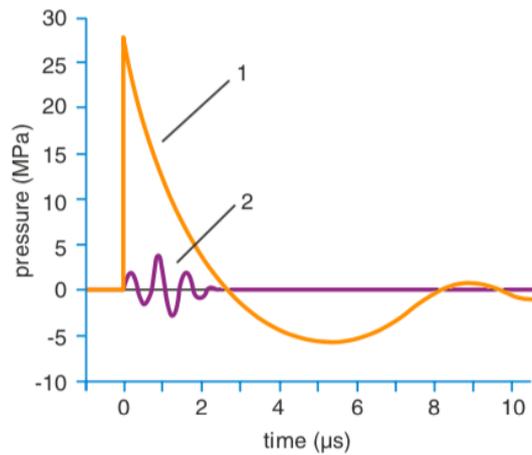


Figura 2.4: (1) Profilo di pressione di un'onda d'urto utilizzata in litotripsia e (2) forma d'onda di pressione di un tipico dispositivo ad ultrasuoni diagnostico.

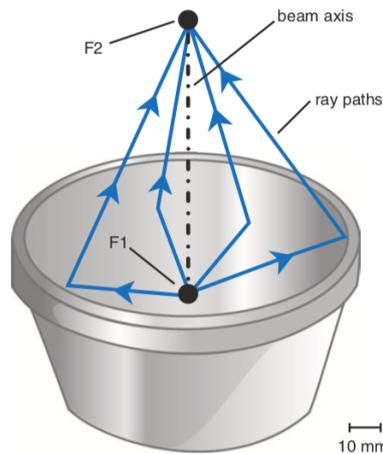


Figura 2.5: Schema di un riflettore ellissoidale usato nelle sorgenti cliniche di onde d'urto. Le onde d'urto generate da scariche ad alta tensione o microesplosivi in F1 sono riflesse e focalizzate verso F2.

Contrariamente agli ultrasuoni che sono un'onda acustica a singola frequenza, lo spettro di frequenza di un impulso ad onde d'urto focalizzato è relativamente ampio, compreso tra circa 15 kHz e 100 MHz; però; la maggior parte dell'energia si trova tra circa 100 kHz e 1 MHz.

Per alcune applicazioni cliniche, diverse dalla SWL, i termini onde d'urto radiali, terapia ad onde d'urto radiali (RSWT) e terapia d'onda d'urto extracorporea radiale (rESWT) sono comuni, anche se sono confusi e fisicamente non corretti.

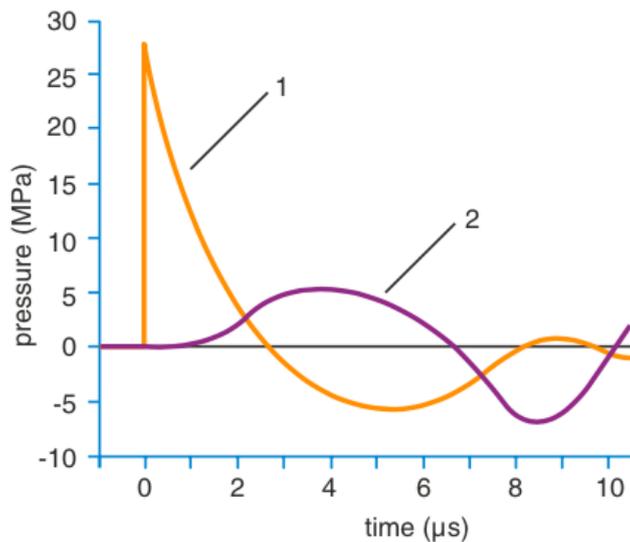


Figura 2.6: (1) Profilo di pressione di un'onda d'urto usata per litotripsia extracorporea , (2) forma d'onda di pressione emessa da dispositivi a pressione radiale (sorgenti balistiche) usati per le terapie ad onde d'urto extracorporee.

Sarebbe più appropriato parlare di *terapia con onda di pressione extracorporea* o *terapia con onde acustiche extracorporee*.

Per evitare confusioni, alcune aziende e diversi autori usano il termine *terapia di attivazione dell'impulso extra-corporeo (EPAT)*. Normalmente, le onde di pressione radiali vengono generate accelerando un piccolo proiettile all'interno di un tubo-guida chiuso. Il proiettile colpisce un applicatore metallico, trasformando la sua energia cinetica in un'onda di pressione, che si espande radialmente nel tessuto bersaglio. Come già accennato, una caratteristica delle onde di pressione radiali è che il loro tempo di salita è molto più lungo rispetto a quello delle onde d'urto focalizzate (Fig. 2.6). Per alcune indicazioni, un vantaggio delle onde di pressione radiali è che coprono un'ampia area in modo che la localizzazione assistita da ultrasuoni dei singoli punti di innesco non sia necessaria e durante il dialogo medico-paziente può essere usato il cosiddetto metodo di bio-feedback([59] [60]).

Poiché le onde d'urto e le onde di pressione radiali non sono le stesse, le loro modalità d'azione e gli effetti sui tessuti viventi dovrebbero essere diversi. Diversi studiosi hanno registrato il campo di pressione prodotto da un dispositivo ad onde di pressione radiale *DolorClast Vet* (Electro Medical Systems SA, Nyon, Svizzera) con un idrofono di fluoruro di polivinilidene (PVDF). Gli impulsi di pressione sono stati trasmessi in un serbatoio d'acqua attraverso una membrana. Sia per l'applicatore non focalizzato che per quello focalizzato, la forma d'onda della pressione era simile, e consiste in un impulso positivo di $4\mu s$ con una pressione massima di 8 MPa, seguita da una depressione e diversi picchi. Il volume focale di -6 dB di questo dispositivo non ha la tipica forma di sigaro, come nelle sorgenti di onde d'urto. Consisteva in un volume che si estendeva approssimativamente 40 mm dall'applicatore quando si utilizza l'applicatore non focalizzato e circa 20 mm con l'applicatore focalizzato. Misurando i tempi di salita degli impulsi di pressione, si può concludere che questi sono troppo lunghi per essere onde d'urto, cioè le fonti balistiche non producono onde d'urto focalizzate, anche se sono dotate di un applicatore focalizzato.

I modelli numerici che simulano la propagazione e la focalizzazione delle onde d'urto sono stati preziosi per spiegare i meccanismi d'azione delle onde d'urto e per progettare sorgenti d'onda d'urto più efficienti. A tale scopo, l'impulso del litotritore è stato spesso modellizzato dalla seguente equazione ([61], [62]):

$$p = p_0 + 2p_s e^{-\alpha t} \cos\left(\omega t + \frac{\pi}{3}\right) \quad (2.3)$$

dove p_0 è la pressione atmosferica o ambientale. Per il litotritore *Dornier HM3*, sono stati determinati i seguenti valori: $\alpha = 1.48 \times 10^8 s^{-1}$, $\omega = 1.21 \times 10^8 rad/s$ e $p_s = 35 MPa$.

2.2 Potenza e intensità

La potenza di un'onda acustica è definita come l'energia trasportata dall'onda per unità di tempo. Le sue unità sono joule al secondo (J / s), chiamate anche Watt (W). L'intensità istantanea (I) di un'onda è definita come l'energia acustica trasmessa per unità di tempo e per unità di un'area perpendicolare alla sua direzione di propagazione. In altre parole, I è la potenza per unità di superficie o la velocità con cui l'energia trasportata dall'onda passa attraverso un'area specifica perpendicolare alla sua direzione di propagazione. È proporzionale al quadrato dell'ampiezza della pressione e le sue unità sono Watt per metro quadrato (W/m^2). Supponendo che il mezzo sia isotropico (uguale in tutte le direzioni) e che la sorgente si irradia uniformemente, per le onde sferiche l'intensità varia inversamente con il quadrato della sua distanza dalla sorgente. Se la distanza dalla sorgente è raddoppiata, l'ampiezza dell'onda diminuisce della metà e l'intensità sarà solo di un quarto del suo

valore iniziale. Per misurare l'intensità del suono, le scale logaritmiche sono di grande utilità. È comune confrontare l'intensità I di un'onda sonora con un'intensità di riferimento I_0 e definire il livello di intensità come:

$$\beta = 10 \log \left(\frac{I}{I_0} \right) \text{dB} \quad (2.4)$$

Per alcune applicazioni in acustica il valore di I_0 viene fatto coincidere con la soglia dell'udito (10 – 12) W / m². Anche se β è adimensionale, è qui misurato e valutato in decibel (dB). In realtà, l'intensità della soglia di (10 – 12) W / m², corrispondente a 0 dB è valida solo per una frequenza di riferimento di 1 kHz in aria. Normalmente il decibel non viene utilizzato per descrivere i campi di pressione delle onde d'urto sott'acqua. Per un'onda piana, l'intensità istantanea (I) può essere espressa come la pressione istantanea quadrata (p) divisa per l'impedenza acustica caratteristica del mezzo (Z):

$$I = \frac{p^2}{Z} \quad (2.5)$$

Z può essere inteso come la resistenza alla conduttività acustica e può essere calcolato come il prodotto della densità (ρ_0) e della velocità del suono (c_0). Per l'acqua l'impedenza acustica è di circa 1.5×10^{-6} kg m⁻² s⁻¹.

2.3 Zona focale e profondità di penetrazione

Ci sono diverse definizioni relative alla *zona focale* di una sorgente di onde d'urto.

Indipendentemente dal fatto di riportare le misurazioni della pressione, progettare protocolli sperimentali o clinici o descrivere le prestazioni delle apparecchiature cliniche, è fondamentale utilizzare la terminologia corretta. Teoricamente, un litotritore extracorporeo ideale concentrerebbe tutta la sua energia su un volume avente la forma esatta del beraglio o, almeno, con la forma di una sfera con un diametro uguale alla dimensione più grande del beraglio (Fig. 2.7). Questo è impossibile, dal momento che richiederebbe l'accesso al beraglio da tutti i lati.

Nell'acustica geometrica, le onde sonore sono trattate in modo simile ai raggi di luce nell'ottica; tuttavia, questa teoria semplificata è valida solo in determinate circostanze.

Per definizione, il *fuoco geometrico* è il punto in cui convergono i raggi immaginari provenienti dalla sorgente d'onda d'urto o dall'elemento di messa a fuoco (lente o riflettore). Secondo l'acustica geometrica, in un litotritore elettro-idraulico extracorporeo, F_2 è il punto in cui tutti i raggi generati in F_1 e riflessi dal riflettore ellissoidale si fondono (Fig. 2.8). A causa della popolarità del *litotritore elettro-idraulico Dornier HM3*, la focalizzazione geometrica dei generatori di onde d'urto elettromagnetiche e piezoelettriche è stata talvolta indicata come F_2 . Questo non

ha senso, perché una seconda messa a fuoco esiste solo quando si usano riflettori para-ellissoidali per focalizzare le onde d'urto. La posizione della messa a fuoco geometrica può essere calcolata usando le leggi dell'acustica geometrica; tuttavia, in uno scenario reale, le onde d'urto non sono focalizzate su un punto ([63]).

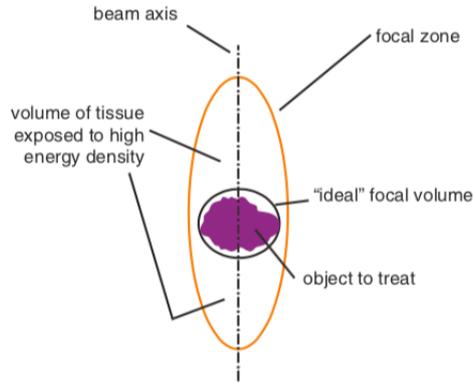


Figura 2.7: Semplice schema che mostra come alcuni tessuti che circondano l'oggetto da trattare si troveranno sempre in una regione con densità di energia relativamente alta.

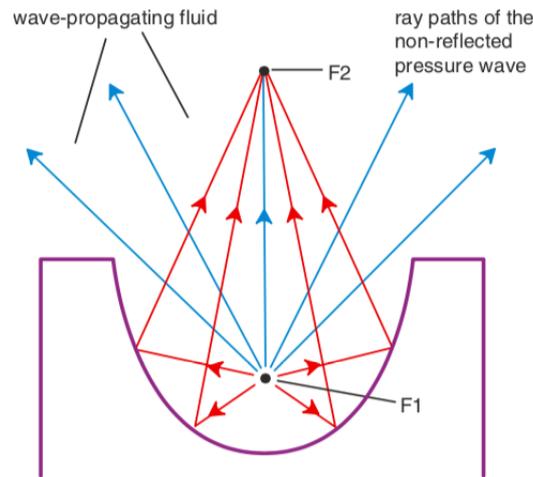


Figura 2.8: Raggi che indicano la direzione delle onde d'urto focalizzate e non focalizzate in un generatore di onde d'urto elettroidraulico.

Il punto in cui viene registrato $p +$ all'interno dell'intero campo di pressione di una sorgente di onde d'urto viene definito *punto focale*, *fuoco dinamico* o *messa a fuoco acustica* (picco della distribuzione di pressione mostrata in Fig. 2.3). A causa dello spostamento non lineare, questo punto normalmente non coincide con il fuoco geometrico.

Inoltre, la posizione del punto focale varia a seconda dell'impostazione di energia del generatore di onde d'urto. Il punto in cui è registrato p^- all'interno dell'intero campo di pressione può anche essere utile per descrivere una sorgente di onde d'urto. La distanza tra F^+ , cioè la messa a fuoco acustica riferita a p^+ e F^- , la messa a fuoco riferita a p^- , non è costante e dipende da diversi fattori, come l'energia dell'onda d'urto e il dispositivo di messa a fuoco. Se non specificato, il punto focale è correlato alla pressione positiva di picco. È pratica comune definire la profondità di penetrazione di una sorgente di onde d'urto come la distanza dalla superficie di accoppiamento al fuoco acustico.

Per le applicazioni biomediche, le definizioni più popolari di *volume focale* sono ([64]; [65]; [66]): (a) la zona focale di -6 dB, definita come il volume entro il quale la pressione positiva è almeno il 50% del suo valore di picco p^+ (figura 2.9), (b) la zona focale di 5 MPa, definita come il volume entro il quale la pressione supera 5 MPa e (c) la zona focale di 10 MPa, definita come volume entro il quale la pressione supera i 10 MPa.

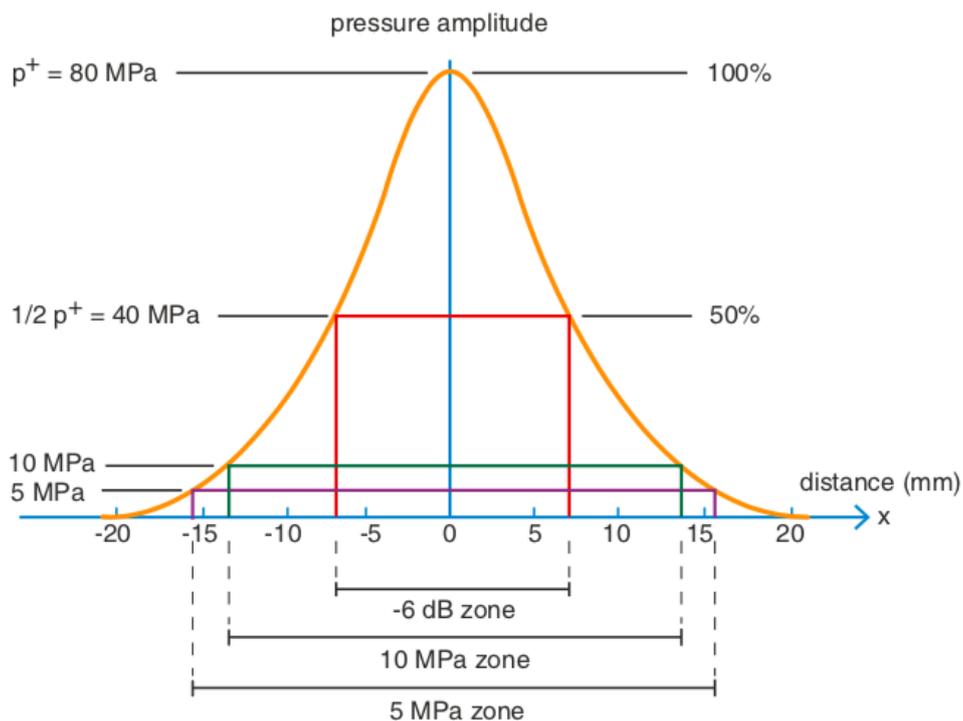


Figura 2.9: Grafico della pressione in funzione della distanza lungo un asse perpendicolare all'asse del fascio di una sorgente di onde d'urto, viene sottolineata la differenza di dimensioni tra le zone focali a -6 dB, 10 MPa e 5 MPa. La pressione positiva di picco p^+ di 80 MPa è stata scelta arbitrariamente come esempio.

Le zone focali da -6 dB, 5 MPa e 10 MPa generate da litotrittori extracorporei hanno una forma simile a quella di un sigaro con la sua dimensione più lunga lungo l'asse del fascio. Si raccomanda che tutti i produttori di litotrittori extracorporei forniscano almeno le dimensioni delle zone focali -6 dB e 5 MPa delle loro sorgenti d'onda d'urto per le impostazioni di energia minima, intermedia e massima. Come accennato, la zona focale di -6 dB, nota anche come *zona focale a mezzo massimo* o *volume focale a mezzo massimo*, è il volume delimitato dal contorno di metà della pressione di picco.

La regione è chiamata zona focale di -6 dB, poiché l'isobara corrisponde alla pressione di 6 dB in meno rispetto al massimo. È importante tenere presente che la zona focale di -6 dB fornisce informazioni su come le onde d'urto sono focalizzate; tuttavia, non è una misura dell'energia nel volume focale.

Per SWL considerando la zona focale di -6 dB come la regione in cui la comminazione del calcolo è massima potrebbe essere fuorviante. Come mostrato in Fig. 2.9, anche i valori di pressione sufficientemente elevata per i calcoli possono essere registrati al di fuori della zona focale di -6 dB. In questa figura, sono stati scelti esclusivamente come esempio 80 MPa come pressione positiva di picco. La dimensione del volume focale di -6 dB dipende dal design della sorgente di onde d'urto. In generale, la definizione di -6 dB si riferisce alla pressione di picco positivo; tuttavia, può anche essere definito in relazione a p-.

Anche se la zona -6 dB è stata ampiamente utilizzata dai produttori, per le applicazioni cliniche sono necessarie ulteriori informazioni per caratterizzare il campo di pressione emesso da una sorgente di onde d'urto. Un parametro fondamentale è la zona 5 MPa, chiamata anche *zona di trattamento*. Si suppone che sia correlato all'efficacia terapeutica delle onde d'urto ed è stata definita assumendo che il limite del valore di pressione positiva al di sopra del quale le onde d'urto generano "effetti clinici" sia pari a 5 MPa. Tuttavia, il valore di 5 MPa non è supportato da prove scientifiche e va considerato che per applicazioni biomediche diverse dalla litotripsia, le energie inferiori vengono utilizzate con successo ([67]). La *German Society di SWL* ha inoltre definito la *10 MPa- fragmentation zone*, che è contenuta all'interno della *5 MPa- Therapy zone* (Fig. 2.9).

L'energia all'interno della zona da 10 MPa dovrebbe essere sufficiente per sminuzzare i calcoli urinari ([64], [65], [66]). Quando l'energia del generatore di onde d'urto viene alzata, entrambe le zone da 5 MPa e 10 MPa aumentano le loro dimensioni; tuttavia, la zona focale di -6 dB rimane essenzialmente la stessa. Analogamente al volume focale di -6 dB, l'area nel piano x-y entro cui la pressione positiva è almeno il 50 di p+ è chiamata -6 dB di area focale o -6 dB di area della sezione focale. Alcuni autori usano anche un'area di 12 mm di diametro per calcolare l'energia erogata ad un calcolo "standard". La definizione di *focus da 12 mm* (F_{12mm}) si basa sull'energia fornita ad un calcolo sferica con un diametro di 12 mm ([68]). Sono stati anche proposti altri parametri come il *diametro di disintegrazione* ([69]). La sua

dimensione è determinata dal volume che è delimitato da un aumento, di un fattore due, del numero di onde d'urto necessarie per polverizzare un calcolo "standard", rispetto alla quantità di onde d'urto necessarie per disintegrare lo stesso calcolo in l'attenzione.

2.4 Energia e impulso

L'energia è definita come la capacità di fare lavoro.

Energia e lavoro non devono essere confusi con la potenza, che fornisce informazioni sulla velocità con cui il lavoro viene svolto e può anche essere definito come flusso di energia, cioè il rate di variazione dell'energia.

La maggior parte delle sorgenti di onde d'urto immagazzina energia elettrica in un condensatore e la consegna 'bruscamente' ad un cosiddetto trasduttore elettroacustico (ad esempio elettroidraulico, elettromagnetico o piezoelettrico). L'energia elettrica immagazzinata nei condensatori è proporzionale all'energia delle onde d'urto generate; tuttavia, il secondo valore è sempre significativamente più piccolo. La loro relazione dipende dal tipo e dal design del trasduttore. Un parametro importante per caratterizzare una sorgente di onde d'urto è la densità del flusso di energia (EFD), talvolta chiamata anche flusso di energia, densità di energia o integrale di intensità dell'impulso (PII) ([70], [57]). È espresso in mJ/mm^2 e ottenuto dividendo l'energia acustica per l'area, cioè, è definita come l'energia trasmessa per unità di area per impulso.

Questa misura della concentrazione di energia è utile perché gli effetti terapeutici delle onde d'urto dipendono, in una certa misura, dal fatto che l'energia sia distribuita su una vasta area o focalizzata su una piccola zona di trattamento.

Per ottenere l'EFD, sono necessari profili di pressione registrati in vari punti. Poiché i campi di pressione utilizzati in SWL e generati da molti dispositivi ESWT hanno una simmetria circolare, l'uso di coordinate polari è generalmente comodo. L'EFD in un punto specifico (r, θ) sul piano x-y è l'integrale nel tempo dell'intensità istantanea, dove p è la pressione acustica istantanea:

$$EFD^+(EFD) = \frac{1}{Z} \int p^2(r, \theta, t) dt \quad (2.6)$$

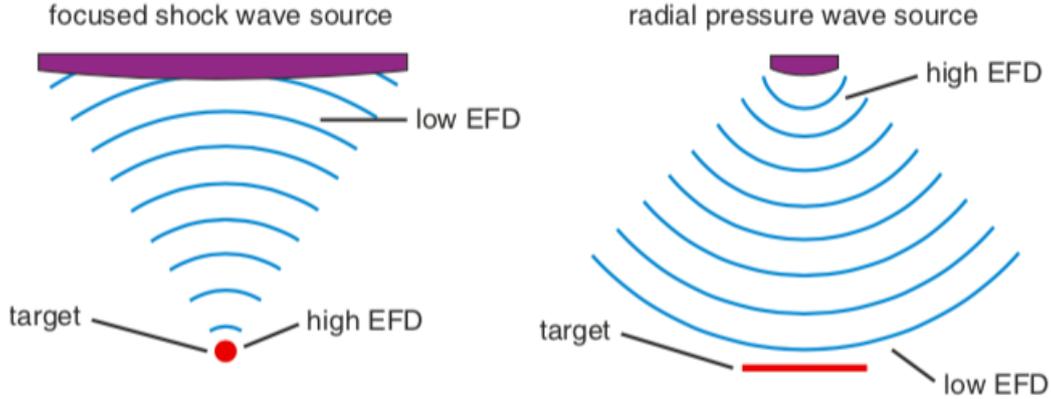


Figura 2.10: Schema che illustra le differenze tra il campo di pressione generato da una sorgente d'onda d'urto focalizzata e una sorgente d'onda di pressione radiale.

I limiti temporali per eseguire l'integrazione possono essere T_P per ottenere EFD^+ o T_T per ottenere EFD (Fig. 2.10). Man mano che la distanza dall'elemento di messa a fuoco (riflettore o lente) aumenta, l'area della sezione trasversale del fascio di onde d'urto si riduce e la densità di energia aumenta.

Contrariamente a ciò, le onde di pressione radiali utilizzate nell'ESWT vengono trasmesse radialmente dall'applicatore al tessuto bersaglio. In questo caso, la densità di energia diminuisce all'aumentare della profondità di penetrazione, poiché l'energia non è focalizzata sulla zona target del trattamento (Fig. 2.10). L'energia per impulso è comunemente approssimata dall'integrazione sull'area focale di -6 dB:

$$E = \frac{1}{Z} \iint p^2(r, \theta, t) dt dS \quad (2.7)$$

dove S è l'area focale nel piano x - y contenente F . È importante ricordare che l'EFD di due sorgenti di onde d'urto che emettono la stessa energia totale E può essere diversa, poiché la densità di energia dipende da come viene messa a fuoco l'onda di pressione. La relazione tra l'energia elettrica applicata al trasduttore elettroacustico e i valori di energia, come EFD ed E , dipende da fenomeni non lineari e dal meccanismo di messa a fuoco della sorgente d'onda d'urto. Raddoppiare l'energia elettrica non determinerà il doppio di EFD.

A parità di pressione massima, le onde d'urto ad alta energia consentono una migliore frammentazione rispetto alle onde d'urto a bassa energia ([71]). Poiché l'energia dell'onda d'urto è un parametro cruciale per la distruzione del calcolo e l'EFD è correlata ai danni del tessuto renale, alcuni produttori hanno concentrato i loro sforzi per allargare il volume focale al fine di ottenere un'elevata energia delle onde d'urto senza aumentare l'EFD. Tipici valori di EFD e di energia totale degli impulsi per SWL sono stati riportati tra circa 0,2 e 2,0 mJ/mm^2 e tra circa 10 e

100 mJ, rispettivamente ([72]; [73]); tuttavia, alcuni litotritori, come il Modulith SLX-F2, possono avere campi EFD e impulsi di energia totali ancora più grandi.

Per l'ESWT, la densità del flusso di energia varia tra circa 0,004 e 0,6 mJ/mm²; tuttavia, ciò che emerge dalla letteratura è che non esiste un consenso globale sui valori di soglia. La classificazione dell'EFD è risultata incoerente tra diversi autori. Chow ([74]) ha definito la densità di flusso di bassa, media ed elevata energia come: inferiore a 0,1 mJ/mm², tra 0,1 e 0,2 mJ/mm² e superiore a 0,2 mJ/mm². Altri studiosi ancora [75] hanno classificato le densità di flusso a bassa, media ed alta energia come meno di 0,08 mJ/mm², tra 0,08 e 0,28 mJ/mm² e tra 0,28 e 0,60 mJ/mm², rispettivamente. Speed ([76]) ha riportato densità di flusso a bassa energia inferiori o uguali a 0,12 mJ/mm² e densità di flusso ad alta energia superiore a 0,12 mJ/mm². Per Cacchio ([77]) le densità di flusso a bassa energia sono inferiori a 0,10 mJ/mm² e le densità elevate sono comprese tra 0,20 e 0,40 mJ/mm².

Molti articoli sulla soppressione della crescita tumorale riportano l'uso di onde d'urto "ad alta energia" (HESW) ([78], [79], [80], [81], [82], [83],[84], [85]).

Tuttavia, il termine HESW potrebbe essere fonte di confusione, poiché in questi studi sono state utilizzate energie non superiori alle energie del litotritore standard. Come già menzionato, nell'ESWT è importante distinguere tra onde d'urto e onde di pressione radiali, che hanno una pressione di picco più bassa e un tempo di salita molto più lungo rispetto alle onde d'urto extracorporee (Fig. 2.11). Inoltre, la distinzione generale tra le onde di pressione radiali come "bassa energia" e le onde d'urto come fenomeni "ad alta energia" è inopportuna ([86]).

Un buon indicatore per valutare la capacità di disintegrazione dei calcoli urinari è *effective energy*, indicata con $E_{12\text{mm}}$ o E_{eff} ([71]). È definita come l'energia (in mJ) trasmessa da ogni singola onda d'urto attraverso un'area di 12 mm di diametro all'interno del piano focale.

Come già accennato, il diametro di 12 mm è considerato il diametro della sezione trasversale di un tipico calcolo trattata con SWL.

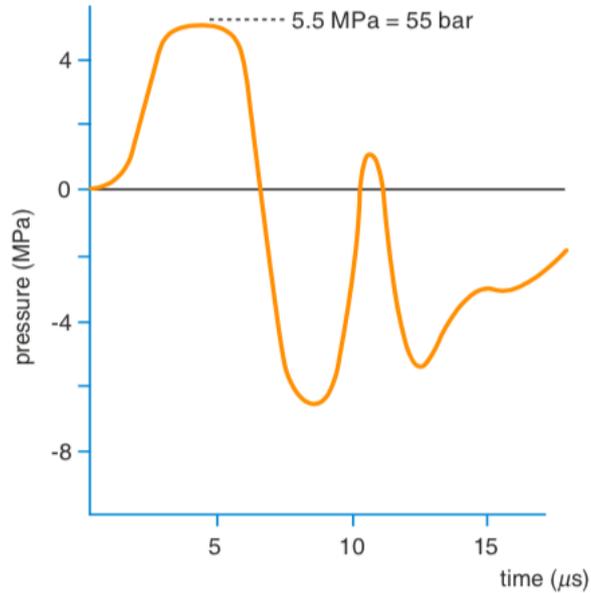


Figura 2.11: Profilo di pressione generato da una sorgente ESWT balistica.

L'energia effettiva si ottiene integrando l'EFD su un'area di 12 mm, cioè l'integrale temporale dell'impulso di pressione, seguito da un integrale di area. Poiché il campo di pressione emesso dai litotritori è simmetrico attorno all'asse del fascio, è sufficiente misurare la pressione lungo un asse nel piano focale per calcolare l'energia.

La dose di energia (*Edose*) è definita come l'*efficient energy* E_{12mm} , moltiplicata per n , il numero di onde d'urto applicate.

Come accennato in precedenza, sono necessarie forme d'onda registrate in vari punti del campo di pressione per calcolare l'EFD. Nel caso di sorgenti balistiche, sono necessari idrofoni in grado di registrare non solo alte ma anche basse frequenze (<5 kHz) per registrare fedelmente le onde di pressione radiali che viaggiano attraverso i tessuti. Le oscillazioni ad alta frequenza a bassa intensità sono generate dall'impatto del proiettile all'interno del trasmettitore e si sovrappongono all'onda di pressione a frequenza più bassa. Tuttavia, l'influenza delle oscillazioni ad alta frequenza è bassa, perché la loro profondità di penetrazione è piccola([67]). L'impulso (J) sulla superficie della pelle, cioè l'integrale della forza rispetto al tempo, dato in Newton secondi (Ns), è stato proposto come parametro per confrontare diverse sorgenti balistiche ([67]):

$$J = \int F(t)dt \quad (2.8)$$

dove $F(t)$ è la forza in funzione del tempo t .

Come accade con l'EFD, la relazione esatta tra J e gli effetti biologici sul tessuto non è nota. J può essere usato per confrontare le sorgenti di onde di pressione radiali, ma non dovrebbe essere interpretato come una misura di "efficacia" biologica.

2.5 Registrazione della cavitazione acustica e campi di onde d'urto

Il confronto e la valutazione delle sorgenti di onde d'urto sono diventati particolarmente importanti durante gli anni '80 con il moltiplicarsi di produttori e modelli di litotritore. La performance dei litotritori extracorporei di onde d'urto è stata valutata utilizzando diversi metodi, come la registrazione del campo di pressione nelle vicinanze del punto focale ([87]; [88]; [89]), l'esecuzione della frammentazione di un calcolo in vitro ([90]; [91]), catturando le emissioni acustiche prodotte dalle bolle collassanti, esponendo sottili lamine metalliche alle onde d'urto, utilizzando la dispersione laser e le misurazioni di trasmittanza in fibra ottica per fornire la storia temporale della dinamica delle bolle ([92]; [93]; [94]), e registrazioni di fotografie ad alta velocità ([95]). Questa sezione descrive solo i principi fisici di base di alcuni sistemi per registrare le forme d'onda d'urto e gli episodi di cavitazione. A causa delle alte frequenze coinvolte e dei cambiamenti di pressione estremamente rapidi, la registrazione delle onde d'urto utilizzate nelle applicazioni biomediche risulta decisamente impegnativa.

Sono necessari sensori che rispondono linearmente su un ampio intervallo di frequenze, con tempi di salita dell'ordine dei nanosecondi. I riflessi sonori sulla superficie solida dell'idrofono possono produrre interferenze e piccoli errori di allineamento che possono influire sui risultati. Inoltre, la registrazione fedele della forma d'onda completa di un'onda d'urto utilizzata nelle applicazioni cliniche è problematica, in quanto l'adesione tra l'idrofono e il fluido (acqua) deve essere sufficientemente forte da sopportare l'impulso di trazione dell'onda d'urto.

Inoltre, i sensori devono resistere alla vaiolatura a causa dell'impatto dei microgetti indotti dalle onde d'urto. Per valutare le sorgenti di onde d'urto si consiglia di utilizzare un intervallo di campionamento inferiore a 1 mm o un quinto della larghezza minima dell'isobara di -6 dB nel piano x-y. Se il valore di p da un punto di campionamento ad un altro non differisce di oltre il 10%, gli intervalli di campionamento possono essere estesi. Lo standard IEC 61846 definisce i parametri che dovrebbero caratterizzare i campi acustici e le forme d'onda di pressione generate da sorgenti di onde d'urto cliniche. Come accennato in precedenza, anche se questo standard è stato concepito per litotritori extracorporei ad onde d'urto, può anche essere utilizzato, in una certa misura, per valutare i dispositivi ESWT. Lo standard stabilisce che gli idrofoni per le misure di onde d'urto biomediche dovrebbero avere una risposta di frequenza complessiva piatta entro ± 3 dB tra 0,5 e 15 MHz. Un

ulteriore requisito è che l'elemento attivo deve avere un diametro uguale o inferiore a 1 mm. Ci sono relativamente pochi idrofoni disponibili in commercio progettati per valutare i campi di pressione prodotti da sorgenti di onde d'urto per SWL e ESWT.

La registrazione delle forme d'onda di pressione nella zona focale è fondamentale per ottenere informazioni sull'EFD, così come altri parametri importanti, come ad esempio t_{FWHM_p+} , t_r , $p+$ e $p-$. Alcuni produttori riportano misurazioni di pressione interne senza descrivere la loro metodologia. Tali misurazioni sono di scarso valore per confrontare le prestazioni dei dispositivi clinici, a meno che tutte le misurazioni siano state effettuate con lo stesso idrofono e seguendo lo stesso protocollo.

Gli idrofoni capacitivi *Capacitance hydrophones* sono stati utilizzati agli esordi della SWL [96]; tali dispositivi hanno dimostrato di essere resistenti e hanno permesso una calibrazione diretta basata su misurazioni elettriche; tuttavia, la fase negativa finale dell'onda d'urto non è stata riprodotta fedelmente. Alcuni anni dopo, Etienne ([97]) riportò i risultati delle misurazioni della pressione con un idrofono elettromagnetico semplice ed economico. Il dispositivo faceva affidamento sulla forza elettromotrice indotta in un conduttore elettrico che vibrava sotto l'azione di ciascuna onda d'urto all'interno di un campo magnetico ([98]) ed era calibrata misurando il campo magnetico di un magnete permanente e la tensione indotta nel conduttore. La larghezza di banda di questo idrofono era limitata a 17 MHz.

Anche i sensori di pressione piezoelettrici commerciali come il 603B1 (Kistler Instruments Corporation, Svizzera) sono stati utili; il loro tempo di risalita ,però, di un microsecondo era troppo lungo e l'elemento sensibile di circa 5,5 mm troppo grande per registrare fedelmente i campi di pressione dei litotrittori extracorporei. Tuttavia, poiché questi idrofoni sono facili da maneggiare, hanno una lunga durata, forniscono misurazioni riproducibili e sono molto resistenti, sono stati utilizzati per eseguire misurazioni preliminari.

Un sensore popolare, appositamente progettato per registrare le onde d'urto del litotritore è l'idrofono del polivinilidene difluoruro (PVDF) (Imotec GmbH, D-5102 Würselen, Germania) sviluppato nel 1985 ([99], [100], [101], [102], [89]). Il suo principio di funzionamento si basa sulle proprietà piezoelettriche del PVDF polarizzato. Le molecole di questo polimero possono essere orientate in modo tale che quando sollecitate tra una coppia di elettrodi, viene prodotta una carica elettrica netta sugli elettrodi stessi. L'idrofono è costituito da un ago in acciaio ricoperto con PVDF e un rivestimento argentato all'estremità, incollato con resina epossidica in un supporto cilindrico metallico (Fig. 2.12).

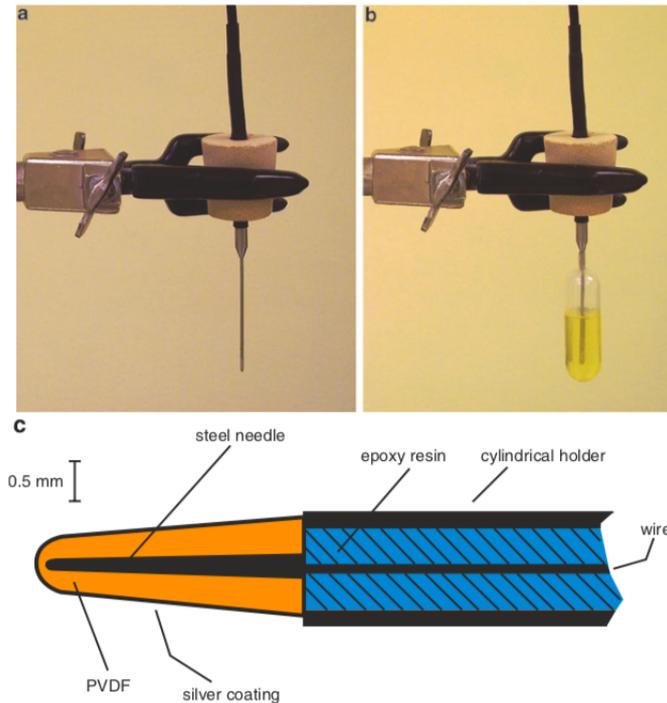


Figura 2.12: Fotografia di un idrofono di polivinilidene difluoruro (PVDF), prodotto da Imotec GmbH a Würselen.

Il diametro della punta è di circa 0,5 mm e il sensore ha un tempo di salita di circa 20 ns. Uno svantaggio è che l'adesione acqua-metallo sulla punta dello strumento non resiste alla fase di trazione di un'onda d'urto. Di conseguenza, la durata e l'ampiezza dell'impulso negativo sono sottostimate. Questo è da considerare quando si calcolano i valori energetici dai record di pressione ottenuti con gli idrofoni. Inoltre, i micro-getti fluidi ad alta velocità prodotti dalla cavitazione acustica possono danneggiare la punta del sensore. Va inoltre considerato che il ronzio causato dal picco di pressione positiva potrebbe non essere completamente scomparso prima dell'arrivo dell'impulso di tensione. Nonostante questo, gli idrofoni ad aghi sono facili da usare e forniscono risultati riproducibili. Per anni si sono studiati campi di pressione in vitro e in vivo generati da litotritori extracorporei.

Oggi sul mercato sono disponibili altri modelli di idrofoni PVDF con una varietà di diametri, sensibilità e larghezze di banda sensibili (Fig. 2.13). Perfetti per la registrazione delle onde d'urto del litotritore sono gli idrofoni a membrana PVDF ([103], [104], [105]). Questi sensori ad ampia larghezza di banda utilizzano lo stesso principio fisico degli idrofoni ad ago per convertire le variazioni di pressione in segnali elettrici. Un vantaggio rispetto agli idrofoni ad ago è che non producono artefatti dovuti ai riflessi delle onde sulla punta della sonda; tuttavia, poiché il PVDF è idrofobo, l'adesione tra il foglio e l'acqua è relativamente debole. Per questo motivo,

la fase di trazione dell'onda d'urto produce cavitazione sulla superficie di contatto, generando erosione e limitando la sua capacità di riprodurre fedelmente l'impulso negativo. La maggior parte dei gruppi di ricerca utilizza gli idrofoni a membrana solo per scopi di calibrazione, poiché riproducono forme d'onda del litotritore meglio degli idrofoni ad ago, ma sono più costosi e non possono essere ristrutturati con la stessa facilità degli idrofoni ad ago o degli idrofoni a fibra ottica descritti di seguito.

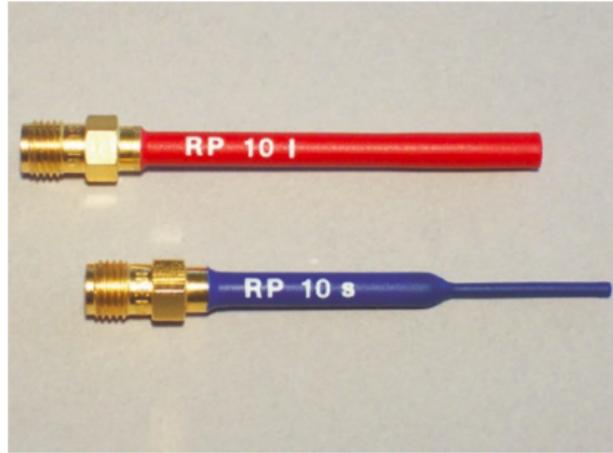


Figura 2.13: : Fotografia di due idrofoni di polivinilidene difluoruro (PVDF). L'idrofono rosso (modello RP 10 l) ha un diametro sensibile di 3 mm e una sensibilità di 15 mV / bar. L'idrofono blu (modello RP 10 s) ha un diametro sensibile di 1 mm e una sensibilità di 2 mV / bar. Entrambi i modelli hanno una larghezza di banda che va da 1 kHz a 3 MHz (RP Acoustics e.K., Leutenbach, Germania).

Granz ([106]) sviluppò un idrofono di PVDF affidabile separando l'area sensibile non metallizzata e gli elettrodi metallici, cioè, non c'era nessun contatto metallico sul PVDF vicino alla regione sensibile. L'onda d'urto generava cariche alternate in una regione in cui la pellicola PVDF era polarizzata e piezoelettrica. Il segnale era accoppiato con un mezzo dielettrico, come l'acqua deionizzata, agli elettrodi metallici situati all'esterno dell'area sensibile. Il dispositivo è stato testato su un'ampia larghezza di banda senza alcuna diminuzione significativa della sensibilità. La sensibilità della pellicola PVDF era sufficientemente elevata da consentire aree di misurazione di un diametro di 1 mm.

Nel 2006 un gruppo di ricerca dell'Università di Washington a Seattle ha riportato risultati con un nuovo idrofono a membrana PVDF ([105]). Il dispositivo ha resistito alla misurazione fino a 1000 onde d'urto del litotritore e aveva un basso rapporto segnale / rumore. [106] [107]) hanno riportato misurazioni simultanee del campo acustico delle singole onde d'urto del litotritore utilizzando un idrofono lineare costituito da 20 elementi PVDF, ciascuno lungo 4 mm e largo 0,5 mm. Utilizzando questo idrofono non è stato necessario calcolare la media delle misurazioni effettuate

in singole posizioni su diverse onde d'urto al fine di valutare le caratteristiche della zona focale. Secondo gli autori, un rivestimento protettivo o immersione in olio ha migliorato la coerenza del loro dispositivo.

Al giorno d'oggi la maggior parte delle misurazioni della pressione viene effettuata con idrofoni a fibra ottica ([58], [108], [109], [110], [111], [112], [113], [114]). In questo sistema, la punta di una fibra di vetro che guida la luce viene immersa nell'acqua e utilizzata come elemento sensibile alla pressione. L'idrofono a fibre ottiche (UFSP), inventato da W. Eisenmenger e J. Staudenraus, ha un'ampia larghezza di banda ed è privo di rumore elettromagnetico. Il suo funzionamento si basa sulle variazioni dell'indice di rifrazione di un fluido, solitamente acqua, che si verifica quando la densità del fluido cambia ([109]). Come mostrato nella figura 2.14, la luce laser è accoppiata in una fibra di vetro e riflessa dalla punta. Le variazioni di densità dipendenti dalla pressione della punta della fibra determinano la modulazione dell'intensità della luce riflessa, che viene catturata da un fotorilevatore e convertita tramite un accoppiatore di fibre direzionali in un segnale di tensione vs tempo ([113];[115]). Si consiglia la deconvoluzione o il filtraggio del segnale misurato.

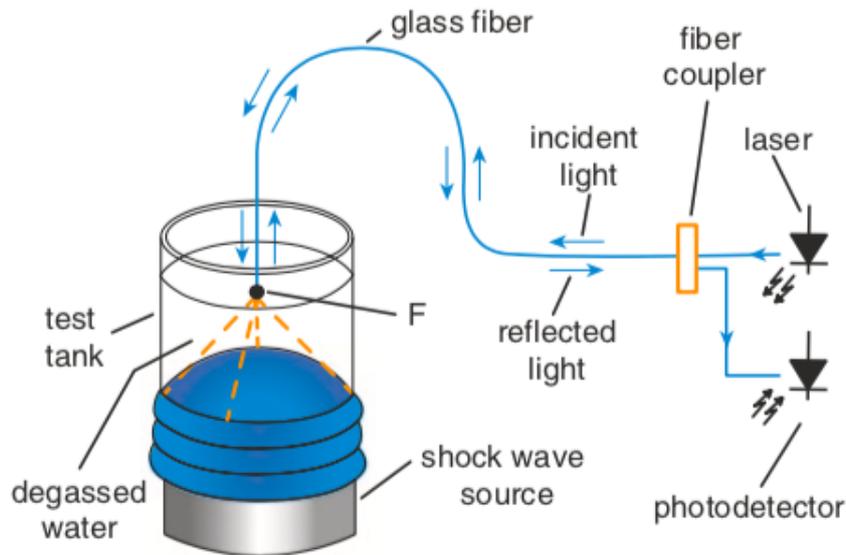


Figura 2.14: Schema del principio di funzionamento di un idrofono con sonda a fibre ottiche (UFSP).

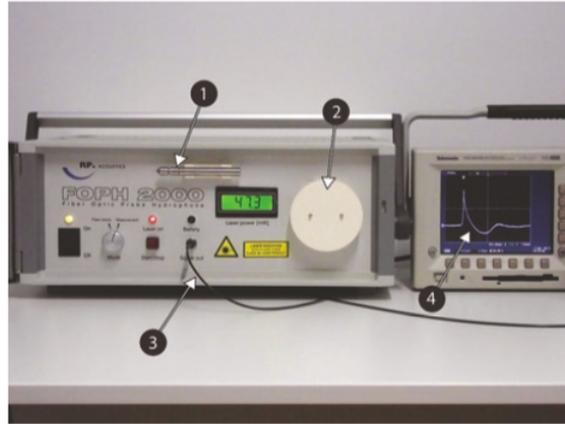


Figura 2.15: Fotografia di un idrofono con sonda a fibra ottica, che mostra (1) il supporto per fibra ottica, (2) la cartuccia in fibra ottica, (3) l'uscita del segnale e (4) la forma d'onda della pressione registrata dopo il filtraggio. La fibra è troppo sottile per essere vista su questa immagine. (RP Acoustics e.K., Leutenbach, Germania) .

L'FOPH 2000 mostrato in Fig. 2.15 (RP Acoustics eK, Leutenbach, Germania) ha un'alta risoluzione temporale e spaziale ed è adatto per la misurazione dell'impulso di pressione negativa, poiché l'adesione del *water-glass* è abbastanza forte ([109], [116]). Secondo il produttore, il campo di misura va da -60 a 400 MPa, la risoluzione della pressione è di ± 0.7 MPa e la sua sensibilità di 2 mV / MPa. Un altro vantaggio è che il diametro dell'area attiva (risoluzione spaziale) è di soli $100\mu\text{m}$. Inoltre, l'FOPH 2000 è autocalibrante, cioè non è necessaria una calibrazione rispetto a uno standard di riferimento, poiché il dispositivo può essere utilizzato come standard di misura stesso ([109]). I principali svantaggi sono il costo elevato e il fatto che la fibra di vetro potrebbe essere troppo fragile per sopportare le variazioni di pressione e gli eventi di cavitazione. Se la punta della fibra si rompe, deve essere tagliata e rimossa usando un utensile per tagliare la fibra consegnato dal produttore. Dopo aver fatto ciò, il dispositivo deve essere calibrato e riposizionato nuovamente.

Questo processo è facile ma richiede un tempo relativamente lungo. La riparazione della fibra può essere eseguita almeno 400 volte, poiché la cartuccia ha una lunghezza della fibra di 20 m. Con gli idrofoni a fibra ottica la registrazione delle forme d'onda di pressione generate da sorgenti di onde di pressione planari o sorgenti di onde di pressione radiali è più facile rispetto alla misura con litrotitore focalizzato delle onde d'urto, poiché la punta della fibra non viene danneggiata come spesso accade quando si misurano le onde d'urto. A causa dell'alta precisione dell'UFSP, il corretto allineamento della fibra è fondamentale. Gli idrofoni a fibra ottica non sono consigliati per misurare picchi di pressione inferiori a 2 MPa. Nella cavitazione che avviene nei liquidi possono essere registrate grandi variazioni nell'ampiezza del segnale; tuttavia, questo si verifica con qualsiasi tipo di sonda di pressione. Il degassamento dell'acqua nel serbatoio di prova migliora le prestazioni e riduce la

probabilità di danneggiamento della fibra a causa del collasso delle bolle. Zijlstra e Ohl ([117]) hanno riferito che aggiungendo una piccola quantità di acido acetico, si riducono la cavitazione e le variazioni shot-to-shot.

Un'alternativa alla fragile fibra di vetro dell'UFSP è l'idrofilo a luce spot (LSHD) proposto da Granz ([118]). Si basa sullo stesso principio fisico dell'UFSP; tuttavia, la superficie attiva dell' LSHD è un blocco di vetro (spessore circa 30 mm) che sopporta l'azione delle onde d'urto e della cavitazione molto meglio di una fibra di vetro. Come nell'UFSP, l'intensità del raggio riflesso viene modulata dai cambiamenti dell'indice di rifrazione dell'acqua causato dalle variazioni di pressione. La superficie anteriore del blocco di vetro deve essere allineata perpendicolarmente all'asse focale della sorgente di onde d'urto. I fisici dell'Università di Erlangen e gli ingegneri della Siemens Healthcare GmbH (Erlangen, Germania) hanno sviluppato un LSHD costituito da un laser focalizzato e riflesso su un lato di un blocco di vetro di quarzo, parzialmente immerso nell'acqua (figura 2.16).

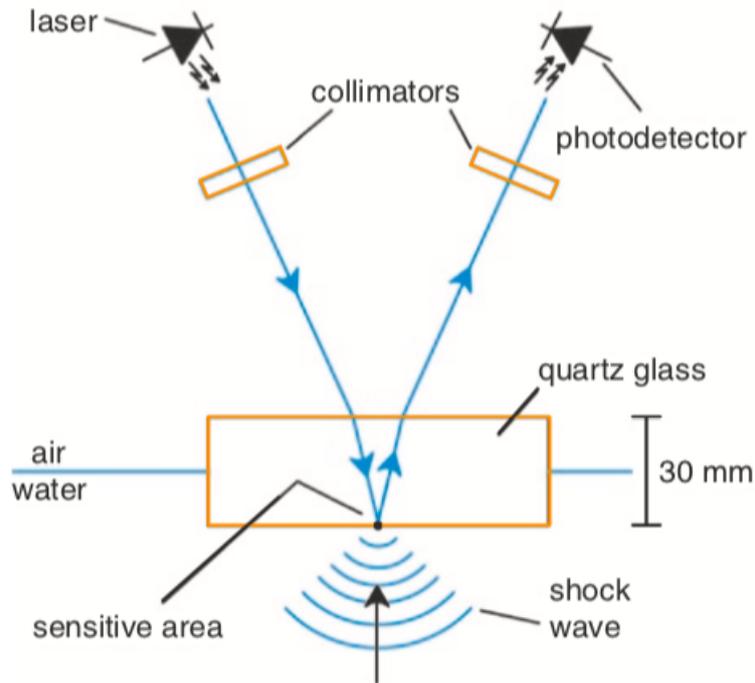


Figura 2.16: Schema del principio di funzionamento di un idrofono a luce spot (LSHD).

La buona adesione del vetro al quarzo all'acqua impedisce la cavitazione nell'interfaccia vetro-acqua. La luce laser a diodi passa attraverso una fibra e viene diretta attraverso il blocco di vetro con un angolo di circa 15° da una lente a un punto $50\mu\text{m}$ sul lato di uscita del blocco, che è l'area sensibile [58]. La luce riflessa viene focalizzata da una seconda lente ed accoppiata ad un fotodiodo. L'idrofono è conforme ai requisiti della norma IEC 61846 e si è dimostrato tanto preciso quanto

l'UFSP. Nel caso in cui la superficie del vetro venga parzialmente danneggiata, è possibile continuare con le misurazioni semplicemente spostando il punto luminoso lungo l'interfaccia vetro-acqua in un'area non danneggiata.

Ciò riduce il tempo di misurazione rispetto all'uso di un UFSP. Confrontando le misurazioni effettuate sulle sorgenti di onde d'urto utilizzate per SWL con l'FOPH e l'LSHD, è emerso che per le impostazioni ad alta energia l'LSHD mostra una pressione di picco negativo più alta, probabilmente a causa della forte adesione del vetro al quarzo all'acqua.

I risultati ottenuti per le pressioni di picco positive in ambienti sia a bassa che ad alta energia [17] risultano buoni e in accordo tra loro. Utilizzando una tecnica di post-elaborazione proposta da Rad, l'LSHD è affidabile per le misurazioni ad alta pressione. Un inconveniente quando si usa l'LSHD è che deve sempre essere posizionato sulla superficie dell'acqua, mentre la sorgente d'onda d'urto deve trovarsi sul fondo del serbatoio d'acqua, cioè il raggio d'onda d'urto deve impattare verticalmente sull'idrofono. Un altro svantaggio è che le bolle ascendenti possono essere intrappolate dal blocco di vetro e produrre interferenze. Inoltre, il livello dell'acqua deve essere regolato se sono necessarie misurazioni della pressione lungo un asse verticale (asse z). I suddetti idrofoni possono anche essere utilizzati per registrare le forme d'onda di pressione emesse da sorgenti di impulsi di pressione balistica; tuttavia, sono ancora necessarie metodologie standardizzate. Ueberle e Rad [58] hanno sviluppato un sistema *water-free* per registrare le forme d'onda di pressione generate da sorgenti balistiche. Il metodo può essere utilizzato per il controllo di qualità nel servizio e nella produzione. L'applicatore è accoppiato tramite uno strato di silicio da 5 mm a un trasduttore di pressione. Usando questo sistema su sorgenti balistiche commerciali, gli autori hanno dimostrato alte variazioni di output quando i primi 10-20 impulsi sono stati prodotti a velocità superiori a 2 Hz.

I confronti tra le misurazioni della pressione subacquea e della pressione a secco hanno dimostrato che il nuovo banco di prova è una soluzione affidabile per caratterizzare le fonti di impulsi di pressione balistica. Le forme d'onda di pressione possono essere registrate con la stessa accuratezza nell'acqua, mentre si modifica la frequenza degli impulsi e la pressione dell'aria nel dispositivo. Un vantaggio del metodo *water-free* è che si evita la cavitazione. Non solo le misure di pressione ma anche la visualizzazione del campo di pressione è utile per valutare le sorgenti di onde di pressione. La propagazione delle onde d'urto e la dinamica delle bolle possono essere visualizzate utilizzando tecniche ottiche, come la fotografia di Schlieren ([119]; [120]; [121]; [122]; [123]), tecniche di fotoelastica ad alta velocità combinate con l'imaging di ombregrafiche ([124]; [125]; [126]; [127]), interferometria olografica ([128]; [129]) e tecniche di background-oriented schlieren ([130]).

Ad esempio, la Fig. 2.17 mostra una sequenza di fotografie di schlieren combinate con l'imaging di stress fotoelettrico di un piccolo cilindro acrilico esposto a un'onda d'urto subacquea. Il diametro del cilindro (20 mm) è stato scelto per essere

paragonabile a un calcolo renale. L'onda d'urto subacquea con una pressione di picco di circa 70 MPa, generata utilizzando una sorgente di onde d'urto elettromagnetiche (Storz Medical AG) colpisce il cilindro dalla parte superiore delle immagini. Lo stress all'interno del bersaglio appare non appena l'onda d'urto si avvicina al cilindro (Fig. 2.17b). Le piccole bolle generate dopo il passaggio dell'onda d'urto sono visibili come punti scuri in tutte le immagini. Le onde d'urto secondarie sferiche, prodotte dopo il collasso delle bolle, possono essere viste come sottili cerchi bianchi in Fig. 2.17g, h.

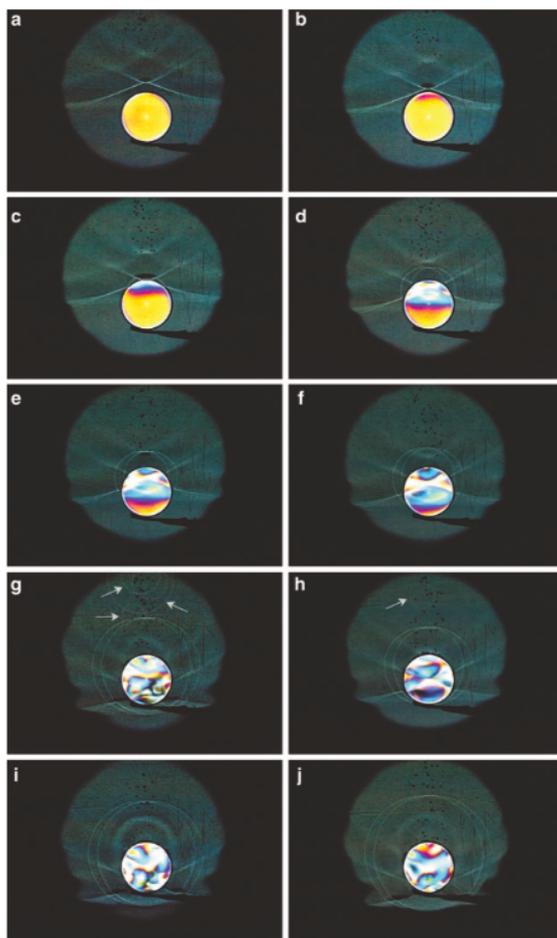


Figura 2.17: Sequenza fotografica di un'onda d'urto subacquea che colpisce un cilindro acrilico (20 mm di diametro) e vengono qui mostrate le onde riflesse in diverse fasi. I colori mostrano uno schema di sollecitazione all'interno del cilindro. Le onde d'urto secondarie generate dal collasso delle bolle indotte dalle onde d'urto possono essere osservate nelle immagini (g) e (h). Le bolle di cavitazione si distinguono come punti neri. Tecnica: *shlieren optics in combinazione con fotoespressione dello stress fotoelastico* (fotografie: O. Wess e J. Mayer, Storz Medical AG, Tägerwilen, Svizzera).

Un'altra immagine color-schlieren è presentata in Fig. 2.18. Le variazioni di pressione positiva e negativa sono visualizzate in diversi colori, facilitando la comprensione del fenomeno. Le bolle di cavitazione generano onde d'urto secondarie dopo il passaggio dell'onda d'urto originale, che si è propagata dal basso verso l'alto dell'immagine.

Un metodo popolare per studiare la dinamica delle bolle vicino al fuoco di una sorgente di onde d'urto è il rilevamento passivo di cavitazione (PCD) ([131]; [132]; [133]; [134]; [135]; [136]; [137]; [138]). Un sensore ad ultrasuoni registra le emissioni acustiche dalla cavitazione senza interferire con il campo di cavitazione stesso. I segnali ricevuti vengono elaborati per ottenere le componenti di frequenza di diversi tipi di cavitazione. Il PCD focalizzato e sfocato è stato utile. Nel primo caso, il sistema fornisce un'elevata specificità spaziale e sensibilità nella zona focale della sorgente di onde d'urto. I rivelatori non focalizzati hanno una specificità spaziale e una sensibilità inferiori, ma inviano informazioni da un volume maggiore del campo di cavitazione.

Altri autori [139] hanno usato il cosiddetto *doppio rilevamento di cavitazione passiva* (DPCD), cioè due sensori focalizzati quasi ortogonali per localizzare eventi di cavitazione. Il vantaggio di questa disposizione è che il volume sensibile risultante è piccolo (pochi millimetri cubici) e solo i segnali originati da bolle all'interno di questo volume vengono catturati simultaneamente da entrambi i rilevatori (Fig. 2.19). Un'altra possibilità è quella di utilizzare un sensore per inviare un'onda verso la nuvola di bolle, mentre l'altro trasduttore riceve i riflessi dalle bolle. Questo metodo, noto come *rilevazione attiva della cavitazione* (ACD), è stato testato per studiare la dinamica delle bolle in biomedicina [138]. Una caratteristica interessante del rilevamento della cavitazione è la registrazione dell'attività della bolla in vivo.

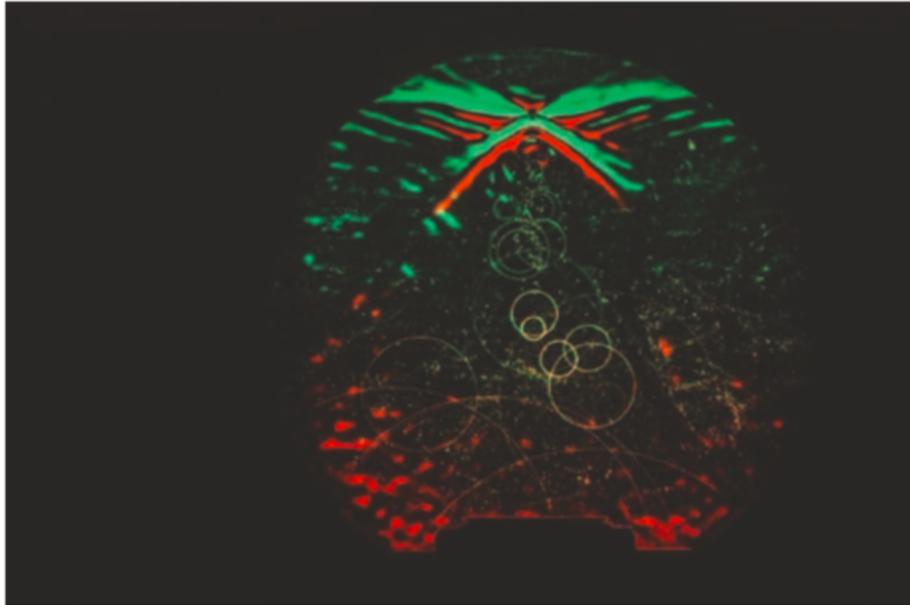


Figura 2.18: Messa a fuoco dell'onda d'urto vicino al punto focale di una sorgente di onde d'urto elettromagnetica, che genera la cavitazione in acqua. Le bolle collassanti (parte inferiore) creano onde d'urto sferiche secondarie (cerchi). Tecnica: *optic color-schlieren con gradienti di pressione positivi* in gradienti di pressione rossi e negativi in verde (fotografia: O. Wess e J. Mayer, Storz Medical AG, Tägerwilten, Svizzera)

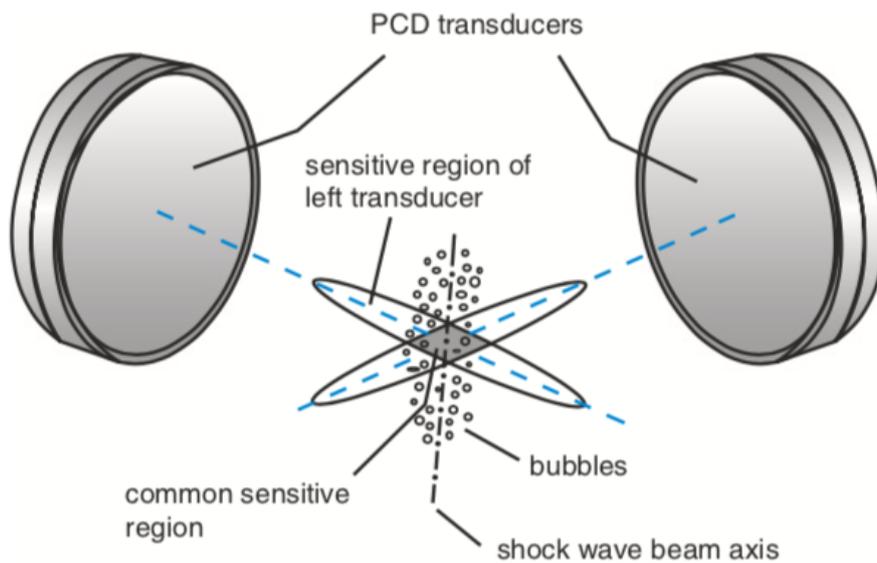


Figura 2.19: Schema di un doppio rilevatore di cavitazione passiva per registrare le emissioni acustiche da cavitazione generate nella regione focale di una sorgente di onde d'urto subacquee.

Capitolo 3

Le nano-bolle

Le bolle di dimensioni nanometriche sono definite *nanobolle*.

Negli ultimi decenni, proprio a partire da queste piccole bolle, sono stati progettati nuovi sistemi di somministrazione di farmaci decisamente più efficienti di quelli tradizionali. In effetti, le loro piccole dimensioni consentono il travaso dai vasi sanguigni nei tessuti circostanti e il rilascio nello specifico sito, garantendo minima invasività. Inoltre, le nanobolle potrebbero essere dotate di una maggiore stabilità e di un tempo di permanenza più lungo nella circolazione sistemica.

In questo capitolo si porrà l'accento sulle proprietà fisico-chimiche delle nanobolle, i parametri più importanti per la loro preparazione, nonché gli approcci di caricamento del farmaco, oltre alle potenziali applicazioni come *strumento terapeutico*.

3.1 Dalle micro-bolle alle nano-bolle

Le microbolle sono bolle sferiche con dimensioni comprese tra 1 e $10\mu m$, la cui struttura comprende un nucleo di gas avvolto da uno *shell* esterno [140]. Il loro guscio consiste principalmente di lipidi, proteine o polimeri, mentre il nucleo può essere riempito con vari gas, come perfluoro-carburi, esafluoruro di zolfo, aria e anidride carbonica. La natura comprimibile del nucleo di gas consente alle microbolle di oscillare in risposta a stimoli di compressione e di rarefazione dell'onda ultrasonica e sono in grado di risonare alle frequenze diagnostiche. In particolare, la combinazione / associazione di un farmaco con strutture di microbolle consente il rilascio controllato del farmaco e la deposizione. Sfortunatamente, le microbolle, a causa delle loro dimensioni microscopiche, rimangono in circolazione un tempo cioè più o meno breve.

Per superare questa limitazione, sono state ideate e progettate delle *nanoformulazioni*, come liposomi, micelle e nanobolle, per il rilascio di farmaci attivati dagli Ultrasuoni al di fuori del flusso sanguigno.

Questi sistemi su scala nanometrica sono stati originariamente progettati come agenti di contrasto [141], essendo efficienti riflettori dell'energia ultrasonica. Più recentemente, sono stati anche studiati in relazione alla somministrazione di farmaci, geni e gas [141, 142].

Le nanobolle possono essere considerate **la nuova generazione di nano-carrier** sensibili agli ultrasuoni, finalizzate a migliorare ulteriormente le prestazioni in vivo. Come accennato nell'introduzione al capitolo, è interessante notare che le bolle di dimensioni nanometriche aprono la strada al travaso dai vasi sanguigni nei tessuti circostanti, migliorando così l'efficienza e la localizzazione della somministrazione [143]. Potrebbero accumularsi all'interno di tessuti tumorali tramite l'effetto *Enhanced Permeability and Retention* [144] o attraverso il targeting attivo [145, 146].

Tali bolle di dimensioni nanometriche possono essere usate come nuclei di cavitazione terapeutica per la sonoporazione indotta da ultrasuoni, causando la formazione di pori transitori nelle membrane plasmatiche per modificare la permeabilità cellulare. A tale scopo, le nanobolle possono essere co-somministrate con una soluzione di farmaco o un farmaco può essere associato all'interno della struttura a bolle, che agirà da nano-carrier mediato dagli Ultrasuoni, per migliorare l'assorbimento intracellulare di farmaci [147].

Un'altra strategia prevede sistemi a cambiamento di fase (*phase-change systems*) che combinano i vantaggi dei nanocarrier con le proprietà acustiche delle micro-nanobolle. Questo concetto è stato sperimentato da Rapoport e utilizza perfluorocarburi, sostanze che possono rimanere liquide a temperatura ambiente e corporea, ma possono vaporizzare se sottoposte ad Ultrasuoni [148, 149].

Nei prossimi paragrafi si illustreranno tutte le principali nozioni e conoscenze sulle nanobolle e il relativo background teorico, focalizzando l'attenzione proprio su quelle che utilizzano perfluorocarburi, includendo la loro progettazione, i principali metodi di preparazione, gli approcci di carico e le potenziali applicazioni terapeutiche.

3.2 Aspetti teorici per la formulazione delle nano-bolle

Progettare e creare nanobolle stabili, come in parte visto nel primo capitolo, è un procedimento critico ed impegnativo, per il quale occorre prendere in considerazione diversi parametri, primi fra tutti la tensione interfacciale e la pressione di Laplace, oltre alle strutture delle fase dispersa e della fase continua.

L'interazione molecolare tra il nucleo interno gassoso e il mezzo liquido esterno è definita dalla tensione superficiale all'interfaccia delle miscele. La pressione di Laplace è la differenza di pressione tra l'interno e l'esterno di una bolla (o una goccia):

$$\Delta P = P_{\text{inside}} - P_{\text{outside}} = \frac{2\sigma}{r} \quad (3.1)$$

dove P_{inside} e P_{outside} indicano rispettivamente la pressione all'interno e all'esterno di una bolla, σ è la tensione interfacciale e r è il raggio della bolla. Per una maggiore comprensione, nella figura 3.1 sono evidenziati tutti i parametri sopracitati.

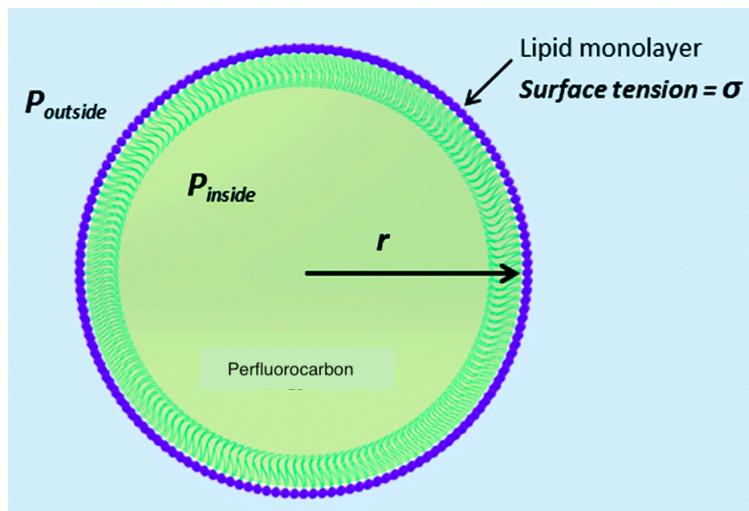


Figura 3.1: : Schema dei principali contributi della pressione di La Place

Quando il gas interno lascia il nucleo, guidato dal gradiente di pressione, le bolle si restringono e la pressione di Laplace aumenta, aumentando così la velocità di dissipazione del gas e il conseguente restringimento finché la bolla non si rompe. Poiché la tensione superficiale genera una pressione che guida la dissoluzione delle bolle per diffusione del gas, il tasso di dissoluzione della bolla in vivo dipenderà principalmente proprio dalla pressione di Laplace [150]. Durante il processo di formazione delle nanobolle, occorre essere in grado di far fronte anche ad un evento che fa crescere le bolle più grandi a spese di quelle più piccole, un fenomeno definito come *Ostwald ripening for liquid droplet or solid nanoparticles* (maturazione di Ostwald per goccioline liquide o nanoparticelle solide) che potrebbe minare la stabilità dei sistemi su scala nanometrica [151].

L'utilizzando tensioattivi è possibile formare un monostrato molecolare all'interfaccia che riduce la tensione interfacciale ed abbatte la differenza di pressione tra l'interno e l'esterno di una bolla [152]; mentre l'aggiunta di cosurfattanti, oltre al

tensioattivo o agli stabilizzanti, può essere sfruttata per modulare con precisione le proprietà interfacciali.

Diversi studiosi e ricercatori [153, 154], al fine di formare bolle nanometriche stabili di perfluorocarburi con shell lipidico, hanno utilizzato un tensioattivo anfifilico, *Pluronic*s, vale a dire copolimeri a blocchi a base di ossido di etilene e ossido di propilene. Combinando *Pluronic*s al tensioattivo è possibile incrementare la stabilità delle nanobubble e controllarne le dimensioni modificando la fluidità dei lipidi e alterando l'involucro e la curvatura dei gusci lipidici e il modulo elastico del guscio delle bolle.

L'influenza della lunghezza della catena alchilica di fosfolipidi usati come tensioattivo sul packaging del guscio può essere studiata mediante studi sul monostrato [155]. In generale più lunga è la catena, maggiore è l'attrazione di van der Waal, che promuove una coesione più forte e catene strettamente integrate all'interfaccia, con conseguente aumento della stabilità della bolla [156, 157]. Come già teorizzato da altri studiosi [158], chiaramente anche il tipo di fase gassosa avrà una certa influenza sulla bolla e sulla sua stabilità: l'interazione delle molecole di fluorocarburo adsorbite con DPPC riduce l'energia di interazione reciproca tra le molecole DPPC, portando a una fluidizzazione altamente efficace del monostrato.

Per creare nanobolle con una maggiore longevità si è pensato all'uso di gas inerte con solubilità acquosa molto scarsa per la composizione del nucleo, come perfluorocarburi o esafluoruro di zolfo, al fine di ridurre il tasso di dissoluzione del gas interno dalle nanobolle; l'incapsulamento di gas che sono insolubili in acqua, in altre parole perfluorocarburi, può aumentare l'emivita di vari sistemi a bolle.

3.2.1 Formulazione basata sui perfluoro-carburi

I Perfluorocarburi (PFC), ampiamente utilizzati per ottenere agenti di contrasto a cambiamento di fase, oltre ad essere sicuri e biologicamente inerti, hanno un punto di ebollizione vicino alle temperature fisiologiche e consentono, pertanto, di creare delle nano-goccioline allo stato surriscaldato o vicino a quest'ultimo [159, 160].

Tra tutti il più usato è il *Perfluoropentano* (PFP) che ha un punto di ebollizione di 29° C, genererà, pertanto, delle goccioline che sono liquide a temperatura ambiente, ma esponendole alle temperature fisiologiche (circa 37° C), queste necessariamente si surriscalderanno, ma non vaporizzeranno grazie alla pressione di Laplace; inoltre la tipica idrofobicità dei PFC può portare a tensioni superficiali interfacciali relativamente elevate quando dispersi in acqua [161].

Kandadai ha fatto una scoperta notevole: mentre le goccioline "pure" cioè non rivestite di tensioattivo hanno una tensione superficiale (all'interfaccia PFP/acqua) di circa 56 mN/m, incapsulandole mediante un guscio lipidico o proteico la tensione interfacciale può essere opportunamente modificata [162].

Utilizzando l'equazione di Antoine, è stato valutato che per goccioline di diametro di 500 nm, la temperatura di ebollizione del PFP è di circa 68°C per un valore di 30 mN/m di tensione superficiale all'interfaccia goccia/acqua [148, 149].

Conseguentemente, la conversione da goccia a bolla, indotta termicamente, è ostacolata dall'elevata pressione di Laplace; utilizzando gli ultrasuoni terapeutici, si possono però facilmente convertire queste nano-goccioline di perfluorocarburi in nano/micro-bolle. Una volta vaporizzata, la bolla di perfluorocarburo aumenta le sue dimensioni da 3 a 6 volte, a seconda delle dimensioni iniziali della gocciolina [163].

I meccanismi fisici dietro al cambiamento di fase non sono ancora del tutto chiari, nonostante negli anni siano state proposte diverse teorie. Tutti concordano però sul fatto che **la componente meccanica degli ultrasuoni gioca un ruolo predominante nell'indurre la vaporizzazione delle goccioline.**

La quantità di energia necessaria per vaporizzare una specifica gocciolina potrebbe essere alterata attraverso un metodo alternativo di progettazione delle gocce che implica la preparazione di una miscela di PFC con diversi punti di ebollizione. Kawaba [164], ad esempio, ha dimostrato che miscelando perfluoropentano (pe 29°C) e 2H, 3H-decafluoropentano (pe 53°C) è riuscito a produrre una gocciolina che richiede energia diversa per vaporizzare, rispetto ad una goccia contenente solo perfluoropentano o 2H, 3H- decafluoropentano.

Un'ulteriore strategia prevede l'uso di perfluorocarburi con punto di ebollizione inferiore. Due studi recenti [165, 166] hanno dimostrato che il decafluorobutano (DFB), che normalmente è un gas a temperatura ambiente, può essere trasformato in goccioline su scala nanometrica che sono stabili in vitro a temperatura ambiente e corporea. Queste goccioline, che sono stabili contro la vaporizzazione spontanea in condizioni fisiologiche, possono essere vaporizzate a pressioni che sono significativamente inferiori a goccioline simili di altri perfluorocarburi, il che è promettente per le applicazioni che richiedono basse pressioni acustiche [165, 166].

3.2.2 Stabilità della nano-bolla

I problemi di stabilità devono essere presi in considerazione nella progettazione e nella formulazione delle nanobolle. Le caratteristiche fisico-chimiche (numero, dimensioni e stabilità) di una bolla possono essere influenzate da diversi parametri.

Per stabilizzare le bolle e prevenirne la coalescenza, le nanobolle possono essere rivestite con un agente stabilizzante. Lo stesso Kooiman ha riferito che il rivestimento può influenzare profondamente la dinamica della bolla [151]. In generale, sono possibili due rivestimenti: rivestimento flessibile di fosfolipidi (pochi nm) ed un incapsulamento solido di polimeri (decine di nm). **La composizione del rivestimento può avere un ruolo determinante nella durata della bolla.** Sono stati riportati vari studi su microbolle con rivestimento flessibile, come fosfolipidi o

rivestimento polimerico rigido [151]. Per le microbolle incapsulate con polimero di dimensioni $3\mu\text{m}$ è stato osservato un aumento della frequenza di risonanza a valori maggiori di 15 MHz [167].

Contrariamente ai monostrati lipidici, i gusci solidi sferici sopportano più facilmente la compressione piana, che stabilizzano le bolle contro la loro dissoluzione [168]. Questi risultati possono essere trasferiti alle nano-bolle: anche qui la presenza di un guscio solido può migliorare la longevità della nanostruttura. Inoltre, un guscio polimerico multistrato e un involucro comprendente fosfolipidi e polimeri possono ulteriormente migliorare la stabilità della *nano-bubble* [163].

Inoltre, la composizione qualitativa-quantitativa del rivestimento delle nanobubble è un fattore cruciale per ottenere sistemi sferici. Infatti, se il rivestimento non fosse omogeneo, potrebbe causare una forma sferica imperfetta con una stabilità inferiore [169].

In conclusione, la stabilità della bolla può essere influenzata da dimensioni, concentrazione, lunghezza della catena, flessibilità, forma e tipo del rivestimento, ma sono anche da considerare le condizioni ambientali, come il pH e la forza ionica della soluzione.

La temperatura è il fattore chiave per la resa e la stabilità delle bolle. Come visto da Rovers [170], le bolle conservate a 4°C sono più stabili (fino a 1 mese) di quelle conservate a temperatura ambiente e dopo la preparazione.

Una scelta opportuna è anche quella avere un'intera popolazione con lo stesso diametro per evitare la maturazione di Ostwald [171]. Le gocce sub-micrometriche di perfluorocarburi possono crescere, non solo attraverso la coalescenza ma anche come risultato di un processo di diffusione molecolare. In questo processo, le singole molecole di perfluorocarburo lasciano le goccioline più piccole, dove il potenziale chimico è più alto, per unirsi a goccioline più grandi, dove la curvatura e, di conseguenza, il potenziale chimico è minore [172].

3.3 Composizione delle nanobolle



Figura 3.2: Rappresentazione schematica della struttura *core-shell* di una nano-bolla.

Le due principali componenti delle nano-bolle sono: il nucleo interno (*core*), rappresentato in blu nella figura 3.2, ed il guscio esterno (*shell*), in azzurro. Il guscio comprende principalmente tensioattivi, polimeri o proteine, mentre l'area del nucleo è generalmente occupata da esafluoruro di zolfo e perfluorocarburi. **Per la formulazione del sistema devono essere selezionate sostanze sicure, biocompatibili, biodegradabili e regolamentate.**

Un fattore chiave da considerare nella formulazione delle bolle è la composizione dello shell; lo shell, in genere, è costituito da lipidi o polimeri per potenziare la stabilità a discapito della coalescenza delle bolle [173]. I principali componenti dello shell sono riassunti nella tabella 1. La composizione dello shell

può avere una notevole influenza sull'emivita della bolla, poiché influenza lo scambio gassoso dal nucleo al mezzo esterno. Infatti, lo spessore del guscio e l'elasticità determinano la stabilità della nano-bolla [174]. I parametri acustici per indurre il rilascio del farmaco possono notevolmente variare in funzione della struttura della nano-bolla.

La risposta della nano-bolla all'interno di un campo acustico è fortemente influenzata dalle proprietà viscoelastiche del guscio [175]. Sicuramente gusci eccessivamente morbidi possono rompersi anche a causa di piccole variazioni di pressione, ma gusci molto duri non sarebbero in grado di oscillare. **Quindi, un guscio eccessivamente rigido riduce l'effetto ecogeno; tuttavia, i gusci sottili possono consentire la diffusione dalla bolla.** I gusci più elastici sono fatti di fosfolipidi; i tipi di code idrocarburiche di questi lipidi possono influenzare fortemente le proprietà dello shell. L'aumento del numero di atomi di carbonio porta ad una diminuzione della tensione superficiale e all'aumento della resistenza alla permeazione del gas; d'altra parte, l'allungamento della catena del carbonio aumenta la viscosità della shell, il che si traduce in bolle più solide e meno ecogeniche.

Un modo per aumentare la resistenza delle bolle con monostrato a base di fosfolipidi è quello di aggiungere polimeri alla formulazione. L'influenza di un ulteriore strato polimerico sulla struttura delle bolle è stata ampiamente studiata anche per

le microbolle.

Un guscio di polimero più spesso e più robusto può prevenire la diffusione del gas, garantendo una maggiore durata della circolazione in vivo e una maggiore stabilità del sistema nano-bolla; inoltre, il guscio polimerico potrebbe consentire di incorporare una quantità maggiore di farmaco [176]. I polimeri più comunemente utilizzati sono PLGA, PCL, composti PEG, Pluronic e polisaccaridi, in altre parole, chitosano, derivati del chitosano, destrano.

Il cross-linking, sia chimico che fisico, in particolare dello shell offre un altro approccio per la produzione di sistemi a nano-bolle che sono stabili in presenza degli Ultrasuoni. La reticolazione chimica delle catene polimeriche conferisce elasticità e stabilità alle microbolle polimeriche [177]. Ad esempio, per scopi termostatici sono state progettate delle nanobolle con guscio polimerico di glicol-chitosano reticolate con tri-polifosfato mostrando una maggiore stabilità nel tempo [178].

Tab.1: Composizione dello shell

Polimeri	Polisaccaridi (solfato di destrano, destrano, chitosano, glicol-chitosano, acido ialuronico, DEAE destrano), composti PEG, PLGA, Pluronic, PVA, PVP.
Proteine	Albumina, Lisozima, Avidina.
Lipidi	Fosfolipidi (DSPC, DPPC, DMPC).
Tensioattivi	SPAN, TWEEN.

3.4 Metodi di preparazione delle Nano-bolle

Si possono prendere in considerazione due strategie principali per la produzione di nanobolle: la manipolazione di microbolle preformate e la formulazione *ab initio* di sistemi alla nano-scala. Il primo comprende metodi di filtrazione, flottazione, centrifugazione e condensazione. Per la seconda strategia, le nanobolle vengono principalmente preparate mediante evaporazione a strato sottile, sonicazione, emulsione *high shear*, agitazione meccanica e coacervazione o coalescenza; tecniche che sono state utilizzate anche nella preparazione di microbolle [184].

Nano-bubbles biocompatibili sono state fabbricate mediante ultrasuoni di una miscela di Span 60 e poliossietilene 40 stearato (PEG40S), seguite da centrifugazione differenziale per ottenere una popolazione di bolle nano-dimensionali con una distribuzione di dimensioni unimodali [185]. Un secondo metodo, che è comunemente usato, in particolare per preparare micro-nanobolle rivestite con polimero,

comporta l'emulsione del polimero (disciolto in un solvente opportuno) in una sospensione acquosa mediante un agitatore ad *high shear*, usando un altro liquido che è immiscibile sia con il polimero che con l'acqua come stabilizzatore. A condizione che il solvente polimerico sia sufficientemente volatile, inizierà ad evaporare, facendo precipitare il polimero sull'interfaccia. Dopo una fase di liofilizzazione, il solvente viene rimosso, lasciando la matrice di emulsione. Quindi, il sistema liofilizzato viene riempito con il gas opportuno.

Il metodo di agitazione meccanica è un approccio comune per la produzione di micro-nanobolle con fosfolipidi. Inizialmente, una formulazione liposomiale viene creata usando un metodo convenzionale, come l'idratazione di un sottile film fosfolipidico, l'inversione di fase o l'iniezione di etanolo. Successivamente, la dispersione liposomiale viene collocata in fiale e il restante spazio vuoto superiore delle fiale viene riempito con un gas, che successivamente formerà i nuclei delle nano-bolle. Le fiale sono poste in un agitatore meccanico e scosse a diverse migliaia di oscillazioni al minuto.

Un'altra tecnica per la preparazione di bolle rivestite di polimero comporta il deposito di nanoparticelle di polimeri monodisperse sulla superficie delle microbolle stabilizzate con tensioattivi, dove si uniscono per formare uno strato uniformemente denso [184].

Recentemente, è stata anche studiata la produzione di nano-bolle tramite dispositivi microfluidici, poiché la microfluidica consente un controllo maggiormente preciso sul diametro della bolla e sulla velocità di produzione, attraverso l'interazione della pressione del gas, della portata del liquido e della geometria del dispositivo [186, 187].

Recentemente, Sheeran [188] ha descritto un metodo di estrusione a temperatura fredda per emulsionare goccioline liquide a base di fluorocarburi a basso punto di ebollizione, perfluorobutano (DFB). Poiché il DFB è un gas a temperatura ambiente con un punto di ebollizione di -2 ° C, le tecniche di generazione di goccioline hanno comportato metodi di condensazione del gas a temperature ridotte e / o pressioni più elevate. In questo studio, le goccioline sono state prodotte prima condensando il DFB a temperature ridotte, e quindi incapsulando il DFB liquido risultante in gusci di lipidi mediante estrusione della membrana. Una fase di post-sonicazione può essere eseguita per produrre un sistema con una più uniforme distribuzione delle dimensioni[188].

Il concetto di nano-emulsioni perfluorocarburiche phase-shift è stato utilizzato per la preparazione di nano-bolle da Rapoport [189, 190] che progettò delle nano-emulsioni di PFC stabilizzate da un copolimero a blocchi anfifilico. Per formare nano-goccioline stabilizzate con copolimero a blocchi, i composti PFC sono posti in soluzioni micellari di copolimeri a blocchi anfifilici (cioè, PEG-PLLA o PEG-PCL) ed emulsionati. Quando la concentrazione del PFC supera il limite di solubilità nel nucleo della micella, il PFC si evolve in una nano-gocciolina separata in modo che

l'ex nucleo della micella si trasformi nel guscio della gocciolina.

Il team della professoressa Cavalli, in particolare, ha sviluppato delle particolari nano-bolle a guscio polimerico [191]. Queste, possono, a tutti gli effetti, essere considerate un *sistema ibrido*, dal momento che contengono un monostrato di tensioattivo all'interfaccia, rivestito da un guscio polimerico che ne migliora la stabilità. Per la loro preparazione sono state preparate delle nano-emulsioni di perfluorocarburi a temperatura ambiente con un semplice set-up di preparazione, nanoemulsioni che verranno convertite in bolle dopo la transizione liquido-gas (ADV). E' stata preparata una pre-emulsione miscelando una soluzione di etanolo, tensioattivo e co-surfattante, acqua e generalmente un perfluorocarburo usando un omogeneizzatore high-shear. Quindi, per ottenere le nano-bubbles a guscio polimerico, è stata aggiunta in gocce una soluzione acquosa di un polimero, generalmente un polisaccaride, durante l'agitazione magnetica. Questa formulazione viene sì definita "nanobubbles", ma occorre sottolineare che, prima dell'applicazione degli ultrasuoni, sarebbe più preciso parlare "nanodroplets" quando il nucleo è costituito da perfluoropentano.

Queste sono state progettate considerando la logica che i monostrati fosfolipidici sono in grado di assorbire i polimeri caricati. Ad esempio, il chitosano interagisce con i fosfolipidi principalmente attraverso interazioni elettrostatiche ma include anche il legame ad idrogeno e le forze idrofobiche, a seconda della densità del rivestimento fosfolipidico [192]. Inoltre, è stata descritta l'interazione interfacciale tra destrano solfato e i lipidi del monostrato [193]. Come sottolineato nel paragrafo precedente l'aggiunta di molecole di tensioattivi a monostrati di fosfolipidi può avere un effetto sinergico sul rivestimento interfacciale e sulla tensione interfacciale, riducendo le dimensioni delle bolle e stabilizzando il sistema. Sono stati sviluppati gusci con vari spessori e poi ancora sistemi multistrato possono essere ottenuti mediante deposizione strato per strato di polimeri caricati in modo opposto.

3.5 Gli approcci più attuali per il caricamento di farmaci

Le nanobolle possono essere caricate con gas, piccole molecole e macromolecole, sia idrofile che lipofile. Sono stati proposti diversi approcci tecnologici per associare molecole all'interno delle strutture delle nano-bolle, sfruttando strategie di progettazione precedentemente ottimizzate per le microbolle. Sono generalmente possibili tre tipi di caricamento. I farmaci potrebbero essere incapsulati all'interno del nucleo, o potrebbero essere incorporati all'interno o appena al di sotto del guscio delle nano-bolle [194]. L'incapsulamento del farmaco in una nanoparticella successivamente attaccata alla superficie della bolla può essere considerato un ulteriore approccio di caricamento. La prima strategia di caricamento consisteva nell'associare il farmaco al guscio, generalmente tramite l'interazione elettrostatica.

Un farmaco idrofobico può essere incorporato direttamente nella formulazione del guscio di lipidi, ma il monostrato è molto sottile e la quantità di farmaco che può essere incorporata è estremamente bassa. I componenti caricati, come la doxorubicina o gli acidi nucleici, possono essere facilmente accoppiati elettrostaticamente con il guscio quando sono presenti lipidi o polimeri anionici / cationici. Nomikou [195] ha studiato l'influenza delle manipolazioni della superficie delle bolle sulla loro interazione con il DNA plasmide e le cellule bersaglio, confrontando le capacità di bolle neutre, cationiche, cationiche e biotinilate e rivestite di lipidi per migliorare il trasferimento genico mediato da ultrasuoni.

Lo svantaggio di questo tipo di caricamento elettrostatico è il prematuro rilascio del farmaco caricato nel corpo dopo l'iniezione endovenosa. Infatti, i componenti del sangue, come l'albumina sierica, potrebbero interagire con il guscio delle nano-bolle favorendo lo spostamento del farmaco. Il legame chimico dei farmaci sulla superficie può essere sfruttato per limitare questo fenomeno.

La tecnica di assemblaggio strato per strato (*layer-by-layer*) viene utilizzata per adsorbire sequenzialmente polielettroliti con carica opposta sulla superficie delle nano-bolle.

I rivestimenti multistrato ottenuti mediante tecniche di auto-assemblaggio strato per strato possono essere utilizzati per aumentare la quantità di farmaco incorporato e migliorare l'emivita in vivo del sistema. Un farmaco con una certa carica può essere combinato nell'assemblaggio multistrato ed essere presente quindi non all'interno ma in uno strato esterno della nano-bolla. Per esempio, la doxorubicina, un farmaco carico positivamente, può essere inclusa in uno strato di polielettroliti carichi negativamente [196]. Il nucleo della nano-bolla può fungere da *nano-reservoir*, quando le proprietà fisico-chimiche del farmaco consentono la sua solubilizzazione. I farmaci lipofili possono essere disciolti in perfluorocarburi, si può eventualmente utilizzare un co-solvente per facilitare la dissoluzione.

Un approccio per migliorare il carico include l'aggiunta di un *olio* al nucleo interno per dissolvere e immagazzinare farmaci lipofili. Kooiman progettò delle microcapsule riempite d'olio come reservoir di farmaci, in grado di rilasciare il farmaco dopo l'insonazione [167]. Inoltre, un farmaco contenente una fase oleosa potrebbe essere associato a nano-bolle rivestite di lipidi, come proposto da Tartis per le microbolle [197]. Questa tecnica di formazione di liposfere acusticamente attive ha avuto successo nell'erogazione di chemioterapici in vitro. La cavitazione della fase gassosa indotta da ultrasuoni produce variazioni di volume e grandi sforzi di taglio che possono perturbare la struttura del doppio strato, creando piccoli pori per una maggiore permeabilità o producendo una rottura su larga scala dell'intera liposfera, portando al rilascio immediato del farmaco caricato [198].

In alternativa, i farmaci possono essere precedentemente caricati in una nano-struttura, come la ciclodestrina, che può quindi essere collegata alla superficie delle nano-bolle. Il caricamento sul guscio della nano-bolla può anche essere ottenuto

usando le interazioni ligando-recettore (cioè il legame biotina-avidina) [199, 200]. L'integrazione delle nanoparticelle che circondano una bolla di gas rende questo un agente promettente sia per l'imaging potenziato con contrasto a US sia per la somministrazione di farmaci mediata dagli Ultrasuoni. Una nuova piattaforma di particelle costituita da microbolle stabilizzate da nanoparticelle polimeriche è stata studiata da Eggen [201]. Le nano-particelle polimeriche consistevano in poli (butilcianacrilato), che è biodegradabile e biocompatibile e potrebbe essere funzionalizzato con PEG e coniugato con molecole bioattive per il targeting.

Infine, la versatile struttura delle nanobolle può essere sfruttata per la consegna di due diversi farmaci sia nel caso di una terapia combinata che per scopi terapeutici. La terapia combinata con più farmaci per il trattamento dei tumori è già ampiamente utilizzata in campo medico [202].

È stata progettata una nuova formulazione di nanobolle basate sul destrano, coinvolte nella somministrazione di due farmaci chemioterapici, come il cisplatino e la doxorubicina. Il cisplatino caricato positivamente è localizzato all'interno del guscio, mentre la doxorubicina di base è immagazzinata nel nucleo. Le nano-bolle di destrano caricate con i due farmaci hanno mostrato una maggiore efficacia durante il trattamento in vitro delle linee cellulari tumorali quando sono state applicate le radiazioni ultrasoniche [191].

3.5.1 Formulazione di nano-bolle mirate

Le *targeted-nanoparticelle* hanno acquisito notevole importanza come efficiente sistema di rilascio di farmaci e geni, il che è dovuto alla loro capacità di raggiungere il più alto accumulo di agenti citotossici in una specifica patologia. Questo approccio che modifica la farmacocinetica e la biodistribuzione può migliorare l'efficacia del trattamento e limitare gli effetti collaterali. La *consegna mirata* può essere attiva o passiva. Nel targeting passivo, non viene utilizzato alcun ligando, mentre il targeting viene ottenuto incorporando l'agente terapeutico nel nanosistema che raggiunge in modo passivo l'organo bersaglio. Nel targeting attivo, il carrier è coniugato con un ligando specifico che riconosce il recettore specifico del tessuto o della cellula che è sovraespresso nel tessuto bersaglio. Le nanobolle sono anche sensibili alle modifiche superficiali che migliorano il loro segnale e selettività del tumore e riducono la tossicità. Anche il targeting delle nano-bolle attraverso le modifiche superficiali è considerata un interessante approccio teranostico.

Una strategia per assicurare la medesima selettività del tumore consiste nell'utilizzare specifiche bolle coniugate con anticorpi che si legano ai ligandi nei tumori. Le nanobolle potrebbero essere coniugate con molecole Affibody utilizzate come sonda per produrre agenti di contrasto ad ultrasuoni nano-dimensionali [203]. Nano-bolle rivestite da uno shell fosfolipidico nano-dimensionale uniforme ed un nucleo gassoso C_3F_8 sono state preparate utilizzando un metodo di idratazione a film sottile,

controllando lo spessore delle pellicole di fosfolipidi. Le nano-bolle sono state poi coniugate con molecole Affibody biotinilate anti-ErbB2, una piccolissima proteina ingegnerizzata con alta affinità e specificità per i tumori che sovraesprimono HER2. L'alta specificità dei coniugati nanobolle-Affibody per le cellule del cancro al seno che sovraesprimono HER2 è stata ampiamente dimostrata sia in vivo che in vitro [203]. Nano-bolle ad ultrasuoni accoppiate con nano-corpi specifici per anti-PSMA (specifico antigene della membrana della prostata) sono stati costruiti tramite un sistema biotina-streptavidina per facilitare l'imaging del cancro alla prostata [204]. La microscopia ha rivelato la capacità legante in vitro di nano-bolle mirate a cellule PSMA-positive, e la loro efficacia di imaging in vivo è stata dimostrata in tre tipi di xenotrapianti animali (LNCaP, C4-2 e MKN45).

3.6 Nano-bolle per la somministrazione di farmaci antitumorali

La strategia terapeutica basata sulla combinazione di nanobolle associate ai farmaci e agli US è stata inizialmente proposta per la chemioterapia del cancro.

La sensibilità cellulare al cisplatino e al 5-FU è stata efficacemente aumentata con nanobolle e ultrasuoni. Le nanogoccioline di perfluorocarburi sono i nuovi nanocarrier che possono essere vaporizzati con ultrasuoni per trasformarsi in bolle di gas su scala microscopica in situ. Dopo la vaporizzazione delle nanogoccioline di PFC, la bolla di gas su scala microscopica può interagire fortemente con la radiazione ultrasonica, così che le bolle possano essere utilizzate per l'imaging e la terapia del cancro.

Gao [205] ha prodotto un sistema di nano-bolle polimeriche per aumentare la sensibilità alla doxorubicina delle cellule cancerose, utilizzando gli US. I sistemi sviluppati includono nanogoccioline di perfluorocarburi stabilizzate da una parete di copolimero a blocchi biodegradabile (PEG-PLLA o PEG-PCL). Dopo il riscaldamento a temperature fisiologiche, le nanogocce si trasformano in nano / micro-bolle. Sotto l'azione dell'ecografia diretta dal tumore, le nanobolle caricate con doxorubicina cavitano e collassano, rilasciando il farmaco incapsulato e aumentando l'efficacia nella chemioterapia tumorale in vivo [205].

Rapoport [206] ha usato micelle polimeriche per incapsulare PFP liquido contenente doxorubicina. Per questo sistema, l'aumento della temperatura a 37 ° C ha causato la vaporizzazione delle nanogoccioline di PFP in bolle più grandi. È stato proposto che gli ultrasuoni focalizzati sul tumore potrebbero generare microbolle più grandi formate dalla coalescenza delle nano-goccioline vaporizzate. Rapoport, attraverso i suoi studi, è riuscito a dimostrare che le nano-goccioline di PFP stabilizzate con un polimero possono essere utilizzate per somministrare doxorubicina

nel caso di tumori e hanno dimostrato che la crescita del tumore potrebbe essere arrestata con questo metodo [189].

Sono stati ottenuti risultati entusiasmanti, in vitro e in vivo, per il rilascio di paclitaxel utilizzando nanogoccioline di perfluoro-pentano stabilizzate da copolimeri a blocchi anfifilici. Le nanoemulsioni di PFP caricate con paclitaxel, sistemicamente iniettate e combinate con ultrasuoni a 1 MHz hanno prodotto un'efficace regressione del tumore nei modelli murini di cancro al seno, alle ovaie e al pancreas [190].

I risultati di Rapoport hanno suggerito che la transizione da goccia a bolla e l'oscillazione delle bolle causano il rilascio di farmaci incapsulati e migliorano l'assorbimento intracellulare.

Il meccanismo dell'erogazione di farmaci mediata da ultrasuoni proposta per le nanogoccioline con perfluorocarburi stabilizzate con polimeri si basa sulla transizione da goccia a bolla.

Dopo la transizione da goccia a bolla, il volume delle particelle aumenta in modo significativo, il che si accompagna a una diminuzione dello spessore della goccia. Ci si aspetta che questo favorisca il rilascio del farmaco incapsulato, specialmente sotto l'azione di ultrasuoni che "strappano" la superficie del farmaco. L'aumento della superficie diminuisce la concentrazione del copolimero sulla superficie e può anche creare zone "nude" che facilitano anche il rilascio di farmaci.

In un altro studio di Du [206], la doxorubicina è stata incapsulata in micelle polimeriche, preparate usando poli (D, L-lactide-co-glicolide) -metossi-poli (glicole etilenico) (PLGA-mPEG). Dopo il riempimento con perfluoro-pentano, le micelle sono state trasformate in nanogocce, stabilizzate dal guscio in PEG e convertite in nanobolle a 37 ° C. È stato osservato il rilascio, attivato dagli ultrasuoni (40 kHz, 0,7 W / cm²), di doxorubicina dalle nanobolle, con alta dipendenza dal pH. Le nanogoccioline caricate con doxorubicina hanno mostrato una maggiore attività antitumorale e una riduzione della tossicità in un modello di tumorale murino, risultante dall'effetto di targeting del tumore e dalla mancanza di rilascio di farmaci nei tessuti normali.

Anche le nanobolle di poli (acido lattico-co-glicolico) (PLGA) sono state sfruttate da Zhang ed il suo team [207] sia come trasportatore mirato di farmaci, sia come mezzo di contrasto ecografico efficace, nonché come agente sinergico per l'ablazione con HIFU del coriocarcinoma. A tale scopo, le nanobolle caricate con metotrexate (MTX) sono state preparate e riempite con gas fluorocarburo, ed utilizzando un metodo di evaporazione a doppia emulsione.

Gli anticorpi monoclonali anti-HLA-G per il targeting attivo del tumore (mAbHLA-G) sono stati ulteriormente coniugati sulla superficie delle nanobolle. Le nano-bolle mAbHLA-G / MTX / PLGA hanno mostrato un'efficienza mirata ai tessuti tumorali, sia in vitro che in vivo, e conseguentemente, hanno potenziato l'imaging ultrasonico tumorale. Ulteriori valutazioni hanno dimostrato che le nanobolle mirate possono agire da agente sinergico per migliorare l'efficienza dell'ablazione HIFU

modificando l'ambiente acustico e che gli ultrasuoni focalizzati possono promuovere il rilascio su richiesta di MTX incorporato nel sistema [207].

Nuove nanogoccioline multifunzionali basate su perfloropentano stabilizzato dal copolimero a blocchi anfifilico (polietilen glicole block-polycaprolactone) sono state progettate per la somministrazione mediata da US di curcumina [208]. In vivo, le nanogocce hanno trattenuto con forza la curcumina caricata e hanno rilasciato il farmaco sotto ADV, implementando così un efficace targeting nel tumore. Una maggiore riduzione della crescita tumorale nei topi portatori di tumore è stata osservata dopo la somministrazione di nanogoccioline caricate con curcumina combinata con ultrasuoni [208].

Le onde d'urto extracorporee (ESW), onde acustiche largamente utilizzate nella litotripsia senza effetti collaterali, sono state recentemente proposte come un nuovo strumento per aumentare il rilascio di farmaci da nanobolle cariche di farmaci anticancro. Le ESW producono cavitazione senza riscaldamento, determinando la permeabilizzazione delle membrane plasmatiche e possono essere focalizzate con alta precisione in profondità. Tutte queste caratteristiche rendono le ESW un'alternativa ideale agli ultrasuoni nella strategia di somministrazione del farmaco. Nuove nanobolle di glicol-chitosano riempite con perfluoropentano sono stati progettate per la somministrazione di doxorubicina [209]. La combinazione di nano-bolle caricate con doxorubicina ed onde d'urto extracorporee è stata studiata per individuare la doxorubicina e migliorare il suo effetto antitumorale nelle linee cellulari di carcinoma anaplastico della tiroide (cellule ATC). Il trattamento combinato con NB e ESW con doxorubicina è risultato più citotossico della doxorubicina libera, causando approssimativamente una riduzione del 40% nel farmaco GI50. In effetti, le onde d'urto estracorporee hanno migliorato l'assorbimento intracellulare delle nanobolle caricate con farmaci ed hanno aumentato l'accumulo nucleare di doxorubicina [209].

Concludendo, le nanobolle sono in grado di offrire diverse caratteristiche utili nella somministrazione di farmaci antitumorali, migliorando l'assorbimento della linea cellulare cancerosa di un farmaco chemioterapico. Questo sistema può fornire una strategia promettente per la somministrazione specifica del farmaco antitumorale, riducendo l'esposizione del tessuto non bersaglio al farmaco, eliminando così gli effetti collaterali sistemici e riducendo le dosi terapeutiche.

3.7 Nano-bolle per la somministrazione di acido nucleico

L'associazione degli Ultrasuoni con bolle cariche di acido nucleico è stata proposta per migliorare l'efficacia di somministrazione, a causa dei fenomeni di sonoporazione. Inoltre, questo approccio può portare ad un rilascio nello specifico sito dei materiali genetici che riducono la trasfezione dei tessuti non in-sonificati.

L'uso di microbolle come veicoli per la consegna di geni e agenti che migliorano la transfezione è diventato sempre più popolare negli ultimi anni [210, 211]. Sono stati proposti vari metodi per la consegna di geni usando le bolle, a partire dalla somministrazione con acido nucleico alla loro associazione all'interno della struttura della bolla. Queste strategie includono: incorporazione fisica diretta del DNA nel guscio delle microbolle durante la fabbricazione, uso di lipidi cationici incorporati nel guscio per legare il DNA elettrostaticamente, uso di uno o più strati di polimero cationico sul guscio della bolla per legare il DNA elettrostaticamente, legame covalente DNA-carrier di nanoparticelle e l'uso di filamenti di DNA complementari per caricare le nanoparticelle. La maggior parte di queste formulazioni di bolle ha dimostrato un'elevata capacità di carico del DNA e / o un'elevata efficienza di trasfezione [212]. Più recentemente, le bolle di dimensione submicrometriche sono state progettate e proposte come un potenziale strumento per la consegna di geni.

Nel contesto della somministrazione di acido nucleico, Yin [213] ha sintetizzato nanobolle sensibili agli Ultrasuoni che portano il siRNA per la terapia del tumore attraverso una particolare strategia di assemblaggio al fine di colpire il gene dell'antiapoptosi SIRT2. L'applicazione degli US ha migliorato l'effetto di silenziamento genico delle nanobolle di siRNA, sia in vitro che in vivo, determinando un notevole aumento dell'apoptosi delle cellule tumorali. Di conseguenza, un effetto terapeutico significativamente migliorato è stato ottenuto in un modello di glioma murino. Le nanobolle di siRNA sensibili agli US possono essere un vettore di consegna ideale per mediare l'interferenza dell'RNA altamente efficace per il trattamento del tumore.

Successivamente, sulla base dei risultati incoraggianti, sono state preparate delle nano-bolle sensibili agli Ultrasuoni, che hanno simultaneamente incapsulato l'agente chemioterapico paclitaxel (PTX) e siRNA, bersagliando il gene BCL-2 (siRNA BCL-2) per il trattamento del carcinoma epatocellulare [214]. Usando una forza ultrasonica a bassa frequenza, diretta contro il sito del tumore, è stata ottenuta un'efficace penetrazione del tumore e consegna del siRNA e del PTX mediante iniezione in vena caudale di nanobolle nei topi portatori di xenotrapianti umani HepG2. A causa dell'effetto sinergico antitumorale di due agenti terapeutici, la crescita tumorale è stata completamente inibita usando il PTX a basse dosi negli studi sugli animali. Nanobolle contenenti recettori per gli androgeni (AR) siRNA sono state preparate da Wang [215] utilizzando poli-L-lisina e metodi di adsorbimento elettrostatico, per il trattamento del carcinoma prostatico androgeno-indipendente.

Il trattamento con nanobolle di siRNA combinato con l'irradiazione ultrasonica ha inibito significativamente la crescita cellulare e ha portato alla soppressione dell'RNA, dell'mRNA e dell'espressione proteica.

È stato sviluppato un nuovo sistema di targeting siRNA per tumori EphA2-positivi, basato su CPP e nano-bolle ultrasuoni-sensibili. La stimolazione ad ultrasuoni locale ha attivato il rilascio di CPP-siRNA dalle nanobolle e ne ha attivato

la penetrazione. Dopo la somministrazione sistemica nei topi, le nanobolle di CPP-siRNA si sono accumulate nel tumore, ed hanno aumentato l'effetto di silenziamento del c-Myc ed il ritardo della progressione tumorale [216, 217, 218, 219, 220, 221].

3.8 Nano-bolle per la somministrazione di ossigeno

La somministrazione di gas terapeutici è stata al centro di un crescente interesse. Molte ricerche si sono incentrate sulla somministrazione di ossigeno, dal momento che molte condizioni mediche, come diabete, ustioni, piaghe da decubito e ferite, sono collegate ad un insufficiente apporto di ossigeno ai tessuti. Inoltre, la carenza di ossigeno, insieme all'acidosi, è anche il principale segno distintivo dei tumori solidi cancerosi. Per di più, la somministrazione mirata di ossigeno potrebbe essere un utile coadiuvante per la terapia antibiotica delle infezioni anaerobiche. Questi sono, pertanto, potenziali campi di applicazione delle nanobolle cariche di ossigeno, oltre ad altri approcci per l'ossigenazione, come l'uso di microbolle, nanospugne o liposomi ecogeni [222, 223, 224, 225, 226, 227]. È interessante notare che i fluorocarburi sono in grado di dissolvere e immagazzinare ossigeno, una caratteristica che viene sfruttata da un numero relativamente alto di formulazioni.

Nel 2009, Cavalli insieme al suo team [228], ha progettato delle particolari nanobolle basate su destrano comprendenti un guscio di solfato di destrano e un nucleo di perfluoropentano in cui è stato caricato l'ossigeno. Questo sistema ha una buona capacità di incapsulare e immagazzinare ossigeno e non presenta né attività emolitica né effetti tossici sulle linee cellulari. Le nanobolle riempite di ossigeno erano in grado di rilasciare passivamente l'ossigeno in soluzioni a diversi livelli ipossici. La cinetica del rilascio di ossigeno potrebbe essere migliorata dopo l'insonizzazione della nano-bolle con gli ultrasuoni. Inoltre sono stati sviluppati sistemi con shell di chitosano. La capacità delle bolle di chitosano cariche di ossigeno di rilasciare ossigeno è stata studiata in assenza o in presenza di ultrasuoni, dimostrando che sia la frequenza che la durata della sonicazione hanno influenzato la cinetica di scambio gassoso [229].

Nel 2014, Matsuki [230] ha dimostrato che le nanobolle contenenti ossigeno possono generare fluidi supersaturi di ossigeno e possono essere sufficientemente piccole da essere infuse in modo sicuro nei vasi sanguigni. Una normale soluzione salina contenente nanobolle riempite di ossigeno era efficace per migliorare l'ossigenazione del sangue. Pertanto, l'uso di nanobolle contenenti ossigeno contenenti fluidi è un metodo potenzialmente efficace e innovativo per migliorare l'ossigenazione del sangue nei casi di ipossia, malattie ischemiche, controllo delle infezioni e terapie di chemioterapia anti-tumorale. I nanocarrier di ossigeno, con nucleo di 2H, 3H-decafluoropentano (DFP), sono chiamati nano-goccioline cariche di ossigeno (OLND) per distinguerli

dai precedenti sistemi contenenti perfluoropentano. Magnetto [231] ha prodotto dei nano-carrier di ossigeno, costituiti da un core di DFP e fluorocarburi e chitosano come polisaccaride dello shell, disponibile in formulazioni liquide o gel. La struttura polimerica simile a gel in soluzione può ridurre la diffusione del gas.

Tali nano-goccioline contenenti ossigeno hanno una buona capacità di trasportare ossigeno e non hanno effetti tossici sui cheratinociti umani. In vitro, gli OLND sono molto efficaci nel rilasciare ossigeno con o senza la somministrazione di Ultrasuoni complementare. In vivo, la sonicazione degli OLND applicati localmente appare essenziale per consentire un rilascio di ossigeno significativo e prolungato nel tempo.

Gli OLND in vitro sono più efficaci nel rilasciare ossigeno in ambienti ipossici rispetto alle precedenti nanobolle con perfluoropentano, come dimostrato dall'ossimetria. In vivo, gli OLND migliorano efficacemente i livelli di ossiemoglobina, come rivelato dalle indagini di imaging fotoacustica. È interessante notare che il trattamento con gli Ultrasuoni migliora ulteriormente il rilascio di ossigeno transdermico dagli OLND.

In generale, i risultati hanno dimostrato che le nanogoccioline caricate con ossigeno possono essere utilizzate per promuovere processi di guarigione delle ferite croniche [232]. Allo stesso modo, Khadjavi [233] ha dimostrato che le nanogoccioline rivestite di chitosano e caricate con ossigeno potrebbero essere un promettente approccio per promuovere i processi di guarigione nelle ferite ipossiche.

3.9 Nano-bolle per altre applicazioni

Nello specifico, sono state studiate le nano-bolle caricate con farmaci combinate con gli ultrasuoni per la loro capacità di attirare i farmaci all'interno di siti specifici. Nanobolle a base di lipidi contenenti perfluoropentano sono state preparate per la somministrazione di apomorfina cloridrato, un agonista del recettore della dopamina, una molecola chimicamente instabile con bassa biodisponibilità. Pertanto, il suo incapsulamento in un sistema di somministrazione potrebbe superare problemi di instabilità e una breve emivita, indirizzando efficacemente il farmaco al sistema nervoso centrale [234]. In termini di stabilità, i risultati sperimentali hanno indicato che le nanobolle potrebbero proteggere l'apomorfina dalla degradazione. Il rilascio di farmaci in vitro è stato prolungato nel tempo ed è stato potenziato dall'insonazione, dimostrando un possibile effetto di targeting per i farmaci [235].

Inoltre, questi nuovi sistemi di somministrazione di farmaci di dimensioni nano potrebbero essere una strategia promettente per superare le attuali sfide associate alla terapia antibiotica.

In base alle loro proprietà fisico-chimiche, i nanomateriali potrebbero facilitare la consegna antimicrobica mirata e combattere il problema della resistenza agli antibiotici. Date le proprietà antimicrobiche e immunitarie del chitosano, Anche ha

proposto delle nanogoccioline caricate di ossigeno con shell di chitosano e core di decafluoropentano (OLN) [236] come strumento innovativo per il trattamento adeguato delle ferite croniche infette. Le nanogoccioline caricate con ossigeno hanno mostrato una significativa attività citostatica contro allo *Staphylococcus aureus* (MRSA) meticillina-resistente e contro alla *Candida albicans* ed hanno anche mostrato nessuna tossicità sui cheratinociti umani (cellule HaCaT). Inoltre, il trattamento a ultrasuoni complementare ha promosso l'erogazione transdermica di ossigeno dalle nanobolle ai tessuti ipossici.

Un'altra applicazione è lo sviluppo di un sistema che fornisce supporto per imaging al trattamento terapeutico. Questo approccio, che è chiamato *approccio teranostico*, sembra essere particolarmente efficace nel migliorare il trattamento del cancro o di altre importanti malattie in una fase iniziale, in quanto può visualizzare i tessuti patologici monitorando anche la cinetica di somministrazione e la biodistribuzione di un farmaco, ottenendo in tal modo importanti benefici in termini di terapia di sintonizzazione e dosi e riduzione degli effetti collaterali avversi [237, 238, 239, 240].

I sistemi di dimensioni nanometrici sono promettenti strumenti teranostici perché le loro dimensioni favoriscono un tempo di circolazione prolungato dopo la somministrazione endovenosa e una buona capacità di carico. Diversi sistemi nanotecnologici sono stati presi in considerazione per il trasporto di sonde e farmaci, ad esempio nanoparticelle polimeriche, micelle, vescicole e liposomi [241, 242]. Idealmente, per scopi teranostici, il nanocarrier dovrebbe essere stabile (vale a dire, nessun rilascio di farmaci in distretti corporei diversi dal bersaglio biologico), facilmente sintonizzabile con elevata capacità di carico utile e proprietà multifunzionali.

Ad esempio, le nanobolle lipidiche per il rilevamento tramite imaging con Ultrasuoni sono state proposte come un sistema di contrasto in vivo per l'imaging e come sistema di somministrazione di farmaci tumorali [243].

Nel 2015 Cavalli [244] ha sviluppato una formulazione a base di chitosano contenente prednisolone fosfato come modello di farmaco ed il complesso paramagnetico Gd-DOTP è stato preparato e testato in vitro come agente T1-MRI. Queste nanobolle teranostiche presentavano una carica superficiale positiva che consentiva l'interazione con il complesso Gd-DOTP caricato negativamente. L'efficienza dell'incapsulamento era buona in entrambi i composti attivi ed un profilo prolungato di rilascio del farmaco è stato osservato in vitro. Un marcato aumento della cinetica di rilascio del prednisolone fosfato è stato ottenuto dopo che il sistema è stato esposto agli ultrasuoni. Inoltre, la rilassività della sonda MRI è cambiata dopo l'incorporazione nel guscio della nano-bolla, offrendo così un'opportunità interessante in un esperimento duale MRI-Ultrasuoni. Sulla base di questi risultati, le nanobolle di chitosano caricate con il complesso Gd (III) legato al loro guscio potrebbero essere considerate una nuova piattaforma per l'imaginag e il rilascio di farmaci con l'importante possibilità di migliorare i trattamenti antitumorali.

Rapoport [245] si è concentrato su nuove nano-goccioline ecogeniche di fluoro-15- con coronA-5-etero (PFCE) che manifestavano proprietà di contrasto sia agli ultrasuoni che alla fluorina MR, consentendo una duale modalità di imaging. La regressione del tumore è stata ottenuta con goccioline PFCE caricate con paclitaxel. A causa della mancata corrispondenza dell' impedenza acustica tra PFCE e tessuto circostante, le goccioline potrebbero essere visualizzate con ultrasuoni in circolazione, consentendo lo sviluppo di sistemi di rilascio di farmaci guidati da immagini.

Un'altra importante applicazione per questi sistemi è la vaccinazione cancerosa. Un vaccino contro il cancro è un vaccino che tratta il cancro esistente o previene lo sviluppo di un cancro [246]. Nel 2014 Dewitte ed altri [247] hanno sviluppato nuovi vaccini contro il cancro basati sulla formulazione di bolle. Gli esperimenti in vivo hanno mostrato una regressione del tumore di circa il 30% negli animali vaccinati. Oda [248], invece, propose i liposomi a bolle come vaccino contro il melanoma metastatico. L'immunizzazione profilattica con liposoma a bolle combinato con ultrasuoni ha permesso una quadrupla diminuzione della frequenza delle metastasi polmonari del melanoma.

3.10 Prospettive future e conclusioni

Le nanobolle combinate con gli ultrasuoni sono oggetto di molte ricerche in relazione al loro potenziale utilizzo come promettenti strumenti terapeutici in vari contesti clinici.

Presentano una serie di caratteristiche che le rendono particolarmente adatte ad un' avanzata strategia di drug delivery. La versatilità strutturale delle nanobolle consente un'efficiente integrazione con diverse molecole attive, in altre parole, gas terapeutici, farmaci, geni e molecole biologiche. I nano-carrier forniscono un'innovativa piattaforma multifunzionale per la somministrazione di farmaci, adatta per una vasta gamma di applicazioni terapeutiche e percorsi di somministrazione. Oltre che mediante Ultrasuoni, la consegna mirata potrebbe anche essere ottenuta progettando sistemi di nano-bolle con ligandi specifici attaccati alla superficie del loro guscio.

Le nanobolle giocheranno un ruolo importante nelle future applicazioni della nano-medicina. Le proprietà fisico-chimiche delle nano-bolle possono essere personalizzate per sviluppare sistemi intelligenti che rispondano agli stimoli endogeni al fine di fornire la molecola terapeutica on-demand, nel campo della nano-medicina personalizzata. La combinazione di imaging diagnostico e modalità terapeutiche di erogazione potrebbe essere ottenuta sviluppando nano-bolle caricate con farmaci *multi-detectable* con l'ulteriore possibilità di monitorare la cinetica di consegna e la biodistribuzione del farmaco dopo la somministrazione.

In conclusione, sebbene le nanobolle rappresentino un nuovo strumento per fornire un'efficace rilascio *site-specific* e *on-demand*, alcuni punti della ricerca devono

ancora essere chiariti ed approfonditi, vale a dire l'effetto cavitazionale mediato dagli ultrasuoni su cellule e tessuti, la stabilità nel sangue, l'interazione con proteine plasmatiche, alcuni aspetti di biodistribuzione e la nano-tossicologia.

Capitolo 4

Modello termodinamico delle nano-bolle

Il processo di formazione della bolla può essere descritto utilizzando *la variazione di potenziale di Gibbs* tra lo stato liquido e quello vapore per una singola bolla:

$$\begin{aligned}\Delta G &= -\Delta G_{IV} + \Delta G_t = -[(N - n)\mu_V + n\eta_l - N\mu_l] + 4\pi r^2\sigma = \\ &= -N(\mu_V - \mu_l) + n(\mu_V - \mu_l) + 4\pi r^2\sigma = -(N - n)(\mu_V - \mu_l) + 4\pi r^2\sigma\end{aligned}\quad [249] \quad (4.1)$$

dove N è il numero totale di molecole, n è il numero di molecole legate nello stato liquido e $N - n$ è il numero di molecole nello stato di vapore, μ_V il potenziale chimico del vapore, r il raggio della bolla e σ la sua tensione superficiale.

Il numero di molecole nello stato di vapore può essere determinato considerando il volume della bolla, ovvero:

$$\frac{4}{3}\pi r^3 = (N - n)V_{vmol} \rightarrow (N - n) = \frac{\frac{4}{3}\pi r^3}{V_{vmol}} = \xi \quad [249] \quad (4.2)$$

dove V_{vmol} è il volume occupato dalla molecola nello stato di vapore e ξ è il rapporto tra il volume della bolla e il volume occupato dalla singola molecola nello stato di vapore, quindi la relazione (4.1) diventa:

$$\Delta G = -\frac{\xi}{N_A}(\mu_V - \mu_l) + 4\pi r^2\sigma \quad [249] \quad (4.3)$$

Se il vapore non condensa, allora si trova in uno stato surriscaldato e può essere trattato come un gas ideale per cui:

$$v_v e_v = k_B T \quad [249] \quad (4.4)$$

dove k_B è la costante di Boltzmann, v_v è il volume specifico del vapore [$\text{m}_3 \text{kg}_-1$] e e_v è l'energia su volume specifico del vapore [J kg m_-3]; inoltre:

$$\mu_V - \mu_l = k_B T \ln \left(\frac{e}{e_s} \right) = k_B T \ln \left(\frac{P}{P_s} \right) \quad [249] \quad (4.5)$$

dove e_s e p_s sono rispettivamente l'energia per unità di volume specifico alla saturazione e la pressione di saturazione alla temperatura di lavoro.

Allora l'equazione (4.3) diventa:

$$\Delta G = \frac{4\pi}{3V_{vmol}} r^3 k_B T \ln \left(\frac{P}{P_s} \right) + 4\pi r^2 \sigma = r^2 \left[-\frac{4\pi}{3V_{vmol}} r k_B T \ln \left(\frac{P}{P_s} \right) + 4\pi \sigma \right] \quad [249] \quad (4.6)$$

Si ha un processo naturalmente sviluppato quando la funzione di Gibbs risulta negativa, ovvero se:

$$\Delta G < 0 \rightarrow r > \frac{3V_{vmol}}{k_B T \ln \left(\frac{P}{P_s} \right)} \sigma \quad [249] \quad (4.7)$$

che risulta verificata solo se $P < P_s$. Considerando una distribuzione di Gibbs del numero di bolle si avrà che :

$$n_b(r) = n_{b0} \exp \left[-\frac{\Delta G}{k_B T} \right] = n_{b0} \exp \left[-\frac{3V_{vmol}}{(k_B T)^2 \ln \left(\frac{P}{P_s} \right)} \sigma \right] \quad [249] \quad (4.8)$$

Ci si può chiedere se esiste un valore critico per il quale l'incipienza diventa stazionaria. Per trovarlo occorre studiare il segno della variazione della funzione di Gibbs in funzione del raggio:

$$\frac{d(\Delta G)}{dr} = 0 \rightarrow r_c = \frac{2\sigma V_{vmol}}{k_B T \ln \left(\frac{P}{P_s} \right)} \quad [249] \quad (4.9)$$

ritrovando così l'equazione di Kelvin.

4.1 Modello termodinamico della cavitazione

Si considera adesso un sistema aperto, e si analizza un certo volume di controllo ben definito attraverso il quale vi è scambio di materia ed energia; si ipotizza inoltre che l'unica variabile responsabile della formazione di bolle sia la *pressione*. Una variazione di pressione innesca la transizione di fase liquido-vapore, e conseguentemente il sistema assume un certo titolo $x = \frac{m_{\text{vap}}}{(m_{\text{vap}} + m_{\text{liq}})}$ legato proprio alla formazione di bolle; questo avviene, in linea teorica, mantenendo costante la temperatura del sistema (sebbene, localmente, la transizione di fase induce variazioni di temperatura). Un concetto che permette di garantire la stabilità dei vari stati termodinamici verso cui l'intero sistema evolve durante il fenomeno di cavitazione, è quello della **massima variazione dell'entropia** legato all'irreversibilità del sistema (in questo caso ci si riferisce ad effetti di cavitazione non transitori ma costanti nel tempo).

La variazione di entropia in un certo intervallo di tempo, riferita ad un fluido che passa attraverso un condotto orizzontale è riportata nell'equazione (4.10) in cui si assume il sistema in regime stazionario.

$$\frac{\Delta S_{\text{irr}}}{\Delta \tau} = \frac{\dot{m}}{T_m} \left(\int_{in}^{out} V dP + \int_{in}^{out} w dw \right) \quad [249] \quad (4.10)$$

In cui \dot{m} è la quantità di massa di fluido entrante nel volume, T_m è la temperatura globale del sistema, $\Delta \tau$ è il tempo in cui il fluido attraversa il volume stesso, ed infine w è la velocità del fluido nel condotto.

Il dP (legato alla tensione superficiale delle bolle formatesi durante il processo) può essere espresso (4.11) in funzione del calore latente $\lambda(T)$ (a sua volta esprimibile come funzione lineare della temperatura $\lambda(T) = a + bt$ con a e b costanti proprie del vapore diluito in un liquido). La velocità w invece può essere espressa in funzione del titolo x come riportato nella (4.12).

$$dP = \frac{\lambda(T)dT}{TV_{\text{diff}}} = \frac{(a + bt)dT}{T_{V\text{diff}}} \quad [249] \quad (4.11)$$

$$w = \frac{\dot{m}}{A}(V_{\text{liq}} + xV_{\text{diff}}) \quad [249] \quad (4.12)$$

Si considera adesso, la relazione (4.13) in cui, a sua volta, la variazione di entropia specifica dipende dal calore specifico c del liquido secondo la relazione (4.14).

$$x \frac{\lambda(T)}{T} = x_{\text{in}} \frac{\lambda(T)}{T_{\text{in}}} - [s_{\text{liq}}(T) - s_{\text{liq}}(T_{\text{in}})] \quad [249] \quad (4.13)$$

$$s_{\text{liq}}(T) - s_{\text{liq}}(T_{\text{in}}) = c \ln \frac{T}{T_{\text{in}}} \quad [249] \quad (4.14)$$

Sostituendo quindi la (4.14) nella (4.13) si ottiene una nuova espressione del titolo, riportata di seguito.

$$x = x_{\text{in}} \frac{\lambda(T)}{T_{\text{in}}} - c \frac{T}{\lambda(T)} \ln \left(\frac{T}{T_{\text{in}}} \right) \quad [249] \quad (4.15)$$

Quest'espressione completa del titolo (4.15), può essere sostituita nell'espressione della velocità (4.12) e quest'ultima viene allora derivata rispetto alla temperatura e si ottiene l'espressione del dw in funzione del dT da inserire nella (4.10). Attraverso queste sostituzioni l'equazione (4.10) può quindi essere riscritta nel seguente modo.

$$\frac{\Delta S_{\text{irr}}}{\Delta \tau} = \frac{\dot{m}}{T_{\text{m}}} \int_{\text{in}}^{\text{out}} \left[\left(\frac{v_{\text{liq}}}{v_{\text{diff}}} + x \right) \frac{a + bT}{T} + \frac{\dot{m}^2}{A^2} v_{\text{diff}} \left(v_{\text{liq}} + x v_{\text{diff}} \right) \left(\frac{x}{T} - \frac{bx + c}{a + bT} \right) \right] dT \quad [249] \quad (4.16)$$

Da precisare che v_{liq} è il volume specifico del liquido e $v_{\text{diff}} = v_{\text{vap}} - v_{\text{liq}}$. Chiaramente nell'ipotesi di sistema chiuso, il liquido è fermo, ed il contributo dato dalla (4.12) sarebbe stato nullo.

Altri approcci per lo studio della cavitazione prevedono il calcolo della pressione locale attraverso l'equazione di Clausius-Clapeyron (con $T = T_{\text{in}} - \Delta T$) (4.17) ed il calcolo del cosiddetto *coefficiente di cavitazione*, un coefficiente adimensionale usato ad esempio per identificare il fenomeno nelle tubature di determinati sistemi (4.18).

$$\ln \frac{P(T)}{P_{\text{in}}} = \frac{a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{in}}} \right) + \frac{b}{R} \ln \frac{T}{T_{\text{in}}} \quad [249] \quad (4.17)$$

$$C_a = \frac{P - P_{\text{vap}}}{\frac{1}{2} \rho \omega^2} \quad [249] \quad (4.18)$$

Al numeratore P è la pressione locale, P_{vap} pressione del vapore, al denominatore l'energia cinetica espressa con la densità del fluido.

4.2 Cavitazione: Espressione matematica della pressione esercitata dall'onda

Il modello termodinamico che si è fino ad ora tentato di ricostruire può essere ulteriormente ottimizzato e reso più specifico per il campo farmaceutico.

Le onde di pressione che innescano i fenomeni cavitativi, vengono generate da appositi dispositivi, applicati localmente. I possibili contesti applicativi di questo senso possono essere molteplici (paragrafi 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9): le onde di pressione in questione potrebbero, ad esempio, scatenare un processo di vaporizzazione della fase volatile contenuta nelle bolle, migliorando l'effetto di contrasto durante procedimenti di screening, oppure sfruttare il processo per rilasciare farmaci o altre sostanze in determinati distretti corporei.

Il valore efficace dell'onda pressoria può essere espresso, in maniera approssimativa, considerando diversi fattori fra cui la *velocità di risalita delle bolle*, la cui espressione, trovata facilmente in letteratura, è di seguito scritta utilizzando i simboli già presenti nella trattazione (4.19).

$$w = \frac{2g \left(\frac{1}{V_{\text{liq}} + xV_{\text{vap}}} - \frac{1}{V_0} \right) a^2}{9\eta} \quad [249] \quad (4.19)$$

Da questa si può facilmente ricavare l'espressione del titolo x , (4.20):

$$x = \left[\frac{1}{\frac{9\eta w}{2ga^2} + \frac{1}{V_0}} - V_{\text{liq}} \right] V_{\text{vap}} \quad [249] \quad (4.20)$$

Partendo poi dalla formula (4.10), assumendo che il fluido in questione sia fermo (velocità nulla) e combinando la definizione di titolo si ottiene la seguente espressione:

$$\Delta S = \frac{m}{T_m} \int_{P_0}^P (1-x)V_{\text{liq}} dP + \frac{m}{T_m} \int_{P_0}^P xV_{\text{vap}} dP \quad [249] \quad (4.21)$$

Ipotizzando adesso che il volume di liquido non sia funzione della pressione, che il vapore formato durante i vari cicli di pressione non ricondensi e che sia quindi assimilabile ad un gas ideale ($P_{\text{vap}} = R_{\text{vap}} T$) si ricava la (4.22):

$$\Delta S = \frac{m}{T_m} \int_{P_0}^P (1-x)V_{\text{liq}} dP + \frac{m}{T_m} \int_{P_0}^P xR_V T \frac{dP}{P} \quad [249] \quad (4.22)$$

Applicando il principio di *massima variazione di entropia*:

$$\left[(1-x)V_{\text{liq}} + x \frac{R_V T}{P} \right] dP = 0 \quad [249] \quad (4.23)$$

si ricava una nuova espressione del titolo:

$$x = \frac{V_{\text{liq}}}{V_{\text{liq}} + \frac{R_V T}{P}} \quad [249] \quad (4.24)$$

L'equazione (4.24) deve essere contemporaneamente valida a quella che esprime il raggio critico r_c della bolla (4.9): deve cioè essere soddisfatto il seguente sistema di equazioni:

$$\begin{cases} x = \frac{V_{\text{liq}}}{V_{\text{liq}} + \frac{R_V T}{P}} \\ r_c = \frac{2\sigma V_{\text{vmol}}}{k_B T \ln\left(\frac{P}{P_s}\right)} \end{cases} \quad [249] \quad (4.25)$$

E' possibile a questo punto ricavare la pressione (4.26) dalla prima equazione del sistema, pressione che può poi essere eventualmente sostituita nella seconda equazione del sistema per trovare un'espressione più complessa e più completa del raggio critico (4.27).

$$P = \frac{R_V T}{V_{\text{liq}} \left(\frac{1}{x} - 1 \right)} \quad [249] \quad (4.26)$$

$$r_c = \frac{2\sigma V_{\text{vmol}}}{k_B T \ln\left(\frac{R_V T(1-x)}{x V_{\text{liq}} P_s}\right)} \quad [249] \quad (4.27)$$

Infine, sostituendo l'espressione del titolo ricavata a partire dalla velocità di risalita (4.20) nell'equazione (4.26) della pressione, si ottiene l'equazione finale (4.28).

Si tratta di un'espressione, ricavata in maniera assolutamente teorica, che riesce a mettere insieme la pressione dell'onda P con la velocità di risalita, con le caratteristiche del liquido nella bolla, ma anche con le caratteristiche dell'ambiente.

$$P = \frac{R_V T}{V_{\text{liq}} \left(\frac{\frac{9\eta w}{2ga^2} + \frac{1}{V_0}}{\left[1 - V_{\text{liq}} \left(\frac{9\eta w}{2ga^2} + \frac{1}{v_0} \right) \right] V_{\text{vap}}} - 1 \right)} \quad [249] \quad (4.28)$$

4.3 Modello di nano-bolle create a partire da un'emulsione con fase volatile (PCE)

Queste particolari nano-bolle contengono un liquido a basso punto di ebollizione (la fase volatile) disperso in una fase acquosa. L'applicazione degli ultrasuoni determina anche un aumento di temperatura, che fa evaporare il liquido disperso determinando un aumento di volume dell'emulsione strettamente dipendente dal raggio iniziale delle bolle disperse nella fase acquosa. In questa fase, è consigliabile non produrre bolle troppo grandi e garantire una buona tensione superficiale per una buona stabilità dell'emulsione.

Il modello descritto in questo contesto risulta ancor più specifico rispetto a quelli descritti nei paragrafi 4.1 e 4.2.

La fase volatile subisce, sotto riscaldamento, una transizione di fase, da liquido a gas, si osserva pertanto una variazione nel volume occupato dal materiale volatile all'interno dell'emulsione. È possibile caratterizzare l'aumento di volume tramite il **rapporto volume della bolla (gas) su volume della gocciolina (liquido)**, V_b/V_d , in funzione del raggio della gocciolina originale, r_d , e questo prende il nome di **Rapporto del volume di attivazione**. Il numero di moli, n_d , di materiale volatile in una goccia di liquido è determinata dal volume di liquido molare del materiale volatile, $n_d = V_d/V_{m,l}$. Il volume molare liquido è descritto da

$$V_{m,l} = \frac{M_{wt}}{\rho_l} \quad (4.29)$$

dove M_{wt} è la massa molare del liquido; e ρ_l è la densità della fase volatile in forma liquida. Il volume di una bolla viene calcolato tramite la legge del gas ideale dalla pressione della bolla, P_b , e il numero di moli di materiale volatile presenti al suo interno, n_b ,

$$V_b = \frac{n_b RT}{P_b} \quad (4.30)$$

La teoria di Unger [250] trascura l'aumento della pressione in seguito alla diminuzione delle dimensioni delle bolle (si utilizza la pressione ambiente, $P_b = P_0$), e trascura anche la solubilità del materiale volatile assumendo che il numero di moli di materiale volatile in una bolla sia uguale a quello della gocciolina che fa da precursore, $n_b = n_d$. Di conseguenza, il rapporto del volume di attivazione nella teoria di Unger è costante e indipendente dalla dimensione della gocciolina. Il cambiamento di volume previsto dalla teoria di Unger è descritto da

$$\left(\frac{V_b}{V_d}\right)_{\text{Unger}} = \frac{RT}{P_0 V_{m,l}} \quad (4.31)$$

Il rapporto di Unger è valido esclusivamente per le bolle di grandi dimensioni. È possibile estendere tale teoria per descrivere il comportamento delle microbolle e

delle nanobolle usando l'equazione Young - Laplace per fornire la pressione all'interno di una bolla. L'equazione di Young - Laplace per un corpo sferico è definita come

$$\Delta P = P_b - P_0 = \frac{2\gamma_b}{r_b} \quad (4.32)$$

dove γ_b è la tensione interfacciale gas - liquido della bolla (N , m¹); e r_b è il raggio della bolla (m). Inserendo questa pressione nell'equazione (4.30) e riordinando (usando $V_b = 4/3\pi(r_b)^3$), si ottiene "un'equazione madre" che definisce il raggio della bolla,

$$\frac{4\pi P_0}{3}(r_b)^3 + \frac{8\pi\gamma_b}{3}(r_b)^2 - n_b RT = 0 \quad (4.33)$$

Questa equazione consente di tenere conto della pressione di Laplace nella determinazione del raggio della bolla. Applicando una serie di ipotesi diverse relative alla solubilità della fase volatile, è possibile prevedere l'aumento di volume. L'ipotesi più semplice, utilizzata anche nella teoria di Unger, prevede che $n_b = n_d$ e si trascura la solubilità della fase volatile completamente: questa è riportata in letteratura con il termine di **teoria della PCE non equilibrata** . Al contrario, la **teoria della PCE equilibrata** spiega la solubilità della fase volatile, sia nella fase liquida che nella fase gassosa. È presente anche una teoria intermedia (**PCE parzialmente equilibrata**) che unisce i due casi estremi.

Capitolo 5

Risultati sperimentali

5.1 Materiali e metodi

5.1.1 Preparazione delle nanobolle

300 microlitri di una soluzione etanolica di Epikuron 200 (1%, w/ w) contenente un co-tensioattivo sono stati aggiunti a 500 microlitri di perfluoropentano a temperatura ambiente. Quindi, 4,8 ml di acqua ultrapura sono stati aggiunti lentamente alla miscela (sotto lieve agitazione) fino alla formazione di un'emulsione. Successivamente, il sistema è stato omogeneizzato per tre minuti a 12.000 rpm utilizzando un omogeneizzatore ad alto taglio (Ultraturrax, IKA, Germania) in un bagno di ghiaccio. La terza fase consiste nell'aggiunta goccia a goccia di una soluzione acquosa di chitosano (pH = 5,0) per formare il guscio polimerico delle nanobolle. Per ottenere, invece, nanobolle con shell di glicolchitosano, una soluzione acquosa di glicolchitosano (2,7% w / v) è stata aggiunta goccia a goccia sotto lieve agitazione magnetica.

Nanobolle fluorescenti sono state ottenute aggiungendo cumarina-6 verde fluorescente al nucleo di perfluoropentano.

5.1.2 Caratterizzazione delle nanobolle

Il diametro medio e l'indice di polidispersione delle formulazioni sono stati determinati mediante spettroscopia a correlazione fotonica (PCS); il potenziale zeta è stato determinato dalla mobilità elettroforetica utilizzando uno strumento 90 Plus (Brookhaven, NY, USA). Le analisi sono state eseguite con un angolo di diffusione di 90 ° e una temperatura di 25 ° C, utilizzando sospensioni di nanobolle diluite con acqua distillata deionizzata (proporzione nanobolle-acqua distillata 1:4). Per la determinazione del potenziale zeta, i campioni sono stati collocati nella cella elettroforetica dove è stato applicato un campo elettrico di circa 15 V / cm.

5.1.3 Trattamento con onde d'urto

Il generatore di onde d'urto utilizzato per gli esperimenti in vitro è un dispositivo piezoelettrico (*Piezoson 100*, Richard Wolf, Knittlingen, Germania) appositamente progettato per l'uso clinico in ortopedia e traumatologia. Lo strumento genera onde d'urto focalizzate a varie frequenze (1-4 shock / s) e intensità (0,05-1,48 mJ / mm²). Il dispositivo è costituito da un generatore di corrente elettrica ad alta tensione e da un riflettore. Sulla superficie del riflettore, elementi piezoelettrici sono disposti a formare parte di una sfera che vengono stimolati con impulsi elettrici ad alta energia. Ciò provoca vibrazione/rapida espansione dei cristalli, generando un'onda d'urto che può essere propagata attraverso l'acqua al suo interno e focalizzata al centro della sfera. La pressione sull'area focale è proporzionale alla tensione applicata. L'energia nel punto focale è definita come la densità del flusso di energia (EFD) per impulso, registrata come joule per area (mJ/mm²). Per uso medico, in ortopedia, si applicano onde d'urto di circa 0,01-0,60 mJ / mm². L'area focale, che è caratteristica di ogni tipo di generatore, è definita come l'area in cui viene raggiunto il 50% dell'energia massima: per quanto riguarda il *Piezoson 100*, ha una lunghezza di 10 mm nella direzione dell'asse delle onde d'urto e un diametro di 2,5 mm perpendicolare all'asse.

Il set-up sperimentale è mostrato in figura 5.1.

Le sospensioni di nanobolle sono state dispensate in provette di polipropilene da 45 × 12,5 mm (Nunc, Wiesbaden, Germania).

Ogni provetta contenente le nanobolle è stata posizionata, allineandola verticalmente con l'area focale del generatore d'onde d'urto ed è stata regolata in modo che il punto centrale dell'area focale corrispondesse con il punto centrale dell'area di base della provetta. Il generatore di onde d'urto è stato mantenuto in contatto con la provetta mediante un cuscinetto pieno d'acqua. Un comune gel ad ultrasuoni è stato usato come mezzo di contatto tra cuscinetto e la provetta.

Le nanobolle sono state trattate come segue: fissando la pressione di picco positiva ad un valore pari a 64 MPa, ogni provetta, quindi ogni formulazione, è stata trattata con un numero di shock crescente (da 100 fino a 1000); il procedimento è stato ripetuto anche per un valore di pressione di picco positiva pari a 90 MPa.

Dopo ogni trattamento, le nanobolle sono state nuovamente caratterizzate, come descritto nel precedente paragrafo, al fine di rilevare eventuali variazioni del loro diametro medio, del potenziale zeta e del PDI.

5.1.4 Stabilità delle nanobolle nel tempo

Le formulazioni di nanobolle sono state osservate in diverse condizioni di conservazione, ad esempio a 4 ° C o a 25 ° C.

Le formulazioni si sono dimostrate fisicamente stabili nel tempo, come confermato dal controllo a lungo termine dei parametri fisico-chimici. In effetti, i valori ottenuti non sono cambiati significativamente fino a tre mesi dopo la preparazione delle formulazioni.

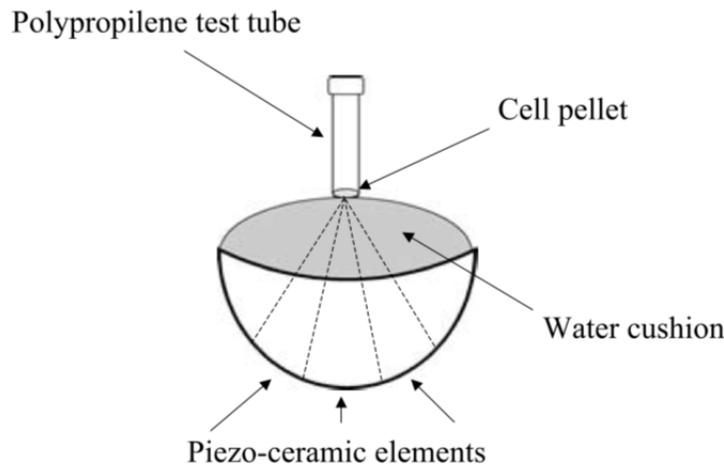


Figura 5.1: Schema del set-up sperimentale per l'esposizione ad onde d'urto. Le nanobolle sono state inserite in tubicini (provette) di polipropilene e fissate nell'area focale. Gli elementi piezo-ceramici generano onde d'urto che si propagano all'interno della sonda riempita d'acqua. Nell'interfaccia tra la provetta ed il cuscinetto d'acqua è stato versato un gel acustico al fine di adattare l'impedenza acustica.

5.2 Risultati sperimentali

Nelle tabelle seguenti sono riportati, per tutte e quattro le diverse formulazioni i risultati ottenuti durante le sperimentazioni, in termini di diametro. Per una corretta lettura delle tabelle si ricorda che:

- sotto la colonna "NO ESW" sono stati riportati i valori di diametro iniziale della bolla;
- sotto le colonne successive sono stati invece riportati i valori di diametro raggiunti dopo il trattamento rispettivamente con 100, 250, 500 e 1000 colpi;
- nell'ultima riga sono invece stati calcolati i valori medi di ogni colonna.

5.2. Risultati sperimentali

NO ESW	100 shots	250 shots	500 shots	1000 shots
415,60	449,99	494,93	571,50	718,50
413,90	448,20	493,23	571,90	717,90
416,70	450,95	496,20	569,14	724,10
416,20	453,40	492,90	568,53	716,80
421,90	454,80	500,80	581,10	731,90
417,90	451,10	496,13	566,90	720,30
416,80	451,40	498,30	570,60	725,10
417,80	451,39	499,00	572,80	719,90
417,10	451,36	496,44	571,56	721,81

Tabella 5.1: Tabella riassuntiva dei valori di diametro ottenuti (per nanobolle con shell di Glicolchitosano) con onde d'urto ampie 64 MPa.

NO ESW	100 shots	250 shots	500 shots	1000 shots
415,60	465,60	521,20	610,90	793,60
413,90	470,90	519,10	609,10	792,90
416,70	458,70	522,40	612,50	779,70
416,20	469,20	523,10	611,30	798,20
421,90	479,90	528,90	617,50	767,65
417,90	468,80	519,80	613,30	807,90
416,80	465,80	517,20	611,60	801,30
417,80	467,40	526,80	612,40	797,80
417,10	468,29	522,31	612,33	792,38

Tabella 5.2: Tabella riassuntiva dei valori di diametro ottenuti (per nanobolle con shell di Glicolchitosano) con onde d'urto ampie 90 MPa.

NO ESW	100 shots	250 shots	500 shots	1000 shots
492,50	495,70	525,50	575,50	673,80
493,50	496,70	525,50	574,50	677,30
495,50	498,80	529,50	577,50	679,90
497,20	500,60	528,20	580,20	677,00
496,40	500,50	531,20	580,60	675,30
493,80	496,70	526,60	574,30	674,20
494,50	497,30	527,50	577,20	677,00
494,80	497,60	527,80	578,60	677,10
494,77	497,99	527,73	577,30	676,45

Tabella 5.7: Tabella riassuntiva dei valori di diametro ottenuti (per nanobolle con shell di Chitosano-HA) con onde d'urto ampie 64 MPa.

5.2. Risultati sperimentali

NO ESW	100 shots	250 shots	500 shots	1000 shots
458,45	481,75	523,45	589,45	724,03
460,40	483,60	524,40	592,40	725,98
462,40	485,50	525,40	596,40	727,80
469,20	492,60	532,60	595,20	734,50
468,50	492,30	531,50	596,50	734,20
463,20	485,20	527,00	596,10	729,00
463,50	487,00	527,40	594,50	729,00
462,10	486,20	525,45	595,00	727,90
463,47	486,77	527,15	594,44	729,05

Tabella 5.3: Tabella riassuntiva dei valori di diametro ottenuti (per nanobolle con shell di Chitosano) con onde d'urto ampie 64 MPa.

NO ESW	100 shots	250 shots	500 shots	1000 shots
458,45	493,88	542,74	622,25	783,45
460,40	495,84	544,63	627,00	783,40
462,40	497,60	547,30	629,60	786,40
469,20	504,40	553,40	632,70	794,20
468,50	503,90	553,40	634,40	797,50
463,20	502,00	548,70	628,90	792,00
463,50	497,50	546,30	629,80	791,35
462,10	496,40	545,50	628,10	790,10
463,47	498,94	547,75	629,10	729,80

Tabella 5.4: Tabella riassuntiva dei valori di diametro ottenuti (per nanobolle con shell di Chitosano) con onde d'urto ampie 90 MPa.

NO ESW	100 shots	250 shots	500 shots	1000 shots
492,50	498,50	534,50	592,50	717,50
493,50	499,60	536,50	598,50	717,50
495,50	497,50	537,50	601,50	718,50
497,20	504,00	541,20	599,20	720,20
496,40	502,40	541,40	599,40	724,20
493,80	502,50	533,80	596,80	720,60
494,50	501,50	536,50	597,80	720,50
494,80	500,80	537,70	600,60	721,70
494,77	500,85	537,39	598,29	720,09

Tabella 5.8: Tabella riassuntiva dei valori di diametro ottenuti (per nanobolle con shell di Chitosano-HA) con onde d'urto ampie 90 MPa.

NO ESW	100 shots	250 shots	500 shots	1000 shots
465,40	475,40	513,70	573,40	690,10
473,80	486,30	522,80	581,80	700,30
475,10	488,90	523,10	582,50	702,10
466,40	478,60	514,10	572,40	692,70
463,70	477,20	511,60	571,60	689,80
474,55	486,75	522,05	582,25	700,85
465,30	477,50	512,60	572,70	692,00
463,50	475,80	512,00	571,10	691,50
468,47	480,81	516,49	575,97	694,92

Tabella 5.5: Tabella riassuntiva dei valori di diametro ottenuti (per nanobolle con shell di Chitosano-TPP) con onde d'urto ampie 64 MPa.

NO ESW	100 shots	250 shots	500 shots	1000 shots
465,40	485,21	529,40	601,43	746,40
473,80	493,60	536,80	612,30	754,60
475,10	494,90	538,10	611,00	759,29
466,40	486,20	528,10	600,40	749,40
463,70	483,00	528,70	595,70	743,70
474,55	494,35	537,95	613,35	753,55
465,30	485,10	528,70	602,30	746,45
463,50	483,40	526,90	599,50	745,40
468,47	488,22	531,83	604,50	749,85

Tabella 5.6: Tabella riassuntiva dei valori di diametro ottenuti (per nanobolle con shell di Chitosano-TPP) con onde d'urto ampie 90 MPa.

5.3 Analisi ed interpretazione dei dati sperimentali

Al fine di interpolare ed interpretare i dati sperimentali sono stati ideati tre diversi modelli: un modello semplificato, prettamente ingegneristico, un modello analitico ed un modello numerico più esatto e, per certi versi, più generale. Tali modelli non sono tra loro scollegati: non sono cioè da intendersi come soluzioni diverse per lo stesso problema, ma si integrano e si completano al fine di rendere la comprensione del problema più rapida ed immediata.

Tutti i modelli si basano sulle seguenti ipotesi:

- Dal momento che l'estremo superiore dell'intervallo di pressioni utilizzate si mantiene sempre al di sotto di 100 MPa, il numero di bolle prima e dopo il trattamento è identico, cioè il raggio della bolla, a seguito del trattamento, si aumenta ma si

- mantiene sempre al sotto del valori critico r_c al di sopra del quale la bolla implode;
- le bolle sono distribuite in maniera uniforme all'interno della provetta e ad una quota pari alla metà dell'altezza complessiva della provetta;
 - le bolle hanno una forma perfettamente sferica;
 - si assume che ciascuna bolla sia colpita dalla medesima intensità d'onda e che questa sia esattamente pari al valore di picco positivo dell'onda d'urto, P_{max} ;
 - le nanobolle sono in condizioni statiche.

5.3.1 Modello semplificato

Come già accennato, il primo modello pensato è fortemente semplificato e si basa sul fatto che, a seguito del trattamento con ESW, le nanobolle sono stabili, e, per ognuna di esse, è possibile scrivere la legge di Laplace:

$$P_{int} - P_{ext} = \frac{4\tau}{r} \quad (5.1)$$

Il primo termine dell'equazione (5.1), la pressione interna della bolla dopo il trattamento, coincide con la pressione che il gas, il perfluoropentano in questo caso specifico, che occupa un volume pari proprio al volume della bolla, esercita alla temperatura ambiente (298 K). Pertanto sotto l'ipotesi che il perfluoropentano sia un gas ideale, la pressione ed il volume sono legati dall'equazione di stato dei gas perfetti:

$$PV = nRT \quad (5.2)$$

dove P è la P_{int} dell'equazione (5.1), cioè la pressione esercitata dalle molecole di gas all'interno della bolla espressa in Pa, V il volume della bolla in m^3 , n il numero di moli di gas all'interno del core della bolla, R la costante dei gas ($8.314 m^3 Pa K^{-1} mol^{-1}$).

Si immagini adesso che le bolle abbiano una forma perfettamente sferica, il volume ed il raggio finale sono legati dalla relazione (5.3):

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3 \quad (5.3)$$

e sostituendo la relazione (5.3) nell'equazione (5.2) ed esplicitando la pressione si ottiene:

$$P_{int} = \frac{3 nRT}{4 4\pi r^3} \quad (5.4)$$

Il secondo contributo nell'equazione (5.1), la pressione esterna che il fluido circostante esercita sulla parete esterna della nanobolla, si ottiene mediante il Teorema di Bernoulli:

$$P_{ext} = P_{atm} + \rho gh \quad (5.5)$$

Per il Teorema di Bernoulli in (5.5): la pressione atmosferica P_{atm} è pari a 10^5 Pa, ρ è la densità del liquido in cui le bolle sono sospese, per l'acqua distillata $\rho_{H_2O} = 1000$ kg/ m³, g è l'accelerazione di gravità ($9,81$ m/s²), e, detta L , l'altezza complessiva della provetta in cui la sospensione di nanobolle è stata versata, allora $h = L/2$, si ipotizza cioè che le nanobolle sono concentrate esattamente ad una quota pari alla metà dell'altezza totale della provetta.

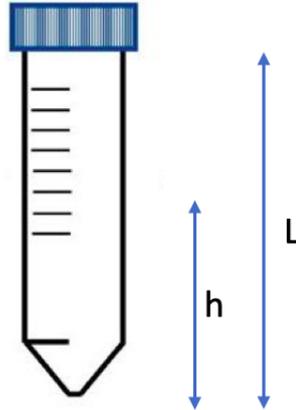


Figura 5.2: Rappresentazione schematica della provetta utilizzata negli esperimenti: in questo modello si ipotizza che tutte le nanobolle siano posizionate ad una quota h dentro la provetta.

Infine, il valore di tensione superficiale τ dell'equazione (5.1), per i polimeri utilizzati per creare gli shell delle nanobolle trattate negli esperimenti, sono riassunti nella tabella 5.9.

Polimero	τ [N/m]
Glicolchitosano	4×10^{-3}
Chitosano	2×10^{-3}
Chitosano-TPP	6×10^{-3}
Chitosano-HA	9×10^{-3}

Tabella 5.9: Valori di tensione superficiale τ per i polimeri che compongono lo shell delle nanobolle.

Sostituendo opportunamente i valori all'interno dell'equazione (5.1) si ottengono i valori di raggio atteso, per le quattro tipologie di nanobolle trattate; questi valori sono riassunti nella tabella 5.10:

Nanobolla con shell polimerico	r [nm]
Glicolchitosano	340
Chitosano	320
Chitosano-TPP	290
Chitosano-HA	260

Tabella 5.10: Valori di raggio r atteso per le nanobolle trattate in funzione dello shell che le circonda.

Una rappresentazione grafica di quanto appena descritto è riportata nelle figure 5.3, 5.4, 5.5 e 5.6.

In figura 5.3 si osserva che il modello semplificato approssima sufficientemente bene il comportamento delle nanobolle con shell di Glicolchitosano, quando il numero di colpi è compreso tra 600 ed 800; in particolare la precisione del modello sale quando viene eseguito un trattamento con 700 colpi. Si sconsiglia di usare questo modello per un numero di shock inferiore a 600 o superiore ad 800, per i quali l'errore commesso non sarebbe più trascurabile: in particolare per un numero di colpi inferiore a 600 viene commesso un errore per eccesso, mentre per un numero di colpi superiore ad 800 l'errore commesso è per difetto.

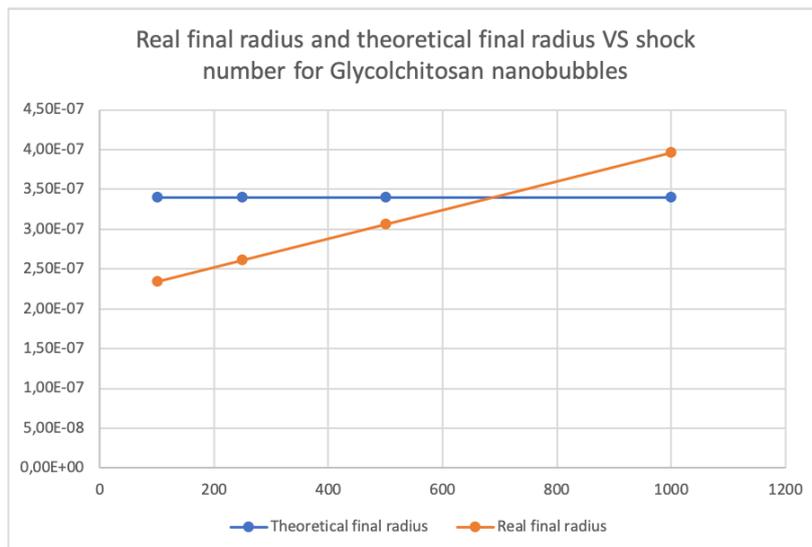


Figura 5.3: Raggio finale teorico calcolato con il modello semplificato (blu) e raggio finale reale (arancione) in funzione del numero di shock per le bolle con involucro di Glicolchitosano.

In figura 5.4 si osserva la soluzione ottenuta attraverso il modello semplificato confrontata con i valori reali di raggio finale delle nanobolle con shell di Chitosano: in questo caso l'approssimazione è sufficientemente buona per l'intervallo di colpi

400-600. Agli estremi del range di utilizzo l'approssimazione di questo non è buona: per un numero di colpi superiore a 600 il modello causa una sottostima del valore di raggio finale, mentre per un numero di colpi inferiore a 400 il modello causa una sovrastima del raggio finale.

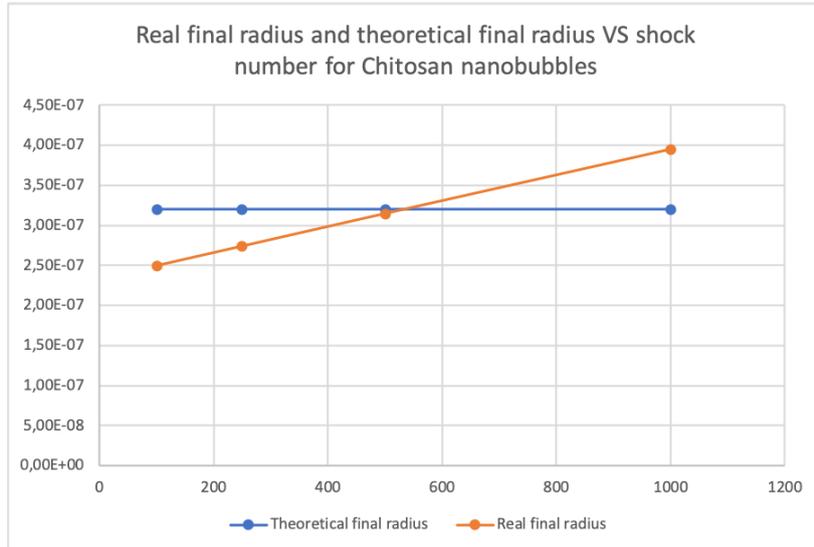


Figura 5.4: Raggio finale teorico calcolato con il modello semplificato (blu) e raggio finale reale (arancione) in funzione del numero di shock per le bolle con involucro di Chitosano.

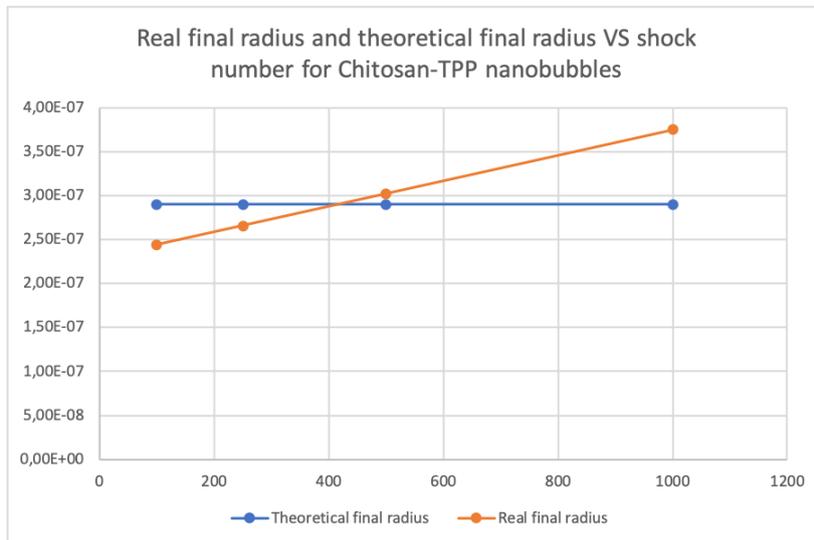


Figura 5.5: Raggio finale teorico calcolato con il modello semplificato (blu) e raggio finale reale (arancione) in funzione del numero di shock per le bolle con involucro di Chitosano-TPP.

La figura 5.5 illustra che per le nanobolle con shell di Chitosano-TPP il modello semplificato si avvicina sufficientemente ai valori reali solo quando il numero di colpi è compreso tra 350 e 450. Per nanobolle con shell di Chitosano-HA, si sconsiglia l'utilizzo del modello semplificato: la soluzione ottenuta attraverso il modello è sempre inferiore alla soluzione reale se non per un numero di colpi uguale o inferiore a 200. Tuttavia un trattamento è, in genere, efficace se il numero di onde d'urto è almeno pari a 250.

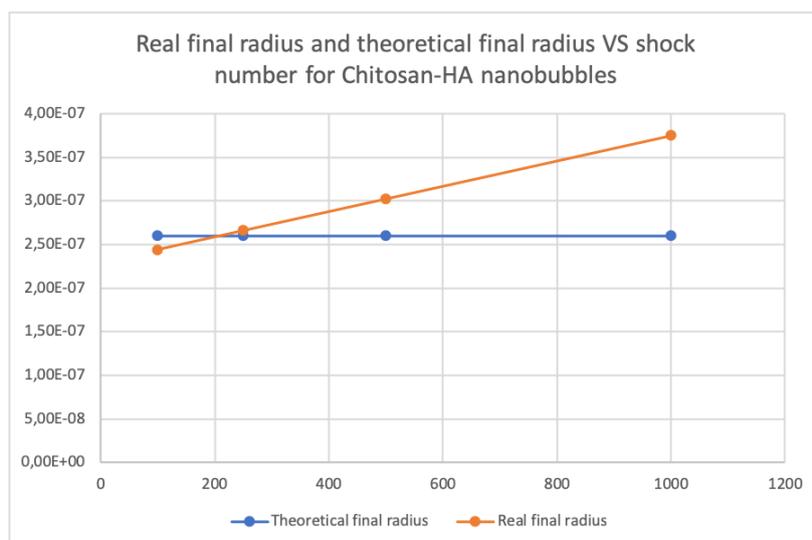


Figura 5.6: Raggio finale teorico calcolato con il modello semplificato (blu) e raggio finale reale (arancione) in funzione del numero di shock per le bolle con involucro di Chitosano-HA.

Sulla base dei risultati ottenuti, si deduce che:

- Noti i valori di tensione superficiale del polimero che circonda il nucleo gassoso della nanobolla, la temperatura di lavoro e la densità del fluido in cui la nanobolla è sospesa, questo modello fornisce sempre una soluzione.
- L'aspetto più negativo di tale modello, è che tale soluzione è univoca: per ogni tipo di shell, e quindi di polimero, esiste un solo valore di tensione superficiale, e quindi un unico valore di raggio teorico della bolla; il modello non è cioè in grado di correlare il valore del raggio calcolato con il trattamento erogato, più precisamente al numero di onde d'urto ed all'ampiezza delle onde d'urto utilizzate.
- E' consigliabile utilizzare questo modello per prevedere il raggio finale di nanobolle con shell di Glicolchitosano o Chitosano o comunque per nanobolle che hanno valori di tensione superficiale sufficientemente bassi.
- I risultati teorici sarebbero, senza dubbio, più vicini a quelli reali se il Perfluoropentano venisse studiato con un modello più complesso di gas.

5.3.2 Modello analitico

Il secondo modello pensato si basa sul fatto che la nanobolla è stabile prima e dopo il trattamento con ESW, risponderà, pertanto, in entrambi i casi, alla legge di Laplace, che può quindi essere scritta, per entrambi gli stadi, iniziale e finale.

$$\begin{cases} P_{int,i} - P_{ext,i} = \frac{4\tau}{r_i} \\ P_{int,f} - P_{ext,f} = \frac{4\tau}{r_f} \end{cases}$$

Si sottrae membro a membro:

$$P_{int,i} - P_{ext,i} - P_{int,f} + P_{ext,f} = 4\tau \left(\frac{1}{r_i} - \frac{1}{r_f} \right) \quad (5.6)$$

La pressione esterna, la pressione cioè che il fluido circostante esercita su ogni bolla prima e dopo il trattamento è la medesima, e quindi i termini $P_{ext,i}$ $P_{ext,f}$ avendo segno opposto, possono essere elisi, ottenendo l'equazione (5.7):

$$P_{int,i} - P_{int,f} = 4\tau \left(\frac{1}{r_i} - \frac{1}{r_f} \right) \quad (5.7)$$

La pressione interna, iniziale e finale, della bolla può essere calcolata, come nel modello precedente, sfruttando le ipotesi che il gas nel core della bolla sia un un gas perfetto (equazione (5.2)) e che la bolla abbia una forma perfettamente sferica (equazione (5.3)), ottenendo quindi le seguenti relazioni:

$$P_{int,i} = \frac{3nRT}{4\pi r_i^3} \quad (5.8)$$

$$P_{int,f} = \frac{3nRT}{4\pi r_f^3} \quad (5.9)$$

Si noti che il numero di moli di gas all'interno della nanobolla, tra lo stadio iniziale e finale, non varia, nelle relazioni (5.8) e (5.9) non compare n_i ed n_f ma semplicemente n .

A seguito del trattamento con onde d'urto, la dimensione delle nanobolle aumentano, cioè $r_f > r_i$. In particolare, il raggio finale r_f , per un determinato tipo di bolla, sarà pari al valore di raggio iniziale a cui si somma un certo Δr , che dipende certamente dal numero di onde d'urto utilizzate, N .

$$r_f = r_i + \Delta r = r_i + \Delta r(N) \quad (5.10)$$

Sostituendo le relazioni (5.8), (5.9) e (5.10) nell'equazione (5.7) si ottiene:

$$\frac{3nRT}{4\pi r_i^3} - \frac{3nRT}{4\pi (r_i + \Delta r)^3} = 4\tau \left(\frac{1}{r_i} - \frac{1}{r_i + \Delta r} \right) \quad (5.11)$$

Esplicitando i cubi di binomio e svolgendo i calcoli si ottiene:

$$\Delta r = \frac{16\tau\pi r_i^3 - 9nRT r_i N}{18nRTN - 48\tau\pi r_i^2} \quad (5.12)$$

Sostituendo i valori all'interno dell'equazione (5.12) si ottengono i valori di raggio atteso, per le quattro tipologie di nanobolle trattate, al variare del numero di shock N ; questi valori sono rappresentati graficamente nelle figure 5.7, 5.8, 5.9 e 5.10.

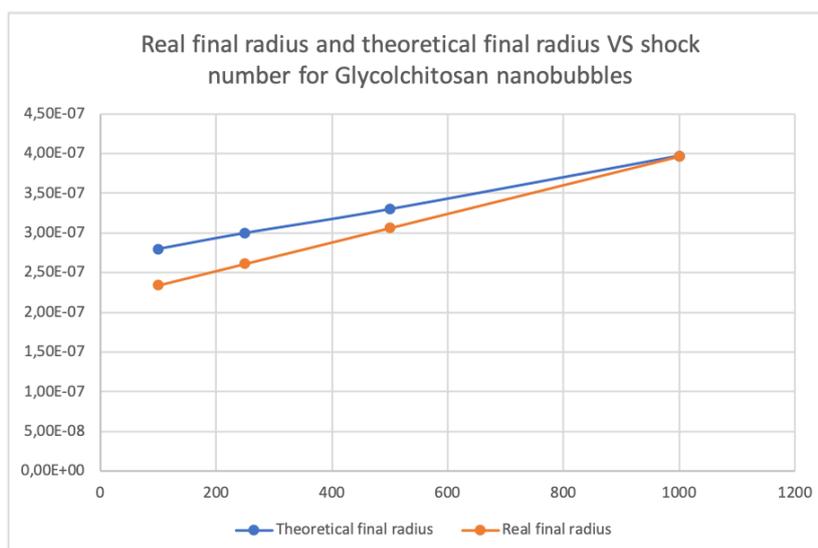


Figura 5.7: Raggio finale teorico calcolato con il modello analitico (blu) e raggio finale reale (arancione) in funzione del numero di shock per le bolle con involucro di Glicolchitosano.

Dalla figura 5.7 si osserva che il modello analitico approssima bene la risposta, in termini di aumento di raggio, delle nanobolle con shell di Glicolchitosano, a patto che il numero di colpi sia sufficientemente alto, ossia superiore a 600. L'errore commesso è invece eccessivo e non trascurabile per un numero di colpi inferiore a questo limite.

A differenza del caso del modello semplificato, in questo caso l'errore commesso è sempre per eccesso.

Dalla figura 5.8 emerge che, per le nanobolle con shell di Chitosano, la risposta teorica, prevista dal modello, e quella reale rilevata dalle sperimentazioni, sono sovrapponibili solo quando il numero di shock si mantiene all'interno dell'intervallo 400-600. Anche per questa seconda tipologia di nanobolle, i valori teorici sono sempre maggiori di quelli reali.

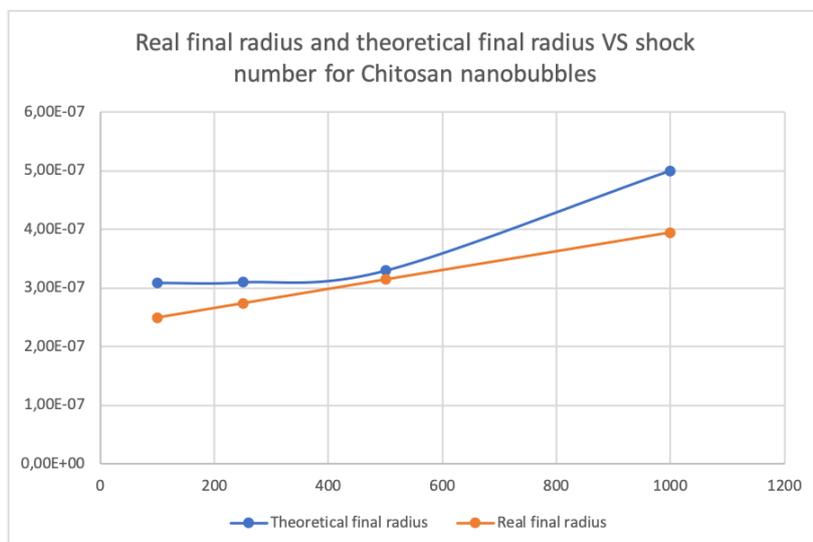


Figura 5.8: Raggio finale teorico calcolato con il modello analitico (blu) e raggio finale reale (arancione) in funzione del numero di shock per le bolle con involucro di Chitosano.

Infine, nei grafici in figura 5.9 e 5.10, si osserva ancora che il modello analitico causa, anche in questi casi, una sovrastima del valore finale di raggio raggiunto dalla bolla. Per nanobolle con shell di Chitosano-TPP o Chitosano-HA i valori teorici si avvicinano a quelli reali solo quando il numero di shock utilizzati per il trattamento è contenuto, ovvero minore di 300.

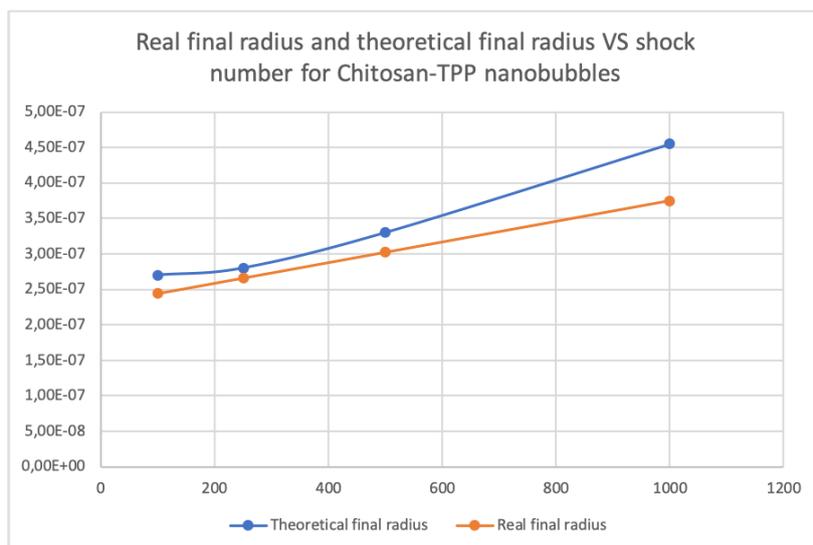


Figura 5.9: Raggio finale teorico calcolato con il modello analitico (blu) e raggio finale reale (arancione) in funzione del numero di shock per le bolle con involucro di Chitosano-TPP.

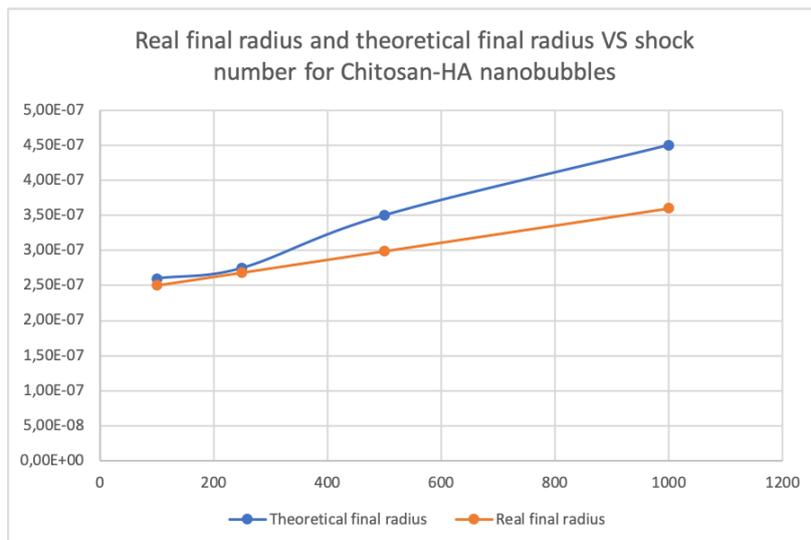


Figura 5.10: Raggio finale teorico calcolato con il modello analitico (blu) e raggio finale reale (arancione) in funzione del numero di shock per le bolle con involucro di Chitosano-HA.

Alla luce dei risultati osservati si può concludere che:

- Il modello analitico, a differenza di quello semplificato, correla il valore di raggio finale della nanobolla con il numero di onde d'urto utilizzate ma non con l'ampiezza di queste ultime; rappresenta pertanto un modello sicuramente più affinato e preciso del precedente ma non ancora completo.
- Come per il modello semplificato, anche per quello analitico, si osserva che, per le nanobolle con shell di Chitosano-TPP e ancor di più per quelle con shell di Chitosano-HA, i valori calcolati si avvicinano a quelli reali solo per un numero di shock inferiore a 300: questo tuttavia è, se l'energia è contenuta, un numero di shock inefficace.

5.3.3 Modello numerico

In ultimo si è pensato di mediare tutti i dati raccolti, e interpolarli utilizzando funzioni opportunamente create in Matlab. Come già spiegato, a seguito, del trattamento con onde d'urto, le nanobolle subiranno un aumento di volume legato al trattamento utilizzato. La variazione di volume, e quindi di raggio Δr subita da ogni bolla è funzione del numero di shock e dell'ampiezza di ognuno di essi, cioè $\Delta r = \Delta r(N, P_{max})$.

L'entità dell'aumento di raggio osservato per le nanobolle, dipende fortemente da ciò che circonda il core gassoso, cioè dalla composizione dello shell.

Attraverso l'interpolazione realizzata in Matlab, infatti è stata trovata un'espressione diversa del Δr per ogni tipologia di nanobolla trattata:

$$\Delta r_{Gly} = -1.1 \times 10^{-8} + 7.7 \times 10^{-11} \mathbf{N} + 1.1 \times 10^{-16} \mathbf{Pmax} \quad (5.13)$$

$$\Delta r_C = -1.0 \times 10^{-8} + 7 \times 10^{-11} \mathbf{N} + 1.0 \times 10^{-16} \mathbf{Pmax} \quad (5.14)$$

$$\Delta r_{C-TPP} = -0.8 \times 10^{-8} + 5.6 \times 10^{-11} \mathbf{N} + 0.8 \times 10^{-16} \mathbf{Pmax} \quad (5.15)$$

$$\Delta r_{C-HA} = -0.6 \times 10^{-8} + 4.2 \times 10^{-11} \mathbf{N} + 0.6 \times 10^{-16} \mathbf{Pmax} \quad (5.16)$$

Sostituendo i valori di N e P_{max} all'interno dell'espressione di Δr corretta, si ottengono i grafici in figura 5.11, 5.12, 5.13 e 5.14.

E' possibile, infine, rendere il modello meno specifico, introducendo un fattore k all'interno dell'espressione di Δr , ottenendo così un'espressione più generale della variazione di raggio che interessa la bolla.

$$\Delta r = -k \times 10^{-8} + 7 \times k \times 10^{-11} \mathbf{N} + k \times 10^{-16} \mathbf{Pmax} \quad (5.17)$$

Il valore di k varierà opportunamente al variare del tipo di shell che circonda il core della bolla: per uno shell di Glicolchitosano si ha un $k = 1.1$, per uno shell di Chitosano $k = 1$, per uno shell di Chitosano-TPP $k = 0.8$ ed infine per uno shell di Chitosano-HA $k = 0.6$.

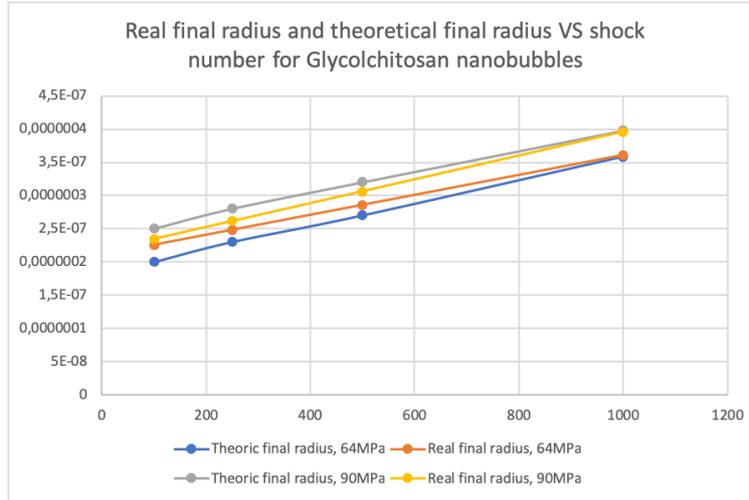


Figura 5.11: Raggio finale teorico calcolato con il modello numerico (blu per una P_{max} di 64 MPa e grigio per una P_{max} di 90 MPa) e raggio finale reale (arancione per una P_{max} di 64 MPa e giallo per una P_{max} di 90 MPa) in funzione del numero di shock per le bolle con guscio di Glicolchitosano.

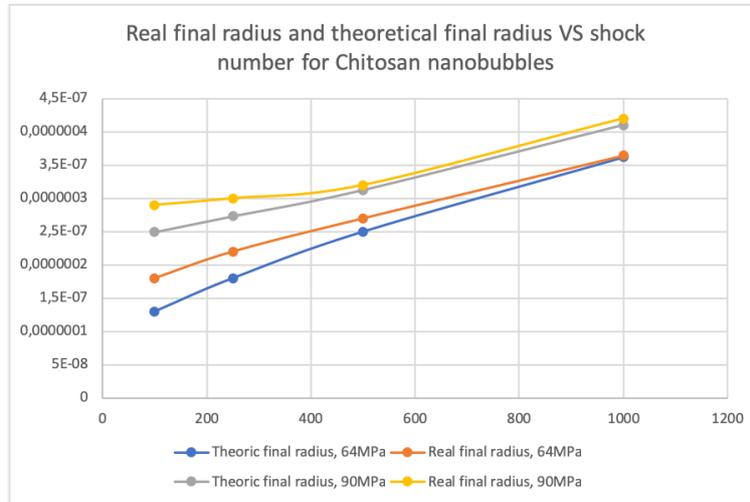


Figura 5.12: Raggio finale teorico calcolato con il modello numerico (blu per una P_{max} di 64 MPa e grigio per una P_{max} di 90 MPa) e raggio finale reale (arancione per una P_{max} di 64 MPa e giallo per una P_{max} di 90 MPa) in funzione del numero di shock per le bolle con guscio di Chitosano.

Dai grafici si osserva che l'interpolazione numerica funziona più o meno bene in tutti i casi. Ancora una volta le nanobolle con shell di Chitosano-HA sembrano avere il comportamento meno prevedibile, al contrario di quelle con shell di Glicolchitosano o Chitosano i cui andamenti teorici e reali sono quasi perfettamente sovrapponibili specie all'aumentare di N e P_{max} .

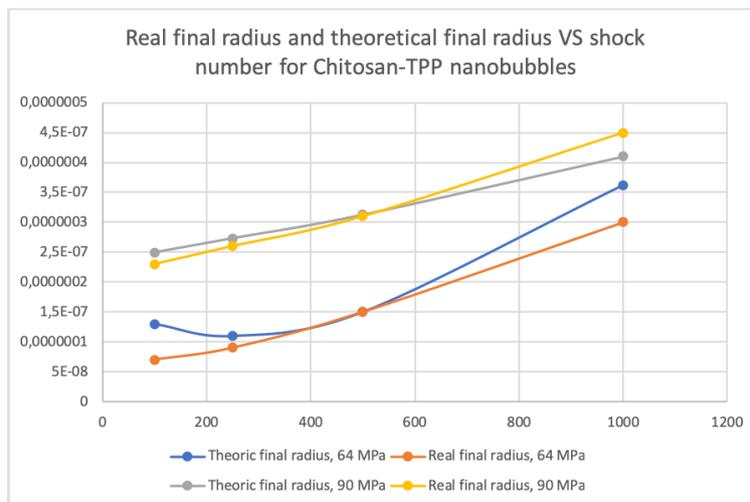


Figura 5.13: Raggio finale teorico calcolato con il modello numerico (blu per una P_{max} di 64 MPa e grigio per una P_{max} di 90 MPa) e raggio finale reale (arancione per una P_{max} di 64 MPa e giallo per una P_{max} di 90 MPa) in funzione del numero di shock per le bolle con guscio di Chitosano-TPP.

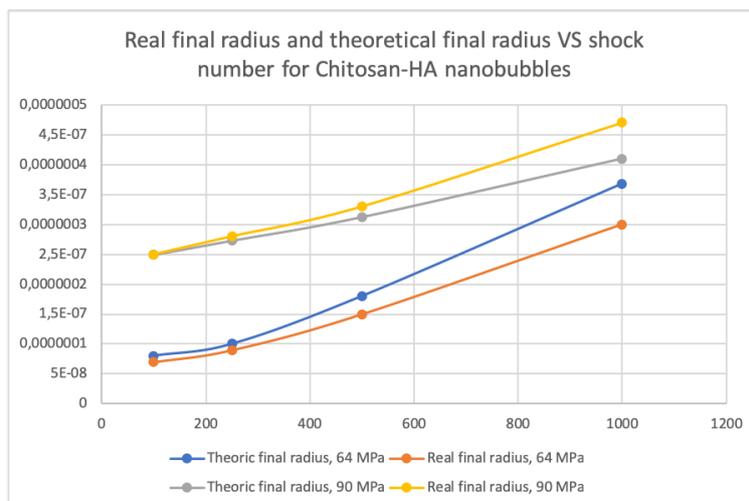


Figura 5.14: Raggio finale teorico calcolato con il modello numerico (blu per una P_{max} di 64 MPa e grigio per una P_{max} di 90 MPa) e raggio finale reale (arancione per una P_{max} di 64 MPa e giallo per una P_{max} di 90 MPa) in funzione del numero di shock per le bolle con guscio di Chitosano-HA.

Il modello numerico è, tra i tre, quello più complesso e preciso. Il primo modello illustrato, quello semplificato, approssima la risposta della bolla con una retta orizzontale, quello analitico ha un andamento più simile ad una retta inclinata, mentre il modello numerico ha un andamento più vicino a un'esponenziale crescente.

La generalizzazione del modello, equazione (5.17), consente di osservare che, a parità di trattamento, le bolle aventi shell di Glicolchitosano sono quelle che hanno un aumento di raggio maggiore assieme a quelle con shell di Chitosano (k rispettivamente pari ad 1.1 ed 1); per le nanobolle con shell di Chitosano-TPP il valore di k scende a 0.8 e quindi, a parità di trattamento, subirà un aumento di volume Δr certamente più piccolo rispetto a quelle con shell di solo Chitosano.

Il fatto che il Chitosano presente nello shell si leghi ad una molecola, seppur piccola come il TPP, fa sì che lo shell della bolla risulti più spesso, nonché più rigido e questo certamente ostacola l'aumento di volume della bolla a seguito del trattamento. L'aumento di raggio e di volume della bolla, sarà ancor più ridotto se il Chitosano si lega ad una molecola di dimensioni più rilevanti come l'acido ialuronico, per il quale il valore di k scende a 0.6 (Chitosano-HA).

In questo senso, sembra logico aspettarsi un valore di k compreso tra 0.6 e 0.8 nel caso in cui il Chitosano sia legato ad una molecola di dimensioni intermedie tra quelle dell'acido ialuronico e del TPP; questo ragionamento risulta attendibile e corretto solo in alcuni casi: l'energia di legame, infatti, non è sempre proporzionale alle dimensioni delle molecole che si legano, e può pertanto accadere che, ad esempio, molecole più grandi dell'acido ialuronico sviluppino con il Chitosano legami meno

energetici di quelli stabiliti dall'acido ialuronico stesso, e avere quindi un valore di k più basso di quello atteso.

5.3.4 Calcolo incertezza di misura

Come ogni misura sperimentale anche quelle analizzate in questa trattazione sono affette da errori casuali e strumentali. Per determinare l'incertezza assoluta associata alla misura di raggio r_f si parte dall'espressione di Δr (5.12).

$$r_f = r_i + \Delta r = r_i + \frac{16\tau\pi r_i^3 - 9nRT r_i N}{18nRTN - 48\tau\pi r_i^2} \quad (5.18)$$

L'espressione di r_f viene derivata rispetto ad ogni variabile e quindi moltiplicata per l'incertezza assoluta associata alla variabile stessa, viene cioè applicata la *Teoria della Propagazione degli errori massimi*, secondo cui:

$$\delta r_f = \left| \frac{\partial r_f}{\partial r_i} \right| \times \delta r_i + \left| \frac{\partial r_f}{\partial T} \right| \times \delta T + \left| \frac{\partial r_f}{\partial N} \right| \times \delta N + \left| \frac{\partial r_f}{\partial \tau} \right| \times \delta \tau \quad (5.19)$$

Dove: $\delta r_i = 50nm$, $\delta T = 1K$, $\delta N = 2$, $\delta \tau = 0.1$.

L'incertezza associata alla misura di raggio vale pertanto: $\delta r_f = 52.4nm$.

Bibliografia

- [1] Apfel RE. Acoustic cavitation inception. *Ultrasonics*. 1984;22(4):167–73.
- [2] ter Haar G. Therapeutic applications of ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol*. 2007;93(1–3):111–29.
- [3] Apfel RE, Holland CK. Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound. *Ultrasound Med Biol*. 1991;17(2):179–85.
- [4] Miller MW, Miller DL, Brayman AA. A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective. *Ultrasound Med Biol*. 1996;22(9):1131–54.
- [5] Apfel RE. Acoustic cavitation prediction. *J Acoust Soc Am*. 1981;69:1624–33.
- [6] Neppiras E. Acoustic cavitation series: part one: Acoustic cavitation: an introduction. *Ultrasonics*. 1984;22(1):25–8.
- [7] Akulichev V, Rozenberg L. Certain relations in a cavitation region (Energy dissipation of acoustic waves propagating in liquid medium and producing cavitation). *Sov Phys Acoust*. 1966;11:246–51.
- [8] Fox FE, Herzfeld KF. Gas bubbles with organic skin as cavitation nuclei. *J Acoust Soc Am*. 1954;26:984–9.
- [9] Flynn H. Physics of acoustic cavitation in liquids. *Physical Acoustics*. 1964;1(Part B):57–172.
- [10] Yount DE. Skins of varying permeability: a stabilization mechanism for gas cavitation nuclei. *J Acoust Soc Am*. 1979;65:1429.
- [11] Johnson BD, Cooke RC. Generation of stabilized microbubbles in seawater. *Science*. 1981;213 (4504):209–11.
- [12] Correas J-M, Bridal L, Lesavre A, Mejean A, Claudon M, Helenon O. Ultrasound contrast agents: properties, principles of action, tolerance, and artifacts. *Eur Radiol*. 2001;11(8):1316–28.
- [13] Borkent BM, Gekle S, Prosperetti A, Lohse D. Nucleation threshold and deactivation mechanisms of nanoscopic cavitation nuclei. *Phys Fluids*. 2009;21(10):102003.
- [14] Bouakaz A, Versluis M, de Jong N. High-speed optical observations of contrast agent destruction. *Ultrasound Med Biol*. 2005;31(3):391–9.

- [15] Chomas JE, Dayton P, Allen J, Morgan K, Ferrara KW. Mechanisms of contrast agent destruction. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. 2001;48(1):232–48.
- [16] Porter TM, Smith DA, Holland CK. Acoustic techniques for assessing the optison destruction threshold. *J Ultrasound Med*. 2006;25(12):1519–29.
- [17] Smith DA, Porter TM, Martinez J, Huang S, MacDonald RC, McPherson DD, Holland CK.
- [18] Bloch SH, Wan M, Dayton PA, Ferrara KW. Optical observation of lipid- and polymer-shelled ultrasound microbubble contrast agents. *Appl Phys Lett*. 2004;84(4):631–3.
- [19] Rapoport N, Gao Z, Kennedy A. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(14):1095–106.
- [20] Reznik N, Williams R, Burns PN. Investigation of vaporized submicron perfluorocarbon droplets as an ultrasound contrast agent. *Ultrasound Med Biol*. 2011;37(8):1271–9.
- [21] Zhang M, Fabiilli ML, Haworth KJ, Fowlkes JB, Kripfgans OD, Roberts W, Ives K, Carson PL. Initial investigation of acoustic droplet vaporization for occlusion in canine kidney. *Ultrasound Med Biol*. 2010;36(10):1691–703.
- [22] Fabiilli ML, Haworth KJ, Sebastian IE, Kripfgans OD, Carson PL, Fowlkes JB. Delivery of chlorambucil using an acoustically-triggered perfluoropentane emulsion. *Ultrasound Med Biol*. 2010;36(8):1364–75.
- [23] Zhang P, Porter T. An in vitro study of a phase-shift nanoemulsion: a potential nucleation agent for bubble-enhanced HIFU tumor ablation. *Ultrasound Med Biol*. 2010;36(11):1856–66.
- [24] Pitt WG, Singh RN, Perez KX, Hussein GA, Jack DR. Phase transitions of perfluorocarbon nanoemulsion induced with ultrasound: a mathematical model. *Ultrason Sonochem*. 2014;21 (2):879–91.
- [25] Sheeran PS, Dayton PA. Phase-change contrast agents for imaging and therapy. *Curr Pharm Des*. 2012;18(15):2152–65.
- [26] Lukianova-Hleb EY, Santiago C, Wagner DS, Hafner JH, Lapotko DO. Generation and detection of plasmonic nanobubbles in zebrafish. *Nanotechnology*. 2010;21(22):225102.
- [27] Kennedy JE. High-intensity focused ultrasound in the treatment of solid tumours. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(4):321–7.
- [28] Askar'yan G, Moroz E. Pressure on evaporation of matter in a radiation beam. *Sov J Exp Theor Phys*. 1963;16:1638–9.
- [29] Brewer RG, Rieckhoff KE. Stimulated Brillouin scattering in liquids. *Phys Rev Lett*. 1964;13 (11):334.

- [30] Lauterborn W, Bolle H. Experimental investigations of cavitation-bubble collapse in the neighbourhood of a solid boundary. *J Fluid Mech.* 1975;72(02):391–3.
- [31] Lauterborn W. Optische kavitation. *Phys Blatter.* 1976;32(12):553–6.
- [32] Raizer YP. Breakdown and heating of gases under the influence of a laser beam. *Sov Phys Usp.* 1966;8(5):650–73.
- [33] Smith D, Meyerand R Jr. Laser radiation induced gas breakdown. New York: Wiley; 1976.
- [34] Ready J. Effects of high-power laser radiation. New York: Academic Press; 1971.
- [35] Bloembergen N. Laser-induced electric breakdown in solids. *IEEE J Quantum Electron.* 1974;10 (3):375–86.
- [36] Kennedy PK, Hammer DX, Rockwell BA. Laser-induced breakdown in aqueous media. *Prog Quantum Electron.* 1997;21(3):155–248.
- [37] Vogel A, Busch S, Parlitz U. Shock wave emission and cavitation bubble generation by picosecond and nanosecond optical breakdown in water. *J Acoust Soc Am.* 1996;100 (1):148–65.
- [38] Farny CH, Wu T, Holt RG, Murray TW, Roy RA. Nucleating cavitation from laser-illuminated nano-particles. *Acoust Res Lett Online.* 2005;6(3):138–43.
- [39] Plesset M. The dynamics of cavitation bubbles. *J Appl Mech.* 1949;16:277.
- [40] Leighton T. The acoustic bubble. London: Academic Press; 1994.
- [41] Hoff L. Acoustic characterization of contrast agents for medical ultrasound imaging. Berlin: Springer; 2001.
- [42] Morgan KE, Allen JS, Dayton PA, Chomas JE, Klibaov A, Ferrara KW. Experimental and theoretical evaluation of microbubble behavior: effect of transmitted phase and bubble size. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control.* 2000;47(6):1494–509.
- [43] Glazman RE. Effects of adsorbed films on gas bubble radial oscillations. *J Acoust Soc Am.* 1983;74(3):980–6.
- [44] de Jong N, Hoff L, Skotland T, Bom N. Absorption and scatter of encapsulated gas filled microspheres: theoretical consideration and some measurements. *Ultrasonics.* 1992;30 (2):95–103.
- [45] Chatterjee D, Sarkar K. A Newtonian rheological model for the interface of microbubble contrast agents. *Ultrasound Med Biol.* 2003;29(12):1749–57.
- [46] Oguz HN, Prosperetti A. Bubble oscillations in the vicinity of a near plane free-surface. *J Acoust Soc Am.* 1990;87(5):2085–92.
- [47] Robinson PB, Blake JR, Kodama T, Shima A, Tomita Y. Interaction of cavitation bubbles with a free surface. *J Appl Phys.* 2001;89(12):8225–37.
- [48] Sankin GN, Zhong P. Interaction between shock wave and single inertial bubbles near an elastic boundary. *Phys Rev E.* 2006;74(4):046304.

- [49] Labouret W, Kurz T. Physics of bubble oscillations. *Rep Prog Phys*. 2010;73(10):106501.
- [50] Brujan EA, Ikeda T, Matsumoto Y. Jet formation and shock wave emission during collapse of ultrasound-induced cavitation bubbles and their role in the therapeutic applications of high-intensity focused ultrasound. *Phys Med Biol*. 2005;50(20):4797–809.
- [51] Oguz HN, Prosperetti A. The natural frequency of oscillation of gas bubbles in tubes. *J Acoust Soc Am*. 1998;103(6):3301–8.
- [52] Miao H, Gracewski SM, Dalecki D. Ultrasonic excitation of a bubble inside a deformable tube: Implications for ultrasonically induced hemorrhage. *J Acoust Soc Am*. 2008;124(4):2374–84.
- [53] Hay TA, Ilinskii YA, Zabolotskaya EA, Hamilton MF. Model for the dynamics of a spherical bubble undergoing small shape oscillations between parallel soft elastic layers. *J Acoust Soc Am*. 2013;134(2):1454–62.
- [54] Hosseinkhah N, Hynynen K. A three-dimensional model of an ultrasound contrast agent gas bubble and its mechanical effects on microvessels. *Phys Med Biol*. 2012;57(3):785–808.
- [55] Allen JS, Roy RA. Dynamics of gas bubbles in viscoelastic fluids. I. Linear viscoelasticity. *J Acoust Soc Am*. 2000a;107(6):3167–78.
- [56] Allen JS, Roy RA. Dynamics of gas bubbles in viscoelastic fluids. II. Nonlinear viscoelasticity. *J Acoust Soc Am*. 2000b;108(4):1640–50.
- [57] Cleveland RO, McAteer JA (2007) The physics of shock wave lithotripsy. In: Smith AD, Badlani GH, Bagley DH, Clayman RV, Docimo SG, Jordan GH, Kavoussi LR, Lee BR, Lingeman JE, Preminger GM, Segura JW (eds) *Smith's textbook of endourology*. BC Decker, Hamilton, pp 317–332 .
- [58] Ueberle F, Rad AJ (2011) Pressure pulse measurements using optical hydrophone principles. *Advanced metrology for ultrasound in medicine*. *J Phys Conf Ser* 279:012003. doi:10.1088/1742-6596/279/1/012003.
- [59] Dreisilker U (ed) (2010a) *Enthesiopathien*. Level10 Buchverlag, Heilbronn, 135 p, (in German) .
- [60] Church CC (1989) A theoretical study of cavitation generated by an extracorporeal shock wave lithotripter. *J Acoust Soc Am* 86:215–227 .
- [61] Johnsen E, Colonius T (2008) Shock-induced collapse of a gas bubble in shock wave lithotripsy. *J Acoust Soc Am* 124:2011–2020.
- [62] Eliasson V (2007) *On focusing of shock waves*. Dissertation. Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden, 84 p.
- [63] Wess O, Leal CA, Cortes M, Schaden W (2007) Biocirugía por ondas de choque: principios básicos y tecnología. *Rev Soc Latinoam Artoscop Traumatol Dep* 4:8–17 .
- [64] Ogden JA, Tóth-Kischkat A, Schultheiss R (2001b) Principles of shock wave therapy. *Clin Orthop Relat Res* 387:8–17 .

- [65] Cleveland RO, Chitnis PV, McClure SR (2007) Acoustic field of a ballistic shock wave therapy device. *Ultrasound Med Biol* 33:1327–1335
- [66] Novak P (2014) Physics: F-SW and R-SW. Basic information on focused and radial shock wave physics. In: Lohrer H, Gerdesmeyer L (eds) *Multidisciplinary medical applications*. Level10 Buchverlag, Heilbronn, pp 28–49 (Shock wave therapy in practice) .
- [67] Wess O (2013) Shock wave technology for stone fragmentation. In: Tiselius HG (ed) *Urology*. Level10 Buchverlag, Germany, pp 14–39 (Shock wave therapy in practice).
- [68] Ueberle F (2011) Application of shock waves and pressure pulses in medicine. In: Kramme R, Hoffmann KP, Pozos RS (eds) *Springer handbook of medical technology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 641–675.
- [69] Chitnis PV (2002) Characterization and comparative analysis of extracorporeal shock wave devices. Master’s Thesis, College of Engineering, Boston University, Boston, p 108.
- [70] Granz P, Köhler D (1992) What makes shock waves efficient in lithotripsy? *J Lithotr Stone Dis* 4:123–128.
- [71] Folberth W, Köhler G, Rohwedder A, Matura E (1992) Pressure distribution and energy flow in the focal region of two different electromagnetic shock wave sources. *J Lithotr Stone Dis* 4:1–7.
- [72] Loske AM (2010) The role of energy density and acoustic cavitation in shock wave lithotripsy. *Ultrasonics* 50:300–305.
- [73] Chow IHW, Cheing GLY (2007) Comparison of different energy densities of extracorporeal shock wave therapy (ESWT) for the management of chronic heel pain. *Clin Rehabil* 21:131–141.
- [74] Bannuru RR, Flavin NE, Vaysbrot E, Harvey W, McAlindon T (2014) High-energy extracorporeal shock-wave therapy for treating chronic calcific tendinitis of the shoulder. *Ann Intern Med* 160:542–549.
- [75] Speed CA (2004) Extracorporeal shock-wave therapy in the management of chronic soft-tissue conditions. *J Bone Joint Surg Br Vol* 86:165–171.
- [76] Cacchio A, Paoloni M, Barile A, Don R, de Paulis F, Calvisi V, Ranavolo A, Frascarelli M, Santilli V, Spacca G (2006) Effectiveness of radial shock-wave therapy for calcific tendinitis of the shoulder: single-blind, randomized clinical study. *Phys Ther* 86:672–682.
- [77] Russo P, Stephenson RA, Mies C, Huryk R, Heston WD, Melamed MR, Fair WR (1986) High energy shock waves suppress tumor growth in vitro and in vivo. *J Urol* 135:626–628.
- [78] Oosterhof GON, Smits GAHJ, de Ruyter JE, Schalken JA, Debruyne FMJ (1990a) Effects of high- energy shock waves combined with biological response modifiers or Adriamycin on a human kidney cancer xenograft. *Urol Res* 18:419–424.

- [79] Oosterhof GON, Smits GAHJ, de Ruyter AE, Schalken JA, Debruyne FMJ (1990b) In vivo effects of high energy shock waves on urological tumors: an evaluation of treatment modalities. *J Urol* 144:785–789.
- [80] Gamarra F, Spelsberg F, Dellian M, Goetz AE (1993a) Complete local tumor remission after therapy with extra-corporeally applied high-energy shock waves (HESW). *Int J Cancer* 55:153–156.
- [81] Gamarra F, Spelsberg F, Kuhnle GEH, Goetz AE (1993b) High-energy shock waves induce blood flow reduction in tumors. *Cancer Res* 53:1590–1595.
- [82] Oosterhof GON, Cornel EB, Smits GAHJ, Debruyne FMJ, Schalken JA (1996) The influence of high-energy shock waves on the development of metastases. *Ultrasound Med Biol* 22:339–344.
- [83] Frairia R, Catalano MG, Fortunati N, Fazzari A, Raineri M, Berta L (2003) High energy shock waves (HESW) enhance paclitaxel cytotoxicity in MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 81:11–19.
- [84] Canaparo R, Serpe L, Catalano MG, Bosco O, Zara GP, Berta L, Frairia R (2006) High energy shock waves (HESW) for sonodynamic therapy: effects on HT-29 human colon cancer cells. *Anticancer Res* 26:3337–3342 .
- [85] Schmitz C, Császár NBM, Milz S, Schieker M, Maffulli N, Rompe JD, Furia JP (2015) Efficacy and safety of extracorporeal shock wave therapy for orthopedic conditions: a systematic review on studies listed in the PEDro database. *Br Med Bull* 116:115–138 .
- [86] Hunter PT, Finlayson B, Hirko RJ, Voreck WC, Walker R, Walck S, Nasr M (1986) Measurement of shock wave pressures used for lithotripsy. *J Urol* 136:733–738 .
- [87] Coleman AJ, Saunders JE, Choi MJ (1989) An experimental shock wave generator for lithotripsy studies. *Phys Med Biol* 34:1733–1742.
- [88] Müller M (1990) Dornier-Lithotripter im Vergleich. Vermessung der Stosswellenfelder und Fragmentationswirkungen. *Biomed Tech* 35:250–262 (in German).
- [89] McAleer IM, Kaplan GW, Bradley JS, Carroll SF, Griffith DP (2003) Endotoxin content in renal calculi. *J Urol* 169:1813–1814.
- [90] van Cauwelaert J (2004) Use of micro-computed tomography to follow the progression of crack formation in artificial and human stones during shock wave lithotripsy. Master's Thesis, Boston University, Boston MA, 164 p.
- [91] Huber P, Debus J, Peschke P, Hahn EW, Lorenz WJ (1994) In vivo detection of ultrasonically induced cavitation by a fibre-optic technique. *Ultrasound Med Biol* 20:811–825.
- [92] Delacrétaz G, Rink K, Pittomvils G, Lafaut JP, Vandeursen H, Boving R (1995) Importance of the implosion of ESWL-induced cavitation bubbles. *Ultrasound Med Biol* 21:97–103 .

- [93] Jöchle K, Debus J, Lorenz WJ, Huber P (1996) A new method of quantitative cavitation assessment in the field of a lithotripter. *Ultrasound Med Biol* 22:329–338 .
- [94] Huber P, Debus J, Jöchle K, Simiantonakis I, Jenne J, Rastert R, Spoo J, Lorenz WJ, Wannenmacher M (1999a) Control of cavitation activity by different shockwave pulsing regimes. *Phys Med Biol* 44:1427–1437 .
- [95] Filipczynsky L, Etienne J (1990) Capacitance hydrophones for pressure determination in lithotripsy. *Ultrasound Med Biol* 16:157–165.
- [96] Etienne J, Filipczynski L, Kujawska T, Zienkiewicz B (1997) Electromagnetic hydrophone for pressure determination of shock wave pulses. *Ultrasound Med Biol* 23:747–754 .
- [97] Filipczynsky L (1969) Absolute measurements of particle velocity, displacement or intensity of ultrasonic pulses in liquids and solids. *Acustica* 21:173–180.
- [98] Müller M, Platte M (1985) Einsatz einer breitbandigen Drucksonde auf PVDF-Basis zur Untersuchung konvergierender Stosswellen in Wasser. *Acustica* 58:215–222 (in German).
- [99] Platte M (1985) A polyvinylidene fluoride needle hydrophone for ultrasonic applications. *Ultrasonics* 23:113–118.
- [100] Müller M (1987) Experimental investigations on focusing of weak spherical shock waves in water by shallow ellipsoidal reflectors. *Acustica* 64:85–93.
- [101] Sommerfeld M, Müller M (1988) Experimental and numerical studies of shock wave focusing in water. *Exp Fluids* 6:209–216.
- [102] Preston RC, Bacon DR, Livett AJ, Rajendran K (1983) PVDF membrane hydrophone performance properties and their relevance to the measurement of the acoustic output of medical ultrasonic equipment. *J Phys E* 16:786–796.
- [103] Schafer ME (1993) Cost effective shock wave hydrophones. *J Stone Dis* 5:73–76.
- [104] Maxwell AD, Sapozhnikov OA, Bailey MR (2006) A new PVDF membrane hydrophone for measurement of medical shock waves. In: *Proceedings of the IEEE ultrasonics symposium, IEEE, Vancouver, BC, pp. 1608–1611, 2–6 Oct 2006.* doi:10.1109/ULTSYM.2006.407 .
- [105] Granz B (1989) PVDF hydrophone for the measurement of shock waves. *IEEE Trans Electr Insul* 24:499–502 .
- [106] Kreider W, Bailey MR, Ketterling JA (2009) Beamwidth measurement of individual lithotripter shock waves. *J Acoust Soc Am* 125:1240–1245.
- [107] Eisenmenger W, Staudenraus J (1991) Sampling hydrophone. United States Patent US5010248 A, Int. Cl. A61B8/12, 23 Apr 1991.
- [108] Staudenraus J, Eisenmenger W (1993) Fibre-optic hydrophone for ultrasonic and shock wave measurements in water. *Ultrasonics* 31:267–273 .

- [109] Wang ZQ, Lauxmann P, Wurster C, Köhler M, Gompf B, Eisenmenger W (1999a) Impulse response of a fiber optic probe hydrophone determined with shock waves in water. *J Appl Phys* 85:2514–2516 .
- [110] Wang ZQ, Pecha R, Gompf B, Eisenmenger W (1999b) Single bubble sonoluminescence: investigation of the emitted pressure wave with a fiber optic probe hydrophone. *Phys Rev E* 59:1777–1780 .
- [111] Ginter S, Liebler M, Steiger E, Dreyer T, Riedlinger RE (2002) Full-wave modeling of therapeutic ultrasound: nonlinear ultrasound propagation in ideal fluids. *J Acoust Soc Am* 111:2049–2059.
- [112] Parsons JE, Cain CA, Fowlkes JB (2006b) Cost-effective assembly of a basic fiberoptic hydrophone for measurement of high amplitude therapeutic ultrasound fields. *J Acoust Soc Am* 119:1432–1440.
- [113] Kang G, Cho SC, Coleman AJ, Choi MJ (2014) Characterization of the shock pulse-induced cavitation bubble activities recorded by an optical fiber hydrophone. *J Acoust Soc Am* 135:1139–1148.
- [114] Krücker J, Eisenberg A, Krix M, Lötsch R, Pessel M, Trier HG (2000) Rigid piston approximation for computing the transfer function and angular response of a fiber-optic hydrophone. *J Acoust Soc Am* 107:1994–2003.
- [115] Parsons JE, Cain CA, Fowlkes JB (2006b) Cost-effective assembly of a basic fiberoptic hydrophone for measurement of high amplitude therapeutic ultrasound fields. *J Acoust Soc Am* 119:1432–1440.
- [116] Hamilton MF, Blackstock DT (1997) *Nonlinear acoustics: theory and application*. Academic, San Diego .
- [117] Zijlstra A, Ohl CD (2008) On fiber optic probe hydrophone measurements in a cavitating liquid. *J Acoust Soc Am* 123:29–32..
- [118] Granz B, Nanke R, Fehre J, Pfister T, Engelbrecht R (2004) Light spot hydrophone, innovation in lithotripsy. *Med Solut* 6:86–87 .
- [119] Kolacek K, Babicky V, Preinhaelter J, Sunka P, Benes J (1988) Pressure distribution measurements at the shock wave focus in water by schlieren photography. *J Phys D Appl Phys* 21:463–469 .
- [120] Carnell MT, Emmony DC (1995a) A schlieren study of the interaction between a lithotripter shock wave and a simulated kidney stone. *Ultrasound Med Biol* 21:721–724.
- [121] Carnell MT, Emmony DC (1995b) Optical distortion in the field of a lithotripter shock wave. *Appl Opt* 28:6465–6470.
- [122] Settles GS (2001) *Schlieren and shadowgraph techniques: visualizing phenomena in transparent media*. Springer, Berlin.
- [123] Yamamoto S, Tagawa Y, Kameda M (2014) The evolution of a shock wave pressure induced by a laser pulse in a liquid filled thin tube using the

- background-oriented schlieren technique. In: Proceedings of the 17th international symposium on applications of laser techniques to fluid mechanics; Lisbon Symposia, Lisbon, Portugal, 8 p, 7–10 July 2014.
- [124] Xi XF, Zhong P (2000) Improvement of stone fragmentation during shock wave lithotripsy using a combined EH/PEAA shock-wave generator—in vitro experiments. *Ultrasound Med Biol* 26:457–467 .
- [125] 26:457–467 Xi X, Zhong P (2001) Dynamic photoelastic study of the transient stress field in solids during shock wave lithotripsy. *J Acoust Soc Am* 109:1226–1239 .
- [126] Zhou Y, Zhong P (2003) Suppression of large intraluminal bubble expansion in shock wave lithotripsy without compromising stone comminution: refinement of reflector geometry. *J Acoust Soc Am* 113:586–597 .
- [127] Oshita D, Hosseini SHR, Okuda Y, Miyamoto Y, Sakugawa T, Katsuki S, Akiyama H (2012) Time-resolved high-speed visualization and analysis of underwater shock wave focusing generated by a magnetic pulse compression unit. *IEEE Trans Plasma Sci* 40:2395–2400 .
- [128] Takayama K (1983) Application of holographic interferometry to shock wave research. In: Fagan WF (ed) *Industrial applications of laser technology*, Proceedings of SPIE, the international society for optical engineering, SPIE, Bellingham, Washington, vol 398, pp 174–181, 19–22 Apr 1983. doi:10.1117/12.935372 .
- [129] Hosseini SHR, Takayama K (2004) Study of micro shock waves and cavitation generated by Ho: YAG laser beam for medical application. In: Behnia M, Lin W, McBain GD (eds) *Proceedings of the 15th Australasian fluid mechanics conference*, University of Sydney, Sydney, Australia, 13–17 Dec 2003 .
- [130] Yamamoto S, Tagawa Y, Kameda M (2015) Application of background-oriented schlieren (BOS) technique to a laser-induced underwater shock wave. *Exp Fluids* 56:93.
- [131] Coleman AJ, Choi MJ, Saunders JE (1996) Detection of acoustic emission from cavitation in tissue during clinical extracorporeal lithotripsy. *Ultrasound Med Biol* 22:1079–1087.
- [132] Bailey MR (1997b) Control of acoustic cavitation with application to lithotripsy. Final report. Applied Research Laboratories Report No: ARL-TR-97-1. The University of Texas at Austin, Austin, Texas and Defense Technical Information Center .
- [133] Cunningham KB, Coleman AJ, Leighton TG, White PR (2001) Characterising in vivo acoustic cavitation during lithotripsy with time-frequency methods. *Acoust Aust* 26(5):10–16 .
- [134] Bailey MR, Pishchalnikov YA, Sapozhnikov OA, Cleveland RO, McAteer JA, Miller NA, Pishchalnikova IV, Connors BA, Crum LA, Evan AP (2005)

- Cavitation detection during shock wave lithotripsy. *Ultrasound Med Biol* 31:1245–1256 .
- [135] Chitnis PV, Cleveland RO (2006) Quantitative measurements of acoustic emissions from cavitation at the surface of a stone in response to a lithotripter shock wave. *J Acoust Soc Am* 119:1929–1932.
- [136] Tu J, Matula TJ, Bailey MR, Crum LA (2007) Evaluation of a shock wave induced cavitation activity both in vitro and in vivo. *Phys Med Biol* 52:5933–5944 .
- [137] Collin JRT, Coussios CC (2011) Quantitative observations of cavitation activity in a viscoelastic medium. *J Acoust Soc Am* 130:3289–3296 .
- [138] Wan M, Feng Y, ter Haar G (eds) (2015) *Cavitation in biomedicine: principles and techniques*. Springer Science and Business Media, Heidelberg, New York, London .
- [139] Cleveland RO, Sapozhnikov OA, Bailey MR, Crum LA (2000b) A dual passive cavitation detector for localized detection of lithotripsy-induced cavitation in vitro. *J Acoust Soc Am* 107:1745–1758 .
- [140] Qin S, Caskey CF, Ferrara KW. Ultrasound contrast microbubbles in imaging and therapy: physical principles and engineering. *Phys. Med. Biol.* 54(6), R27–R57 (2009).
- [141] Marxer EEJ, Brußler J, Becker A et al. Development and characterization of new nanoscaled ultrasound active lipid dispersions as contrast agents. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77, 430–437 (2011).
- [142] O’Neill BE, Rapoport N. Phase-shift, stimuli-responsive drug carriers for targeted delivery. *Ther. Deliv.* 2(9), 1165–87 (2011).
- [143] Cavalli R, Bisazza A, Lembo D. Micro-and nanobubbles: a versatile non-viral platform for gene delivery. *Int. J. Pharm.* 456(2), 437–445 (2013).
- [144] Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug Del. Rev.* 63(3), 136–151 (2011).
- [145] Fokong S, Theek B, Wu Z et al. Image-guided, targeted and triggered drug delivery to tumors using polymer-based microbubbles. *J. Control. Rel.* 163, 75–81 (2012).
- [146] Zhang C, Cao H, Li Q et al. Enhancement effect of ultrasound-induced microbubble cavitation on branched polyethylenimine-mediated VEGF165 transfection with varied N/P ratio. *Ultrasound Med. Biol.* 39, 161–171 (2013).
- [147] Pitt WG, Hussein GA. Ultrasound in drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1095–1096 (2008).
- [148] Rapoport N. Phase-shift, stimuli-responsive perfluorocarbon nanodroplets for drug delivery to cancer. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 4(5), 492–510 (2012).

- [149] Rapoport NY, Efros AL, Christensen DA et al. Microbubble generation in phase-shift nanoemulsions used as anticancer drug carriers. *Bubble Sci. Eng. Technol.* 1(1–2), 31–39 (2009).
- [150] Van Liew HD, Raychaudhuri S. Stabilized bubbles in the body: pressure-radius relationships and the limits to stabilization. *J. Appl. Physiol.* 82(6), 2045–2053 (1997).
- [151] Kooiman K, Vos HJ, Versluis M et al. Acoustic behavior of microbubbles and implications for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 72, 28–48 (2014).
- [152] Kwan JJ, Borden MA. Lipid monolayer collapse and microbubble stability. *Adv. Colloids Interface Sci.* 183, 82–99 (2012).
- [153] Dressaire E, Bee R, Bell DC et al. Interfacial polygonal nanopatterning of stable microbubbles. *Science* 320(5880), 1198–1201 (2008).
- [154] Krupka TM, Solorio L, Wilson RE et al. Formulation and characterization of echogenic lipid pluronic nanobubbles. *Mol. Pharm.* 7(1), 49–59 (2009).
- [155] Cruz A, Vazquez L, Velez M et al. Influence of a fluorescent probe on the nanostructure of phospholipid membranes: dipalmitoylphosphatidylcholine interfacial monolayers. *Langmuir* 21(12), 5349–5355 (2005).
- [156] Moghaddam B, Ali MH, Wilkhu J et al. The application of monolayer studies in the understanding of liposomal formulations. *Int. J. Pharm.* 417(1), 235–244 (2011).
- [157] Eeman M, Berquand A, Dufrene YF et al. Penetration of surfactin into phospholipid monolayers: nanoscale interfacial organization. *Langmuir* 22(26), 11337–11345 (2006).
- [158] Krafft MP, Fainerman VB, Miller R. Modeling of the effect of fluorocarbon gases on the properties of phospholipid monolayers and the adsorption dynamics of their aqueous solutions or dispersions. *Colloid. Polym. Sci.* 293(11), 3091–3097 (2015).
- [159] Wu H, Rognin NG, Krupka TM et al. Acoustic characterization and pharmacokinetic analyses of new nanobubble ultrasound contrast agents. *Ultrasound. Med. Biol.* 39(11), 2137–2146 (2013).
- [160] Krafft MP. Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research. *Adv. Drug Del. Rev.* 47(2), 209–228 (2001).
- [161] Sheeran PS, Dayton PA. Phase-change contrast agents for imaging and therapy. *Curr. Pharm. Des.* 18(15), 2152–2165 (2012).
- [162] Kandadai MA, Mohan P, Lin G et al. Comparison of surfactants used to prepare aqueous perfluoropentane emulsions for pharmaceutical applications. *Langmuir* 26(7), 4655–4660 (2010).
- [163] Cavalli R, Soster M, Argenziano M, Nanobubbles: a promising efficient tool for therapeutic delivery, Torino, 15 January 2016.

- [164] Kawabata K, Sugita N, Yoshikawa H et al. Nanoparticles with multiple perfluorocarbons for controllable ultrasonically induced phase shifting. *Jpn. J. Appl. Phys.* 44, 5 (2005).
- [165] Mountford PA, Sirsi SR, Borden MA. Condensation phase diagrams for lipid-coated perfluorobutane microbubbles. *Langmuir* 30(21), 6209–6218 (2014).
- [166] Mountford PA, Thomas AN, Borden MA. Thermal activation of superheated lipid-coated perfluorocarbon drops. *Langmuir* 31(16), 4627–4634 (2015).
- [167] Kooiman K, Bohmer MR, Emmer M et al. Oil-filled polymer microcapsules for ultrasound-mediated delivery of lipophilic drugs. *J. Control. Rel.* 133(2), 109–118 (2009).
- [168] Glynos E, Koutsos V, McDicken WN et al. Nanomechanics of biocompatible hollow thin-shell polymer microspheres. *Langmuir* 25(13), 7514–7522 (2009).
- [169] Pu G, Borden MA, Longo ML. Collapse and shedding transitions in binary lipid monolayers coating microbubbles. *Langmuir* 22, 2993–2999 (2006).
- [170] Rovers TA, Sala G, Van der Linden E, Meinders MB. Temperature is key to yield and stability of BSA stabilized microbubbles. *Food Hydrocolloids* 52, 106–115 (2016).
- [171] Talu E, Lozano MM, Powell RL et al. Long-term stability by lipid coating monodisperse microbubbles formed by a flow-focusing device. *Langmuir* 22(23), 9487–9490 (2006).
- [172] Riess JG. Understanding the fundamentals of perfluorocarbons and perfluorocarbon emulsions relevant to in vivo oxygen delivery. *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* 33(1), 47–63 (2005).
- [173] Du Toit LC, Govender T, Pillay V et al. Investigating the effect of polymeric approaches on circulation time and physical properties of nanobubbles. *Pharm. Res.* 28, 494–504 (2011).
- [174] Delalande A, Postema M, Mignet N et al. Ultrasound and microbubble-assisted gene delivery: recent advances and ongoing challenges. *Ther. Deliv.* 3(10), 1199–1215 (2012).
- [175] Kothapalli SV, Oddo L, Paradossi G, Brodi LÅ, Grishenkov D. Assessment of the viscoelastic and oscillation properties of a nano-engineered multimodality contrast agent. *Ultrasound Med. Biol.* 40(10), 2476–2487 (2014).
- [176] Xiong X, Zhao F, Shi M, Yang H, Liu Y. Polymeric microbubbles for ultrasonic molecular imaging and targeted therapeutics. *J. Biomater. Sci, Polym. Ed.* 22(4–6), 417–428 (2011).
- [177] Capece S, Chessi E, Cavalli R, Giustetto P, Grishenkov D, Paradossi G. A general strategy for the obtainment of biodegradable polymer shelled microbubbles as theranostic device. *Chem. Commun.* 49, 5763–5765 (2013).
- [178] Cavalli R, Soster M, Argenziano M, Baroni S, Giustetto P, Terreno E. New crosslinked polymeric nanobubbles as in vitro and in vivo theranostic agent.

Presented at: European Molecular Meeting 2014. Antwerp, Belgium, 4–6 June 2014.

- [179] Christenson, H. K.; Claesson, P. M. Direct Measurements of the Force between Hydrophobic Surfaces in Water. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2001, 91, 391436.
- [180] Craig, V. S. J. Very Small Bubbles at Surfaces-the Nanobubble Puzzle. *Soft Matter* 2011, 7, 4048.
- [181] Zhang, X. H.; Kumar, A.; Scales, P. J. Effects of Solvency and Interfacial Nanobubbles on Surface Forces and Bubble Attachment at Solid Surfaces. *Langmuir* 2011, 27, 24842491.
- [182] Ishida, N.; Inoue, T.; Miyahara, M.; Higashitani, K. Nano Bubbles on a Hydrophobic Surface in Water Observed by Tapping-Mode Atomic Force Microscopy. *Langmuir* 2000, 16, 63776380.
- [183] Holmberg, M.; Kuhle, A.; Garnæs, J.; Mørch, K.; Boisen, A. Nanobubble Trouble on Gold Surfaces. *Langmuir* 2003, 19, 10510 10513.
- [184] Stride E, Edirisinghe M. Novel microbubble preparation technologies. *Soft Matter* 4, 2350–2359 (2008).
- [185] Xing Z, Wang J, Ke H et al. The fabrication of novel nanobubble ultrasound contrast agent for potential tumor imaging. *Nanotechnology* 21(14), 145607 (2010).
- [186] Dhanaliwala AH, Dixon AJ, Lin D et al. In vivo imaging of microfluidic-produced microbubbles. *Biomed. Microdevices* 17(1), 23 (2015).
- [187] Wang S, Dhanaliwala AH, Chen JL et al. Production rate and diameter analysis of spherical monodisperse microbubbles from two-dimensional, expanding-nozzle flow- focusing microfluidic devices. *Biomicrofluidics* 7(1), 14103 (2013).
- [188] Sheeran PS, Luois S, Dayton PA, Matsunaga TO. Formulation and acoustic studies of a new phase-shift agent for diagnostic and therapeutic ultrasound. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 27, 10412–10420 (2011).
- [189] Rapoport N, Gao Z, Kennedy A. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy. *J. Natl Cancer Inst.* 99, 1095–1106 (2007).
- [190] Rapoport NY, Kennedy AM, Shea JE, Scaife CL, Nam KH. Controlled and targeted tumor chemotherapy by ultrasound- activated nanoemulsions/microbubbles. *J. Control. Release* 138(3), 268–276 (2009).
- [191] Cavalli R. Nanoscale bubbles: an alternative tool for anticancer drug delivery. Presented at: Leeds Microbubble Symposium. Leeds, UK, 29–30 June 2015.
- [192] Anderson KE, Rogers JA, Li D. An interfacial tension model of the interaction of water-soluble polymers with phospholipid composite monolayers. *J. Pharm. Pharmacol.* 49(6), 587–591 (1997).

- [193] Santos HA, Garcia-Morales V, Roozeman RJ, Manzanares JA, Kontturi K. Interfacial interaction between dextran sulfate and lipid monolayers: an electrochemical study. *Langmuir* 21(12), 5475–5484 (2005).
- [194] Geers B, Dewitte H, De Smedt SC, Lentacker I. Crucial factors and emerging concepts in ultrasound-triggered drug delivery. *J. Control. Release* 164(3), 248–255 (2012).
- [195] Nomikou N, Tiwari P, Trehan T, Gulati K, McHale A. Studies on neutral, cationic and biotinylated cationic microbubbles in enhancing ultrasound-mediated gene delivery in-vitro and in-vivo. *Acta Biomater.* 8, 1273–1280 (2012).
- [196] Cavalli R, Bisazza A, Giustetto P et al. Dextran multilayer microbubbles as ultrasound-triggered doxorubicin carriers. Presented at: iConference on Innovation Drug Delivery Aix-en-Provence. France, 3–6 October 2010.
- [197] Tartis SM, McCallan J, Lum A et al. Therapeutic effects of paclitaxel-containing ultrasound contrast agents. *Ultrasound Med. Biol.* 32, 1771–1780 (2006).
- [198] Nguyen AT, Wrenn SP. Acoustically active liposome-nanobubble complexes for enhanced ultrasonic imaging and ultrasound-triggered drug delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 6, 316–325 (2014).
- [199] Tinkov S, Bekeredjian R, Winter G, Coester C. Microbubbles as ultrasound triggered drug carriers. *J. Pharm. Sci.* 98(6), 1935–1961 (2009).
- [200] Wang CH, Huang YF, Yeh CK. Aptamer-conjugated nanobubbles for targeted ultrasound molecular imaging. *Langmuir* 27(11), 6971–6976 (2011).
- [201] Eggen S, Fagerland SM, Mørch Y et al. Ultrasound-enhanced drug delivery in prostate cancer xenografts by nanoparticles stabilizing microbubbles. *J. Control. Release* 187, 39–49 (2014).
- [202] Ruttala HB, Ko YT. Liposomal co-delivery of curcumin and albumin/paclitaxel nanoparticle for enhanced synergistic antitumor efficacy. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 128, 419–426 (2015).
- [203] Yang H, Cai W, Xu L et al. NanobubbleAffibody: novel ultrasound contrast agents for targeted molecular ultrasound imaging of tumor. *Biomaterials* 37, 279–288 (2015).
- [204] Fan X, Wang L, Guo Y et al. Ultrasonic nanobubbles carrying anti-PSMA nanobody: construction and application in prostate cancer-targeted imaging. *PLoS ONE* 10(6), e0127419 (2015).
- [205] Gao Z, Kennedy AM, Christensen DA, Rapoport NY. Drug-loaded nano/microbubbles for combining ultrasonography and targeted chemotherapy. *Ultrasonics*. 48, 260–270 (2008).
- [206] Du L, Jin Y, Zhou W, Zhao J. Ultrasound-triggered drug release and enhanced anticancer effect of doxorubicin-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide)-methoxy-poly(ethylene-glycol) nanodroplets. *Ultrasound Med. Biol.* 37(8),

- 1252–1258 (2011).
- [207] Zhang X, Zheng Y, Wang Z et al. Methotrexate-loaded PLGA nanobubbles for ultrasound imaging and Synergistic Targeted therapy of residual tumor during HIFU ablation. *Biomaterials* 35(19), 5148–5161 (2014).
- [208] Ji G, Yang J, Chen J. Preparation of novel curcumin-loaded multifunctional nanodroplets for combining ultrasonic development and targeted chemotherapy. *Int. J. Pharm.* 466(1), 314–320 (2014).
- [209] Rychak JJ, Klibanov AL. Nucleic acid delivery with microbubbles and ultrasound. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 72, 82–93 (2014).
- [210] Suzuki R, Oda Y, Utoguchi N, Maruyama K. Progress in the development of ultrasound-mediated gene delivery systems utilizing nano- and microbubbles. *J. Control. Release* 149, 36–41 (2011).
- [211] Tlaxca J, Anderson C, Klibanov A et al. Analysis of in-vitro transfection by sonoporation using cationic and neutral microbubbles. *Ultrasound Med. Biol.* 36, 1907–1918 (2010).
- [212] Cavalli R, Bisazza A, Lembo D. Micro-and nanobubbles: a versatile non-viral platform for gene delivery. *Int. J. Pharm.* 456(2), 437–445 (2013).
- [213] Yin T, Wang P, Li J et al. Ultrasound-sensitive siRNA- loaded nanobubbles formed by hetero-assembly of polymeric micelles and liposomes and their therapeutic effect in gliomas. *Biomaterials* 34(18), 4532–4543 (2013).
- [214] Yin T, Wang P, Li J et al. Tumor-penetrating codelivery of siRNA and paclitaxel with ultrasound-responsive nanobubbles hetero-assembled from polymeric micelles and liposomes. *Biomaterials* 35(22), 5932–5943 (2014).
- [215] Wang L, Zhang M, Tan K et al. Preparation of nanobubbles carrying androgen receptor siRNA and their inhibitory effects on androgen-independent prostate cancer when combined with ultrasonic irradiation. *PLoS ONE* 9(5), e96586 (2014).
- [216] Xie X, Yang Y, Lin W et al. Cell-penetrating peptide-siRNA conjugate loaded YSA-modified nanobubbles for ultrasound triggered siRNA delivery. *Colloids Surf. B.* 136, 641–650 (2015).
- [217] Zhou ZY, Zhang P, Ren JL et al. Synergistic effects of ultrasound-targeted microbubble destruction and TAT peptide on gene transfection: an experimental study in vitro and in vivo. *J. Control. Release* 170, 437–444 (2013).
- [218] Zhu F, Jiang Y, Luo F et al. Effectiveness of localized ultrasound-targeted microbubble destruction with doxorubicin liposomes in H22 mouse hepatocellular carcinoma model. *J. Drug Target* 23(4), 323–334 (2015).
- [219] Stride E. Physical principles of microbubbles for ultrasound imaging and therapy. *Front. Neurol. Neurosci.* 36, 11–22 (2015).
- [220] Mahalingam S, Raimi-Abraham BT, Craig DQ et al. Formation of protein and protein–gold nanoparticle stabilized microbubbles by pressurized gyration. *Langmuir* 31, 659–666 (2015).

- [221] Parhizkar M, Stride E, Edirisinghe M. Preparation of monodisperse microbubbles using an integrated embedded capillary T-junction with electrohydrodynamic focusing. *Lab Chip* 14, 2437–2446 (2014).
- [222] Bisazza A, Giustetto P, Rolfo A et al. Microbubble-mediated oxygen delivery to hypoxic tissues as a new therapeutic device. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 2008, 2067–2070 (2008).
- [223] Kheir JN, Polizzotti BD, Thomson LM et al. Bulk manufacture of concentrated oxygen gas-filled microparticles for intravenous oxygen delivery. *Adv. Healthcare Mater.* 2(8), 1131–1141 (2013).
- [224] Thomson LM, Polizzotti BD, McGowan FX, Kheir JN. Manufacture of concentrated, lipid-based oxygen microbubble emulsions by high shear homogenization and serial concentration. *J. Vis. Exp.* 87, doi:10.3791/51467 (2014).
- [225] McEwan C, Owen J, Stride E et al. Oxygen carrying microbubbles for enhanced sonodynamic therapy of hypoxic tumours. *J. Control. Release* 203, 51–56 (2015).
- [226] Cavalli R, Akhter AK, Bisazza A, Giustetto P, Trotta F, Vavia P. Nanosponge formulations as oxygen delivery systems. *Int. J. Pharm.* 402(1), 254–257 (2010).
- [227] Klegerman ME, Wassler M, Huang SL et al. Liposomal modular complexes for simultaneous targeted delivery of bioactive gases and therapeutics. *J. Control. Release* 142, 326–33 (2010).
- [228] Cavalli R, Bisazza A, Giustetto P et al. Preparation and characterization of dextran nanobubbles for oxygen delivery. *Int. J. Pharm.* 381(2), 160–165 (2009).
- [229] Cavalli R, Bisazza A, Rolfo A et al. Ultrasound-mediated oxygen delivery from chitosan nanobubbles. *Int. J. Pharm.* 378(1–2), 215–217 (2009).
- [230] Matsuki N, Ishikawa T, Ichiba S, Shiba N, Ujike Y, Yamaguchi T. Oxygen supersaturated fluid using fine micro/ nanobubbles. *Int. J. Nanomedicine* 9, 4495–4505 (2014).
- [231] Magnetto C, Prato M, Khadjavi A et al. Ultrasound-activated decafluoropentane-cored and chitosan-shelled nanodroplets for oxygen delivery to hypoxic cutaneous tissues. *RSC Adv.* 4(72), 38433–38441 (2014).
- [232] Basilico N, Magnetto C, D’Alessandro S et al. Dextran-shelled oxygen-loaded nanodroplets reestablish a normoxia-like pro-angiogenic phenotype and behavior in hypoxic human dermal microvascular endothelium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 288(3), 330–338 (2015).
- [233] Khadjavi A, Magnetto C, Panariti A et al. Chitosan-shelled oxygen-loaded nanodroplets abrogate hypoxia dysregulation of human keratinocyte gelatinases and inhibitors: new insights for chronic wound healing. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 286(3), 198–206 (2015).

- [234] Aryal M, Arvanitis CD, Alexander PM et al. Ultrasound-mediated blood-brain barrier disruption for targeted drug delivery in the central nervous system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 72, 94–109 (2014).
- [235] Hwang TL, Lin YK, Chi CH, Huang TH, Fang JY. Development and evaluation of perfluorocarbon nanobubbles for apomorphine delivery. *J. Pharm. Sci.* 98(10), 3735–3747 (2009).
- [236] Banche G, Prato M, Magnetto C et al. Antimicrobial chitosan nanodroplets: new insights for ultrasound-mediated adjuvant treatment of skin infection. *Future Microbiol.* 10(6), 929–939 (2015).
- [237] Lammers T, Aime S, Hennink WE, Storm G, Kiessling F. Theranostic nanomedicine. *Acc. Chem. Res.* 44(10), 1029–1038 (2011).
- [238] Terreno E, Uggeri F, Aime S. Image guided therapy: the advent of theranostic agents. *J. Control. Release* 161(2), 328–337 (2012).
- [239] Kelkar SS, Reineke TM. Theranostics: combining imaging and therapy. *Bioconjugate Chem.* 22(10), 1879–1903 (2011).
- [240] Shi D. Integrated multifunctional nanosystems for medical diagnosis and treatment. *Adv. Funct. Mater.* 19(21), 3356–3373 (2009).
- [241] Janib SM, Moses AS, MacKay JA. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62(11), 1052–1063 (2010).
- [242] Muthu MS, Feng S. Theranostic liposomes for cancer diagnosis and treatment: current development and pre-clinical success. *Expert Opin. Drug Deliv.* 10(2), 151–155 (2013).
- [243] Yin T, Wang P, Zheng R. Nanobubbles for enhanced ultrasound imaging of tumors. *Int. J. Nanomed.* 7, 895–904 (2012).
- [244] Cavalli R, Argenziano M, Vigna E et al. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanobubbles as theranostic agents. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 129, 39–46 (2015).
- [245] Rapoport N, Nam KH, Gupta R et al. Ultrasound-mediated tumor imaging and nanotherapy using drug loaded block copolymer stabilized perfluorocarbon nanoemulsions. *J. Control. Rel.* 153, 4–15 (2011).
- [246] Unga J, Hashida M. Ultrasound induced cancer immunotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 72, 144–153 (2014).
- [247] Dewitte H, Van Lint S, Heirman C et al. The potential of antigen and Tri-Mix sonoporation using mRNA-loaded microbubbles for ultrasound-triggered cancer immunotherapy. *J. Control. Release* 194, 28–36 (2014).
- [248] Oda Y, Suzuki R, Otake S et al. Prophylactic immunization with Bubble liposomes and ultrasound-treated dendritic cells provided a four-fold decrease in the frequency of melanoma lung metastasis. *J. Control. Release* 160(2), 362–366 (2012).
- [249] Lucia U., Nucleazione per applicazioni farmaceutiche, 01 giugno 2017.

- [250] Unger, E. C.; Fritz, T. A.; Matsunaga, T.; Ramaswami, V.; Yellowhair, D.; Guanli, W. U.S. Patent No. 5,585,112, 1996, ImaRx Pharmaceutical Corp.
- [251] Adamson, A. W.; Gast, A. P. *Physical Chemistry of Surfaces*, 6th ed.; John Wiley and Sons: New York, 1997.