POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale

Sintesi di nanoparticelle per veicolare principi attivi

Relatore

prof. Davide Fissore

Candidato

Carlotta Caruso

Ottobre 2019

Indice

1. Introduzione 1
1.1. *Nanocarriers* per rilascio controllato di sostanze attive 1
1.1.1. Nanoparticelle polimeriche 2
1.2. Metodologie di sintesi delle nanoparticelle polimeriche 6
1.3. Il chitosano come matrice per *nanocarriers* 10
1.4. Le virosi del peperone: malattia dell'avvizzimento maculato 11
1.5. Tecnica dell'RNA-*interference* 13
1.6. La dialisi come tecnica per lo studio di rilascio del dsRNA 16
1.7. Scopo della Tesi 16
2. Materiali e metodologie sperimentali 19
2.1. Materiali utilizzati 19
2.2. Apparato sperimentale e metodologia di sintesi delle nanoparticelle 21
2.2.1. Agitatore *Vortex* 21
2.2.2. *Confined Impinging Jets Mixer* (CIJM) 22
2.3. Misura della dimensione media, della distribuzione di dimensioni delle particelle e del potenziale zeta 23
2.4. Spettrofotometria 26
2.5. Metodologia adottata per lo studio dell'incapsulamento del dsRNA 28
2.6. Metodologia adottata per lo studio del rilascio del dsRNA 29
3. Analisi dei risultati 31
3.1. Studio del processo di sintesi delle nanoparticelle con l'agitatore *Vortex* 31
3.1.1. Effetto della concentrazione di chitosano sulla dimensione delle nanoparticelle 31
3.1.2. Effetto della concentrazione di solfato di sodio sulla dimensione delle nanoparticelle 33
3.1.3. Effetto del tempo di riscaldamento della miscela sulla dimensione delle nanoparticelle 33
3.1.4. Effetto della miscelazione sulla dimensione delle nanoparticelle 34
3.1.5. Effetto del preriscaldamento dei reagenti sulla dimensione delle nanoparticelle 34
3.1.6. Effetto del *quench ratio* sulla dimensione delle nanoparticelle 35
3.1.7. Effetto delle variabili operative sul potenziale zeta 36

3.1.8. Stabilità delle nanoparticelle 36
3.2. Studio del processo di sintesi delle nanoparticelle con il CIJM 42
3.2.1. Effetto della concentrazione di chitosano sulla dimensione delle nanoparticelle 42
3.2.2. Effetto della portata alimentata sulla dimensione delle nanoparticelle 44
3.2.3. Effetto del *quench ratio* sulla dimensione delle nanoparticelle 46
3.2.4. Effetto della tipologia di chitosano sulla dimensione delle nanoparticelle 48
3.2.5. Effetto delle variabili operative sul potenziale zeta 50
3.2.6. Stabilità delle nanoparticelle 52
3.3. Confronto tra agitatore *Vortex* e CIJM nella sintesi delle nanoparticelle ottimali 55
3.4. Studio dell'incapsulamento del dsRNA 56
3.5. Studio del rilascio del dsRNA 59
4. Conclusioni 63

Lista dei simboli 65

Abbreviazioni 67

Bibliografia 69

Ringraziamenti 73

1. Introduzione

1.1. Nanocarriers per il rilascio controllato di sostanze attive e biomolecole

Con il prefisso di origine greca "nano" si indica qualcosa di veramente piccolo. Le nanoparticelle possiedono dimensioni caratteristiche nell'ordine dei nanometri, ovvero 10^{-9} metri. Si collocano quindi al di sopra delle dimensioni tipiche delle molecole, ma al di sotto, ad esempio, di quelle dei batteri.

I *nanocarrier* sono particelle facenti parte della nanoscala, costituite da diverse tipologie di materiali inorganici o organici, naturali o sintetici, che permettono il trasporto di sostanze attive o biomolecole. Le loro applicazioni sono principalmente di tipo biomedico o agrario. Vengono impiegati per il rilascio controllato di vari farmaci tra cui chemioterapici e antinfiammatori, per immunoprofilassi, diagnosi delle malattie e *bioimaging*, riparazione dei tessuti, rilascio di vaccini e di DNA (Reis et al., 2006; Ranjit e Baquee, 2013). Per quanto riguarda le applicazioni in campo agrario, le nanoparticelle, insieme alla selezione di colture resistenti ai parassiti e alla produzione di biopesticidi e biofertilizzanti, costituiscono un approccio alternativo ai comuni pesticidi. L'uso indiscriminato di fitofarmaci effettuato negli ultimi anni ha infatti incrementato la resistenza delle specie patogene e ha danneggiato l'ambiente con l'accumulo di queste sostanze nel suolo. Le nanoparticelle consentono di veicolare fitofarmaci e fertilizzanti, sia di origine chimica che biologica, e materiale genetico limitando quantitativamente l'impiego del composto veicolato, aumentandone l'efficacia e riducendo l'impatto ambientale. Sono anche usate come sensori per il rilevamento di inquinanti e malattie delle piante e come dispositivi utili per la bonifica del terreno dai pesticidi (Ghormade et al., 2011).

Esistono numerose tipologie di *nanocarrier* (Figura 1.1): nanotubi, liposomi, nanoparticelle solide lipidiche, nanoparticelle polimeriche, nanoparticelle inorganiche, nanoparticelle di idrogel, micelle polimeriche e dendrimeri (Rawat et al., 2006; Malodia et al., 2012).

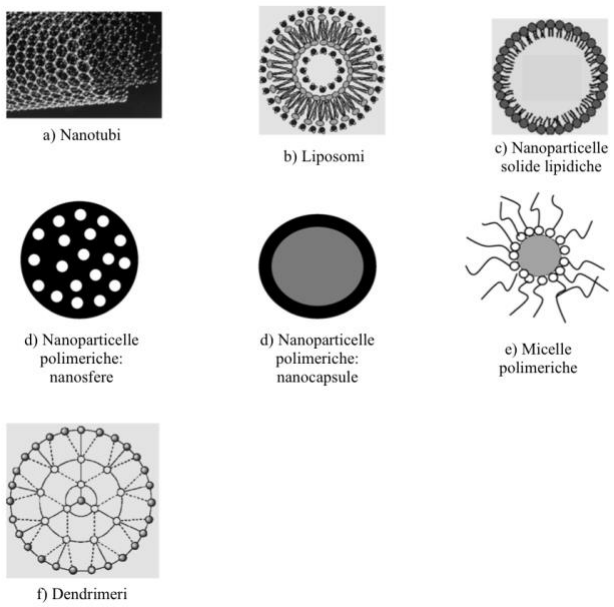

Figura 1.1: Tipi di *nanocarrier*: (a) Nanotubi, (b) Liposomi, (c) Nanoparticelle solide lipidiche, (d) Nanoparticelle polimeriche: nanosfere e nanocapsule, (e) Micelle polimeriche, (f) Dendrimeri. (Figura tratta da Rawat et al., 2006, con modifiche).

I *nanotubi* (Figura 1.1 (a)) si formano per auto-assemblaggio di foglietti di carbonio che assumono forma cilindrica. Possono presentare un singolo o un doppio strato di carbonio che ne compone la parete. In particolare i nanotubi a singolo strato rappresentano un promettente sistema per il rilascio di farmaci e materiale genetico (Rawat et al., 2006).

I *liposomi* (Figura 1.1 (b)) sono vescicole aventi un doppio strato fosfolipidico in cui è contenuto un piccolo volume di soluzione acquosa. Vengono classificati per dimensione e per numero di doppi strati fosfolipidici presenti: *small unilamellar vescicles* (SUVs), aventi un singolo *bilayer* fosfolipidico e dimensioni pari a 25-50 nm; *large unilamellar vescicles* (LUVs), aventi sempre un singolo *bilayer*, ma dimensioni maggiori; *multilamellar vescicles* (MLVs), aventi più strati lipidici separati dalla soluzione acquosa (Malodia et al., 2012). Essendo anfifilici, biocompatibili e facilmente modificabili in superficie, sono stati spesso impiegati con successo in biologia e in medicina (Rawat et al., 2006).

Le *nanoparticelle solide lipidiche* (SLN, *solid-liquid nanoparticles*) (Figura 1.1 (c)) presentano un nucleo solido idrofobico circondato da uno strato fosfolipidico avente le code rivolte verso il centro. Presentano tossicità molto ridotta, sono biodegradabili e facilmente producibili su scala industriale, pertanto sono ritenuti un ottimo *carrier* di acidi nucleici e un efficacie coadiuvante per i vaccini (Rawat et al., 2006).

Le *nanoparticelle inorganiche* possono essere metalliche, ovvero a base di oro, argento, rame, oppure ceramiche, costituite quindi da silice, allumina o titania. Presentano grossi vantaggi: detengono una notevole stabilità, sono facilmente sintetizzabili e modificabili in superficie, proteggono in maniera efficacie la sostanza attiva, sono biocompatibili, ma spesso non sono biodegradabili e tendono ad accumularsi (Rawat et al., 2006; Malodia et al., 2012).

Le *nanoparticelle di idrogel* si ottengono per auto-assemblaggio e auto-aggregazione di polimeri anfifilici come polisaccaridi resi idrofobi grazie al legame con dei gruppi colesterolo. Questi ultimi possono essere più o meno presenti e definiscono dimensioni e densità delle nanoparticelle ottenute. Grazie alla loro elevata biocompatibilità, vengono impiegati per il trasporto di antigeni, DNA ed oligonucleotidi (Rawat et al., 2006).

Le *micelle polimeriche* (Figura 1.1 (e)) si generano per auto-assemblaggio di copolimeri anfifilici a blocchi in soluzione acquosa. Presentano un nucleo idrofobo e uno strato esterno idrofilo. Quest'ultimo permette il trasporto di sostanze attive insolubili in acqua, costituendo un efficacie sistema di rilascio che può essere somministrato per endovena (Rawat et al., 2006).

I *dendrimeri* (Figura 1.1 (f)) sono composti macromolecolari che si ramificano a partire da un centro, assumendo le dimensioni desiderate. Si tratta di una particolare classe di polimeri ottenuti per polimerizzazione di monomeri con approccio divergente (dal nucleo alle ramificazioni) o convergente (dalle ramificazioni al nucleo). Vengono impiegati per il trasporto di acidi nucleici, ma necessitano uno studio approfondito riguardante la loro struttura al fine di migliorarne la biocompatibilità (Rawat et al., 2006).

Per quel che riguarda le *nanoparticelle polimeriche* (Figura 1.1 (d)) segue una trattazione più specifica.

1.1.1. Nanoparticelle polimeriche

Le nanoparticelle polimeriche possono essere ottenute a partire da polimeri sintetici o naturali (Divya e Jisha, 2018). A seconda del metodo impiegato per la loro sintesi si possono ottenere nanosfere o nanocapsule, nelle quali i principi attivi o le biomolecole possono essere incorporate internamente o adsorbite sulla superficie (Figura 1.2). Le nanosfere sono costituite da una matrice polimerica nella quale la sostanza attiva è dispersa uniformemente all'interno o

in superficie. Le nanocapsule sono sistemi nei quali una membrana polimerica delimita una cavità nella quale si colloca la sostanza attiva; tuttavia, talvolta quest'ultima può trovarsi anche legata all'esterno (Reis et al., 2006; Malodia et al., 2012; Ranjit e Baquee, 2013). Nella formulazione del sistema di rilascio è utile tenere presente che è importante avere un buon controllo sulla dimensione e sulle proprietà della superficie esterna della nanoparticella. Si vorrebbe poi migliorare la solubilità della sostanza attiva trasportata e rilasciarla gradualmente (Malodia et al., 2012; Ranjit e Baquee, 2013). Rispetto ai liposomi, che presentano una bassa efficienza di incapsulamento, rilascio rapido e instabilità, le nanoparticelle polimeriche offrono un'ottima alternativa in quanto maggiormente stabili, aventi rilascio più controllato ed elevata capacità di incapsulare il farmaco o la biomolecola desiderata. Tuttavia, i nanovettori, a causa delle loro dimensioni ridotte ed elevata area superficiale, tendono ad aggregarsi (Malodia et al., 2012).

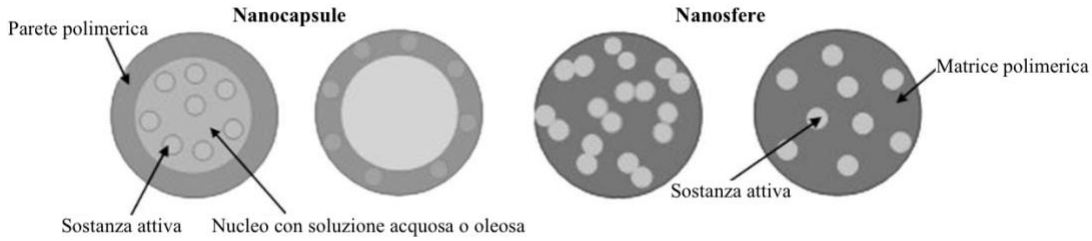

Figura 1.2: Rappresentazione schematica delle due tipologie di nanoparticelle polimeriche contenenti sostanze attive: nanocapsule e nanosfere. (Figura tratta da Reis et al., 2006, con modifiche).

I polimeri generalmente usati possono essere di due tipi:

- Sintetici (Uhrich et al., 1999; Nagavarma et al., 2012; Malodia et al., 2012): poliesteri, quali acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA), acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA); poliortoesteri; polianidridi; poliammidi; policaprolattone (PCL).
- Naturali (Nagavarma et al., 2012): polisaccaridi, tra cui chitosano e alginato; albumina.

Al fine di ottenere nanoparticelle biodegradabili occorre scegliere polimeri che lo siano, pertanto quelli maggiormente impiegati sono: PLA, PGA, PLGA, PCL, albumina e polisaccaridi (Malodia et al., 2012). In particolare questi ultimi risultano particolarmente interessanti perché facilmente reperibili in natura e producibili su larga scala a basso costo. Fanno parte dei polisaccaridi utilizzati (Figura 1.3) (Campos et al., 2015):

- *Alginato*: polisaccaride lineare composto da acido β-D-mannuronico e acido α-L-guluronico legati con legami covalenti 1-4, derivato dalle pareti cellulari delle alghe brune;
- *Amido*: polisaccaride presente in molte piante con funzione di riserva energetica, abbondante in cereali, legumi, radici e frutti, costituito da amilosio e amilopectina; l'amilosio è un polimero lineare costituito da unità glucosio connesse tramite legami glicosidici α-(1-4), mentre l'amilopectina è un polimero ramificato con catena di base uguale all'amilosio e ramificazioni aventi legami α-(1-6) glicosidici;
- *Cellulosa*: polisaccaride più abbondante in natura, costituito da unità di glucosio unite con legame β-(1-4) glicosidico;
- *Ciclodestrine*: polisaccaridi complessi costituiti da unità di glucosio unite tramite legami α-(1-4) glicosidici a formare un anello;

- *Destrani*: polisaccaridi ramificati derivati dai batteri costituiti da monomeri di glucosio legati da legami α-(1-6) nella catena principale e da legami α-(1-2), α-(1-3), α-(1-4) nelle ramificazioni;
- *Gomma di guar*: polisaccaride con catena principale composta da residui di D-mannopiranosio legati tra loro con legami β-(1-4) glicosidici e ramificazioni di galattosio ad essa unite tramite legami α-(1-6);
- *Pectine*: famiglia di polisaccaridi presenti nelle pareti cellulari delle piante, costituita da unità di acido galatturonico legate con legami α-(1-4) glicosidici che formano una catena lineare interrotta da numerose e lunghe ramificazioni;
- *Chitosano*: polisaccaride derivato dalla chitina presente nell'esoscheletro dei crostacei e nelle pareti cellulari di alcuni funghi e batteri, le cui caratteristiche e struttura verranno approfondite nei paragrafi seguenti.

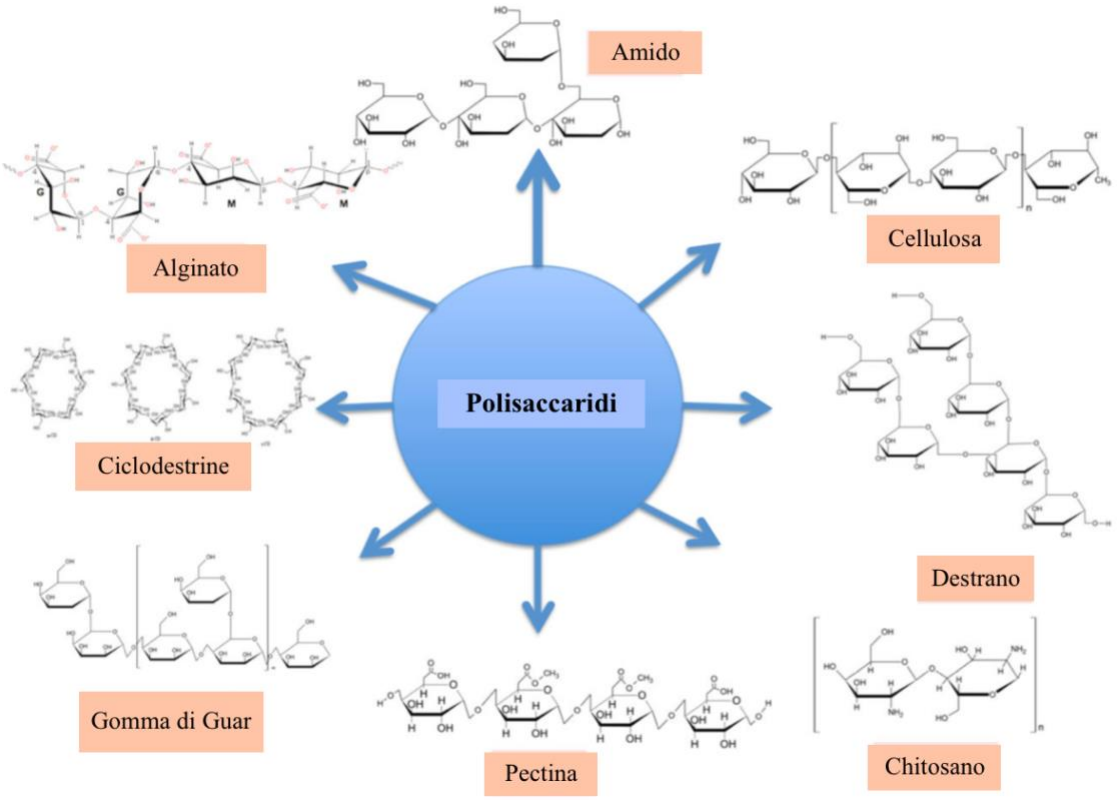

Figura 1.3: Rappresentazione dei principali polisaccaridi impiegati nella sintesi di nanoparticelle. (Figura tratta da Campos et al., 2015, con modifiche).

La nanoparticella ideale dovrebbe avere una elevata efficienza di incapsulamento del principio attivo, o della biomolecola che si vuole trasportare, al fine di ridurre al minimo la quantità di matrice che deve essere impiegata. L'inserimento della sostanza attiva o biomolecola avviene in due modi: per *incorporazione,* durante la produzione delle nanoparticelle o, una volta formate, per *adsorbimento* sulla superficie della nanoparticella da una soluzione ricca di tale composto. La quantità incapsulata dipende fortemente dal tipo di matrice polimerica, in particolare dal suo peso molecolare, dalla sua interazione con la sostanza da veicolare e dalla presenza di gruppi funzionali alle estremità (Soppimath et al., 2001; Ranjit e Baquee, 2013).

Il rilascio della sostanza contenuta nelle nanoparticelle avviene secondo tre principali meccanismi:

- *Desorbimento* della sostanza adsorbita/legata superficialmente;
- *Diffusione* attraverso la matrice delle nanosfere, o attraverso la parete delle nanocapsule;
- *Erosione* della matrice costituente le nanoparticelle.

Impiegando le nanosfere si può osservare inizialmente un rapido rilascio dovuto alla frazione di sostanza veicolata adsorbita o debolmente legata. Successivamente, la quantità rilasciata diminuisce esponenzialmente seguendo una cinetica simile al primo ordine (Soppimath et al., 2001). In questa fase la biodegradazione del polimero (erosione) e la diffusione risultano essere i meccanismi che governano il rilascio del prodotto (Soppimath et al., 2001; Ranjit e Baquee, 2013). Le nanosfere rilasciano la sostanza attiva proprio con questi due meccanismi, dove il prevalente sarà quello più veloce. Tuttavia, usando le nanocapsule, che rilasciano per diffusione dal cuore della particella attraverso lo strato polimerico, la quantità rilasciata diminuisce linearmente nel tempo, ovvero segue una cinetica simile a quella di ordine zero (Soppimath et al., 2001).

Una volta sintetizzate, le nanoparticelle possono essere caratterizzate sulla base della loro dimensione e carica superficiale. Da quest'ultima, ma anche dal diametro medio e dalla distribuzione di dimensioni, dipende infatti la stabilità dei vettori. Più piccole sono le nanoparticelle, maggiore è l'area superficiale che permetterà il rilascio, ma maggiore sarà anche la tendenza a presentare fenomeni aggregativi. Per tali motivi occorre trovare un compromesso tra le dimensioni ridotte e la maggior stabilità dei *carrier*. Strumenti utili alla valutazione della grandezza delle nanoparticelle sono: il *dynamic light scattering* (DLS), il microscopio elettronico a scansione (SEM) e il microscopio elettronico a trasmissione (TEM). La stabilità delle nanoparticelle, e le interazioni delle stesse con l'ambiente circostante, sono determinate dalla natura e dall'entità della carica superficiale. Il potenziale zeta ne è una misura indiretta, e corrisponde alla differenza di potenziale che si instaura tra l'Outer Helmholtz Plane (OHP) e la superficie di taglio. Alti valori di potenziale zeta, siano essi positivi o negativi, evitano l'aggregazione delle nanoparticelle, aumentandone la stabilità. Inoltre, la misurazione di tale parametro può fornire informazioni riguardanti il materiale incapsulato o adsorbito sulla superficie del *carrier* (Ranjit e Baquee, 2013).

In campo biomedico i vantaggi offerti dalle nanoparticelle polimeriche, specialmente per quel che riguarda il rilascio di farmaci, sono numerosi. Grazie alla facilità con cui si possono manipolare dimensione dei vettori e caratteristiche della superficie, si possono ottenere *carrier* che rilasciano il farmaco in modo controllato nel sito specifico di interesse impiegando particolari ligandi. In questo modo si può avere massima efficacia terapeutica e minimi effetti collaterali e, se la particella è biodegradabile, non si accumulerà nel corpo. Il farmaco, inoltre, può essere incorporato senza essere modificato chimicamente, preservandone la normale attività. Infine, grazie alle piccole dimensioni raggiungibili, i *nanocarrier* possono essere somministrati per varie vie (oralmente, endovena, oculare, …). La scelta della matrice appropriata permetterà poi di raggiungere una elevata capacità di incapsulamento e la cinetica di rilascio desiderata. Occorre tener presente però che questi nanovettori presentano una grossa controindicazione legata alla tossicità: le nanoparticelle, in particolar modo quelle sotto i 100 nm, possono entrare facilmente nelle cellule e causare forti reazioni biologiche negative (Ranjit e Baquee, 2013). Secondo il sistema di classificazione nanotossicologica (NCS, *nanotoxicological classification system*) i *nanocarriers* non biodegradabili di dimensioni inferiori ai 100 nm costituiscono un serio rischio per la salute (Kerk e Müller, 2013).

In ambito agrario sono stati impiegati diversi tipi di nanovettori: inorganici, principalmente a base di ossidi metallici come l'ossido di ferro, di titanio, di argento e di zinco;

organici, come nanotubi di carbonio, liposomi e nanoparticelle solide lipidiche; polimerici, di origine sintetica, ma soprattutto di origine naturale. Le nanoparticelle polimeriche preparate a partire da biopolimeri presentano vantaggi quali: la facile reperibilità in natura, la biocompatibilità, la biodegradabilità e l'ecocompatibilità (Ghormade et al., 2011). Il rilascio controllato e mirato realizzabile con i nanovettori minimizza l'impatto sull'ambiente (Campos et al., 2015). Nel veicolare pesticidi di origine chimica, ma soprattutto di origine biologica, come enzimi, metaboliti o anche intere cellule, il *carrier* agisce anche migliorandone l'efficacia e la stabilità. Infine, il rilascio di materiale genetico, come DNA o siRNA (*short interfering* RNA), consente di aumentare la resistenza delle colture vegetali ai patogeni, ai parassiti e agli stress abiotici. Ciò avviene attraverso un particolare meccanismo detto RNA-*interference* che verrà esposto nei paragrafi seguenti, e che si basa su una modifica dell'espressione genica che non altera il patrimonio genetico della pianta (Ghormade et al., 2011).

1.2. Metodologie di sintesi delle nanoparticelle polimeriche

Il processo di formazione di nanoparticelle comincia con la *nucleazione*, ovvero la formazione di un nucleo. Si definisce nucleo una particella che assume dimensione superiore rispetto alla dimensione critica, che è il valore soglia al di sotto della quale il polimero si ridisciogliere bbe. Il fenomeno della nucleazione dipende fortemente dal grado di sovrasaturazione, ovvero dal rapporto tra concentrazione di soluto presente in soluzione e la solubilità dello stesso ad una determinata temperatura. Quando la sovrasaturazione è sufficientemente elevata, la nucleazione può avere inizio e può essere di due tipologie: omogenea, se indotta solamente dalla sovrasaturazione, o eterogenea, se indotta anche dalla presenza di superfici solide. In generale, se il grado di sovrasaturazione è molto elevato, prevale la nucleazione omogenea, viceversa se è basso prevale la nucleazione eterogenea. L'aumento della sovrasaturazione fa anche aumentare esponenzialmente la velocità di nucleazione fino ad un valore limite. Pertanto, se il sistema permane ad alti valori di sovrasaturazione a lungo, otterremo molte particelle di piccole dimensioni; se, invece, vi permane per un tempo ridotto, si otterranno meno particelle, ma di dimensioni maggiori.

Dopo la nucleazione, ovvero una volta superata la dimensione critica, si assiste principalmente a due fenomeni: la crescita e l'aggregazione delle nanoparticelle.

La *crescita* è un aumento di dimensioni di tipo continuo che avviene grazie al trasferimento di materia dalla soluzione alle particelle; essa dipende dal coefficiente di diffusione di materia e dalla sovrasaturazione. La forza spingente di questo processo è data dalla differenza di concentrazione di soluto che si ha tra il *bulk* di liquido e l'interfaccia solido-liquido, ma anche tra quest'ultima ed il valore di solubilità. Se si supera di poco la condizione di equilibrio, si entra in un intervallo di concentrazione e temperatura detto regione metastabile, dove la sovrasaturazione è sufficientemente alta da consentire la crescita, ma non la nucleazione. Il processo di crescita continuerà riducendo via via la concentrazione di soluto disciolto fino al raggiungimento dell'equilibrio termodinamico.

L'*aggregazione* è un fenomeno che porta ad una crescita di tipo discontinuo delle particelle e avviene a seguito delle collisioni tra esse. La probabilità di ottenere una collisione dipende dal quadrato del numero di particelle presenti in sospensione; tuttavia, non tutte le collisioni portano ad aggregazione, bensì solo quelle in cui le forze attrattive prevalgono su quelle repulsive; si parla in questo caso di sospensione instabile. La presenza di un doppio strato elettrico che si instaura sulla superficie delle nanoparticelle, ed il conseguente potenziale elettrico che si può rilevare, detto potenziale zeta, fornisce un'indicazione dell'entità delle forze repulsive presenti tra particelle. Qualora il potenziale zeta fosse sufficientemente elevato, le

forze repulsive prevarrebbero su quelle attrattive permettendo alla sospensione di rimanere stabile.

Un altro fenomeno osservato è la cosiddetta maturazione di Ostwald, processo che prevede un aumento continuo della dimensione media delle particelle. Si osserva infatti la crescita delle nanoparticelle più grandi a scapito di quelle di piccole dimensioni a causa della progressiva dissoluzione di queste ultime.

Si può concludere dicendo che, in generale, il parametro più rilevante per la sintesi dei nanovettori è la sovrasaturazione. Se è elevata si osserveranno nucleazione e aggregazione, mentre se è ridotta si otterranno più facilmente nucleazione e crescita delle particelle (Aubry et al., 2009; Lepeltier et al., 2014).

Al fine di ottenere nanoparticelle polimeriche è possibile partire da monomeri che verranno fatti polimerizzare in particolari condizioni, o, più semplicemente, si può partire da polimeri preformati. I principali metodi di sintesi di particelle a partire da polimeri preformati (Nagavarma et al., 2012) sono:

- *Evaporazione del solvente*: il polimero e la sostanza attiva vengono posti in soluzione con un solvente immiscibile con acqua; tale soluzione viene emulsionata con una soluzione acquosa che può contenere uno stabilizzatore di nanoparticelle; dall'emulsione ottenuta viene fatto evaporare il solvente al fine di promuovere la formazione delle particelle.
- *Emulsione/diffusione del solvente*: il polimero e la sostanza attiva vengono posti in soluzione con un solvente parzialmente miscibile con acqua; tale soluzione viene emulsionata con una soluzione acquosa che può contenere uno stabilizzatore di nanoparticelle; la parziale miscibilità del solvente permette la sua diffusione dal polimero verso la soluzione acquosa e la conseguente formazione dei *carrier*.
- *Salting-out*: il polimero e la sostanza attiva vengono disciolti in acetone; tale soluzione viene emulsionata con una soluzione acquosa che contiene un agente di *salting-out*, spesso un elettrolita, che induce la formazione di nanovettori.
- *Dialisi*: il polimero e la sostanza attiva vengono disciolti in un solvente organico e posti all'interno di una membrana da dialisi; tale membrana viene posizionata in una soluzione acquosa e permette lo spostamento del solvente, ma non del soluto; l'abbassamento di solubilità che ne consegue porta alla formazione di nanoparticelle.
- *Tecnologie basate sull'impiego di fluidi supercritici*: il polimero viene disciolto in un fluido supercritico, scaldato isobaricamente e poi fatto espandere a pressione atmosferica in aria o in un solvente liquido; l'espansione provoca la formazione di nanoparticelle e, se avviene in soluzione liquida, si ottengono *nanocarrier* di dimensioni inferiori e maggiormente stabili.
- *Nanoprecipitazione*: detta anche metodo di *spostamento del solvente*, prevede che polimero e principio attivo vengano disciolti in un solvente organico (nel quale il polimero è solubile) che sia totalmente miscibile in acqua; tale soluzione, alla quale può essere aggiunto anche un tensioattivo, viene iniettata in una soluzione acquosa, detta antisolvente, nella quale il polimero non si scioglie; il rapido spostamento del solvente dal polimero verso l'antisolvente causa una riduzione del valore di solubilità e, quindi, la formazione quasi istantanea di nanoparticelle.

In particolare, per ottenere *nanoparticelle di chitosano* si impiegano *emulsione/diffusione del solvente*, *nanoprecipitazione* ed alcuni metodi specifici descritti di seguito (Kashyap et al., 2015; Divya et al., 2018; Naskar et al., 2019):

- *Gelazione ionotropica*: il chitosano e la sostanza attiva vengono disciolti in soluzione acquosa con acido acetico a cui viene aggiunto il tripolifosfato (TPP); l'interazione

elettrostatica tra gruppi amminici protonati del chitosano, aventi carica positiva, e i gruppi carichi negativamente del TPP permette la formazione di nanoparticelle.

- *Emulsione/coalescenza delle gocce*: il chitosano viene disciolto in acqua e acido acetico e viene posto in emulsione con paraffina liquida, mentre la sostanza attiva viene disciolta in idrossido di sodio ed emulsionata con paraffina liquida; la miscelazione ad alta velocità delle due emulsioni permette la coalescenza di gocce provenienti dalle due emulsioni e permette la formazione di nanoparticelle.
- *Micelle inverse*: si prepara una soluzione di tensioattivo lipofilico e solvente organico alla quale viene aggiunta la soluzione acquosa di chitosano, sostanza attiva e acido acetico; la miscelazione continua permette di ottenere una emulsione e, infine, l'aggiunta di un agente di *cross-linking* porta alla formazione dei *nanocarriers*.
- *Complex coacervation*: alla soluzione di acido acetico e chitosano viene aggiunto un elettrolita carico negativamente, come filamenti di DNA; la neutralizzazione tra la carica negativa dell'elettrolita e quella positiva del polimero rende quest'ultimo meno idrofilo e induce la formazione dei complessi, i nanovettori, che si generano spontaneamente.

In questa sede si pone maggior attenzione alla formazione di nanoparticelle di chitosano per nanoprecipitazione. Come spiegato precedentemente, la nanoprecipitazione prevede il contatto intimo tra una soluzione solvente contenente il polimero e una soluzione in cui questo non sia solubile, detta antisolvente. Tuttavia è necessario che solvente e antisolvente siano completamente miscibili tra loro per permettere la formazione delle particelle. Poiché il chitosano è solubile solo in ambiente acido, il solvente sarà costituito da acqua e acido acetico, mentre l'antisolvente sarà costituito da acqua e eventuali altri soluti che rendono il pH neutro o leggermente basico.

Questo metodo di sintesi è molto semplice perché permette di evitare la formazione di emulsioni e di ottenere, senza l'uso di tensioattivi, una sospensione di nanoparticelle pressoché monodispersa. Le condizioni necessarie per ottenere tale risultato, detto "Ouzo effect" (Figura 1.4), sono una bassa concentrazione di chitosano ed un elevato contenuto di antisolvente (acqua). Per particelle di piccole dimensioni, occorre un'intensa e veloce miscelazione: minore è il tempo caratteristico di miscelazione, minore sarà la dimensione media delle particelle (Lepeltier et al., 2014).

Figura 1.4: Diagramma di fase ternario di soluto (chitosano), solvente (soluzione di acido acetico) e acqua che evidenzia la regione all'interno della quale si osserva il cosiddetto "Ouzo effect", ovvero la spontanea e pressoché immediata formazione di nanoparticelle monodisperse. Ciò avviene quando si ha un elevato contenuto d'acqua e una piccola quantità di soluto. (Figura tratta da Lepeltier et al., 2014, con modifiche).

I tipi di reattori impiegati per la produzione di nanoparticelle a livello di laboratorio possono essere molto semplici, come un agitatore *Vortex*, oppure più complesse.

L'agitatore *Vortex* (Figura 1.5) è un comune agitatore da laboratorio, dove un motore elettrico è collegato ad un albero verticale che mette in moto un piatto con opportuno supporto per provette. Il motore elettrico permette all'albero di oscillare rapidamente compiendo un moto circolare che viene trasmesso al liquido, posto all'interno delle provette, generando un vortice.

Figura 1.5: Agitatore vortex

I *mixer* più complessi (Figura 1.6) permettono la generazione di una turbolenza maggiore e quindi una miscelazione più efficace. I principali sono:

- *Multi Inlet Vortex Mixer*: miscelatore con camera cilindrica con 2 o 4 ingressi tangenziali (Figura 1.6 (d)); in particolare, la presenza di quattro getti permette di impiegare portate differenti di solvente e antisolvente, inibendo così la maturazione di Ostwald che avrebbe luogo a concentrazioni più elevate di solvente.
- *Tee Mixer* e *Y-Mixer*: miscelatore con due ingressi orizzontali collidenti posti a 180° (Figura 1.6 (c)) o a meno di 180° nel miscelatore a Y; sono le tipologie reattoristiche più semplici e vengono spesso impiegati per processi di cristallizzazione.
- *Confined Impinging Jets Mixer* (CIJM) (Figura 1.6 (a)), o reattore a getti confinati collidenti: miscelatore con due ingressi orizzontali posti a 180° che, a differenza del T-mixer, permettono la collisione dei due getti all'interno di una piccolissima camera di miscelazione cilindrica; il volume molto ridotto di tale camera permette di ottenere elevatissime efficienze di *mixing*; infatti, la rapida dissipazione di energia cinetica turbolenta determina una miscelazione di tipo intenso.

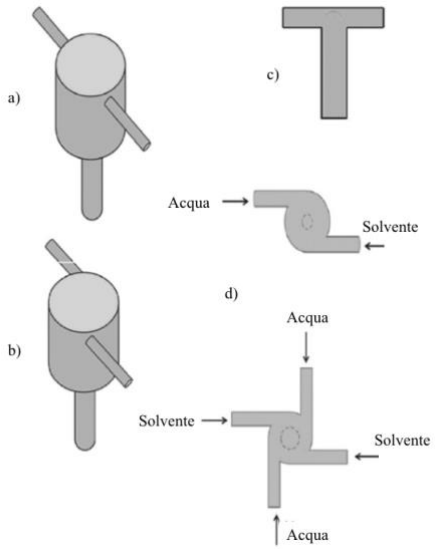

Figura 1.6: Rappresentazione schematica dei miscelatori che permettono di ottenere una miscelazione più efficiente grazie alla generazione di una intensa turbolenza: (a) *Confined Impinging Jets Mixer* (CIJM) e (b) una sua diversa configurazione; (c) *Tee Mixer*; (d) *Multi Inlet Vortex Mixer*. (Figura tratta da Barresi et al., 2015, con modifiche).

Nel *Confined Impinging Jets Mixer* (Figura 1.7), tipologia di *mixer* impiegata in questo lavoro di Tesi, viene alimentata da un lato la soluzione acquosa con acido acetico (solvente) nella quale è disciolto il chitosano, mentre dall'altro la soluzione acquosa (antisolvente) contenente il dsRNA, ovvero la biomolecola che si intende veicolare. Con questo miscelatore è possibile ottenere tempi caratteristici di miscelazione nell'ordine dei millisecondi e, di conseguenza, si possono formare numerose particelle molto piccole.

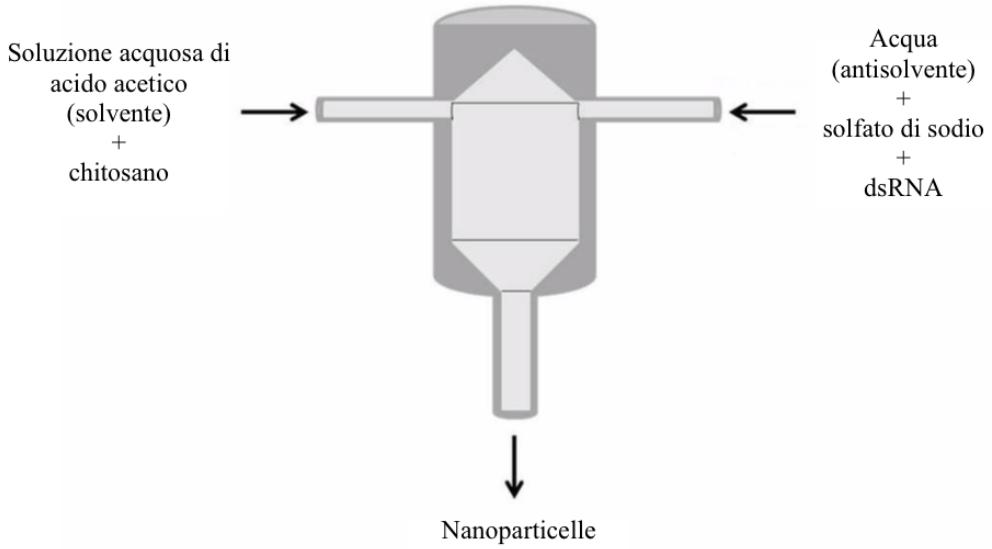

Figura 1.7: Schematizzazione di un CIJM impiegato per la produzione di nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA.

1.3. Il chitosano come matrice per nanocarriers

Il chitosano (Figura 1.8) è un polisaccaride lineare composto da N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina legate da un legame β (1-4). Si ottiene per deacetilazione parziale della chitina, il maggior costituente dell'esoscheletro dei crostacei e degli insetti, ma anche delle pareti cellulari di alcuni funghi e batteri. Viene caratterizzato principalmente dal peso molecolare e dal grado di deacetilazione (*Deacetilation Degree*, DD). Contiene tre gruppi funzionali: un gruppo amminico in posizione C2, un gruppo ossidrile primario in posizione C6 e un gruppo ossidrile secondario in posizione C3. Inoltre esso, a causa della presenza di un gruppo amminico libero, è solubile in condizioni acide (pH inferiore a 6,5) e presenta carica positiva (Singh e Mishra, 2013; Rajasree e Rahate, 2013; Divya e Jisha, 2018).

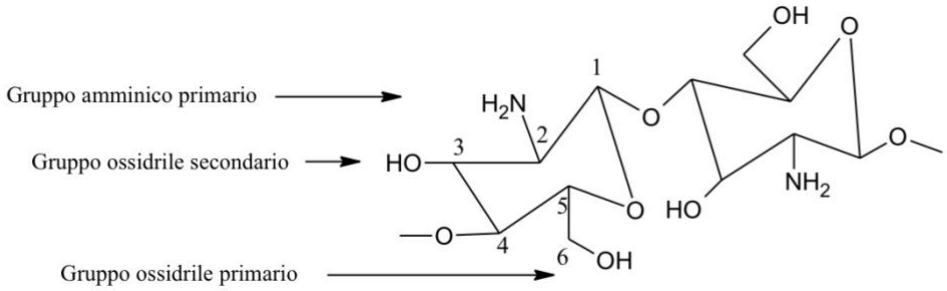

Figura 1.8: Struttura del chitosano. Vengono posti in evidenza i suoi tre principali gruppi funzionali. (Figura tratta da Rajaree e Rahate, 2013, con modifiche)

Il chitosano è largamente impiegato in svariati contesti: per l'incapsulamento di additivi alimentari, come supporto per l'immobilizzazione di enzimi, come *carrier* per il rilascio controllato di sostanze attive, come promotore della crescita di piante, e per il trattamento delle acque. Questo biopolimero ha suscitato grande interesse in ambito medico e farmaceutico grazie alla sua biodegradabilità, biocompatibilità, bioattività, non tossicità, versatilità ed elevata disponibilità in natura. Presenta ulteriori vantaggi qualora venga usato come matrice costituente un *carrier* in quanto protegge, stabilizza e rilascia lentamente la sostanza incapsulata (Hassan e Chang, 2017; Divya e Jisha, 2018). Esistono applicazioni biologiche legate al suo effetto antitumorale, antimicrobico, antiossidante e antinfiammatorio, ed applicazioni farmaceutiche soprattutto per il "*drug delivery*" (Rajasree e Rahate, 2013). In particolare, in ambito agrario, viene impiegato come protezione dai patogeni che attaccano le piante ed i frutti sia prima che dopo il raccolto. Il chitosano, inoltre, stimola meccanismi di difesa, migliora la resistenza agli stress abiotici e promuove la crescita di diversi tipi di colture (Kashyap et al., 2015; Hassan e Chang, 2017; Sharif et al., 2018). Per tali motivi questo polisaccaride è considerato un ottimo bio-pesticida, sicuro per la salute umana e non tossico per microrganismi utili alle piante. Nel 2015 infatti la US Environmental Protection Agency (EPA) ha dichiarato ufficialmente che il chitosano non è rischioso per l'ambiente (Hassan e Chang, 2017).

Questo biopolimero permette di ridurre la frequenza delle malattie contratte dalle piante sia per azione diretta sui patogeni che per via indiretta stimolando la risposta difensiva delle piante verso gli stessi. Si ritiene che alla base dell'attività antimicrobica del chitosano vi sia la presenza del gruppo amminico che viene protonato, diventando particolarmente reattivo, e che gli conferisce una carica positiva. I meccanismi principali dell'azione antimicrobica attiva del chitosano sono tre:

- l'interazione tra chitosano, con carica positiva, e i componenti di membrane e pareti cellulari dei microrganismi patogeni, carichi negativamente, causa la distruzione di queste, la perdita di materiale intracellulare e quindi la morte di questi ultimi;
- il legame tra chitosano, avente carica positiva, e gli acidi nucleici del microrganismo patogeno, che possiedono carica negativa, inibisce la sintesi di RNA messaggero e impedisce, di conseguenza, la sintesi delle proteine necessarie alla sopravvivenza del patogeno;
- la formazione di un film di chitosano sulla superficie del patogeno agisce da chelante di metalli e altri micronutrienti e impedisce il flusso dei macronutrienti all'interno della cellula, causando il blocco dell'attività metabolica del microrganismo.

Infine, il chitosano agisce per via indiretta stimolando la produzione di enzimi, metaboliti secondari e proteine legate alla difesa della pianta (Hassan e Chang, 2017; Sharif et al., 2018).

In particolare è stata evidenziata anche un'attività antivirale del polimero (Chirkov, 2002).

In questo lavoro di Tesi verrà descritto l'uso del chitosano come supporto nell'incapsulamento di dsRNA coinvolti nel meccanismo di RNA-*interference*.

1.4. Le virosi del peperone: malattia dell'avvizzimento maculato

Le virosi che maggiormente colpiscono le colture di peperone, causando gravi perdite di tale prodotto, sono principalmente: il *virus dell'avvizzimento maculato* (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), il *virus del mosaico del cetriolo* (*Cucumber mosaic virus*, CMV), il *virus del mosaico del tabacco* (*Tobacco mosaic virus*, TMV) e il *virus del mosaico del pomodoro* (*Tomato mosaic virus*, ToMV). Tra questi il più dannoso è proprio quello che causa la malattia dell'avvizzimento maculato, ovvero il TSWV, che può colpire una grande varietà di colture,

oltre a quella del peperone, causando gravi perdite economiche (Scholthof et al, 2011; Rybicki, 2015).

La malattia dovuta al TSWV si manifesta con la necrosi di foglie, fusto e apici vegetativi, ridotto sviluppo della pianta, malformazione di fiori e frutti, presenza di maculature (Figura 1.9 (a) e (b)).

(a) *(b)*

Figura 1.9: Manifestazione della malattia dovuta al TSWV: presenza di macchie evidenti su foglie della pianta (a) e sul peperone stesso (b).

La trasmissione del virus (Figura 1.10) avviene attraverso particolari insetti, i tripidi, di cui fa parte la *Frankliniella occidentalis*. Le larve di tripide, cibandosi delle foglie delle piante malate, vengono infettate. Tali insetti fungono così sia da vettore che da organismo ospitante del TSWV. La coltura in serra del peperone, caratterizzata da temperature elevate, favorisce lo sviluppo di questi insetti e la diffusione del virus (Gupta et al., 2018).

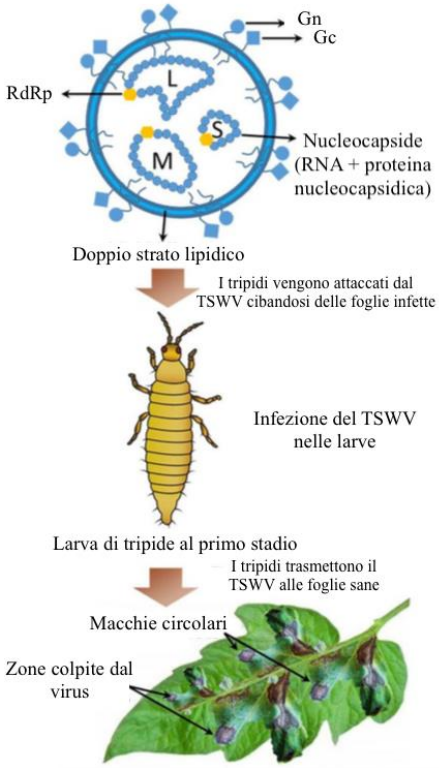

Figura 1.10: Schematica rappresentazione della struttura di un virione di TSWV e del metodo di trasmissione dell'infezione ai tripidi e alle piante. (Figura tratta da Gupta et al., 2018, con modifiche).

I virioni del TSWV, rappresentati schematicamente nella Figura 1.10, presentano una struttura quasi sferica con diametro intorno agli 80-120 nm. La membrana esterna è costituita da lipoproteine e da due tipi di glicoproteine, G_N e G_C, dove N e C indicano rispettivamente un terminale con gruppo amminico e carbossile. Tali glicoproteine sono essenziali per la replicazione del virus nella cellula ospite. Il genoma del TSWV si compone di tre ribonucleoproteine alle quali sono legate tre catene di RNA: un singolo filamento negativo più lungo, detto large (L), e due filamenti ambisenso (ovvero in parte positivi e in parte negativi) di dimensioni più contenute, detti medium (M) e small (S). La catena più lunga, essendo formata da un filamento negativo, deve essere convertita in RNA positivo per essere tradotta, pertanto contiene una regione codificante per una RNA polimerasi (RdRp, RNA-dependent RNA polymerase) che interviene nella replicazione dell'RNA. Il filamento di medie dimensioni codifica per una singola proteina che funge da precursore delle glicoproteine G_N e G_C, mentre quello più piccolo codifica per la proteina nucleocapsidica (proteina che circonda il genoma, costituendo il nucleocapside). Queste due catene di RNA codificano anche per due proteine non presenti nel virione, ma solo nelle cellule infette, utili a facilitare la diffusione del virus nell'organismo ospite e a reprimere i meccanismi che possono silenziare il gene del TSWV. Tutte queste proteine aventi funzioni differenti agevolano e rendono possibile l'infezione da parte del TSWV (Gupta et al., 2018).

Il TSWV è considerato organismo nocivo (Decreto Legislativo 19 Agosto 2005 n. 214 e successive modificazioni ed integrazioni) ed è inserito, insieme al suo insetto vettore *F. occidentalis*, nell' elenco di EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) "*List of pests recommended for regulation as quarantine pests*" tipo A2.

In caso di infezione diagnosticata di TSWV occorre eliminare le piante che presentano i sintomi, e anche quelle adiacenti seppur prive di sintomi. Si ricorre poi all'impiego di insetticidi di vario tipo al fine di non instaurare resistenze da parte degli insetti e si eseguono numerosi trattamenti in modo da coprire tutti gli stadi di sviluppo del tripide.

Risulta quindi evidente la necessità di applicare misure di prevenzione, come ad esempio selezionare colture resistenti a tali virosi e impiegare pesticidi specifici. Tuttavia, poiché le varietà tipiche di peperone del Piemonte non posseggono resistenze genetiche verso il TSWV, e poiché si vuole cercare di ridurre il più possibile l'uso di pesticidi, si rende necessario lo sviluppo di tecniche alternative ed ecocompatibili volte alla protezione di tali colture.

1.5. Tecnica dell'RNA-interference

Il protagonista del meccanismo di RNA-*interference*, ovvero di interferenza dell'RNA, è l'RNA a doppio filamento, detto *double-stranded* RNA (dsRNA). Si tratta di un tipo di RNA avente due filamenti complementari che si può trovare in diverse tipologie di cellule.

L'RNA-*interference* costituisce un meccanismo di interferenza nell'espressione genica e/o di silenziamento di alcuni geni. Si tratta quindi di un sistema normalmente presente nelle cellule eucarioti che, attraverso il controllo dell'espressione genica, regola la crescita e lo sviluppo dell'organismo di cui le cellule fanno parte, ma costituisce anche un meccanismo di difesa dai virus.

I virus sfruttano la cellula che infettano al fine di svolgere il loro ciclo vitale e replicarsi. L'RNA-*interference* è quindi in grado di bloccare l'espressione del genoma virale rendendo le cellule immuni alle virosi. Per fare ciò si ricorre ad un dsRNA esogeno, ovvero non prodotto naturalmente dalla cellula, bensì sintetizzato esternamente ed inserito successivamente all'interno della stessa. Il dsRNA inserito non deve far parte del genoma della cellula ospite, bensì deve essere parte del patrimonio genetico del virus che si vuole combattere. Al fine di

rendere lo spettro di efficacia il più ampio possibile, si sceglie una sequenza di RNA che sia comune a più tipologie di virus e che codifichi per proteine coinvolte nella replicazione degli stessi, come ad esempio la RdRp, o per proteine nucleocapsidiche, ovvero proteine legate agli acidi nucleici (Runo et al, 2010).

La Figura 1.11 mostra nel dettaglio il meccanismo dell'RNA-*interference*. Il dsRNA presente nel citosol viene scisso in frammenti di lunghezza pari a 19-21 nucleotidi, detti *short interference* RNA (siRNA), da parte di un complesso enzimatico, il Dicer (ribonucleasi III specifiche per RNA a doppio filamento). I siRNA ottenuti si associano quindi ad un altro complesso enzimatico detto RISC, ovvero RNA *induced silencing complex*, dove una elicasi separa i due filamenti lasciando all'interno del complesso solo il filamento antisenso. A questo punto il RISC può funzionare: confronterà il filamento antisenso con moltissimi RNA messaggeri provenienti dal nucleo della cellula e, se vi sarà un appaiamento praticamente perfetto, una RNAsi del complesso andrà a tagliare l'mRNA nel primo punto in cui l'appaiamento non avviene. Ciò darà inizio ad un processo di degradazione dell'RNA messaggero che quindi non permetterà l'espressione del gene codificato da tale filamento di mRNA (Runo et al, 2010; Rychahou et al, 2016; Rosa et al, 2018).

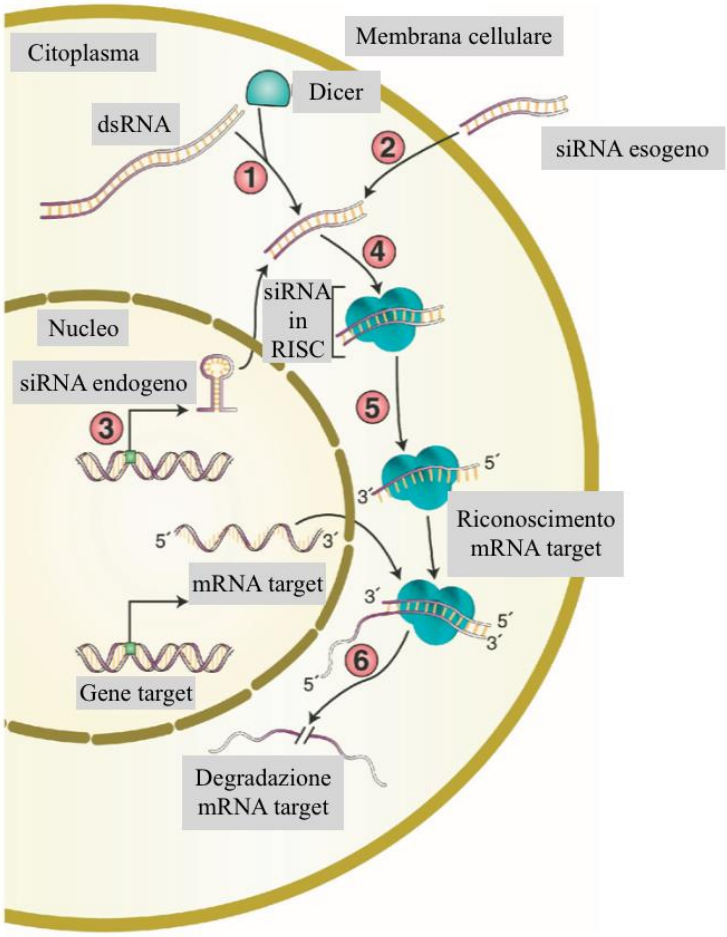

Figura 1.11: Meccanismo dell'RNA-*interference* che coinvoge i siRNA: (1) Il dsRNA si trova nel citoplasma e viene riconosciuto dal complesso enzimatico Dicer che forma i siRNA; i siRNA, che possono essere sia esogeni (2) che endogeni (3), si legano al RISC (4); il RISC separa i due filamenti e trattiene solo il filamento antisenso (5); il RISC confronta numerosi mRNA provenienti dal nucleo e se riconosce quello complementare, detto target, procede con la degradazione dello stesso (6). (Figura tratta da Rychahou et al., 2016, con modifiche).

L'RNA-*interference* può aver luogo anche a partire dai microRNA (miRNA), ovvero piccoli RNA (21-25 nucleotidi) non codificanti endogeni che prendono parte a diversi meccanismi di regolazione genica a livello post-trascrizionale (Figura 1.12). I miRNA sono frutto della maturazione di precursori, detti pre-miRNA, che vengono assemblati nel nucleo e trasportati nel citoplasma dove il complesso enzimatico Dicer li rende miRNA maturi. Questi ultimi entrano poi a far parte di un complesso enzimatico simile al RISC detto miRNP. A differenza di ciò che accade con i siRNA, tale complesso è in grado sia di degradare l'mRNA complementare che di attenuare la sua traduzione in proteina e quindi reprimerne l'espressione (Runo et al, 2010; Rychahou et al, 2016; Rosa et al, 2018).

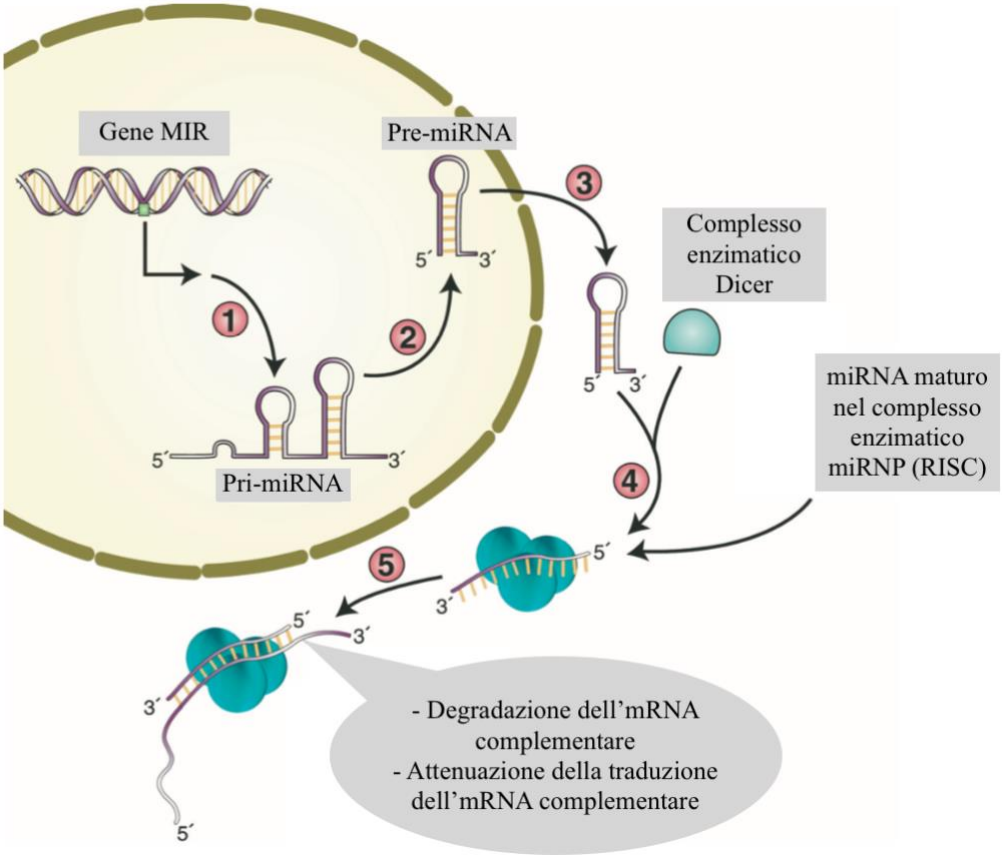

Figura 1.12: Meccanismo dell'RNA-*interference* che coinvoge i miRNA: (1) Il precursore primario dei miRNA (Pri-miRNA) viene sintetizzato nel nucleo (1) e trasformato in Pre-miRNA da una specifica ribonucleasi (2); il Pre-miRNA viene trasportato nel citoplasma e viene riconosciuto dal complesso enzimatico Dicer che forma i miRNA maturi (3); i miRNA si legano al miRNP che separa i due filamenti e trattiene il filamento antisenso (4); il miRNP confronta numerosi mRNA provenienti dal nucleo e se riconosce quello complementare, detto target, può procedere con la degradazione dello stesso o semplicemente attenuarne la traduzione (5). (Figura tratta da Rychahou et al., 2016, con modifiche).

Numerosi studi hanno dimostrato che l'applicazione di dsRNA esogeni sulle piante le rende immuni a determinate virosi per circa 5-7 giorni. La scarsa durata di tale meccanismo di difesa è dovuta principalmente alla degradazione del dsRNA applicato. Per aumentarne la stabilità è stato quindi necessario ricorrere ad un supporto (nanoparticelle) che non solo permettesse la conservazione di tali acidi nucleici, ma che ne consentisse anche il rilascio graduale e controllato. In questo modo la finestra di protezione delle piante è stata estesa a circa 20 giorni (Mitter et al, 2017).

1.6. La dialisi come tecnica per lo studio di rilascio del dsRNA

Al fine di valutare la quantità di dsRNA che le nanoparticelle sono in grado di rilasciare e di stimare anche una cinetica di rilascio, si può ricorrere a prove *in vitro* condotte per dialisi.

La dialisi, mostrata in Figura 1.13, è un processo fisico di separazione di uno o più soluti disciolti in un liquido, svolto tramite una membrana semipermeabile per effetto di un gradiente di concentrazione. I soluti che possono passare attraverso la membrana da dialisi vengono detti permeanti e diffondono dalla soluzione donatrice ricca di permeanti ad una soluzione accettrice povera di permeanti. I soluti passano quindi da una soluzione a maggior concentrazione verso una soluzione più diluita fino al raggiungimento dell'equilibrio.

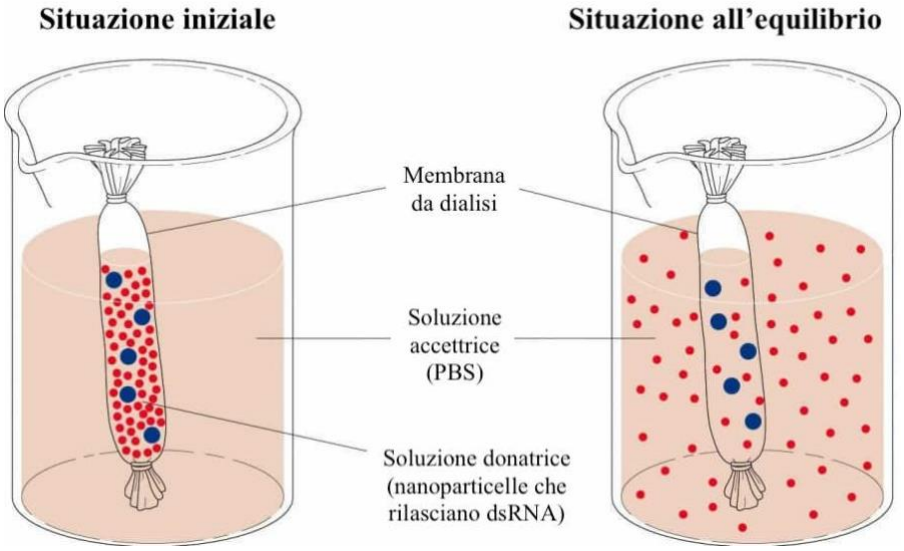

Figura 1.13: Schematizzazione di una prova di rilascio in vitro tramite dialisi. In rosso le molecole di dsRNA permeabili, in blu le nanoparticelle di chitosano non permeabili.

Il processo di dialisi può essere impiegato per diversi scopi: la formazione, la separazione o la concentrazione di nanoparticelle o lo studio del rilascio del contenuto delle stesse. In particolare, è da preferirsi alla centrifugazione, metodo alternativo di separazione delle nanoparticelle, in quanto non vengono applicate forze esterne. La forza centrifuga infatti può interferire sia nel rilascio della sostanza attiva dalle particelle che in fenomeni di aggregazione delle stesse.

In questa sede la dialisi è stata impiegata come metodo per lo studio del rilascio di dsRNA in un buffer, il PBS (Phosphate-buffered saline, pH 7,4), che simulasse quello dei tessuti vegetali. In questo modo è stato quindi possibile valutare la quantità di dsRNA contenuto nella soluzione accettrice priva di *carriers*.

1.7. Scopo della Tesi

Lo scopo di questo lavoro di Tesi è lo studio della sintesi di nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA utile a combattere la virosi dell'avvizzimento maculato (TSWV) nella pianta di peperone. Le attività sperimentali sono state suddivise in due fasi principali: in un primo momento è stata studiata la sintesi e caratterizzazione del vettore privo di dsRNA, mentre successivamente è stato analizzato l'incapsulamento del dsRNA ed il conseguente rilascio *in vitro*.

La sintesi delle nanoparticelle è avvenuta tramite nanoprecipitazione impiegando due diversi microreattori: l'agitatore *Vortex* e il *Confined Impinging Jets Mixer* (CIJM). In entrambi i casi è stata impiegata una soluzione di acqua e acido acetico come solvente ed una soluzione di acqua e fosfato di sodio come antisolvente. Al fine di confrontare i risultati ottenuti con le diverse tipologie di reattori e le diverse condizioni operative, sono state valutate dimensioni medie, curve di distribuzione delle dimensioni e potenziale zeta delle nanoparticelle ottenute da ogni prova sperimentale.

Per studiare l'incapsulamento del dsRNA è stato scelto il CIJM come reattore per la sintesi, sono state separate le nanoparticelle per filtrazione e analizzato il contenuto di dsRNA nel surnatante attraverso lo spettrofotometro in modo da ricavare per differenza quello incorporato dal *carrier*. Infine, la valutazione del rilascio di dsRNA *in vitro* è stata condotta attraverso dialisi ed analisi del mezzo accettore sempre con l'uso dello spettrofotometro.

2. Materiali e metodologie sperimentali

2.1. Materiali utilizzati

Chitosano

Come matrice polimerica costituente le nanoparticelle è stato impiegato il chitosano, un polimero che, come esposto nel paragrafo 1.3, ha origine naturale. Si ricava infatti per deacetilazione parziale della chitina (Figura 2.1), polisaccaride maggiormente presente nell'esoscheletro di crostacei ed insetti. Per questo lavoro di Tesi sono state impiegate due tipologie di chitosano: ad alto e a basso peso molecolare.

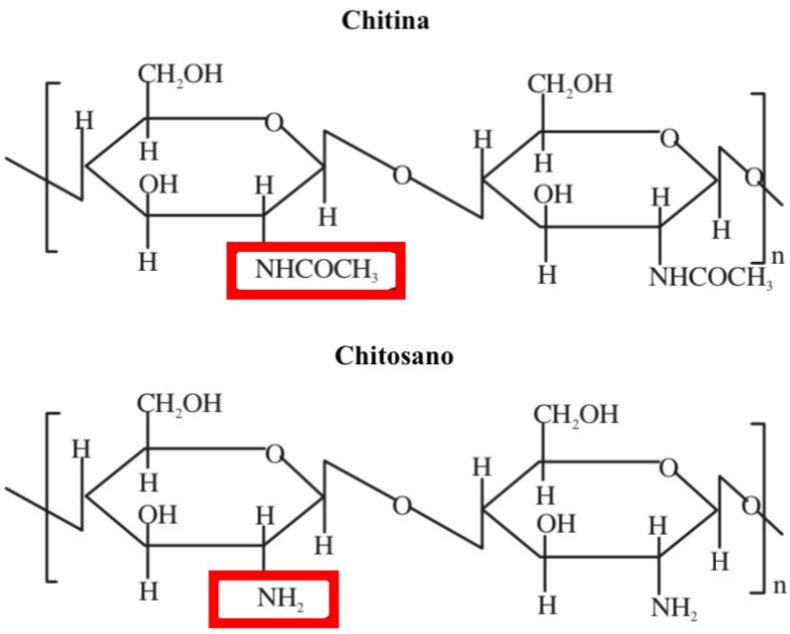

Figura 2.1: Formula di struttura della chitina e del chitosano. In evidenza il gruppo $NHCOCH_3$ della chitina che, a seguito della deacetilazione, diventa un gruppo NH_2 nel chitosano. (Figura tratta da Hassan e Chang, 2017, con modifiche).

Sodium acetate buffer

Soluzione composta da acetato di sodio, acido acetico (Figura 2.2) e acqua impiegata per sciogliere il chitosano, ovvero come solvente nel processo di sintesi dei *nanocarriers*. Si riporta in Tabella 2.1 la composizione.

Tabella 2.1: Composizione del *sodium acetate buffer*.

Reagente	Quantità per 1000 ml di soluzione, g
Acido acetico (CH_3COOH)	7,719
Acetato di sodio (CH_3COONa)	0,353

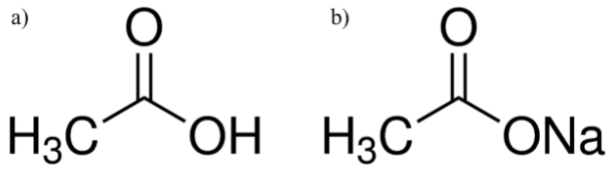

Figura 2.2: Formule di struttura dell'acido acetico (a) e dell'acetato di sodio (b).

Solfato di sodio

Il solfato di sodio (Figura 2.3) è stato aggiunto all'acqua usata come antisolvente in modo da ottenere soluzioni 0,73 M o 0,05 M.

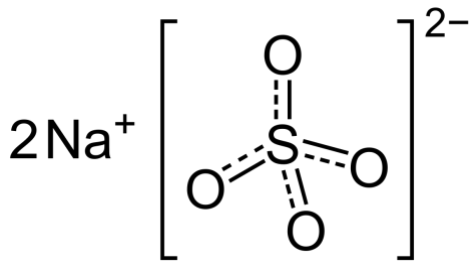

Figura 2.3: Formula di struttura del solfato di sodio.

Double stranded RNA (dsRNA)

Il dsRNA è un particolare tipo di RNA che, similmente al DNA, presenta due filamenti complementari anziché un unico filamento. I due filamenti presentano orientamento opposto e vengono uniti da legami idrogeno tra basi azotate. Si può trovare in diversi tipi di cellule, ma principalmente costituisce parte del patrimonio genetico di alcune tipologie di virus.

Nel caso specifico di questa trattazione viene impiegato un dsRNA sintetizzato da parte dell'IPSP-CNR (Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante – CNR, Torino) contenente una sequenza omologa al gene N del TSWV, ovvero il gene codificante per la proteina nucleocapsidica. Tale biomolecola è stata ottenuta *in vitro* mediante amplificazione con PCR e successiva retrotrascrizione in RNA, seguendo lo studio svolto da Tenllado e Diaz Ruiz (2001). Sono in corso le procedure di messa a punto di un sistema di sintesi *in vivo* mediante l'uso di batteri *E. coli* ceppo HT115 privi di RNasi III seguendo il protocollo riportato da Tenllado *et al.* (2003).

Phosphate-Buffered Saline (PBS)

Come mezzo di dialisi è stato impiegato il PBS, un tampone a pH 7,4 contenente cloruro di sodio (NaCl), cloruro di potassio (KCl), fosfato di sodio (Na_2HPO_4) e fosfato di potassio (KH_2PO_4). Questo tampone non è tossico e presenta una concentrazione di sali simile a quella del corpo umano (soluzione isotonica). Per questi motivi viene spesso impiegato in ambito biologico. In questo lavoro di Tesi è stato impiegato un *blend* di sali preconfezionato, pertanto non se ne riporta la composizione.

Tutti i reagenti finora nominati, ad eccezione del dsRNA, sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania). L'acqua impiegata è acqua distillata.

2.2. *Apparato sperimentale e metodologia di sintesi delle nanoparticelle*

Nel capitolo precedente è stato presentato il metodo di *nanoprecipitazione* come metodo di sintesi dei nanovettori. Esso prevede l'impiego di miscelatori nei quali avvenga una rapida diffusione di solvente nell'antisolvente, ovvero una miscelazione rapida ed intensa. A questo scopo sono stati impiegati due tipi di mixer diversi: l'agitatore *Vortex* e il *Confined Impinging Jets Mixer* (CIJM).

In una prima fase sono state prodotte nanoparticelle prive di dsRNA. Lo scopo di questa sperimentazione era infatti individuare le condizioni operative migliori al fine di ottenere il tipo di *carrier* ottimale. Inoltre, visti i piccolissimi quantitativi di dsRNA ottenibili dalla sintesi *in vitro*, non sarebbe stato possibile condurre tutte le prove sperimentali necessarie utilizzando questa biomolecola. Il dsRNA è stato quindi impiegato solamente nella fase successiva in cui è stato studiato il suo stesso incapsulamento e rilascio controllato.

Peraltro, come illustrato nel capitolo precedente, anche le nanoparticelle di chitosano possono avere interessanti proprietà e applicazioni.

Una volta confrontati i risultati ottenuti dalla sintesi del solo *carrier* (privo di dsRNA) con entrambi i reattori è stato deciso di proseguire la sperimentazione solamente con le particelle prodotte mediante il CIJM.

2.2.1. Agitatore *Vortex*

La sintesi di nanoparticelle per nanoprecipitazione usando l'agitatore *Vortex* è stata condotta utilizzando le informazioni disponibili in diversi articoli di letteratura (Bozkir e Saka, 2004; Sarathi et al., 2008; Ramesh Kumar et al., 2016). Si opera preparando due soluzioni, la soluzione solvente contenente il chitosano e quella antisolvente. La prima è costituita dal *sodium acetate buffer*, che funge da solvente, al quale viene aggiunto il chitosano a basso peso molecolare in concentrazione pari a 0.2, 0.5 o 1 mg/mL. Sono state condotte prove anche con chitosano ad alto peso molecolare, ma, a causa della formazione di una popolazione multimodale di particelle, questa tipologia di reagente è stata scartata. La seconda è una soluzione acquosa di solfato di sodio 0,05 M.

La sintesi prevede che un uguale volume delle due soluzioni venga posto in provetta; questa viene poi riscaldata e inserita all'interno di un opportuno supporto posto sull'agitatore *Vortex*. Il riscaldamento avviene per immersione della provetta in un bagno termostatico a 55°C. La messa a punto del protocollo ha richiesto una lunga sperimentazione in quanto in letteratura sono presenti numerose procedure che prevedono tempi diversi di miscelazione e riscaldamento o, ancora, il preriscaldamento delle singole soluzioni seguito direttamente dal mixing nell'agitatore *Vortex*. Sono state quindi effettuate prove che prevedessero:

- nessun ricaldamento o il riscaldamento della provetta per uno o due minuti;
- miscelazione della durata di 30 secondi, due minuti o tre minuti e 30 secondi;
- preriscaldamento delle due soluzioni separate seguito direttamente dal *mixing*.

A seguito di questo set di prove, alla luce dei risultati ottenuti, è stato deciso di impiegare provette da 15 mL che vengono caricate con 6 mL di ciascuna delle due soluzioni. La provetta viene poi riscaldata per immersione per un minuto in un bagno termostatico a 55°C e opportunamente collocata nel miscelatore per 30 secondi.

2.2.2. *Confined Impinging Jets Mixer* (CIJM)

La sintesi di nanoparticelle per nanoprecipitazione nel *Confined Impinging Jets Mixer* (Figura 2.4) avviene mediante la collisione di due flussi di solvente e antisolvente che, determinando una velocissima dissipazione dell'energia cinetica turbolenta, permette una miscelazione molto intensa e rapida.

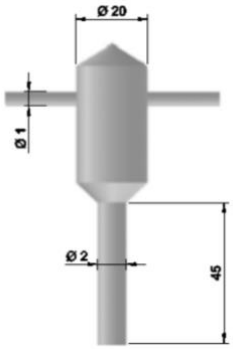

Figura 2.4: Rappresentazione schematica del reattore a getti confinati collidenti (CIJM) con rispettive dimensioni.

La metodologia usata per le prove sperimentali è riassunta in Figura 2.5. Alla soluzione solvente, costituita dal *sodium acetate buffer*, viene aggiunto chitosano ad alto peso molecolare in modo da ottenere concentrazione pari a 1 mg/mL, oppure chitosano a basso peso molecolare in modo da ottenere concentrazione pari a 0.5, 1, 2 o 5 mg/mL. La soluzione antisolvente è invece una soluzione acquosa di solfato di sodio 0,73 M.

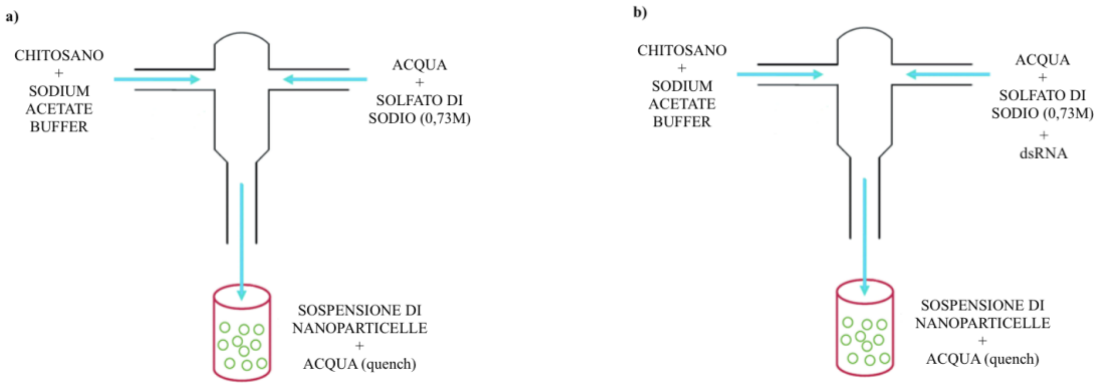

Figura 2.5: Metodologia di sintesi del solo *carrier* (a) e delle nanoparticelle vere e proprie (b) con l'uso del CIJM.

Le due soluzioni ottenute vengono caricate in due siringhe con volume pari a 100 mL ciascuna. Una pompa ad infusione (KDS200, KD Scientific, USA) permette di erogare i due reagenti al CIJM con una portata costante. Sono state svolte numerose prove con portate pari a 40, 60, 80, 100 e 120 mL/min al fine di identificare quella ottimale. Per ragioni pratiche si è scelto di inviare al reattore al massimo 45 mL di ciascuna soluzione. In particolare, per le sperimentazioni successive che prevedevano l'uso del dsRNA è stato necessario erogare un volume molto più piccolo pari a 10 mL di ciascuna soluzione.

Una volta sintetizzate le nanoparticelle, ovvero una volta avvenuta la miscelazione nella piccola camera cilindrica del CIJM, queste ultime sono state raccolte in un becher all'interno del quale è stato posto precedentemente un certo quantitativo di acqua (*quench*). Successivamente, sottoponendole ad una blanda agitazione con l'uso di un'ancoretta magnetica

per qualche minuto, si ottiene la stabilizzazione delle nanoparticelle e vengono bloccati i fenomeni di crescita e aggregazione (Figura 2.6). Si definisce quindi il *quench volumetric ratio* come il volume di acqua impiegato per il *quench* rispetto al volume di sospensione ottenuta. I valori di *quench ratio* impiegati nelle prove sperimentali sono: 1:1, 2:1 e 3:1.

Figura 2.6: Apparato per la sintesi di nanoparticelle con il CIJM.

2.3. Misura della dimensione media, della distribuzione di dimensioni delle particelle e del potenziale zeta

Al termine di ogni prova di sintesi sono state valutate le dimensioni medie, la distribuzione di dimensioni e il potenziale zeta delle nanoparticelle. La misura è stata svolta con l'impiego del *Nano Zetasizer ZS90* (DLS Zetasizer Nanoseries ZS90, Malvern Instrument, UK), strumento dotato di una vasta gamma di opzioni e accessori utili a ottimizzare e semplificare la misurazione di diversi campioni. Le tecniche adottate in questo lavoro di Tesi sono il *Dynamic Light Scattering* e il *Laser Doppler Micro-electrophoresis*.

Le dimensioni medie e le curve di distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle sono state ottenute con la tecnica del *Dynamic Light Scattering*. In questo tipo di misura (Figura 2.6) un raggio laser colpisce il campione posto in una cuvetta di polistirene e si diffonde all'interno della stessa. Quando il fascio di luce laser colpisce delle particelle ferme, queste deflettono la luce in tutte le direzioni. Le radiazioni luminose deflesse si propagano e interferiscono tra loro in maniera costruttiva (onde in fase) o distruttiva (onde in opposizione di fase). Tuttavia, le nanoparticelle presenti nella sospensione non sono ferme, bensì si muovono di moto browniano e ciò significa che le interazioni tra le onde luminose deflesse cambiano continuamente nel tempo. Il detector, posto a 90° rispetto al laser, rileverà delle variazioni di intensità luminosa che possono essere correlate alle dimensioni delle particelle.

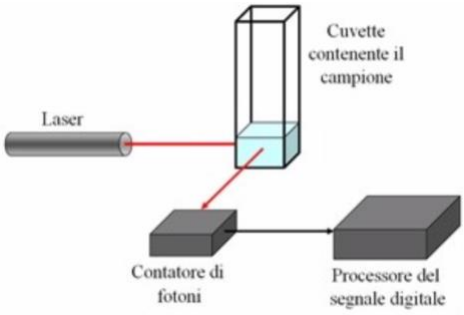

Figura 2.6: La tecnica del Dynamic Light Scattering

Lo strumento, misurando la frequenza di queste fluttuazioni di intensità luminosa in un certo arco di tempo, crea così, tramite processore digitale, una funzione di correlazione dalla quale è possibile ricavare il coefficiente di diffusione browniana. La funzione di correlazione, costruita confrontando ad ogni istante il segnale luminoso che raggiunge il detector, sarà massima inizialmente (tendente a uno) e con l'avanzare del tempo tenderà a zero. Essa è strettamente legata alla dimensione delle particelle (Figura 2.7). Le particelle più grandi, che si muovono meno, causano fluttuazioni di intensità di luce meno frequenti e ciò si riflette in una funzione di correlazione che decade dopo rispetto a quella delle particelle piccole. Queste ultime, infatti, a causa delle loro dimensioni ridotte si muovono più velocemente, quindi determineranno fluttuazioni di intensità luminosa più frequenti e presenteranno una funzione di correlazione con tempo di decadimento più breve.

A partire dalla funzione di correlazione è possibile, quindi, ricavare la curva di distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle ed il coefficiente di diffusione browniana. Quest'ultimo, inserito nell'equazione di Stokes-Einstein, viene convertito nel diametro idrodinamico. È possibile ottenere misure accurate per dimensioni delle nanoparticelle comprese tra i 2 nm e i 3 μm.

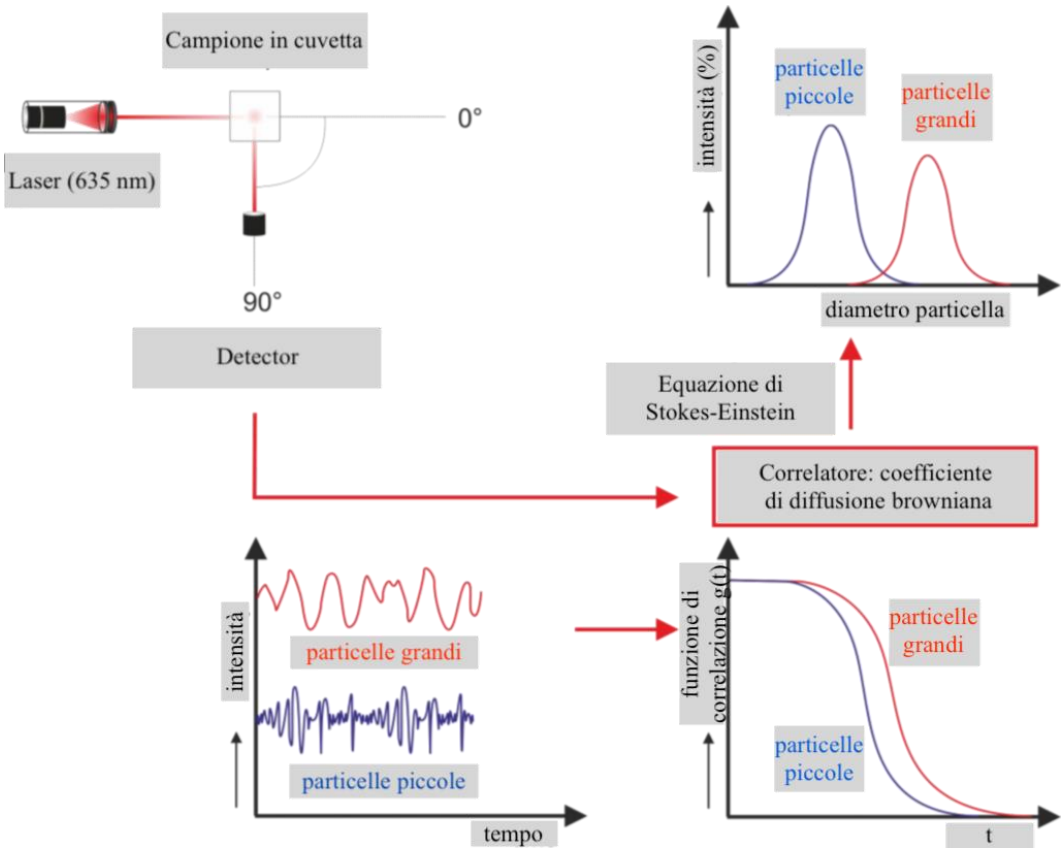

Figura 2.7: Schematizzazione approfondita del funzionamento del Nano Zetasizer ZS90 con la tecnica del Dynamic Light Scattering. Le particelle più piccole, muovendosi più velocemente, generano fluttuazioni più frequenti dell'intensità di luce alle quale si associa una funzione di correlazione che decade prima. Al contrario le più grandi, poiché si muovono lentamente, causano minori fluttuazioni di intensità luminosa e quindi presentano una funzione di correlazione che decade più avanti nel tempo. Infine, tramite il correlatore, dalla funzione di correlazione si ottiene il coefficiente di diffusione browniana che viene trasformato in diametro idrodinamico e curve di distribuzione di dimensioni grazie all'equazione di Stokes-Einstein.

La velocità del moto browniano dipende dalla temperatura e dalla viscosità del campione; pertanto, al fine di ottenere una misura corretta, è stato necessario impostare la viscosità pari a quella dell'acqua e la temperatura a 25°C. La cuvetta in polistirene (12,5x12,5x45 mm) deve essere riempita in modo che il livello di liquido superi i 10 mm e stia sotto i 15 mm, quindi è stato sufficiente utilizzare 1 mL circa di campione per ogni misura.

Il potenziale zeta delle nanoparticelle è stato valutato tramite la tecnica del *Laser Doppler Micro-electrophoresis*. Si inserisce il campione in una cella capillare dotata di elettrodi (Disposable capillary cuvette 1060) ai quali viene applicata una differenza di potenziale, generando un campo elettrico nella sospensione. Le particelle cariche, per effetto dell'elettroforesi, si spostano con una certa velocità verso l'elettrodo che presenta carica opposta. Anche in questo caso un raggio laser passa attraverso la sospensione e viene deflesso. Se la particella fosse ferma, la luce riflessa presenterebbe la stessa frequenza della luce incidente; tuttavia, poiché la particella si muove, la frequenza della luce riflessa subisce un incremento rispetto a quella della luce incidente (effetto Doppler, Figura 2.8). Essendo tale frequenza più elevata di quella del laser, per l'analisi dell'effetto Doppler lo strumento utilizza una tecnica interferometrica laser brevettata chiamata M3-PALS (Phase Analysis Light). Analizzando la differenza tra le frequenze è quindi possibile risalire alla mobilità elettroforetica e, attraverso il modello di Smulochowski, si ricava infine il potenziale zeta.

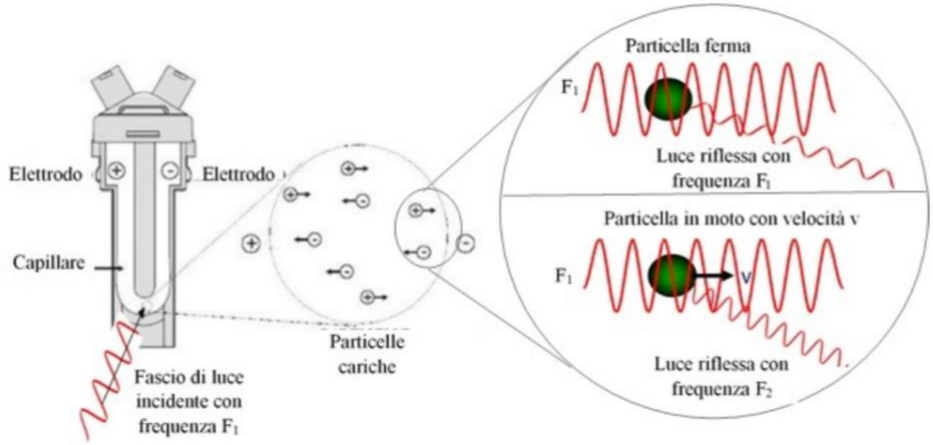

Figura 2.8: Rappresentazione schematica dell'effetto Doppler e del suo impiego nella tecnica del Laser Doppler Micro-electrophoresis.

La velocità delle particelle cariche in questo caso dipende dalla costante dielettrica e dalla viscosità del mezzo in cui si trovano sospese, ma anche dal loro potenziale zeta e dall'intensità del campo elettrico applicato. Per tali motivi è stato necessario impostare i parametri relativi al medium pari a quelli dell'acqua.

Sia per le misure di dimensione che di potenziale zeta un parametro molto importante è la concentrazione delle nanoparticelle in sospensione. Se questa è troppo elevata, le particelle tendono a sedimentare, ad ostacolare la diffusione browniana o a riflettere la luce riflessa da un'altra particella dando luogo al fenomeno del *multiple scattering*. Al contrario, se la concentrazione è troppo bassa, la luce diffusa dalle nanoparticelle non sarà abbastanza intensa da essere rilevata. Per questi motivi, le prove svolte con concentrazioni pari o superiori a 1 mg/mL di chitosano sono state tutte diluite 1:10 (una parte di campione e nove parti d'acqua).

Lo strumento esegue tre misure per ciascun campione e restituisce il valore mediato. Al fine di verificare la replicabilità delle prove e di ottenere dei valori medi accurati, ciascuna prova è stata ripetuta una o due volte mantenendo inalterate le condizioni operative.

2.4. *Spettrofotometria*

La spettrofotometria UV-visibile è una tecnica che viene spesso impiegata nella determinazione quantitativa e qualitativa di sostanze sia organiche che inorganiche. Essa si basa sull'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche monocromatiche del campo UV e del visibile da parte delle molecole analizzate. Come si può vedere in Figura 2.9, tali radiazioni sono ottenute a partire da una sorgente luminosa a bassa intensità, con luminosità costante nel tempo e con uno spettro il più possibile lineare. La luce proveniente dalla lampada attraversa dei filtri fino ad arrivare al monocromatore. In questo modo l'operatore può impostare la lunghezza d'onda desiderata (diversa a seconda del tipo di esperimento che si vuole condurre) ed il monocromatore scomporrà la luce bianca lasciando passare solo il raggio monocromatico avente lunghezza d'onda pari a quella inserita. A questo punto il raggio viene deviato verso due cuvette con due facce parallele e trasparenti alle radiazioni. Una cuvetta conterrà il campione, mentre l'altra conterrà il bianco, ovvero solo il mezzo nel quale è sospesa la sostanza che si vuole analizzare e quantificare. Il raggio monocromatico attraversa entrambe le cuvette e, interagendo con due soluzioni differenti, diminuisce la sua intensità luminosa. Un fotorivelatore legge continuamente i due raggi e fornisce il valore della differenza tra questi, generando così lo spettro di assorbimento.

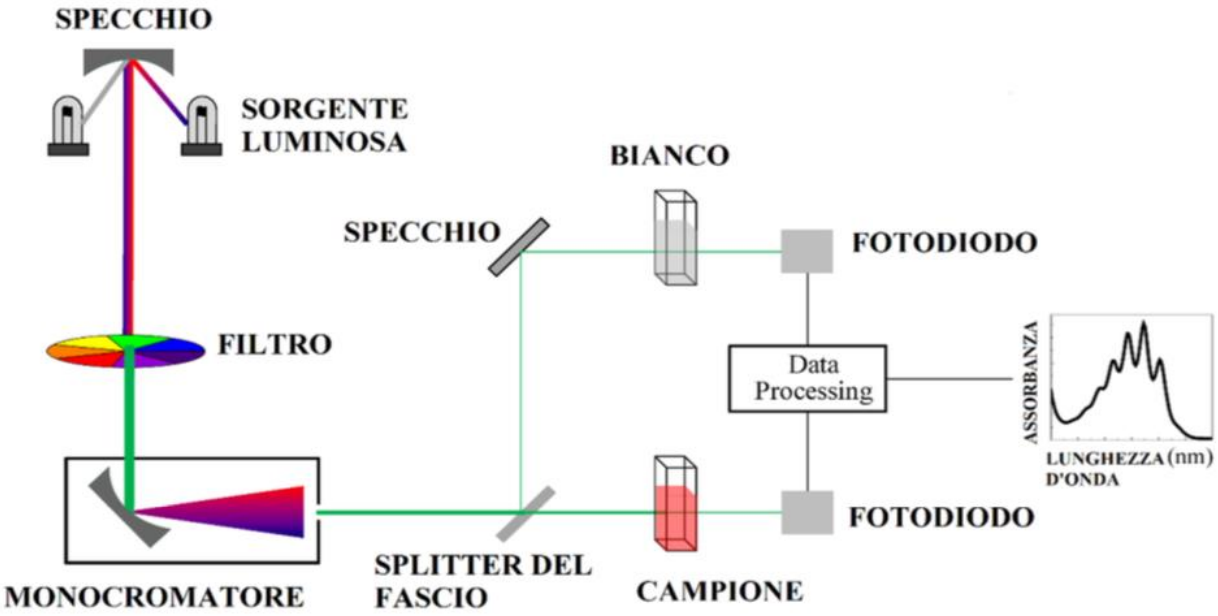

Figura 2.9: Rappresentazione del funzionamento dello spettrofotometro.

In Figura 2.10 viene riportato lo spettro UV del dsRNA. Questo, così come le altre tipologie di acidi nucleici, presenta un picco ad una lunghezza d'onda pari a 260 nm circa. La lettura a 280 nm permette di valutare se vi sia in atto una contaminazione da parte delle proteine; ciò avviene quando si rileva un rapporto tra assorbanza a 260 nm e assorbanza a 280 nm superiore a 2.

Poiché il picco di assorbanza relativo al dsRNA si trova nel campo dell'UV è stato necessario impiegare delle cuvette in quarzo ottico (12,5x12,5x45 mm, cammino ottico 10 mm) in modo da permettere la misura a tali lunghezze d'onda.

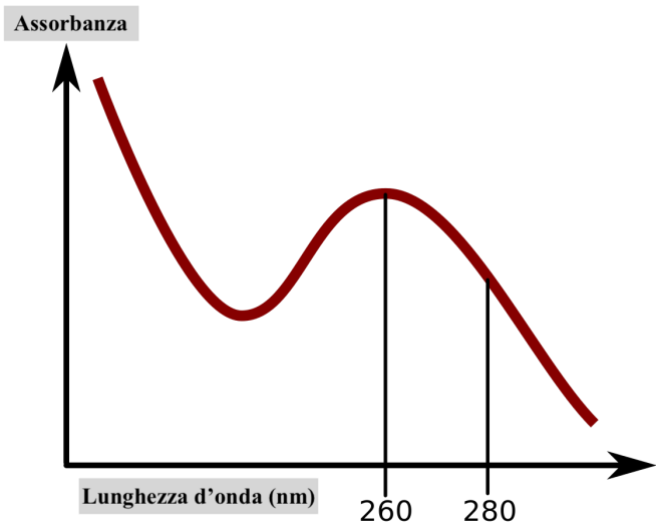

Figura 2.10: Spettro di assorbimento di un generico dsRNA.

L'assorbanza A permette di quantificare l'assorbimento della radiazione luminosa da parte della soluzione esaminata. Essa viene definita nel modo seguente:

$$A = log\frac{1}{T} \tag{2.1}$$

dove T è la trasmittanza, cioè il rapporto tra l'intensità della luce I in uscita dalla cuvetta e l'intensità I_o della luce incidente. Per legare l'assorbanza A alla concentrazione della soluzione in esame, si ricorre alla legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot C \tag{2.2}$$

dove C è la concentrazione della soluzione espressa in termini molari, ε_λ è il coefficiente di assorbimento molare ed l è il cammino ottico, ovvero lo spessore della soluzione attraversato dalla luce monocromatica. Dato che ε_λ ed l sono dei valori costanti, l'equazione precedente si può riscrivere come:

$$A = m \cdot C \tag{2.3}$$

L'equazione (2.3) è valida solo per concentrazioni basse e, in questo caso, il grafico che riporta l'assorbanza in funzione della concentrazione è una retta passante per l'origine avente coefficiente angolare $m = \varepsilon_\lambda \cdot l$.

Sulla base di queste considerazioni è stato possibile convertire i valori di assorbanza in valori di concentrazione mediante curve di calibrazione ricavate per via sperimentale. Per comodità sono state riportate le concentrazioni massiche anziché quelle molari.

Questa tecnica è stata utilizzata sia per valutare l'incapsulamento del dsRNA, come descritto nel paragrafo seguente, sia per valutarne il rilascio per dialisi, come si vedrà nel paragrafo 2.6.

2.5. *Metodologia adottata per lo studio dell'incapsulamento del dsRNA*

Per valutare l'incapsulamento del dsRNA nelle nanoparticelle, è stato necessario ricavare sperimentalmente la curva di calibrazione. Un campione di nanoparticelle prive di dsRNA (solo *carrier*) è stato filtrato in modo da ottenere il mezzo di sintesi privo di nanosfere, ovvero il surnatante. A tale scopo è stato utilizzato un filtro in grado di trattenere particelle con dimensioni superiori agli 0,2 μm. Sono state preparate, quindi, diverse soluzioni a concentrazione nota di dsRNA nel mezzo di sintesi preparato. Di ciascuna soluzione, contenente la biomolecola, è stata ricavata l'assorbanza tramite lo spettrofotometro usando il mezzo di sintesi anche come bianco. Riportando le letture ottenute in funzione delle rispettive concentrazioni è stata ottenuta la retta di calibrazione (Figura 2.11).

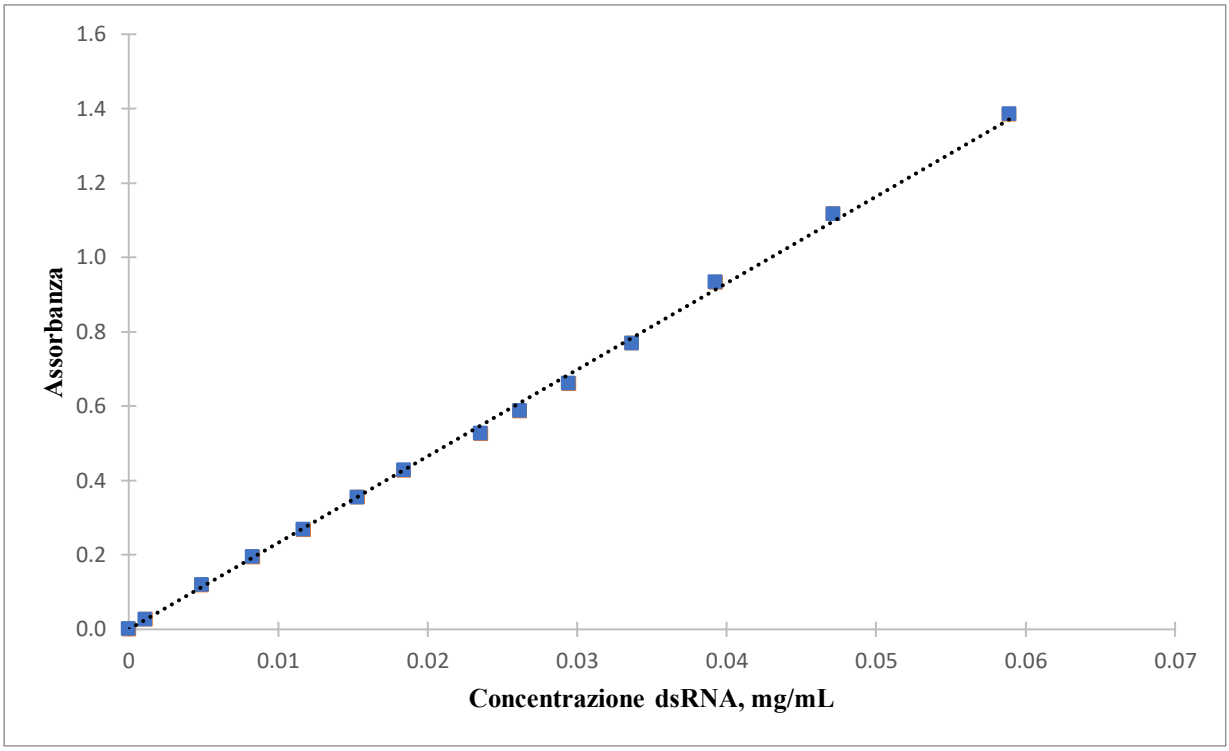

Figura 2.11: Curva di calibrazione del dsRNA nel mezzo di sintesi.

L'equazione (2.4) rappresenta la retta che mette in relazione il valore di assorbanza misurato (A) con la corrispondente concentrazione di dsRNA (C):

$$A = 23{,}272 \cdot C \tag{2.4}$$

Una volta ricavata tale relazione, il surnatante, ottenuto per filtrazione da ogni prova di sintesi di nanoparticelle veicolanti dsRNA, è stato utilizzato per valutare l'efficienza di incapsulamento della biomolecola. Nello spettrofotometro è stato introdotto un campione di 3 mL di surnatante in modo da ottenerne il valore di assorbanza. Poiché la quantità di dsRNA impiegato in ciascuna prova è molto ridotta, le concentrazioni ottenute nel surnatante sono sufficientemente basse da rientrare nel campo di validità della legge di Lambert-Beer. Ottenuto il valore di assorbanza allo spettofotometro, e ricavata la concentrazione di dsRNA del

campione tramite l'equazione (2.4), è stato possibile valutare la quantità di biomolecola disciolta nel surnatante, ovvero non incapsulata dalle nanoparticelle:

$$Q_S = C_S \cdot S \tag{2.5}$$

dove S è il volume di surnatante, mentre C_S e Q_S sono rispettivamente la concentrazione, espressa in mg mL^{-1}, e la quantità, espressa in mg, di dsRNA nel surnatante. Il volume di surnatante può essere considerato pari al volume erogato tramite le due siringhe dalla pompa ad infusione al quale viene sottratto il volume di liquido che resta nei tubi (circa 5 mL); il volume occupato dalle nanoparticelle si può considerare trascurabile viste le basse concentrazioni di chitosano impiegate. A questo punto, nota la quantità di dsRNA immessa inizialmente nel microreattore (Q_{IN}), tenendo conto della quantità che resta nel tubicino di alimentazione (Q_T) e di quella rimasta nel surnatante (Q_S), è possibile risalire alla quantità incapsulata nelle nanoparticelle (Q_N) tramite la seguente equazione:

$$Q_N = Q_{IN} - Q_S - Q_T \tag{2.6}$$

2.6. Metodologia adottata per lo studio del rilascio del dsRNA

Per studiare il rilascio di dsRNA da parte delle nanoparticelle si è scelto di adottare la tecnica della dialisi. Essa risulta vantaggiosa in quanto, non essendo necessaria l'applicazione di forze esterne, limita fenomeni aggregativi tra i nanovettori e non modifica la cinetica di rilascio. Una volta sintetizzati i *nanocarriers* contenenti la biomolecola, questi vengono sospesi all'interno della soluzione donatrice e posti all'interno di una membrana da dialisi. Quest'ultima viene posizionata in un volume noto di fase accettrice. A intervalli di tempo determinati viene eseguito un prelievo dalla soluzione accettrice in modo da poterla analizzare tramite lo spettrofotometro. I valori di assorbanza ottenuti vengono trasformati, tramite la retta di calibrazione, in concentrazioni espresse in mg mL^{-1} e queste vengono riportate in funzione del tempo in modo da definire il profilo di rilascio.

In questo lavoro di Tesi la dialisi è stata condotta subito dopo la sintesi delle nanoparticelle. La prova di rilascio è stata condotta con una membrana da dialisi di cellulosa (Sigma Aldrich, MWCO 14000 Da, larghezza 43 mm) precedentemente inserita per un paio di minuti in acqua per permetterne il lavaggio. A questo punto sono stati inseriti 20 mL di prodotto (nanoparticelle e mezzo di sintesi) nella membrana che, successivamente, è stata chiusa con due clips e posta all'interno di un becher insieme ad 80 mL di *Phosphate-Buffered Saline (PBS)*, usato come soluzione accettrice. Quest'ultima, infine, è stata posta in blanda agitazione tramite un'ancoretta magnetica. Ad intervalli di tempo stabiliti sono stati effettuati prelievi di 3 mL dal liquido esterno alla membrana in modo da poterlo analizzare. Dopo il prelievo è stato effettuato anche il reintegro di una pari quantità di *buffer* fresco al fine di evitare di concentrare la soluzione. La concentrazione di dsRNA di ciascun campione è stata determinata per via spettrofotometrica. A tale scopo è stato necessario costruire sperimentalmente la retta di calibrazione. Sono state misurate allo spettrofotometro soluzioni a concentrazione nota di dsRNA in PBS. Interpolando così i punti sperimentali ottenuti e supponendo di essere nel campo di validità della legge di Lambert-Beer, è stato possibile ottenere la retta mostrata in Figura 2.12.

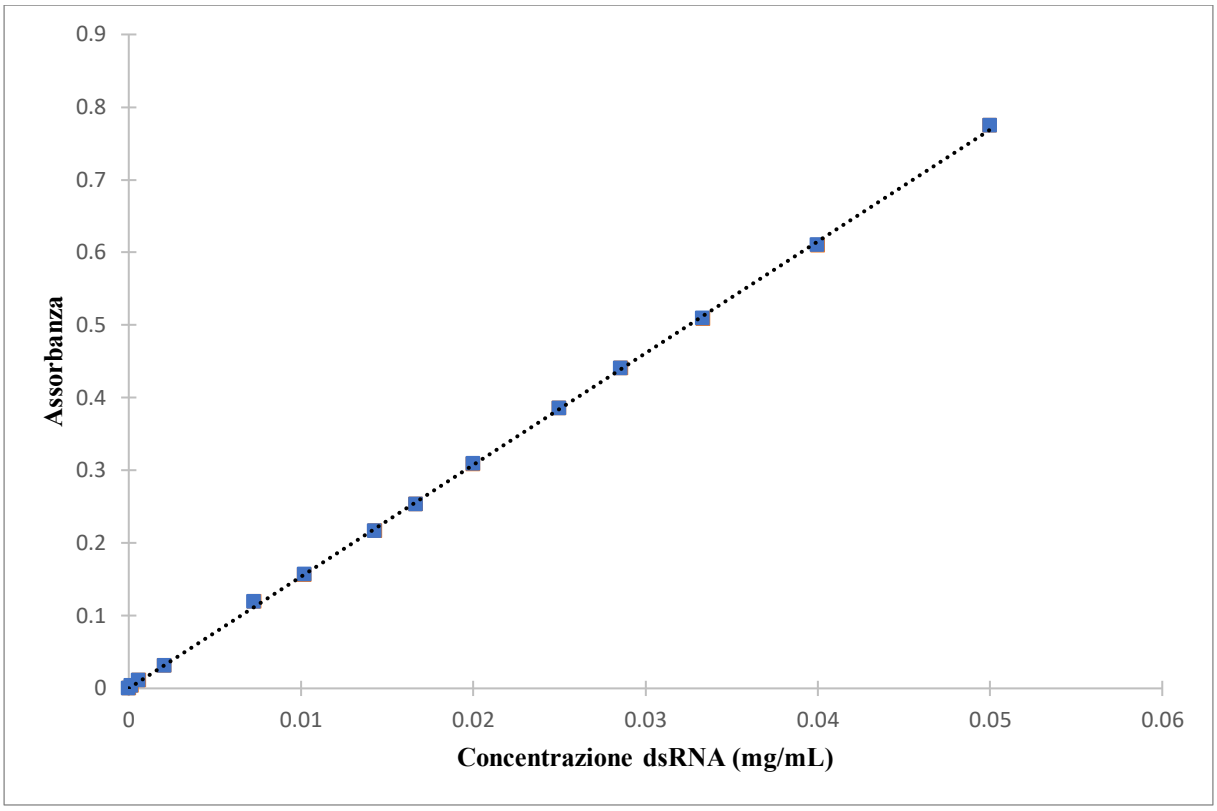

Figura 2.12: Curva di calibrazione del dsRNA nel PBS (pH 7,4).

L'equazione (2.6) mette in relazione il valore di assorbanza (A) misurato con la corrispondente concentrazione di dsRNA (C):

$$A = 15{,}377 \cdot C \tag{2.6}$$

A questo punto, ricavata la concentrazione della biomolecola nella soluzione accettrice ad un determinato istante di tempo, per conoscere la quantità di dsRNA complessivamente rilasciata è necessario considerare anche la quantità sottratta di volta in volta ad ogni prelievo. Pertanto i microgrammi di dsRNA rilasciati ad un certo istante saranno pari a quelli presenti all'esterno della membrana da dialisi a cui è stata sommata la quantità di biomolecola presente in ciascun campione prelevato precedentemente.

Occorre tenere presente che, ponendo il mezzo di sintesi con le nanoparticelle direttamente all'interno della membrana da dialisi, il dsRNA rilasciato inizialmente sarà prevalentemente quello non incapsulato nei nanovettori. Tale quantità è nota in quanto determinata nella fase di studio dell'incapsulamento, come esposto nel paragrafo precedente. Anche questa quota di dsRNA è comunque utile ad immunizzare la pianta dal virus tramite meccanismo dell'RNA-*interference*.

3. Analisi dei risultati

3.1. Studio del processo di sintesi delle nanoparticelle con l'agitatore Vortex

Nella fase preliminare di questo lavoro di Tesi sono state condotte molteplici prove sperimentali volte a ricavare una metodologia di sintesi, adatta per l'agitatore *Vortex*, che permettesse di ottenere nanoparticelle sferiche di dimensioni inferiori a 1000 nm (preferibilmente tra i 200 e i 500 nm) e carica superficiale (potenziale zeta) positiva.

Da letteratura (Sarathi et al., 2008) è stata ricavata la seguente procedura:

- Versare in una provetta il *sodium acetate buffer* contenente chitosano a basso peso molecolare (0,2 mg/mL) insieme alla soluzione di solfato di sodio (0,05 M).
- Scaldare la miscela per un minuto a 55 °C.
- Miscelare per 30 secondi con il *Vortex mixer*.

Dopo aver verificato tale metodo si è pensato di studiare l'effetto delle singole variabili operative coinvolte così da poterne valutare l'influenza sulle dimensioni delle nanoparticelle sintetizzate e valutare la necessità di introdurre variazioni alla procedura descritta. Sono state prese in considerazione le seguenti variabili:

- concentrazione di chitosano,
- concentrazione di solfato di sodio,
- tempo di riscaldamento della miscela,
- tempo di miscelazione,
- preriscaldamento dei reagenti,
- *quench*.

L'impiego di chitosano ad alto peso molecolare è stato scartato in quanto, dalle prime prove sperimentali eseguite, si è osservato che porta alla formazione di una popolazione multimodale di nanoparticelle con *Polydispersity Index (PDI)* molto prossimo a uno.

3.1.1. Effetto della concentrazione di chitosano sulla dimensione delle nanoparticelle

Per valutare l'effetto della concentrazione di chitosano sulla dimensione delle nanoparticelle, le prove sperimentali sono state svolte seguendo la procedura descritta da Sarathi *et al* (2008), precedentemente indicata, impiegando chitosano, posto in soluzione con il *sodium acetate buffer,* in concentrazione 0.2, 0.5, o 1 mg/mL. Ciascuna prova è stata ripetuta almeno due volte in modo da valutare la replicabilità dei risultati.

Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti (Tabella 3.1, Figura 3.1) e le curve di distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle (Figura 3.2).

Tabella 3.1: Dimensioni medie delle nanoparticelle ottenute con rispettiva deviazione standard e PDI.

Concentrazione, mg/mL	D, nm	DEV D, nm	PDI
0,2	309,5	20,7	0,216
0,5	327,4	8,2	0,183
1	511,0	35,5	0,089

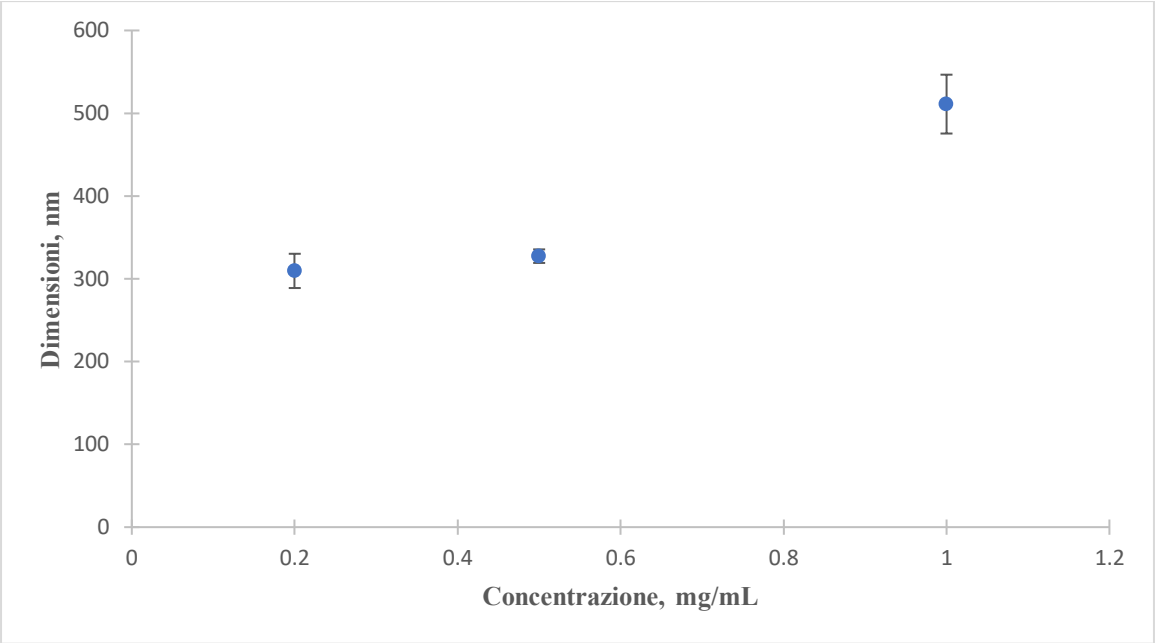

Figura 3.1: Dimensione delle nanoparticelle prodotte in funzione della concentrazione di chitosano in alimentazione. Barre d'errore relative alle dimensioni valutate tramite deviazione standard.

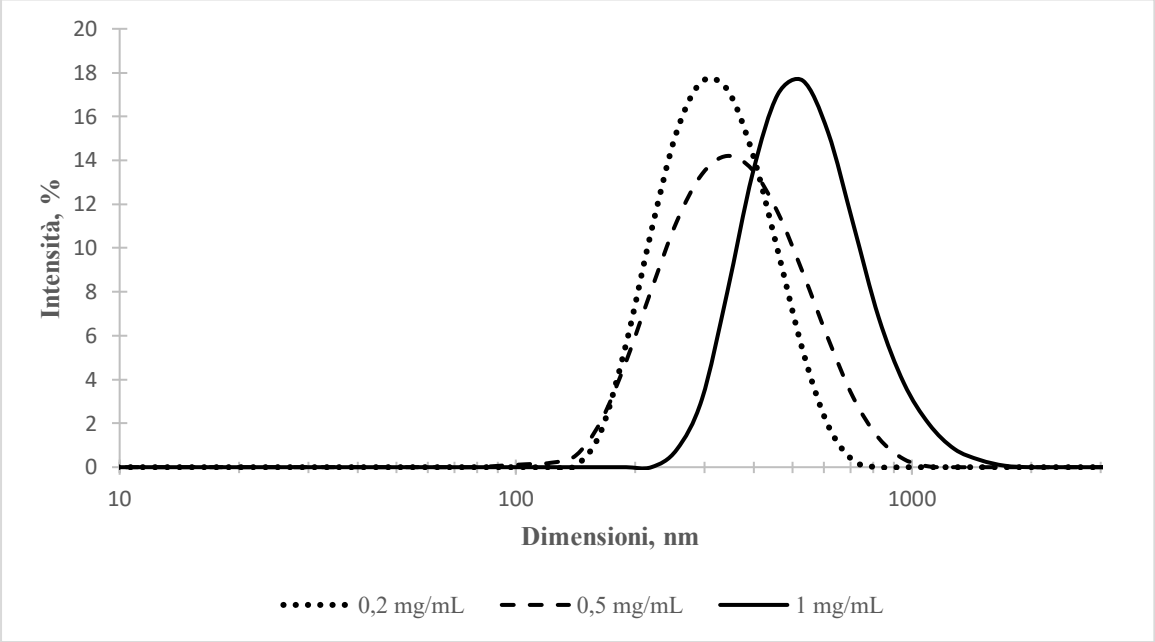

Figura 3.2: Curve PSD delle nanoparticelle prodotte al variare della concentrazione di chitosano in alimentazione.

Dai risultati ottenuti è possibile concludere che la dimensione delle particelle non varia di molto impiegando chitosano in concentrazione 0.2 o 0.5 mg/mL, mentre con concentrazione 1 mg/mL si ottengono particelle nettamente più grandi. Per quello che riguarda il PDI non si identificano variazioni rilevanti conseguenti al cambiamento di concentrazione.

3.1.2. Effetto della concentrazione solfato di sodio sulla dimensione delle nanoparticelle

Per valutare l'effetto della concentrazione di solfato di sodio sulla dimensione delle nanoparticelle ottenute, è stata seguita la medesima procedura operativa utilizzata in precedenza. Oltre ad utilizzare una soluzione di solfato di sodio 0,05 M, è stata provata una soluzione a molarità superiore (0,73 M). Il test è stato eseguito a differenti concentrazioni di chitosano.

Di seguito vengono riportati i risultati relativi a queste prove (Tabella 3.2).

Tabella 3.2: Dimensioni medie delle nanoparticelle ottenute con rispettiva deviazione standard e PDI.

	D, nm		**DEV D, nm**		**PDI**	
Concentrazione di chitosano, mg/mL	**Soluzione 0,73 M**	**Soluzione 0,05 M**	**Soluzione 0,73 M**	**Soluzione 0,05 M**	**Soluzione 0,73 M**	**Soluzione 0,05 M**
0,2	578,4	309,5	23,7	20,7	0,058	0,216
0,5	677,2	327,4	25,3	8,2	0,032	0,183
1	762,8	511,0	27,3	35,5	0,060	0,089

Come si può notare dalla Tabella 3.2, con la soluzione di solfato di sodio 0,73 M si generano particelle più grandi, ma si ottiene un PDI più ridotto. Le elevate dimensioni ottenute hanno fatto propendere per l'utilizzo della soluzione 0,05 M già proposta in letteratura.

3.1.3. Effetto del tempo di riscaldamento della miscela sulla dimensione delle nanoparticelle

Per queste prove sono state selezionate le seguenti condizioni: *sodium acetate buffer* con chitosano in concentrazione 0,2 mg/mL e soluzione di solfato di sodio 0,05 M, sulla base dei risultati ottenuti nei test precedentemente descritti. Sono state inserite le due soluzioni in provetta (miscela) e quest'ultima è stata scaldata a 55°C per 0, 1 o 2 minuti.

Di seguito vengono riportati i risultati relativi a queste prove (Tabella 3.3).

Tabella 3.3: Dimensioni medie delle nanoparticelle ottenute con rispettiva deviazione standard e PDI.

Tempo di riscaldamento miscela	**D, nm**	**DEV D, nm**	**PDI**
0 min	398,7	17,2	0,070
1 min	332,5	34,3	0,300
2 min	349,2	8,6	0,292

Si è osservato che il tempo di riscaldamento della miscela incide poco sulle dimensioni delle particelle ottenute. Tuttavia, un breve riscaldamento (un minuto), in modo analogo a quanto proposto in letteratura, sembra favorire la formazione di particelle con diametro ridotto, pertanto tale operazione farà parte della procedura adottata nelle prove seguenti.

3.1.4. Effetto della miscelazione sulla dimensione delle nanoparticelle

Operando nelle medesime condizioni (*sodium acetate buffer* con chitosano in concentrazione 0,2 mg/mL e una soluzione di solfato di sodio 0,05 M) si è valutato l'effetto della miscelazione. Le due soluzioni sono state collocate nella provetta che, una volta scaldata per un minuto, è stata posta nell'agitatore *Vortex* per 30 secondi, 2 minuti o 3 minuti e 30 secondi.

I risultati conseguiti sono sintetizzati nella Tabella 3.4.

Tabella 3.4: Dimensioni medie delle nanoparticelle ottenute con rispettiva deviazione standard e PDI.

Tempo di *mixing*	D, nm	DEV D, nm	PDI
30 sec	332,5	34,3	0,300
2 min	269,1	31,0	0,139
3 min 30 sec	386,0	3,7	0,043

Dai risultati ottenuti si può concludere che l'aumento del tempo di miscelazione all'interno dell'agitatore *Vortex* non modifica in maniera rilevante le dimensioni delle particelle. Se si considerano, infatti, i valori medi del diametro delle nanoparticelle ricavati con le rispettive deviazioni standard, questi rientrano sempre nel medesimo intervallo. Il riscaldamento della miscela, tuttavia, sembra ridurre la polidispersità del campione. Viste le variazioni di dimensioni non significative, si è deciso di continuare a seguire la procedura tratta da letteratura che prevede un *mixing* di 30 secondi.

3.1.5. Effetto del preriscaldamento dei reagenti sulla dimensione delle nanoparticelle

Anche per lo studio dell'effetto del preriscaldamento dei reagenti sono state mantenute le condizioni definite nei paragrafi precedenti (*sodium acetate buffer* con chitosano in concentrazione 0,2 mg/mL e di una soluzione di solfato di sodio 0,05 M). Le due soluzioni sono state scaldate per 2 minuti a 55°C prima di essere poste a contatto. Successivamente sono state inserite in provetta e immediatamente miscelate per 30 secondi nell'agitatore *Vortex*. Il risultato ottenuto è stato confrontato con il metodo descritto da Sarathi *et al* (2008), che prevede, invece, il riscaldamento per un minuto a 55°C dei reagenti già a contatto all'interno della provetta.

Di seguito vengono riportati i risultati relativi a queste prove (Tabella 3.5).

Tabella 3.5: Dimensioni medie delle nanoparticelle ottenute con rispettiva deviazione standard e PDI.

	D, nm	DEV D, nm	PDI
Preriscaldamento 2 min	372,1	43,2	0,130
Riscaldamento miscela 1 min	332,5	34,3	0,300

Poiché il preriscaldamento non incide significativamente sulle dimensioni delle particelle tale variazione procedurale non è stata ritenuta necessaria.

3.1.6. Effetto del *quench ratio* sulla dimensione delle nanoparticelle

Per *quench* si intende la diluizione immediata del sistema subito dopo la sintesi, utile a ridurre i fenomeni di crescita e/o aggregazione delle particelle e a renderle stabili nel tempo. Quando la sintesi avviene tramite CIJM, il campione ottenuto viene diluito con acqua a temperatura ambiente e miscelato tramite agitatore magnetico. La procedura di sintesi delle nanoparticelle tramite agitatore *Vortex* non prevede un *quench*. Tuttavia si è pensato di provare a mimare le condizioni utilizzate per il CIJM. Le prove sono state svolte usando il *sodium acetate buffer* con chitosano in concentrazione 0,5 mg/mL e una soluzione di solfato di sodio 0,05 M. Sono quindi stati impiegati *quench ratio* pari a 1:1, 2:1 o 3:1 utilizzando acqua a temperatura ambiente. Infine si è pensato di condurre un *quench* 1:1 impiegando acqua riscaldata a 55°C, temperatura alla quale si trova approssimativamente il prodotto in provetta subito dopo la sintesi.

I risultati conseguiti sono riassunti nella Tabella 3.6 e nella Figura 3.3.

Tabella 3.6: Dimensioni medie delle nanoparticelle ottenute con rispettiva deviazione standard e PDI.

Quench	D, nm	DEV D, nm	PDI
No quench	327,4	8,2	0,183
1:1	221,9	14,3	0,238
2:1	207,8	7,3	0,321
3:1	203,1	19,4	0,374
1:1, caldo	329,5	14,7	0,174

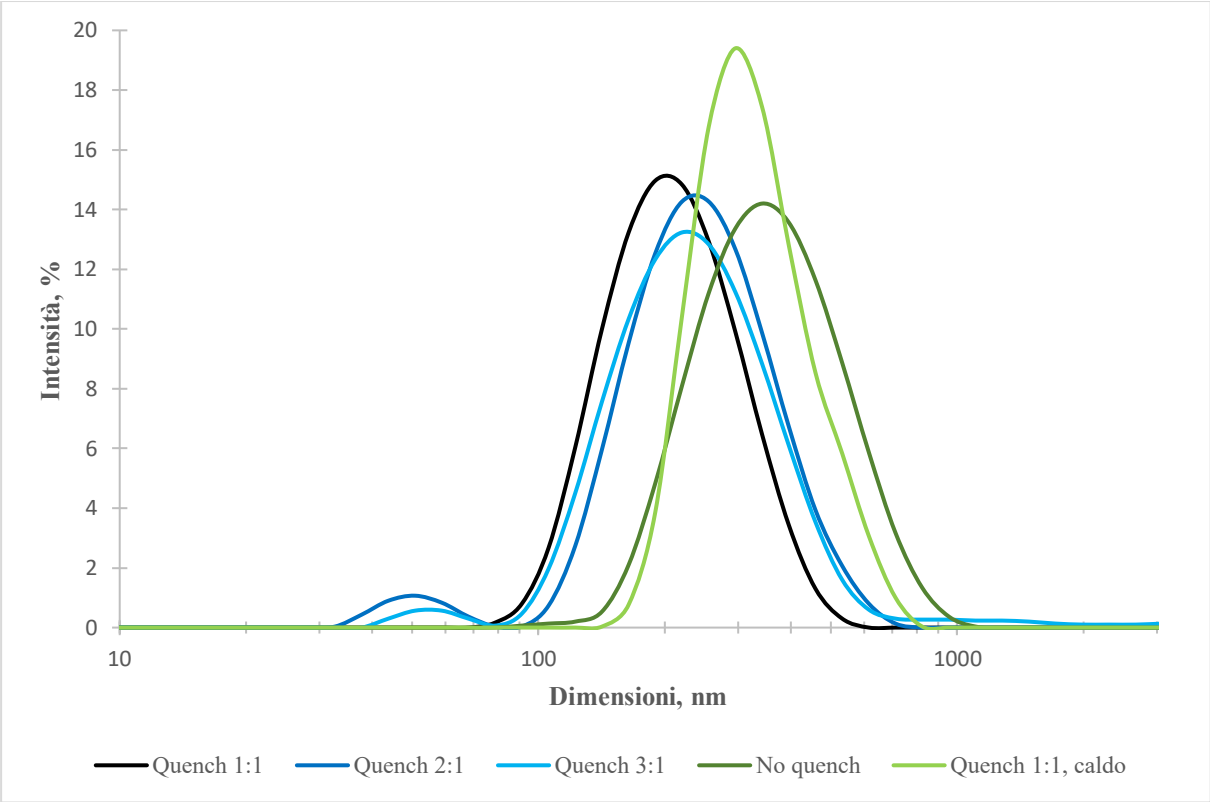

Figura 3.3: Curve PSD delle nanoparticelle prodotte al variare della tipologia di *quench* condotto.

L'utilizzo del *quench* con acqua a temperatura ambiente ha influenzato chiaramente la dimensione delle nanoparticelle, il cui diametro finale risulta ridotto di circa 100 nm. L'abbassamento della temperatura, unitamente alla diluizione del sistema, che si ottiene in queste condizioni blocca la crescita delle dimensioni delle nanoparticelle sintetizzate. Utilizzando un *quench* a 55°C non si osserva alcun effetto. È evidente quindi l'importanza della riduzione della temperatura.

3.1.7. Effetto delle variabili operative sul potenziale zeta

In ognuna delle condizioni sperimentali descritte precedentemente, è stata fatta, tramite DLS, anche una misura del potenziale zeta in modo da valutare indirettamente la carica superficiale delle nanoparticelle. In generale, si può affermare che non si nota alcuna correlazione precisa tra il potenziale zeta e le variabili operative considerate nei precedenti paragrafi. Complessivamente è stato ottenuto un valore di potenziale zeta che varia tra i 10 e i 18 mV.

A titolo di esempio, vengono riportati i valori di potenziale zeta misurati al variare della concentrazione di chitosano in alimentazione (Tabella 3.7).

Tabella 3.7: Potenziale zeta delle nanoparticelle prodotte con rispettive deviazioni standard.

Concentrazione, mg/mL	Potenziale Zeta, mV	DEV Potenziale Zeta, mV
0,2	15,8	3,2
0,5	15,4	0,8
1	16,6	0,9

3.1.8. Stabilità delle nanoparticelle

Conclusa la fase di verifica dell'influenza delle variabili sperimentali, e non avendo evidenziato la necessità di introdurre variazioni alla procedura descritta in letteratura, è stata valutata inizialmente la stabilità delle nanoparticelle ottenute. Le misure di stabilità sono state condotte sul campione ottenuto impiegando *sodium acetate buffer* con chitosano in concentrazione 0,5 mg/mL e soluzione di solfato di sodio 0,05 M.

Di seguito vengono riportati i risultati relativi a queste prove (Tabella 3.8, Figura 3.4, Figura 3.5).

Tabella 3.8: Dimensioni medie delle nanoparticelle ottenute con rispettiva deviazione standard e PDI.

	D, nm	DEV D, nm	PDI
Sintesi	339,1	59,2	0,140
1 giorno dopo	690,2	24,8	0,084
2 giorni dopo	710,3	18,4	0,068
5 giorni dopo	693,9	31,5	0,067
7 giorni dopo	730,8	7,3	0,144

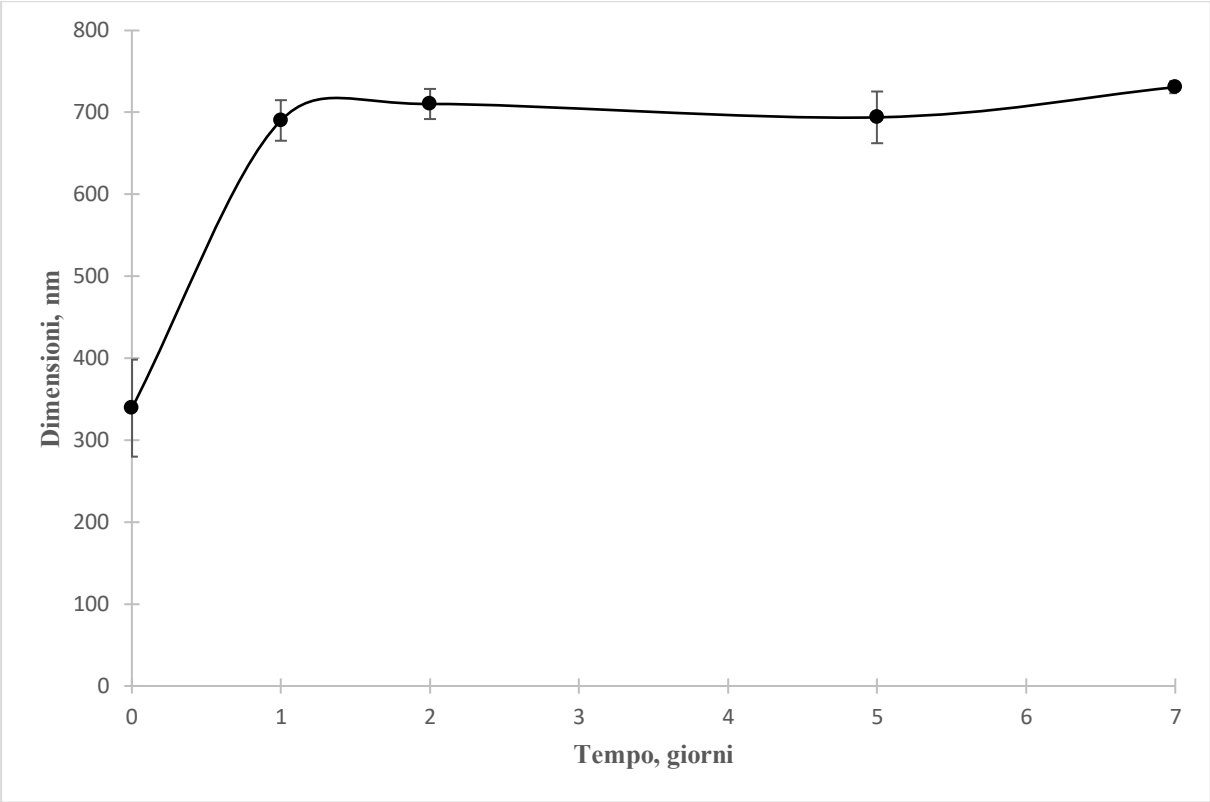

Figura 4.4: Dimensione medie delle nanoparticelle in funzione del tempo. Barre d'errore relative alle dimensioni valutate tramite deviazione standard.

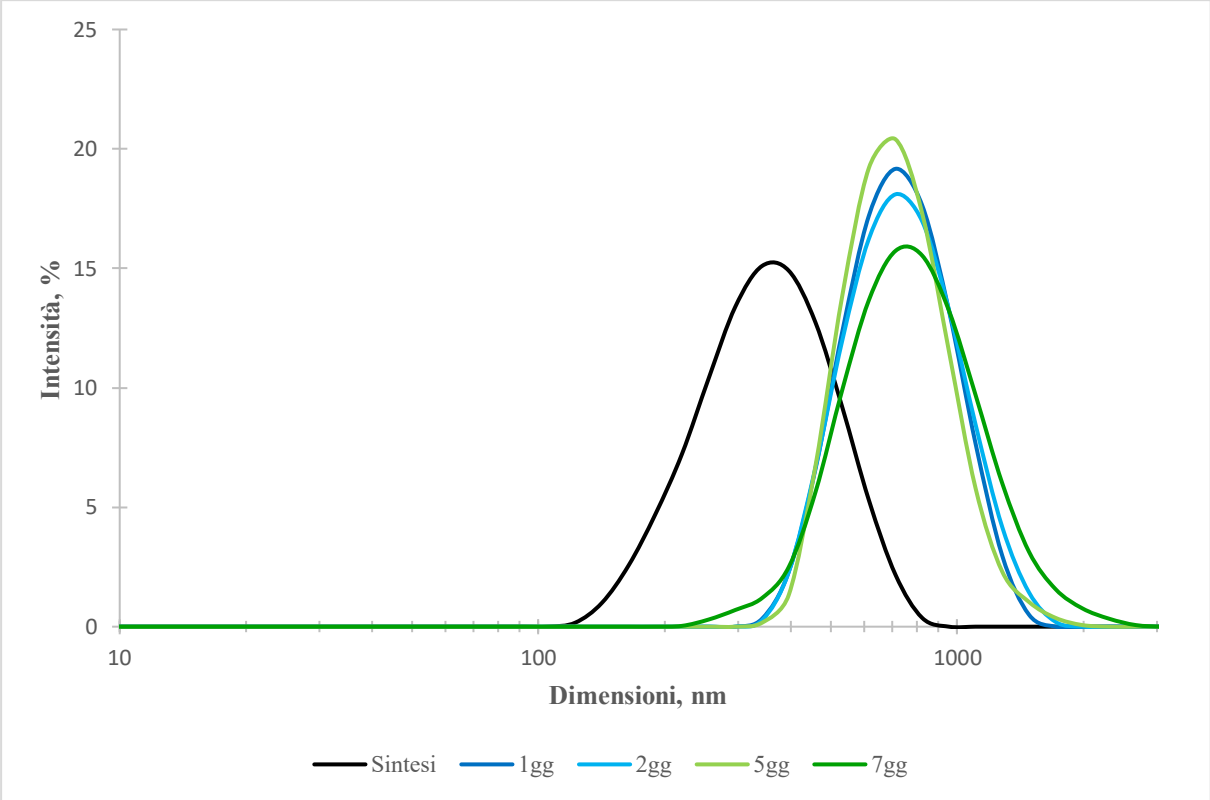

Figura 3.5: Curve PSD di uno stesso campione di nanoparticelle (concentrazione di chitosano 0,5 mg/mL, soluzione di solfato di sodio 0,5 M) dal momento della sintesi, fino a una settimana di distanza.

Come si può notare da grafici e tabelle sopra riportati, le misure hanno evidenziato un forte processo di crescita che porta le nanoparticelle, che al termine della sintesi avevano dimensioni medie di circa 300 nm, ad assumere dimensioni medie che variano fino a oltre 600 nm nell'arco delle 24 ore successive, per poi portarsi asintoticamente intorno ai 700 nm.

Per cercare di ridurre questo fenomeno sono state condotte delle prove nelle quali è stato eseguito un *quench* simile a quello che si conduce durante la sintesi di nanoparticelle con il CIJM. I campioni ottenuti in queste prove, i cui risultati sono stati precedentemente esposti nel paragrafo 3.1.6., sono stati conservati e monitorati nell'arco di una settimana dalla sintesi per valutarne la stabilità. A tale scopo una serie dei campioni è stata mantenuta a temperatura ambiente, mentre un'altra serie di campioni provenienti da prove analoghe è stata conservata in frigorifero, a 5°C circa. Le Figure 3.6 e 3.7 riportano l'andamento dei campioni conservati a temperatura ambiente, mentre la Figura 3.8 riporta l'andamento di quelli mantenuti a 5°C. La Tabella 3.9 elenca le dimensioni e i PDI di tutte le prove al momento della sintesi, dopo un giorno e a distanza di una settimana. Infine la Figura 3.9 presenta il confronto tra le due modalità di conservazione riferito ad una specifica prova con *quench ratio* pari a 3:1.

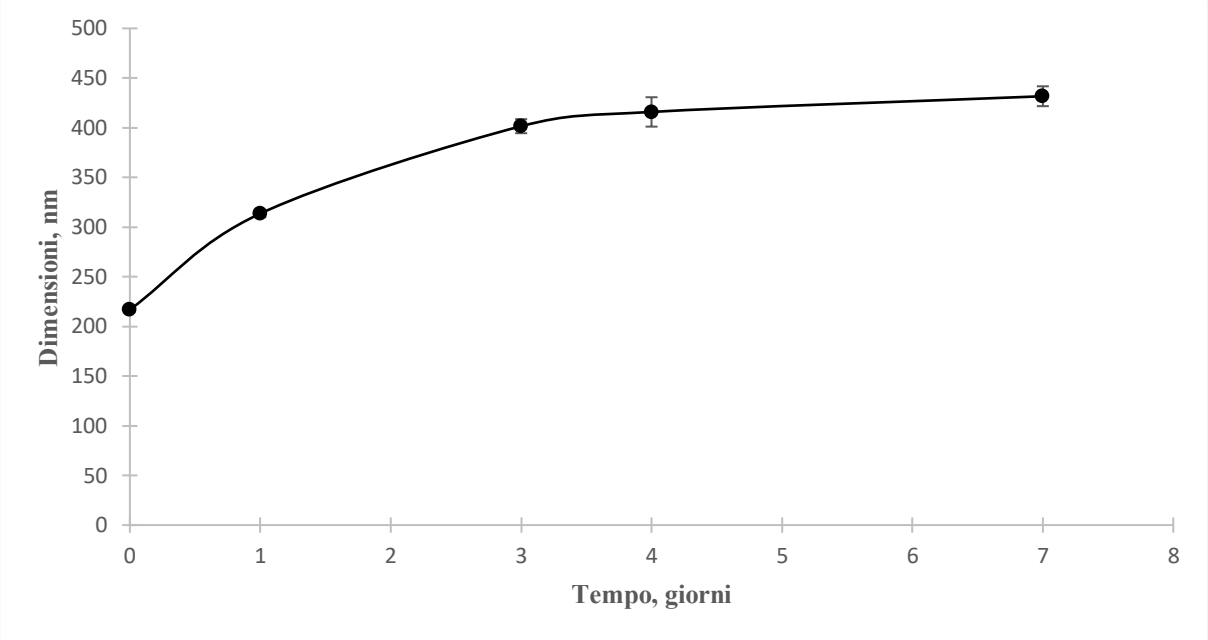

Figura 5.6: Dimensioni medie delle nanoparticelle conservate a temperatura ambiente (concentrazione di chitosano 0,5 mg/mL; soluzione di solfato di sodio 0,5 M; *quench ratio* 3:1) in funzione del tempo. Barre d'errore relative alle dimensioni valutate tramite deviazione standard.

Tabella 3.9: Dimensioni medie e PDI delle nanoparticelle conservate sia a temperatura ambiente che a 5°C al momento della sintesi, il giorno seguente ed a distanza di una settimana.

Quench e conservazione	D, nm			PDI		
	sintesi	1 giorno dopo	7 giorni dopo	sintesi	1 giorno dopo	7 giorni dopo
1:1, a T_{amb}	221,9	535,4	606,3	0,238	0,063	0,042
2:1, a T_{amb}	207,8	421,1	519,7	0,321	0,100	0,054
3:1, a T_{amb}	203,1	313,6	431,7	0,374	0,121	0,100
1:1, a 5°C	229,2	638,9	657,2	0,246	0,046	0,086
2:1, a 5°C	191,0	496,6	546,8	0,353	0,067	0,137
3:1, a 5°C	175,6	369,3	450,2	0,455	0,105	0,096

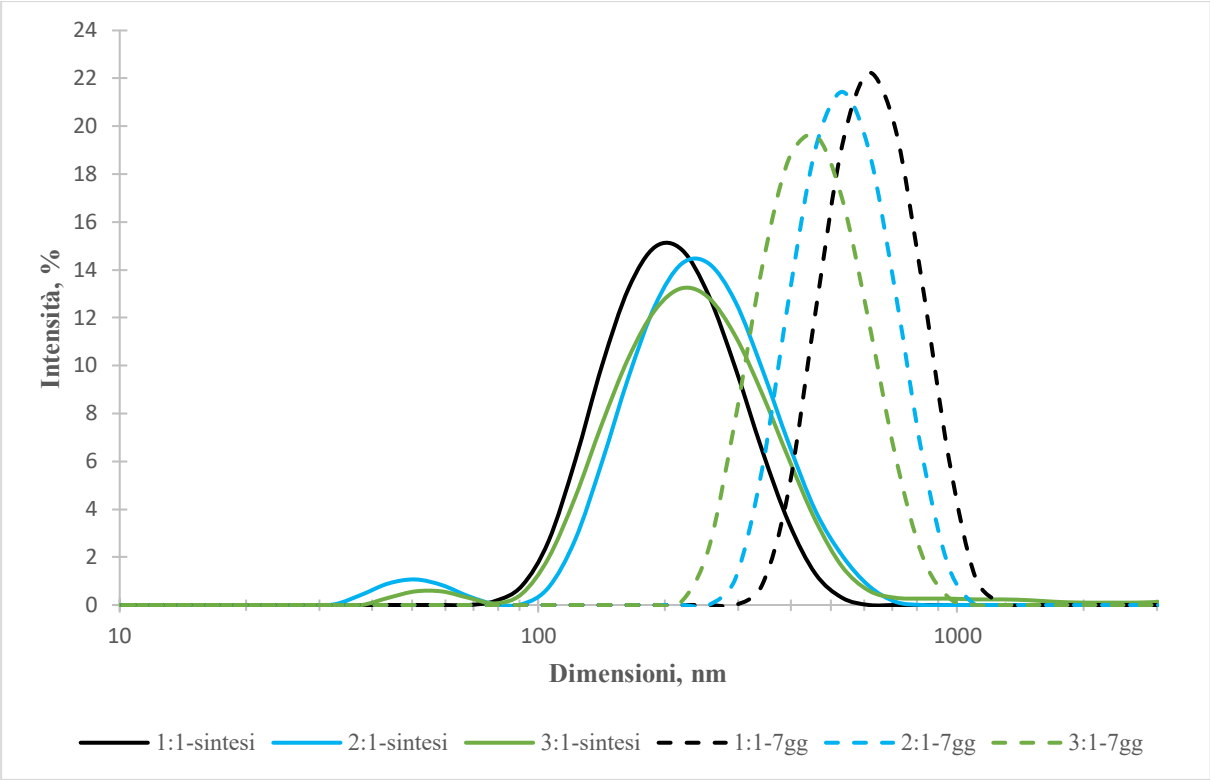

Figura 3.7: Curve PSD dei campioni di nanoparticelle (concentrazione di chitosano 0,5 mg/mL, soluzione di solfato di sodio 0,5 M) con *quench ratio* 1:1, 2:1 e 3:1 al momento della sintesi e ad una settimana di distanza, conservati a temperatura ambiente.

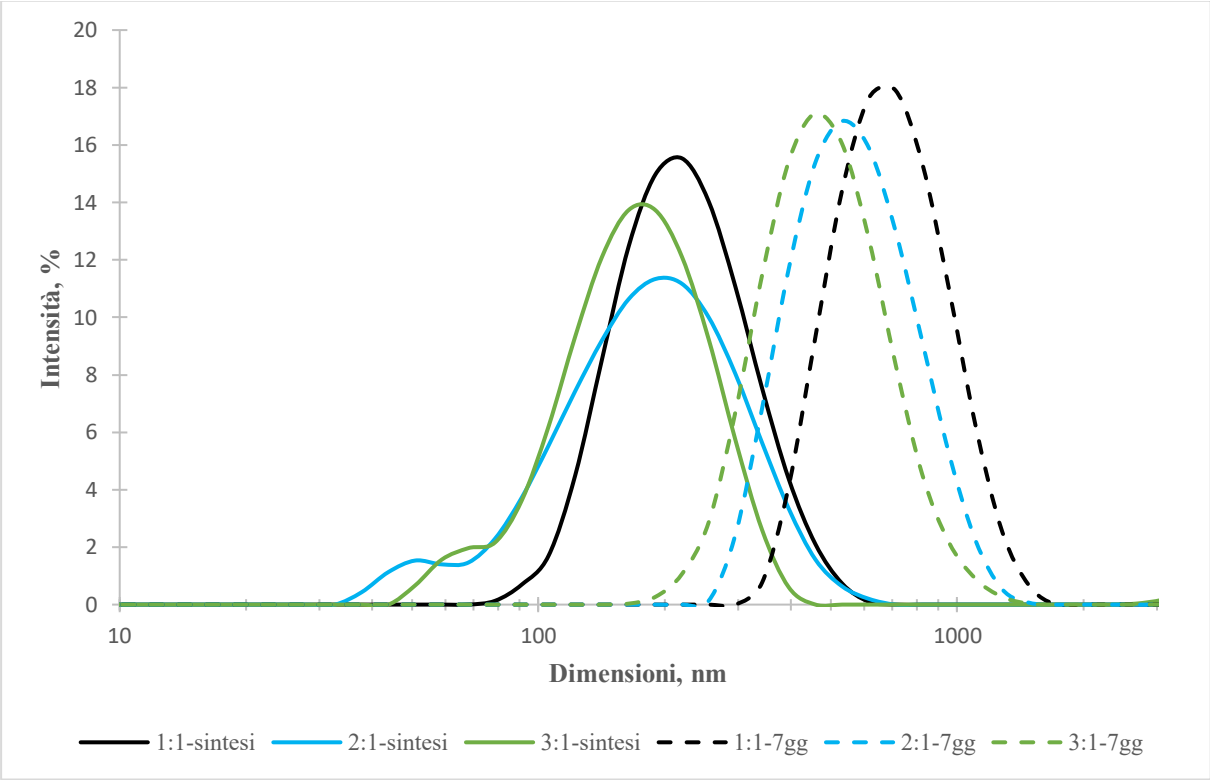

Figura 3.8: Curve PSD dei campioni di nanoparticelle (concentrazione di chitosano 0,5 mg/mL, soluzione di solfato di sodio 0,5 M) con *quench ratio* 1:1, 2:1 e 3:1 al momento della sintesi e ad una settimana di distanza, conservati in frigorifero a 5°C circa.

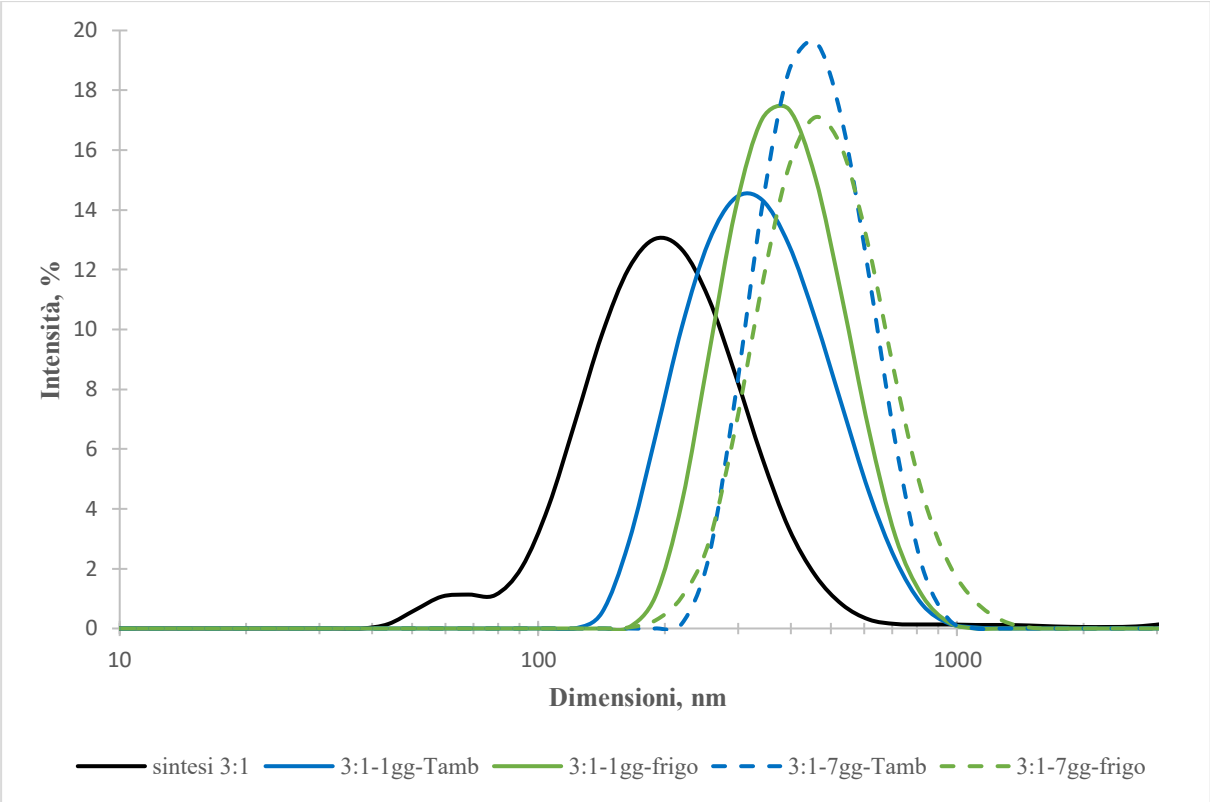

Figura 3.9: Confronto tra le curve PSD del campione di nanoparticelle (concentrazione di chitosano 0,5 mg/mL, soluzione di solfato di sodio 0,5 M) con *quench ratio* 3:1 conservato a temperatura ambiente e quello conservato a 5°C al momento della sintesi e ad una settimana di distanza.

Dalla tabella e dai grafici precedentemente mostrati è possibile notare che, al momento della sintesi, le nanoparticelle hanno dimensioni medie intorno ai 200 nm, con valori inferiori all'aumentare del *quench ratio*. A distanza di un giorno si rileva un forte aumento di dimensioni; tuttavia, in questo caso, maggiore è il rapporto di *quench* più l'aumento del diametro delle nanoparticelle è contenuto. Dal momento della sintesi al primo giorno si osserva un incremento di oltre 200 nm nella dimensione media delle nanoparticelle, mentre nei giorni successivi la crescita delle particelle è molto ridotta, al di sotto dei 100 nm. Anche il PDI varia maggiormente nelle prime 24 ore dalla sintesi riducendosi da 0,3 circa a 0,1 circa per poi assestarsi intorno a quest'ultimo valore nei giorni successivi.

In particolare, dalla Figura 3.9, si evince che la conservazione in frigorifero rispetto a quella a temperatura ambiente non comporta un miglioramento significativo in termini di stabilità. A distanza di sette giorni, infatti, le curve di distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle conservate nelle due diverse modalità sono pressoché sovrapposte. Il prodotto non necessita, quindi, di essere conservato in frigorifero al fine di preservarne la stabilità.

Si può inoltre concludere che introducendo il *quench* si possono raggiungere dimensioni medie pari a 450-650 nm dopo una settimana dalla sintesi in funzione del *quench ratio* impiegato. Maggiore è il *quench ratio*, minore è l'incremento di diametro delle nanoparticelle. In questo modo si riesce a contenere la crescita dei nanovettori, che diversamente assumerebbero dimensioni medie intorno ai 750 nm a distanza di sette giorni dalla sintesi.

Poiché il *quench* non è altro che una tempestiva diluizione del prodotto, si è pensato, infine, di ridurre la concentrazione di chitosano in alimentazione, così da "diluire" la corrente in ingresso. Una volta condotte le prove di sintesi delle nanoparticelle a concentrazione di

chitosano pari a 0.5 mg/mL o a 0.05 mg/mL, è stata valutata la stabilità dei campioni nell'arco di una settimana (Tabella 3.10 e Figura 3.10).

Tabella 3.10: Dimensioni medie e PDI delle nanoparticelle prodotte con concentrazione di chitosano pari a 0,5 mg/mL e pari a 0,05 mg/mL, dal momento della sintesi fino ad una settimana di distanza.

	0,5 mg/mL			**0,05 mg/mL**		
	D, nm	**DEV D, nm**	**PDI**	**D, nm**	**DEV D, nm**	**PDI**
Sintesi	339,1	59,2	0,140	174,9	10,2	0,157
1 giorno dopo	690,2	24,8	0,084	302,2	3,4	0,061
2 giorni dopo	710,3	18,4	0,068	310,6	1,4	0,011
5 giorni dopo	693,9	31,5	0,067	317,3	6,9	0,064
7 giorni dopo	730,8	7,3	0,144	315,0	4,4	0,024

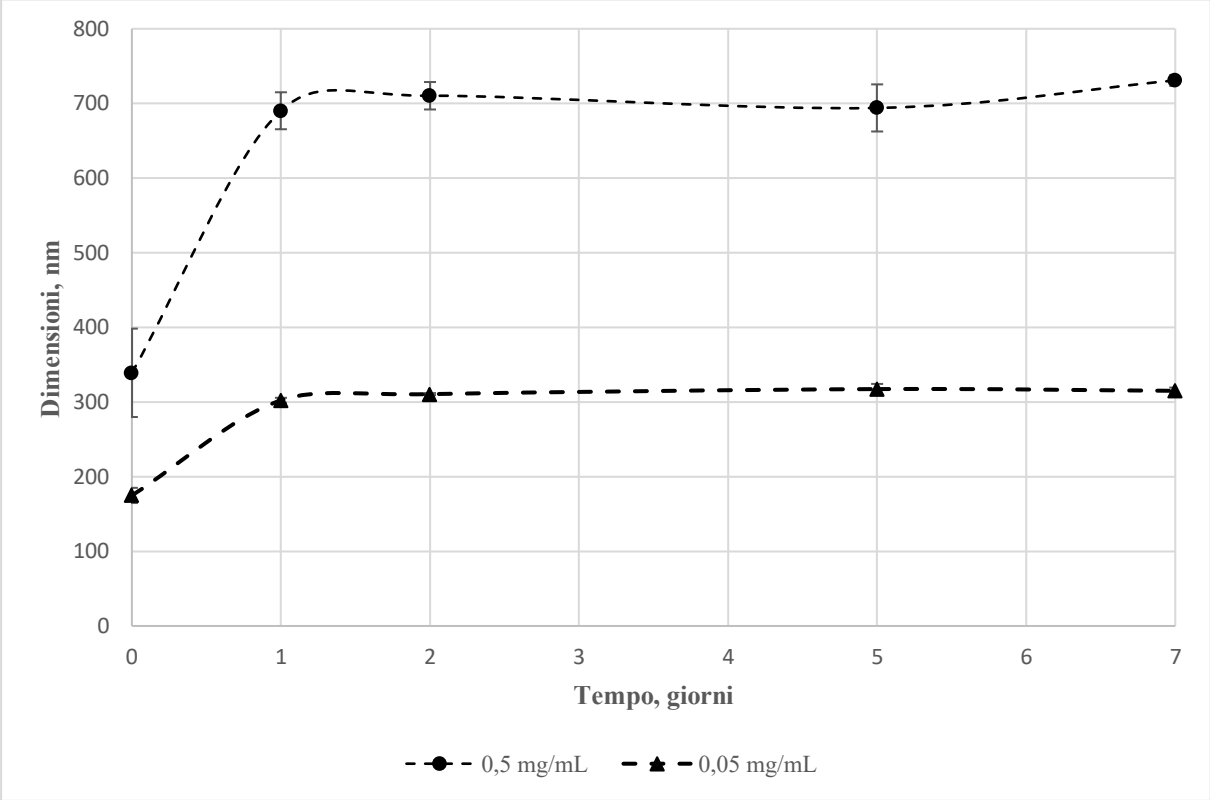

Figura 6.10: Dimensioni medie delle nanoparticelle prodotte con concentrazione di chitosano pari a 0,5 mg/mL e pari a 0,05 mg/mL in funzione del tempo. Barre d'errore relative alle dimensioni valutate tramite deviazione standard.

Dai risultati ottenuti si osserva che la diluizione della corrente di alimentazione da una concentrazione pari a 0,5 mg/mL a 0,05 mg/mL, permette di mantenere dopo sette giorni dimensioni di poco superiori rispetto a quelle ottenute alla sintesi.

Possiamo quindi concludere che, al fine di produrre nanoparticelle stabili aventi dimensioni ridotte, occorre operare con concentrazioni molto basse di chitosano in alimentazione.

3.2. Studio del processo di sintesi delle nanoparticelle con il CIJM

Con le stesse finalità della sperimentazione fatta con l'agitatore *Vortex*, sono state condotte molteplici prove sperimentali impiegando il *Confined Impinging Jets Mixer* (CIJM). In particolare, in questo lavoro di Tesi, è stato valutato l'impiego di due tipologie di chitosano: ad alto e a basso peso molecolare. Le condizioni operative che il sistema permette di variare, una volta decisa la tipologia di chitosano, sono:

- concentrazione di chitosano all'interno della corrente di alimentazione al reattore,
- portata dell'alimentazione,
- *quench ratio*.

Sono quindi stati studiati gli effetti di ciascun tipo di variabile operativa sulle dimensioni e sul potenziale zeta delle nanoparticelle prodotte.

3.2.1. Effetto della concentrazione di chitosano sulla dimensione delle nanoparticelle

Per valutare l'effetto della concentrazione di chitosano in alimentazione sono state svolte prove in condizioni costanti di portata in ingresso, pari a 100 ml/min, e *quench ratio* 1:1. Tali valori sono stati scelti sulla base di studi precedentemente condotti su questa tipologia di *mixer* che indicano come portate ottimali quelle comprese tra i 60 e i 120 mL/min ed adottano *quench* 1:1 (Lince et al., 2009; Zelenková et al., 2018). Sono state testate, quindi, diverse concentrazioni di chitosano a basso peso molecolare: 0.5, 1, 2 e 5 mg/mL.

Di seguito vengono riportati i risultati relativi a queste prove (Tabella 3.11, Figura 3.11, Figura 3.12).

Tabella 3.11: Dimensioni medie delle nanoparticelle prodotte con rispettiva deviazione standard e PDI.

Concentrazione, mg/mL	D, nm	DEV D, nm	PDI
0,5	446,5	1,9	0,048
1	466,3	8,2	0,057
2	571,4	120,3	0,129
5	967,5	255,5	0,316

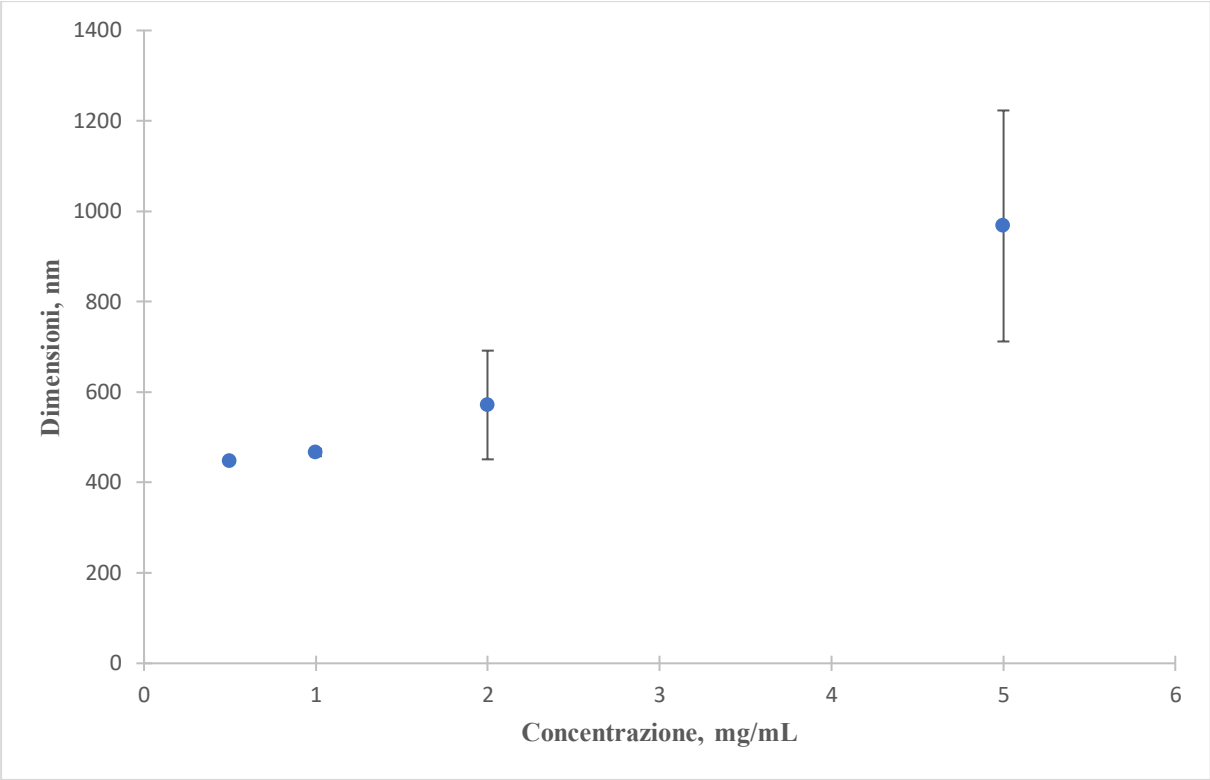

Figura 7.11: Dimensioni medie delle nanoparticelle prodotte in funzione della concentrazione di chitosano in alimentazione. Barre d'errore relative alle dimensioni valutate tramite deviazione standard.

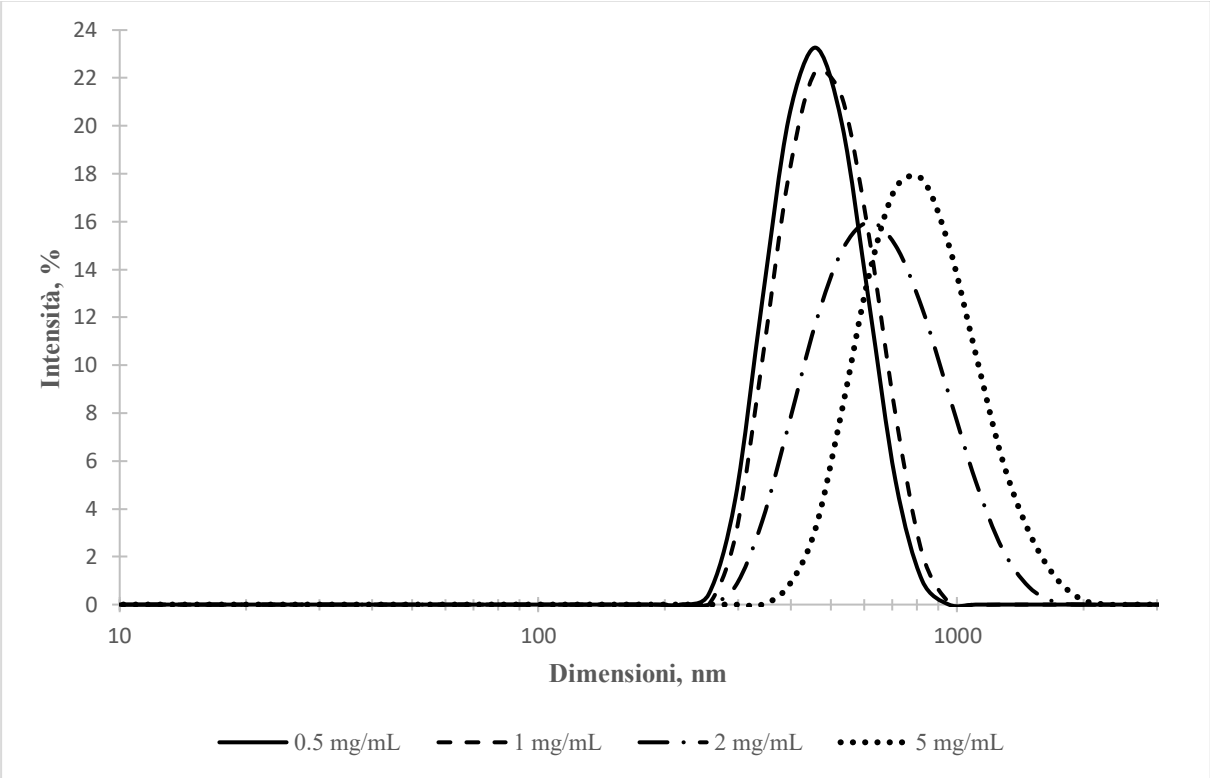

Figura 8.12: Curve PSD delle nanoparticelle prodotte al variare della concentrazione di chitosano in alimentazione.

Risulta evidente come l'aumento della concentrazione di chitosano nella corrente di alimentazione determini un incremento della dimensione media e della polidispersità (PDI) delle nanoparticelle. Le curve di distribuzione delle dimensioni delle nanosfere, aumentando la concentrazione di chitosano, sono sempre più spostate verso dimensioni maggiori e tendono ad essere più larghe, indicando così anche l'incremento del PDI.

3.2.2. Effetto della portata alimentata sulla dimensione delle nanoparticelle

L'effetto della portata dell'alimentazione è stato studiato mediante prove effettuate a condizioni costanti di concentrazione di chitosano in ingresso e *quench ratio* (concentrazione 0.5 mg/mL, chitosano a basso peso molecolare; *quench* 1:1), ma impostando, tramite la pompa ad infusione, una portata pari a 40, 60, 80, 100 o 120 mL/min.

Nella Tabella 3.12 e nelle Figure 3.13 e 3.14 si riassumono i risultati ottenuti.

Tabella 3.12: Dimensioni medie delle nanoparticelle prodotte con rispettiva deviazione standard e PDI.

Portata (mL/min)	D, nm	DEV D, nm	PDI
40	413,9	0,1	0,079
60	407,9	10,6	0,059
80	415,1	30,1	0,029
100	446,5	1,9	0,048
120	447,6	21,3	0,059

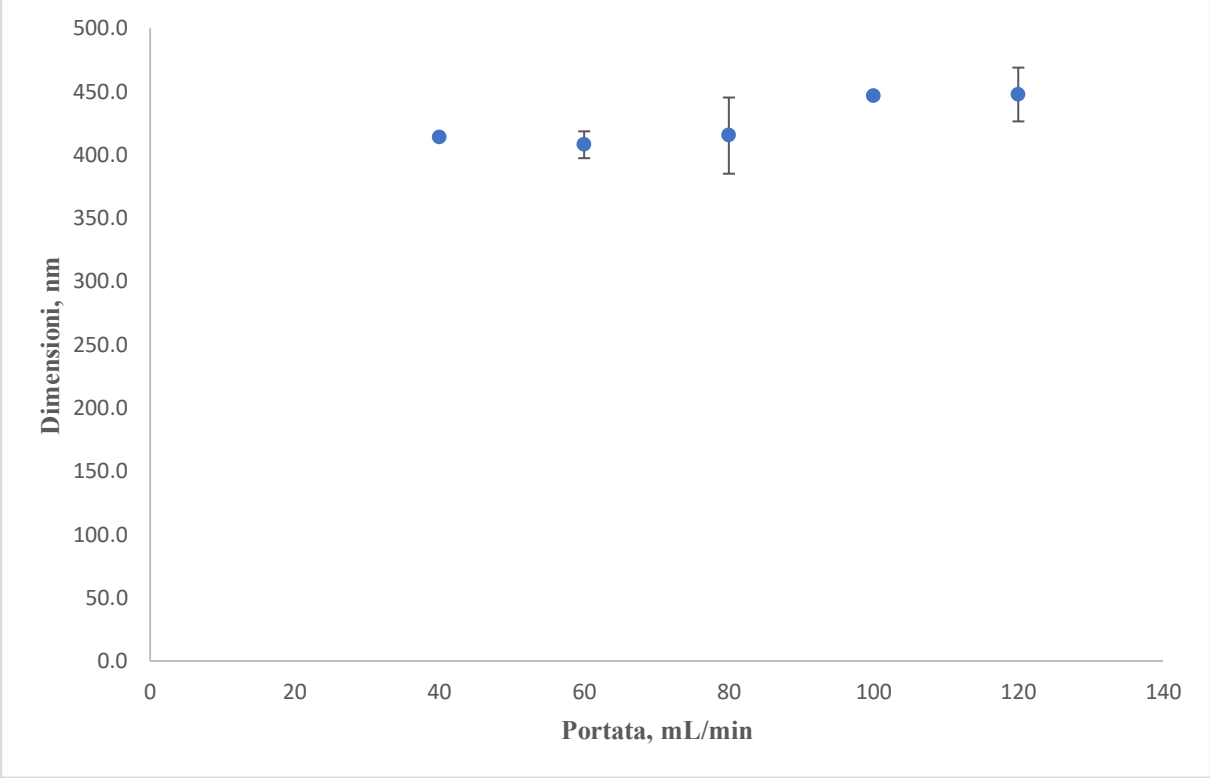

Figura 9.13: Dimensioni medie delle nanoparticelle prodotte in funzione della portata di alimentazione. Barre d'errore relative alle dimensioni valutate tramite deviazione standard.

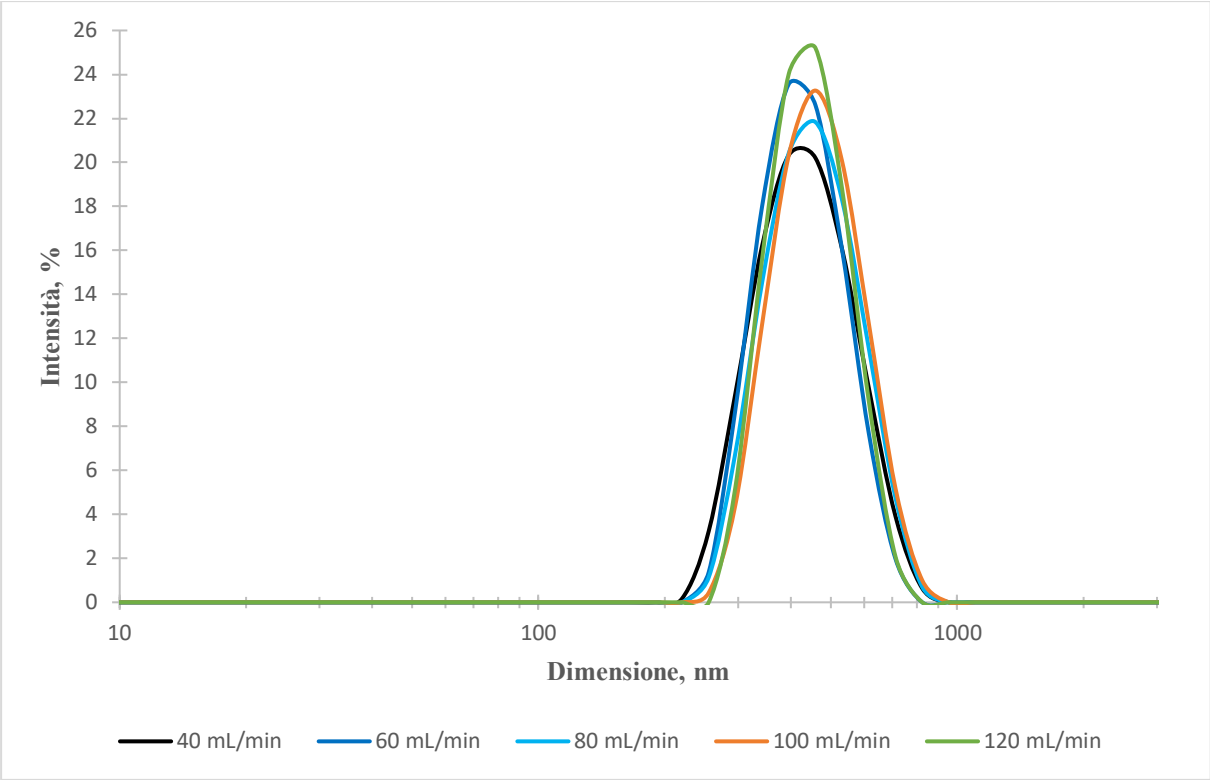

Figura 10.14: Curve PSD delle nanoparticelle prodotte al variare della concentrazione di chitosano in alimentazione.

Come si può facilmente notare in Figura 3.14, l'effetto della portata è pressoché nullo. I valori medi di diametro idrodinamico si collocano sempre tra i 400 e i 450 nm. La variazione molto ridotta non permette di identificare un andamento preciso della dimensione delle particelle in funzione della portata alimentata.

Il medesimo set di prove è stato ripetuto anche per differenti concentrazioni di chitosano a basso peso molecolare (1 mg/ml e 2 mg/mL) e ad alto peso molecolare (1 mg/mL), confermando le conclusioni precedentemente espresse. Per completezza se ne riportano di seguito brevemente i risultati in Tabella 3.13.

Tabella 3.13: Dimensioni medie delle nanoparticelle prodotte e rispettivi PDI.

	D, nm				PDI			
Portate (mL/min)	**0.5 mg/mL**	**1 mg/mL**	**2 mg/mL**	**1 mg/mL, Alto P.M.**	**0.5 mg/mL**	**1 mg/mL**	**2 mg/mL**	**1 mg/mL, Alto P.M.**
40	413,9	461,8	644,3	290,9	0,079	0,071	0,254	0,320
60	407,9	433,5	568,8	313,9	0,059	0,051	0,252	0,350
80	415,1	559,9	624,0	298,2	0,029	0,114	0,163	0,371
100	446,5	466,3	571,4	293,4	0,048	0,057	0,129	0,379
120	447,6	429,2	478,0	295,3	0,059	0,066	0,140	0,404

3.2.3. Effetto del *quench ratio* sulla dimensione delle nanoparticelle

Per valutare l'effetto del *quench ratio* sulla dimensione delle nanosfere sono state effettuate delle prove a condizioni costanti di portata in ingresso e concentrazione di chitosano in alimentazione (portata 100 mL/min; concentrazione di chitosano 0.5 mg/mL, basso P.M.), ma con *quench ratio* pari a 1:1, 2:1 o 3:1 (numero di parti di acqua di diluizione per ciascuna parte di prodotto).

Si riportano i risultati ottenuti nella Tabella 3.14 e nelle Figure 3.15 e 3.16.

Tabella 3.14: Dimensioni medie delle nanoparticelle prodotte con rispettiva deviazione standard e PDI.

Quench ratio	**D, nm**	**DEV D, nm**	**PDI**
1:1	446,5	1,9	0,048
2:1	313,8	11,8	0,023
3:1	279,9	0,3	0,025

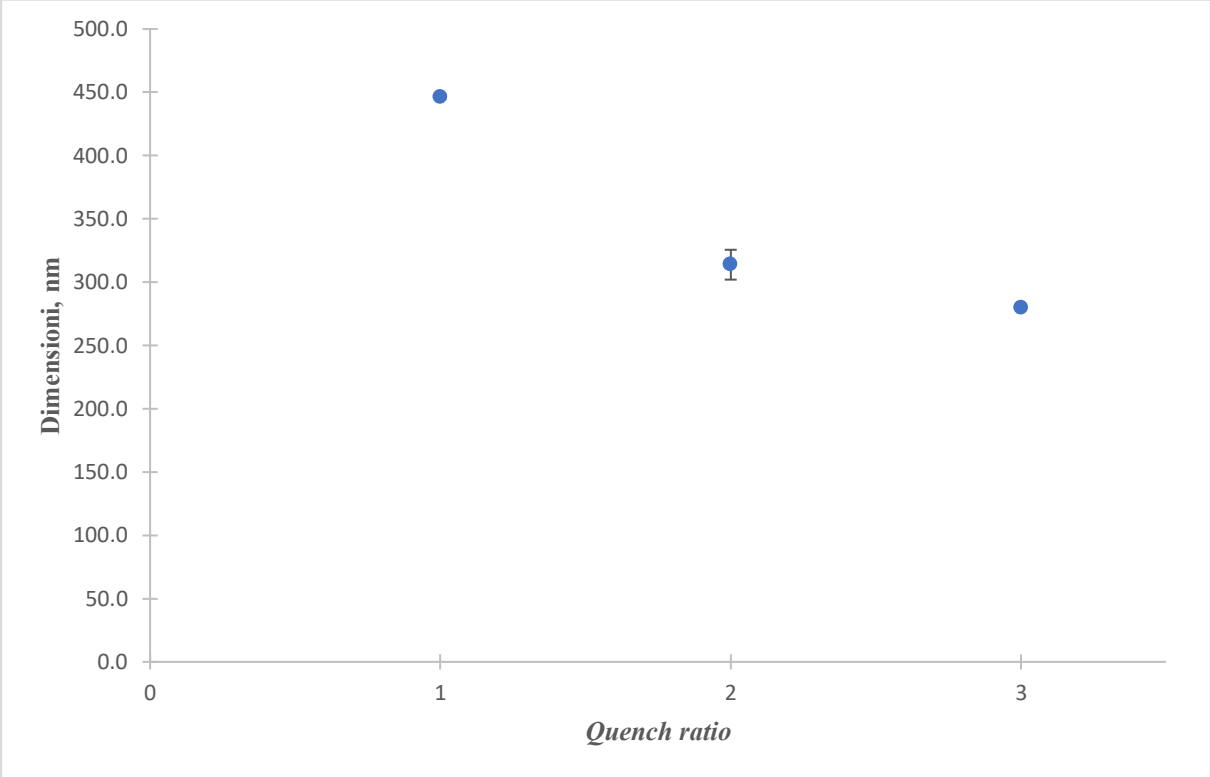

Figura 11.15: Dimensioni medie delle nanoparticelle prodotte in funzione *quench ratio* adottato. Barre d'errore relative alle dimensioni valutate tramite deviazione standard.

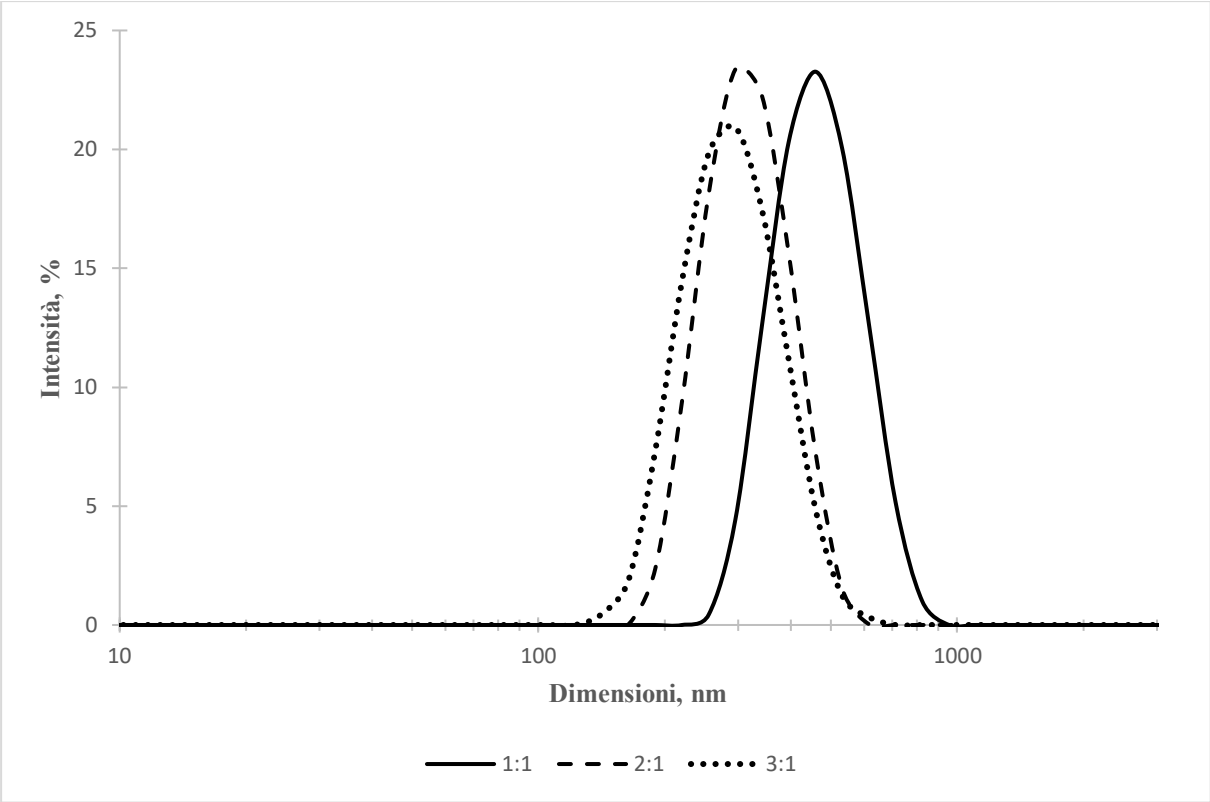

Figura 12.16: Curve PSD delle nanoparticelle prodotte al variare del *quench ratio* adottato.

Si può notare che maggiore è il *quench ratio*, ovvero la quantità di acqua di diluizione aggiunta alla corrente d'uscita, minore è la dimensione media delle particelle. Non si possono trarre invece conclusioni relative all'indice di polidispersità in quanto le variazioni sono minime.

Il medesimo set di prove è stato ripetuto anche per differenti concentrazioni di chitosano a basso peso molecolare (1 mg/ml e 2 mg/mL) e ad alto peso molecolare (1 mg/mL), confermando le conclusioni precedentemente espresse. Per completezza si riportano di seguito brevemente i risultati in Tabella 3.15.

Tabella 3.15: Dimensioni medie delle nanoparticelle prodotte e rispettivi PDI.

	D, nm				**PDI**			
Quench ratio	**0.5 mg/mL**	**1 mg/mL**	**2 mg/mL**	**1 mg/mL, Alto P.M.**	**0.5 mg/mL**	**1 mg/mL**	**2 mg/mL**	**1 mg/mL, Alto P.M.**
1:1	446,5	466,3	571,4	293,4	0,048	0,057	0,129	0,379
2:1	313,8	428,9	531,2	278,3	0,023	0,068	0,088	0,337
3:1	279,9	372,2	397,1	280,2	0,025	0,048	0,091	0,303

3.2.4. Effetto della tipologia di chitosano sulla dimensione delle nanoparticelle

Per confrontare le due tipologie di chitosano utilizzate, ad alto e a basso peso molecolare, è stato scelto un *quench ratio* sempre pari a 1:1 e la concentrazione di chitosano è stata mantenuta pari a 1 mg/mL. La Tabella 3.16 e la Figura 3.17 permettono quindi di paragonare i risultati ottenuti con i due tipi di chitosano disponibili.

Tabella 3.16: Dimensioni medie delle nanoparticelle prodotte con rispettiva deviazione standard e PDI.

	Basso P.M.			**Alto P.M.**		
Portate (mL/min)	**D, nm**	**DEV D, nm**	**PDI**	**D, nm**	**DEV D, nm**	**PDI**
40	461,8	9,1	0,071	290,9	1,3	0,320
60	433,5	7,5	0,051	313,9	32,6	0,350
80	559,9	19,2	0,114	298,2	0,6	0,371
100	466,3	8,2	0,057	293,4	10,8	0,379
120	429,2	50,3	0,066	295,3	0,9	0,404

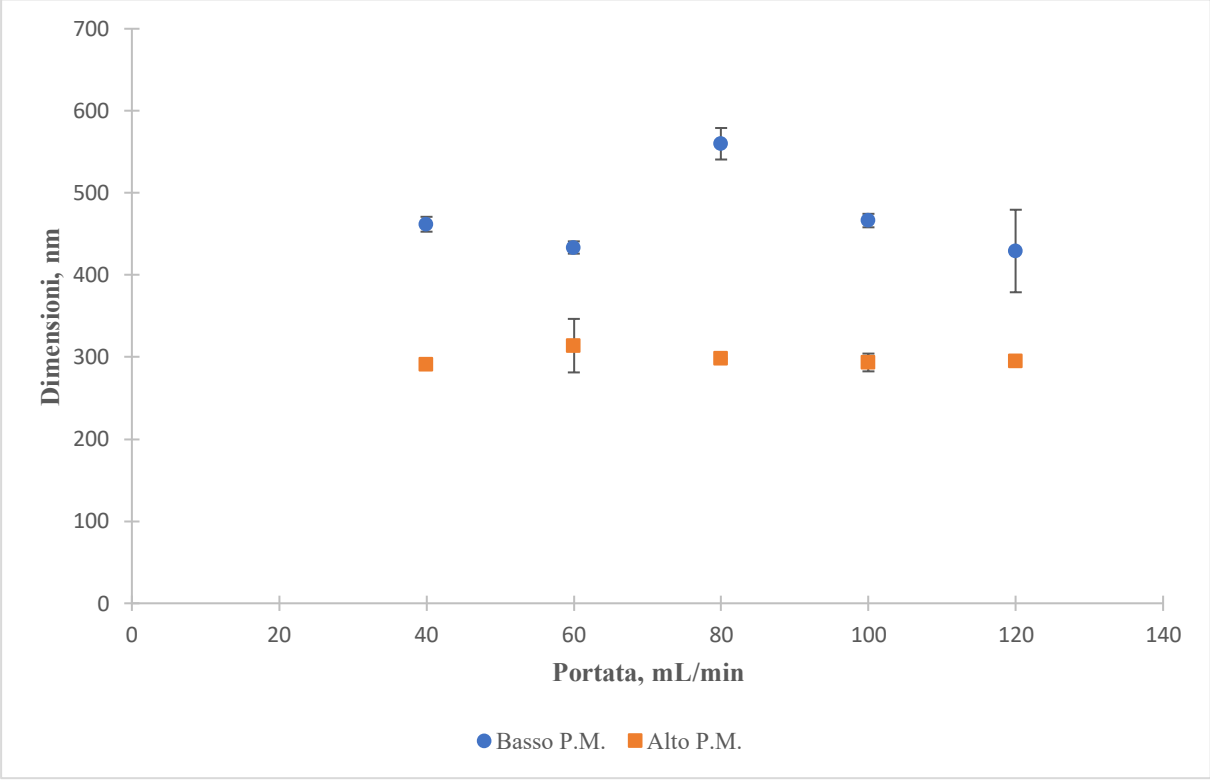

Figura 13.17: Dimensioni medie delle nanoparticelle prodotte con chitosano a basso e ad alto peso molecolare in funzione della portata. Barre d'errore relative alle dimensioni valutate tramite deviazione standard.

Come evidenziato nel paragrafo 3.2.2., la portata non ha un'incidenza sulla dimensione e sulla polidispersità delle nanoparticelle prodotte. Tuttavia, è facilmente riscontrabile che l'impiego di chitosano ad alto peso molecolare consente il raggiungimento di dimensioni medie delle nanoparticelle fino a 200 nm inferiori, ma con PDI più elevato.

In secondo luogo sono state condotte prove a portata costante, pari a 100 mL/min, e concentrazione costante, pari a 1 mg/mL, facendo variare il *quench ratio* e la tipologia di chitosano impiegata. La Tabella 3.17 e le Figure 3.18 e 3.19 permettono confrontare i risultati ottenuti con i due tipi di reagente a disposizione.

Tabella 3.17: Dimensioni medie delle nanoparticelle prodotte con rispettiva deviazione standard e PDI.

	Basso P.M.			**Alto P.M.**		
Quench ratio	**D, nm**	**DEV D, nm**	**D, nm**	**DEV D, nm**	**D, nm**	**DEV D, nm**
1:1	466,3	8,2	0,057	293,4	10,8	0,379
2:1	428,9	24,3	0,068	278,3	1,6	0,337
3:1	372,2	54,1	0,048	280,2	2,4	0,303

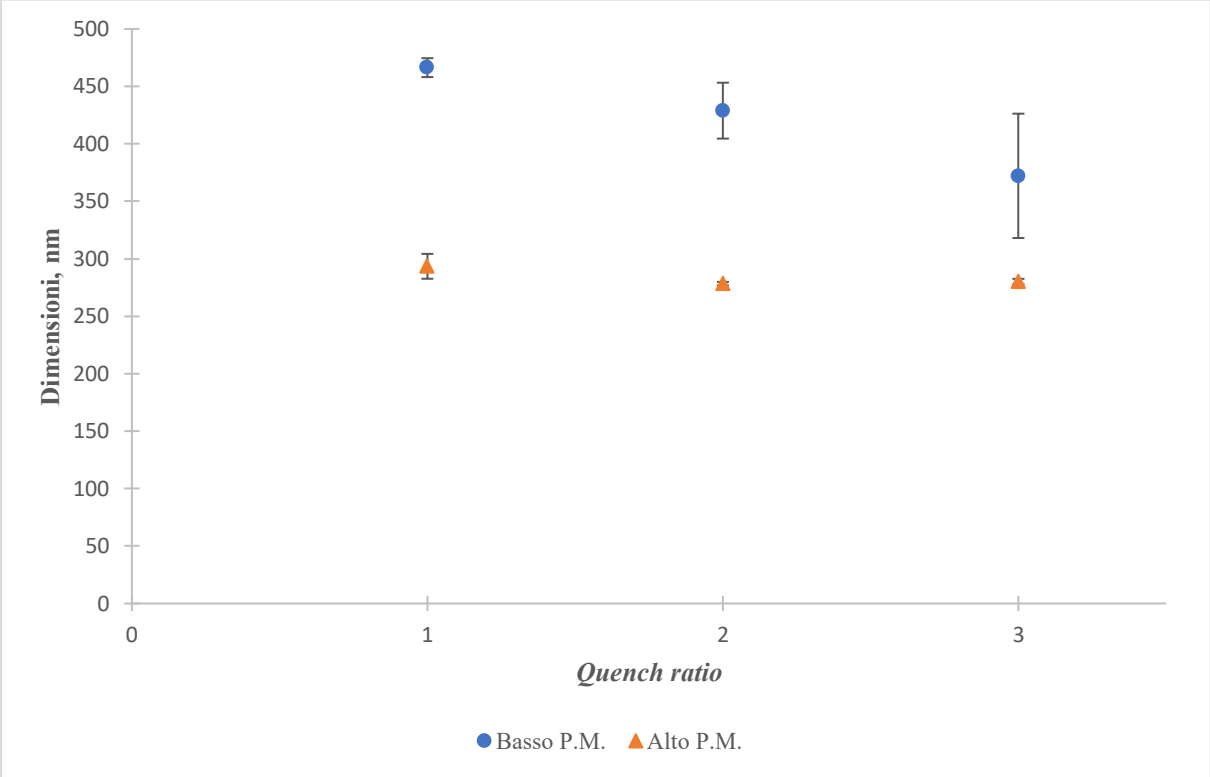

Figura 14.18: Dimensioni medie delle nanoparticelle prodotte con chitosano a basso e ad alto peso molecolare in funzione del *quench ratio* adottato. Barre d'errore relative alle dimensioni valutate tramite deviazione standard.

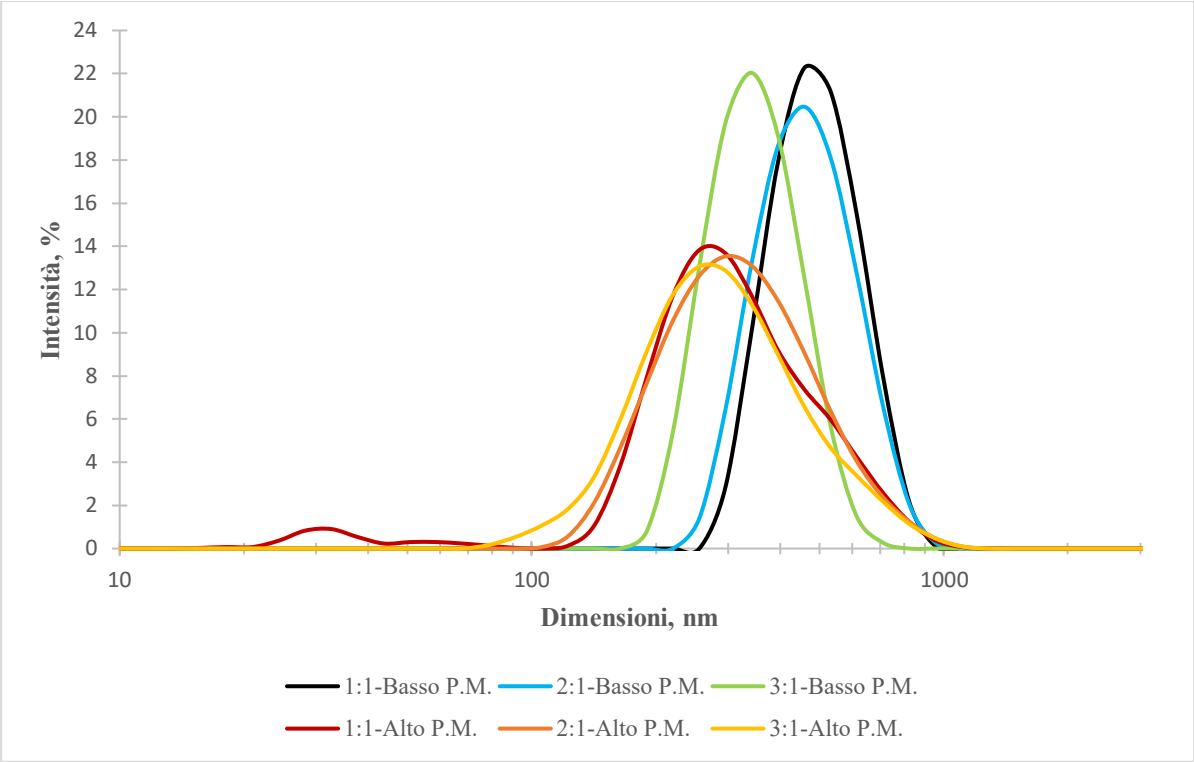

Figura 15.19: Curve PSD delle nanoparticelle prodotte al variare del *quench ratio* adottato e della tipologia di chitosano scelta.

Dai risultati emerge, quindi, che l'azione di *quench* porta sempre ad una riduzione delle dimensioni medie delle particelle, più marcata quando si impiega chitosano a basso peso molecolare. Inoltre, è ancora una volta facilmente visibile come, passando da chitosano a basso peso molecolare a chitosano alto peso molecolare, la curva di distribuzione tenda a spostarsi verso dimensioni inferiori e tenda ad avere un picco meno marcato dovuto alla maggiore polidispersità.

3.2.5. Effetto delle variabili operative sul potenziale zeta

Per ogni misura di dimensioni condotta tramite DLS è stata effettuata anche una misura del potenziale zeta in modo da valutare indirettamente la carica superficiale delle nanoparticelle. In generale si può affermare che non si nota alcuna correlazione tra concentrazione e/o tipologia di chitosano in alimentazione, portata in ingresso e *quench ratio*.

Questo tipo di misurazione presenta un intervallo di errore talvolta molto elevato rispetto a quello che è il valore rilevato. Complessivamente, è stato ottenuto un valore di potenziale zeta che varia tra i 5 e gli 11 mV.

Nella Tabella 3.18 vengono riportati i risultati relativi alle prove condotte al variare della portata in ingresso, della concentrazione e della tipologia di chitosano in alimentazione. Nella Tabella 3.19 vengono, invece, riassunti i risultati delle prove svolte variando il *quench ratio*, la concentrazione e tipologia di chitosano in ingresso al microreattore.

Tabella 3.18: Potenziale zeta delle nanoparticelle prodotte, con rispettive deviazioni standard, variando portata d'ingresso, concentrazione e tipologia di chitosano.

	Basso P.M.						Alto P.M.	
Portate, mL/min	**Potenziale Zeta, mV**	**DEV Potenziale Zeta, mV**	**Potenziale Zeta, mV**	**DEV Potenziale Zeta, mV**	**Potenziale Zeta, mV**	**DEV Potenziale Zeta, mV**	**Potenziale Zeta, mV**	**DEV Potenziale Zeta, mV**
	0.5 mg/mL	**0.5 mg/mL**	**1 mg/mL**	**1 mg/mL**	**2 mg/mL**	**2 mg/mL**	**1 mg/mL**	**1 mg/mL**
40	8,78	0,52	8,43	0,45	9,62	1,44	7,50	0,46
60	5,96	1,82	8,17	1,78	9,95	0,64	5,41	0,04
80	5,98	3,51	7,09	3,43	7,67	3,68	5,32	0,57
100	5,53	2,87	11,40	0,28	9,71	0,68	5,81	0,93
120	5,89	2,93	9,89	1,06	10,06	0,15	4,31	0,49

Tabella 3.19: Potenziale zeta delle nanoparticelle prodotte, con rispettive deviazioni standard, variando portata d'ingresso, concentrazione e tipologia di chitosano.

	Basso P.M.						Alto P.M.	
Quench ratio	**Potenziale Zeta, mV**	**DEV Potenziale Zeta, mV**	**Potenziale Zeta, mV**	**DEV Potenziale Zeta, mV**	**Potenziale Zeta, mV**	**DEV Potenziale Zeta, mV**	**Potenziale Zeta, mV**	**DEV Potenziale Zeta, mV**
	0.5 mg/mL	**0.5 mg/mL**	**1 mg/mL**	**1 mg/mL**	**2 mg/mL**	**2 mg/mL**	**1 mg/mL**	**1 mg/mL**
1:1	5,53	2,87	11,40	0,28	9,71	0,68	5,81	0,93
2:1	8,88	1,23	5,15	0,74	5,59	2,43	8,97	0,47
3:1	8,81	1,28	4,92	0,98	6,04	0,91	6,78	0,81

3.2.6. Stabilità delle nanoparticelle

Una volta completato lo studio dell'effetto delle singole variabili operative in gioco è stata valutata la stabilità nel tempo dei campioni prodotti. Sono stati monitorati i campioni a base di chitosano a basso peso molecolare in concentrazione 0.5 e 1 mg/mL ottenuti con portate tra i 40 e i 120 mL/min e *quench ratio* pari a 1:1.

La Figura 3.20, esemplificativa di tutte le altre condotte con chitosano a basso peso molecolare, riporta l'andamento della prova con concentrazione di chitosano pari a 1 mg/mL, ottenuta con portata 100 mL/min e *quench ratio* 1:1.

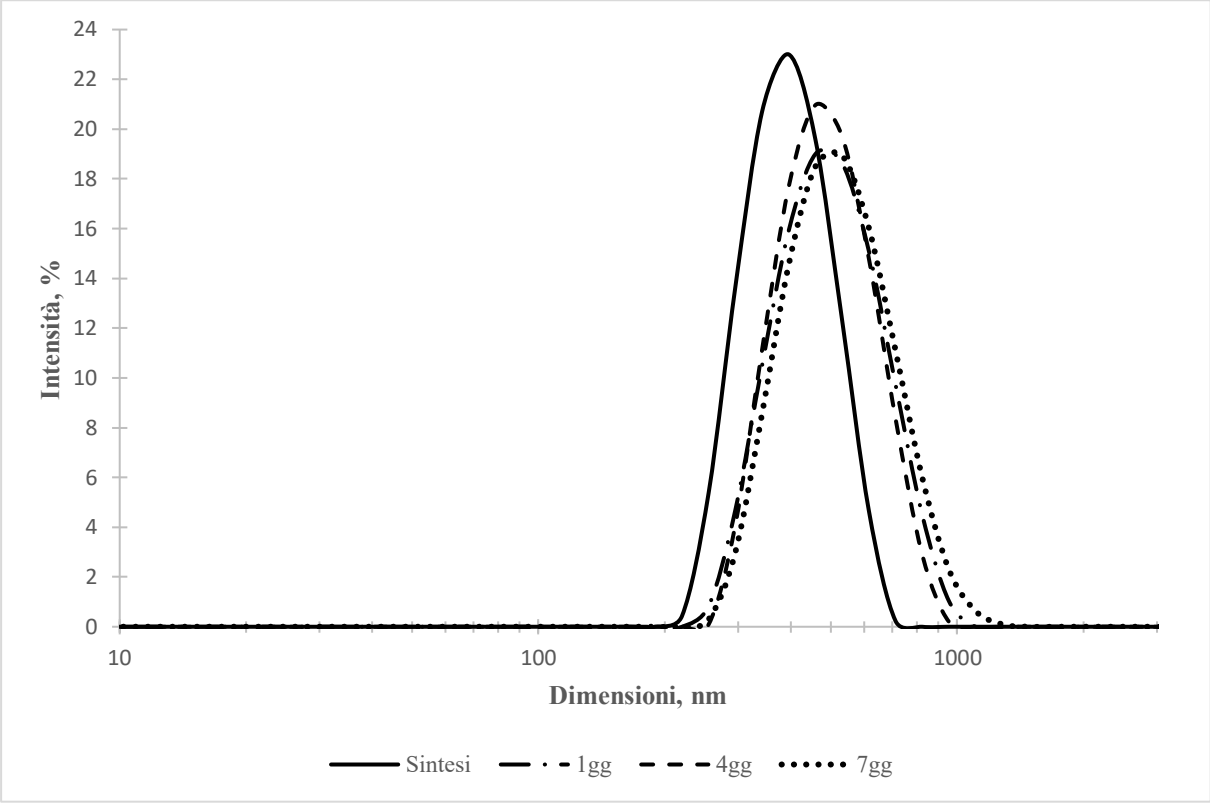

Figura 3.20: Curve PSD dei campioni di nanoparticelle (concentrazione di chitosano 1 mg/mL, basso peso molecolare, portata 100 mL/min, quench ratio 1:1) dal momento della sintesi ad una settimana di distanza.

Per permettere un ulteriore confronto tra tipologie di chitosano differenti, sono stati monitorati anche i campioni a base di chitosano ad alto peso molecolare in concentrazione 1 mg/mL ottenuti sempre con portate tra i 40 e i 120 mL/min e *quench ratio* pari a 1:1.

La Figura 3.21, esemplificativa, invece, di tutte le altre condotte con chitosano ad alto peso molecolare, riporta l'andamento della prova con concentrazione di chitosano nuovamente pari a 1 mg/mL, ottenuta sempre con portata 100 mL/min e *quench ratio* 1:1.

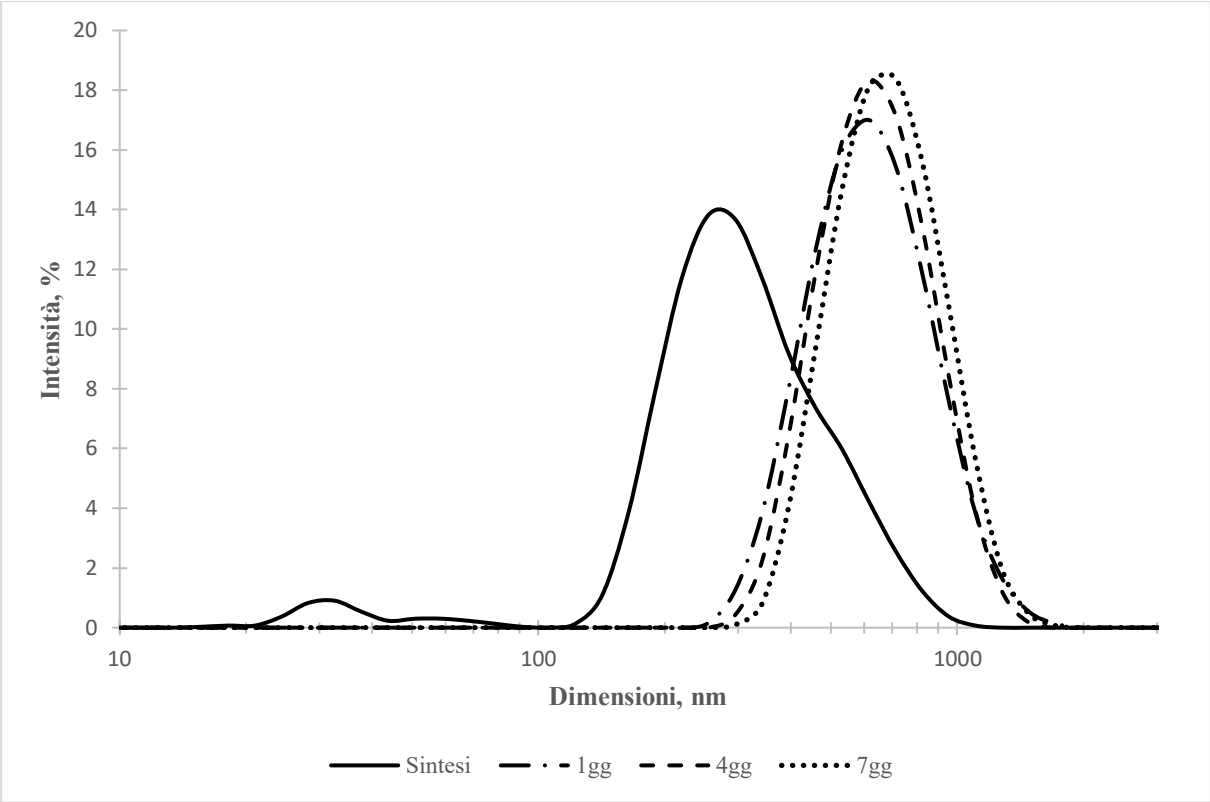

Figura 3.21: Curve PSD dei campioni di nanoparticelle (concentrazione di chitosano 1 mg/mL, alto peso molecolare, portata 100 mL/min, quench ratio 1:1) dal momento della sintesi ad una settimana di distanza.

Dai risultati presentati si può notare che le nanoparticelle a base di chitosano a basso peso molecolare passano da 400 nm a 500 nm circa, mentre quelle a base di chitosano ad alto peso molecolare partono da 300 nm e, a distanza di una settimana, raggiungono circa i 650 nm. Per contenere tale aumento di dimensioni sono necessari valori di *quench ratio* superiori a 1:1. Per entrambe le tipologie di chitosano, sono stati monitorati i campioni ottenuti dalle prove a concentrazione 1 mg/mL, portata alimentata pari a 100 mL/min e *quench ratio* variabile tra 1:1 e 3:1.

La Figura 3.22 mostra le curve PSD delle nanoparticelle a base di chitosano a basso peso molecolare e *quench ratio* variabile al momento della sintesi e a distanza di una settimana dalla stessa. La Figura 3.23, invece, mostra le curve PSD delle nanoparticelle a base di chitosano ad alto peso molecolare e variabile *quench ratio* al momento della sintesi e dopo una settimana. La Figura 3.24 permette di osservare la variazione, nell'arco di una settimana, delle dimensioni medie delle nanoparticelle a base di chitosano a basso peso molecolare, mentre la Figura 3.25 si riferisce a quelle a base di chitosano ad alto peso molecolare.

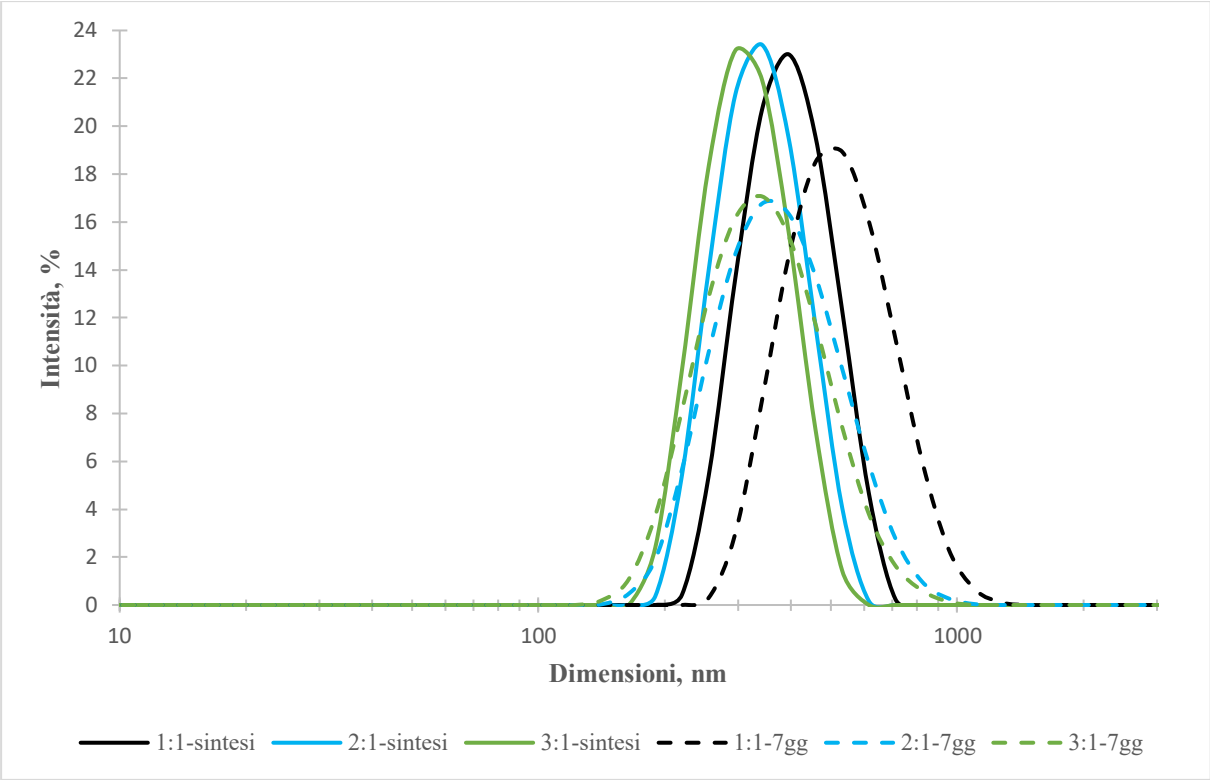

Figura 3.22: Curve PSD dei campioni di nanoparticelle (concentrazione di chitosano 1 mg/mL, alto peso molecolare, portata 100 mL/min), al momento della sintesi e ad una settimana di distanza, al variare del *quench ratio* scelto.

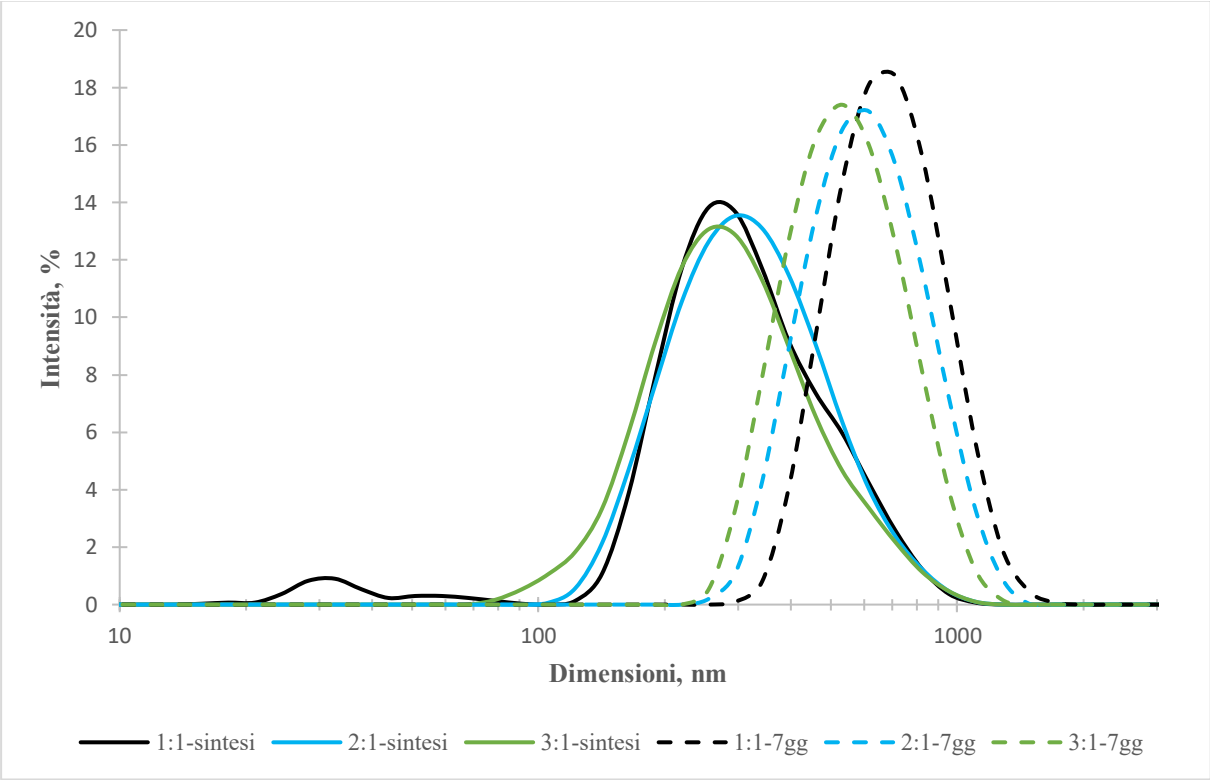

Figura 3.23: Curve PSD dei campioni di nanoparticelle (concentrazione di chitosano 1 mg/mL, alto peso molecolare, portata 100 mL/min), al momento della sintesi e ad una settimana di distanza, al variare del *quench ratio* scelto.

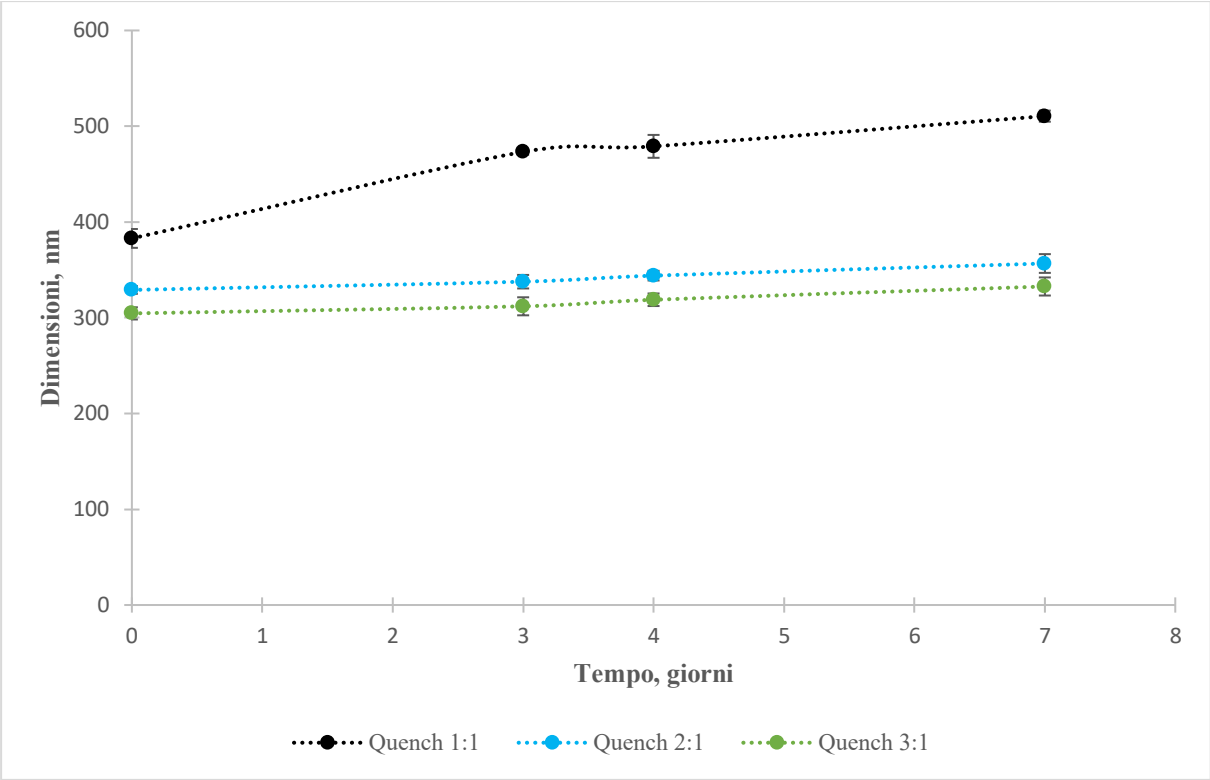

Figura 3.24: Dimensioni medie delle nanoparticelle prodotte (concentrazione di chitosano 1 mg/mL, basso peso molecolare, portata 100 mL/min) in funzione del tempo e del *quench ratio* scelto. Barre d'errore relative alle dimensioni valutate tramite deviazione standard.

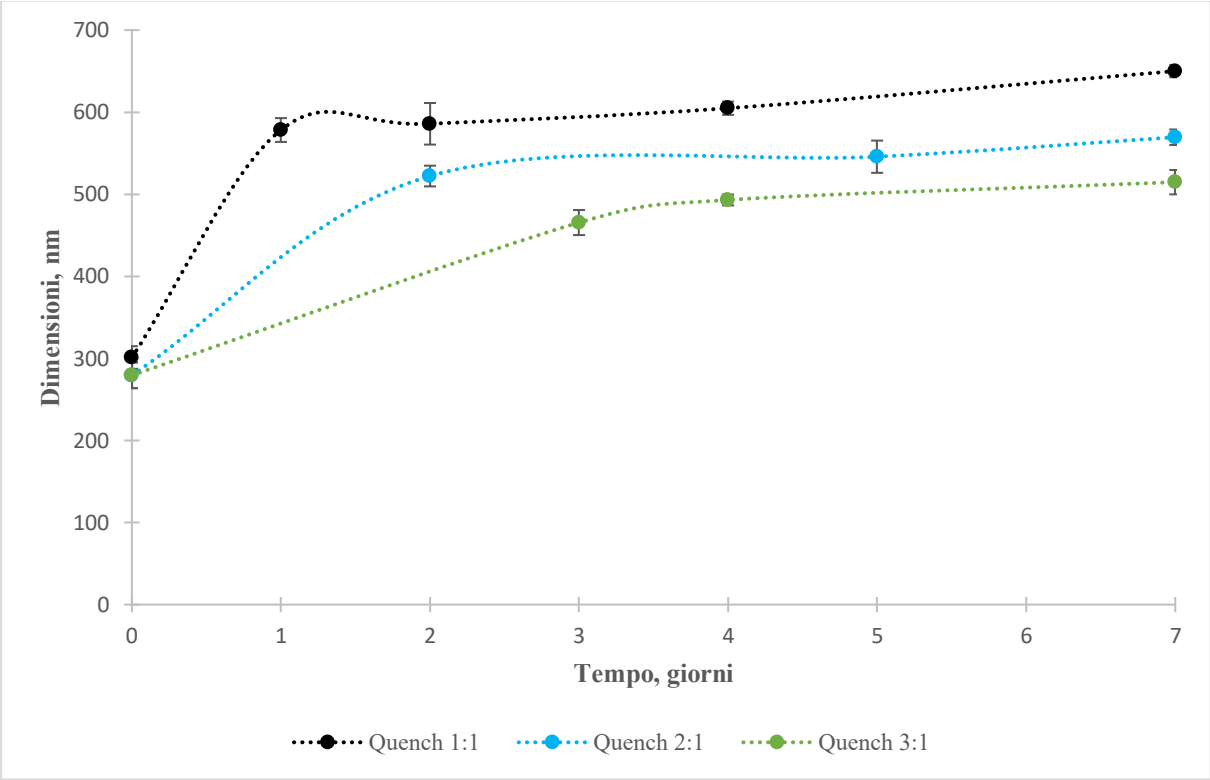

Figura 3.25: Dimensioni medie delle nanoparticelle prodotte (concentrazione di chitosano 1 mg/mL, basso alto molecolare, portata 100 mL/min) in funzione del tempo e del *quench ratio* scelto. Barre d'errore relative alle dimensioni valutate tramite deviazione standard.

Dai risultati presentati è possibile notare che, per il chitosano a basso peso molecolare, il *quench* ha inizialmente un effetto marcato e la crescita delle nanosfere è molto ridotta, come evidenziato dal piccolo spostamento verso destra delle curve di distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle. Tuttavia, si riscontra un aumento di polidispersità del campione individuabile dall'abbassamento e allargamento conseguente delle curve.

Al contrario, per il chitosano ad alto peso molecolare, si riscontra, al momento della sintesi, un minimo effetto di *quench* che nel tempo diventa più rilevante e permette di contenere l'incremento di dimensioni. Tuttavia, le nanoparticelle a base di chitosano ad alto peso molecolare, già a distanza di un solo giorno dalla loro produzione, tendono a raddoppiare il loro diametro.

Si può quindi concludere che, sebbene al momento della sintesi il chitosano a basso peso molecolare consenta di produrre particelle intorno ai 400 nm, a distanza di giorni e con un *quench ratio* elevato, come quello 3:1, l'incremento delle dimensioni ottenuto sia pressoché trascurabile. Con l'altra tipologia di chitosano, invece, è possibile ottenere inizialmente particelle con diametro di circa 280-300 nm, ma, dopo poco tempo, questo supererà i 500 nm nonostante si effettui un *quench* deciso.

3.3. Confronto tra agitatore Vortex e CIJM nella sintesi delle nanoparticelle ottimali

Come evidenziato nei paragrafi precedenti l'impiego di tipologie diverse di *mixer* permette di raggiungere diversi risultati. Poiché le variabili operative caratteristiche di ciascun microreattore sono differenti, il confronto tra questi ultimi può essere complesso. Nella Tabella 3.20 vengono riepilogati i principali risultati ottenuti con l'impiego di queste due tecnologie ed i conseguenti pro e contro. Si tenga presente che i risultati riportati si riferiscono ad una concentrazione di chitosano a basso peso molecolare pari a 0,5 mg/mL.

Tabella 3.20: Tabella di confronto relativo ai due tipi di microreattore considerati: agitatore Vortex e CIJM

	Pro	**Contro**
Confined Impinging Jets Mixer	- **Diametro medio ottenuto**: **280-300 nm** (portata 100 mL/min e quench 3:1) - **Elevata stabilità**: variazione di dimensioni di 50-70 nm nell'arco di 7 giorni - **Elevata riproducibilità** dovuta ad una miscelazione più controllata e non soggetta alla manualità dell'operatore - **Procedura scalabile** a livello industriale	- **Potenziale zeta** più **basso**: 8-10 mV
Agitatore Vortex	- **Diametro medio ottenuto**: **200-230 nm** (quench 3:1 e soluzione di solfato di sodio 0,05 M) - **Potenziale zeta** più **alto**: 17-20 mV	- **Scarsa stabilità**: variazione di oltre 200 nm già a distanza di 24 ore, 250-270 nm in 7 giorni - **Scarsa riproducibilità** delle prove (soggetta alla manualità dell'operatore) - **Procedura difficilmente scalabile** a livello industriale, destinata alla produzione di piccole quantità

3.4. Studio dell'incapsulamento del dsRNA

Il confronto presentato nel paragrafo precedente tra i due tipi di microreattori indica il *Confined Impinging Jets Mixer* come miglior candidato per la produzione, eventualmente anche su larga scala, di nanoparticelle di chitosano. Per tale ragione, vista l'elevata riproducibilità nella sintesi delle nanoparticelle e la buona stabilità delle stesse nel tempo, si è scelto di eseguire le prove di incapsulamento e rilascio del dsRNA su nanovettori ottenuti tramite CIJM.

Poiché si disponeva di piccolissime quantità di dsRNA, fornito dall'IPSP-CNR di Torino, le prove di incapsulamento e rilascio sono state condotte in volumi molto ridotti. Si doveva, infatti, evitare di avere un sistema talmente diluito da non essere più leggibile attraverso lo spettrofotometro. Per tali motivi sono state predisposte due siringhe contenenti ciascuna 10 mL delle due soluzioni necessarie alla sintesi dei nanovettori. Considerando che in ognuno dei due tubi che portano al microreattore restano all'interno circa 2,5 mL, sono stati raccolti circa 15 mL di prodotto, diluiti, poi, con altri 15 mL di acqua (*quench ratio* 1:1). Infatti, sebbene un *quench ratio* di 3:1 fosse più vantaggioso in termini di dimensioni e stabilità delle nanoparticelle, il prodotto sarebbe stato troppo diluito per permettere di valutare le concentrazioni di dsRNA rimasto nel mezzo di sintesi, ovvero non incapsulato.

È stata scelta una concentrazione di chitosano in alimentazione pari a 0,5 mg/mL, in modo da ottenere nanovettori di dimensioni il più possibile contenute e stabili. Il dsRNA, invece, è stato alimentato nell'altra corrente con concentrazione pari a 130 μg/mL. Infine è stata scelta una portata per le correnti di ingresso al microreattore pari a 100 mL/min.

Una volta ottenuto un campione, 3 mL di questo sono stati filtrati tramite filtro da 0,2 μm in modo da eliminare le nanoparticelle presenti nella sospensione. Il liquido ottenuto è stato posizionato in una cuvetta e questa è stata collocata nello spettrofotometro al fine di poter valutare la quantità di dsRNA non incapsulato nel nanovettore. Il valore di assorbanza ottenuto è stato infatti convertito, tramite curva di calibrazione (Figura 2.11), in un valore di concentrazione. La concentrazione è stata, infine, trasformata in microgrammi di dsRNA non incapsulato tenendo conto del fatto che sono stati prodotti 30 mL di sospensione. Conoscendo così la quantità di dsRNA posto in soluzione di alimentazione, la quantità di dsRNA rimasta nei tubi e la quantità di biomolecola non incapsulata, è stato possibile ricavare per differenza i microgrammi di dsRNA incapsulati dalle nanoparticelle. Occorre, infatti, tener conto del fatto che il contenuto di dsRNA di circa 2,5 mL di soluzione resta all'interno del tubicino di alimentazione e tale quantità non è trascurabile in quanto i volumi in gioco sono molto piccoli. Pertanto sui 1300 μg inseriti nella siringa di alimentazione in ciascuna prova, soltanto 975 μg arriveranno in ingresso al microreattore.

La Tabella 3.21 riporta i risultati delle due prove di incapsulamento condotte nelle medesime condizioni con lo scopo di verificarne la ripetibilità. Le percentuali di dsRNA incapsulato e non incapsulato sono state valutate riferendosi alla quantità di biomolecola che arriva al CIJM, ovvero 975 μg.

Tabella 3.21: Riepilogo dei risultati delle prove di incapsulamento.

	PROVA 1	PROVA 2
Assorbanza	0,1578	0,1486
Concentrazione, μg/mL	6,78	6,39
Quantità dsRNA non incapsulato, μg	203,42	191,56
Quantità dsRNA incapsulato, μg	771,58	783,44
Percentuale di dsRNA non incapsulato rispetto a quello in ingresso al microreattore	20,9%	19,6%
Percentuale di dsRNA incapsulato rispetto a quello in ingresso al microreattore	79,1%	80,4%

È possibile notare dalla Tabella 3.21 che le due prove svolte hanno prodotto risultati molto simili ed una percentuale di incapsulamento del dsRNA pari circa all'80%. Come era stato osservato nella fase di produzione del solo vettore privo di dsRNA, con la sintesi di nanoparticelle tramite CIJM, grazie alle condizioni di miscelazione molto controllate che questo permette di ottenere, si ha una buona riproducibilità delle prove sperimentali.

Al momento della sintesi è stato prelevato anche un campione di 2 mL da analizzare tramite DLS, per misurare le dimensioni e il potenziale zeta delle nanoparticelle contenenti la biomolecola. I risultati di tale analisi sono stati riportati e confrontati, nella Tabella 3.22, con quelli ottenuti dalla produzione del solo carrier usando le medesime soluzioni prive di dsRNA. La Figura 3.26, infine, permette di paragonare le curve di distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle di solo chitosano e di quelle che veicolano la biomolecola.

Tabella 3.22: Dimensioni medie e potenziale zeta delle nanoparticelle prodotte con rispettive deviazioni standard e PDI.

	D, nm	DEV D, nm	PDI	Potenziale Zeta, mV	DEV Potenziale Zeta, mV
PROVA 1	823,1	62,4	0,319	9,52	0,74
PROVA 1, solo vettore	491,1	24,7	0,051	6,82	0,59
PROVA 2	876,2	38,6	0,291	10,27	0,92
PROVA 2, solo vettore	576,1	29,4	0,059	8,13	1,06

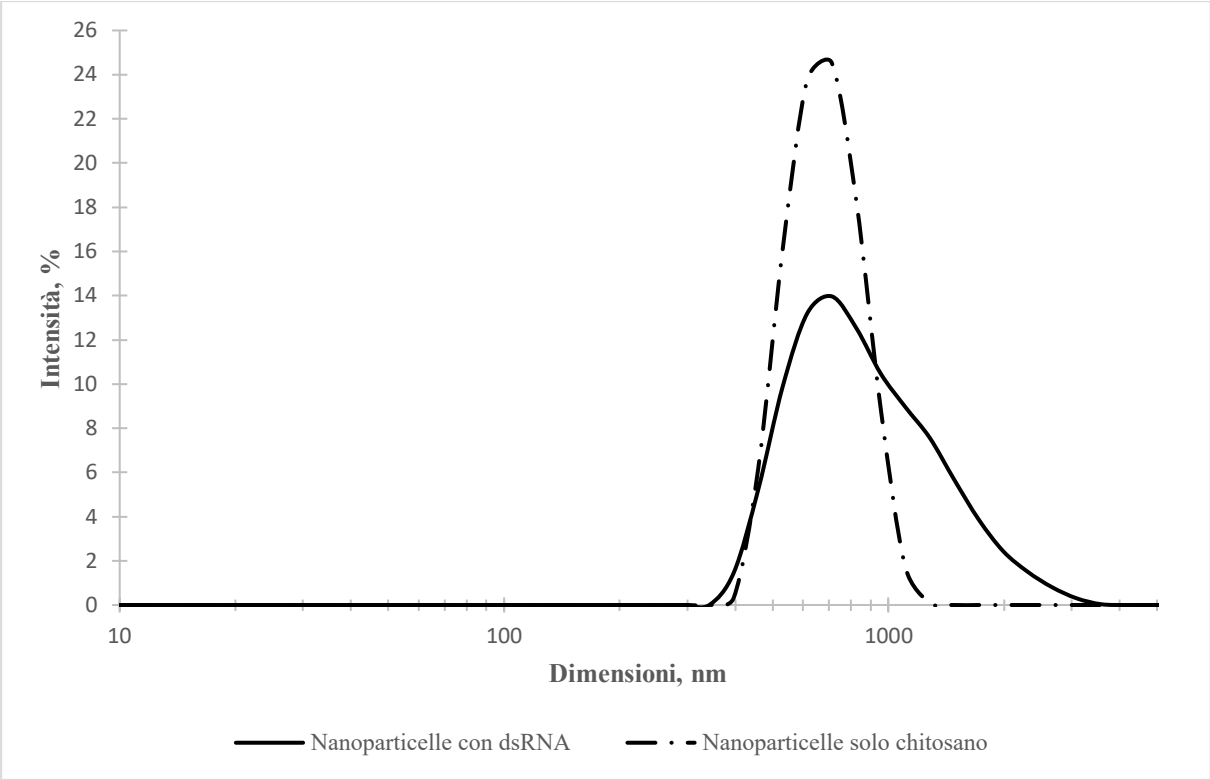

Figura 3.26: Confronto tra le curve PSD delle nanoparticelle a base di solo chitosano e quelle veicolanti dsRNA prodotte nella prova 2.

Dai risultati raccolti è possibile notare che, quando viene incapsulato il dsRNA, si assiste ad un forte aumento di dimensioni rispetto alle nanoparticelle che sono costituite dal solo chitosano. Si superano, infatti, gli 800 nm e si ottiene anche un PDI più elevato. Ciò viene posto in evidenza dalla Tabella 3.18, ma soprattutto dalla Figura 3.26 che mostra come la curva PSD delle nanoparticelle veicolanti la biomolecola copra un intervallo di dimensioni molto più ampio.

Il potenziale zeta delle nanoparticelle che contengono la biomolecola assume valori pari a circa 9-10 mV. Poiché l'acido nucleico presenta carica negativa, mentre il chitosano ha carica positiva, un potenziale zeta positivo indica che l'acido nucleico non è adsorbito sulla superficie, bensì è contenuto all'interno del vettore.

Infine, un ulteriore parametro che può essere utile a caratterizzare le nanoparticelle che veicolano il dsRNA è la capacità di carico (Tabella 3.23). Essa è definita come la percentuale di biomolecola incapsulata rispetto al peso totale delle nanoparticelle. Considerando che la concentrazione del chitosano in ingresso è pari a 0,5 mg/mL e che arrivano al microreattore 7,5 mL di soluzione, il peso totale delle nanoparticelle è dato dalla somma tra la quantità di chitosano che arriva al CIJM (circa 3,75 mg) ed i microgrammi di dsRNA incapsulato.

Tabella 3.23: Valutazione della capacità di carico nelle prove svolte.

	PROVA 1	**PROVA 2**
Quantità dsRNA incapsulato, µg	771,58	783,44
Capacità di carico	17,1%	17,3%

3.5. Studio del rilascio del dsRNA

In questa ultima fase del lavoro di Tesi è stato studiato il rilascio, tramite dialisi, del dsRNA incapsulato nelle nanoparticelle prodotte con il CIJM. Subito dopo la sintesi, 20 mL della sospensione ottenuta nella seconda prova di incapsulamento, contenente le nanoparticelle, sono stati collocati all'interno di una membrana da dialisi e questa è stata immersa in un becher con 80 mL di PBS. Il PBS, che costituisce la fase accettrice, è stato sottoposto a blanda agitazione. Ad intervalli di tempo determinati sono stati prelevati, per essere analizzati, 3 mL della soluzione all'esterno della membrana, poi reintegrati con 3 mL di tempone fresco.

Tramite lo spettrofotometro sono stati letti i valori di assorbanza di ciascun campione prelevato e questi, usando la curva di taratura (Figura 2.12), sono stati convertiti in concentrazioni. Tenendo conto del fatto che si hanno 80 mL di soluzione e del fatto che ad ogni prelievo viene sottratta una certa quantità di biomolecola, sono stati ricavati i microgrammi di dsRNA rilasciati nel corso di 48 ore. Nella Tabella 3.24 vengono riassunti i risultati ottenuti, mentre nella Figura 3.27 è possibile osservare il profilo di rilascio di dsRNA.

Occorre tenere presente che, non avendo separato le nanoparticelle dal mezzo di sintesi prima di effettuare la prova di dialisi, la sospensione posizionata nella membrana contiene un certo quantitativo di dsRNA non incapsulato. Questo tenderà ad uscire per primo in quanto libero nella soluzione.

Nella sua applicazione pratica questo non rappresenta una limitazione. La sospensione, infatti, fornirà immediatamente alla pianta il dsRNA non incapsulato, mentre rilascerà in modo lento e controllato il dsRNA incapsulato.

Tabella 3.24: Riepilogo dei risultati della prova di rilascio.

Tempo, ore	**1**	**3**	**5**	**8**	**24**	**26**	**32**	**48**
Assorbanza	0,0351	0,0533	0,0571	0,0601	0,1424	0,1454	0,1471	0,1548
Concentrazione, μg/mL	2,28	3,47	3,71	3,91	9,26	9,46	9,57	10,07
Quantità di dsRNA nel campione, μg	182,61	277,30	297,07	312,67	740,85	756,45	765,30	805,36
Quantità di dsRNA prelevato, μg	6,85	10,40	11,14	11,73	27,78	28,37	28,70	30,20
Quantità di dsRNA rilasciato, μg	182,61	284,15	314,31	341,06	780,96	824,35	861,56	930,32
% rispetto al dsRNA incapsulato	-	11,8%	15,7%	19,1%	75,2%	80,8%	85,5%	94,3%
% rispetto al dsRNA in ingresso al CIJM	18,7%	29,1%	32,2%	35,0%	80,1%	84,5%	88,4%	95,4%

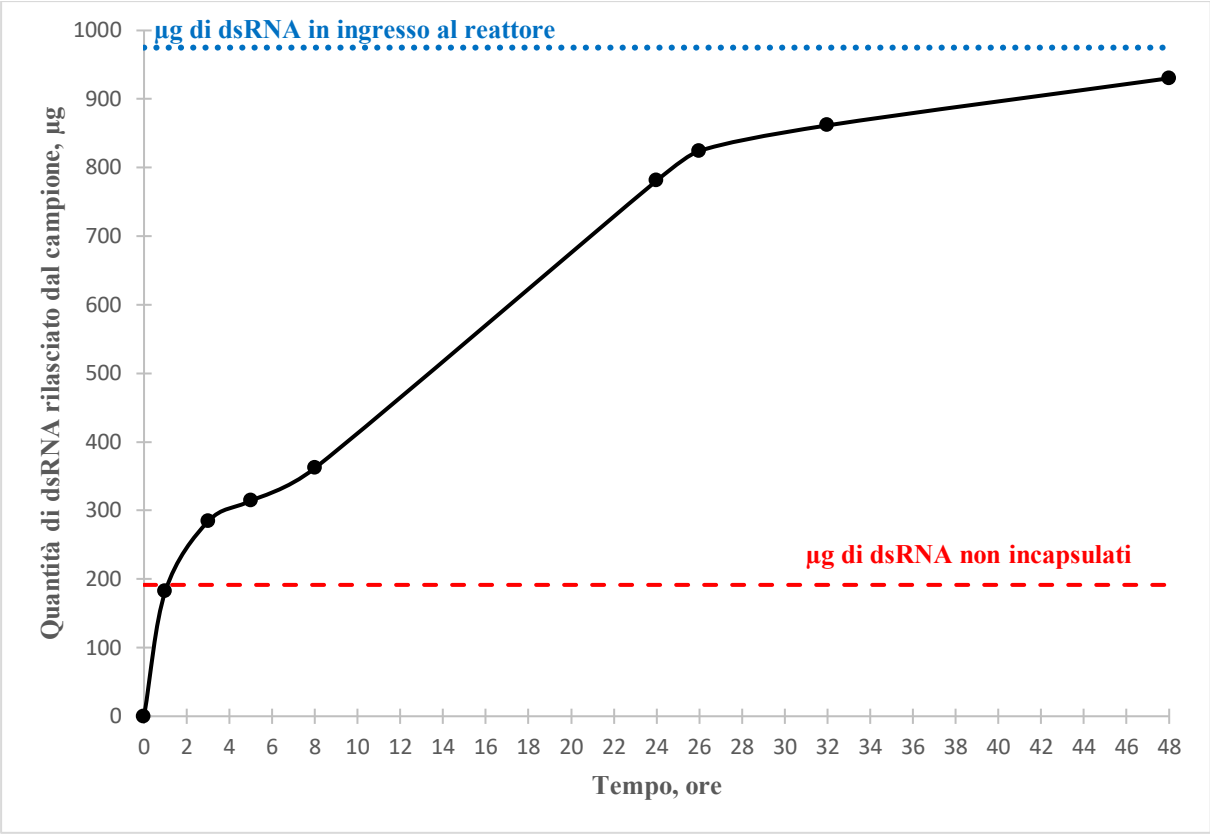

Figura 3.27: Profilo di rilascio del dsRNA dalla sospensione di nanoparticelle ottenuta a seguito della seconda prova di incapsulamento.

Come si può notare dai risultati, nell'arco di un'ora circa viene rilasciata quasi la totalità del dsRNA libero in soluzione. In particolare, dalla Figura 3.27, si osserva che, ad un'ora dall'inizio della prova di dialisi, la quantità di dsRNA rilasciato nel PBS è circa pari alla totalità del dsRNA non incapsulato. La biomolecola libera nel mezzo di sintesi, infatti, dovendo fronteggiare la sola resistenza al trasporto di materia opposta dalla membrana da dialisi, tende a fuoriuscire da quest'ultima molto velocemente. Al contrario, il dsRNA incapsulato deve diffondere dall'interno all'esterno della nanoparticella e poi attraverso la membrana, quindi occorrerà più tempo prima che questo raggiunga la soluzione accettrice.

La presenza di dsRNA libero in soluzione motiva l'iniziale pendenza molto elevata della curva di rilascio. Anche dalla Tabella 3.20 si osserva che nella prima ora viene rilasciato quasi il 19% della totalità del dsRNA in ingresso al microreattore (975 µg), mentre già nelle due ore successive si passa solo dal 19% al 29%, dimezzando così l'incremento della quantità di biomolecola rilasciata nell'unità di tempo. Dopo le prime 24 ore, circa l'80% del dsRNA alimentato al CIJM si trova nella soluzione accettrice ed il profilo di rilascio riduce nettamente la sua pendenza arrivando a superare di poco il 95% a 48 ore di distanza dall'inizio della prova.

Un ultimo aspetto che si è voluto verificare è la dimensione delle nanoparticelle una volta conclusa la prova di rilascio. A tale scopo, dopo 48 ore, sono stati sottratti 2 mL circa di sospensione dall'interno della membrana da dialisi in modo da poterli analizzare tramite DLS. I risultati di tale prova sono riportati nella Tabella 3.25 e nella Figura 3.28.

Tabella 3.25: Dimensioni medie delle nanoparticelle prodotte con rispettive deviazioni standard e PDI.

	D, nm	**DEV D, nm**	**PDI**
PROVA 2	876,2	38,6	0,291
PROVA 2, post dialisi	585,1	53,7	0,360

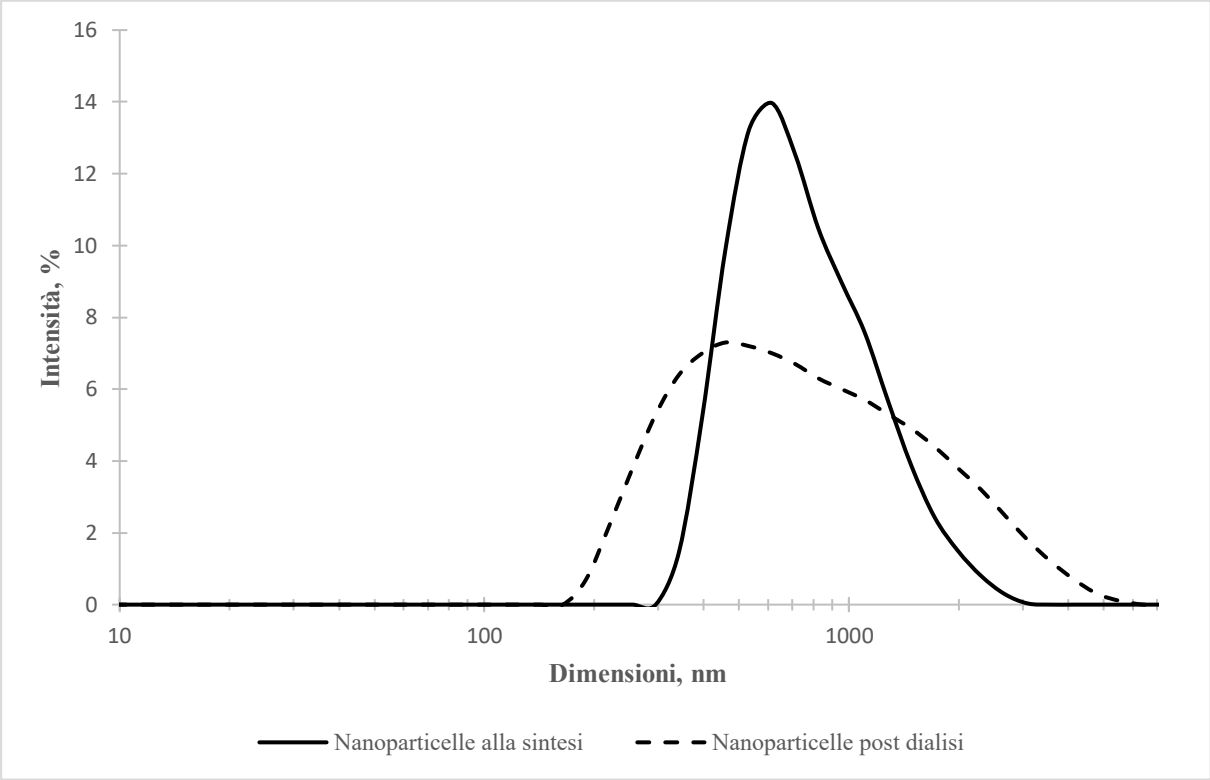

Figura 3.28: Confronto tra le curve PSD delle nanoparticelle, prodotte nella prova 2, al momento della sintesi e dopo la prova di rilascio tramite dialisi.

È interessante osservare che le nanoparticelle che hanno rilasciato la quasi totalità del dsRNA presente al loro interno, hanno riacquistato le dimensioni medie tipiche delle nanoparticelle di solo chitosano (circa 570 nm). Si osserva, inoltre, un ulteriore incremento del PDI, reso evidente anche dalla Figura 3.28.

4. Conclusioni

In questo lavoro di Tesi è stato studiato il processo di sintesi di nanoparticelle di chitosano contenenti un *double-stranded* RNA (dsRNA) che permettessero un rilascio lento e controllato di quest'ultimo al fine di immunizzare la pianta del peperone dalla virosi dell'avvizzimento maculato tramite meccanismo dell'RNA-*interference*.

Il metodo di preparazione delle nanoparticelle che è stato scelto è la nanoprecipitazione utilizzando due tipologie di microreattori: l'agitatore *Vortex* e il *Confined Impinging Jets Mixer* (CIJM).

I componenti impiegati nella produzione di tali nanovettori sono: il chitosano, un polisaccaride ottenuto dall'esoscheletro dei crostacei e degli insetti, completamente biodegradabile, ma anche biocompatibile e non tossico, ed il dsRNA, fornito dall'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante di Torino (IPSP-CNR, Torino). Seguendo le procedure di sintesi presentate nella letteratura scientifica sono state preparate due soluzioni, una in cui il chitosano fosse solubile, detta per questo motivo solvente, e una in cui restasse insolubile, detta antisolvente. La soluzione solvente è il *sodium acetate buffer*, mentre l'antisolvente è una soluzione acquosa nella quale viene disciolto del solfato di sodio (0,05 o 0,73 M) e la biomolecola da incapsulare. Infine, in un certo numero di prove, subito dopo la sintesi, il prodotto è stato sottoposto a *quench* in modo da bloccare i fenomeni di crescita e/o aggregazione dei nanovettori, rendendoli più stabili nel tempo.

Disponendo di piccolissime quantità di dsRNA, il lavoro di Tesi è stato suddiviso in due fasi. Inizialmente è stata svolta una valutazione degli effetti delle condizioni operative, relative a ciascun tipo di *mixer*, con lo scopo di definire una procedura e un microreattore adatti per la sintesi del vettore ottimale, privo della biomolecola. Una volta definiti questi aspetti, sono state condotte prove che prevedessero la sintesi delle nanoparticelle veicolanti il dsRNA, volte a studiare l'incapsulamento ed il rilascio dello stesso.

Nella prima fase, quindi, le nanoparticelle prodotte tramite agitatore *Vortex* e CIJM sono state analizzate in modo da studiarne la dimensione media, il potenziale zeta ed infine la stabilità nel tempo. Nelle prove svolte sono state variate condizioni operative quali: concentrazione del chitosano alimentato, concentrazione del solfato di sodio nell'antisolvente, tempo di riscaldamento della miscela o dei reagenti, tempo di permanenza nell'agitatore e *quench ratio* nel caso dell'agitatore *Vortex*; concentrazione e tipologia di chitosano alimentato, portata di alimentazione, *quench ratio* nel caso del CIJM.

Dai risultati sperimentali ottenuti è emerso che i nanovettori prodotti con entrambe le tipologie di microreattore presentano dimensioni maggiori all'aumentare della concentrazione di chitosano in alimentazione e che un elevato *quench ratio* consente di ottenere nanoparticelle di dimensioni inferiori e più stabili. Il confronto tra i due tipi di *mixer* impiegati permette di concludere che, sebbene le nanoparticelle siano prodotte a parità di concentrazione e *quench ratio*, l'impiego dell'agitatore *Vortex* consente il raggiungimento di potenziali zeta maggiori e dimensioni inferiori, al momento della sintesi, rispetto a ciò che si otterrebbe con il CIJM. Tuttavia, i nanovettori ottenuti tramite agitatore *Vortex* tendono a raddoppiare le loro dimensioni nell'arco di 24 ore dalla produzione. Inoltre, questo tipo di microreattore, oltre a non essere scalabile a livello industriale, non permette di ottenere una buona riproducibilità delle prove di sintesi in quanto l'esito di queste è fortemente soggetto alla manualità dell'operatore che le conduce. Per questi motivi, si è deciso di proseguire la sperimentazione impiegando il CIJM nella produzione dei nanovettori.

Sebbene le condizioni operative ottimali per la sintesi delle nanoparticelle con il CIJM prevedessero un *quench ratio* pari a 3:1, avendo a disposizione quantità molto ridotte di dsRNA, è stato scelto un *quench ratio* pari a 1:1, in modo da rendere possibile la lettura di concentrazione della biomolecola allo spettrofotometro. Impiegando volumi maggiori, infatti, il sistema sarebbe stato troppo diluito ed avrebbe compromesso la misura di assorbanza che è molto importante per valutare l'incapsulamento del dsRNA. Sono, quindi, state prodotte nanoparticelle a partire da un'alimentazione con 0,5 mg/mL di chitosano a basso peso molecolare, erogando una portata di 100 mL/min ed eseguendo *quench* 1:1. Le dimensioni medie dei nanovettori ottenuti si collocano tra gli 800 e i 900 nm, sebbene quelle del solo vettore (a base di solo chitosano) fossero intorno ai 500 nm. Il potenziale zeta ottenuto è pari a 9-10 mV ed essendo positivo indica che il dsRNA è stato incorporato all'interno della nanoparticella e non sulla sua superficie.

L'incapsulamento della biomolecola è stato valutato filtrando il prodotto proveniente dal CIJM ed analizzandolo tramite lo spettrofotometro. Sono state eseguite due prove di incapsulamento ed entrambe hanno dato esito positivo: circa l'80% del dsRNA in ingresso al microreattore è stato incorporato nelle nanoparticelle e la capacità di carico, ovvero il rapporto tra il peso di biomolecola incapsulata e il peso totale delle nanoparticelle, è risultata circa pari al 17%.

Infine è stato condotto uno studio di rilascio del dsRNA per dialisi impiegando, come soluzione accettrice, il *Phosphate-Buffered Saline* (PBS). Circa 20 mL di prodotto proveniente dal CIJM sono stati collocati direttamente in una membrana da dialisi e quest'ultima è stata immersa nel PBS. Effettuando prelievi a distanza di alcune ore l'uno dall'altro, con conseguenti reintegri di *buffer* fresco, è stato possibile ricavare il profilo di rilascio della biomolecola nell'arco di 48 ore. Dai risultati è emerso che, durante la prima ora, si ha il rilascio del dsRNA libero in soluzione, ovvero non incapsulato. Dopo circa 24 ore, l'80% della biomolecola presente nel mezzo di sintesi (incapsulata e non) è stato rilasciato nella soluzione all'esterno della membrana e, a distanza di 48 ore, si supera di poco il 95%. In questo modo è quindi possibile fornire alla pianta un rilascio quasi immediato del dsRNA libero in soluzione ed un rilascio più lento e controllato della quota di dsRNA incapsulato nelle nanoparticelle. Al termine della prova di dialisi è emerso, inoltre, che i nanovettori rilasciando la biomolecola tornano ad assumere dimensioni simili a quelle del solo carrier a base di chitosano.

Lista dei simboli

G_N	Glicoproteina del TSWV con terminale amminico
G_C	Glicoproteina del TSWV con terminale carbossile
A	Assorbanza
T	Trasmittanza
C	Concentrazione, mg/mL
ε_λ	Coefficiente di assorbimento molare, m^2/mol
l	Cammino ottico, m
m	Coefficiente angolare della retta di calibrazione nella spettrofotometria
Q_S	Quantità di dsRNA disciolta nel surnatante, µg
C_S	Concentrazione di dsRNA nel surnatante, µg/mL
S	Volume del surnatante, m^3
Q_N	Quantità di dsRNA incapsulata nelle nanoparticelle, µg
Q_{IN}	Quantità di dsRNA immessa nella siringa di alimentazione, µg
Q_T	Quantità di dsRNA rimasta all'interno del tubo di alimentazione, µg

Abbreviazioni

SLN	Solid- Liquid Nanoparticles
PLA	Acido Polilattico
PGA	Acido Poliglicolico
PLGA	Acido Poli(lattico-co-glicolico)
PCL	Policaprolattone
DLS	Dynamic Light Scattering
SEM	Microscopio a Scansione Elettronica
TEM	Microscopio a Trasmissione Elettronica
OHP	Outer Helmholtz Plane
NCS	Nanotoxicological Classification System
siRNA	Short Interfering RNA
TPP	Tripolifosfato
CIJM	Confined Impinging Jets Mixer
DD	Deacetilation Degree
TSWV	Tomato Spotted Wilt Virus
CMV	Cucumber Mosaic Virus
TMV	Tobacco Mosaic Virus
ToMV	Tomato Mosaic Virus
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase
dsRNA	Double-Stranded RNA
RISC	RNA Induced Silencing Complex
mRNA	RNA messaggero
miRNA	microRNA
miRNP	miRNA Ribonucleoprotein
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
IPSP-CNR	Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante-CNR

Bibliografia

Aubry J., Ganachaud F., Addad J. C., Cabane B. (2009). Nanoprecipitation of Polymethylmethacrylate by Solvent Shifting: 1. Boundaries. *Langmuir, **25**, 1970-1979.*

Barresi A. A., Vanni M., Fissore D., Zelenková T. (2015). Synthesis and Preservation of Polymer Nanoparticles for Pharmaceutical Applications in "*Handbook of Polymers for Pharmaceutical Technologies: Processing and Applications, Volume 2",* (V. K. Thakur and M. K. Thakur, Eds.), Chap. 9. Scrivener Publishing-Wiley, Beverly, pp. 229-280. [ISBN 978-1119-04138-2]

Bozkir A. & Saka O. M. (2004). Chitosan Nanoparticles for Plasmid DNA Delivery: Effect of Chitosan Molecular Structure on Formulation and Release Characteristics. *Drug Delivery, **11**, 107-112.*

Campos E. V. R., de Oliveira J.L., Fraceto L.F., Singh B. (2015). Polysaccharides as Safer Release Systems for Agrochemicals. *Agronomy for Sustainable Development, **35**, 47-66.*

Chirkov S. N. (2002). The Antiviral Activity of Chitosan (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology, **38** (1), 1-8.*

Divya K. & Jisha S. (2018). Chitosan Nanoparticles Preparation and Applications. *Environmental Chemistry Letters, **16**, 101-112.*

Ghormade V., Deshpande M. V., Paknikar K. M. (2011). Perspectives for Nano-Biotechnology Enabled Protection and Nutrition of Plants. *Biotechnology Advances, **29**, 792-803.*

Gupta R., Kwon S., Kim S. T. (2018). An Insight into the Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV), Tomato and Thrips Interaction. *Plant Biotechnology Reports, **12**, 157–163.*

Hassan O. & Chang T. (2017). Chitosan for Eco-friendly Control of Plant Disease. *Asian Journal of Plant Pathology, **11** (2), 53-70.*

Kashyap P. L., Xiang X., Heiden P. (2015). Chitosan Nanoparticle Based Delivery Systems for Sustainable Agriculture. *International Journal of Biological Macromolecules, 77, 36–51.*

Keck C. M. & Müller R. H. (2013). Nanotoxicological Classification System (NCS) – A Guide for The Risk-Benefit Assessment of Nanoparticulate Drug Delivery Systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. **84** (3)*, 445-448.

Lepletier E., Bourgaux C. & Couvreur P. (2014). Nanoprecipitation and the "Ouzo effect": Application to Drug Delivery Device. *Advanced Drug Delivery Reviews, **71***, 86-97.

Lince F., Marchisio D. L., Barresi A. A. (2009). Smart Mixers and Reactors for the Production of Pharmaceutical Nanoparticles: Proof of Concept. *Chemical Engineering Research and Design, **87**, 543–549.*

Malodia K., Singh S. K., Mishra D. N., Shrivastava B. (2012). Nanoparticles: An Advance Technique for Drug Delivery. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, ***3** (3), 1186-1208.*

Mitter N., Worrall E., Robinson K., Xu Z., Carroll B. (2017). Induction of Virus Resistance by Exogenous Application of Double-Stranded RNA. *Current Opinion in Virology, **26**, 49-55.*

Nagavarma B. V. N., Yadav H. K. S., Ayaz A., Vasudha L. S., Shivakumar H. G. (2012). Different Techniques for Preparation of Polymeric Nanoparticles – A Review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, **5** (3), 16-23.*

Naskar S., Sharma S., Kuotsu K. (2019). Chitosan-Based Nanoparticles: An Overview of Biomedical Applications and Its Preparation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology, **49**, 66–81.*

Rajasree R. & Rahate K. P. (2013). An Overview on Various Modifications of Chitosan and its Applications. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, **4** (11), 4175-4193.*

Ramesh Kumar D., Saravana Kumar P., Gandhi M.R., Al-Dhabi N.A., Paulraj M.G., Ignacimuthu S. (2016). Delivery of Chitosan/dsRNA Nanoparticles for Silencing of Wing Development Vestigial (vg) Gene in Aedes Aegypti Mosquitoes. *International Journal of Biological Macromolecules, **86**, 89-95.*

Ranjit K., Baquee A. A. (2013), Nanoparticle: An Overview of Preparation, Characterization and Application. *International Research Journal of Pharmacy, **4** (4), 47-57.*

Rawat M., Singh D., Saraf S., Saraf S. (2006). Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin, **29** (9), 1790-1798.*

Reis P. C. Neufeld R. J., Ribeiro A. J., Veiga F. (2006). Nanoencapsulation II. Biomedical Applications and Current Status of Peptide and Protein Nanoparticulate Delivery Systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, **2**, 53–65.*

Rosa C., Kuo Y., Wuriyanghan H., Falk B. W. (2018). RNA Interference Mechanisms and Applications in Plant Pathology. *Annual Review of Phytopathology, **56**, 581-610.*

Runo S., Alakonya A., Machuka J., Sinhab N. (2010). RNA Interference as a Resistance Mechanism Against Crop Parasites in Africa: a 'Trojan horse' Approach. *Pest Management Science, **67**, 129-136.*

Rybicki E. P. (2015). A Top Ten List for Economically Important Plant Viruses. *Archives Virology, **160**, 17-20.*

Rychahou P. G., Jackson L. N., Farrow B. J., Mark Evers B. (2016). RNA Interference: Mechanisms of Action and Therapeutic Consideration. *Surgical research review, **140**, 719-725.*

Sarathi M., Simon M. C., Venkatesan C., Sahul Hameed A. S. (2008). Oral Administration of Bacterially Expressed VP28dsRNA to Protect Penaeus Monodon from White Spot Syndrome Virus. *Marine Biotechnology, **10**, 242-249.*

Scholthof K. G., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G. D. (2011). Top 10 Plant Viruses in Molecular Plant Pathology. *Molecular Plant Pathology, **12** (9), 938–954.*

Sharif R., Mujtaba M., Rahman M. U., Shalmani A., Ahmad H., Anwar T., Tianchan D., Wang X. (2018). The Multifunctional Role of Chitosan in Horticultural Crops; A Review. *Molecules, **23**, 872-891.*

Singh K. & Mishra A. (2013). Water Soluble Chitosan Nanoparticle for the Effective Delivery of Lipophilic Drugs: A Review. *International Journal of Applied Pharmaceutics, **5** (3), 1-6.*

Soppimath K. S., Aminabhavi T.M., Kulkarni A. R., Rudzinski W. E. (2001). Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Devices. *Journal of Controlled Release, **70**, 1–20.*

Tenllado F. & Díaz-Rúiz J. R. (2001). Double-Stranded RNA-Mediated Interference with Plant Virus Infection. *Journal of Virology, **75** (24), 12288-12297.*

Tenllado F., Martínez-García B., Vargas M., Díaz-Ruíz J.R. (2003). Crude Extracts of Bacterially Expressed dsRNA Can Be Used to Protect Plants Against Virus Infections. *BMC Biotechnology, **3**, 3.*

Uhrich K. E., Cannizzaro S. M., Langer R. S., Shakesheff K. M. (1999). Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *Chemical Reviews, **99**, 3181-3198.*

Zelenková T., Mora M. J., Barresi A. A., Granero G. E., Fissore D. (2018). On the Production of Chitosan-Coated Polycaprolactone Nanoparticles in a Confined Impinging Jet Reactor. *Journal of Pharmaceutical Sciences, **107**, 1157-1166.*

Ringraziamenti

Il termine di questo lavoro di Tesi segna la fine di un lungo periodo di studi e quindi vorrei cogliere l'occasione per ringraziare tutti coloro che, fisicamente vicini o lontani, mi sono stati accanto in questi anni supportandomi, *sopportandomi* e sostenendomi.

Ringrazio il mio relatore, il prof. Davide Fissore, per la passione trasmessa, per l'infinita pazienza e per la costante disponibilità a fornire consigli, spiegazioni ed incoraggiamenti.

Vorrei ringraziare i miei compagni di corso che hanno reso questi anni meno duri strappandomi sorrisi e facendomi sentire meno sola di fronte alle difficoltà. Soprattutto grazie ad Andrea, un amico che in cinque anni è diventato per me come un fratello, che ha sempre saputo come esserci e tendermi una mano. Grazie ad Emanuele, Simone, Giuvà, Beatrice, Lorenzo, Giacomo, Gabriele, Camilla e Ylenia, ma anche ai miei amici di Ingegneria dei materiali, Francesco, Valentina e Alice. Infine, grazie anche a coloro che mi hanno conosciuta al primo anno prendendo strade diverse, ma standomi comunque accanto: Federico, Giampiero, Federica e Riccardo. Senza tutti voi sarebbero stati cinque anni completamente diversi.

Ringrazio gli amici della *Monregafamily*, complici di avventure e disavventure finite sempre col sorriso. Dove siete voi c'è sempre festa e risate, vi voglio bene.

Un ringraziamento enorme va, poi, alle mie compagne di squadra, le *Sorelle Cheesecake*: Giulia, Chiara, Greta, Alice e Valeria. Grazie per le vasche di gelato a sorpresa in sessione, per tutte le uscite fatte con il solo fine di abbuffarci di cose buone più che per vederci, per essere sempre presenti, per ricordarmi di non mollare mai, per tenere sempre viva la passione per il *sincro* e per quelle infinite risate che mi fanno venire male agli addominali. Siete fantastiche, ognuna a modo suo.

Grazie a Matteo, che in questi anni ha condiviso con me tutto, il "pacchetto completo", standomi accanto come solo lui sa fare e spingendomi ad essere ogni giorno una persona migliore.

Grazie alla mia cuginetta Bubi, la mia piccola roccia a cui voglio un mondo di bene, e grazie ai miei zii e zie. Qualsiasi cosa accada so che voi ci sarete sempre a sostenermi.

Infinitamente grazie ai miei genitori, mamma Antonella e papà Costantino, per avermi trasmesso sin da piccola la gioia e la curiosità di imparare cose nuove, per essere sempre il mio punto di riferimento, per aver creduto nelle mie capacità quando nemmeno io ci credevo. Grazie per tutto il tempo dedicato a darmi consigli nella stesura di questa Tesi e nei cinque anni di università dove non sempre tutto è andato come avrei sperato. Ciò che sono lo devo a voi.

Infine, un grazie speciale ai miei nonni, Giorgio, Nanda, Pino e Gilly, non qui fisicamente, ma comunque qui. Soprattutto grazie a nonno Pino, che ha creduto in me sin dal primo giorno in cui, varcando la soglia del Politecnico, per lui sono diventata automaticamente Ingegnere. Un enorme grazie anche a nonna Gilly, che mi ha cresciuta, che mi ha insegnato a farmi sempre forza "perché piangere non serve", che ricordava le date dei miei esami meglio di me, che era talmente coinvolta nei miei studi da andare anche lei in "ansia da sessione". Mi manchi come l'aria, ora più che mai. Questa Tesi che hai visto nascere, senza poterne leggere la fine, la dedico a te e ti prometto che te ne spiegherò ogni singola riga.

Grazie a tutti voi dal profondo del cuore,

Carlotta.