

POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea in magistrale in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea

**Interazione onde d'urto e nanobolle
nella cavitazione farmaceutica**



Relatori

Umberto Lucia

Roberta Cavalli

Candidata

Ortenzia Veltri

Marzo 2020

A chi ha sempre creduto in me.

Con amore,

Ortenzia

Ringraziamenti

Alla fine di questo percorso di studi al Politecnico è d'obbligo ringraziare coloro che hanno accompagnato il mio viaggio.

In primo luogo, ringrazio il mio relatore, professor Umberto Lucia, per la competenza con cui mi ha seguito. Si è dimostrato essere una guida fondamentale nel mio percorso e ritengo sia uno dei professori più disponibili, educati e comprensivi del Politecnico. Fonte inesauribile di conoscenza, con i suoi corsi è riuscito a trasmettermi la passione per l'argomento della tesi e gli sono grata.

Ringrazio la correlatrice di tesi, la professoressa Roberta Cavalli, che ha messo a mia disposizione il suo sapere e il suo team della facoltà di Farmacia che mi ha fornito spunti interessanti.

Un ringraziamento speciale va ad Emmanuele che mi ha sostenuto per l'intero percorso universitario con amore e positività. Ha sempre creduto in me, dandomi il coraggio e la forza necessari.

Infine il ringraziamento più caloroso è rivolto ai miei genitori che sono stati il pilastro fondamentale nella vita, grazie al loro appoggio e sostegno sono riuscita a raggiungere questo traguardo. Li ringrazio per i tanti sacrifici che hanno fatto per me e per tutto l'amore con cui mi hanno cresciuta. Questo traguardo di vita è dedicato a loro, con la speranza di averli resi orgogliosi.

Questo traguardo di vita lo dedico a voi.

Indice

1	La cavitazione	1
1.1	Il fenomeno della cavitazione	1
1.2	Cavitazione acustica	1
1.2.1	Caratteristiche di una bolla	1
1.2.2	La cavitazione in campo biomedico	2
1.2.3	Soglie di cavitazione	3
1.2.4	Soglia di nucleazione e soglia di collasso	3
1.3	Dinamica della bolla di cavitazione	5
1.3.1	Bolla di gas libera in un campo libero	5
1.3.2	Bolla incapsulata in un campo libero	7
1.3.3	Dinamica di una bolla all'interno di un vaso costretto	8
1.3.4	Dinamica di una bolla nei fluidi viscoelastici	10
1.3.5	Dinamica di una bolla vicino all'interfaccia	11
1.4	Nanobolle	13
2	Le onde d'urto	15
2.1	Proprietà fisiche	15
2.2	Tecnologia delle onde d'urto	17
2.3	Comportamenti fisici delle onde d'urto	19
2.3.1	Acustica non lineare	22
2.3.2	Meccanismi per generare l'onda d'urto	22
2.4	Dosimetria termica	25
2.5	Applicazioni biomediche	26
2.5.1	Effetti biologici degli ultrasuoni	30
2.6	Tubo d'urto	31
2.7	Misurazione delle onde d'urto	33
3	Formulazione delle nanobolle	36
3.1	Ruolo della pressione di Laplace	36
3.2	Principio di massima generazione di entropia	37

3.3	Teorema di Gouy-Stodola e calcolo variazionale	39
3.4	Approccio termodinamico della cavitazione	41
3.4.1	Parametri sperimentali	42
4	Risultati sperimentali trattamento ESW per nanobolle contenenti decafluoropentano	43
4.1	Preparazione delle nanobolle	43
4.2	Materiali e metodi	45
4.3	Risultati sperimentali	45
4.4	Analisi risultati sperimentali	50
4.5	Approccio semplificato	54
4.6	Approccio specifico	56
5	Risultati sperimentali trattamento ESW per nanobolle contenenti doxorubicina	61
5.1	Caratterizzazione fisico-chimica di nanobolle con doxorubicina con shell di Chitosano	62
5.2	Caratterizzazione fisico-chimica di nanobolle con doxorubicina con shell di Chitosano-TPP	66
6	Studio della ripetibilità e dell'efficacia del trattamento	70
6.1	NBs caricate con doxorubicina-shell di Chitosano	70
6.1.1	Prima prova	70
6.1.2	Seconda prova	72
6.2	NBs caricate con doxorubicina-shell di Chitosano-TPP	74
6.2.1	Prima prova	74
6.2.2	Seconda prova	76
6.3	Conclusioni	78
	Bibliografia	81

Sommario

La cavitazione è un fenomeno fisico caratterizzato dalla formazione, in seguito alla rottura del liquido, di cavità (propriamente bolle) contenenti gas disciolto o vapore. Sin dai primi anni '80 la cavitazione veniva utilizzata per il trattamento dei calcoli renali. Attualmente applicazioni di questo fenomeno nel campo biomedico sono molteplici tra cui *extracorporeal shock wave lithotripsy* (ESWL) e *extracorporeal shock wave therapy* (ESWT).

Le bolle possono avere dimensioni dei μm o dei nm . Le microbolle, a causa delle loro dimensioni, non sono in grado di migrare passivamente attraverso le pareti dei vasi sanguigni, soprattutto nella rete vascolarizzata del tumore, ma rimangono in circolazione fino a quando non vengono assorbiti dalla milza e dal fegato. L'originalità di questo studio è l'utilizzo di nanobolle per ovviare a queste limitazioni con lo scopo di rilasciare farmaci in loco. Una strategia avanzata dell'uso della cavitazione con ultrasuoni è la drug delivery che consiste nell'assorbimento, da parte della cellula di farmaco caratterizzato da alto peso molecolare. In questo modo il rilascio del farmaco risulta essere mirato. Alcuni studi hanno dimostrato la maggiore efficacia della drug delivery con l'aggiunta delle nanobolle gassose. In generale, sono possibili due modalità per la drug delivery. Nell'approccio di co-somministrazione, gli agenti di contrasto ad ultrasuoni vengono iniettati nel flusso sanguigno insieme all'agente terapeutico. Al contrario, l'applicazione locale degli ultrasuoni può indurre un aumento della permeabilità della membrana cellulare endoteliale, migliorando l'assorbimento dell'agente terapeutico da parte delle cellule bersaglio.

In questo studio è stata sviluppata un'analisi termodinamica della cavitazione ed è stato preso in considerazione un modello fermo (fluido a riposo) per la determinazione del modello matematico della nanobolla. Le nanobolle utilizzate negli esperimenti, contengono perfluoropentano circondato da diversi gusci polimerici: Chitosano, Glicolchitosano, Chitosano-TPP, Chitosano fluorescente- FITC. Le onde d'urto utilizzate negli esperimenti sono state prodotte da un dispositivo piezoelettrico con un'intensità di $0,05\text{-}1,48 \text{ mJ/m}^2$. Dallo studio è emersa la stabilità della nanobolla anche a seguito del trattamento con le onde d'urto. I risultati ottenuti sperimentalmente sono congrui a quelli teorici e si è ottenuta quindi, un'evaporazione del perfluoropentano contenuto al suo interno. Questo comportamento è stato osservato principalmente nel caso di nanobolle con shell di Blank Chitosan, Glicolchitosano, Chitosano+TPP con una pressione applicata pari a 64 MPa e 250 shots. Un ulteriore studio su nanobolle contenenti il farmaco antitumorale doxorubicina, ha dimostrato l'efficacia del modello matematico di nanobolle per il rilascio in loco e la sua ripetibilità. I risultati sperimentali si è dimostrato essere corrispondenti a quelli teorici.

Capitolo 1

La cavitazione

1.1 Il fenomeno della cavitazione

La *cavitazione*, in generale, può essere definita come la *rottura* di un liquido e la conseguente formazione all'interno dello stesso, di cavità (propriamente di bolle) contenenti gas disciolto o vapore del liquido stesso. Esistono diverse tipologie di cavitazione: chimica, elettrica e indotta da radiazioni. La cavitazione è causata da un abbassamento della pressione sotto il livello della pressione di vapore del liquido oppure dall'innalzamento della temperatura oltre al punto di ebollizione. Quest'ultima cavitazione è chiamata *acustica* ed è quella considerata in questa trattazione. La cavitazione acustica è quindi la crescita e il collasso di microbolle preesistenti sotto l'influenza di un campo ultrasonico nei liquidi. Queste bolle vengono quindi agitate, espandendosi e contraendosi con la compressione e decompressione delle onde ultrasoniche.

La cavitazione acustica con ultrasuoni ha possibili applicazioni terapeutiche [1] tra cui somministrazione dei farmaci in loco, istopatologia, litotripsia, trasferimento genico. La cavitazione viene applicata anche per migliorare l'ablazione termica dei tumori o di altri tessuti malati.

In un campo acustico la materia è alternativamente soggetta a pressione e tensione. Nella fase di tensione un solido può rompersi quando la tensione supera un valore limite. Un liquido anche questa volta può rompersi per formare cavità o bolle. Nei campi sonori le bolle formate iniziano a oscillare e danno origine a una serie di effetti distinti che generano l'area di ricerca della cavitazione acustica. La dinamica della bolla costituisce un campo di ricerca attivo.

1.2 Cavitazione acustica

1.2.1 Caratteristiche di una bolla

Il raggio di una bolla, esposta ad ultrasuoni, viene aumentato dalla pressione acustica che agisce come forza esterna. Quindi una bolla ha un comportamento oscillante caratterizzata da un'elasticità

data dal gas al suo interno e da un'inerzia caratterizzante il liquido attorno la bolla. La bolla risulta avere frequenza propria e il suo valore è inversamente proporzionale al suo raggio, in condizioni di equilibrio. Se la frequenza del campo acustico si avvicina alla frequenza propria, la bolla assume un comportamento risonante e l'ampiezza delle sue oscillazioni dipende da quanto sono vicini i due valori di frequenza e dal valore della pressione applicata. Le oscillazioni sono non lineari quando si è in prossimità della risonanza e si generano armoniche di ordine superiore con conseguenti effetti in campo acustico producendo modificazioni chimiche e fisiche.

Un comportamento della bolla può essere il cosiddetto *diffusione rettificata*, in prossimità della quale il raggio di equilibrio tende a crescere nel tempo. Questo avviene ad intensità acustiche basse, perché durante compressione ed espansione, del gas può diffondere verso il liquido esterno o interno della bolla, e siccome l'area della superficie è più grande durante l'espansione che nel corso della compressione. Il risultato è che entra più gas di quello che esce; tale processo corrisponde alla *cavitazione non inerziale o stabile*. Tale fenomeno avviene solo con l'irradiazione di fasci ultrasonori continui.

Nel caso in cui vi è una fase di lenta espansione della bolla nel campo sonoro, la cavitazione è *inerziale* e il campo è descritto da onde di compressione e di depressione.

Nella fase di pressione positiva, la bolla viene compressa in modo rapido e violento fino al collasso su se stessa con conseguente implosione e rilascio di energia. Successivamente si ha un'emissione di energia localizzata con aumento di pressione e temperature che possono produrre effetti dannosi per il sistema biologico con conseguente formazione degli *hot spot*, punti caldi. Invece, durante la fase di pressione negativa (depressione), si ha l'ingrandimento della bolla fino ad un volume molto più grande di quello in condizioni di equilibrio.

1.2.2 La cavitazione in campo biomedico

Alcune applicazioni della cavitazione in biomedicina risultano essere [2]:

- Sonotrombolisi
- Terapia genica
- Sonicazione cellulare
- Litotripsia
- Somministrazione localizzata di farmaci

La cavitazione viene usata in associazione all'ablazione termica per la cura dei tumori.

Possono insorgere delle conseguenze a seguito dell'uso di alte temperature e pressioni, quali la lisi cellulare o la formazione di radicali liberi. La cavitazione inerziale è un processo caratterizzato da una soglia, in termini di ampiezza del campo acustico (più precisamente del massimo negativo della pressione acustica): soglia di nucleazione, di frequenza (più è bassa, più lungo è il tempo a disposizione per l'espansione delle bolle) e di dimensioni delle bolle presenti. A tal proposito, bolle molto piccole sono caratterizzate da un'alta tensione superficiale che tende a limitarne l'espansione, mentre bolle con un

raggio di equilibrio già molto grande possono espandersi ma il collasso non è sufficientemente violento. Questo andamento violento del fenomeno della cavitazione può portare alla formazione dei *radicali liberi*, molecole o atomi estremamente reattivi, che possono agire direttamente sulle catene polimeriche e sulle strutture presenti nel mezzo. I radicali liberi più noti sono quelli derivanti: dalla sonolisi dell'acqua e dal contenuto di ossigeno detti ROS (Reacting Oxygen Species). Applicazioni di ultrasuoni diagnostici in vitro, permettono di rilevare l'insorgenza della cavitazione inerziale [3].

La pressione in un liquido può subire variazioni a seguito di onde sonore. Quando la pressione nel mezzo diminuisce (rarefazione) la bolla tende ad espandersi, mentre durante la condensazione tende a diminuire la dimensione. La bolla è caratterizzata da diverse pressioni interna ed esterna e quando viene colpita da una vibrazione, questa tende a schiacciarsi e ad assumere una forma ellissoidale e il guscio si assottiglia. In questo modo vi è un maggior gradiente di concentrazione e questo permette il trasferimento di massa. Al contrario, quando la bolla si contrae, il guscio è più spesso e il gradiente della fase di rarefazione è minore e ne determina il flusso verso l'interno della bolla. Questo fenomeno è il *shell effect*.

1.2.3 Soglie di cavitazione

La *nucleazione* è il primo processo della cavitazione in cui si vengono a formare le cavità. Se si parte da un liquido senza impurità o gas si ottengono delle cavità nel corpo della fase già esistente (*nucleazione omogenea*). La nucleazione omogenea è sfavorita in quanto aumenta l'energia libera. Nella nucleazione eterogenea, si formano cavità dove è già presente una discontinuità di fase. Nei sistemi sperimentali si è notato che la nucleazione si verifica per la presenza di siti "deboli". Quest'ultimi si collocano all'interfaccia liquido-solido, o liquido-solido-gas (*nucleazione eterogenea*) [4]. La pressione è caratterizzata da cicli alternati e questo è dovuto alla propagazione ultrasonica nei tessuti. Le bolle oscillano intorno alla loro dimensione di risonanza e, se soggette ad alte pressioni acustiche, collassano e si rompono in bolle più piccole. Questo effetto produce picchi di temperatura e di pressione altamente localizzati, che a loro volta generano onde d'urto, radicali liberi e calore locale. Il collasso della bolla di cavitazione è alla base di molte applicazioni biomediche. Affinchè una bolla possa crescere è necessario che il valore dell'ampiezza dell'oscillazione di pressione sonora agente su di essa sia superiore a un valore soglia (*soglia di cavitazione*). Al di sotto di tale soglia, se non stabilizzata, la bolla si dissolve. Nella figura 1.1 nella pagina seguente vengono rappresentati la formazione, la crescita e il collasso delle bolle. Il collasso viene utilizzato molto nelle applicazioni biomediche.

1.2.4 Soglia di nucleazione e soglia di collasso

- Soglia di nucleazione. Affinchè avvenga la nucleazione, omogenea o eterogenea, l'energia deve raggiungere la soglia. L'energia dipende dall'angolo θ , ovvero l'angolo di contatto tra una bolla di nucleazione e la superficie di contatto con il liquido [5].
- Soglia di collasso. Quando le bolle si espandono rapidamente, nel mezzo ciclo di compressione, si osserva un collasso violento, ovvero un'implosione che genera la suddivisione in bolle più piccole. La pressione a cui avviene l'implosione è la soglia di collasso. Le simulazioni confermano che il

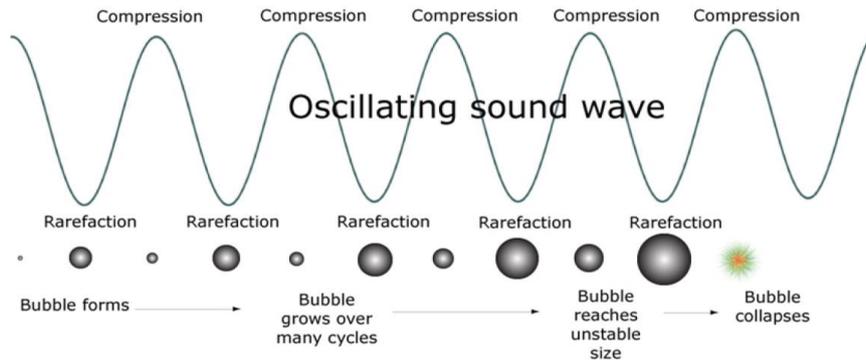


Figura 1.1: Riepilogo grafico dell'evento di formazione di bolle [4], crescita di bolle e conseguente collasso nel corso di diversi cicli acustici. Una bolla oscilla in fase con l'onda sonora applicata, contraendosi durante la compressione ed espandendosi durante le rarefazioni.

collasso più intenso, con la massima velocità del getto e pressione d'impatto, si verifica per bolle con dimensioni intermedie durante la fase di contrazione quando il tempo di collasso della bolla è approssimativamente uguale alla durata dell'impulso di compressione dell'onda d'urto. In questa condizione, la massima quantità di energia dell'onda d'urto incidente viene trasferita alla bolla collassante [6].

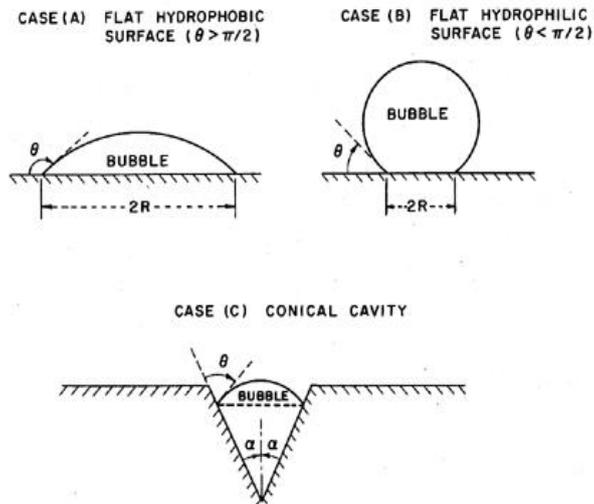


Figura 1.2: Caso a) superficie idrofobica, $\theta > \frac{\pi}{2}$, caso b) Superficie idrofilica, $\theta < \frac{\pi}{2}$, caso c) Cavità conica [5]

Dalla figura 1.2 si può dedurre che se la bolla è piccola, θ è maggiore e quindi la superficie risulta essere idrofobica. L'angolo di contatto, ha influenza sulla soglia di nucleazione; infatti, si potrebbe concludere che la presenza di una superficie idrofobica provoca una nucleazione eterogenea.

Queste condizioni estreme e localizzate del collasso, determinano una serie di reazioni chimiche che possono essere utilizzate per una varietà di applicazioni.

Un'area in cui si è scoperto che l'interazione onda d'urto-bolla gioca un ruolo critico è la litotripsia d'onda d'urto (SWL), in cui le onde d'urto ad alta energia vengono utilizzate per la disintegrazione non invasiva dei calcoli renali nei pazienti [7]. La simulazione di un'onda d'urto come un impulso di pressione che interagisce con una bolla è rappresentata schematicamente nella figura 1.3.

Un'applicazione che sfrutta le reazioni chimiche derivanti dal collasso della bolla è la sonochimica. Quando la bolla collassa, questo vapore viene riscaldato in modo significativo e subisce reazioni chimiche dissociative. La variazione di pressione nella bolla non è connessa alla velocità ma all'accelerazione della parete della bolla [7], come mostrato nell'equazione 1.1.

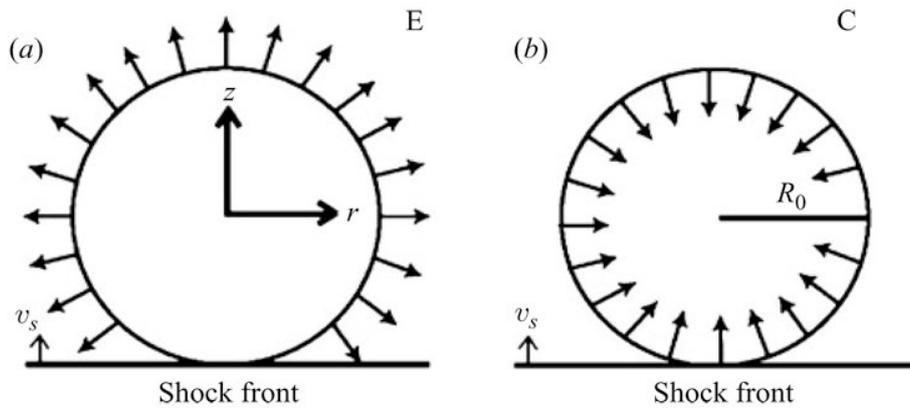


Figura 1.3: Diagramma schematico di un'onda d'urto in movimento verso l'alto che colpisce una bolla. L'onda d'urto si sposta verso l'alto con velocità v_s . Nel momento in cui lo shock colpisce la bolla, il raggio della bolla raggiunge un valore R_0 . L'onda d'urto colpisce la parte inferiore di una bolla in espansione (a). In (b), una bolla collassante, viene colpita dalla stessa onda d'urto.

$$\varepsilon_p \equiv \frac{\bar{\rho} \ddot{R} R}{2P_c} = \frac{P_c - P_w}{P_c} \quad (1.1)$$

Dove $\bar{\rho}$ è la densità media dipendente dal tempo, R è il raggio della bolla, P_c è la pressione al centro, P_w è la pressione alla parete, e i punti sono le derivate nel tempo.

1.3 Dinamica della bolla di cavitazione

1.3.1 Bolla di gas libera in un campo libero

Modello di Rayleigh

Si considera una bolla sferica in un liquido perfetto e incomprimibile di estensione infinita [8]. Il raggio della bolla è R , e r è il raggio di qualsiasi punto del liquido. L'equazione di Rayleigh-Plesset è il

modello che descrive l'oscillazione della bolla in un campo libero [8][9]:

$$\ddot{R}R + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{P(r) - P(t)}{\rho} \quad (1.2)$$

Dove $P(t)$ è la pressione esterna e $P(r)$ è la pressione al bordo. Vengono fatte le seguenti assunzioni:

- $\rho_{\text{liquido}} \gg \rho_{\text{gas}}$
- P_v (pressione di vapore all' interno della bolla) costante durante l'oscillazione
- $R < \lambda$, dove λ è la velocità del suono all'interno del liquido
- Viscosità e comprimibilità del liquido non sono considerate

Neppiras, Noltingk e Poritsky [10] hanno formulato un'ulteriore equazione per prendere in considerazione la presenza del gas all'interno, della tensione superficiale e di vapore e della viscosità del liquido:

$$\ddot{R}R + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{1}{\rho} \quad (1.3)$$

Modello di Herring

Questo modello è basato sull'*approssimazione acustica*, che assume una velocità del suono nel liquido costante ($c = c_\infty$). L'equazione assume la seguente forma [9]:

$$\ddot{R}R \left(1 - 2\frac{\dot{R}}{c_\infty}\right) + \frac{3}{2}\dot{R}^2 \left(1 - \frac{4}{3}\frac{\dot{R}}{c_\infty}\right) = \frac{1}{\rho_\infty} \left[P - p_\infty + \frac{R}{c_\infty} \dot{P} \left(1 - \frac{\dot{R}}{c_\infty}\right) \right] \quad (1.4)$$

$P = P_0 \left(\frac{R_0}{R}\right)^{3\gamma}$ è la pressione nel liquido (P_0 e R_0 sono la pressione e il raggio iniziale, γ il rapporto dei calori specifici) e p_∞ è la pressione al bordo. Si osserva che se $c \rightarrow c_\infty$ l'equazione 1.4 si riduce alla 1.3 di Rayleigh.

Modello di Gilmore

In questo modello la velocità del suono c varia con la pressione p . Al bordo della bolla $p = P$, $c = C$ e l'entalpia $h = H$. L'equazione del modello di Gilmore [9]:

$$\ddot{R}R \left(1 - \frac{\dot{R}}{C}\right) + \frac{3}{2}\dot{R}^2 \left(1 - \frac{1}{3}\frac{\dot{R}}{C}\right) = H \left(1 + \frac{\dot{R}}{C}\right) + \frac{R}{C} \dot{H} \left(1 - \frac{\dot{R}}{C}\right) \quad (1.5)$$

L'equazione 1.5 viene utilizzata per le oscillazioni di grande ampiezza. Questa equazione differisce dall'equazione di Rayleigh per il termine correttivo $\left(1 - \frac{\dot{R}}{C}\right)$ [9].

Modello di Herring modificato

La modifica consiste nell'omissione del termine correttivo $\left(1 - \frac{\dot{R}}{c_\infty}\right)$ dall'equazione di Herring.

$$\ddot{R}R + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{1}{\rho_\infty} \left(P - p_\infty + \frac{R}{c_\infty} \dot{P} \right) \quad (1.6)$$

Questo modello [9] viene utilizzato per piccole o medie ampiezze delle oscillazioni delle bolle.

1.3.2 Bolla incapsulata in un campo libero

Nelle applicazioni biomediche le bolle vengono rese più stabili inserendo una capsula di materiali di shell [11]. Il comportamento della bolla, viene influenzato dalle proprietà chimiche dei materiali della capsula.

Doinikov e Dayton hanno effettuato uno studio su una bolla di gas incapsulata per valutarne le differenze di comportamento con la bolla libera. Si considera una bolla con strato incapsulante costituito da solido elastico incomprimibile con smorzamento viscoso e liquido di Newton come mezzo circostante. Viene rappresentata nella figura 1.4.

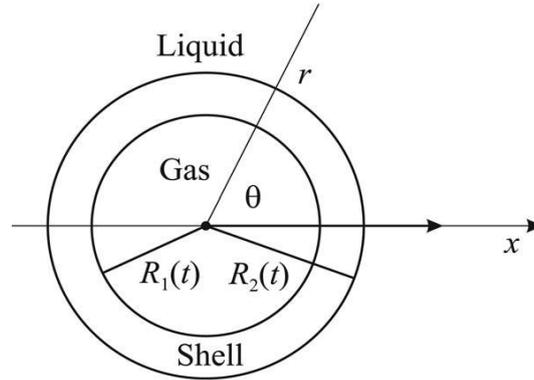


Figura 1.4: Rappresentazione di una bolla incapsulata [12]

Questo è il modello di Church che consente il movimento di traslazione della bolla e le perdite di radiazione (nel caso di uso degli ultrasuoni) dovute alla compressibilità del liquido circostante. Le bolle incapsulate risultano essere più rigide e sono caratterizzate da frequenze di risonanza maggiori con minori effetti lineari. I materiali di shell aumentano la viscosità della bolla e causano maggior calore dovuto alla trasformazione dell'energia acustica. Il modello viene descritto dall'equazione [12]:

$$\rho_L \left(R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 \right) = \left(P_{g0} \frac{R_0}{R} \right)^{3\gamma} - \frac{2\sigma}{R} - P_0 - P_{ac} - 4\eta_L \frac{\dot{R}}{R} - 12\eta_L R_S \frac{\dot{R}}{R^2} - 12\eta_S R_S \frac{R_0}{R} - \left(\frac{1}{R_0} - \frac{1}{R} \right) \quad (1.7)$$

dove R è il raggio esterno della bolla, η_S è la viscosità di taglio della capsula, η_L viscosità del liquido, γ è il rapporto di calore specifico, P_{g0} è la pressione del gas all'interno della bolla. Le tensioni di superficie delle interfacce sono indicate con σ_1 e σ_2 e $\sigma = \sigma_1 + \sigma_2$ è la loro somma.

Jong ha sviluppato un'equazione praticamente identica con l'aggiunta di due parametri che determinano l'influenza della capsula:

- Coefficiente di rigidità $S_P = \frac{E_t}{1-\mu}$
- Termine di smorzamento $\delta_t = \frac{(4\mu)}{\omega\rho_0 R^2} + \frac{\omega R_0}{c} \frac{1}{1+\left(\frac{\omega R_0}{c}\right)^2} + \frac{S_P}{4\pi R^3 \rho \omega}$

L'equazione risulta quindi essere:

$$\rho R \ddot{R} + \frac{3}{2} \dot{R}^2 = \frac{1}{\rho} P_{g0} \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3\gamma} + P_v - \frac{2\sigma}{R} - P_0 - P(t) - S_P \left(\frac{1}{R_0} - \frac{1}{R} \right) - \delta_t \omega \rho R \dot{R} \quad (1.8)$$

Il valore $S_P \left(\frac{1}{R_0} - \frac{1}{R} \right)$ riguarda la tensione superficiale. Assume valori positivi nel caso di bolle incapsulate, valore 0 per bolle piene di gas e valori negativi per agenti tensioattivi. Il termine $\delta_t = \delta_f + \delta_{vis} + \delta_{th} + \delta_{ra}$ è relativo allo smorzamento della viscosità generato dall'attrito tra le molecole [13]. Il termine di smorzamento tiene conto anche dello spessore del guscio. Il modello di Chatterjee e Sarkar presume una reologia newtoniana con viscosità superficiale e tensione superficiale che si concentrano all'interfaccia. L'incapsulamento è modellato come un'interfaccia complessa di uno spessore infinitesimale [11]. Si fa l'assunzione che il guscio comprenda diversi strati e, come già detto, di spessore infinitesimale. La dinamica può quindi essere descritta come:

$$\rho \left(R \ddot{R} + \frac{3}{2} \dot{R}^2 \right) = P_{g0} \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3k} - 4\mu \frac{\dot{R}}{R} - \frac{2\gamma}{R} - \frac{4k^s \dot{R}}{R^2} - P_0 + P_{driv}(t) \quad (1.9)$$

Il gas che è contenuto nella bolla segue una legge di tipo politropico per cui $P_g = P_{g0} \left(\frac{R}{R_0} \right)^{3k}$, dove k è l'esponente caratteristico della trasformazione e può assumere qualsiasi valore tra 1,0 e γ , a seconda che sia una trasformazione isoterma o adiabatica.

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

Viene studiata la dinamica delle bolle nei vasi sanguigni. E' stato osservato che, contrariamente alla tipica espansione prolungata e ai violenti collassi inerziali di bolle indotti da SWL (Shockwave in lithotripsy) in un campo libero, l'espansione della bolla all'interno del fantoccio del vaso è significativamente limitata. Questo porta ad un allungamento asimmetrico delle bolle lungo l'asse del vaso e ad un collasso molto indebolito [14]. Uno studio recente ha dimostrato che, a causa dell'espansione limitata, il collasso di una bolla di cavitazione in un tubo di silicone è indebolito rispetto al collasso di una bolla non costretta in un campo libero [14]. Nello studio di Hay [15] vengono presi in considerazione due bordi elastici e paralleli con moduli immersi in un liquido comprimibile, posizionato perpendicolarmente all'asse z e separati da una distanza $z_2 - z_1$. Il loro spessore è rispettivamente h_1 e h_2 . Il modello è rappresentato nella figura 1.5 nella pagina seguente, dove $\mu_1 \mu_2$ sono i moduli di taglio, h_1 e h_2 sono gli spessori finiti. Gli strati sono stati immersi in un liquido incomprimibile. Il modello è descritto dall'equazione [15]:

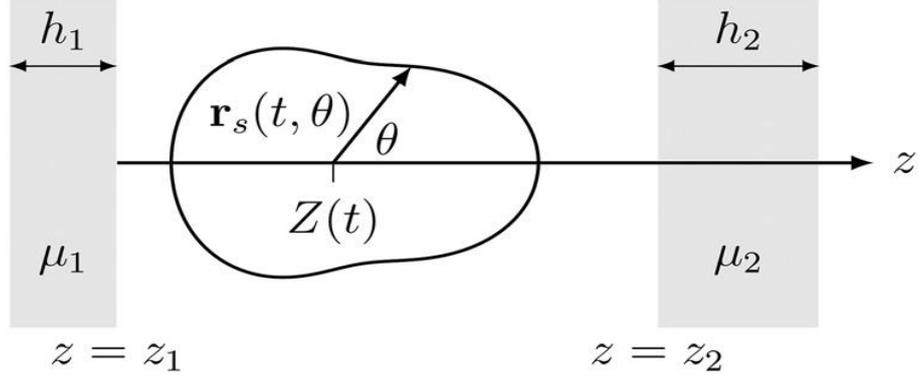


Figura 1.5: Geometria di una bolla sferica con perturbazioni di forma tra due pareti [15]

$$\begin{aligned}
 R_e \ddot{R}_e^2 + \frac{3}{2} \dot{R}_e^2 &= \frac{P_1}{\rho} + \frac{1}{4} U^2 + \frac{1}{2} \left(\frac{s_2^2}{3} \frac{s_3^2}{4} \right) + \frac{s_2 \ddot{s}_2}{15} + \frac{s_3 \ddot{s}_3}{14} \\
 &+ \frac{\dot{R}_e^2}{R_e^2} \left(\frac{s_2^2}{15} \frac{s_3^2}{4} \right) + \frac{2 \dot{R}_e}{R_e} \left(\frac{2 s_2 \dot{s}_2}{15} + \frac{s_3 \dot{s}_3}{7} \right) - \frac{11}{70} \frac{s_2 s_3 \dot{U}}{R_e} \\
 &- \frac{U}{R_e} \left(\frac{1}{5} s_2 \dot{s}_3 + \frac{3}{14} \dot{s}_2 s_3 \right) - \frac{U^2}{10 R_e} \left(s_2 + \frac{17}{98} \frac{s_3^2}{R_3} - \frac{9}{70} \frac{s_2^2}{R_2^2} \right) \\
 &- \sum_{j=1}^2 \frac{\beta_j}{2} \left[\frac{R_e^3}{(Z - z_j)^4} - \frac{4 R_0^3}{(Z_0 - z_j)(Z - z_j)(Z_0 + Z - 2 z_j)^2} \right]
 \end{aligned} \tag{1.10}$$

dove β_j è un parametro che dipende solo dal materiale e dallo spessore di ogni strato elastico, il pedice j è il numero degli strati elastici, P_1 è la pressione nel liquido al bordo della bolla, R_e è la distanza dal centro della bolla al bordo, $s_{2,3}$ sono coefficienti di dilatazione dipendenti dal tempo e U è la velocità della bolla.

Gli agenti di contrasto a ultrasuoni a microbolle all'interno del flusso sanguigno migliorano i segnali ecografici del letto vascolare e sono ampiamente utilizzati nell'ecografia diagnostica. Più recentemente, è stato dimostrato che le microbolle possono anche essere potenzialmente utilizzate nel trattamento delle malattie. Alcune di queste potenziali applicazioni terapeutiche comprendono il potenziamento della deposizione di energia nei tessuti, la lisi della membrana cellulare, il rilascio di farmaci e geni nelle cellule in vitro e in vivo e l'apertura della barriera emato-encefalica (BBB) localmente e temporaneamente per la consegna mirata di farmaci e geni. Quando una bolla viene posizionata all'interno di un tubo, l'ambiente circostante confina con il comportamento e la risposta della bolla, e questo è stato mostrato numericamente e sperimentalmente in letteratura. Il modello di Hosseinkhah e Hynynen nella figura 1.6 nella pagina successiva viene utilizzato per studiare l'influenza dei parametri acustici, le proprietà del vaso, le dimensioni del vaso e della bolla, le sollecitazioni meccaniche della parete del vaso [16].

L'equazione di Navier Stokes descrive il moto del sangue [16]:

$$\rho \left(\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + \mathbf{v} \nabla \mathbf{v} \right) = -\nabla p + \mu \nabla^2 \mathbf{v} \tag{1.11}$$

dove ρ è la densità del fluido [$\frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$], v è la velocità del fluido [$\frac{\text{m}}{\text{s}}$], p è la pressione in [Pa] e infine la

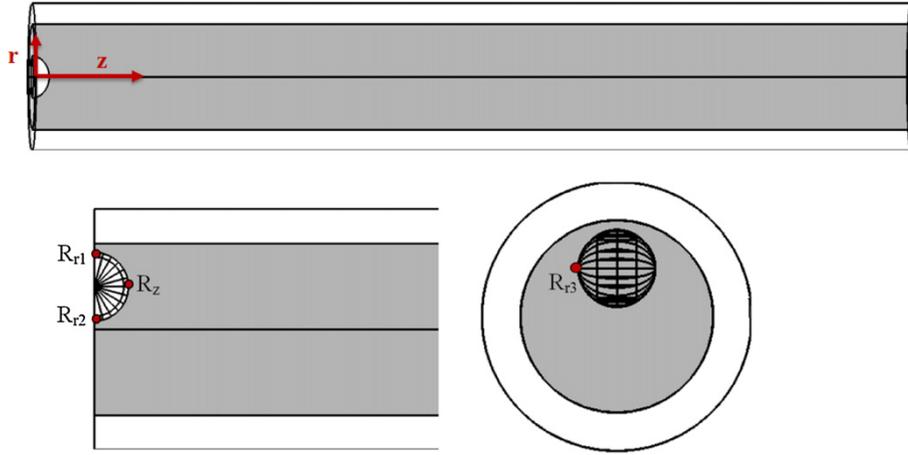


Figura 1.6: Illustrazione schematica della geometria tridimensionale della bolla, del sangue e dei microvasi [16]

divergenza è $\Delta \mathbf{v} = \frac{\partial V_x}{\partial x} + \frac{\partial V_y}{\partial y} + \frac{\partial V_z}{\partial z}$.

L'oscillazione di una bolla segue la seguente equazione:

$$P_L = \left(P_0 + \frac{2\sigma}{R_0} - P_V \right) \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3k} + P_V - \frac{2\sigma}{R} - \frac{4\nu\dot{R}}{R^2} - \frac{4\kappa_s\dot{R}}{R^2} = 4\chi \left(\frac{1}{R_0} - \frac{1}{R} \right) - P(t) \quad (1.12)$$

dove P_v è la pressione del vapore, κ_s è la viscosità del bordo della bolla [kgs^{-1}], χ è l'elasticità del bordo [Nm^{-1}], σ è la tensione di superficie [Nm^{-1}], R_0 è il raggio di partenza.

1.3.4 Dinamica di una bolla nei fluidi viscoelastici

Allen e Roy hanno approfondito l'oscillazione non lineare di una bolla di gas sferica in un fluido viscoelastico. L'equazione di Rayleigh-Plesset per una bolla di gas [17] può essere scritta in una forma generale, 1.13, che include il tensore di stress del liquido.

Questa equazione descrive il movimento di una bolla sferica simmetrica di raggio $R(t)$ in un fluido incomprimibile di densità ρ soggetto a una tensione statica superficiale $\hat{\sigma}$, una pressione interna del gas p_i e una pressione ambiente p_∞ . Per il caso viscoelastico lineare bisogna solo considerare la componente di sollecitazione radiale.

$$R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{1}{\rho_0} \left[p_i - p_\infty - \frac{2\hat{\sigma}}{R} - 3 \int_R^\infty \frac{\tau_{rr}}{r} dr \right] \quad (1.13)$$

Questa formula è accoppiata ad un'equazione costitutiva per il fluido che a sua volta collega il tensore dello stress radiale, τ_{rr} , alle deformazioni spaziali nel fluido. Per il fluido viscoelastico si considera solo la componente radiale delle sollecitazioni. Il modello lineare di Jeffrey è stato scelto come equazione costitutiva.

$$\tau_{rr} + \lambda_1 \frac{\partial \tau_{rr}}{\partial t} = -2\eta_0 \left(\dot{\zeta} + \lambda_2 \frac{\partial \zeta}{\partial t} \right) \quad (1.14)$$

Dove

$$\dot{\zeta} = \frac{\partial u}{\partial r} = -\frac{2\dot{R}R^2}{r^3} \quad (1.15)$$

$$u = \frac{\dot{R}R^2}{R^2} \quad (1.16)$$

λ_1 è il tempo di rilassamento, λ_2 è il tempo di ritardo, ζ è il tasso di deformazione, η_0 è la viscosità.

1.3.5 Dinamica di una bolla vicino all'interfaccia

Gibson e Blake hanno dimostrato che il collasso delle bolle dipende dalla natura degli strati vicini. Quindi è necessario studiare il comportamento delle bolle nei pressi dell'interfaccia [18], figura 1.7.

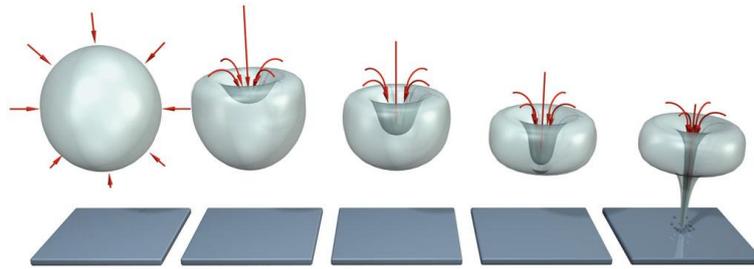


Figura 1.7: Collasso di una bolla di cavitazione vicino ad una interfaccia acustica. Il getto è diretto verso l'interfaccia con velocità fino a diverse centinaia di m/s. Questo contribuisce all'erosione e alla frammentazione del tessuto.

Più recentemente, Kodama e Tomita hanno studiato il comportamento delle bolle vicino ad una superficie di gelatina ed è stato dimostrato che il collasso non ha prodotto un getto significativo di liquido verso la superficie. Il modello studiato da Blake, Kodama, figura 1.8, si pone di studiare sia teoricamente che sperimentalmente la dinamica della bolla.

E' stato dimostrato che la forma della bolla cambia in modo significativo durante l'ultima fase del

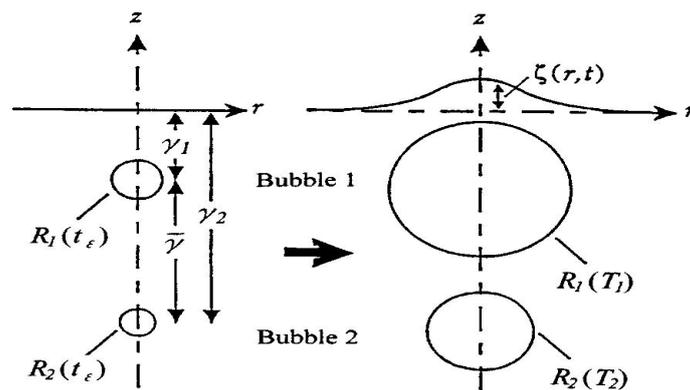


Figura 1.8: Illustrazione schematica della geometria assiale per il movimento di due bolle di cavitazione verso una superficie libera.

collasso; forma un getto liquido diretto lontano dalla superficie libera e penetra attraverso il suo interno [19]. Il picco di superficie continua a spostarsi verso l'alto, raggiungendo un'altezza pari al raggio massimo della bolla. La formazione del getto è indotta dalla regione ad alta pressione che si forma in seguito alla maggiore mobilità del fluido durante il collasso. Nella figura 1.9a è mostrata l'interazione

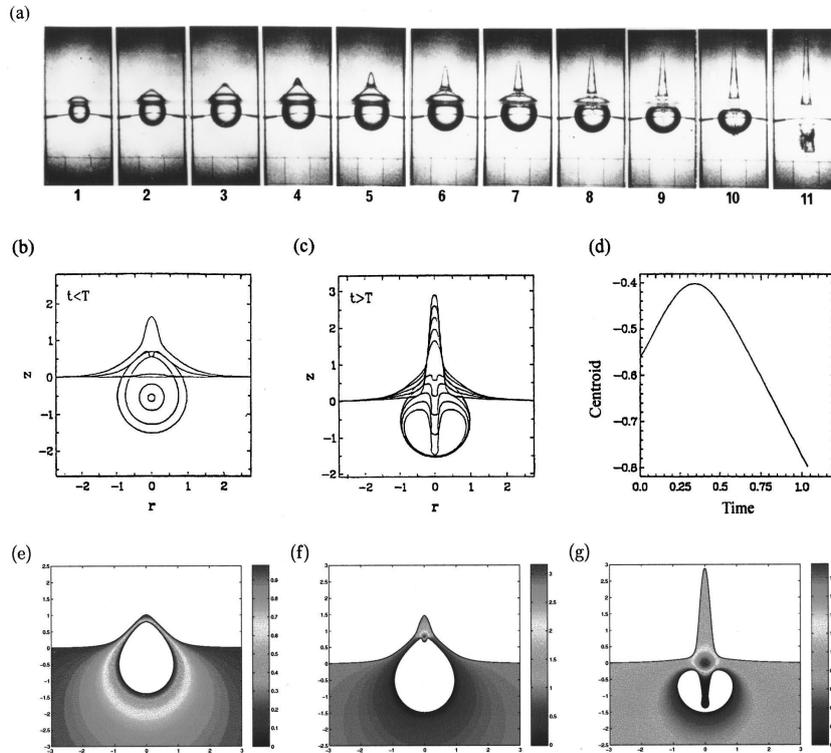


Figura 1.9: Interazione bolla-superficie libera

bolla-superficie libera per una cavità generata circa a metà del suo raggio massimo rispetto la superficie libera. Solo in questo caso le bolle sono generate da una scarica elettrica con conseguente movimento della superficie libera. In *b* sono riportati profili teorici di superficie che mostrano la formazione di picchi di superficie libera durante la crescita della cavità e in *c* durante la fase di collasso. In *d* si riporta il movimento del centroide della cavità. È chiaro che lo sviluppo del picco di superficie libera e del getto di liquido prima della conclusione della fase di espansione si verifica a causa dell'elevato grado di deformazione della superficie insieme alla cavità che viene trascinata nella base della superficie libera elevata [19].

Sankin e Zhong [20] hanno invece effettuato sul comportamento della bolla vicino un confine elastico. La dinamica di un'oscillazione indotta da laser, figura 1.10 nella pagina successiva può essere caratterizzata dalla traslazione della bolla e dalla seguente formazione di un getto di liquido verso il confine. Si è notato che la bolla ha collassato completamente con microgetto che ha penetrato la bolla vicina e la membrana. Durante il collasso, il bordo elastico viene attratto verso la bolla e avvia un getto anulare. Il getto penetrante nell'adiacente membrana elastica dipende da importanti parametri, che possono essere descritti

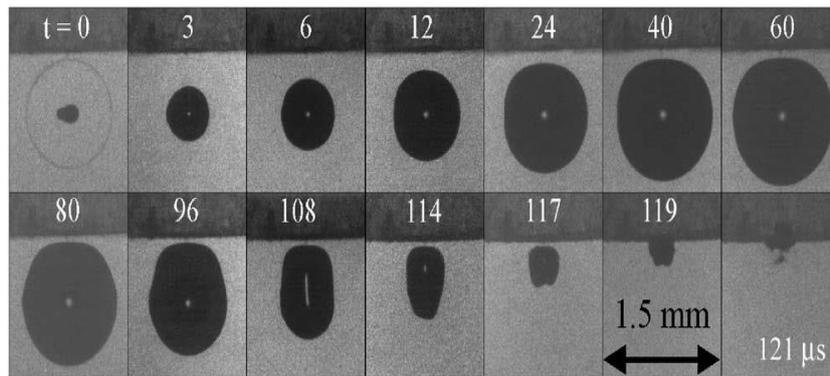


Figura 1.10: Dinamica di un'oscillazione di una bolla indotta da laser [20]

genericamente da $H = f(\alpha, \nabla, G_b, E)$ dove G_b rappresenta le caratteristiche geometriche della bolla, E è il modulo elastico della membrana [20]. Durante l'interazione dell'onda d'urto vicino il bordo elastico, la forza imposta alla bolla viene determinata da $F_b = -V\nabla P_S W + F_B$. Il primo termine rappresenta la forza di radiazione prodotta dall'onda d'urto e il secondo termine è la forza mutua dovuta dagli effetti di bordo.

1.4 Nanobolle

Le *microbolle* [21], a causa delle loro dimensioni dell'ordine dei μm , non sono in grado di migrare passivamente attraverso le pareti dei vasi sanguigni ma rimangono in circolazione fino a quando non vengono assorbite dalla milza e dal fegato. Inoltre, le microbolle hanno limitazioni nell'attraversare la vascolarizzazione del tumore. Il passaggio dei vasi tumorali è consentito a particelle con un diametro di circa 400 nm-600 nm. Per superare questa limitazione, sono state progettate formulazioni dell'ordine di nm per il rilascio di farmaci. L'utilizzo di nanocarrier nel microcircolo tumorale permette di avere l'effetto di permeabilità e ritenzione (EPR).

Le strategie di caricamento di macrobolle proposte fino ad ora sono:

- caricamento dei farmaci nel nucleo
- caricamento dei farmaci all'interno della shell attraverso interazioni covalenti o non covalenti

Pertanto, gli MB possono fungere da serbatoio e le proprietà chimiche del farmaco possono influenzare la cinetica di rilascio.

Per rendere le bolle stabili e prevenire la loro coalescenza o dissoluzione nella circolazione, si usa un rivestimento di uno strato stabilizzante [22]. I sistemi di rilascio di farmaci incorporano anche farmaci sul rivestimento o al suo interno. Il rivestimento agisce sulla dinamica della bolla. Tipicamente ci sono due tipi di rivestimenti:

- rivestimento flessibile: composto da fosfolipidi con incapsulamenti solidi. Il rivestimento fosfolipidico ha uno spessore di qualche *nanometro*.

- rivestimento rigido ha spessore di circa decine di *nanometri*.

Il rivestimento viscoso aumenta lo smorzamento di un fattore 5. Tuttavia, gli effetti inerziali dominano il comportamento delle nanobolle per intervalli di pressione rilevanti per le applicazioni di rilascio di farmaci. Nel caso di rivestimento rigido, la dinamica dell'oscillazione è determinata dalla proprietà della capsula. Nel caso di nanobolle con rivestimento composto da polimeri reticolati biodegradabili e fosfolipidi, il processo di autoassemblaggio a partire da vescicole liquide, prevede i seguenti passaggi:

- deposizione di un monolayer di fosfolipidi attorno ad una gocciolina di perfluorocarbene
- aggiunta di un polimero idrofilo
- fotopolimerizzazione dei radicali liberi

Queste vescicole liquide, in presenza di ultrasuoni, potrebbero subire una transizione da liquido a gas, trasformando così le vescicole polimeriche in bolle di micro e nano dimensioni.

Capitolo 2

Le onde d'urto

2.1 Proprietà fisiche

L'onda d'urto è una perturbazione transitoria, che si propaga nelle tre dimensioni dello spazio. Una caratteristica tipica dell'onda d'urto è il breve tempo di risalita dell'ordine di alcuni nanosecondi con cui raggiunge una pressione di picco fino a 100 MPa o 1000 volte la pressione atmosferica.

Nella propagazione degli ultrasuoni vi è trasferimento di energia e non di particelle, in quanto queste ultime oscillano intorno la loro posizione di equilibrio con trasferimento di energia tra le particelle. Tutte le onde acustiche nel propagarsi attraverso un fluido, perdono una piccola frazione della loro energia: questa perdita di energia viene definita assorbimento. L'assorbimento del suono è maggiore dalle forme d'onda con forti pendenze. Nel caso di un'onda d'urto in cui la pendenza tende verso l'infinito, anche l'assorbimento tenderà verso l'infinito. L'onda quindi non raggiungerà mai una pendenza infinita, ma invece si raggiungerà un equilibrio tra distorsione non lineare e assorbimento che si tradurrà in un cambiamento repentino della pressione in brevissimo tempo [23]. Questo tempo viene chiamato *tempo di risalita* e per un'onda d'urto nell'acqua si esprime come:

$$T_{rt} = \frac{5}{\Delta P} [ns] \quad (2.1)$$

Dove ΔP è il salto di pressione misurato in MPa e T_{rt} è il tempo di risalita, misurato in [ns], che indica il tempo necessario per passare dal 10% al 90% di ΔP [23].

La velocità di propagazione di un'onda d'urto dipende dal mezzo in cui si trasmette e dall'intensità dell'onda d'urto stessa. Lo spessore del fronte d'onda è la dimensione spaziale fra la posizione dove persiste la pressione ambientale e quella dove si raggiunge la massima ampiezza di pressione. Nei tessuti viventi può variare tra 1,5 e 6,0 μm .

Si parla di ultrasuoni quando la frequenza dell'onda acustica è maggiore di 16000 oscillazioni al secondo. L'oscillazione molecolare si può propagare in diverse direzioni:

- onde trasversali: direzione di propagazione perpendicolare al mezzo

- onde longitudinali: direzione di propagazione parallelo al mezzo.

Le prime possono propagarsi solo in mezzi solidi [2], perché si vengono a formare legami deboli tra atomi e molecole; mentre le onde longitudinali possono propagarsi in qualsiasi mezzo. Gli ultrasuoni sono onde longitudinali e in particolare, l'onda d'urto consiste di un singolo impulso di pressione positiva seguito, nel giro di pochi microsecondi, da un decremento esponenziale ad un valore negativo di pressione, per poi riportarsi ai valori normali della pressione ambientale, figura 2.1. La pressione negativa è uno dei tratti distintivi di un'onda d'urto, dell'ordine del 10% della massima pressione positiva e può causare effetti cavitazionali.

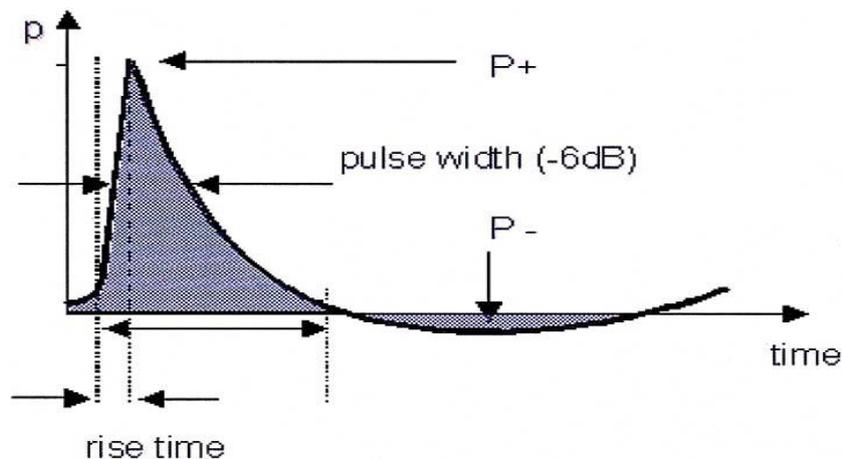


Figura 2.1: Andamento pressorio di singola onda d'urto. Fase con pressione positiva corrisponde all'onda d'urto, quella a pressione negativa corrisponde all'ultrasuono

La trasmissione dell'onda acustica nei gas e nei liquidi avviene longitudinalmente. Se le impedenze delle pareti che costituiscono il mezzo di propagazione dell'onda sono differenti, una parte dell'energia dell'onda viene riflessa. La diffrazione è invece il fenomeno che vede indebolirsi l'onda trasmessa all'interfaccia di due mezzi.

In un fluido, le onde d'urto si propagano secondo una serie di superfici isobare (figura 2.2 nella pagina successiva), caratterizzate dall'insieme dei fronti d'onda generati. Tali onde, attraversando il fluido, generano delle differenze pressorie, responsabili della formazione delle bolle di gas[18]. L'emissione della pressione viene diretta verso un fuoco della parabola: in quest'area vi è la massima energia che proviene da diversi punti e si concentra in quella zona. La depressione che si produce sul lato interno della superficie isobara procede in una certa direzione e consente un rapido passaggio alla fase gassosa dell'acqua, con chiusura del film acquoso e formazione di una bolla (*effetto cavitazionale*). Come già detto, il collasso asimmetrico della bolla provoca la formazione di un getto d'acqua che viene accelerato enormemente dal campo di bassa pressione presente all'interno della bolla. Il danno tissutale sarà massimo nel punto focale.

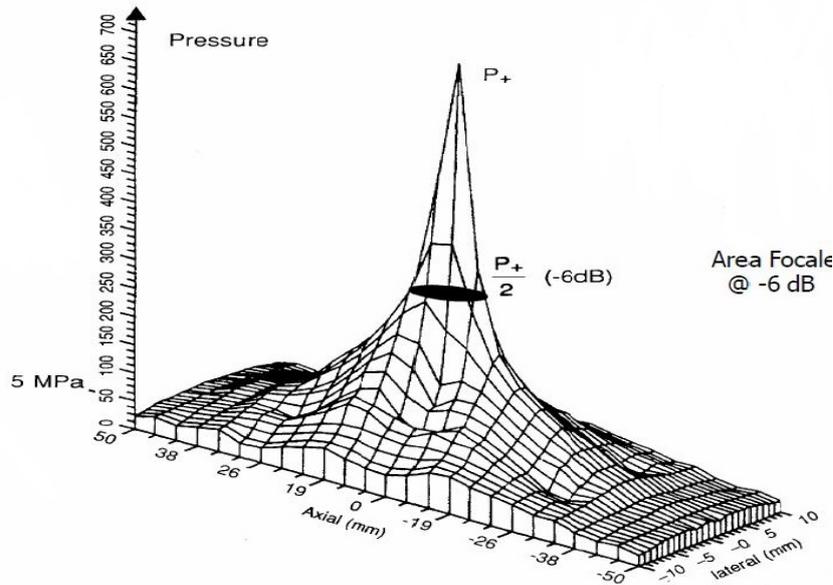


Figura 2.2: Curva di distribuzione tridimensionale di un'onda d'urto

2.2 Tecnologia delle onde d'urto

Gli effetti biologici che producono le onde d'urto sono importanti, mentre, quelli termici, sono irrilevanti in quanto la durata dell'impulso solitamente è molto breve ($3.0 - 5.0 \mu s$). Numerosi parametri vengono usati per descrivere le onde d'urto.

L'energia totale è determinata da:

$$E = [A - \rho c] \int p^2(t) dt \quad (2.2)$$

Dove l'integrale è l'area al di sotto della curva p (figura 2.1 nella pagina precedente), A è l'area della superficie dell'onda, ρ è la densità media, c è la velocità di propagazione nel fluido e t il tempo. Questa equazione non tiene conto se l'energia è concentrata in un'area piccola (focus) o è diffusa su una superficie maggiore [24]. Bisogna quindi, aggiungere un parametro per descrivere il focus (figura 2.2). Un parametro comune per descrivere le onde d'urto è il *flusso di densità di energia* (EFD), anche chiamato *densità di energia*. La *densità di energia* è la quantità di energia in un millimetro quadro del campo del punto focale ed è misurato in $mJ mm^{-2}$. Una stessa quantità di energia depositata in un punto focale, ha una maggiore densità di energia quando il punto è focale è piccolo.

La zona focale del litotritore è stato dimostrato essere ellissoidale con la dimensione più lunga lungo l'asse dell'onda d'urto. La lunghezza e il diametro della zona focale dipendono dalla sorgente, dalla lunghezza focale e dal contenuto in frequenza dell'onda. La zona focale è comunque diversa per tutti i litotritori. Per una sorgente acustica focalizzata che genera una forma d'onda sinusoidale, esistono delle espressioni che regolano la dimensione della zona focale. I parametri critici sono la lunghezza d'onda λ

[m] e l'angolo di apertura α :

$$\alpha = \arcsin\left(\frac{D}{2F}\right) \quad (2.3)$$

D è il diametro della sorgente e F la lunghezza focale. La lunghezza focale e il diametro focale sono determinati rispettivamente da:

$$L_{FZ} = \frac{0,6\alpha}{\sin^2(\alpha)} \quad (2.4)$$

$$D_{FZ} = \frac{0,7\lambda}{\sin \alpha} \quad (2.5)$$

Quindi la zona focale si accorcia e si restringe al diminuire della lunghezza focale della sorgente. Pertanto, al fine di creare una piccola zona focale, è necessaria una sorgente con grande diametro e lunghezza focale ridotta [23] [25].

Il flusso di densità di energia $I = \frac{1}{Z} \int p^2(t) dt$, è una misura dell'energia media. Dove p è la pressione e Z l'impedenza acustica del mezzo. L'intensità istantanea [W/cm^2], indipendente dal tempo, si calcola omettendo l'operazione di integrale:

$$I = \frac{p^2}{Z} \quad (2.6)$$

Dove $Z = \rho_0 c_0$ e per l'acqua assume il valore $1,5 \times 10^{-6} \text{ kg m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A piccole differenze di impedenza acustica (Z_2 e Z_1), si perdono piccole quantità di energia per riflessione o assorbimento.

Il rapporto tra intensità riflessa e trasmessa è dato da [25]:

$$EFD_{\text{reflected}} = EFD_{\text{in}} \left(\frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} \right) \quad (2.7)$$

e l'energia trasmessa :

$$EFD = EFD_{\text{in}} 4 \left(\frac{Z_2 Z_1}{Z_2 + Z_1} \right)^2 \quad (2.8)$$

L'impedenza acustica deve essere considerata quando si pianifica una terapia ad onde d'urto. L'onda riflessa cambia fase di 180° quando colpisce una superficie di bassa impedenza acustica. Le onde di trazione possono causare effetti cavitazionali e avere un forte potenziale dirompente creando la possibilità di danni superficiali pleuriche o intestinali.

Nel caso in cui l'onda di compressione è diretta in una sola direzione, si riferisce a un'onda progressiva. Invece, l'onda acustica si muove in entrambe le direzioni, si riferisce ad un'onda composta. Per un'onda progressiva, le molecole nella regione compressa hanno anche una piccola velocità lontano dalla sorgente. La velocità netta u_a per un'onda progressiva è espressa come:

$$u_a = \frac{p_a}{\rho_0} c_0 \quad (2.9)$$

In questo caso la pressione, la densità e la velocità delle particelle non sono indipendenti, ma linearmente dipendenti tra loro:

$$p_a = u_a Z = \rho_a c_0^2 \quad (2.10)$$

Dove i coefficienti sono proprietà del materiale. Si deduce che le regioni ad alta pressione sono sempre *comprese* [23].

2.3 Comportamenti fisici delle onde d’urto

Le onde d’urto sono generate fuori dal corpo del paziente e sono indirizzate al target. Sono soggette a riflessione, diffrazione, dissipazione, assorbimento e non tutte le onde d’urto raggiungono il punto focale. Gli effetti di riflessione, diffrazione, rifrazione, scattering e attenuazione per le onde d’urto sono simili agli effetti per la propagazione della luce. La formula della rifrazione è $\frac{\sin(\alpha)}{\sin(\beta)} = \frac{n_1}{n_2}$, dove α e β sono gli angoli di incidenza della riflessione, $n_1 n_2$ gli indici della rifrazione. Per le onde d’urto, gli indici di rifrazione ottica sono sostituiti dalla velocità del suono c dei due mezzi, modificando la formula: $\frac{\sin(\alpha)}{\sin(\beta)} = \frac{c_1}{c_2}$.

La deflessione gioca un ruolo minore quando un’onda d’urto viaggia dal mezzo acquoso al corpo. Nel corpo gli angoli di deflessione dipendono dal numero di interfacce caratterizzate da velocità del suono diverse.

La natura delle onde trasmesse varia continuamente poichè ci sono differenti porosità dovute a strutture elastiche differenti dei vari tessuti. L’effetto di un’onda che viene riflessa solo in parte è l’assorbimento. L’assorbimento delle onde acustiche si verifica nei tessuti in cui sono presenti pori e cavità. L’assorbimento si verifica per attrito dell’onda d’urto propagante sulle pareti dei pori dei tessuti e gran parte dell’energia acustica viene convertita in calore. Ad esempio, le onde d’urto vengono assorbite rapidamente nell’osso spongioso ma si propagano bene nell’osso corticale.

L’attenuazione totale di un’onda acustica comprende la perdita di energia (assorbimento) e la dispersione dei tessuti. Per la maggior parte dei tessuti molli, la dispersione è trascurabile e i coefficienti di attenuazione e assorbimento sono approssimativamente uguali [26]. Al contrario, il tessuto polmonare ha il più alto coefficiente di attenuazione di qualsiasi tessuto e l’attenuazione proviene quasi interamente dallo scattering. Inoltre, a una frequenza di 1 MHz, l’osso ha il più alto assorbimento reale dei tessuti corporei, oltre 20 volte superiore a qualsiasi tessuto molle.

Quando un’onda acustica attraversa un mezzo con una diversa impedenza, parte dell’onda continua a propagarsi nel nuovo mezzo e l’altra sarà riflessa indietro verso il mezzo di origine (figura 2.3 nella pagina seguente). La massima trasmissione di un’onda ultrasonica avviene quando le impedenze dei due mezzi in questione sono uguali.

Nel caso di *incidenza normale*, dove la direzione di propagazione è perpendicolare alla superficie, l’ampiezza dell’onda trasmessa e riflessa dipende solo dal cambiamento di impedenza tra i due mezzi [27]. In termini di pressione acustica, la trasmissione è:

$$R_p = \frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} \quad (2.11)$$

Il coefficiente di riflessione:

$$T_p = \frac{2Z_2}{Z_2 + Z_1} \quad (2.12)$$

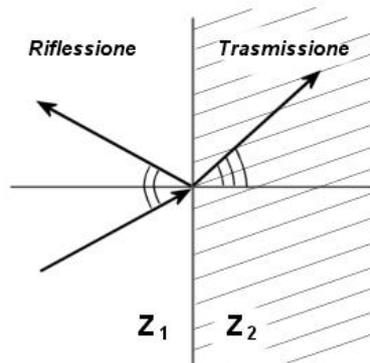


Figura 2.3: Fenomeni di trasmissione e riflessione all'interfaccia tra due mezzi.

In figura 2.4, viene rappresentato il coefficiente di trasmissione per un'onda acustica che passa dall'acqua ad un altro mezzo con diversa impedenza. Vengono indicati valori tipici per tessuti, calcoli renali, osso, aria [23]. Il coefficiente di trasmissione acqua-calcolo nella litotripsia, è elevato con il 75-95% di energia

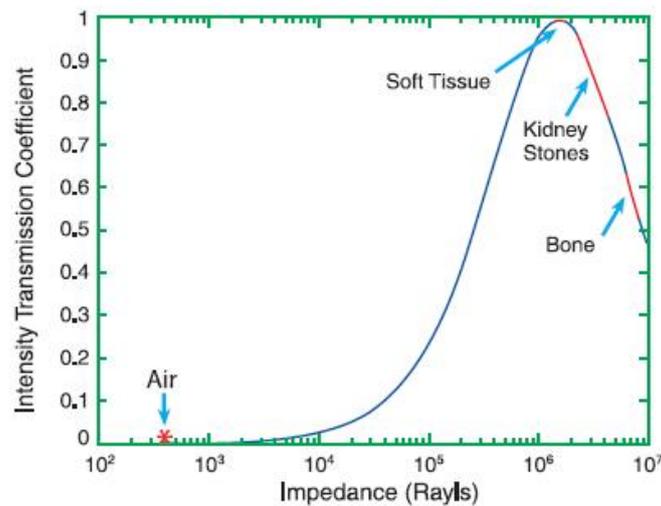


Figura 2.4: Coefficiente di trasmissione dall'acqua ad un secondo mezzo con diversa impedenza

trasmessa nei calcoli renali. Per questo motivo i generatori di onde d'urto nella litotripsia sono pieni di acqua e l'accoppiamento risulta essere più efficiente.

Un'onda di pressione piana che si propaga in direzione x assume la forma [27]:

$$p(x, t) = p_0 e^{-\alpha x} \exp\left(jw\left(t - \frac{x}{c}\right)\right) \quad (2.13)$$

dove $j = \sqrt{-1}$, $w = 2\pi\nu$ e ν la frequenza, x è la posizione e c la velocità del suono tipica di quel mezzo, α è il coefficiente di attenuazione dell'ampiezza dell'onda, p è la pressione e il pedice 0 indica il

valore della posizione iniziale ($x = 0$ m). Quando un'onda acustica di intensità I_0 incide su un tessuto disomogeneo, la potenza assorbita o diffusa dal tessuto risulta proporzionale all'intensità incidente stessa e la costante di proporzionalità è detta sezione d'urto (*cross section*) σ_a (assorbita) o σ_s (scattered, diffusa). Se si considera l'onda di potenza \dot{W} e l'area della sezione trasversale (*cross-sectional area*) A , la potenza diffusa da k strati disomogenei e assorbita da l strati disomogenei, non necessariamente uguali, risulta:

$$d\dot{W} = d\dot{W}_s + d\dot{W}_a = -\left(\sum_j h_j \sigma_{aj} + \sum_l n_l \sigma_{al}\right) \dot{W} dx = -(\mu_s + \mu_a) \dot{W} dx = -\mu \dot{W} dx \quad (2.14)$$

Si trova quindi:

$$\frac{d\dot{W}}{\dot{W}} = \mu dx \quad (2.15)$$

dove \dot{W} è la potenza dell'onda, dx è il suo cammino, μ è il coefficiente di attenuazione, s indica che è *diffuso* e a che è *assorbito*. La soluzione dell'equazione 2.15, integrata tra 0 e x :

$$\dot{W} = \dot{W}_0 e^{-\mu x} \quad (2.16)$$

Dove 0 indica la grandezza iniziale nel punto di incidenza. La relazione tra il coefficiente di attenuazione dell'ampiezza α e il coefficiente di attenuazione dell'intensità è:

$$\mu = 2\alpha \quad (2.17)$$

Si possono esprimere i due coefficienti di attenuazione in [dBcm⁻¹]:

$$\mu = -\frac{10}{x} \log_{10} \left(\frac{\dot{W}}{\dot{W}_0} \right) \quad (2.18)$$

$$\alpha = -\frac{20}{x} \log_{10} \left(\frac{p}{p_0} \right) \quad (2.19)$$

Per quanto riguarda l'utilizzo degli ultrasuoni nelle terapie termiche, è fondamentale comprendere l'effetto termico dell'interazione tra ultrasuoni e tessuti [27]. L'equazione 2.19 dell'intensità è utile per determinare il picco spaziale e temporale dell'onda, in base al quale è possibile definire l'intensità media di impulso sul picco spaziale (*Spatial Peak Pulse Avarage Intensity*) I_{SPPA} che descrive il valore massimo dell'intensità media su un singolo impulso, ed è definito come l'integrale sulla durata dell'impulso valutato nella posizione di massimo campo. L'intensità media temporale del picco spaziale I_{SPTA} , *Spatial Peak Temporal Avarage Intensity* [27], viene definita come:

$$I_{SPTA} = \frac{PD}{PRP} I_{SPPA} \quad (2.20)$$

dove PRP è il periodo di ripetizione dell'impulso, *Pulse Repetition Period*, e PD è la durata dell'impulso.

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

Index) definito come:

$$TI = \frac{\dot{W}_p}{\dot{W}_{deg}} \quad (2.21)$$

dove \dot{W}_p è la potenza acustica nella zona di tessuto di interesse e \dot{W}_{deg} è la potenza acustica necessaria per innalzare di 1 °C la temperatura del tessuto.

2.3.1 Acustica non lineare

Quando l'onda acustica ha una grande ampiezza, la velocità dell'onda non è più costante ma dipende dalla compressione locale del fluido. Per le onde d'urto *deboli* la velocità di propagazione (Phase speed) di un'onda acustica è:

$$c_{phase} = c_0 + \beta \frac{\rho_a}{\rho_0} c_0 \quad (2.22)$$

dove β è il *coefficiente di non linearità* del fluido ed è la proprietà del materiale del mezzo. Per l'acqua β vale circa 3.5, e per i tessuti varia tra 4.0 e 9.0. La *non linearità* sorge a causa di due processi fisici: in primo luogo, nelle regioni ad alta pressione, la velocità del suono locale viene aumentata al di sopra del valore normale; e in secondo luogo, le molecole nelle regioni ad alta pressione hanno una maggiore velocità delle particelle. Per il suono che viaggia attraverso i tessuti, la non linearità è determinata dal primo processo. In figura 2.5 nella pagina seguente viene rappresentata la distorsione non lineare di un'onda sinusoidale descritta dall'equazione 2.22.

La differenza tra un'onda non lineare e un'onda lineare è che, per un'onda non lineare, diverse parti dell'onda viaggiano a velocità diverse. Nel caso di un'onda sinusoidale che si propaga in modo non lineare, la sua forma si deforma. In assenza di assorbimento, l'onda ottiene una pendenza infinita e poi si piega.

I fenomeni di acustica non lineare sono importanti per applicazioni biomediche [23]. Nell'ambito delle ecografie diagnostiche, gli effetti non lineari possono creare alcuni problemi come il surriscaldamento del tessuto, ma possono essere utili in quanto migliorano la qualità nell'imaging diagnostico. Nella chirurgia ad ultrasuoni focalizzata ad alta intensità (HIFU)[28] [29], il riscaldamento dei tessuti viene sfruttato per distruggere specifiche regioni del tessuto o per far coagulare il sangue.

2.3.2 Meccanismi per generare l'onda d'urto

Le onde d'urto a scopo medico sono generate in acqua, esistono diversi metodi per generarle. Inizialmente venivano generate facendo cadere un pellet esplosivo nel fluido. Tuttavia, le onde d'urto generate da questo metodo erano incoerenti e non è stato più utilizzato. Per applicazioni cliniche l'elettricità viene utilizzata come fonte di energia per generare onde d'urto.

Esistono tre meccanismi per generare un'onda d'urto focalizzata [25]:

- Piezoelettrico, figura 2.6 a pagina 24
- Elettromagnetico

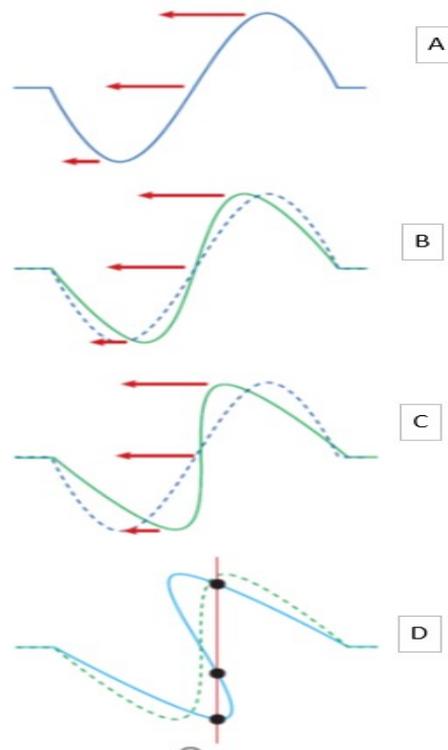


Figura 2.5: A) Forma d'onda iniziale. La lunghezza delle frecce mostra la velocità della fase locale in diversi punti. Il picco si sposterà più rapidamente. B) Forma d'onda dopo un breve tempo di propagazione (linea tratteggiata è la forma d'onda A) che mostra la distorsione. C) La pendenza della forma d'onda diventa per la prima volta infinita. D) Presenza di 3 diverse pressioni per lo stesso punto di tempo. Questa forma non è fisica, perchè l'assorbimento impedisce all'onda di piegarsi.

- Elettroidraulico

(Rispettivamente figure 2.6 nella pagina successiva, 2.7 nella pagina seguente, 2.8 a pagina 25). Questi meccanismi generano onde d'urto focalizzate mediante conversione dell'elettricità in rapidi movimenti fisici all'interno del fluido. Ciascun meccanismo utilizza un condensatore, che viene caricato a diverse tensioni e quindi scaricato rapidamente all'interno dei trasduttori acustici.

Generatori piezoelettrici

I generatori che utilizzano elementi in grado di trasformare energia elettrica in energia meccanica, sono chiamati *piezoelettrici* [25]. I cristalli piezoelettrici si espandono o si contraggono rapidamente a seconda della polarità quando viene applicata un'alta tensione. È quindi possibile generare un'onda di pressione. Nei trasduttori di onde d'urto piezoelettriche possono essere utilizzati diversi cristalli in una disposizione a singolo o doppio strato. In seguito all'applicazione di una pressione esterna, si genera una corrente elettrica, detta *corrente piezoelettrica* tra le facce opposte del cristallo. Invece, se si applica una differenza di potenziale, il cristallo si espande o contrae. In figura 2.6 nella pagina seguente il generatore

piezoelettrico Wolf ha un doppio strato di piezocristalli. La sonda al centro viene utilizzata per focalizzare l'onda d'urto alla profondità desiderata.

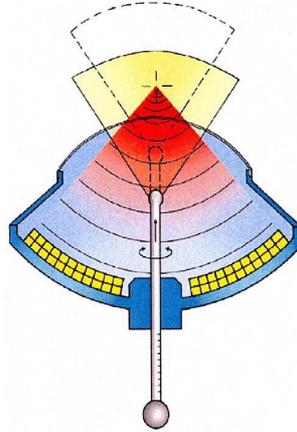


Figura 2.6: Generatore piezoelettrico

Generatori elettromagnetici

Si suddividono in due categorie:

- con bobina piatta e lente acustica di focalizzazione
- con bobina cilindrica e riflettore parabolico

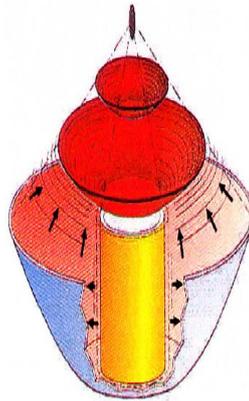


Figura 2.7: Generatore elettromagnetico

Il condensatore elettrico viene scaricato attraverso una bobina piatta che genera un campo magnetico in rapida evoluzione. Questo campo magnetico induce un campo magnetico opposto in una membrana metallica sopra la bobina, causando una forza repulsiva e un rapido movimento della membrana [25]. Il movimento della lamina metallica produce l'onda.

Generatori elettroidraulici

Il principio elettroidraulico utilizza un'alta tensione applicata su 2 punte di elettrodi immerse in un fluido. La potente scarica crea una bolla di plasma tra le punte [25]. L'acqua circostante rallenta l'espansione della bolla. Non appena la velocità di espansione scende al di sotto della velocità del suono, viene emesso un fronte d'urto. Il riflettore ellissoidale focalizza l'onda sul punto focale. Il principio elettroidraulico fu utilizzato per la prima volta in un litotritore nei primi anni '80 per applicazioni mediche.

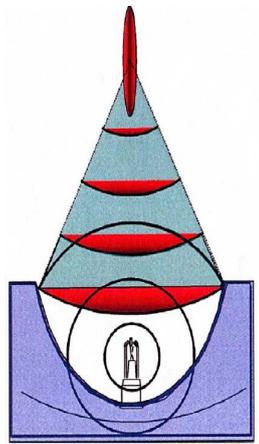


Figura 2.8: Generatore elettroidraulico

2.4 Dosimetria termica

La dosimetria è il settore della fisica e dell'ingegneria che si occupa di definire e misurare in modo accurato la dose somministrata durante una terapia o una indagine clinica [2]. Gli effetti dell'interazione delle onde elettromagnetiche con i tessuti biologici sono considerati il risultato di tre principali fenomeni:

- la penetrazione delle onde
- l'interazione primaria con i tessuti biologici
- i possibili effetti secondari prodotti dall'interazione primaria.

Le grandezze fondamentali che si introducono in dosimetria sono:

- la densità di correnti indotte [A/m^2]
- l'assorbimento specifico (SA, *Specific Absorption*) [J/kg]
- la velocità di assorbimento specifico (SAR, *Specific Absorption Rate*)[W/kg]

La determinazione di queste grandezze si basa sulla modellizzazione del corpo umano in relazione all'obiettivo che si persegue [27]. Una dose termica non adeguata può determinare il fallimento del trattamento terapeutico. Per valutare la correttezza della dose degli ultrasuoni, si prendono in considerazione la pressione acustica [MPa], l'intensità [$\frac{W}{cm^2}$] e la pressione di picco negativa nel caso di cavitazione. Tuttavia la conoscenza del valore dell'intensità non determina una misura della dose, in quanto è solo l'energia a cui il tessuto è sottoposto. Risulta necessario quindi definire la **dose** tenendo conto dell'effetto biologico e del danno causato. Si usano *tecniche sperimentali* e teoriche per definirla. Le tecniche teoriche consistono nella simulazione numerica della propagazione del fascio di ultrasuoni; le tecniche sperimentali vengono applicate su *fantocci* accoppiati con termocoppie per misurare la temperatura.

La sicurezza delle esposizioni agli ultrasuoni, viene regolata dalla norma International Electro-Technical Commission IEC 60601, 2001 [27]. Un danno meccanico della cavitazione provocato al tessuto per effetto delle bolle, viene determinato dall'*indice meccanico*, ovvero un indice di esposizione che prende in considerazione le proprietà dei tessuti. L'*indice termico* quantifica la produzione di calore e dipende dal tempo di esposizione e dalla propagazione del calore. Entrambi gli indici vengono utilizzati nelle applicazioni ad alta frequenza. Diversi studi sono attualmente in corso per verificarne l'utilizzabilità per le applicazioni a bassa frequenza.

2.5 Applicazioni biomediche

Le onde d'urto usate in applicazioni biomediche, sono disturbi transitori della pressione che si propagano rapidamente nello spazio tridimensionale. Per scopi medici, ci sono due tipi di onde d'urto:

- ESWL: extracorporeal shock wave lithotripsy
- ESWT: extracorporeal shock wave therapy

È importante sottolineare che le onde d'urto vengono modificate per uso medico formando un'onda convergente. Le onde convergenti hanno una superficie di pressione debole ed energia concentrata. Utilizzando onde convergenti il medico può ottenere l'effetto desiderato senza causare effetti collaterali significativi (ad esempio, la disintegrazione di un calcolo renale senza causare danni al rene stesso). Le *onde balistiche* si diffondono in modo radiale con conseguente perdita di energia proporzionale a $\frac{1}{r^2}$. Poiché la distanza tra la sorgente e il raggio viene raddoppiata, solo un quarto dell'energia colpisce il bersaglio[30]. L'energia è massima alla sorgente oppure quando accoppiata al tessuto, sulla superficie della pelle e si dissipa all'aumentare della distanza. Gli impulsi di pressione dei generatori balistici hanno un'ampiezza sostanzialmente inferiore e hanno un tempo di risalita e una durata dell'impulso più lunghi rispetto a un'onda d'urto focalizzata.

La membrana cellulare è la più sensibile e sono sufficienti livelli di energia pari a $0,2 \text{ mJ mm}^{-2}$ per alterarne le proprietà di permeabilità.

Il citoscheletro, i mitocondri e la membrana nucleare sono più resistenti e le alterazioni si iniziano a notare per un valore di energia pari a $0,5 \text{ mJ mm}^{-2}$.

Studi sperimentali hanno dimostrato che le alte energie sprigionate dal *jet stream*, producono alterazioni biomolecolari tali da spiegare le molteplici risposte biologiche-tissutali che si osservano in corso di trattamento, ovvero quelle angiogenetiche, citotossiche e neuromodulanti. La terapia con le onde d'urto viene applicata sempre più frequentemente in biomedicina.

Il trattamento extracorporeo delle onde d'urto, noto anche come ortotripsia, è disponibile sin dai primi anni '80 per il trattamento dei calcoli renali ed è stato ampiamente studiato per il trattamento dei calcoli biliari. ESWT utilizza onde d'urto applicate esternamente per creare un disturbo transitorio della pressione, che interrompe le strutture solide, spezzandole in frammenti più piccoli, consentendo così il passaggio e / o la rimozione spontanea di calcoli. Il meccanismo mediante il quale ESWT [31][32] potrebbe avere un effetto sulle condizioni muscolo-scheletriche non è ben definito. Si ritiene inoltre che siano coinvolti altri meccanismi. È noto che gli stimoli fisici attivano i sistemi di controllo del dolore endogeno e l'attivazione da parte delle onde d'urto può "resettare" i recettori del dolore endogeno. I danni al tessuto endoteliale da ESWT possono comportare un aumento della permeabilità della parete del vaso, causando una maggiore diffusione delle citochine, che a loro volta possono favorire la guarigione. I microtraumi indotti dall'ESWT possono promuovere l'angiogenesi e quindi aiutare nella guarigione. Infine, è stato dimostrato che le onde d'urto stimolano l'osteogenesi e promuovono la formazione insensibile negli animali, che è la logica alla base delle prove di ESWT nell'unione ritardata o nella non unione delle fratture ossee. Esistono 2 tipi di ESWT: focalizzato e radiale. L'ESWT focalizzato invia onde d'urto da media ad alta energia di impulsi a pressione singola della durata di microsecondi, dirette su un target specifico mediante ultrasuoni o guida radiografica. L'ESWT radiale (RSW) trasmette onde d'urto a bassa o media energia su una superficie più ampia.

La ESWT [33] ad alta energia è una opzione terapeutica per la pseudoartrosi, per l'algodistofia e nella osteonecrosi asettica. Viene utilizzata inoltre, nella terapia del dolore dove svolge un lavoro locale per la riduzione dello stesso.

Il trattamento ESWT è stato efficace nello stimolare la guarigione della frattura della malattia di Kienbock che è un doloroso disturbo al polso molto raro. È stato effettuato uno studio su 22 pazienti con questa malattia a vari stadi con onde d'urto ad alta energia. I risultati indicano che l'ESWT ha un effetto positivo sul dolore e può ritardare il trattamento chirurgico. Sono comunque necessari ulteriori studi per comprendere il pieno potenziale di questo strumento terapeutico. La fascite plantare è un disturbo caratterizzato da un profondo dolore a livello plantare del tallone e viene trattata con ESWT [31]. In alcuni pazienti il dolore diminuisce con l'attività, in altri pazienti, invece il dolore persiste.

I calcoli renali possono essere trattati con ESWL [14], *Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy*. Le onde d'urto focalizzate vengono utilizzate per polverizzare i calcoli renali: dopo aver attraversato la cute, entrano in contatto con il calcolo colpendolo e frantumandolo in frammenti di dimensioni minori. Quest'ultimi vengono poi smaltiti tramite le urine. Nella regione focale, un impulso del litotritore consiste in un ripido

fronte di shock compressivo seguito da una coda di espansione di durata più lunga con una pressione negativa di trazione (figura 2.9) [34]. Si presume che il calcolo renale abbia un'impedenza infinita in modo

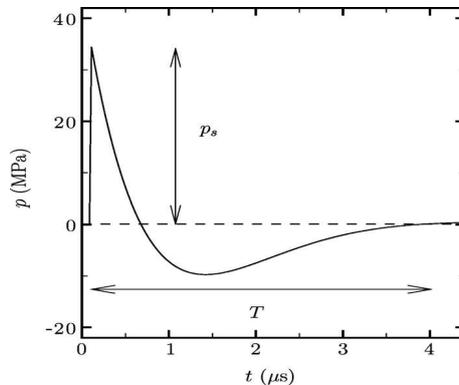


Figura 2.9: Forma d'onda di pressione di un impulso litotritore al focus

che tutte le onde siano completamente riflesse senza perdite; ciò si traduce in un raddoppio approssimativo della pressione sulla superficie del calcolo, che può essere compreso considerando il riflesso di un'onda d'urto planare in acqua su una superficie solida. Nella pratica, l'onda non è necessariamente allineata normalmente con il calcolo, quindi l'interazione tra l'onda d'urto e la bolla è un processo completamente tridimensionale.

Le onde d'urto ad alta energia HESW, vengono utilizzate nella soppressione della crescita tumorale [35][36][37].

In uno studio dell'università di Torino è stato valutato l'effetto della terapia sonodinamica con HESW sulle cellule cancerose del colon [38]. La vitalità delle cellule dopo l'esposizione a HESW, si è notato che cambiava.

Un ulteriore uso della cavitazione ad ultrasuoni è il trattamento del grafene che è un nanomateriale dalle straordinarie proprietà [39]. In particolare, con l'uso della cavitazione ultrasonica, è stata generata dall'ossido di grafene (GO) una nanodispersione di ossido di grafene ridotto RGO di pochi strati e molto stabile senza l'uso di tensioattivi e stabilizzanti. Durante l'ultrasuono, le onde d'urto causate dal collasso delle bolle generano una maggiore dispersione di energia nei fogli di grafene che supera le forze di Van der Waals e l'insieme dei legami $\pi - \pi$ favorisce la formazione di una dispersione di grafene acquosa e stabile.

L'ultrasuono ad alta intensità focalizzato, HIFU, viene utilizzato con l'obiettivo di riscaldare un volume di tessuto senza influire sul tessuto durante la propagazione degli ultrasuoni. HIFU può aumentare la temperatura di un'area selezionata fino a 55 °C, che è tipica di una necrosi coagulativa e la conseguente immediata morte delle cellule. HIFU sta ottenendo un riconoscimento clinico della sua efficacia; tuttavia, provoca complicazioni ed effetti collaterali [40][41]. Ne sono un esempio le ustioni di secondo grado riscontrate in tutti i pazienti e quelle di terzo grado riscontrate solo nel 3% dei pazienti.

Una strategia avanzata dell'uso degli ultrasuoni è la *drug delivery* che consiste nell'assorbimento da parte della cellula di farmaco caratterizzato da alto peso molecolare. In questo modo il rilascio del

farmaco risulta essere mirato. Alcuni studi hanno dimostrato la maggiore efficacia della drug delivery con l'aggiunta delle nanobolle gassose [21]. In generale, sono possibili due modalità per la drug delivery. Nell'approccio di co-somministrazione, gli agenti di contrasto ad ultrasuoni vengono iniettati nel flusso sanguigno insieme all'agente terapeutico [21]. Al contrario, l'applicazione locale degli ultrasuoni può indurre un aumento della permeabilità della membrana cellulare endoteliale, migliorando l'assorbimento dell'agente terapeutico da parte delle cellule bersaglio. Questo metodo è noto anche come *sonoporazione*: tecnica per il rilascio di agenti bioattivi a partire da nanobolle stimulate con ultrasuoni. Si basa sulla capacità delle microbolle oscillanti di generare stress a livello cellulare attraverso il microstreaming o attraverso una rapida espansione. Alcuni studi [42] [43] evidenziano un'efficienza della sonoporazione elevata mediante l'uso di nanoemulsioni (PSNE) come nuclei nella cavitazione acustica. PSNE sono nanoparticelle di perfluorocarburi liquidi (PFC) che possono cambiare fase da liquido a vapore quando esposti agli ultrasuoni in un processo chiamato *vaporizzazione di gocce acustiche* (ADV). La vaporizzazione di PSNE in funzione del picco di pressione negativa e della frequenza è stata studiata utilizzando i setup sperimentali in figura 2.10 e 2.11. I principi fisici alla base di ADV non risultano essere

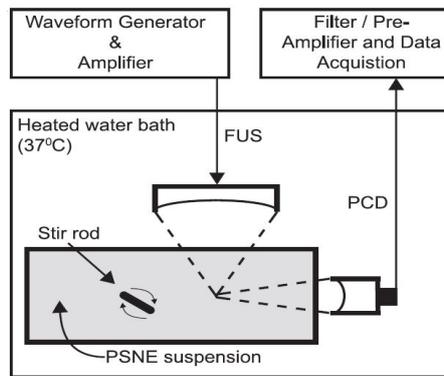


Figura 2.10: Setup sperimentale utilizzato per rilevare le emissioni acustiche dipendenti dalla frequenza durante e dopo l' ADV di PSNEs [42]

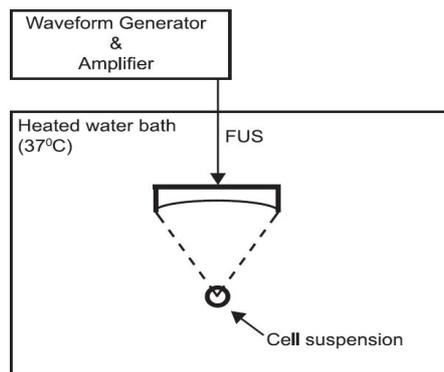


Figura 2.11: Setup sperimentale utilizzato per rilevare l'efficienza della sonoporazione [42]

completamente chiari ancora. Quando la pressione circostante è maggiore della pressione vapore, la sostanza liquida rimane nella sua forma condensata. Le onde acustiche possono modificare la pressione locale del liquido, innescando così la trasformazione di fase, da liquido a gas o vice versa [21].

2.5.1 Effetti biologici degli ultrasuoni

Le onde d'urto inducono nelle zone colpite:

- riduzione della glicolisi locale
- neoformazione dei vasi sanguigni
- riattivazione dei processi riparativi.

Tali effetti sono dovuti ad un meccanismo di azione diretto, figura 2.12, (distruzione meccanica degli aggregati inorganici), dal momento che sono soprattutto mediati da alcuni fenomeni fisici conseguenti al passaggio dell'onda nel tessuto colpito. La formazione di bolle avviene quando si generano differenze pressorie. La ridotta pressione che si produce sul lato interno della semionda consente un rapido passaggio dell'acqua alla fase gassosa con formazione di una bolla con dimensioni variabili in base all'energia sprigionata. Successivamente, un'ulteriore onda colpisce la bolla e si crea una implosione con conseguente formazione del getto d'acqua. Il getto colpisce i tessuti adiacenti e ne causa microlesioni. Gli effetti

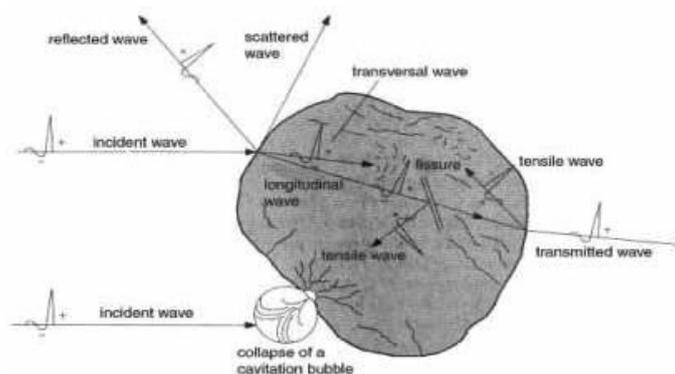


Figura 2.12: Effetti biologici delle Onde d'Urto sulla cellula

biologici degli ultrasuoni si distinguono in *termici* e *non termici*. Gli effetti termici degli ultrasuoni derivano dall'assorbimento di energia per esposizione ad onda continua; quelli non termici sono dovuti all'esposizione ad onde non continue. La presenza dell'uno determina sempre anche la presenza dell'altro. L'unica eccezione è nel caso della litotripsia, in cui l'unico effetto indotto è quello meccanico [40].

Effetti termici

Dal momento in cui l'onda ultrasonica entra in un mezzo, la sua ampiezza diminuisce e c'è una perdita di energia con conseguente attenuazione del fascio. Il calore prodotto dagli ultrasuoni, è prodotto dalle vibrazioni e dall'attrito delle strutture cellulari. I biopolimeri presenti nel mezzo possono

risentire dell'aumento della temperatura causato che dipende dall'intensità e dalla frequenza del fascio, dalle caratteristiche del mezzo e dal tempo di esposizione. L'effetto termico si sviluppa maggiormente all'interfaccia. Per quanto riguarda l'anatomia, esso si presenta a livello del periostio, che essendo in continuità con l'osso assorbe tanta energia, e della zona di passaggio tra muscolo e grasso. Gli effetti dell'innalzamento della temperatura, vengono utilizzati a scopi terapeutici, per esempio l'aumento del metabolismo cellulare, la vasodilatazione.

Effetti non termici

Consistono nella cavitazione, cioè nella formazione, crescita e collasso delle bolle quando sono soggette ad ultrasuoni. Se il campo ultrasonoro è molto intenso si parla di cavitazione acustica. Le bolle in risposta all'azione del campo acustico, possono avere diversi comportamenti. Nella *diffusione rettificata* la bolla tende a aumentare le sue dimensioni, questo avviene ad intensità acustiche minori e con conseguente produzione di cavità. Invece la *cavitazione non inerziale* avviene con campi ultrasonori continui e si ritiene utile nell'utilizzo terapeutico oppure in ecografia. Come già detto, il collasso della nanobolla provoca una grande emissione di energia che determina il raggiungimento di pressioni e temperature molto alte che determinano la formazione degli *hot spot* con eventuali danni ai tessuti. Le temperature raggiunte sono di circa 5000 K, le pressioni circa $1,013 \times 10^8$ Pa. Inoltre, le variazioni istantanee dei parametri quali densità, pressione, temperatura causano onde *shock* che possono essere molto intense. Le bolle molto piccole hanno un'alta tensione superficiale e di conseguenza l'espansione viene limitata, invece le bolle più grandi hanno maggiore libertà di espansione ma ne deriva un collasso non violento. Quando il comportamento è *violento* si vengono a formare i *radicali liberi* caratterizzati da un'alta reattività che agiscono sulle catene polimeriche. I ROS sono i radicali liberi contenenti ossigeno che vengono prodotti dalla sonolisi dell'acqua. La formazione di radicali liberi, provoca effetti biologici sul DNA in quanto vengono spezzati i legami chimici anche per l'impatto del jet stream e per gli sforzi di taglio prodotti dalle vibrazioni. I radicali liberi agiscono anche tramite la destrutturizzazione delle membrane: il doppio strato lipidico viene modificato, figura 2.13 nella pagina successiva. Inoltre le basi azotate risentono dello stress ossidativo dei radicali liberi e si modificano. Dall'uso degli ultrasuoni con le proteine, si può avere la formazione di strutture amiloidi. Un'ulteriore conseguenza è il cambiamento nella struttura secondaria della proteina (*unfolding*).

2.6 Tubo d'urto

Al fine di studiare le onde d'urto, viene utilizzato il dispositivo *Shock tube*. Consiste in un lungo tubo chiuso ad entrambe le estremità ed è separato in due parti da una fine membrana. Le due parti sono caratterizzate da alta e bassa pressione. La prima, ad alta pressione dell'ordine di MPa, è chiamata *driver section*. Quella a bassa pressione solitamente minore della pressione atmosferica, *driven section*, è dell'ordine di pochi kPa. Il contatto della superficie tra parte ad alta e bassa temperatura è rappresentato dalla linea tratteggiata in figura 2.14(b). Il procedimento in cui la *driven section* viene svuotata dal gas fino ad arrivare ad una certa temperatura, viene utilizzato per produrre onde d'urto. Quando c'è

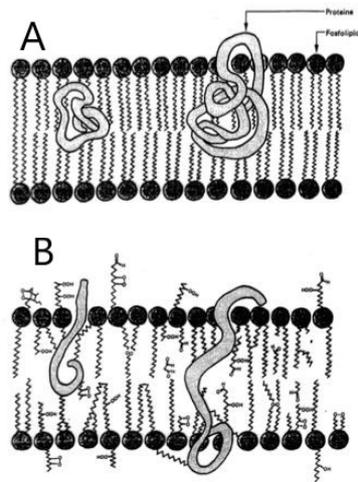


Figura 2.13: A) Membrana integra B) Membrana destrutturale per opera degli ultrasuoni.

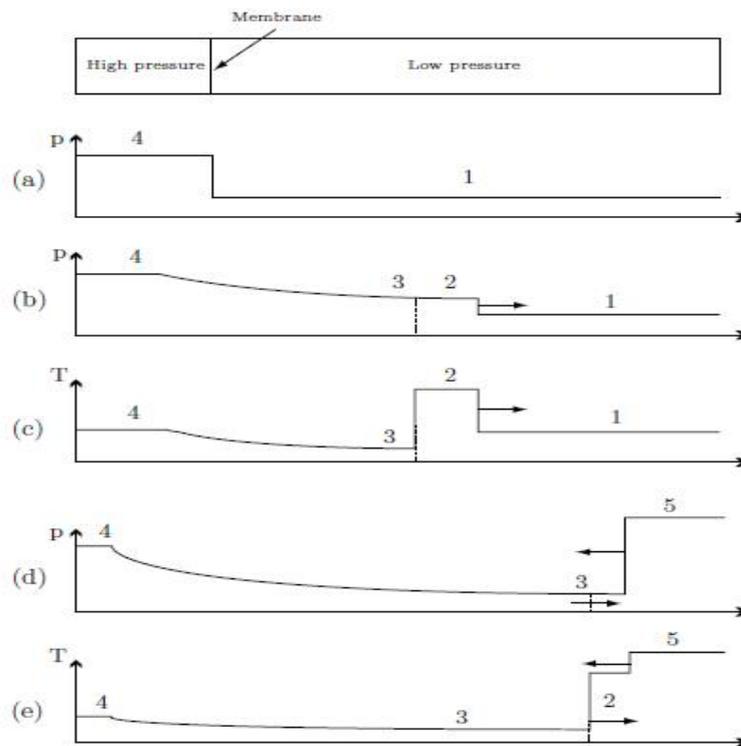


Figura 2.14: a) Distribuzione pressione iniziale b) Distribuzione pressione e temperatura dopo la rottura della membrana. c) Distribuzione pressione e temperatura dopo che l'onda si sposta verso la bassa pressione. d) e) Pressione e temperatura subito dopo che l'onda viene riflessa

una differenza di pressione tra le due sezioni, la membrana si rompe e c'è un flusso di gas dalla parte a pressione maggiore a quella a pressione minore. Le condizioni di flusso sono descritte nella figura 2.14 nella pagina precedente:

- Regione 1: flusso a bassa pressione
- Regione 2: regione prima dell'onda
- Regione 3: gas che dall'alta pressione è passato attraverso l'onda di rarefazione
- Regione 4: gas ad alta pressione non attraversato dall'onda di rarefazione
- Regione 5: regione dietro l'onda riflessa

Il picco massimo della differenza di pressione si ha prima della rottura della membrana [44], figura 2.14 nella pagina precedente(a). Quando invece si rompe la membrana, un'onda d'urto si muove verso la zona a pressione minore e l'onda di rarefazione si muove verso l'alta pressione. Nella figura 2.14 nella pagina precedente(b)-(c), viene rappresentata la distribuzione della pressione e della temperatura. Successivamente, l'onda d'urto si riflette e ritorna, si produce un'alta pressione e temperatura 2.14 nella pagina precedente (d)(e).

Poiché un'onda d'urto produce un flusso, il gas si propaga nella direzione dell'onda d'urto e il tubo d'urto viene anche utilizzato come galleria del vento per studiare gli aspetti aerodinamici del flusso ad alta entalpia.

2.7 Misurazione delle onde d'urto

Il campo acustico viene generalmente misurato in acqua usando un idrofono, che converte la pressione in un segnale elettrico. I litotrittori generano impulsi acustici brevi (banda di frequenza ampia) a grande ampiezza, focalizzati su un piccolo volume nello spazio. L'idrofono deve avere una larghezza di banda molto ampia (da 60 kHz a 20 MHz), deve essere robusto per resistere alle alte pressioni delle onde d'urto e possedere una piccola area attiva di circa 0,5 mm. Le prime misurazioni affidabili delle onde d'urto della litotripsia sono state eseguite con un idrofono in PVDF [45], polimero termoplastico. Questo idrofono è costituito da una pellicola PVDF non lucidata, tesa su un telaio di supporto con elettrodi generalmente di oro (figura 2.15 nella pagina seguente) [46] [47]. Il PVDF ha una larghezza di banda molto ampia, è in grado di misurare pressioni acustiche di ampiezza elevata e può essere prodotto in modo che sia attiva solo una piccola regione. Sono stati utilizzati sia idrofoni a membrana che idrofoni ad ago, tuttavia si ritiene che gli idrofoni a membrana forniscano la migliore misurazione dell'onda d'urto.

Un problema è che l'adesione tra acqua e PVDF non è forte e può determinare la presenza della fase di trazione sulla superficie del PVDF. Questo limita la capacità dell'idrofono di misurare la fase di trazione dell'onda d'urto, perché quando si viene a formare la bolla, la pressione negativa diminuisce e si registra una pressione prossima allo 0. Inoltre, se le bolle di cavitazione collassano, possono danneggiare l'idrofono.

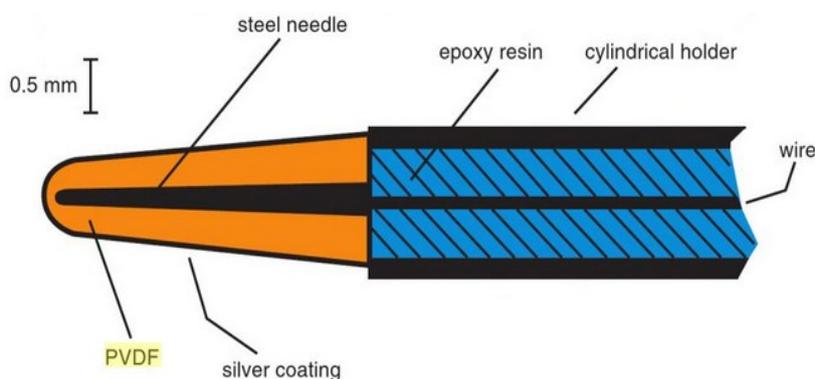


Figura 2.15: Architettura schematica di un idrofono PVDF [48]

L'idrofono FOPH è stato sviluppato recentemente e consiste in un laser che inietta luce ad un'estremità della fibra ottica, mentre l'altra estremità è posizionata nel campo del litotritore. Il FOPH misura la luce che si riflette da un'estremità e sfrutta il fatto che l'ampiezza della luce riflessa dipende dalla pressione [49]. Il FOPH, simile al PVDF, ha una larghezza di banda ampia ed è in grado di misurare ampiezze di pressione molto elevate. L'UFSP ha diametro inferiore ($100\ \mu\text{m}$) rispetto al PVDF ($500\ \mu\text{m}$). L'UFSP, essendo realizzato con una fibra ottica, è caratterizzato da un'adesione tra acqua e silice elevata. Ne consegue che la probabilità che avvenga cavitazione sulla superficie è minore. Inoltre è meno suscettibile ai danni causati dalla cavitazione. Lo svantaggio è che il segnale generato dal FOPH è debole e non è quindi adatto a misurare basse pressioni ($\leq 2\ \text{MPa}$).

Quando vi è una variabilità intrinseca del campo acustico, risulta difficile caratterizzare istantaneamente la larghezza delle bande [50]. Solitamente le larghezze del fascio sono misurate dall'acquisizione sequenziale delle misure dei punti all'interno del piano focale utilizzando un idrofono a singolo elemento. Tuttavia le variazioni di energia e le variazioni della posizione dell'elettrodo, fanno sì che le onde d'urto cambino significativamente [51]. Queste variazioni possono alterare la forma d'onda in termini di tempi di risalita e larghezza di impulso. Inoltre, la zona focale si può spostare. In queste situazioni, quindi servono degli strumenti di misura più precisi. In questo caso viene utilizzato un idrofono progettato per essere un *array lineare* che copre approssimativamente la larghezza di $-6\ \text{dB}$ del fascio di un litotritore. L'array è composto da 20 elementi, ciascuno di dimensioni $4\ \text{mm} \times 0,5\ \text{mm}$. Kreider e Bailey hanno effettuato delle misure in acqua depurata dai gas disciolti, posizionando questo idrofono al focus del litotritore. L'array è stato centrato in modo che gli elementi centrali fossero allineati al fuoco, figura 2.16. I singoli elementi dell'array sono stati in grado di misurare delle forme d'onda coerenti con quelle teoriche, che hanno un picco positivo di circa $1\ \mu\text{s}$ seguito da uno negativo di circa $4\ \mu\text{s}$. Quindi risulta essere utile per misurare rapidamente e con precisione i fasci di onde d'urto focalizzate.

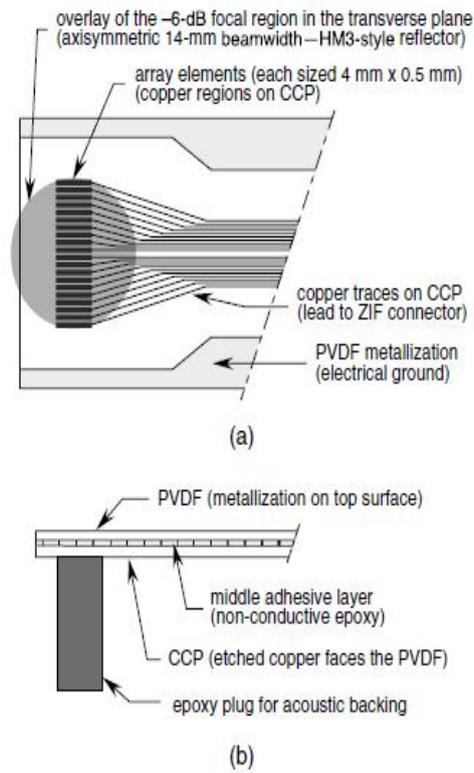


Figura 2.16: Array di un idrofono in una vista planare :a). Vista dall'alto: b)Array costituito da 20 PVDF.

Capitolo 3

Formulazione delle nanobolle

3.1 Ruolo della pressione di Laplace

La *pressione di Laplace* è definita come la pressione sul fluido interno generata dalla tensione superficiale tra le due fasi immiscibili che comprime il liquido o il gas all'interno della goccia.

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

dove P_{inside} e P_{outside} sono rispettivamente la pressione interna ed esterna della goccia, σ è la tensione superficiale e $r(t)$ è il raggio della goccia. Queste grandezze sono riportate in figura 3.1. Quando una sfera

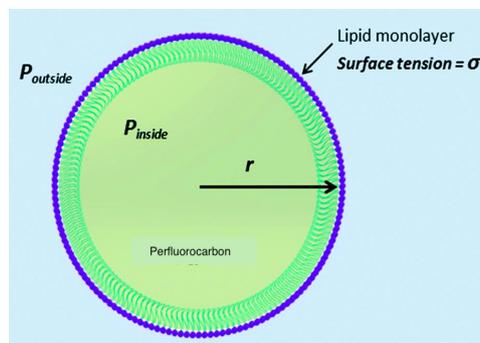


Figura 3.1: Parametri pressione di Laplace

con diversa pressione interna ed esterna viene colpita da una vibrazione, assume una forma ellissoidale in cui ai lati compressi la pressione aumenta mentre al centro la pressione diminuisce, aumentando così la permeabilità. La pressione totale risulterà essere la somma della pressione esterna e di quella all'interfaccia. La pressione di Laplace rende la pressione interna alla goccia di nanoemulsione maggiore di quella del liquido esterno. Quando il gas interno lascia il nucleo, le bolle si restringono e la pressione di Laplace aumenta, accelerando così la velocità di dissipazione del gas e la conseguente riduzione della

bolla fino a quando il sistema si rompe [52]. Inoltre, uno strato di tensioattivo sulla superficie della bolla riduce la tensione interfacciale e la pressione di Laplace.

I perfluorocarburi (PFC) sono utilizzati nelle applicazioni biomediche in quanto sono caratterizzati dalla non tossicità e dalla biocompatibilità. I PFC liquidi sono idrofobici e quindi, una volta immersi nell'acqua, generano una tensione superficiale molto elevata. L'evento di *sotto-pressurizzazione* avviene quando la pressione all'interno della goccia scende al di sotto della pressione vapore di PFC; ciò consente al liquido di vaporizzare e di condensarsi ad una pressione acustica maggiore [21]. Tuttavia, dall'equazione 3.1 nella pagina precedente si deduce che la pressione di Laplace è inversamente proporzionale al raggio della bolla, ciò vuol dire che l'espansione delle bolle avviene più facilmente nel range dei μm piuttosto che nel range dei nm . Per quanto riguarda bolle delle dimensioni nanometriche, la pressione di Laplace è dell'ordine di alcune atmosfere.

3.2 Principio di massima generazione di entropia

Il principio di massima generazione di entropia è stato sviluppato da Giuseppe Grazzini e Umberto Lucia. Prende in considerazione la generazione di energia e non la sua produzione come funzione massima allo stato stazionario per i sistemi aperti [53].

Vengono considerati sistemi aperti irreversibili composti da N particelle. Il vettore \mathbf{x}_i descrive la posizione dell' i -th particella, caratterizzata da una velocità $\dot{\mathbf{x}}_i$, da una massa m_i e da un momento $\mathbf{p}_i = m_i \dot{\mathbf{x}}_i$ ($i \in [1, N]$). La massa totale del sistema corrisponde alla somma delle singole masse $m = \sum_i m_i$ e la sua densità è ρ . La velocità di diffusione è definita dalla relazione $\mathbf{u}_i = \dot{\mathbf{x}}_i - \dot{\mathbf{x}}_B$, dove $\dot{\mathbf{x}}_B$ è la posizione del centro di massa. La massa del sistema è una quantità conservativa. L'equilibrio entropico per un sistema aperto è descritto da:

$$\frac{\partial s}{\partial t} + \nu \nabla \mathbf{J}_s = \dot{s} \quad (3.2)$$

dove $\dot{s} = \nu \sigma$, $s = \frac{S}{m}$ è l'entropia specifica, S è l'entropia, ν è il volume specifico e \mathbf{J}_s è il flusso entropico definito come:

$$\mathbf{J}_s = \frac{Q}{T} + \sum_i \rho_i s_i (\dot{\mathbf{x}}_i - \dot{\mathbf{x}}_B) \quad (3.3)$$

Q è il flusso di calore.

Ruelle nel 2003 [54] ha provato l'esistenza dell'entropia nei sistemi aperti considerando un classico sistema con comportamento isocinetico: Vengono considerati sistemi aperti irreversibili composti da N particelle. Il vettore \mathbf{x}_i descrive la posizione dell' i -th particella, caratterizzata da una velocità $\dot{\mathbf{x}}_i$, da una massa m_i e da un momento $\mathbf{p}_i = m_i \dot{\mathbf{x}}_i$ ($i \in [1, N]$). La massa totale del sistema corrisponde alla somma delle singole masse $m = \sum_i m_i$ e la sua densità è ρ . La velocità di diffusione è definita dalla relazione $\mathbf{u}_i = \dot{\mathbf{x}}_i - \dot{\mathbf{x}}_B$, dove $\dot{\mathbf{x}}_B$ è la posizione del centro di massa. La massa del sistema è una quantità

conservativa. L'equilibrio entropico per un sistema aperto è descritto da:

$$\frac{\partial s}{\partial t} + \nu \nabla \mathbf{J}_s = \dot{s} \quad (3.4)$$

dove $\dot{s} = \nu \sigma$, $s = \frac{S}{m}$ è l'entropia specifica, S è l'entropia, ν è il volume specifico e \mathbf{J}_s è il flusso entropico definito come:

$$\mathbf{J}_s = \frac{\mathbf{Q}}{T} + \sum_i \rho_i s_i (\dot{\mathbf{x}}_i - \dot{\mathbf{x}}_B) \quad (3.5)$$

\mathbf{Q} è il flusso di calore.

Ruelle nel 2003 [54] ha provato l'esistenza dell'entropia nei sistemi aperti considerando un classico sistema con comportamento isocinetico:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} \mathbf{p} \\ \mathbf{x} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \xi - \alpha \mathbf{p} \\ \mathbf{p}/m \end{pmatrix} \iff \frac{dq}{dt} = \mathbf{F}_\xi(\mathbf{q}) \quad (3.6)$$

con le notazioni:

$$\mathbf{q} = \begin{pmatrix} p \\ x \end{pmatrix} \quad (3.7)$$

$$\mathbf{F}_\xi(\mathbf{q}) = \begin{pmatrix} \xi - \alpha \mathbf{p} \\ \mathbf{p}/m \end{pmatrix} \quad (3.8)$$

dove $\mathbf{p} \in \mathbf{R}^N$ (momento) e $\mathbf{x} \in \mathbf{R}^N$ (posizione), ξ è una forza che non è necessariamente un gradiente, m è la massa, $(-\alpha \mathbf{p})$ è il termostato isocinetico (un caso speciale del termostato gaussiano). α è definita come:

$$\alpha = \alpha(\mathbf{q}) = \frac{\mathbf{p} \cdot \xi(\mathbf{x})}{\mathbf{p} \cdot \mathbf{p}} \quad (3.9)$$

in cui il prodotto tra due vettori $a \cdot b$ è un prodotto scalare euclideo. L'incremento di entropia definito da Ruelle: L'entropia è definita come la somma del calore fornito diviso la temperatura. Quando viene fornita quasi staticamente al sistema una piccola quantità di calore δQ , l'entropia del sistema aumenterà della quantità:

$$\Delta S_{rev} = \int_{is}^{fs} \frac{\delta Q}{T} \quad (3.10)$$

dove ΔS_{rev} è la variazione di entropia del segnale dallo stato iniziale in e finale fs di un processo reversibile, δ è la variazione del percorso della funzione. L'approccio entropico di Denbigh viene utilizzato invece per descrivere i processi fondamentali di sistemi aperti.

$$\delta S = \delta S_{int} + \delta S_{ext} \quad (3.11)$$

esprime la variazione di entropia totale come la somma della variazione di entropia all'interno del sistema e lo scambio di entropia con l'ambiente esterno.

3.3 Teorema di Gouy-Stodola e calcolo variazionale

Il teorema di Gouy-Stodola rappresenta un fondamentale approccio nell'analisi dell'irreversibilità dei cicli, utile per valutare il lavoro perduto per irreversibilità usando l'equilibrio di generazione dell'entropia. Ne deriva che la dissipazione di energia è definita come:

$$E_\lambda = \int_0^\tau (E_W^{rev} - \dot{E}_W) dt = W_\lambda = T_0 S_g \quad (3.12)$$

A partire dall'approccio di Gouy, Grazzini e Lucia stanno sviluppando un approccio teorico e fenomenologico della generazione di entropia. Alla base matematica c'è il calcolo variazionale [53] mentre a livello fisico c'è il principio della minima azione. Si seguono le seguenti ipotesi [55]:

- sistema lineare o non lineare irreversibile;
- ogni processo ha una durata limitata τ ;
- ciò che succede in ciascun istante nel range $[0, \tau]$ non può essere conosciuto, ma ciò che succede dopo il tempo τ è conosciuto: non è necessariamente richiesto l'equilibrio locale;
- l'equazione dell'equilibrio entropico è un equilibrio di flussi di entropia ed energia.

Si pone che $\Omega = (\mathbf{x}_i, \mathbf{p}_i), i \in [1; N]$ sia lo spazio delle fasi relativo al sistema aperto considerato, Π è un insieme composto dagli elementi π che sono i processi generatori. Un sistema termodinamico è caratterizzato dall'essere perfettamente accessibile (PA) tramite due azioni: W lavoro svolto e Q calore acquisito durante il processo. Gli stati stazionari fanno riferimento solo ad un flusso medio costante e non alla sua variabilità temporale e spaziale. È stato dimostrato che i sistemi di flusso dissipativo presentano variabilità durante lo stato stazionario, ma, siccome le fluttuazioni attorno ad uno stato stazionario sono descritte statisticamente, permettono di utilizzare lo stato stazionario per descrivere uno stato stazionario di flusso medio costante senza implicare la mancanza di variabilità dei flussi. La misura di uno spazio Γ è descritta da $(\Omega_{PA}, F, \mu_{PA})$, dove Ω_{PA} è una distribuzione statistica. Per un sistema dinamico, invece, si aggiunge il termine ζ che regola la legge dinamica. Nello spazio delle fasi il sistema passa dallo stato iniziale a quello finale seguendo un percorso nel tempo di durata del processo τ ed è possibile introdurre la densità di entropia ρS , la densità lagrangiana $\rho' \mathcal{L}$, la densità di potenza ρ_π e la funzione di dissipazione ϕ [56]:

$$\rho' \mathcal{L} = \rho s - \rho \pi - \phi \quad (3.13)$$

Ricordando che:

$$\rho S - \rho \pi = 2\phi \quad (3.14)$$

ne deriva:

$$\rho' L = \phi \quad (3.15)$$

Il risultato Lagrangiano diventa [56] [57]:

$$L = \int_0^\tau dt \int_{T_0}^T dt \int_V \rho'_{\mathcal{L}} dV = \int_0^\tau dt \int_{T_0}^T dT \int_V \phi dV = W_\lambda \quad (3.16)$$

Per poter scrivere l'equazione 3.16 come funzione della generazione di entropia si ricorda la 3.12 nella pagina precedente:

$$\mathcal{L} = -T_a S_g \quad (3.17)$$

il segno negativo è dovuto al calore ceduto.

La definizione di *azione* [56]:

$$\mathcal{A} = \int_0^\tau \mathcal{L} dt = -T_a \int_0^\tau S_g dt \quad (3.18)$$

unita al principio di *minima azione* $\delta\mathcal{A} = 0$, permette di affermare che la condizione di stabilità di uno stato stazionario è che la generazione di entropia sia la massima:

$$\delta S_g \geq 0 \quad (3.19)$$

Per migliorare questo approccio, la densità Lagrangiana, $\rho\mathcal{L}$ può essere riscritta seguendo Gyarmati [58] come:

$$\rho\mathcal{L} = T\nu\sigma - \phi \quad (3.20)$$

dove ϕ è la funzione di dissipazione, σ è la densità di produzione entropica e ν è il volume specifico. L'equazione 3.16 diventa:

$$\mathcal{L} = \int_0^\tau dt \int_V \rho\mathcal{L} dV = \int_0^\tau dt \int_V (T\nu\sigma - \phi) dV = T S_g - T_0 S_g = (T - T_0) S_g \quad (3.21)$$

La definizione di *azione* 3.18 diventa quindi:

$$\mathcal{A} = \int_0^\tau \mathcal{L} dt = \int_0^\tau (T - T_0) S_g dt \quad (3.22)$$

e applicando il *principio di minima azione* ($\delta\mathcal{A} = 0$ e $\delta\mathcal{A} < 0$ o $\delta^2\mathcal{A} > 0$), segue che la condizione di stabilità di uno stato stazionario è:

$$\delta \left(\int_0^\tau (T - T_0) S_g dt \right) \leq 0 \quad (3.23)$$

$$\begin{cases} S_g \leq \frac{T_1 - T_0}{T - T_0} S_{g1} \\ S_{g1} = T_0 W_{\lambda 1} \end{cases}$$

$$S_g \leq T_0 \frac{T_1 - T_0}{T - T_0} W_{\lambda 1} \quad (3.24)$$

dove $W_{\lambda 1}$ è il lavoro perso per mantenere lo stato 1 alla temperatura $T_1 \neq T_0$. Si può concludere che:

- la generazione di entropia ha un limite superiore per lo stato di non equilibrio
- la generazione di entropia ha un massimo per gli stati stazionari

3.4 Approccio termodinamico della cavitazione

Per sviluppare un'analisi termodinamica della cavitazione, è necessario definire la termodinamica del sistema. Si prende in considerazione un volume di controllo finito in cui le bolle sono prodotte dalla sola pressione. La superficie esterna è un contorno chiuso, mentre è permesso il passaggio di massa e energia [59]. Le variazioni locali della pressione determinano la transizione di fase liquido-vapore e le conseguenti variazioni della temperatura locale T , mentre la temperatura globale T_m del sistema rimane costante.

La vibrazione della bolla provoca una variazione del coefficiente di qualità x :

$$x = \frac{m_{\text{vap}}}{m_{\text{vap}} + m_{\text{liq}}} \quad (3.25)$$

dove m_{vap} è la massa del vapore e m_{liq} è la massa del liquido. La variazione dell'entropia irreversibile nel tempo è [59]:

$$\frac{\Delta S_{\text{irr}}}{\Delta \tau} = \frac{\dot{m}}{T_m} \left(\int_{T_1}^{T_2} v dP + \int_{T_1}^{T_2} w dw \right) \quad (3.26)$$

dove \dot{m} è la portata in massa attraverso il volume, w è la velocità del fluido, v è il volume specifico, P la pressione e $\Delta \tau = \Delta y / \langle w \rangle$ è il tempo impiegato dal fluido per attraversare il volume. T_1 e T_2 sono temperature locali che lasciano invariata T_m . Prendendo in considerazione un modello fermo (fluido a riposo), il termine relativo alla velocità w si annulla e, siccome la massa è ferma, si calcola solo ΔS_{irr} integrando nel tempo. L'equazione 3.26 si semplifica come segue:

$$\Delta S_{\text{irr}} = \frac{1}{T_m} \left(\int_0^{\Delta \tau} \dot{m} dt \int_{T_1}^{T_2} v dP \right) \quad (3.27)$$

Il dP può essere espresso in funzione del calore latente $\lambda(T)$ espresso come $\lambda(T) = (a + bT)$

$$dP = \frac{\lambda(T)dT}{T v_{\text{diff}}} = \frac{(a + bT)dT}{T v_{\text{diff}}} \quad (3.28)$$

Ricordando che $v = v_{\text{liq}} + x v_{\text{diff}}$, e sostituendo nell'equazione 3.27:

$$\int_{T_1}^{T_2} v dP = \int_{T_1}^{T_2} (v_{\text{liq}} + x v_{\text{diff}}) \frac{(a + bT)}{T v_{\text{diff}}} dT \quad (3.29)$$

Quindi effettuando le opportune sostituzioni:

$$\begin{aligned} \Delta S_{irr} &= \frac{1}{T_m} \int_0^{\Delta\tau} \dot{m} dt \int_{T_1}^{T_2} \left[\left(\frac{v_{liq}}{v_{diff}} + x \right) \frac{a + bT}{T} \right] dT = \\ &= \frac{1}{T_m} \int_0^m dm \int_{T_1}^{T_2} \left[\left(\frac{v_{liq}}{v_{diff}} + x \right) \frac{a + bT}{T} \right] dT = \\ &= \frac{V}{T_m v_{diff}^2} \int_0^m \int_{T_1}^{T_2} \left(\frac{v_{liq}}{v_{diff}} + x \right) \frac{1}{\left(\frac{v_{liq}}{v_{diff}} + x \right)^2} \frac{a + bT}{T} dT dv \end{aligned} \quad (3.30)$$

A questo punto si applica il principio di massima produzione di entropia visto nel paragrafo 3.2:

$$\begin{aligned} \delta(\Delta S_{irr}) = 0 \rightarrow \delta \left(\frac{v_{liq}}{v_{diff}} + x \right)^{-1} \frac{a + bT}{T} &= 0 \\ \frac{dx}{\frac{v_{liq}}{v_{diff}} + x} &= a \frac{dT}{T(a + bT)} \end{aligned} \quad (3.31)$$

Risolviendo l'equazione differenziale si trova:

$$x = \left(\frac{T}{(a + bT)^a} - v_{liq} \right) \frac{1}{v_{diff}} \quad (3.32)$$

3.4.1 Parametri sperimentali

Il calore latente $\lambda(T)$ può essere espresso linearmente come $\lambda(T) = (a + bT)$. Il calore dipende dalla temperatura e questa relazione determina la fase dell'acqua, come presentato in figura 3.2. Per quanto riguarda il decafluoropentano per calcolare i parametri a e b sono stati usati i parametri $V_{liq} = 0.625 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{kg}$, $V_{diff} = 1,67 \text{ m}^3/\text{kg}$. I risultati ottenuti:

- $x=1$ (vapore): $a=1, b=0,6$
- $x=0$ (liquido): $a=1, b=2$
- $x=0,5$ (gas e liquido): $a=1, b=0,9$.

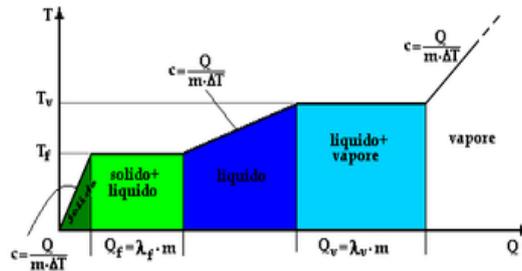


Figura 3.2: Grafico del calore necessario ai passaggi di stato di una sostanza

Capitolo 4

Risultati sperimentali trattamento ESW per nanobolle contenenti decafluoropentano

4.1 Preparazione delle nanobolle

Per la preparazione delle nanobolle [60] è stato utilizzato un metodo con più steps. Il primo step consiste di 300 μL di soluzione etanolica di *Epikuron 200* (1 %, w/w) a cui vengono aggiunti 500 μL di *perfluoro pentano*. La soluzione etanolica di Epikuron contiene un tensioattivo, mentre il perfluoropentano è conservato a temperatura ambiente. Il secondo step è caratterizzato dall'aggiunta di acqua ultrapura in quantità di 4,8 mL alla miscela. Al fine di formare un'emulsione, la miscela è stata sottoposta ad una lieve agitazione. In seguito, è stato utilizzato un *omogeneizzatore ad alto taglio* (Ultraturrax, IKA, Germania) (figura 4.1) per 3 minuti a 12 000 rpm con lo scopo di omogeneizzare il sistema.



Figura 4.1: Ultraturrax, IKA, Germania [60]

Il passaggio seguente ha come scopo la formazione di un guscio polimerico: viene aggiunta lentamente una soluzione acquosa di chitosano con $\text{pH}=5,0$. Il chitosano è un polisaccaride che proviene dalla deacetilazione della chitina, un polimero ottenuto dall'esoscheletro dei crostacei e li protegge rendendoli più duri e resistenti. La struttura del chitosano è riportata in figura 4.2.

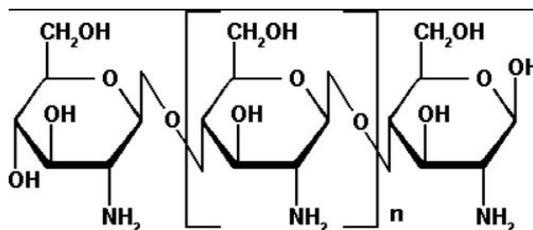


Figura 4.2: Struttura del chitosano.

Per la formazione di un guscio di glicolchitosano, invece, è stata aggiunta una soluzione acquosa di glicolchitosano (2,7% w/v) goccia a goccia con successiva agitazione magnetica.

Sono stati testati due diversi co-tensioattivi: acido palmitico (C16) e acido tetradecilfosforico (C14). Sono state ottenute due tipi di formulazioni nanobolle: C14-NB e C16-NB. Infine, sono stati aggiunti goccia a goccia sotto agitazione ai due tipi di nanobolle, 200 μL di una soluzione acquosa di Gd-DOTP (figura 4.3) alla concentrazione di 4,4 mM. Le formulazioni così ottenute (Gd-C14-NB e Gd-C16-NB) sono state incubate per 30 minuti sotto agitazione per facilitare il legame del complesso Gd caricato negativamente con il guscio di chitosano. Quindi, Gd-DOTP libero (così come altri componenti solubili non legati alle NB) è stato rimosso mediante dia-ultrafiltrazione usando un sistema TCF2 (Amicon) con una membrana dialitica tagliata di 100 kDa.

Dopo la purificazione, una soluzione acquosa stabilizzante è stata aggiunta sotto agitazione alle sospensioni acquose di nanobolle. Infine, tutti i campioni di nanobolle sono stati conservati a 4 °C.

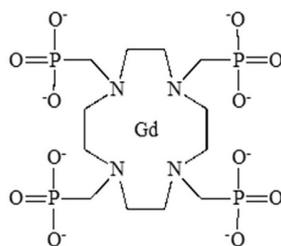


Figura 4.3: Struttura molecolare di Gd-DOTP [60].

Queste nanobolle hanno diametri di circa 500 nm e una carica superficiale positiva che consente l'interazione con il complesso Gd-DOTP caricato negativamente.

4.2 Materiali e metodi

Le onde d'urto utilizzate negli esperimenti sono state prodotte da un dispositivo piezoelettrico (Piezoson 100) il cui uso è rinomato in ortopedia e traumatologia. L'intensità delle onde d'urto generate è di 0,05-1,48 mJ/mm² con una frequenza data dal numero di shock selezionabili al secondo. Nel dispositivo è presente un generatore di corrente elettrica ad alta tensione ed un riflettore sui cui sono posti degli elementi piezoelettrici a forma di una sfera. Gli impulsi elettrici ad alta energia stimolano gli elementi piezoelettrici con conseguente espansione rapida dei cristalli e generazione di un'onda d'urto che si propaga attraverso l'acqua fino al centro della sfera. La tensione utilizzata determina una pressione sull'area focale. L'energia che si genera nell'area focale è stata discussa nel capitolo 2. Per quanto riguarda lo strumento utilizzato, il *Piezoson*, l'area focale ha un diametro di 2,50 mm e una lunghezza di 10 mm (figura 2.6 a pagina 24).

Le provette di polipropilene 45 X 12,5 mm (Nunc, Wiesbaden, Germania), figura 4.6 a pagina 47, contenenti le sospensioni di nanobolle sono state poste perpendicolarmente al generatore di onde d'urto in asse con l'area focale. In questo modo la base della provetta era coincidente con il punto centrale dell'area focale. Un cuscinetto pieno d'acqua è stato il mezzo di contatto tra il generatore di onde d'urto e la provetta. Inoltre è stato utilizzato un gel ad ultrasuoni.

Per determinare la variazione del diametro medio, del potenziale zeta e del PDI, le nanobolle dopo ogni trattamento sono state ricaratterizzate.



Figura 4.4: Struttura molecolare di Gd-DOTP

4.3 Risultati sperimentali

Vengono riportati di seguito i risultati ottenuti in laboratorio usando le seguenti tipologie di nanobolle:

- nanobolle con shell di Chitosano: tabelle 4.1, 4.2
- nanobolle con shell di Glicolchitosano: tabella 4.3
- nanobolle con shell di Chitosano-TPP: tabella 4.4
- nanobolle con shell di Chitosano fluorescente- FITC: tabelle 4.5, 4.6.

Sono state utilizzate pressioni di 64 MPa e 90 MPa con una frequenza di 100, 250, 500 e 1000 shots. Nella colonna NO ESW vengono riportati i valori iniziali del diametro della nanobolla senza aver subito alcun trattamento. In tabella si rilevano i risultati della variazione di diametro (nm), del PDI e del potenziale Zeta (mV) della nanobolla. Nelle tabelle 4.5 a pagina 48 4.6 a pagina 49, le nanobolle fluorescenti sono composte da chitosano reso fluorescente perchè è stato coniugato chimicamente con un probe fluorescente (Fluoresceina isotiocinato). In questo modo lo shell delle nanobolle risulta fluorescente e possono essere visualizzate al microscopio a fluorescenza. Il trifosfato pentasodico (TPP) è dotato di una bassa tossicità e di un potere gelificante elevato. Il diametro medio e il PDI (indice di polidispersione) sono stati esaminati per mezzo della spettroscopia a correlazione fotonica (PCS). In particolare, la PCS viene utilizzata con lo scopo di determinare la distribuzione delle particelle nello spazio. Attraverso lo studio con lo strumento 90 Plus, figura 4.5, della mobilità elettroforetica è stato valutato il potenziale Zeta. Le analisi del potenziale Zeta sono state effettuate seguendo le seguenti caratteristiche:



Figura 4.5: Strumento 90 Plus

- rapporto 1:4 nanobolle-acqua distillata deionizzata
- angolo di diffusione di 90°
- temperatura ambiente 25°C
- campo elettrico applicato 15 V/cm .



Figura 4.6: Preparazione sospensione nanobolle-acqua distillata deionizzata con rapporto 1:4

Parametri	no ESW	ESW 12 100 shots, 64 MPa	ESW 12 250 shots, 64 MPa	ESW 12 500 shots, 90 MPa	ESW 12 1000 shots, 90 MPa
Diametro medio \pm SD(nm)	474.7 \pm 15.7	505.8 \pm 31	625.9 \pm 16.9	685.1 \pm 20.1	664.9 \pm 17.6
PDI	0.229 \pm 0.070	0.338 \pm 0.012	0.357 \pm 0.012	0.279 \pm 0.031	0.329 \pm 0.032
Potenziale Zeta \pm SD (mV)	29.12 \pm 2.51	31.02 \pm 1.35	30.23 \pm 1.33	29.82 \pm 2.01	29.99 \pm 1.56

Tabella 4.1: Nanobolle con shell di Chitosano - E12

Parametri	no ESW	ESW 15 100 shots, 64 MPa	ESW 15 250 shots, 64 MPa	ESW 15 500 shots, 90 MPa	ESW 15 1000 shots, 90 MPa
Diametro medio \pm SD(nm)	474.7 \pm 15.7	506.8 \pm 17.2	801.2 \pm 26.9	706.1 \pm 25.1	731.7 \pm 20.7
PDI	0.229 \pm 0.070	0.313 \pm 0.021	0.309 \pm 0.026	0.326 \pm 0.034	0.305 \pm 0.007
Potenziale Zeta \pm SD (mV)	29.12 \pm 2.51	29.85 \pm 1.35	30.04 \pm 1.22	30.88 \pm 2.17	31.01 \pm 1.11

Tabella 4.2: Nanobolle con shell di Chitosano - E15

Parametri	no ESW	ESW 12 100 shots, 64 MPa	ESW 12 1000 shots, 64 MPa	ESW 15 100 shots, 90 MPa	ESW 15 1000 shots, 90 MPa
Diametro medio \pm SD(nm)	446.5 \pm 17.3	476.5 \pm 20.4	780.9 \pm 22.1	497.1 \pm 1.0	843.3 \pm 69.5
PDI	0.223 \pm 0.018	0.240 \pm 0.135	0.288 \pm 0.02	0.236 \pm 0.04	0.352 \pm 0.08
Potenziale Zeta \pm SD (mV)	25.62 \pm 1.11	26.05 \pm 1.42	25.23 \pm 1.56	24.99 \pm 0.67	25.81 \pm 1.23

Tabella 4.3: Nanobolle con shell di GlicolChitosano - E12-E15

Parametri	no ESW	ESW 12 100 shots, 64 MPa	ESW 12 1000 shots, 64 MPa	ESW 15 100 shots, 90 MPa	ESW 15 1000 shots, 90 MPa
Diametro medio \pm SD(nm)	460.2 \pm 10.3	456.3 \pm 15.8	811.4 \pm 11.9	447.2 \pm 29.5	1177.2 \pm 19.1
PDI	0.232 \pm 0.038	0.278 \pm 0.045	0.263 \pm 0.131	0.259 \pm 0.009	0.407 \pm 0.012
Potenziale Zeta \pm SD (mV)	20.15 \pm 1.33	21.00 \pm 1.89	20.36 \pm 1.65	19.89 \pm 0.74	19.01 \pm 1.34

Tabella 4.4: Nanobolle con shell di Chitosano+TPP

Parametri	no ESW	ESW 12 100 shots, 64 MPa	ESW 12 250 shots, 64 MPa	ESW 12 500 shots, 90 MPa	ESW 12 1000 shots, 90 MPa
Diametro medio \pm SD(nm)	453.3 \pm 22.1	458.3 \pm 32.1	607.3 \pm 26.5	612.2 \pm 22.9	846.6 \pm 36.6
PDI	0.292 \pm 0.014	0.302 \pm 0.004	0.352 \pm 0.111	0.327 \pm 0.009	0.335 \pm 0.083
Potenziale Zeta \pm SD (mV)	27.10 \pm 0.99	25.55 \pm 2.51	26.94 \pm 1.98	27.77 \pm 2.75	29.02 \pm 0.91

Tabella 4.5: Nanobolle con shell di Chitosano fluorescente-FITC-E12

Parametri	no ESW	ESW 15 100 shots, 64 MPa	ESW 15 250 shots, 64 MPa	ESW 15 500 shots, 90 MPa	ESW 15 1000 shots, 90 MPa
Diametro medio ± SD(nm)	453.3 ± 22.1	90.3 ± 17.1	668.3 ± 14.00	681.5 ± 83.9	789.4 ± 36.6
PDI	0.292 ± 0.014	0.284 ± 0.024	0.265 ± 0.130	0.300 ± 0.041	0.278 ± 0.083
Potenziale Zeta ± SD (mV)	27.10 ± 0.99	26.85 ± 1.34	27.12 ± 1.08	27.96 ± 0.93	29.55 ± 0.66

Tabella 4.6: Nanobolle con shell di Chitosano fluorescente-FITC- E15

4.4 Analisi risultati sperimentali

Di seguito vengono riportate le rappresentazioni grafiche del cambiamento del diametro medio e del potenziale Zeta in seguito al trattamento subito dalla nanobolla. Per quanto riguarda la variazione del diametro medio si nota un andamento molto simile per tutte le prove con un picco ai 64 MPa con 250 Shots. Si nota uno strano comportamento in tabella 4.6 nella pagina precedente in quanto il diametro diminuisce parecchio da quello iniziale in seguito al trattamento ad una pressione di 64 MPa (100 shots) per poi aumentare nuovamente a 250 shots. Gli altri andamenti differenti sono dovuti alla standard deviation SD indicata nel grafico. Nelle figure 4.8 4.9 e 4.10 dopo il picco a 250 shots vi è una riduzione drastica del diametro ai 500 shots per poi avere una crescita del diametro fino ai 1000 shots.

La formazione del potenziale Zeta è dovuta alla presenza di un doppio strato elettrico. Il suo valore dipende dalla densità della carica superficiale e dallo spessore del doppio strato [61]. Spesso, il potenziale è determinato dallo ione H^+ e in questo modo il potenziale ζ dipende dal pH:

- bassi valori di PH: potenziale ζ positivo
- alti valori di PH: potenziale ζ negativo
- valore PH per cui ζ è nullo definisce il punto isoelettrico IEP del sistema.

Il punto isoelettrico è una proprietà della superficie della particella ed è il valore intorno al quale si ha scarsa stabilità in quanto sono più evidenti le forze di Van Der Waals [62].

Dai risultati si nota che il potenziale Zeta è sempre positivo per tutti i rivestimenti delle nanobolle e quindi si denotano bassi valori di PH.

Le forze di repulsione sono maggiori di quelle di attrazione e la risultante presenta un massimo (coincidente a 100 Shots, 64 MPa) corrispondente a una barriera energetica che impedisce alle particelle di aggregarsi e il sistema colloidale risulta stabile.

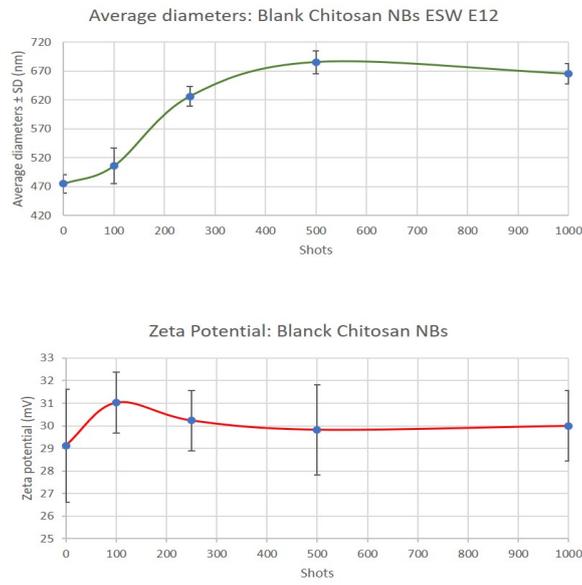


Figura 4.7: Nanobolle con shell di Chitosano ESW E12, con riferimento alla tabella 4.1

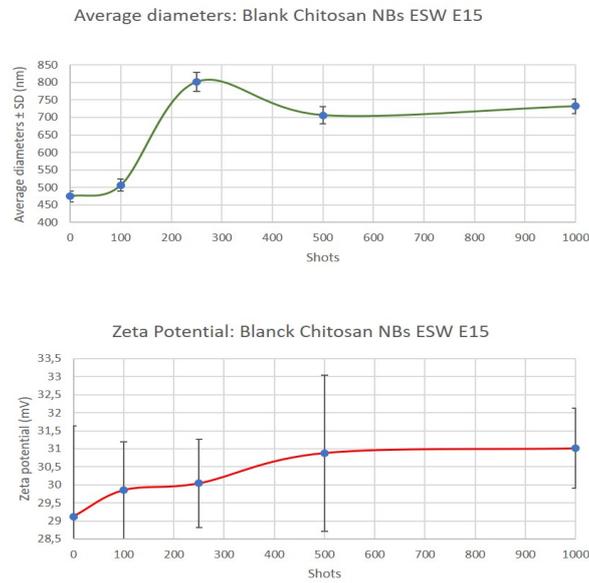


Figura 4.8: Nanobolle con shell di Chitosano ESW E15, con riferimento alla tabella 4.2

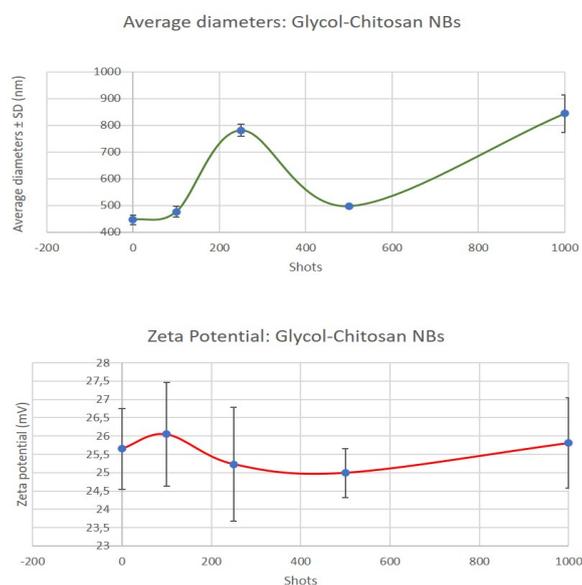


Figura 4.9: Nanobolle con shell di Glycol Chitosano ESW E12, con riferimento alla tabella 4.3

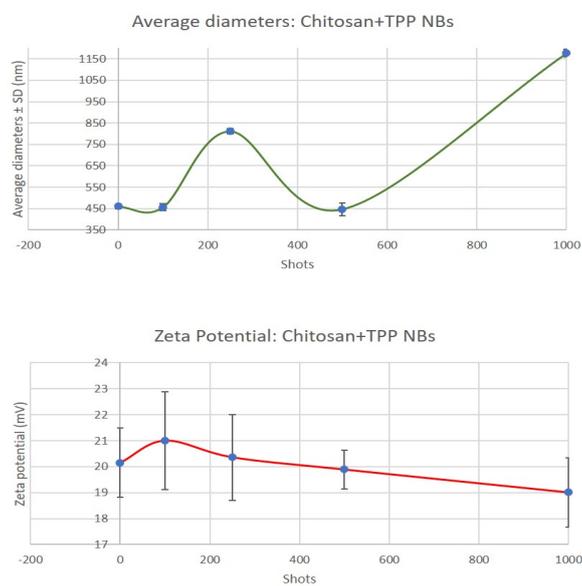


Figura 4.10: Nanobolle con shell di Chitosano+TPP ESW E15, con riferimento alla tabella 4.4



Figura 4.11: Nanobolle con shell di Chitosano fluorescente-FITC ESW E12, con riferimento alla tabella 4.5

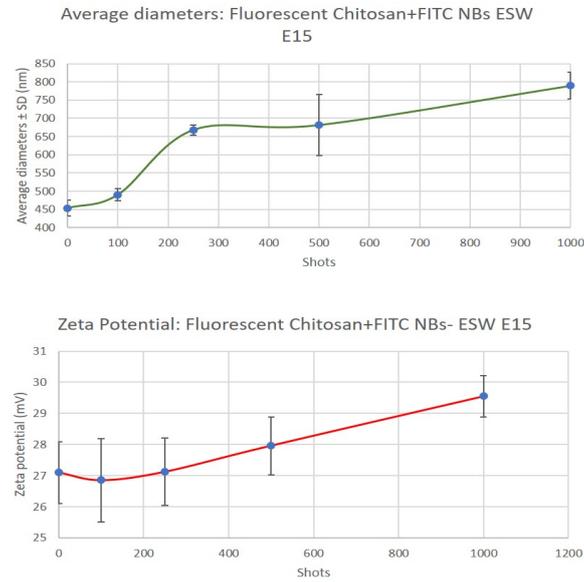


Figura 4.12: Nanobolle con shell di Chitosano fluorescente-FITC ESW E15, con riferimento alla tabella 4.6

Il laboratorio della Professoressa Cavalli del Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco delle facoltà di Farmacia - Chimica e tecnologia farmaceutiche della città di Torino ha fornito i seguenti valori per il contenuto *didecafluoropentano*.

Parameters	Value
Density (liquid)	1.60 g/mL at 20 °C
Molecular W_t	288.03
Specific volume (liquid)	0.625 mL/g
Density (Gas)	10
Boiling point	55 °C
Melting Point/Freezing point	-115 °C
Vapour pressure	43996.4 Pa at 25 °C
Heat of evaporation	28.4 KJ/mol or 129.7 KJ/Kg at 55°C
Viscosity	9
Refractive index	1.3

Vengono riportati inoltre i valori della tensione superficiale per le diverse tipologie di polimero di cui è composto lo shell delle nanobolle.

Polimero	τ [N/m]
Glicochitosano	4×10^{-3}
Chitosano	2×10^{-3}
Chitosano-TPP	6×10^{-3}
Density (Gas)	9×10^{-3}

4.5 Approccio semplificato

Lo scopo degli esperimenti a livello teorico era quello di osservare l'evaporazione del decafluoropentano. Introducendo la variazione del potenziale di Gibbs tra lo stato liquido e quello vapore si analizza la formazione della bolla:

$$\Delta G = -\Delta G_{lv} + \Delta G_t \quad (4.1)$$

Le molecole allo stato vapore possono essere calcolate attraverso il volume della bolla:

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

$$(N - m) = \frac{\frac{4}{3}\pi r^3}{V_{vmol}} = \zeta \quad (4.3)$$

dove V_{vmol} è il volume occupato dalla molecola nello stato di vapore e ζ è il rapporto tra il volume della bolla e il volume occupato dalla singola molecola nello stato di vapore. Si ha un processo naturalmente sviluppato quando la funzione di Gibbs risulta negativa, ovvero se:

$$\Delta G < 0 \quad (4.4)$$

$$r > \frac{3\tau V_{vmol}}{k_b T \ln\left(\frac{p}{P_s}\right)} \quad (4.5)$$

questo si verifica solo se $P < P_s$. Il valore di raggio critico per cui la cavitazione diventa stazionaria risulta dallo studio del segno della funzione di Gibbs:

$$r_c = \frac{2\tau V_{vmol}}{k_B T \ln\left(\frac{P}{P_s}\right)} \quad (4.6)$$

dove $k_B = 1,3807 * 10^{-23}$ [J/K] è la costante di Boltzmann e τ è la tensione superficiale [N/m]. Calcolando il raggio critico si nota che esso non viene mai raggiunto durante gli esperimenti effettuati in laboratorio.

Dall'analisi dei valori del Potenziale Zeta è emerso che le nanobolle sono stabili anche dopo il trattamento, quindi un parametro importante da considerare nello sviluppo di sistemi di bolle stabili è la pressione di Laplace, vedere paragrafo 3.1 a pagina 36.

$$\Delta P = P_{int} - P_{ext} = \frac{2\tau}{r} \quad (4.7)$$

dove P_{int} è la pressione interna della bolla a seguito del trattamento ad una temperatura di 298,25 K, τ è la tensione superficiale [N/m] [63]. La pressione esterna P_{ext} dal teorema di Bernoulli si esprime come:

$$P_{ext} = P_{atm} + \rho g h \quad (4.8)$$

dove ρ è la densità del liquido in cui sono sospese le nanobolle (1000 kg/m^3), g è l'accelerazione di gravità ($9,8 \text{ m/s}^2$), $h = \frac{L}{2}$ è l'altezza della provetta in cui effettivamente sono concentrate le nanobolle, figura 4.6 a pagina 47. Imponendo quindi $H=5 \text{ cm}$, $L=2,50 \text{ cm}$. Dalla relazione di Laplace si ottengono i risultati per i valori di raggio attesi in tabella 4.7.

Shell nanobolle	r [nm]
Chitosano	320
Glicolchitosano	340
Chitosano+TPP	290
Chitosano fluorescente-FITC	260

Tabella 4.7: Valori di raggio atteso per le nanobolle in funzione del loro rivestimento.

Il raggio atteso è ovviamente differente per tutti i tipi di shell polimerico delle nanobolle. Il problema

principale di questo approccio è che non correla il valore del raggio con il trattamento e il coefficiente di qualità. Quindi è un modello semplificato che permette di fare le seguenti osservazioni:

- nanobolle con shell di Chitosano: il diametro teorico e quello sperimentale, tenendo conto della SD, coincidono nel caso del trattamento a 250 shots, 64 MPa
- nanobolle con shell di Glicolchitosano: il diametro teorico e quello sperimentale, tenendo conto della SD, si avvicinano leggermente (con uno scarto di 100 nm nel caso del trattamento a 250 shots, 64 MPa)
- nanobolle con shell di Chitosano + TPP: il diametro teorico e quello sperimentale, tenendo conto della SD, si avvicinano leggermente con uno scarto di circa 100 nm nel caso del trattamento a 100 shots, 64 MPa
- nanobolle con shell di Chitosano fluorescente-FITC: il diametro teorico e quello sperimentale, tenendo conto della SD, coincidono nel caso del trattamento a 250 shots, 64 MPa.

Si deduce che l'uso di Chitosano e di Chitosano fluorescente-FITC come shell sono quelli che permettono di ottenere un raggio prossimo a quello teorico.

4.6 Approccio specifico

Una differente interpretazione dei risultati [64] è stata ottenuta includendo nello studio della cavitazione, la pressione, la temperatura e il coefficiente di qualità. Si è considerata la soluzione generale dell'equazione di Clausius-Clapeyron, dove P_{in} è la pressione a cui è sottoposto il campione, P è la pressione nella regione dove avviene la cavitazione [65].

$$\ln\left(\frac{P}{P_{in}}\right) = \frac{a}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{in}}\right) + \frac{b}{R}\ln\left(\frac{T}{T_{in}}\right) \quad (4.9)$$

T [K] è la temperatura media nel flusso del liquido, ed è assunta costante, a e b sono i parametri caratteristici. Il coefficiente di qualità x affinché avvenga l'evaporazione deve essere pari a 1 con i parametri a e b ($\lambda(T) = (a + bT)$), in riferimento al paragrafo 3.4.1, pari rispettivamente a 1 e 0,60. L'equazione 4.9 calcola la soglia del coefficiente di qualità, rispetto alla quale sono soddisfatte le condizioni per la cavitazione. La variazione della temperatura locale viene valutata laddove si prevede l'inizio della cavitazione. L'equazione può essere riscritta nel seguente modo:

$$\frac{b}{R}\left(\frac{\Delta T}{T_{in}}\right)^2 - \left[\frac{b}{R} - \frac{a}{RT_{in}} + \ln\left(\frac{P}{P_{in}}\right)\right]\frac{\Delta T}{T_{in}} - \ln\left(\frac{P}{P_{in}}\right) = 0 \quad (4.10)$$

Si tiene in conto che la relazione tra la temperatura, il coefficiente di qualità e i parametri caratteristici di λ è:

$$x\frac{a + bT}{T} = x_{in}\frac{a + bT_{in}}{T_{in}} - c\ln\left(\frac{T}{T_{in}}\right) \quad (4.11)$$

dove a e b sono le costanti tipiche e c è il calore specifico.

Esplicitando l'equazione 4.10 nella pagina precedente rispetto al raggio della nanobolla sono stati ottenuti i seguenti risultati per gli esperimenti. I risultati riportano un confronto tra il diametro sperimentale ottenuto dagli esperimenti in laboratorio, il diametro teorico ottenuto dalle relazioni matematiche che legano il raggio della nanobolla con il coefficiente di qualità e quindi con i parametri a e b , ed infine, il diametro della nanobolla non soggetto ad alcun trattamento (NO ESW). Dall'analisi sperimentale si ottiene:

- nanobolle con shell di Blank Chitosan (ESW E12) (figura 4.13 nella pagina seguente): si osserva che il diametro teorico e quello sperimentale si avvicinano ma non coincidono nel caso di 250 shots, 64 MPa
- nanobolle con shell di Blank Chitosan (ESW E15) (figura 4.14 nella pagina successiva): diametro teorico e sperimentale, tenendo conto della SD, coincidono nel caso di 250 shots, 64 MPa
- nanobolle con shell di Glicolchitosano (figura 4.15 a pagina 59): diametro teorico e sperimentale coincidono nel caso di 250 shots, 64 MPa
- nanobolle con shell di Chitosano+TPP (figura 4.16 a pagina 59): diametro teorico e sperimentale, tenendo conto della SD, sono quasi corrispondenti nel caso di 1000 shots, 64 MPa
- nanobolle con shell di Chitosano fluorescente-FITC (ESW E12) (figura 4.17 a pagina 60): diametro sperimentale e teorico differiscono parecchio, di circa 200 nm nel caso di 250 shots, 64 MPa
- nanobolle con shell di Chitosano fluorescente-FITC (ESW E15) (figura 4.18 a pagina 60): diametro sperimentale e teorico si avvicinano con uno scarto di circa 100 nm nel caso di 250 shots, 64 MPa.

Quindi tenendo conto del coefficiente di qualità $x = 1$, si deduce che il diametro sperimentale coincide con quello calcolato teoricamente. Infatti, tenendo conto della standard deviation del modello sperimentale, la differenza dei risultati ottenuti è minima. I rivestimenti delle nanobolle che approssimano meglio sono, come descritto:

- Blank Chitosan
- Glicolchitosano
- Chitosano+TPP

con un trattamento a 64 MPa e 250 Shots. Infatti era stato osservato che la curva rappresentativa della variazione del diametro in corrispondenza dei 250 shots, forma una campana in quanto viene raggiunto il diametro massimo [63]. In conclusione il modello approssima bene la teoria.

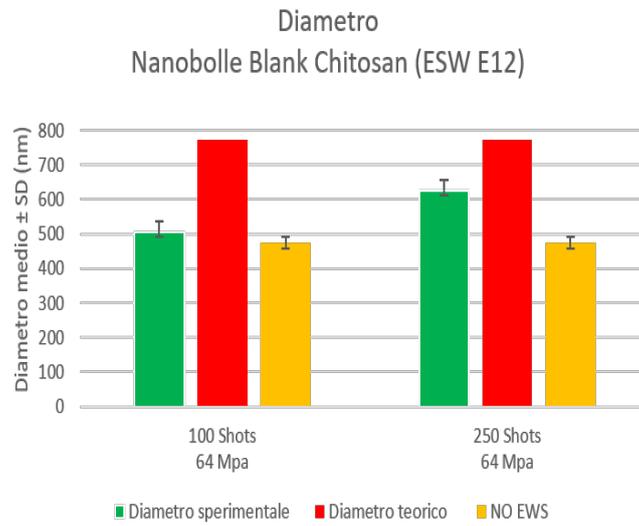


Figura 4.13: Confronto tra Diametro sperimentale, Diametro teorico e Diametro della nanobolla senza alcun trattamento. Nanobolle con shell di Blank Chitosan (ESW E12)

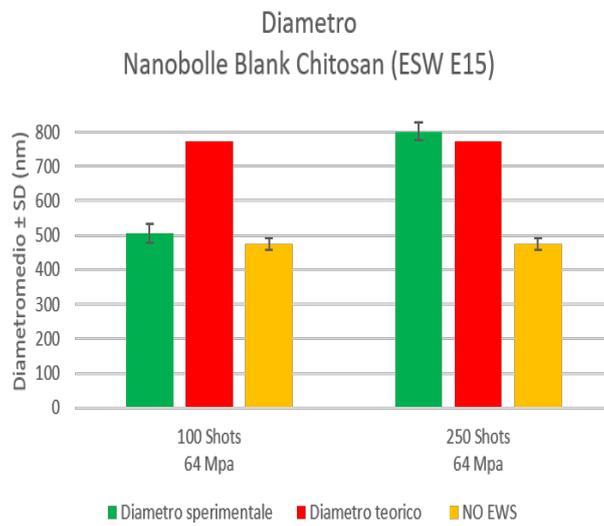


Figura 4.14: Confronto tra Diametro sperimentale, Diametro teorico e Diametro della nanobolla senza alcun trattamento. Nanobolle con shell di Blank Chitosan (ESW E15)

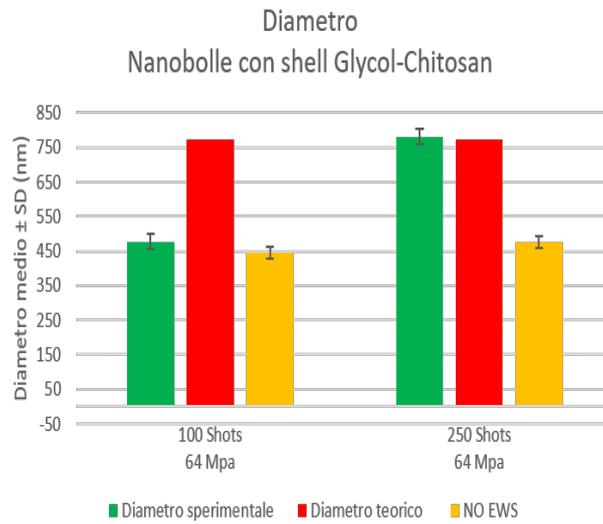


Figura 4.15: Confronto tra Diametro sperimentale, Diametro teorico e Diametro della nanobolla senza alcun trattamento. Nanobolle con shell di Glycol-Chitosan

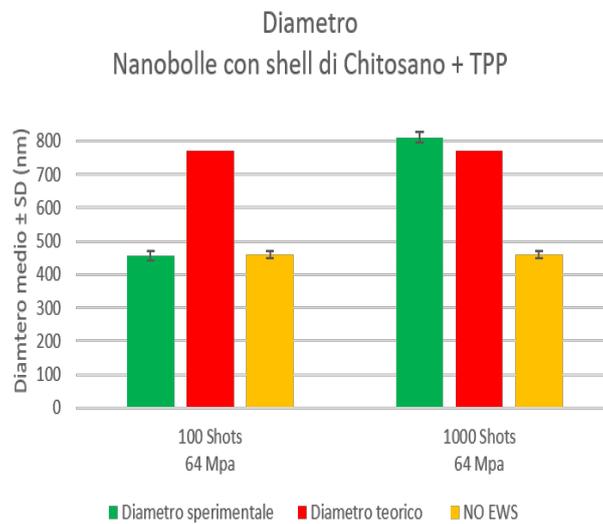


Figura 4.16: Confronto tra Diametro sperimentale, Diametro teorico e Diametro della nanobolla senza alcun trattamento. Nanobolle con shell di Chitosano+TPP

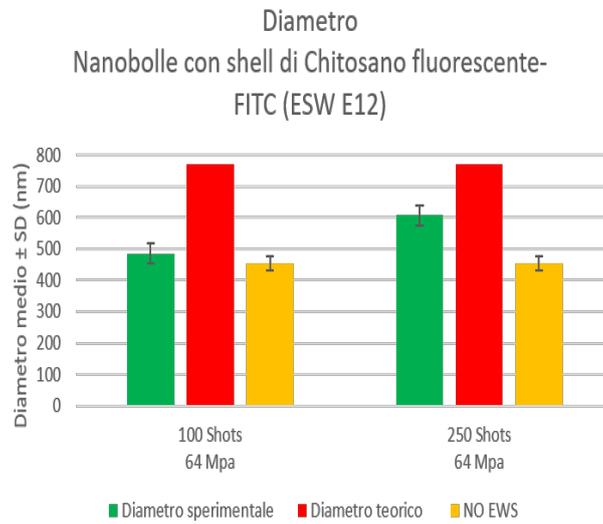


Figura 4.17: Confronto tra Diametro sperimentale, Diametro teorico e Diametro della nanobolla senza alcun trattamento. Nanobolle con shell di Fluorescent Chitosan-FITC

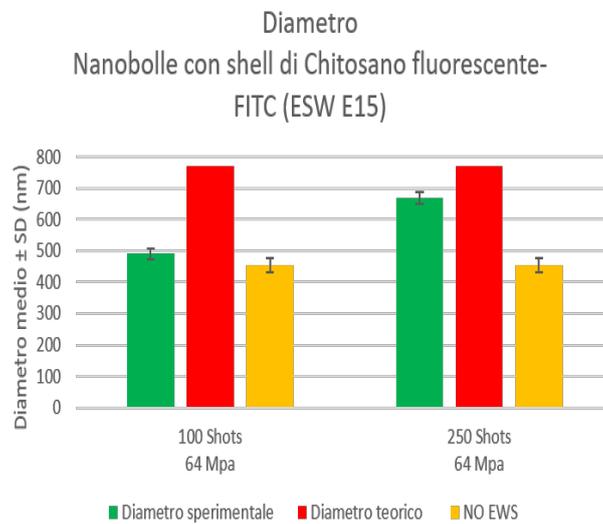


Figura 4.18: Confronto tra Diametro sperimentale, Diametro teorico e Diametro della nanobolla senza alcun trattamento. Nanobolle con shell di Fluorescent Chitosan-FITC(ESW E15)

Capitolo 5

Risultati sperimentali trattamento ESW per nanobolle contenenti doxorubicina

In questo studio è stata osservata la caratterizzazione chimico-fisica delle formulazioni delle bolle di Chitosano e Chitosano-TPP caricate con doxorubicina prima e dopo il trattamento ESW. La doxorubicina è un farmaco antitumorale che è stato incorporato nel cuore centrale della nanobolle dissolvendo la molecola nel decafluoropentano. La flessibilità strutturale delle nanobolle e il metodo di preparazione hanno permesso un'efficace co-incorporazione del farmaco. L'incorporazione della doxorubicina, figura 5.1, non ha influito sulla struttura core-shell delle nanobolle.

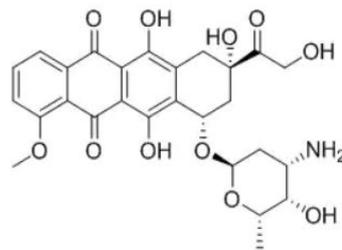


Figura 5.1: Doxorubicina: struttura chimica

5.1 Caratterizzazione fisico-chimica di nanobolle con doxorubicina con shell di Chitosano

Vengono riportati di seguito i risultati ottenuti.

Parametri	no ESW	ESW E12 100 shots, 64 MPa	ESW E12 250 shots, 64 MPa	ESW E12 500 shots, 64 MPa	ESW E12 1000 shots, 64 MPa
Diametro medio \pm SD(nm)	425.0 \pm 10.5	478.8 \pm 49.8	626.0 \pm 18.5	529.6 \pm 10.1	622.2 \pm 17.2
PDI	0.203 \pm 0.098	0.147 \pm 0.053	0.279 \pm 0.007	0.200 \pm 0.050	0.273 \pm 0.051
Potenziale Zeta \pm SD (mV)	32.05 \pm 0.97	30.78 \pm 1.15	31.66 \pm 2.04	31.00 \pm 1.76	30.55 \pm 1.46

Tabella 5.1: Caratterizzazione fisico-chimica nanobolla con Chitosano dopo trattamento ESW a 64 MPa e diversi numeri di shots

Parametri	no ESW	ESW E12 100 shots, 90 MPa	ESW E12 250 shots, 90 MPa	ESW E12 500 shots, 90 MPa	ESW E12 1000 shots, 90 MPa
Diametro medio \pm SD(nm)	425.0 \pm 10.5	408.3 \pm 63.9	532.8 \pm 54.2	555.1 \pm 8.9	621.3 \pm 49.6
PDI	0.203 \pm 0.098	0.324 \pm 0.041	0.234 \pm 0.067	0.204 \pm 0.028	0.322 \pm 0.044
Potenziale Zeta \pm SD (mV)	32.05 \pm 0.97	32.12 \pm 1.33	30.65 \pm 1.88	30.76 \pm 1.31	31.55 \pm 0.99

Tabella 5.2: Caratterizzazione fisico-chimica nanobolla con Chitosano dopo trattamento ESW a 90 MPa e diversi numeri di shots

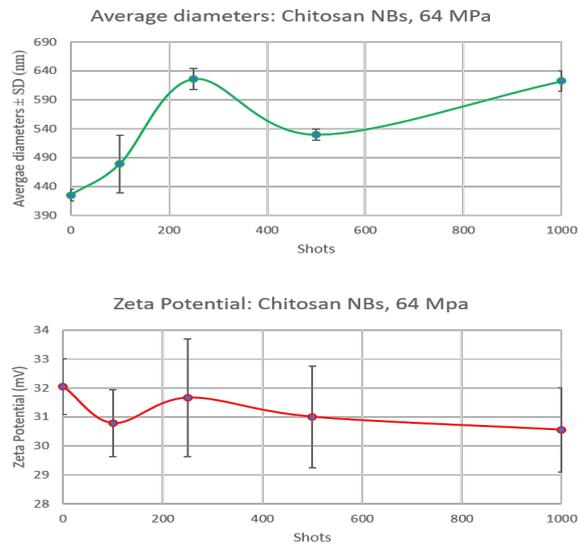


Figura 5.2: Caratterizzazione delle nanobolle caricate di doxorubicina e shell di Chitosano dopo trattamento ESW a 64 MPa e differenti numeri di shots.

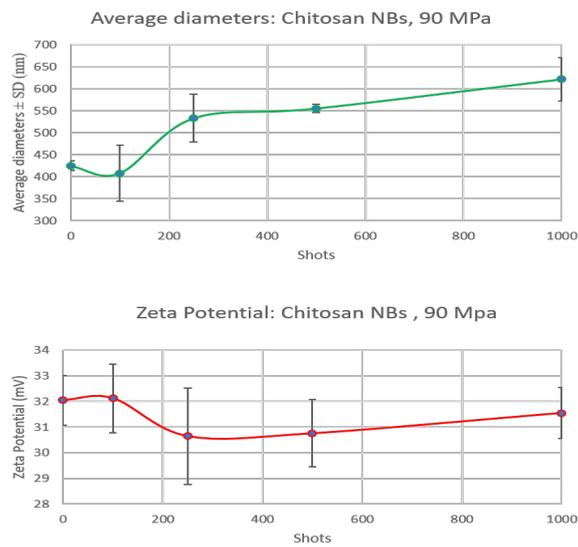


Figura 5.3: Caratterizzazione delle nanobolle caricate di doxorubicina e shell di Chitosano dopo trattamento ESW a 90 MPa e differenti numeri di shots.

Parametri ESW	% di doxorubicina rilasciata
ESW E12 100 shots, 64 MPa	4.71 ± 0.13
ESW E12 100 shots, 64 MPa	5.90 ± 0.01
ESW E12 100 shots, 64 MPa	5.05 ± 0.01
ESW E12 100 shots, 64 MPa	5.69 ± 0.01
ESW E15 100 shots, 90 MPa	5.99 ± 0.01
ESW E15 100 shots, 90 MPa	6.73 ± 0.08
ESW E15 100 shots, 90 MPa	7.72 ± 0.07
ESW E15 100 shots, 90 MPa	8.60 ± 0.09

Tabella 5.3: Percentuale di doxorubicina rilasciata dalla nanobolla con shell di Chitosano dopo il trattamento ESW

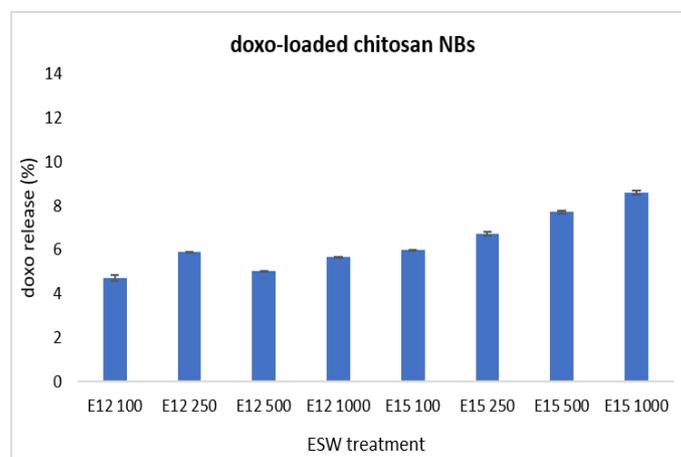


Figura 5.4: Rilascio di doxorubicina in vitro da una nanobolla riempita di doxorubicina e shell si Chitosano dopo il trattamento ESW.

Dal confronto tra il trattamento ESW su nanobolle con shell di Chitosano, figura 4.7 a pagina 51 e figura 4.8 a pagina 51, e su nanobolle caricate di doxorubicina con shell di Chitosano, figura 5.2 a pagina 63 e 5.3 a pagina 63 si denota che:

- l'aumento del diametro medio all'aumentare del numero di shots è leggermente inferiore nel caso di nanobolle con doxorubicina
- il diametro iniziale senza ESW, nel secondo caso risulta essere leggermente inferiore con una SD minore;
- il picco maggiore di diametro medio avviene in entrambi i casi a 250 shots;
- nel caso di nanobolla con doxorubicina e trattamento ESW a 90 MPa, in corrispondenza dei 100 shots si nota una diminuzione del diametro medio però con una SD molto alta pari a 63,90 nm quindi può essere trascurata;
- l'andamento del Potenziale Zeta è molto simile e quindi si possono dedurre le stesse conclusioni del capitolo precedente, ovvero che le bolle successivamente al trattamento, risultano essere stabili.

Il farmaco ha mostrato un rilascio spontaneo lento e prolungato in vitro, figura 5.4 nella pagina precedente con la stimolazione ESW. Queste misurazioni preliminari in vitro hanno dimostrato che le nanobolle sono ben rilevabili in ecografia o in risonanza magnetica e questo risulta essere una prova della fattibilità di questo tipo di nanobolle. I risultati ottenuti forniscono utili spunti per la progettazione di agenti teranostici multi-task.

5.2 Caratterizzazione fisico-chimica di nanobolle con doxorubicina con shell di Chitosano-TPP

Parametri	no ESW	ESW E12 100 shots, 64 MPa	ESW E12 250 shots, 64 MPa	ESW E12 500 shots, 64 MPa	ESW E12 1000 shots, 64 MPa
Diametro medio \pm SD(nm)	401.3 \pm 10.7	397.8 \pm 81.6	539.5 \pm 52.1	553.5 \pm 60.8	569.3 \pm 62.2
PDI	0.233 \pm 0.065	0.280 \pm 0.081	0.271 \pm 0.041	0.273 \pm 0.134	0.340 \pm 0.041
Potenziale Zeta \pm SD (mV)	21.51 \pm 1.33	22.12 \pm 1.08	20.35 \pm 0.54	24.01 \pm 1.28	23.47 \pm 1.66

Tabella 5.4: Caratterizzazione fisico-chimica dopo trattamento ESW a 64 MPa e diversi numeri di shots, Chitosano-TPP

Parametri	no ESW	ESW E12 100 shots, 90 MPa	ESW E12 250 shots, 90 MPa	ESW E12 500 shots, 90 MPa	ESW E12 1000 shots, 90 MPa
Diametro medio \pm SD(nm)	401.3 \pm 10.7	406.7 \pm 46.6	587.0 \pm 5.4	479.3 \pm 73.8	555.1 \pm 52.2
PDI	0.233 \pm 0.065	0.266 \pm 0.031	0.354 \pm 0.001	0.300 \pm 0.059	0.347 \pm 0.035
Potenziale Zeta \pm SD (mV)	21.51 \pm 1.33	20.78 \pm 1.34	21.66 \pm 1.14	22.88 \pm 1.42	23.01 \pm 0.96

Tabella 5.5: Caratterizzazione fisico-chimica dopo trattamento ESW a 90 MPa e diversi numeri di shots, Chitosano-TPP

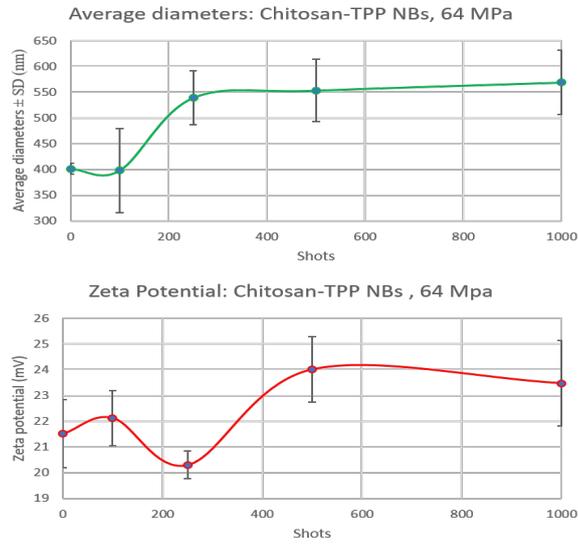


Figura 5.5: Caratterizzazione delle nanobolle caricate di doxorubicina e shell di Chitosano-TPP dopo trattamento ESW a 64 MPa e differenti numeri di shots.

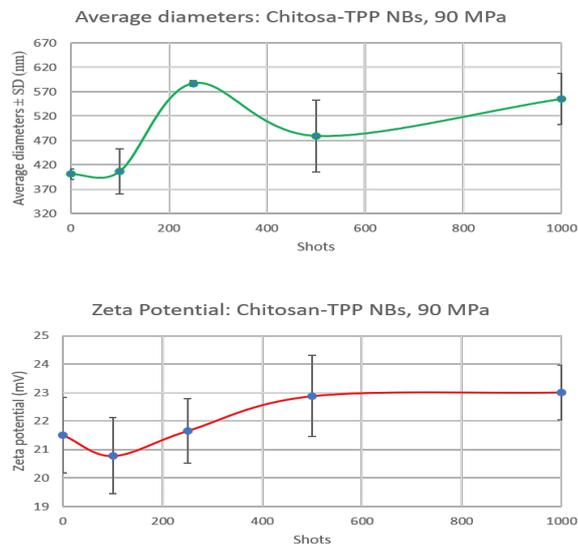


Figura 5.6: Caratterizzazione delle nanobolle caricate di doxorubicina e shell di Chitosano-TPP dopo trattamento ESW a 90 MPa e differenti numeri di shots.

Parametri ESW	% di doxorubicina rilasciata
ESW E12 100 shots, 64 MPa	5.25 ± 0.02
ESW E12 100 shots, 64 MPa	6.19 ± 0.01
ESW E12 100 shots, 64 MPa	6.16 ± 0.06
ESW E12 100 shots, 64 MPa	6.51 ± 0.07
ESW E15 100 shots, 90 MPa	5.46 ± 0.02
ESW E15 100 shots, 90 MPa	6.49 ± 0.07
ESW E15 100 shots, 90 MPa	6.75 ± 0.07
ESW E15 100 shots, 90 MPa	7.73 ± 0.018

Tabella 5.6: Percentuale di doxorubicina rilasciata dalla nanobolla con shell di Chitosano-TPP dopo il trattamento ESW

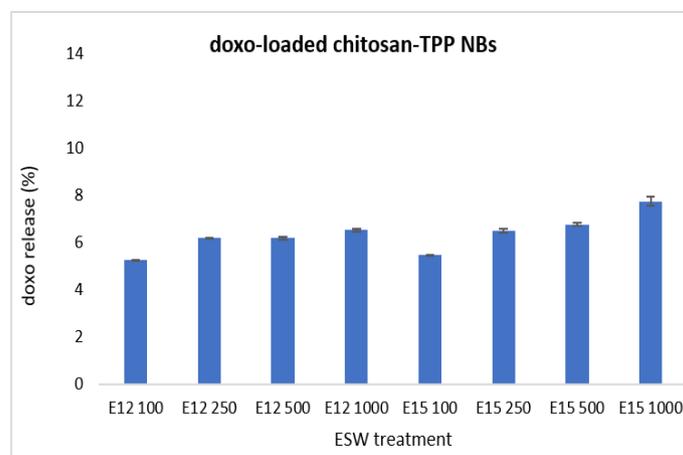


Figura 5.7: Rilascio di doxorubicina in vitro da una nanobolla riempita di doxorubicina e shell si Chitosano-TPP dopo il trattamento ESW.

Dal confronto tra il trattamento ESW su nanobolle con shell di Chitosano, figura 4.11 a pagina 53, e su nanobolle caricate di doxorubicina con shell di Chitosano-TPP, figura 5.5 a pagina 67 e figura 5.6 a pagina 67, si denota che:

- aumento del diametro all'aumentare del numero di shots è leggermente inferiore nel caso di nanobolle caricate con doxorubicina
- nel caso della pressione di 90 MPa e 1000 shots, il diametro finale dopo il trattamento ESW, risulta essere doppio nel caso di nanobolla senza doxorubicina pari a 1177,20 nm (555,10 MPa nel caso di nanobolla con farmaco)
- non vi è in entrambi i casi un picco maggiore di diametro:
 - crescendo lineare dai 250 shots a 64MPa fino ai 1000 shots a 90 MPa nel caso di nanobolla con doxorubicina. In questo caso successivamente ai 250 shots non c'è una diminuzione del diametro medio
 - un picco ai 250 shots, seguito da una diminuzione ai 500 shots e infine una crescita lineare fino a 1000 shots, 90 MPa per le nanobolle con doxorubicina e trattamento a 90 MPa. Questo comportamento è molto simile all'andamento del diametro medio delle nanobolle senza farmaco trattate con ESW a 64 MPa
- l'andamento del Potenziale Zeta è molto simile e quindi si possono dedurre le stesse conclusioni del capitolo precedente, ovvero che le bolle successivamente al trattamento, risultano essere stabili

Per quanto riguarda la percentuale di rilascio della doxorubicina vale quanto detto nel paragrafo 5.1. Si nota che nel caso di shell di chitosano TPP il rilascio è leggermente maggiore di circa l'1 % e in entrambi i casi si ha la quantità maggiore rilasciata a 100 shots e ESW a 90 MPa pari a 8,60 % nel caso di nanobolla con shell di chitosano e pari a 7,73 % nel caso di nanobolla con shell di Chitosano-TPP.

Capitolo 6

Studio della ripetibilità e dell'efficacia del trattamento

Sono stati ripetuti gli esperimenti in laboratorio per verificarne la ripetibilità e le eventuali differenze statistiche significative.

Vengono riportati di seguito i risultati relativi a due prove di ESW con nanobolle caricate con doxorubicina-shell di Chitosano e due prove di ESW con nanobolle caricate con doxorubicina-shell di Chitosano-TPP.

6.1 NBs caricate con doxorubicina-shell di Chitosano

6.1.1 Prima prova

Parametri	no ESW	ESW E12 100 shots, 64 MPa	ESW E12 250 shots, 64 MPa	ESW E12 500 shots, 64 MPa	ESW E12 1000 shots, 64 MPa
Diametro medio \pm SD(nm)	405.9 \pm 12.5	455.8 \pm 14.8	570.6 \pm 38.1	600.4 \pm 39.2	602.9 \pm 42.9
PDI	0.226 \pm 0.085	0.296 \pm 0.068	0.358 \pm 0.082	0.346 \pm 0.123	0.350 \pm 0.070
Potenziale Zeta \pm SD (mV)	31.45 \pm 1.12	31.05 \pm 0.77	32.01 \pm 1.44	30.40 \pm 0.99	30.54 \pm 1.88

Tabella 6.1: Caratterizzazione fisico-chimica dopo trattamento ESW a 64 MPa e diversi numeri di shots, Chitosano

Parametri	no ESW	ESW E12 100 shots, 90 MPa	ESW E12 250 shots, 90 MPa	ESW E12 500 shots, 90 MPa	ESW E12 1000 shots, 90 MPa
Diametro medio ± SD(nm)	405.9 ± 12.5	537.7 ± 23.3	679.9 ± 12.7	707.9 ± 34.6	660.8 ± 44.9
PDI	0.226 ± 0.085	0.245 ± 0.075	0.356 ± 0.005	0.302 ± 0.018	0.369 ± 0.017
Potenziale Zeta ± SD (mV)	31.45 ± 1.12	32.11 ± 1.28	30.13 ± 0.94	31.11 ± 1.92	31.02 ± 1.54

Tabella 6.2: Caratterizzazione fisico-chimica dopo trattamento ESW a 90 MPa e diversi numeri di shots, Chitosano

Parametri ESW	% di doxorubicina rilasciata
ESW E12 100 shots, 64 MPa	5.70 ± 0.02
ESW E12 100 shots, 64 MPa	5.53 ± 0.02
ESW E12 100 shots, 64 MPa	6.60 ± 0.12
ESW E12 100 shots, 64 MPa	7.44 ± 0.27
ESW E15 100 shots, 90 MPa	5.93 ± 0.10
ESW E15 100 shots, 90 MPa	6.29 ± 0.04
ESW E15 100 shots, 90 MPa	7.72 ± 0.15
ESW E15 100 shots, 90 MPa	9.89 ± 0.011

Tabella 6.3: Percentuale di doxorubicina rilasciata dalla nanobolla con shell di Chitosano dopo il trattamento ESW

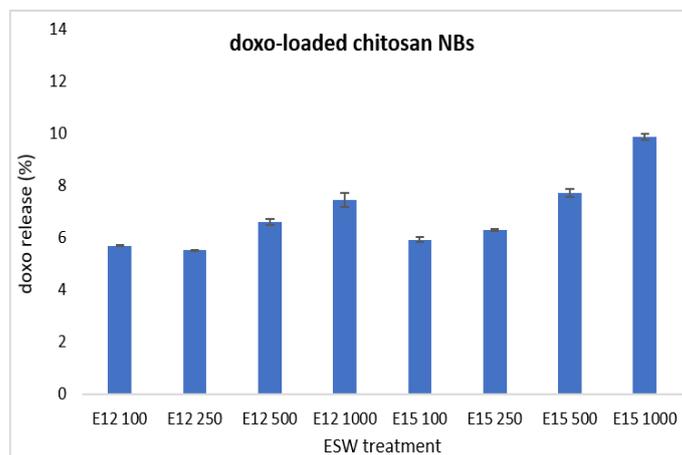


Figura 6.1: Rilascio di doxorubicina in vitro da una nanobolla riempita di doxorubicina e shell si Chitosano dopo il trattamento ESW.

6.1.2 Seconda prova

Parametri	no ESW	ESW E12 100 shots, 64 MPa	ESW E12 250 shots, 64 MPa	ESW E12 500 shots, 64 MPa	ESW E12 1000 shots, 64 MPa
Diametro medio \pm SD(nm)	404.6 \pm 11.5	450.5 \pm 10.2	581.4 \pm 13.0	580.9 \pm 14.0	502.5 \pm 23.2
PDI	0.222 \pm 0.030	0.122 \pm 0.060	0.305 \pm 0.014	0.356 \pm 0.011	0.308 \pm 0.09
Potenziale Zeta \pm SD (mV)	30.24 \pm 0.25	31.03 \pm 1.38	29.98 \pm 2.12	30.64 \pm 1.77	29.75 \pm 2.46

Tabella 6.4: Caratterizzazione fisico-chimica dopo trattamento ESW a 64 MPa e diversi numeri di shots, Chitosano

Parametri	no ESW	ESW E12 100 shots, 90 MPa	ESW E12 250 shots, 90 MPa	ESW E12 500 shots, 90 MPa	ESW E12 1000 shots, 90 MPa
Diametro medio \pm SD(nm)	404.6 \pm 11.5	398.9 \pm 8.0	532.4 \pm 43.3	522.1 \pm 40.8	552.2 \pm 42.1
PDI	0.222 \pm 0.030	0.249 \pm 0.054	0.373 \pm 0.010	0.348 \pm 0.024	0.328 \pm 0.046
Potenziale Zeta \pm SD (mV)	30.24 \pm 0.25	29.86 \pm 0.89	31.05 \pm 1.26	30.45 \pm 1.32	29.11 \pm 2.12

Tabella 6.5: Caratterizzazione fisico-chimica dopo trattamento ESW a 90 MPa e diversi numeri di shots, Chitosano

Parametri ESW	% di doxorubicina rilasciata
ESW E12 100 shots, 64 MPa	2.66 ± 0.05
ESW E12 100 shots, 64 MPa	3.63 ± 0.01
ESW E12 100 shots, 64 MPa	4.62 ± 0.01
ESW E12 100 shots, 64 MPa	4.43 ± 0.04
ESW E15 100 shots, 90 MPa	3.78 ± 0.22
ESW E15 100 shots, 90 MPa	3.80 ± 0.07
ESW E15 100 shots, 90 MPa	4.72 ± 0.04
ESW E15 100 shots, 90 MPa	4.76 ± 0.01

Tabella 6.6: Percentuale di doxorubicina rilasciata dalla nanobolla con shell di Chitosano dopo il trattamento ESW

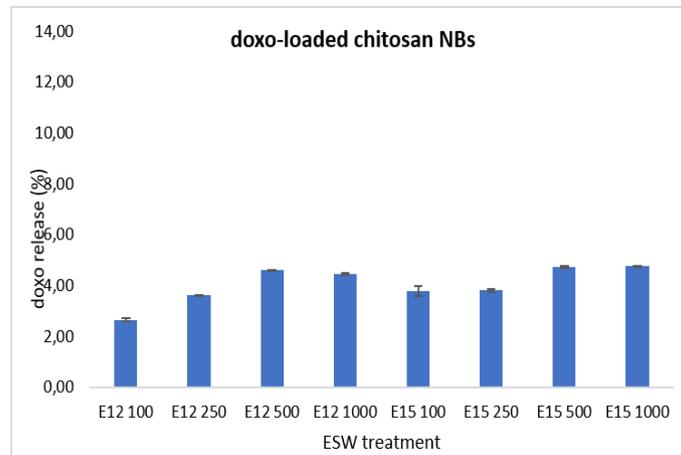


Figura 6.2: Rilascio di doxorubicina in vitro da una nanobolla riempita di doxorubicina e shell si Chitosano-TPP dopo il trattamento ESW.

6.2 NBs caricate con doxorubicina-shell di Chitosano-TPP

6.2.1 Prima prova

Parametri	no ESW	ESW E12 100 shots, 64 MPa	ESW E12 250 shots, 64 MPa	ESW E12 500 shots, 64 MPa	ESW E12 1000 shots, 64 MPa
Diametro medio \pm SD(nm)	398.7 \pm 10.4	494.6 \pm 31.0	613.0 \pm 16.0	596.6 \pm 19.1	739.9 \pm 10.8
PDI	0.222 \pm 0.057	0.277 \pm 0.038	0.344 \pm 0.021	0.345 \pm 0.020	0.261 \pm 0.113
Potenziale Zeta \pm SD (mV)	22.50 \pm 0.99	21.94 \pm 1.33	20.88 \pm 1.34	22.15 \pm 0.76	21.55 \pm 1.27

Tabella 6.7: Caratterizzazione fisico-chimica dopo trattamento ESW a 64 MPa e diversi numeri di shots, Chitosano-TPP

Parametri	no ESW	ESW E12 100 shots, 90 MPa	ESW E12 250 shots, 90 MPa	ESW E12 500 shots, 90 MPa	ESW E12 1000 shots, 90 MPa
Diametro medio \pm SD(nm)	398.7 \pm 10.4	484.7 \pm 7.7	733.8 \pm 16.9	569.7 \pm 11.2	762.7 \pm 44.3
PDI	0.222 \pm 0.057	0.309 \pm 0.032	0.459 \pm 0.009	0.346 \pm 0.073	0.342 \pm 0.018
Potenziale Zeta \pm SD (mV)	22.50 \pm 0.99	20.95 \pm 0.83	22.21 \pm 1.07	21.83 \pm 1.76	20.95 \pm 1.36

Tabella 6.8: Caratterizzazione fisico-chimica dopo trattamento ESW a 90 MPa e diversi numeri di shots, Chitosano

Parametri ESW	% di doxorubicina rilasciata
ESW E12 100 shots, 64 MPa	6.86 ± 0.27
ESW E12 100 shots, 64 MPa	8.58 ± 0.07
ESW E12 100 shots, 64 MPa	10.50 ± 0.47
ESW E12 100 shots, 64 MPa	12.66 ± 0.92
ESW E15 100 shots, 90 MPa	8.25 ± 0.09
ESW E15 100 shots, 90 MPa	8.40 ± 0.14
ESW E15 100 shots, 90 MPa	9.49 ± 10.24
ESW E15 100 shots, 90 MPa	9.78 ± 0.13

Tabella 6.9: Percentuale di doxorubicina rilasciata dalla nanobolla con shell di Chitosano-TPP dopo il trattamento ESW

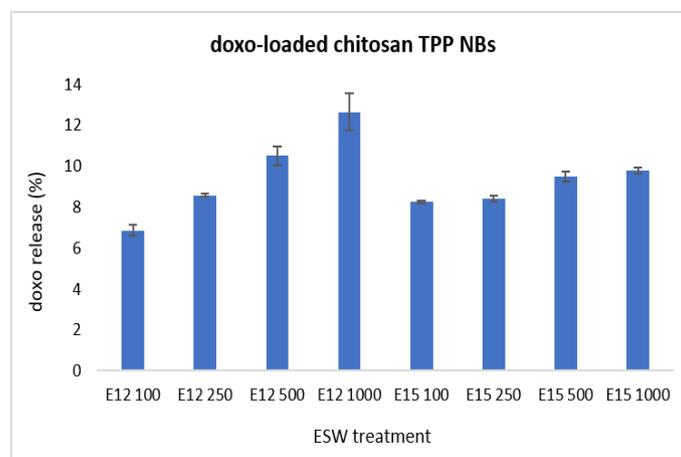


Figura 6.3: Rilascio di doxorubicina in vitro da una nanobolla riempita di doxorubicina e shell si Chitosano-TPP dopo il trattamento ESW.

6.2.2 Seconda prova

Parametri	no ESW	ESW E12 100 shots, 64 MPa	ESW E12 250 shots, 64 MPa	ESW E12 500 shots, 64 MPa	ESW E12 1000 shots, 64 MPa
Diametro medio \pm SD(nm)	420.07 \pm 15.0	416.0 \pm 86.6	581.7 \pm 22.3	559.8 \pm 40.0	580.3 \pm 19.0
PDI	0.222 \pm 0.030	0.321 \pm 0.023	0.342 \pm 0.019	0.347 \pm 0.014	0.290 \pm 0.019
Potenziale Zeta \pm SD (mV)	22.45 \pm 1.24	20.89 \pm 1.28	21.57 \pm 1.62	22.65 \pm 1.25	22.33 \pm 1.44

Tabella 6.10: Caratterizzazione fisico-chimica dopo trattamento ESW a 64 MPa e diversi numeri di shots, Chitosano-TPP

Parametri	no ESW	ESW E12 100 shots, 90 MPa	ESW E12 250 shots, 90 MPa	ESW E12 500 shots, 90 MPa	ESW E12 1000 shots, 90 MPa
Diametro medio \pm SD(nm)	420.7 \pm 15.0	454.3 \pm 40.0	553.7 \pm 31.9	476.6 \pm 45.2	598.8 \pm 10.2
PDI	0.222 \pm 0.030	0.337 \pm 0.002	0.382 \pm 0.008	0.379 \pm 0.069	0.396 \pm 0.015
Potenziale Zeta \pm SD (mV)	22.45 \pm 1.24	22.06 \pm 1.35	20.86 \pm 1.03	23.05 \pm 1.21	23.12 \pm 2.06

Tabella 6.11: Caratterizzazione fisico-chimica dopo trattamento ESW a 90 MPa e diversi numeri di shots, Chitosano-TPP

Parametri ESW	% di doxorubicina rilasciata
ESW E12 100 shots, 64 MPa	5.70 ± 0.11
ESW E12 100 shots, 64 MPa	7.64 ± 0.06
ESW E12 100 shots, 64 MPa	9.82 ± 0.46
ESW E12 100 shots, 64 MPa	11.68 ± 0.12
ESW E15 100 shots, 90 MPa	3.70 ± 0.02
ESW E15 100 shots, 90 MPa	5.23 ± 0.02
ESW E15 100 shots, 90 MPa	9.66 ± 0.12
ESW E15 100 shots, 90 MPa	9.83 ± 0.09

Tabella 6.12: Percentuale di doxorubicina rilasciata dalla nanobolla con shell di Chitosano-TPP dopo il trattamento ESW

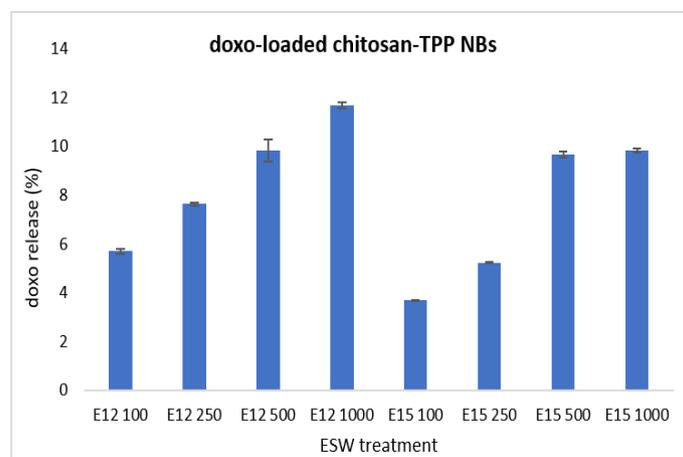


Figura 6.4: Rilascio di doxorubicina in vitro da una nanobolla riempita di doxorubicina e shell si Chitosano-TPP dopo il trattamento ESW.

6.3 Conclusioni

Vengono riportati di seguito i confronti di tre test eseguiti nelle stesse condizioni ambientali e chimico-fisiche.

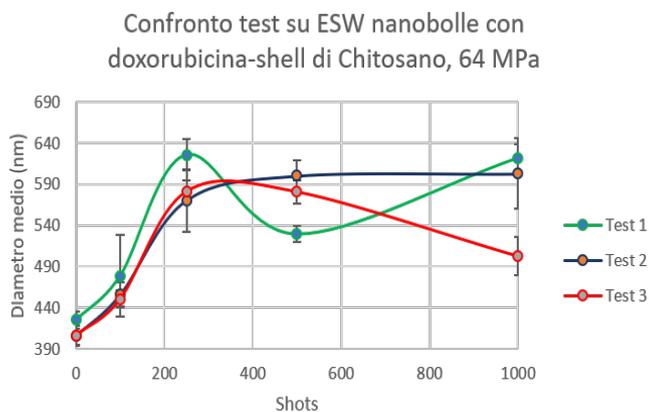


Figura 6.5: Confronto test su ESW nanobolle con doxorubicina-shell di Chitosano, 64 MPa

In figura 6.5 vengono rappresentati i test ESW sulle nanobolle con doxorubicina-shell di Chitosano 64 MPa. Si nota un andamento simile per quanto riguarda i test 2 e 3 tenendo conto della standard deviation. Il test 1, invece si discosta dall'andamento tipico in corrispondenza dei 250 shots ma, avendo una SD pari a 18,50 nm può altresì assumere un valore prossimo agli altri due test. Nel tratto dei 500 shots invece, pur considerando la SD, si ha una differenza sostanziale.

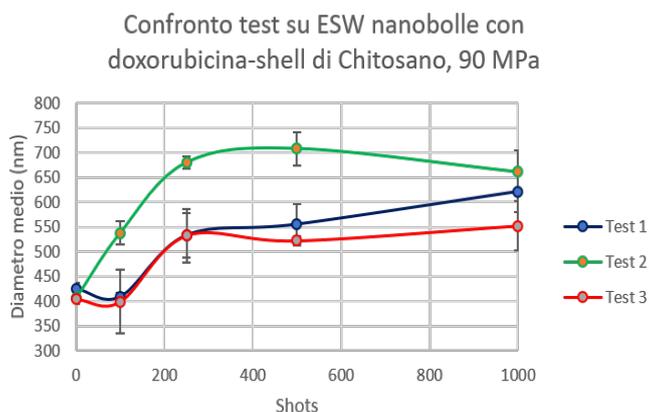


Figura 6.6: Confronto test su ESW nanobolle con doxorubicina-shell di Chitosano, 90 MPa

In figura 6.6 vengono rappresentati i test ESW sulle nanobolle con doxorubicina-shell di Chitosano 90 MPa. Si nota che l'andamento del Test 2 si discosta maggiormente rispetto gli altri due per tutto il

trattamento tenendo conto anche della SD. Invece i test 1 e 3 sono praticamente coincidenti.

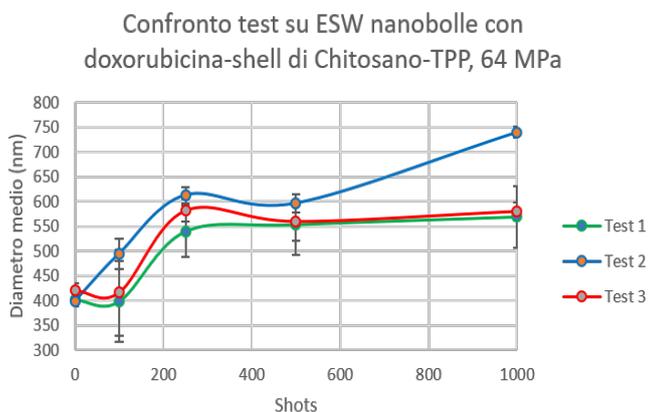


Figura 6.7: Confronto test su ESW nanobolle con doxorubicina-shell di Chitosano-TPP, 64 MPa

In figura 6.7 vengono rappresentati i test ESW sulle nanobolle con doxorubicina-shell di Chitosano-TPP 64 MPa. In questo caso si osserva un andamento pressoché comune, con l'unica differenza per il test 2 ai 1000 shots. I test 2 e 3 sono coincidenti.

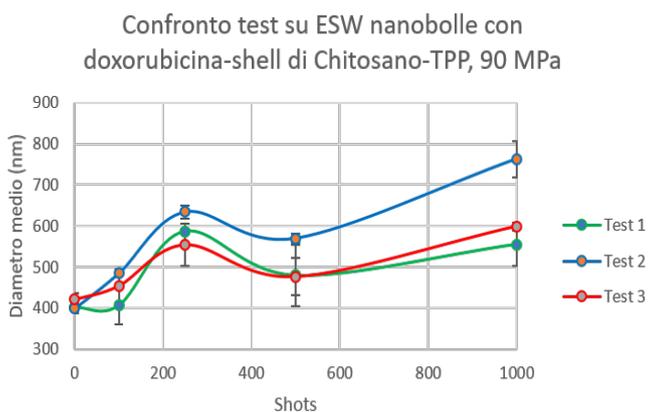


Figura 6.8: Confronto test su ESW nanobolle con doxorubicina-shell di Chitosano, 90 MPa

Infine, in figura 6.8 vengono rappresentati i test ESW sulle nanobolle con doxorubicina-shell di Chitosano-TPP 90 MPa. Gli andamenti dei tre test sono corrispondenti e i risultati ottenuti sono quindi congruenti.

Come esaminato nel capitolo 5 a pagina 61, per avere un'evaporazione al 100 % del contenuto all'interno della nanobolla il diametro medio raggiunto in seguito al trattamento risultava essere di circa 771 nm. Nel caso di nanobolle senza doxorubicina quelle che hanno raggiunto diametri teorici e sperimentali maggiormente coincidenti sono state quelle con shell di Chitosano (90 MPa), shell di

Glicolchitosano (64 MPa) e di Chitosano-TPP (64 MPa) tutte nel caso di 250 shots. Le nanobolle con doxorubicina non raggiungono spesso il diametro medio necessario per l'evaporazione totale del farmaco ma è un risultato aspettato in quanto le percentuali di rilascio di quantità del farmaco sono relativamente basse. Le percentuali maggiori di doxorubicina rilasciata corrispondono rispettivamente a:

- nanobolla con doxorubicina e shell di Chitosano, 1000 shots a 90 MPa, figura 6.1 a pagina 71. Infatti, si dimostra che in corrispondenza il diametro medio raggiunto è pari a $660,80 \text{ nm} \pm 44,90 \text{ nm}$ e che quindi si colloca nelle vicinanze del diametro desiderato;
- nanobolla con doxorubicina e shell di Chitosano-TPP, 1000 shots a 64 MPa, figura 6.3 a pagina 75. Il diametro medio raggiunto in corrispondenza è pari a $733,80 \text{ nm} \pm 16,90 \text{ nm}$ che è prossimo al diametro desiderato.

In altri studi [66] era stata già dimostrata l'efficacia del trifosfato pentasodico (TPP) nelle applicazioni di *drug delivery* in quanto dotato di una tossicità nei livelli limite e di un potere gelificante elevato.

In conclusione, è stato dimostrato che il modello matematico della nanobolla approssima bene il comportamento desiderato per il rilascio di farmaco antitumorale direttamente in loco. La corrispondenza del diametro teorico con quello sperimentale e la ripetibilità del trattamento mostrano il raggiungimento dello scopo di questo studio.

Nel caso di nanobolle caricate con farmaco doxorubicina, il diametro teorico viene raggiunto nei casi di maggiore percentuale di rilascio di farmaco e questo dimostra l'applicabilità in campo biomedicale del modello matematico di nanobolla presentato nella sezione 3.4 a pagina 41.

Bibliografia

- [1] W. Lauterborn, T. Kurz, R. Geisler, D. Schanz, and O. Lindau, "Acoustic cavitation, bubble dynamics and sonoluminescence," *Ultrasonics sonochemistry*, vol. 14, no. 4, pp. 484–491, 2007.
- [2] G. Ter Haar, "Therapeutic applications of ultrasound," *Progress in biophysics and molecular biology*, vol. 93, no. 1-3, pp. 111–129, 2007.
- [3] B. Moretti, R. Garofalo, V. Patella, G. L. Sisti, M. Corrado, and E. Mouhsine, "Extracorporeal shock wave therapy in runners with a symptomatic heel spur," *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, vol. 14, no. 10, pp. 1029–1032, 2006.
- [4] T. Leong, M. Ashokkumar, and S. Kentish, "The fundamentals of power ultrasound-a review," 2011.
- [5] C. E. Brennen, *Cavitation and bubble dynamics*. Cambridge University Press, 2014.
- [6] E. Klaseboer, S. W. Fong, C. K. Turangan, B. C. Khoo, A. J. Szeri, M. L. Calvisi, G. N. Sankin, and P. Zhong, "Interaction of lithotripter shockwaves with single inertial cavitation bubbles," *Journal of fluid mechanics*, vol. 593, pp. 33–56, 2007.
- [7] B. D. Storey, H. Lin, and A. J. Szeri, "Physically realistic models of catastrophic bubble collapses," <http://resolver.caltech.edu/cav2001:sessionB6.001>, 2001.
- [8] M. S. Plesset, "The dynamics of cavitation bubbles," *Journal of applied mechanics*, vol. 16, pp. 277–282, 1949.
- [9] K. Vokurka, "Comparison of rayleigh's, herring's, and gilmore's models of gas bubbles," *Acta Acustica united with Acustica*, vol. 59, no. 3, pp. 214–219, 1986.
- [10] T. Leighton, *The acoustic bubble*. Academic press, 2012.
- [11] D. Chatterjee and K. Sarkar, "A newtonian rheological model for the interface of microbubble contrast agents," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 29, no. 12, pp. 1749–1757, 2003.
- [12] A. A. Doinikov and P. A. Dayton, "Spatio-temporal dynamics of an encapsulated gas bubble in an ultrasound field," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 120, no. 2, pp. 661–669, 2006.
- [13] N. de Jong, L. Hoff, T. Skotland, and N. Bom, "Absorption and scatter of encapsulated gas filled microspheres: theoretical considerations and some measurements," *Ultrasonics*, vol. 30, no. 2, pp. 95–103, 1992.
- [14] P. Zhong, Y. Zhou, and S. Zhu, "Dynamics of bubble oscillation in constrained media and mechanisms of vessel rupture in swl," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 27, no. 1, pp. 119–134, 2001.

- [15] T. A. Hay, Y. A. Ilinskii, E. A. Zabolotskaya, and M. F. Hamilton, "Model for the dynamics of a spherical bubble undergoing small shape oscillations between parallel soft elastic layers," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 134, no. 2, pp. 1454–1462, 2013.
- [16] N. Hosseinkhah and K. Hynynen, "A three-dimensional model of an ultrasound contrast agent gas bubble and its mechanical effects on microvessels," *Physics in Medicine & Biology*, vol. 57, no. 3, p. 785, 2012.
- [17] J. S. Allen and R. A. Roy, "Dynamics of gas bubbles in viscoelastic fluids. i. linear viscoelasticity," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 107, no. 6, pp. 3167–3178, 2000.
- [18] O. J. Wess, "Physics and technique of shock wave lithotripsy (swl)," in *Urolithiasis*, pp. 301–311, Springer, 2012.
- [19] P. Robinson, J. Blake, T. Kodama, A. Shima, and Y. Tomita, "Interaction of cavitation bubbles with a free surface," *Journal of Applied Physics*, vol. 89, no. 12, pp. 8225–8237, 2001.
- [20] G. Sankin and P. Zhong, "Interaction between shock wave and single inertial bubbles near an elastic boundary," *Physical Review E*, vol. 74, no. 4, p. 046304, 2006.
- [21] S. Zullino, M. Argenziano, I. Stura, C. Guiot, and R. Cavalli, "From micro-to nano-multifunctional theranostic platform: effective ultrasound imaging is not just a matter of scale," *Molecular imaging*, vol. 17, p. 1536012118778216, 2018.
- [22] K. Kooiman, H. J. Vos, M. Versluis, and N. de Jong, "Acoustic behavior of microbubbles and implications for drug delivery," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 72, pp. 28–48, 2014.
- [23] R. O. Cleveland and J. A. McAteer, "The physics of shock wave lithotripsy," *Smith's textbook on endourology*, vol. 1, pp. 529–558, 2007.
- [24] A. M. Loske, "The role of energy density and acoustic cavitation in shock wave lithotripsy," *Ultrasonics*, vol. 50, no. 2, pp. 300–305, 2010.
- [25] S. McClure and C. Dorfmueller, "Extracorporeal shock wave therapy: theory and equipment," *Clinical Techniques in Equine Practice*, vol. 2, no. 4, pp. 348–357, 2003.
- [26] F. A. Duck, "Nonlinear acoustics in diagnostic ultrasound," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 28, no. 1, pp. 1–18, 2002.
- [27] U. Lucia, *Elementi di ingegneria delle terapie termiche*. 09 2017.
- [28] J. E. Kennedy, "High-intensity focused ultrasound in the treatment of solid tumours," *Nature reviews cancer*, vol. 5, no. 4, p. 321, 2005.
- [29] C. Hill and G. Ter Haar, "High intensity focused ultrasound—potential for cancer treatment," *The British journal of radiology*, vol. 68, no. 816, pp. 1296–1303, 1995.
- [30] Y.-C. Wang, S.-J. Chen, P.-J. Huang, H.-T. Huang, Y.-M. Cheng, and C.-L. Shih, "Efficacy of different energy levels used in focused and radial extracorporeal shockwave therapy in the treatment of plantar fasciitis: A meta-analysis of randomized placebo-controlled trials," *Journal of clinical medicine*, vol. 8, no. 9, p. 1497, 2019.
- [31] C. Speed, D. Nichols, J. Wies, H. Humphreys, C. Richards, S. Burnet, and B. Hazleman, "Extracorporeal shock wave therapy for plantar fasciitis. a double blind randomised controlled trial," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 21, no. 5, pp. 937–940, 2003.

- [32] J. Ogden, "Extracorporeal shock wave therapy for plantar fasciitis: randomised controlled multicentre trial," 2004.
- [33] G. Haupt, "Use of extracorporeal shock waves in the treatment of pseudarthrosis, tendinopathy and other orthopedic diseases," *The Journal of urology*, vol. 158, no. 1, pp. 4–11, 1997.
- [34] E. Johnsen and T. Colonius, "Shock-induced collapse of a gas bubble in shockwave lithotripsy," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 124, no. 4, pp. 2011–2020, 2008.
- [35] G. O. Oosterhof, G. A. Smits, A. E. de Ruyter, J. A. Schalken, and F. M. Debruyne, "In vivo effects of high energy shock waves on urological tumors: an evaluation of treatment modalities," *The Journal of urology*, vol. 144, no. 3, pp. 785–789, 1990.
- [36] F. Gamarra, F. Spelsberg, M. Dellian, and A. E. Goetz, "Complete local tumor remission after therapy with extra-corporeally applied high-energy shock waves (hesw)," *International journal of cancer*, vol. 55, no. 1, pp. 153–156, 1993.
- [37] F. Gamarra, F. Spelsberg, G. E. Kuhnle, and A. E. Goetz, "High-energy shock waves induce blood flow reduction in tumors," *Cancer research*, vol. 53, no. 7, pp. 1590–1595, 1993.
- [38] R. Canaparo, L. Serpe, M. G. Catalano, O. Bosco, G. P. Zara, L. Berta, and R. Frairia, "High energy shock waves (hesw) for sonodynamic therapy: effects on ht-29 human colon cancer cells," *Anticancer research*, vol. 26, no. 5A, pp. 3337–3342, 2006.
- [39] R. G. Bai, K. Muthoosamy, F. N. Shipton, and S. Manickam, "Acoustic cavitation induced generation of stabilizer-free, extremely stable reduced graphene oxide nanodispersion for efficient delivery of paclitaxel in cancer cells," *Ultrasonics sonochemistry*, vol. 36, pp. 129–138, 2017.
- [40] Z. Izadifar, P. Babyn, and D. Chapman, "Mechanical and biological effects of ultrasound: A review of present knowledge," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 43, no. 6, pp. 1085–1104, 2017.
- [41] S. A. Quadri, M. Waqas, I. Khan, M. A. Khan, S. S. Suriya, M. Farooqui, and B. Fiani, "High-intensity focused ultrasound: past, present, and future in neurosurgery.," *Neurosurgical FOCUS*, vol. 44, no. 2, p. e16, 2018.
- [42] M. T. Burgess and T. M. Porter, "Control of acoustic cavitation for efficient sonoporation with phase-shift nanoemulsions," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 45, no. 3, pp. 846–858, 2019.
- [43] M. T. Burgess and T. M. Porter, "Acoustic cavitation-mediated delivery of small interfering ribonucleic acids with phase-shift nano-emulsions," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 41, no. 8, pp. 2191–2201, 2015.
- [44] V. Eliasson, "On focusing of shock waves," 2007.
- [45] M. Schafer, T. Kraynak, and V. Krakhman, "Development of a cost-effective shock wave hydrophone," in *1994 Proceedings of IEEE Ultrasonics Symposium*, vol. 3, pp. 1805–1808 vol.3, IEEE, 1994.
- [46] J. Tavakkoli, A. Birer, and D. Cathignol, "Development of a pvdv low-cost shock-wave hydrophone," *Shock Waves*, vol. 5, pp. 369–374, 1996.
- [47] A. P. Evan, J. A. Mcateer, B. A. Connors, Y. A. Pishchalnikov, R. K. Handa, P. M. Blomgren, L. R. Willis, J. C. Williams, J. E. Lingeman, and S. Gao, "Independent assessment of a wide-focus,

- low-pressure electromagnetic lithotripter: absence of renal bioeffects in the pig,," *BJU international*, vol. 101 3, 2008.
- [48] A. Loske, "Medical and biomedical applications of shock waves," 12 2017.
- [49] J. Staudenraus and W. F. W. Eisenmenger, "Fibre-optic probe hydrophone for ultrasonic and shock-wave measurements in water," 1993.
- [50] W. Kreider, M. R. Bailey, and J. A. Ketterling, "Beamwidth measurement of individual lithotripter shock waves,," *The Journal of the Acoustical Society of America*, 2009.
- [51] A. J. Coleman, J. E. Saunders, R. C. Preston, and D. R. Bacon, "Pressure waveforms generated by a dornier extra-corporeal shock-wave lithotripter,," *Ultrasound in medicine & biology*, 1987.
- [52] R. Cavalli, A. Bisazza, and D. Lembo, "Micro-and nanobubbles: a versatile non-viral platform for gene delivery,," *International journal of pharmaceutics*, vol. 456, no. 2, pp. 437–445, 2013.
- [53] U. Lucia, "Stationary open systems: A brief review on contemporary theories on irreversibility,," *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, vol. 392, no. 5, pp. 1051–1062, 2013.
- [54] D. P. Ruelle, "Extending the definition of entropy to nonequilibrium steady states,," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 6, p. 3054, 2003.
- [55] U. Lucia, "Maximum or minimum entropy generation for open systems?,," *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, vol. 391, no. 12, pp. 3392–3398, 2012.
- [56] U. Lucia, "Mathematical consequences of gyarmati's principle in rational thermodynamics,," *Il Nuovo Cimento B (1971-1996)*, vol. 110, no. 10, pp. 1227–1235, 1995.
- [57] U. Lucia, "Probability, ergodicity, irreversibility and dynamical systems,," *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 464, no. 2093, pp. 1089–1104, 2008.
- [58] I. Gyamati, "Non-equilibrium thermodynamics. field theory and variational principkes,," 1970.
- [59] U. Lucia and G. Gervino, "Hydrodynamic cavitation: from theory towards a new experimental approach,," *Central European Journal of Physics*, 2009.
- [60] R. Cavalli, M. Argenziano, E. Vigna, P. Giustetto, E. Torres, S. Aime, and E. Terreno, "Preparation and in vitro characterization of chitosan nanobubbles as theranostic agents,," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 129, pp. 39–46, 2015.
- [61] O. D. Kripfgans, J. B. Fowlkes, D. L. Miller, O. P. Eldevik, and P. L. Carson, "Acoustic droplet vaporization for therapeutic and diagnostic applications,," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 26, no. 7, pp. 1177–1189, 2000.
- [62] K. Wei, D. M. Skyba, C. Firschke, A. R. Jayaweera, J. R. Lindner, and S. Kaul, "Interactions between microbubbles and ultrasound: in vitro and in vivo observations,," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 29, no. 5, pp. 1081–1088, 1997.
- [63] V. Dubrovskii, "Fundamentals of nucleation theory,," in *Nucleation Theory and Growth of Nanostructures*, pp. 1–73, Springer, 2014.
- [64] T. B. Drew, G. R. Cokelet, J. W. Hoopes, and T. Vermeulen, *Advances in chemical engineering*. Academic Press, 1981.

- [65] A. A. Doinikov, P. S. Sheeran, A. Bouakaz, and P. A. Dayton, "Vaporization dynamics of volatile perfluorocarbon droplets: a theoretical model and in vitro validation," *Medical physics*, vol. 41, no. 10, p. 102901, 2014.
- [66] A. Trapani, A. Lopodota, M. Franco, N. Cioffi, E. Ieva, M. Garcia-Fuentes, and M. J. Alonso, "A comparative study of chitosan and chitosan/cyclodextrin nanoparticles as potential carriers for the oral delivery of small peptides," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 75, no. 1, pp. 26–32, 2010.