

POLITECNICO DI TORINO

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

**Produzione di nanoparticelle polimeriche
per il rilascio controllato di caffeina per via
transdermica**



Relatore
prof. Roberto Pisano

Candidato
Valeria Gigante

MARZO 2018

Indice

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Nanoparticelle polimeriche	1
1.2 Tecniche di preparazione di nanoparticelle polimeriche	3
1.2.1 Metodi di preparazione di nanoparticelle da dispersione di polimero preformato	3
1.2.2 Metodi di preparazione di nanoparticelle da polimerizzazione di monomeri..	5
1.3 Miniemulsione e polimerizzazione in miniemulsione	7
1.3.1 Miniemulsione inversa	9
1.4 Fotopolimerizzazione radicalica	10
1.5 Rilascio controllato di principi attivi da nanoparticelle polimeriche.....	12
1.5.1 Rilascio controllato da shell polimerico.....	12
1.5.2 Rilascio transdermico di principi attivi	13
1.5.3 Rilascio di nanoparticelle polimeriche nel flusso sanguigno	14
1.6 Proprietà della caffeina	14
1.7 Obiettivo della tesi	15
2. MATERIALI E METODI	17
2.1 Materiali.....	17
2.2 Metodi	19
2.2.1 Polimerizzazione in miniemulsione inversa.....	19
2.2.2 Caratterizzazione dimensionale.....	22
2.2.3 Caratterizzazione termica	23
2.2.4 Caratterizzazione spettroscopica	24
2.2.5 Prove di rilascio.....	25
3. RISULTATI	27
3.1 Studio preliminare della formulazione della miniemulsione inversa	27
3.1.1 Confronto con precedente configurazione	27
3.1.2 Scelta del tensioattivo.....	28
3.1.3 Scelta del metodo di emulsificazione.....	30

3.2 Sintesi del carrier	34
3.2.1 Studio del tempo di irraggiamento	34
3.2.2 Studio delle condizioni di emulsificazione	41
3.2.3 Studio della percentuale in volume della fase dispersa in olio	42
3.2.4 Studio della percentuale di monomero.....	44
3.2.5 Stabilità della sospensione di nanoparticelle nel tempo.....	45
3.3 Loading del principio attivo nel carrier	47
3.3.1 Determinazione della solubilità di caffeina in acqua e individuazione del suo loading nel carrier.....	47
3.3.2 Analisi dimensionale degli idrogel con caffeina.....	49
3.3.3 Studio della conversione del PEGDA e dell'incapsulamento della caffeina .	50
3.3.3.1 Caratterizzazione termica.....	50
3.3.4 Valutazione dell'efficienza di incapsulamento	54
3.3.5 Calcolo della perdita di caffeina a causa delle radiazioni UV	56
3.4 Rilascio controllato di caffeina	57
3.4.1 Prove preliminari.....	58
3.4.1.1 Prove di rilascio da idrogel dispersi in acqua.....	58
3.4.2 Rilascio cumulativo di caffeina da nanoparticelle	60
3.4.3 Rilascio da miniemulsione e confronto con rilascio da nanoparticelle.....	67
4. CONCLUSIONI.....	71
Abbreviazioni	73
Lista dei simboli	75
Bibliografia.....	77
Ringraziamenti	81

1. INTRODUZIONE

1.1 Nanoparticelle polimeriche

La nanotecnologia oggi è spesso usata per diverse applicazioni, ad esempio in: agricoltura, elettronica, fotonica, campo tessile, scienze forensi, biotecnologia, tecnologia ambientale, controllo dell'inquinamento, terapie mediche. Sono usate spesso nanoparticelle biodegradabili per migliorare la biodisponibilità, solubilità e tempo di ritenzione di alcune molecole bioattive e il valore terapeutico di alcuni farmaci [1,2]. Negli ultimi anni, sta aumentando l'interesse per l'uso di nanoparticelle per il rilascio di farmaci. Le nanoparticelle sono definite come particelle colloidali con un diametro che rientra in un range tra 1 e 1000 nm. Esse possono essere costituite da lipidi, polimeri o materiale inorganico, quindi vi sono diversi sistemi di rilascio, ognuno con le proprie applicazioni e proprietà fisico-chimiche [3]. Per quanto riguarda le nanoparticelle polimeriche il principio attivo può essere disciolto, intrappolato, incapsulato o attaccato alla loro matrice [2]. Le nanoparticelle polimeriche trasportano effettivamente il principio attivo, le proteine e il DNA, al centro delle cellule e agli organi. La loro dimensione nanometrica permette la permeazione attraverso la membrana cellulare e la stabilità nel flusso sanguigno.

In base al metodo di preparazione e alla struttura si può parlare di nanosfere o di nanocapsule. Le nanosfere sono particelle solide con struttura piena ed omogenea, in cui il principio attivo è uniformemente e fisicamente disperso [2], mentre le nanocapsule possono essere considerate come dei sistemi vescicolari in cui un principio attivo è confinato in una cavità, che costituisce il core liquido interno ricoperto da una membrana polimerica. La cavità può contenere la sostanza attiva in forma liquida, solida o come dispersione molecolare; inoltre, questo serbatoio può essere lipofilo o idrofilo in base al metodo di preparazione e alle materie prime utilizzate. Nelle nanocapsule la sostanza attiva può trovarsi sulla superficie o essere assorbita nella matrice polimerica [4]. È possibile vedere la differenza tra nanocapsule e nanosfere nella Figura 1.1, che segue.



Figura 1.1 Tipi di nanoparticelle: nanocapsule e nanosfere.

Per la preparazione di nanoparticelle polimeriche per il rilascio di farmaci, sono preferiti fortemente polimeri biodegradabili, che siano compatibili con il corpo umano in termini di adattabilità, non tossicità e non antigenicità. I polimeri naturali generalmente sono biodegradabili e offrono una buona biocompatibilità [5], i più utilizzati nel campo delle nanoparticelle sono: chitosano, gelatina, alginato di sodio ed albumina [2]. Per quanto concerne i polimeri sintetici, essi sono disponibili in una grande varietà di composizioni con proprietà aggiustabili facilmente [5]; quelli comunemente adottati sono: acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA), acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA), polianidride, poliortoesteri, policianoacrilati, policaprolattone, poli(n-vinil pirrolidone), poli(metil metacrilato), poli(vinil alcol), acido poliacrilico, poliacrilamide, poli(etilen glicole) [2].

La biocompatibilità è influenzata da alcune proprietà superficiali, come idrofilia, lubrificabilità, scorrevolezza ed energia superficiale; inoltre, queste influenzano le proprietà fisiche come permeabilità e degradabilità, oltre a determinare anche la capacità di assorbimento di acqua dei polimeri, che possono subire degradazione idrolitica e rigonfiamento. I polimeri biodegradabili possono subire processi di degradazione e di erosione, il primo è di tipo chimico, il secondo è un processo fisico di dissoluzione e diffusione. Il processo legato a fenomeni di erosione può riguardare la superficie o il bulk, quest'ultimo caso interessa molti dei polimeri biodegradabili usati per il rilascio di farmaci e si ha quando le molecole di solvente penetrano il polimero ad una velocità più alta dell'erosione superficiale, stabilendo una complessa cinetica di degradazione/erosione [5].

Nello specifico, in questo progetto di tesi ci si focalizzerà sulla sintesi di idrogel. Negli ultimi anni, gli idrogel hanno assunto particolare importanza nel campo farmaceutico e biomedico. Gli idrogel sono networks polimerici dotati di una configurazione tridimensionale, come si vede in maniera schematica in Figura 1.2. Essi non dissolvono in acqua a temperature e pH fisiologici, rigonfiano in un medium acquoso e hanno una buona capacità di assorbire acqua o fluidi biologici al loro interno. Questa affinità nell'assimilare acqua, senza dissolversi, è dovuta alla presenza di alcuni gruppi idrofili nei polimeri costituenti la loro struttura, come ad esempio: -OH, -COOH, -CONH₂ e SO₃H. Il rigonfiamento che mostrano gli idrogel è dovuto a delle reticolazioni presenti nella loro struttura, che sono a loro volta fornite da legami covalenti, legami idrogeno, forze di van der Waals o da legami di tipo fisico. Come le altre nanoparticelle, i polimeri con cui vengono preparati, possono essere naturali o sintetici, i primi hanno il vantaggio di essere biocompatibili, biodegradabili e hanno parti biologicamente riconoscibili che supportano attività cellulari, i secondi non possiedono queste proprietà bioattive, ma è possibile modificare la loro struttura al fine di migliorare la loro degradabilità e

funzionalità [6,7]. Gli idrogel possono essere classificati in base a varie caratteristiche: natura dei gruppi laterali, proprietà meccaniche e strutturali, metodi di preparazione e risposta agli stimoli ambientali. Nelle caratteristiche e applicabilità degli idrogel assume importanza anche il tipo di monomero utilizzato per la sintesi del network polimerico, tra questi il polietilenglicole diacrilato (PEGDA) [6], usato per questo lavoro di tesi.

Qualsiasi tecnica utilizzata per creare un polimero reticolato può essere impiegata per produrre idrogel. Sono generalmente utilizzati copolimerizzazioni o polimerizzazioni di radicali liberi, facendo reagire monomeri idrofili con reticolanti multifunzionali. Per formare gli idrogel, polimeri lineari solubili in acqua, di origine sia naturale che sintetica, sono reticolati in diversi modi: collegamento delle catene polimeriche tramite reazione chimica o radiazione ionizzante per generare radicali liberi a catena principale, che si possono ricombinare come giunzioni a legami incrociati oppure interazioni fisiche. Per produrre un idrogel inoltre, è possibile adottare varie tecniche di polimerizzazione, incluse polimerizzazione in massa, in soluzione e in sospensione [8].



Figura 1.2 Esempio di struttura di un idrogel (Immagine modificata da [7]).

1.2 Tecniche di preparazione di nanoparticelle polimeriche

Le nanoparticelle possono essere preparate dalla dispersione di un polimero preformato, o da polimerizzazione di monomeri. Il metodo di preparazione, che dipende dal tipo di polimero da utilizzare, è importante per ottenere le proprietà desiderate per un'opportuna applicazione, e la dimensione ottimale.

1.2.1 Metodi di preparazione di nanoparticelle da dispersione di polimero preformato

I metodi di preparazione di nanoparticelle da dispersione di polimero preformato sono:

- *Evaporazione del solvente*

Il polimero è disciolto in un solvente organico volatile come diclorometano, cloroformio o etil acetato. L'emulsione, ottenuta con alta velocità di omogenizzazione o con ultrasonificazione, è convertita in nanoparticelle dall'evaporazione di solvente, che avviene o con agitazione magnetica o sotto pressione ridotta o aumentando la temperatura.

Successivamente le nanoparticelle possono essere ultracentrifugate e lavate con acqua distillata per rimuovere eventuali additivi, come tensioattivi, e infine liofilizzate [2,9,10].

- *Nanoprecipitazione*

È la precipitazione di un polimero preformato da una soluzione organica e diffusione del solvente organico in un medium acquoso, con o in assenza di un tensioattivo. La deposizione all'interfaccia tra acqua e solvente organico causa una rapida diffusione del solvente e formazione di una sospensione colloidale. Un solvente comunemente utilizzato è l'acetone, poiché miscibile in acqua e facilmente rimovibile per evaporazione. È un metodo ampiamente usato sia per preparazione di nanocapsule che di nanosfere [2,9].

- *Emulsificazione*

È una modificazione del metodo di evaporazione del solvente, il quale è eliminato tramite evaporazione o filtrazione, in accordo con il suo punto di ebollizione. Un solvente organico solubile in acqua, come acetone e metanolo, è interfacciato con uno insolubile, come diclorometano e cloroformio. La spontanea diffusione del primo nel secondo crea una turbolenza interfacciale tra di essi e la formazione di particelle più piccole [2,9,10].

- *Salting out*

Consiste nella separazione di un solvente miscibile in acqua da una soluzione acquosa, tramite salting out. Il polimero e il farmaco sono disciolti in un solvente, come acetone, poi emulsionato in un gel acquoso contenente un colloidale stabilizzatore e l'agente di salting out, la cui scelta è fondamentale per l'efficienza di incapsulamento del farmaco. L'agente di salting out e il solvente sono poi eliminati tramite filtrazione cross-flow [2,9].

- *Dialisi*

Il polimero è disciolto in un solvente organico, posto in un tubo da dialisi con adeguato molecular weight cut-off. Grazie alla bassa solubilità, lo spostamento del solvente dentro la membrana è seguito da un'aggregazione e formazione di un'omogenea sospensione di nanoparticelle [2,9].

- *Tecnologia dei fluidi supercritici*

I fluidi supercritici sono oggi una valida alternativa per la produzione di nanoparticelle, poiché sono solventi con basso impatto ambientale, con la capacità di produrre nanoparticelle altamente pure senza tracce di solvente organico. Sono stati sviluppati due principi per la produzione di nanoparticelle usando fluidi supercritici: rapida espansione della soluzione supercritica (RESS) e rapida espansione della soluzione supercritica in solvente liquido (RESOLV) [2,9,10].

1.2.2 Metodi di preparazione di nanoparticelle da polimerizzazione di monomeri

I principali metodi di sintesi di nanoparticelle basati sull'impiego di monomeri sono:

- *Polimerizzazione interfacciale*

Polimerizzazione di due monomeri reattivi, disciolti uno in fase continua e uno in fase dispersa. La reazione avviene all'interfaccia dei due liquidi. Il solvente organico, completamente miscibile in acqua, serve come veicolo per il monomero [2,9].

- *Polimerizzazione radicalica controllata*

Questa tecnica nasce in risposta alle limitazioni della polimerizzazione radicalica, sul controllo della massa molare e sua distribuzione, sulle funzionalità finali e sull'architettura macromolecolare, causati dalle inevitabili e veloci reazioni di terminazione radicalica. Per la determinazione della dimensione delle nanoparticelle, molto importante è la natura del monomero, iniziatore, tipo di emulsione, ma soprattutto dell'agente controllante [2,9].

- *Polimerizzazione in emulsione*

- *Polimerizzazione in miniemulsione*

- *Polimerizzazione in microemulsione*

Dato che in questo progetto di tesi ci si focalizzerà sui metodi di sintesi in emulsione, si è deciso di trattare quest'ultimi metodi in maniera più dettagliata nella sezione che segue.

1.2.2.1 Polimerizzazione in emulsione, microemulsione e miniemulsione

Le emulsioni possono essere divise in tre categorie: macroemulsioni (o più semplicemente emulsioni, come saranno chiamate di seguito), microemulsioni e miniemulsioni. Ciascuno di questi è un sistema bifasico, composto da una fase continua e una dispersa; la sostanziale differenza tra di esse riguarda la loro stabilità e il meccanismo di nucleazione. È riportata una loro rappresentazione schematica, prima e dopo la polimerizzazione, in Figura 1.3.

Il metodo della polimerizzazione in emulsione è largamente usato, le emulsioni sono dispersioni di due liquidi immiscibili, sono sistemi termodinamicamente instabili che sono stabilizzati cineticamente. Di conseguenza la stabilità dipende dalla loro composizione e dalla dimensione delle gocce [11]. Le gocce di monomero hanno diametro di 1-10 μm , che stabilizzate da un tensioattivo, nello stato iniziale coesistono con micelle di tensioattivo vuote o riempite con il monomero. La polimerizzazione ha inizio dalle gocce di monomero e dalle micelle di tensioattivo in fase acquosa, un fotoiniziatore solubile in acqua forma oligoradicali a partire dalle unità monomeriche, gli oligoradicali entrano nelle micelle e iniziano a formare particelle, con dimensione di più di 100 nm.

Una microemulsione è un sistema termodinamicamente stabile con una tensione interfacciale olio-acqua prossima allo zero, in cui le gocce sono completamente ricoperte da tensioattivo, a causa della presenza di un grande quantitativo di questo stesso. I tipi di tensioattivo, iniziatore, monomero e la temperatura di reazione, sono fattori critici che influenzano la polimerizzazione in microemulsione, la sua cinetica e la dimensione delle nanoparticelle. La polimerizzazione in microemulsione inizia dal suo stato termodinamicamente stabile, poiché l'iniziazione non può avvenire simultaneamente in tutte le microgocce, le catene polimeriche sono formate solo in alcune. Si ha una dimensione delle particelle tra 5 e 50 nm, in coesistenza con micelle vuote [12].

La principale differenza tra emulsioni e microemulsioni è che, come già detto, le prime sono cineticamente stabili e termodinamicamente instabili, le seconde sono invece definite come sistemi stabili termodinamicamente con aspetto limpido o traslucido, in contrapposizione all'apparenza torbida delle emulsioni [13].

Emulsioni con dimensioni delle gocce nel range dei 20-500 nm sono chiamate miniemulsioni. A differenza delle microemulsioni sono metastabili e possono essere diluite con acqua, senza cambiamento della distribuzione dimensionale delle gocce [11]. Se le microemulsioni hanno una tensione interfacciale olio-acqua prossima allo zero, nelle miniemulsioni, al contrario, essa è molto maggiore di zero [12].

La differenza chiave tra emulsione e miniemulsione invece, è l'utilizzo di un componente a basso peso molecolare, i.e. co-stabilizzatore, e l'uso di un dispositivo ad alto taglio [9]. Nella polimerizzazione in emulsione, le nanoparticelle non corrispondono alla goccia dell'emulsione primaria e la dimensione è stabilita da processi cinetici in cui i parametri, come la temperatura o la quantità di iniziatore, giocano un ruolo predominante. Nella polimerizzazione in miniemulsione le nanoparticelle sono la copia polimerizzata delle goccioline originali, la dimensione è essenzialmente data dal processo di dispersione e dalla stabilità della goccia, ma non dai parametri di polimerizzazione.

In termini di stabilità e di dimensioni delle particelle risultanti, le miniemulsioni, sono una via di mezzo tra emulsioni e microemulsioni [12]. Di queste e della sua polimerizzazione, si parlerà in modo più approfondito di seguito, essendo il metodo di preparazione di nanoparticelle adottato in questo studio.

Prima della polimerizzazione Dopo polimerizzazione

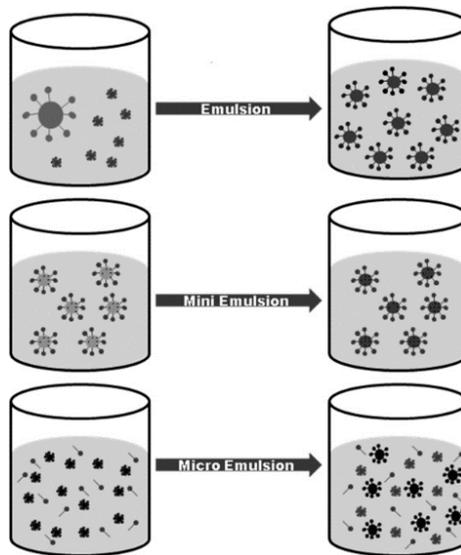


Figura 1.3 Schema di un'emulsione, miniemulsione e microemulsione, prima e dopo polimerizzazione (Immagine modificata da [9]).

1.3 Miniemulsione e polimerizzazione in miniemulsione

Il termine “miniemulsione” sta ad indicare un sistema in cui piccole gocce, con alta stabilità in una fase continua, sono create usando un dispositivo ad alto taglio [14]. Le miniemulsioni sono dette dirette (O/W) quando la fase dispersa è olio e la fase continua è acqua e sono le più comuni. Al contrario, vengono definite inverse (W/O), oggetto di questa tesi, se la fase dispersa è acquosa e quella continua è olio.

Il processo di emulsione prevede due step, uno di deformazione e distruzione delle gocce, che aumenta l'area specifica superficiale dell'emulsione, e successivamente la stabilizzazione di queste nuove interfacce formate, mediante tensioattivo [12].

Quando si crea una miniemulsione, lo step di omogeneizzazione assume particolare importanza al fine di avere piccole gocce monodisperse. Inizialmente la polidispersità è elevata, diminuisce fino a raggiungere uno stato stazionario, grazie ai costanti processi di fusione e fissione, dovuti all'alto taglio [14].

I dispositivi di emulsione possono essere: sistemi rotore-statore, sonicatori e omogeneizzatori ad alta pressione. I sistemi rotor-statori e altri dispositivi di taglio come ad esempio Ultra Turrax o Omni mixer, si basano sulla turbolenza; la dimensione minima

delle gocce dipenderà da quella del più piccolo vortice formato, che a sua volta è in relazione alla geometria del dispositivo e alla velocità di rotazione.

Il sonicatore produce onde di ultrasuoni che propagandosi fanno oscillare le molecole nella loro posizione media. Durante i cicli di compressione la distanza media tra le molecole diminuisce e aumenta durante la rarefazione, quest'ultima crea uno stato di pressione negativa, che porta alla cavitazione delle bolle, che nel successivo ciclo di compressione collassano causando shock meccanici intorno alle gocce di monomero. Solo una piccola regione è soggetta alle onde di ultrasuoni, per tale motivo, in aggiunta al sonicatore si agita il sistema, per permettere che tutto il fluido passi nella regione di sonicazione. La dimensione delle goccioline decresce all'aumentare del tempo di esposizione alle onde di ultrasuoni.

Gli omogenizzatori ad alta pressione più comuni sono il Microfluidizer e il Manton-Gaulin, che usano un dispositivo a pompa e un flusso attraverso uno stretto gap ad alta velocità [16].

Per la formazione di una miniemulsione stabile è richiesta la soppressione di due meccanismi: la coalescenza indotta da collisione e la maturazione di Ostwald. La prima può essere controllata con l'uso di un tensioattivo opportuno, la seconda con l'aggiunta di un agente idrofobico alla fase dispersa. Questo non blocca completamente la crescita delle gocce, ma ne rallenta il processo notevolmente. Il risultato deve essere quello di un equilibrio tra la pressione osmotica nelle gocce e la pressione di Laplace. Poiché la pressione di Laplace, dopo la miniemulsione è generalmente maggiore della pressione osmotica, la dimensione delle gocce tende a crescere dopo alcuni giorni o alcune settimane [14].

Le miniemulsioni trovano ampio impiego nel campo della polimerizzazione, soprattutto per via radicalica [16].

Le gocce hanno la funzione di nanoreattori, in cui avviene la reazione [15]. Per polimerizzazioni eterofasiche, sono discussi tre meccanismi di nucleazione particellare in letteratura: nucleazione micellare, omogenea e di goccioline. Per la nucleazione micellare, il radicale entra in una micella, che è rigonfiata con il monomero, e reagisce con esso per formare una catena polimerica. A causa della sua natura, è possibile che avvenga solo sopra la concentrazione micellare critica (CMC) del tensioattivo usato, e risulta in un'ampia distribuzione dimensionale delle particelle. Per le miniemulsioni questo tipo di nucleazione è improbabile. È invece più probabile la nucleazione omogenea; questo meccanismo dipende dalla concentrazione di iniziatore e dalla solubilità del monomero impiegato. Il meccanismo di nucleazione di goccioline è quello predominante in polimerizzazione da miniemulsione, le goccioline che si formano

durante lo step di emulsione sono direttamente polimerizzate per via di un radicale che entra in queste gocce di monomero e reagisce con il monomero presente [12].

1.3.1 Miniemulsione inversa

Nel caso di una miniemulsione inversa, sono impiegati monomeri idrofili. Analogamente alla miniemulsione diretta, in quella inversa, la pressione osmotica può essere soppressa da un agente lipofobo, insolubile in fase continua [12]. In Figura 1.4 è mostrato uno schema di confronto tra miniemulsione O/W e W/O.

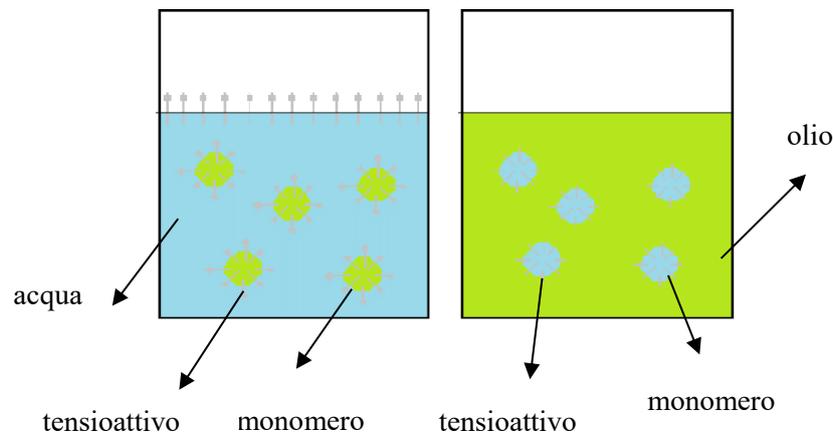


Figura 1.4 Confronto tra miniemulsione diretta e inversa.

La scelta di un opportuno tensioattivo risulta cruciale, al fine di incrementare la stabilità delle micelle, grazie a repulsioni di natura elettrostatica o/e sterica. Esiste una grandezza semi-empirica che permette di raggruppare i tensioattivi in classi, in base alle loro caratteristiche lipofile e idrofile, è il parametro HLB (hydrophilic-lipophilic balance), valutato in base alla struttura del tensioattivo. Il valore di HLB può assumere valori da 0 a 20, dove 0 descrive una molecola completamente lipofila, 20 una idrofila. Per disperdere composti polari in mezzi disperdenti non polari, sono richiesti bassi valori di HBL [17]. I tensioattivi usati in una polimerizzazione da miniemulsione W/O, sono per lo più non ionici idrofobi e copolimeri a blocchi parzialmente anfifilici [18].

La polimerizzazione da miniemulsione inversa di un monomero solubile in acqua, può essere iniziata da un iniziatore solubile in acqua o in olio. Nel primo caso la nucleazione omogenea è soppressa, nel secondo è aumentata. Quando si usa un iniziatore solubile in acqua, come in questo studio, l'iniziazione ha avvio direttamente da reazione di radicali dell'iniziatore con il monomero [18].

In Figura 1.5 è riportata una rappresentazione schematica di una polimerizzazione in minimemulsione W/O.

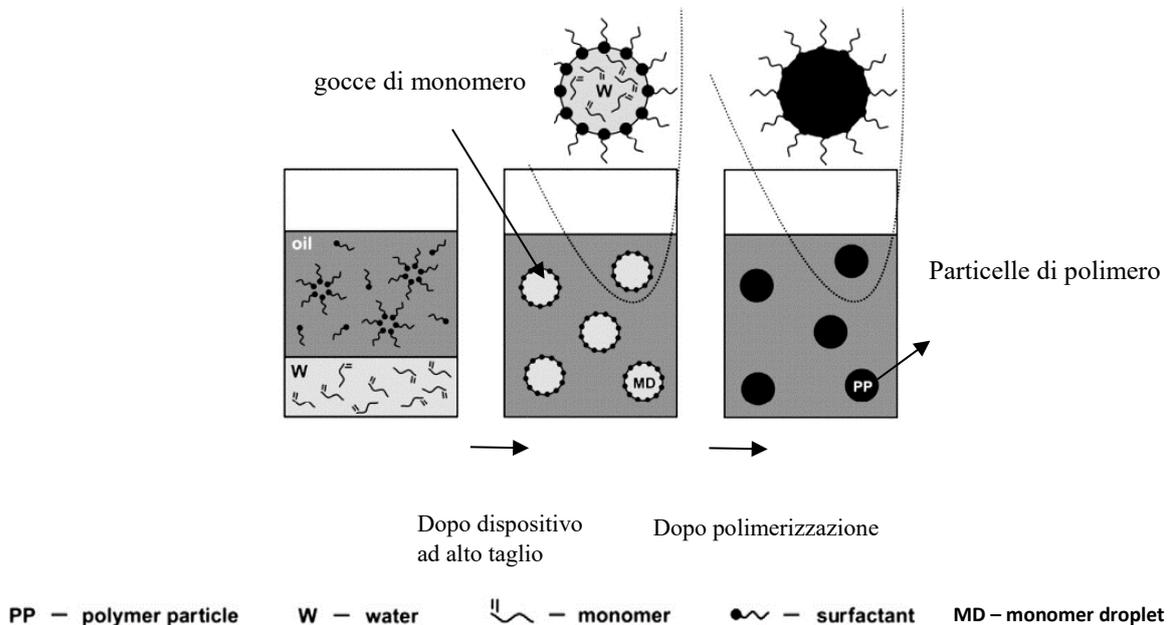


Figura 1.5 Polimerizzazione in miniemulsione inversa (Immagine modificata da [18]).

In questo lavoro di tesi la miniemulsione è polimerizzata con fotopolimerizzazione radicalica attraverso radiazioni UV, descritta di seguito.

1.4 Fotopolimerizzazione radicalica

Il processo di fotopolimerizzazione di monomeri multifunzionali, o curing da radiazioni ultraviolette, ha trovato largo impiego in differenti settori industriali. Consiste nella trasformazione di un monomero multifunzionale in un polimero reticolato, formato in seguito a reazioni a catena iniziate da specie reattive, che sono generate da radiazione UV. Poiché molti monomeri, quando esposti a radiazioni UV, non generano specie iniziatrici con una resa sufficientemente elevata, generalmente sono aggiunti alla formulazione dei fotoiniziatori. Una volta iniziata, la reazione a catena si svilupperà in maniera simile a quanto avviene in una polimerizzazione termica, eccetto per le velocità di iniziazione molto più grandi che possono essere raggiunte da illuminazione intensa, e

per le più basse temperature. Il processo complessivo può essere rappresentato schematicamente, come mostrato in Figura 1.6.

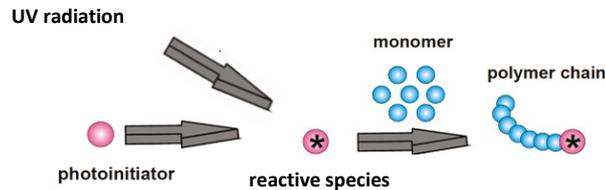


Figura 1.6 Schema del processo di fotopolimerizzazione (Immagine modificata da [19]).

Affinché il fotoiniziatore sia efficiente, deve presentare un elevato assorbimento nel campo di emissione della fonte luminosa e dar vita a specie iniziatrici che abbiano rese quantiche molto alte [20]. Il fotoiniziatore ha un ruolo chiave, assorbe effettivamente la luce e genera radicali liberi reattivi o ioni, dal decadimento dello stato elettronicamente eccitato. La velocità di iniziazione r_i è direttamente legata all'intensità della luce incidente I_0 , lo spessore del campione l , l'assorbanza ϵ , la concentrazione di fotoiniziatore $[I]$ e la resa quantica di iniziazione (ovvero numero di specie iniziatrice prodotta per fotone assorbito) Φ_i , come espresso dall'equazione (1.1):

$$r_i = \Phi_i I_0 [1 - \exp(-\epsilon l [I])] \quad (1.1)$$

In condizioni di alta velocità di avvio, ci si aspetterebbe che la polimerizzazione proceda dando luogo a corte catene, a causa di una terminazione bimolecolare avanzata, e che ciò porti a polimeri a basso peso molecolare. In realtà, per monomeri multifunzionali come di- o tri-acrilati, si formano networks polimerici altamente reticolati. Negli ultimi anni, grazie a questo comportamento inaspettato, la tecnologia della polimerizzazione con UV si sta sviluppando ampiamente e sta trovando un numero sempre crescente di usi finali [21].

Le fotopolimerizzazioni radicaliche sono iniziate dalla combinazione di radiazioni con opportune lunghezze d'onda della luce e da un buon fotoiniziatore. Generalmente, i fotoiniziatori radicalici sono distinti in due classi in base al loro meccanismo di generazione di radicali, fotoiniziatori di tipo I si dissociano in due radicali dopo l'assorbimento del fotone, mentre quelli di tipo II, in uno stato eccitato dopo assorbimento del fotone, estraggono un atomo di idrogeno da un co-iniziatore.

La fotopolimerizzazione è una tecnica efficace per la formazione *in situ* di idrogel, in quanto fornisce un buon controllo spaziale e temporale sulla formazione del materiale. Un grande vantaggio è la capacità di iniziare la polimerizzazione senza bisogno di alte temperature o condizioni di pH estremo [22].

Nel presente studio si vuole rilasciare un principio attivo dagli idrogel che si sono formati dalla fotoreticolazione, a tal proposito segue una trattazione sul rilascio controllato da nanoparticelle polimeriche.

1.5 Rilascio controllato di principi attivi da nanoparticelle polimeriche

Nanoparticelle biodegradabili sono frequentemente usate come veicolo per il rilascio di principi attivi, grazie alla loro biodisponibilità, buon incapsulamento, rilascio controllato e bassa tossicità.

1.5.1 Rilascio controllato da shell polimerico

Ci sono 5 possibili metodi per il rilascio di farmaco: desorbimento attraverso la matrice delle nanoparticelle; diffusione attraverso la parete polimerica delle nanocapsule; erosione della matrice delle nanoparticelle; processo combinato erosione-diffusione. La cinetica di rilascio può essere descritta da una funzione biesponenziale come la (1.2):

$$C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} \quad (1.2)$$

dove C è la concentrazione del farmaco rimanente nella nanoparticella al tempo t , A una costante per il controllo della diffusione e B per quello dell'erosione, α e β sono costanti di velocità ottenute con plots semilogaritmici. La velocità di rilascio dipende dalla solubilità, diffusione, biodegradazione della matrice polimerica, dall'efficienza di caricamento e dalla dimensione delle nanoparticelle [1].

Il profilo di rilascio, dipende dalla natura del sistema trasportatore. Nel caso di una matrice, il farmaco è distribuito e disciolto uniformemente, il rilascio avviene attraverso diffusione o erosione della matrice. Se la diffusione del farmaco è più veloce della degradazione della matrice, il meccanismo avviene principalmente per diffusione, altrimenti per degradazione. Il rilascio tramite matrice, ha una cinetica di primo ordine, mentre nel caso di nanocapsule, in cui il farmaco al centro è ricoperto con un polimero e il rilascio avviene per diffusione dal cuore attraverso la barriera polimerica, la cinetica è di ordine zero [10].

Nel caso di nanoparticelle di idrogel i meccanismi di rilascio di farmaco si possono distinguere in: diffusione controllata; rigonfiamento controllato; chimicamente controllato. Il meccanismo dominante risulta essere quello della diffusione controllata, in accordo con la prima legge di Fick. La diffusione fuori dalla matrice dell'idrogel dipende dal grado di reticolazione e dalla struttura chimica dei monomeri. Si ha rigonfiamento controllato, quando la diffusione è molto più veloce della distensione dell'idrogel [6]. Il rigonfiamento può essere controllato dall'aggiunta di gruppi funzionali idrofili o

monitorando la reticolazione della matrice [10]. Il rilascio chimicamente controllato è determinato dalle reazioni chimiche che si verificano nella matrice del gel.

Vi sono una classe di idrogel, sensibili agli stimoli, che hanno lo scopo di fornire il loro contenuto in risposta ad una condizione fluttuante. Il loro più grande inconveniente è il lento tempo di risposta, per avere maggiore reattività, si possono sviluppare idrogel più piccoli e sottili, che tuttavia determinano fragilità e perdita di forza meccanica nella rete polimerica. Questi idrogel reattivi possono quindi subire alterazioni drastiche nella loro struttura e nel loro comportamento.

Vengono sfruttati diversi stimoli ambientali nella somministrazione di farmaci, stimoli fisici, come la luce, il campo magnetico, corrente elettrica, oppure stimoli chimici come specie ioniche [6].

1.5.2 Rilascio transdermico di principi attivi

Il rilascio transdermico è un'alternativa interessante, che permette di superare le limitazioni dovute alla somministrazione orale e parenterale di farmaci [23].

La pelle è un organo che ha la funzione di proteggere il corpo dall'ambiente circostante, per tale motivo è un efficiente ostacolo alla permeazione di molecole esogene. Ciò è dovuto allo strato corneo, altamente idrofobo, che è composto da cellule differenziate non nucleate, corneociti, che sono pieni di cheratine e incorporati nel dominio lipidico. È stata suggerita un'ampia gamma di modelli animali come sostituti per la pelle umana, ed è stata valutata la permeazione percutanea delle molecole. La pelle dell'orecchio di maiale risulta essere particolarmente adatta per lo studio di permeazione, e mostra risultati comparabili a quelli della pelle umana [24].

Il principale meccanismo di permeazione transdermica è la diffusione [23]. La modalità transdermica offre diversi vantaggi, tra questi il fatto che la pelle presenta una superficie relativamente grande e accessibile. La barriera dello strato corneo è lipofila, con lamelle intercellulare lipidiche, che formano un condotto attraverso il quale i farmaci diffondono al fine di raggiungere l'infrastruttura vascolare sottostante e poi accedere alla circolazione sistemica. Per tale ragione, le molecole lipofile sono meglio accettate dallo strato corneo. Idealmente un farmaco deve possedere sia solubilità lipidale che acquosa, infatti se è troppo idrofilo non sarà in grado di attraversare lo strato corneo, se è troppo lipofilo tenderà a rimanere in esso [25]. Le molecole permeano lo strato corneo attraverso percorsi intercellulari, intracellulari e follicolari. La permeazione avviene per farmaci a basse dosi, avente un peso molecolare minore di 100 Da, adeguata solubilità, punto di fusione di circa 200°C, log P minore di 5 e adeguata lipoficità. Sono stati effettuati diversi studi per aumentare in maniera controllata e reversibile la permeabilità dello strato corneo. Questi coinvolgono metodi chimici e fisici, basati su due strategie: aumentare la permeabilità della pelle e/o fornire una forza motrice che agisce sul farmaco. Tra le

tecnologie: esaltatori chimici alla ionoforesi, elettroporazione, onde di pressione generate da effetti ad ultrasuoni, o combinazioni sinergiche di entrambi i meccanismi [23].

1.5.3 Rilascio di nanoparticelle polimeriche nel flusso sanguigno

Il rilascio temporale e spaziale di farmaci, con iniezione di nanoparticelle, consente di rivoluzionare il trattamento delle malattie. Un dispositivo di somministrazione di farmaci deve essere presente nel flusso sanguigno abbastanza a lungo, in modo da raggiungere o riconoscere il suo sito d'azione terapeutico. Tuttavia, esiste un sistema fagocito mononucleare (MPS) nel nostro organismo, noto anche come sistema reticoloendoteliale (RES), che ostacola ciò, tramite un processo di opsonizzazione o rimozione di vettori farmaceutici nanoparticellari. I macrofagi del MPS rimuovono le nanoparticelle non protette dal sangue in pochi secondi, rendendole, quindi, inefficaci come carrier sito-specifici di farmaci. Per tale motivo, sono state sviluppate tecniche di mimetizzazione o mascheramento, che consentono alle nanoparticelle di bypassare temporaneamente il riconoscimento da parte del MPS e aumentare il livello di emivita circolatoria [26].

1.6 Proprietà della caffeina

Il principio attivo che si vuole rilasciare in questo progetto di tesi è la caffeina, per le sue particolari proprietà.

La caffeina (1,3,7-trimetilxantina) è una metil xantina alcaloide che viene consumata come bevanda, somministrata come medicina o applicata per scopi cosmetici. La caffeina inibisce l'enzima fosfodiesterasi e ha un effetto antagonista sui recettori centrali di adenosina. È uno stimolante del sistema nervoso centrale e può produrre insonnia e attività mentale intensificata. Aumenta anche la velocità e la profondità della respirazione, ma è un broncodilatatore più debole della teofillina. La caffeina è stata studiata per i suoi effetti neuroprotettivi nella demenza e il suo potenziale nell'aiuto a riconoscere sintomi ipoglicemici in pazienti diabetici. È usata anche in campo cosmetico, per la sua capacità nel prevenire l'eccessivo accumulo di grasso nella pelle, promuove il drenaggio linfatico e protegge la pelle da fotodanneggiamento [27]. Per queste sue proprietà, l'agente è incluso nelle creme o gel anticellulite, dove è noto per favorire la liberazione dei trigliceridi e della carnitina, stimolando il trasferimento di acidi grassi liberi nei mitocondri, per produrre energia [28]. La formulazione cosmetica deve essere ottimizzata in modo tale che la caffeina raggiunga il sito attivo negli adipociti situati nell'ipoderma [29]. I prodotti a base di caffeina sono promossi per migliorare l'aspetto della pelle, anche se pochi studi clinici sono stati pubblicati in relazione alla loro efficacia [28].

1.7 Obiettivo della tesi

Lo scopo di questo lavoro di tesi è la produzione di nanoparticelle polimeriche di idrogel, per il rilascio transdermico di caffeina. A tal proposito, è stata impiegata la polimerizzazione in miniemulsione di acqua in olio, mediante radiazione ultravioletta.

Nel Capitolo 1 si esaminano i metodi di produzione delle nanoparticelle polimeriche, soffermandosi sulla tecnica oggetto di questo studio. Si discute poi, sul loro rilascio, soprattutto per via transdermica, e sul principio attivo utilizzato, ovvero la caffeina. Nel Capitolo 2 si espongono i materiali e gli strumenti impiegati, presentando in dettaglio i metodi sperimentali adottati. Nel Capitolo 3 si analizzano i risultati ottenuti dalle prove di produzione e caratterizzazione degli idrogel, e dalle prove di rilascio transdermico della caffeina. Nel Capitolo 4 si riportano le conclusioni a seguito dei risultati conseguiti, e suggerimenti per studi futuri.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Materiali

Nel presente studio il monomero soggetto a fotoreticolazione è il polietilenglicole diacrilato (PEGDA 700), mostrato in Figura 2.1. Il PEGDA 700, acquistato da Sigma-Aldrich (Milano, Italia), presenta un peso molecolare medio di 700, densità di 1.12 g/ml a 25 °C, temperatura di fusione di 12-17 °C, e un indice di rifrazione di 1.47.

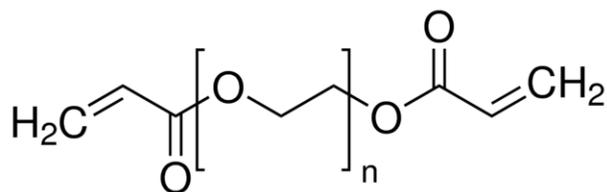


Figura 2.1 Rappresentazione del PEGDA.

Il fotoiniziatore impiegato è il DAROCUR 1173 (2-idrossi-2-metil-1-fenil-propan-1-one), acquistato da BASF (Cesano Maderno, Italia) e mostrato in Figura 2.2. Ha una temperatura di fusione di 4°C e una densità di 1.08 g/cm³.

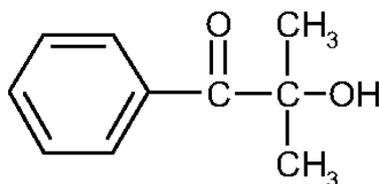


Figura 2.2 Rappresentazione del DAROCUR 1173.

Il principio attivo è la caffeina o 1,3,7-trimetilxantina, purezza al 99%, acquistata da Sigma-Aldrich (Milano, Italia), la cui molecola è rappresentata in Figura 2.3.

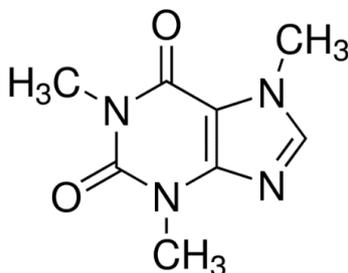
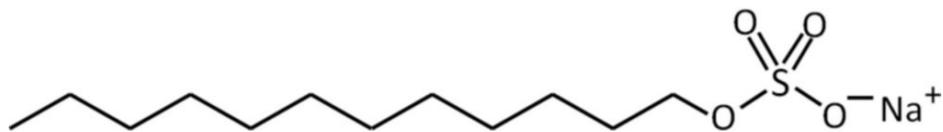


Figura 2.3 Rappresentazione della caffeina.

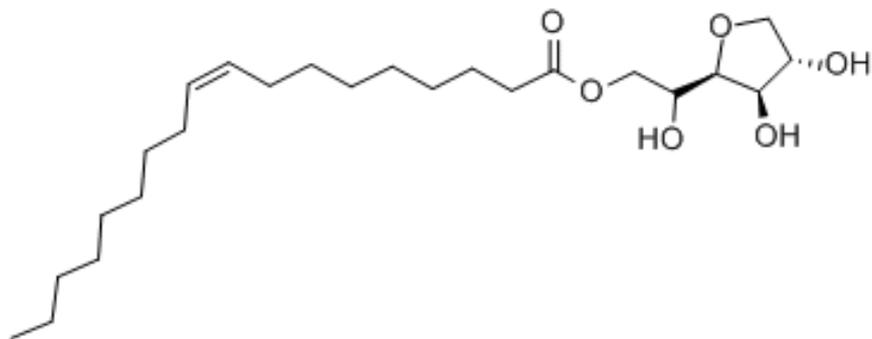
L'acqua impiegata è acqua per preparazioni iniettabili, priva di ioni e sterile, acquistata da Fresenius Kabi (Verona, Italia).

La fase organica usata, per l'elevata biocompatibilità e basso costo, è l'olio di semi di girasole, acquistato da Olitalia (Forlì, Italia).

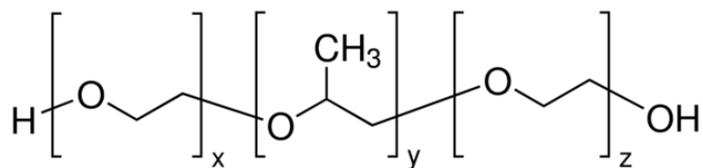
I tensioattivi investigati sono: sodio dodecilsolfato (SDS, mostrato in Figura 2.4 a)), con purezza del 98%, che è un surfattante anionico che a temperatura ambiente si presenta come una polvere cristallina bianca; Span 80 (sorbitano monoleato, mostrato in Figura 2.4 b)) che è un tensioattivo non ionico, entrambi acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia); Pluronic PE 6100 (Figura 2.4 c)), di tipo non ionico e acquistato da BASF (Cesano Maderno, Italia).



a)



b)



c)

Figura 2.4 Rappresentazione di SDS a), Span 80 b) e Pluronic c).

2.2 Metodi

In questa sezione è riportata in dettaglio la procedura sperimentale per la sintesi delle nanoparticelle di idrogel, e le relative tecniche dimensionali, termiche e spettroscopiche adottate. Sono descritti, inoltre, i metodi e gli strumenti per il rilascio controllato della caffeina.

2.2.1 Polimerizzazione in miniemulsione inversa

In questo lavoro di tesi si è posta l'attenzione sulla produzione di nanoparticelle polimeriche di idrogel, contenenti caffeina, per il rilascio transdermico controllato di questo principio attivo. Da dati di letteratura la sua solubilità in acqua risulta essere di 21.6 mg/ml a 25 °C [30]. Sperimentalmente è stato trovato un valore di solubilità di caffeina in acqua per preparazioni iniettabili di 26.9 mg/ml a temperatura ambiente. Il motivo per il quale è stata usata questo tipo di acqua è che è completamente pura e priva di ioni, i quali possono variare il valore di solubilità della caffeina [31]. Non risulta essere solubile in olio di semi di girasole, in quanto idrofila, per tale ragione il principio attivo sarà inserito in fase dispersa.

La procedura sperimentale per la produzione delle nanoparticelle, prevede la preparazione di due fasi distinte, una fase acquosa e una oleosa, la prima costituisce la fase dispersa, la seconda quella continua, in quanto si desidera avere una miniemulsione inversa.

La fase dispersa è preparata con 5 g di acqua per preparazioni iniettabili, il monomero PEGDA al 10% w/w rispetto all'acqua, il 2% w/w di fotoiniziatore DAROCUR 1173 rispetto al monomero, e il 2.5% w/w (25 mg/ml) di caffeina rispetto all'acqua. Si è scelto di usare questo quantitativo di caffeina, per stare al di sotto del limite di solubilità. Il beaker contenente la fase acquosa è sottoposto per circa 10 minuti a stirring magnetico ad una velocità blanda, per permettere la completa solubilizzazione dei reagenti. L'agitatore magnetico adottato è il modello MS-200, fornito dalla Madline Scientific (Chalgrove, UK).

La fase continua è costituita da 69 g di olio di semi di girasole, corrispondenti a 75 ml, essendo la sua densità pari a ~ 0.92 g/ml, e 0.3 g di tensioattivo Pluronic PE 6100. Anche nel caso della fase continua il beaker è posto per 10 minuti sull'agitatore magnetico a velocità blanda, per consentire la solubilizzazione del tensioattivo non ionico in olio.

Tutte le operazioni sono condotte a temperatura ambiente. La fase dispersa è inserita in quella continua, con un quantitativo di 1% v/v in olio, attraverso una pipetta.

Per ottenere la miniemulsione si usa un Ultra Turrax (IKA T25 digital, Germania) ad una velocità di 14000 rpm per 10 minuti. Per evitare l'eccessivo inglobamento di aria, durante il funzionamento del dispositivo si manda un flusso di azoto.

Dopo aver creato la miniemulsione inversa, si versa all'interno di un reattore a tre colli, e si fotopolimerizza per mezzo di radiazioni UV, emesse da una lampada al mercurio (LC8 Lightningcure, Hamamatsu, Photonics, Hamamatsu, Giappone) per 15 minuti. Ai fini di un'omogeneizzazione del sistema, il reattore è posizionato su un agitatore magnetico con una velocità blanda. L'atmosfera deve essere inerte, per rimuovere l'ossigeno che funge da inibitore durante il processo di fotoreticolazione. Il reattore è inoltre rivestito di carta di alluminio per evitare dispersione delle radiazioni.

Per determinare il quantitativo di caffeina da inserire nella formulazione, è stato effettuato un previo studio di solubilità di tale sostanza in acqua per preparazioni iniettabili che è descritto nel seguito.

2.2.1.1 Determinazione della solubilità di caffeina in acqua

Per la prova di solubilità si usano due beaker, contenenti ciascuno 50 g di acqua per preparazioni iniettabili, uno dei quali si pone su un agitatore magnetico a velocità blanda, in modo da poter pesare il quantitativo di acqua alla fine della prova e sapere quanto ne sia evaporata. Nell'altro beaker si aggiunge la caffeina e si lascia su un agitatore, alle stesse condizioni del primo beaker, fino alla solubilizzazione del principio attivo. Si aggiunge di volta in volta un piccolo quantitativo di caffeina e si agita la soluzione, fin quando non è stata raggiunta la saturazione.

Successivamente, con una siringa, su cui è posto un filtro da 0.22 μm , si prelevano dalla soluzione 3 volumi di 9 ml ciascuno, si pongono in 3 vaschette, e si lasciano essiccare a temperatura ambiente. Dopo una settimana si pesa il residuo solido, e si determinano, dunque, i mg/ml di caffeina presenti nella soluzione.

Si effettua un'ulteriore prova di solubilità della caffeina in presenza del PEGDA e del fotoiniziatore in acqua, al fine di valutare come questa possa variare con l'aggiunta del monomero. Si eseguono prove con quantitativi di PEGDA differenti, una al 10 % w/w e l'altra al 20 % w/w rispetto all'acqua, entrambe con il 2 % w/w di fotoiniziatore rispetto al monomero. Così come fatto precedentemente, si aggiunge di volta in volta un quantitativo di caffeina e si lascia solubilizzare, mediante l'uso di un agitatore meccanico, ripetendo l'operazione fino a saturazione della soluzione.

2.2.1.2 Determinazione dei parametri operativi

Si effettua uno studio preliminare per determinare la procedura di sintesi più opportuna per la creazione di nanoparticelle che siano ottimali dal punto di vista delle dimensioni e della stabilità nel tempo, nel fare ciò non è stato inserito il principio attivo.

Inizialmente il dispositivo ad alto taglio impiegato per formare la miniemulsione è il bagno di ultrasuoni (Sonorex, Bandelin, Germania), con preliminare agitazione per 10

minuti alla massima velocità. In tal caso il quantitativo di olio usato è di 23 g invece che 69 g, mantenendo i rapporti dei vari reagenti identici nei due casi. Il motivo di tale differenza nei quantitativi di olio impiegato, è legato a questioni pratiche di immersione dell'Ultra Turrax nel beaker. Di seguito sono riportate le diverse prove effettuate, valutando varie formulazioni, variando il tipo e la quantità di tensioattivo (Tabella 2.1); cambiando condizioni operative, come il tempo di ultrasuoni (Tabella 2.2). Ogni formulazione è identificata con una lettera, mentre le condizioni operative con un numero.

Tabella 2.1 Variazione del tensioattivo.

Formulazioni	Tensioattivo	Quantità Tensioattivo (g)	Quantità olio (g)
A	SDS	0.05	23
B	Span 80	0.05	23
C	Span 80	0.07	23
D	Pluronic PE 6100	0.07	23
E	Pluronic PE 6100	0.1	23
F	Pluronic PE 6100	0.13	23

Tabella 2.2 Variazione del tempo di sonicazione di E.

Prova n°	Tempo di sonicazione (min)	Tempo di irraggiamento (min)
1	5	15
2	10	15
3	15	15

A causa della presenza di gocce bianche nella miniemulsione, dopo il bagno di ultrasuoni, che si verifica nelle prove in maniera casuale, si sostituisce tale dispositivo con l'Ultra Turrax. Di seguito sono riportate le prove effettuate variando il tempo di irraggiamento, il tempo e la velocità dell'Ultra Turrax, la percentuale di fase dispersa in olio e la percentuale di PEGDA in acqua (Tabella 2.3).

Tabella 2.3 Studio delle condizioni operative utilizzando i rapporti della formulazione E.

Prova n°	PEGDA (% w/w)	Fase dispersa (% v/v)	Velocità Ultra Turrax (rpm)	Tempo Ultra Turrax (min)	Tempo UV (min)
4	10	1	14000	10	5
5	10	1	14000	10	10
6	10	1	14000	10	15
7	10	1	14000	10	20
8	10	1	14000	10	25
9	10	1	7000	10	15
10	10	1	14000	5	15
11	10	0.25	14000	10	15
12	10	0.5	14000	10	15
13	10	0.75	14000	10	15
14	20	1	14000	10	15

Determinata la configurazione più opportuna per la sintesi degli idrogel, si aggiunge il principio attivo alla formulazione, e dopo aver eseguito la sintesi delle nanoparticelle, si realizza uno studio di caratterizzazione delle stesse.

2.2.2 Caratterizzazione dimensionale

Per caratterizzare le nanoparticelle dal punto di vista dimensionale si usa il dynamic light scattering (DLS), dal quale, tramite analisi cumulativa, si valuta la dimensione media e il relativo indice di polidispersità.

Il DLS è una tecnica non invasiva per determinare la dimensione di particelle e molecole in sospensione, misurando la velocità di queste sottoposte al moto browniano. Nelle misure DLS il campione viene illuminato da un raggio laser, e le variazioni d'intensità della luce diffusa vengono misurate in funzione del tempo. Le variazioni d'intensità misurate dal detector sono generate dal movimento browniano delle particelle all'origine dello scattering. Il moto browniano è influenzato dalla temperatura e dalla viscosità, a parità di tali variabili, le particelle più piccole si muovono rapidamente, creando delle variazioni rapide dell'intensità di scattering, mentre le particelle più grandi si muovono più lentamente, creando delle variazioni d'intensità lente. Grazie ad un autocorrelatore, viene misurata la velocità delle variazioni d'intensità e calcolato il coefficiente di diffusione delle particelle dalla funzione di correlazione. L'equazione di

Stokes-Einstein consente poi di convertire il coefficiente di diffusione in diametro idrodinamico.

Il diametro idrodinamico non dipende solo dal centro della particella, ma anche dalla struttura superficiale e dalla concentrazione di ioni nel medium. Per una particella non sferica, il DLS dà il diametro di una sfera con lo stesso coefficiente di diffusione medio.

L'indice di polidispersità (PDI) fornisce indicazioni sull'ampiezza della distribuzione dimensionale, è compreso tra 0 e 1, un valore basso indica una distribuzione di popolazione stretta, mentre un PDI con valori maggiori di 0.7 indica una distribuzione dimensionale ampia, spesso dovuta alla presenza di più popolazioni [32].

In questo studio il DLS impiegato è un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK) e il software Zetasizer per l'elaborazione dei dati. In tutti gli esperimenti la temperatura è impostata a 25 °C. Si preleva 1 ml di campione, senza alcuna diluizione, attraverso una pipetta, e si inserisce all'interno di una cuvette di polistirene, usata per l'analisi. Per effettuare l'analisi cumulativa è richiesto l'indice di rifrazione e la viscosità della fase disperdente, l'indice di rifrazione e l'assorbanza della fase dispersa, si riportano in Tabella 2.4 quelli adottati.

Tabella 2.4 Parametri operativi utilizzati per la misura DLS.

FASE CONTINUA	
Indice di rifrazione (-)	1.474
Viscosità (cP)	60.000
FASE DISPERSA	
Indice di rifrazione (-)	1.464
Assorbanza (-)	0.000

2.2.3 Caratterizzazione termica

Per lo studio di alcune proprietà delle nanoparticelle di idrogel e per identificare che sia effettivamente avvenuta la polimerizzazione, è stata condotta una caratterizzazione termodinamica attraverso la tecnica differential scanning calorimetry (DSC).

La DSC è una misura della variazione della differenza del flusso di calore di un campione e uno di riferimento, mentre sono sottoposti ad un programma di temperatura controllata [33]. La sua principale applicazione è nello studio delle transizioni di fase, come fusione, transizioni vetrose o degradazioni esotermiche. Queste transizioni, rappresentate tramite dei picchi, implicano cambiamenti di energia o cambiamenti di capacità termica che possono essere rilevati dalla DSC con grande sensibilità.

Nel presente lavoro di tesi è utilizzata una DSC Q200 (TA Instrument, New Castle, DE, USA). Per ottenere il campione da sottoporre a tale tecnica, si inseriscono due volumi da 10 ml di miniemulsione polimerizzata all'interno di due Falcon e si sottopongono a centrifugazione per 15 minuti ad una velocità di 13000 rpm. Dopo questa operazione si vede la separazione di due fasi, una liquida di olio e una solida di nanoparticelle sul fondo. Dopo aver eliminato l'olio, si preleva un quantitativo di solido e si deposita dentro una vaschetta di plastica, si lascia essiccare per qualche giorno a temperatura ambiente.

Dopo essiccamento, un quantitativo di residuo solido tra i 2 e i 20 mg è posto in un TZERO pan di alluminio, che è inserito a sua volta nella camera della DSC. All'interno della camera è posto un secondo pan vuoto, usato come riferimento. Tutte le analisi sono condotte sotto un flusso di azoto di 50 ml/min, al fine di mantenere all'interno della fornace un ambiente inerte.

Il programma di riscaldamento adottato prevede:

- equilibratura a 20 °C
- isoterma per 1 min
- equilibratura a -80 °C
- isoterma per 1 min
- rampa di riscaldamento 5°C/min a 300 °C (150 °C per campioni senza caffeina)
- equilibratura a 20 °C.

Le isoterme prima della rampa di calore, hanno la funzione di stabilizzare la temperatura del campione.

In questa trattazione sono riportate le curve sperimentali del flusso di calore, normalizzato rispetto alla massa (W/g), in funzione della temperatura (°C). I picchi verso il basso rappresentano i processi endotermici come fusione ed evaporazione, mentre quelli verso l'alto i processi esotermici, come cristallizzazione.

2.2.4 Caratterizzazione spettroscopica

Al fine di identificare la presenza di caffeina in olio e la completa reticolazione del monomero, è stata usata la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR).

La FT-IR è una tecnica spettroscopica che serve ad identificare la natura dei materiali, attraverso lo studio dei legami chimici, grazie all'assorbimento delle radiazioni infrarosse da parte del materiale. Quando un fotone infrarosso viene assorbito da una molecola, questa passa dal suo stato vibrazionale fondamentale ad uno stato vibrazionale eccitato. La FT-IR viene realizzata utilizzando un interferometro, che permette la scansione di tutte le frequenze presenti nella radiazione infrarossa generata dalla sorgente. La scansione avviene per mezzo di uno specchio mobile che spostandosi introduce una differenza del cammino ottico, che origina un'interferenza costruttiva o distruttiva con il

raggio riflesso da uno specchio fisso. Applicando la trasformata di Fourier si ottiene lo spettro infrarosso. Si riportano le assorbanze ad una definita lunghezza d'onda.

In questo studio si adotta un Nicolet iS50 FT-IR (Thermo Scientific, Stati Uniti). Al fine di accertarsi che la conversione del PEGDA sia avvenuta, si sottopone ad analisi il PEGDA puro e il residuo solido secco, comparando i loro spettri caratteristici.

Per assicurarsi di avere un rilascio controllato di tutta la caffeina grazie al nanocarrier, quindi che parte della caffeina non passi dalle nanoparticelle alla fase oleosa, si analizza l'olio di semi di girasole e la caffeina, per visualizzare il loro spettro tipico e metterlo a confronto con quello del residuo oleoso privo di nanoparticelle, che si ottiene dopo centrifugazione del campione.

2.2.5 Prove di rilascio

Poiché una delle molteplici proprietà della caffeina è proteggere la pelle da fotoirraggiamento, e la tecnica adottata per la preparazione delle nanoparticelle contenenti tale principio attivo, prevede l'uso di radiazioni UV, si eseguono delle prove per quantificarne la degradazione. Si preparano due soluzioni di acqua per preparazioni iniettabili e caffeina, con una concentrazione di 25 mg/ml, esattamente pari a quella che si ha nella miniemulsione. Una delle due soluzioni è sottoposta a radiazioni UV per 15 minuti, alle stesse condizioni a cui è sottoposta nella preparazione degli idrogel. Si fanno delle misure allo spettrofotometro UV/Visibile (Jenway 6850, Bibby Scientific, Stone, UK) per valutare l'assorbanza.

Nell'analisi UV/Visibile, si utilizzano due cuvette di polistirene, si effettua il bianco con acqua per preparazioni iniettabili, successivamente si inserisce in una cuvette di polistirene un quantitativo di soluzione di 3 ml diluita 1:3000 e si esegue la misura in un range tra 200 e 700 nm, poiché da studi precedenti [34] si è visto che il picco della caffeina ricade in tale range. A 273 nm per entrambe le soluzioni, quella irraggiata e non irraggiata, si ha un picco di assorbanza. Dai valori di assorbanza, per la legge di Lambert-Beer, è possibile ricavare le concentrazioni, conoscendo il valore di ϵ pari a 53.1 da studi precedenti [34].

2.2.5.1 Dispersione degli idrogel in mezzo acquoso

Si è deciso di effettuare due diversi tipi di rilascio, uno da olio e uno da acqua. Per il rilascio di caffeina da acqua è richiesta una dispersione delle nanoparticelle in essa. A tale scopo è stata eseguita la procedura che segue.

Dopo aver preparato la miniemulsione polimerizzata, si esegue un ciclo di centrifuga ad una velocità di 13000 rpm per 15 minuti, come descritto precedentemente per la caratterizzazione termica, al fine di separare le nanoparticelle dalla fase oleosa. Si rimuove tutto l'olio all'interno della Falcon e si aggiunge uno stesso volume di acqua per

preparazioni iniettabili. Si effettua un altro step di centrifugazione, alla stessa velocità di quanto fatto precedentemente, ma per un tempo di soli 3 minuti, con l'obiettivo di separare eventuale olio residuo. Si disperdono nuovamente le nanoparticelle in fase acquosa, semplicemente riportandole in soluzione, dal fondo, attraverso una piccola spatola e si agita la Falcon. Al fine di rompere gli aggregati che si sono formati, si versa il contenuto in un beaker e si pone su un agitatore magnetico per 10 minuti alla massima velocità. Si effettua ancora un bagno di ultrasuoni per 10 minuti.

Per le prove di rilascio controllato di caffeina è usato il metodo di dialisi.

2.2.5.2 Studio del rilascio da dialisi

La procedura applicata per il rilascio controllato di caffeina attraverso la dialisi, prevede l'utilizzo di una membrana in cellulosa per dialisi con molecular weight cut-off di 14000 Da e larghezza media di 43 mm, acquistata da Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Si pone un pezzo di tale membrana, di opportuna misura, in una soluzione di buffer fosfato salino (PBS) per circa 10 minuti, all'interno del sacchetto da dialisi si inserisce una sferetta in vetro per dare peso e si chiude da un'estremità con una pinza. Si versa al suo interno l'intero volume della produzione della miniemulsione polimerizzata, in modo da conoscere l'effettiva massa iniziale di caffeina, e si chiude l'estremità superiore con un'altra pinza. Il sacchetto da dialisi è quindi immerso all'interno di un beaker contenente 1500 ml di PBS, si pone su un agitatore alla minima velocità e si copre con un coperchio per limitare il fenomeno dell'evaporazione.

A tempi stabiliti, si effettuano dei prelievi di 5 ml attraverso una pipetta e viene rimpiazzato lo stesso volume con del PBS. I prelievi di soluzione sono posti all'analisi di uno spettrofotometro UV/Visibile, come descritto già in precedenza, senza effettuare alcuna diluizione e facendo il bianco con il PBS. Si fa variare lo spettro tra 200 e 350 nm, si legge il valore di assorbanza a 273 nm.

I prelievi sono stati eseguiti ogni 15 minuti per 2 ore, ogni ora per 48 ore e a tempi meno frequenti fino alle 202 ore.

3. RISULTATI

In questo capitolo sono riportati i risultati ottenuti nelle prove sperimentali e, dunque, le motivazioni che hanno condotto a scegliere la formulazione e le condizioni operative più opportune per il processo di sintesi delle nanoparticelle di idrogel e per il rilascio controllato di caffeina. Dopo un attento studio sul tipo e il quantitativo di reagenti da utilizzare, si rivolge l'attenzione sulla procedura da seguire e sui parametri da scegliere per la miniemulsione W/O e la sua polimerizzazione. Allo studio sul carrier segue quello di loading del principio attivo, per le successive prove di rilascio, in cui si effettua un'approssimazione dei dati sperimentali con alcuni modelli matematici.

3.1 Studio preliminare della formulazione della miniemulsione inversa

Per la determinazione della formulazione, quindi per identificare le sostanze e le rispettive quantità che costituiscono la fase dispersa e quella continua della miniemulsione W/O, si prende in esame una configurazione utilizzata in uno studio precedente [35], sulla quale sono apportate diverse modifiche, al fine di migliorarne la robustezza e la riproducibilità.

3.1.1 Confronto con precedente configurazione

Nello studio effettuato da Cikalleshi [35], la fase dispersa della miniemulsione inversa era costituita da acqua, PEGDA e caffeina; la fase continua era formata, invece, da esadecano, fotoiniziatore IRGACURE 819 e SDS come tensioattivo [35].

In questa trattazione si sostituisce l'esadecano con l'olio di semi di girasole, in quanto non pericoloso per la salute umana, biocompatibile e con un costo decisamente inferiore. Si preferisce aggiungere il fotoiniziatore in fase dispersa, dove è contenuto il monomero, in modo da facilitare la fotoreticolazione, in quanto si trova già nel luogo di reazione. Poiché l'IRGACURE 819 è solubile in olio, è soppiantato dal Darocur 1173 solubile in acqua. Ciò consente un risparmio anche nei quantitativi impiegati, in quanto si passa da una massa elevata e superiore rispetto al monomero, ad una del solo 2% in peso rispetto al PEGDA.

Il monomero è utilizzato con il 10% in peso rispetto all'acqua grazie all'elevata solubilità in essa, e per poter creare degli idrogel. Il rapporto in volume di fase dispersa in olio è di 1:100.

L'acqua impiegata è acqua per preparazioni iniettabili, e non acqua deionizzata come nel precedente lavoro sperimentale, in quanto si vuole determinare una corretta

solubilità di caffeina in acqua, senza la presenza di eventuali sostanze che possano variare il suo valore [31].

Come nella formulazione di Cikalleshi [35], si prova ad inserire l'SDS nella fase continua, nel medesimo rapporto in peso, tuttavia, tale tensioattivo risulta insolubile in olio di semi di girasole, al contrario dell'esadecano. Poiché ha, invece, un'elevata solubilità in acqua, si effettua il tentativo di inserirlo in fase dispersa (formulazione A) con una massa 10 volte maggiore rispetto alla prova precedente. Tuttavia, si hanno problemi di foaming, poiché il sodio dodecilsolfato è un detergente schiumogeno e, il volume di acqua a disposizione è molto piccolo e sono in essa presenti anche il monomero e il fotoiniziatore. Dopo aver aspettato un tempo sufficiente per la scomparsa della schiuma dalla superficie della fase dispersa, si inietta quest'ultima nell'olio per creare la miniemulsione, la quale in seguito alla polimerizzazione, non risulta uniforme, a causa della presenza di gocce. Si effettua comunque un'analisi DLS e si osserva una dimensione media di 505.1 nm e un PDI pari a 1. L'elevato indice di polidispersità è causato dall'instabilità della miniemulsione e dal fenomeno di coalescenza; ciò induce a concludere che questo tensioattivo non è indicato per il sistema in esame. A tal proposito, si esegue uno studio per la ricerca del surfattante più idoneo.

3.1.2 Scelta del tensioattivo

Al fine di creare una miniemulsione stabile, le gocce di monomero devono essere stabilizzate rispetto alla maturazione di Ostwald e alla coalescenza per collisione, questo ultimo fenomeno può essere limitato mediante l'aggiunta di un tensioattivo opportuno, che fornisce stabilizzazione elettrostatica e/o sterica [36]. La presenza del tensioattivo all'interfaccia, aumenta le interazioni tra le molecole di acqua e di olio, riducendo la tensione interfacciale. È importante utilizzare concentrazioni sufficientemente elevate da garantire un'adeguata stabilizzazione delle goccioline in breve tempo. Se le gocce sono ricoperte da uno strato di tensioattivo insufficiente, quando vengono a contatto tendono a coalescere. Tuttavia, le concentrazioni nella fase continua devono essere inferiori alla CMC per evitare la nucleazione micellare [37]. Le quantità impiegate devono essere, dunque, tali da stabilizzare le gocce e lasciare poco tensioattivo libero per la formazione di micelle [15].

Uno dei metodi spesso impiegato nella scelta del surfattante, è il bilancio tra i gruppi idrofili-lipofili (HLB) sviluppato da Griffin, che assegna un numero tra 0 e 20 al tensioattivo. Per una miniemulsione W/O i gruppi idrofili risiedono in acqua, quelli lipofili in olio, i valori di HLB richiesti sono in un range tra 3 e 6.

Quando la fase continua è oleosa, come in questo caso, sono preferiti tensioattivi non ionici e con bassi valori di HLB, per poter disperdere composti polari in mezzi disperdenti non polari. I tensioattivi non ionici abbassano maggiormente la tensione

interfacciale γ , e questo causa una riduzione della dimensione delle gocce. Hanno una carica neutra, dunque, promuovono solo la stabilità sterica e non quella elettrostatica. Sono ampiamente impiegati come emulsionanti, in quanto insensibili alle variazioni di pH e alla presenza di elettroliti.

In Tabella 3.1 sono riportate le formulazioni investigate per la ricerca del migliore tensioattivo non ionico da adottare, le prove sono condotte con un tempo di sonicazione di 10 minuti ed un tempo di esposizione ai raggi UV di 15 minuti.

Tabella 3.1 *Composizione delle formulazioni utilizzate per la selezione del tensioattivo.*

Formulazione	Tensioattivo	Quantità Tensioattivo (g)	Quantità olio (g)	Quantità PEGDA (mg)	Quantità Darocur (mg)
B	Span 80	0.05	23	23	0.46
C	Span 80	0.07	23	23	0.46
D	Pluronic	0.07	23	23	0.46
E	Pluronic	0.1	23	23	0.46
F	Pluronic	0.13	23	23	0.46

Lo Span 80, ha un HLB di 4.3, tuttavia, non risulta essere il tensioattivo ottimale. Infatti, la produzione B, pur consentendo di ottenere una miniemulsione polimerizzata uniforme, con dimensione media delle particelle di 170 nm e PDI di 0.69, risulta dopo qualche ora non essere stabile, in quanto è visibile la coalescenza di gocce. Si pensa, quindi, di aumentare la massa di tensioattivo, poiché il valore precedente potrebbe essere piccolo e quindi non sufficiente per la stabilità colloidale del sistema. Tuttavia, la produzione C, in cui il quantitativo dello Span 80 adottato è maggiore, risulta non essere solubile nell'olio di semi di girasole.

Il Pluronic PE 6100, anche esso tensioattivo di tipo non ionico, risulta il più opportuno per tale sistema, consente una buona stabilità della miniemulsione, non essendo visibili fenomeni di coalescenza. Il Pluronic è un copolimero a blocchi composto da polietilenglicole (PEG) e polipropilenglicole (PPG), per la sua elevata biocompatibilità è molto usato nel campo dell'industria farmaceutica e cosmetica.

Sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi DLS della formulazione D ed E in Tabella 3.2. Le deviazioni standard sono calcolate sui tre valori di Z-Average e di PDI forniti dallo strumento ad ogni misura, ciò è vero anche per le prove che saranno riportate in seguito.

Nella produzione F la massa di tensioattivo fornisce una miniemulsione non uniforme, probabilmente è stata raggiunta la concentrazione micellare critica, per tale motivo si esclude di adottare tale quantitativo.

Tabella 3.2 Variazione della dimensione media e del PDI in funzione della massa di Pluronic.

Prova n°	Quantità Pluronic (g)	Quantità olio (g)	Dimensione media (nm)	Dev Std (nm)	PDI (-)	Dev Std (-)
D	0.07	23	245.2	30.5	0.19	0.25
E	0.1	23	176.6	13.4	0.29	0.01

Si decide di utilizzare la massa di Pluronic adottata nella produzione E, in quanto fornisce una dimensione media più piccola rispetto alla D. Quanto avviene è in accordo con la legge di Gibbs (3.1):

$$-d\gamma = RT\Gamma d\ln(c) \quad (3.1)$$

dove γ è la tensione interfacciale, R è la costante universale dei gas, T la temperatura assoluta, c l'attività (concentrazione) e Γ l'eccesso di superficie (moli assorbite per unità di area di interfaccia). Un aumento dell'attività e quindi di concentrazione, porta una riduzione di γ , che a sua volta porta una riduzione della dimensione delle gocce.

Scelta la formulazione ottimale per la fase disperdente, corrispondente a 100 mg di Pluronic PE6100 in 23 g di olio di semi di girasole, si rivolge l'attenzione sul metodo di emulsificazione che meglio favorisce la formazione di una miniemulsione uniforme.

3.1.3 Scelta del metodo di emulsificazione

Le apparecchiature disponibili per il processo di emulsificazione possono essere di varia natura, e possono basarsi su diversi principi, sulla cavitazione, come nel caso dei sonicatori, o sulla creazione di uno stato di turbolenza, come avviene per i dispositivi ad alto taglio, o ancora possono essere adoperati omogeneizzatori ad alta pressione.

Nella presente sperimentazione si impiega inizialmente il bagno ad ultrasuoni, sostituito successivamente dall'Ultra Turrax, a causa di alcune problematiche riscontrate, di cui si parlerà in § 3.1.3.1.

3.1.3.1 Emulsificazione con bagno ad ultrasuoni

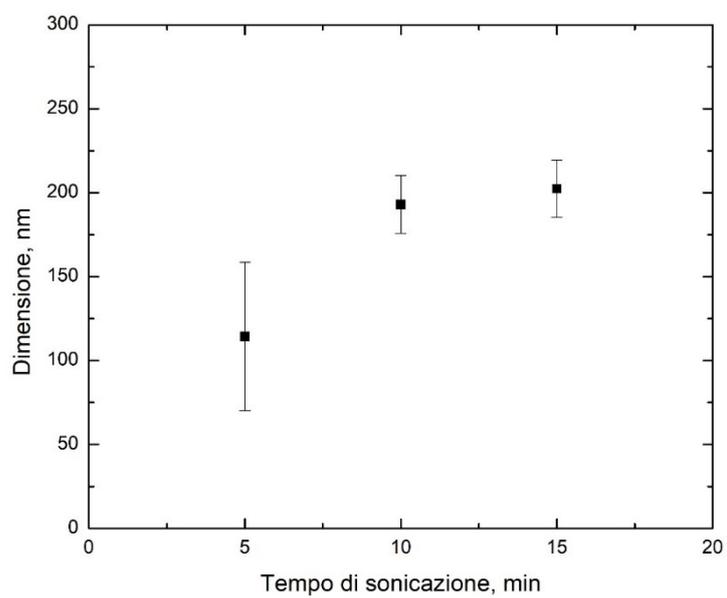
La sonicazione ha il compito di aumentare l'area interfacciale e ridurre la dimensione delle gocce, tale processo si basa sul fenomeno di cavitazione, che in un bagno ad ultrasuoni si verifica in modo non del tutto uniforme. Durante l'esposizione della miniemulsione alle onde di ultrasuoni, le gocce diventano più piccole fino al

raggiungimento di una dimensione di equilibrio. All'inizio la polidispersione è elevata, ma mediante processi di fissione e fusione costanti, tende a diminuire [36].

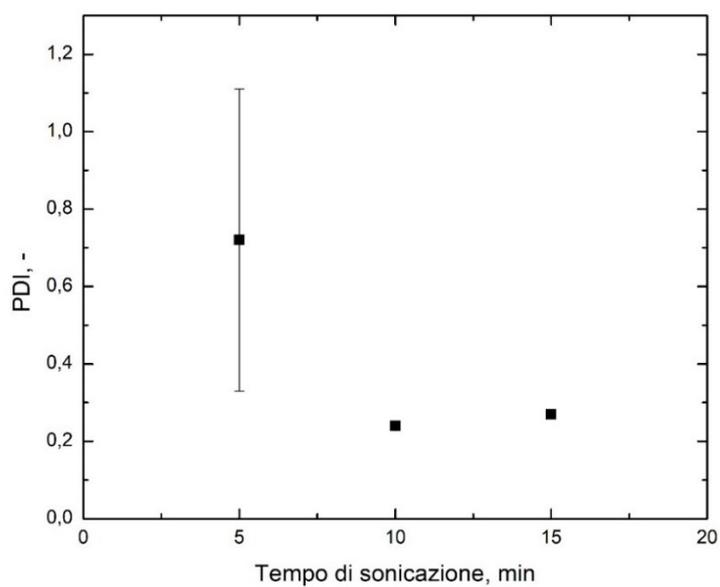
Spesso è consigliabile preparare un'emulsione grossolana, prima di adottare gli ultrasuoni, in quanto la rottura di un'interfaccia planare richiede un'energia maggiore [39]. A tale scopo si esegue un'agitazione preliminare di 10 minuti, con flusso di azoto, per impedire di inglobare troppo ossigeno che potrebbe inibire la successiva fotoreticolazione.

Il tempo di sonicazione inizialmente scelto è di 10 minuti; tuttavia, si è osservato che queste condizioni favoriscono la comparsa di gocce bianche e quindi si è scelto di effettuare delle prove variando il tempo di sonicazione, 5 e 15 minuti.

Si polimerizza la miniemulsione, esponendola alle radiazioni UV per 15 minuti e si effettua una misura DLS. In Figura 3.1 sono mostrati la dimensione media e il PDI medio per i differenti minuti di esposizione a US; le barre di errore sono calcolate con le deviazioni standard calcolate sui tre valori di Z-Average e di PDI forniti dallo strumento ad ogni misura, ciò è vero anche per le figure che saranno riportare successivamente.



a)



b)

Figura 3.1 Andamento della dimensione a) e PDI b) delle particelle al variare del tempo di sonicazione con irraggiamento di 15 minuti per la formulazione E.

Si evince che un tempo di sonicazione di 5 min è insufficiente per la creazione di una miniemulsione uniforme. L'elevato indice di polidispersità induce a concludere che non tutte le gocce siano state ridotte ad un'opportuna dimensione.

Aumentando il tempo di esposizione al bagno ad ultrasuoni, 10 e 15 min, si osserva la formazione di nanoparticelle più grandi, ma essendo queste pressoché simili nelle due sperimentazioni, si predilige un tempo che comporti il minore consumo energetico, ovvero 10 minuti.

Il problema della presenza di gocce bianche si riscontra in tutte e tre le prove, ciò induce alla conclusione che il dispositivo che si sta adottando non è idoneo. Da ricerche bibliografiche, si scopre che nonostante questo metodo sia largamente usato nel campo delle miniemulsioni dirette, l'impiego in quelle inverse è invece riportato raramente. Nelle miniemulsioni W/O la viscosità della fase continua può influenzare la dimensione delle gocce, al variare della natura dell'olio. Con un contenuto di acqua maggiore le gocce sono leggermente più grandi quanto più è viscoso l'olio, ciò è probabilmente legato ad una più alta frequenza di coalescenza, a causa di una più lenta stabilizzazione da parte dell'emulsionante [38].

In uno studio di Chemat et al. [39], è stato confrontato un olio di semi di girasole non trattato e uno trattato con ultrasuoni per 2 minuti a 20 kHz, ed è stato notato un aumento del quantitativo di perossidi dopo sonicazione. L'ossidazione dell'olio è probabilmente legata alla cavitazione, gli shock micromeccanici influenzano i componenti funzionali e strutturali fino al deterioramento. Anche la presenza di metalli come il rame, contenuti naturalmente negli oli alimentari, in combinazione con la cavitazione, sono stati sospettati come possibili responsabili della formazione di specie ossi-radicaliche, che avviano la generazione di composti volatili e prodotti non volatili [39]. In questo lavoro di tesi il tempo di sonicazione è superiore a 2 minuti e la frequenza del bagno di ultrasuoni a disposizione è di 35 kHz, quindi si suppone che lavorando in condizioni peggiori rispetto allo studio di Chemat et al. [39], la formazione di perossidi sia maggiormente favorita.

La comparsa delle gocce bianche, quindi, può essere ricondotta all'incompatibilità tra olio di semi di girasole ed ultrasuoni. Per tali problematiche si sostituisce il bagno di ultrasuoni con l'Ultra Turrax.

3.1.3.2 Emulsificazione con Ultra Turrax

L'Ultra Turrax è un dispositivo ad alto taglio, in cui l'emulsificazione avviene grazie alla formazione di uno stato di turbolenza. Si sceglie di adottare un tempo di 10 minuti a 14000 rpm per consentire l'uniformità della miniemulsione.

Per motivi pratici di immersione di questo strumento nel beaker, si triplicano i quantitativi della formulazione, lasciando invariati i rapporti, di conseguenza il

quantitativo di olio di semi di girasole sarà pari a 69 g in cui si aggiungono 0.3 g di Pluronic.

Poiché durante l'uso dell'Ultra Turrax viene inglobata molta aria, si inertizza il sistema mediante flusso di azoto. Si elimina lo step di agitazione magnetica iniziale, in quanto si è visto che eseguire questo passaggio preliminare, in questo caso, non ha alcun effetto sulla dimensione media delle nanoparticelle.

In Tabella 3.3 sono riportati la dimensione media e il PDI medio, nelle condizioni operative appena descritte, con irraggiamento per 15 minuti.

Tabella 3.3 Dimensione media e PDI di nanoparticelle prodotte con Ultra Turrax e tempo di irraggiamento di 15 minuti. I risultati si riferiscono ai rapporti della formulazione E.

Prova n°	Dimensione media (nm)	Dev Std (nm)	PDI (-)	Dev Std (-)
6	115.8	5.2	0.28	0.07

Le dimensioni medie risultano inferiori rispetto a quelle ottenute con il bagno ad ultrasuoni, ciò è un'ulteriore prova dell'inadeguatezza di tale strumento per il sistema in esame e allo stesso tempo una conferma della scelta dell'Ultra Turrax come dispositivo ottimale per l'emulsificazione.

Dopo uno studio preliminare della formulazione, mirato alla ricerca del tensioattivo e del metodo per ottenere l'emulsione, si conduce un esame più approfondito sulla sintesi delle nanoparticelle, variando alcune condizioni operative.

3.2 Sintesi del carrier

In questa fase del lavoro sperimentale, così come nelle prove precedentemente discusse, le nanoparticelle sono prive di caffeina, la quale sarà inserita solo dopo aver determinato la configurazione ottimale per la creazione delle nanoparticelle.

3.2.1 Studio del tempo di irraggiamento

Si effettuano delle prove a differenti tempi di irraggiamento: 5, 10, 15, 20, 25 minuti, per trovare quello che consenta la completa reticolazione del monomero.

A 5 e 10 minuti non si ha totale polimerizzazione, in quanto si osserva coalescenza delle gocce di monomero. Per i tempi successivi si riportano i valori di dimensione media e PDI medio nella Tabella 3.4:

Tabella 3.4 Dimensione media e PDI di nanoparticelle prodotte con Ultra Turrax al variare del tempo di irraggiamento. I risultati si riferiscono ai rapporti della formulazione E.

Prova n°	Tempo di irraggiamento (min)	Dimensione media (nm)	Dev Std (nm)	PDI (-)	Dev Std (-)
6	15	115.8	5.2	0.28	0.07
7	20	107.2	34.2	0.23	0.02
8	25	146.0	31.4	0.12	0.07

Nelle produzioni 7 e 8 è presente del solido sul fondo del reattore, dopo esposizione ai raggi UV, che induce a concludere che il tempo di irraggiamento sia maggiore di quello necessario per fare avvenire la completa reticolazione, e ciò porta le nanoparticelle ad aggregare tra loro. Per la misura DLS sono stati eliminati gli aggregati visibili, tuttavia l'elevata deviazione standard, e un secondo picco di intensità nella distribuzione dimensionale, attestano che questi sono comunque presenti. Si riporta come esempio la distribuzione dimensionale, in termini di intensità percentuale, del campione 8 (Figura 3.2).

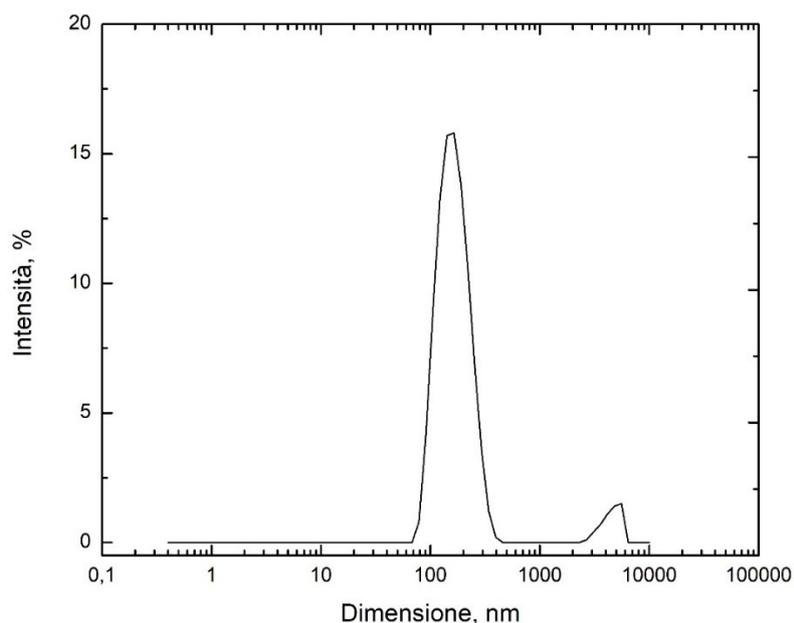


Figura 3.2 Distribuzione dimensionale di nanoparticelle prodotte con Ultra Turrax e 25 min di irraggiamento. I risultati si riferiscono ai rapporti della formulazione E.

Con l'aumentare del tempo di irraggiamento aumenta il numero di radicali liberi per ciascuna goccia, dunque una cinetica di reazione più veloce, che porta ad una maggiore reticolazione.

È possibile fare un confronto tra la dimensione delle gocce di monomero e la dimensione delle nanoparticelle, riportando la distribuzione dimensionale della miniemulsione non polimerizzata e del campione 6 (Figura 3.3). Si può notare come le distribuzioni dimensionali sono molto simili nei due casi; entrambe risultano essere caratterizzate da un singolo picco, centrato all'incirca sul medesimo valore di diametro. Questo conferma che nella polimerizzazione in miniemulsione le nanoparticelle sono la copia polimerizzata delle goccioline originali [12].

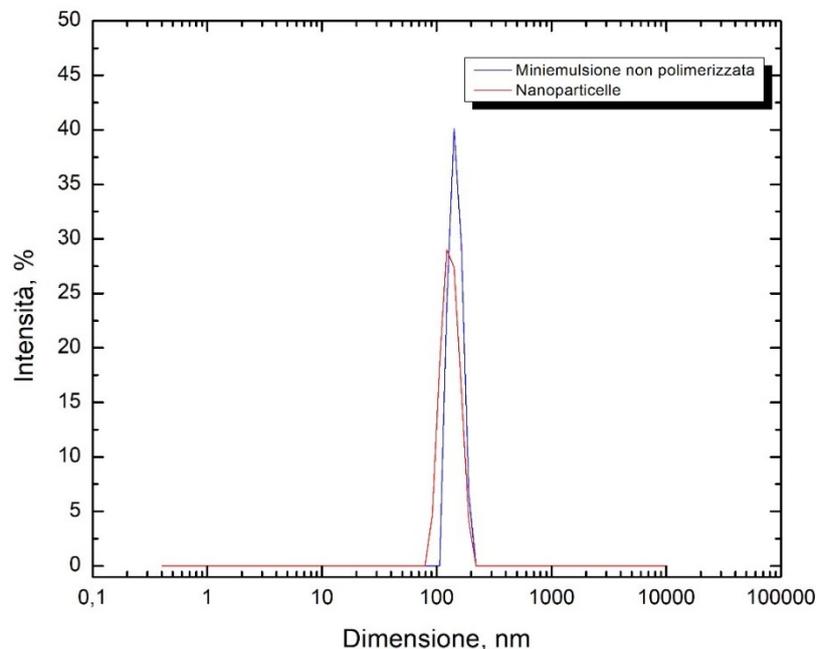


Figura 3.3 Distribuzione dimensionale della miniemulsione non polimerizzata e dopo 15 min di irraggiamento. I risultati si riferiscono ai rapporti della formulazione E con Ultra Turrax.

Per confermare l'avvenuta polimerizzazione si esegue una caratterizzazione termica e spettroscopica delle nanoparticelle. Tali caratterizzazioni si effettuano sul residuo solido secco, ottenuto dopo centrifugazione e separazione della fase oleosa.

3.2.1.1 Caratterizzazione termica

Si effettua un'analisi DSC sui campioni ai diversi tempi di irraggiamento, per verificare la presenza del picco di fusione del monomero PEGDA; se questo fosse presente implicherebbe un'incompleta reticolazione del monomero.

Si esegue un'analisi DSC dell'olio di semi di girasole (Figura 3.4) e del PEGDA (Figura 3.5), per valutare i picchi di interesse. Si esegue una rampa da -80 °C a 150 °C con una velocità di 5°C/min.

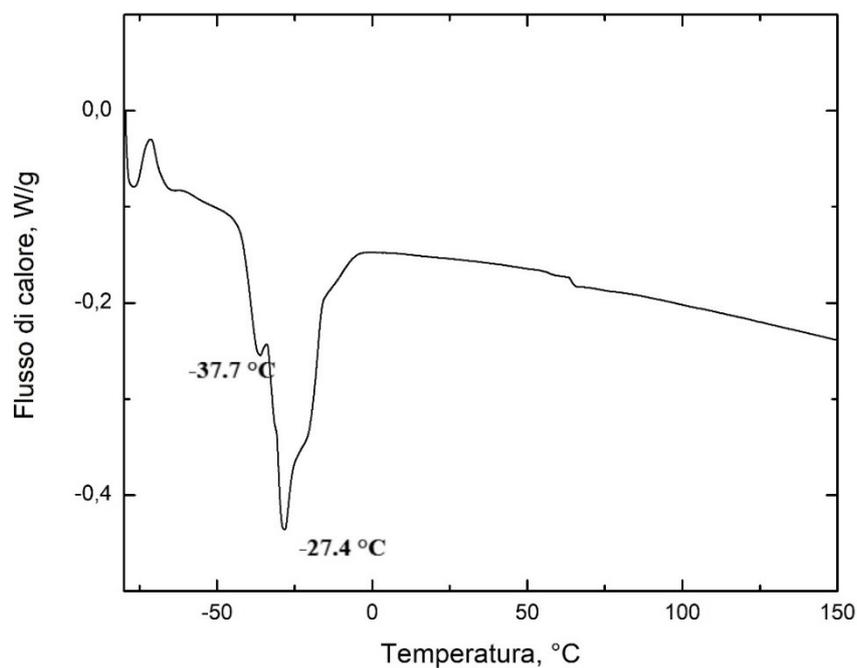


Figura 3.4 DSC dell'olio di semi di girasole.

Nel grafico DSC relativo a 4.9 mg di olio semi di girasole si osservano due picchi relativi alla fusione a -35.7 °C e -27.4 °C.

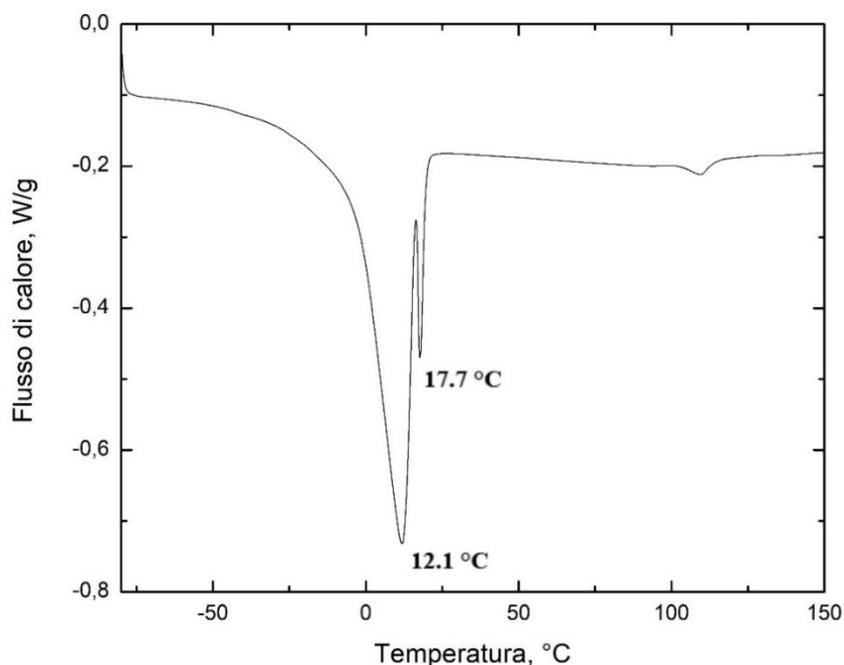


Figura 3.5 DSC del PEGDA.

Nel termogramma relativo a 18.3 mg di PEGDA, si evince che il picco di fusione è nel range tra 12-18 °C.

Si riporta lo spettro DSC del residuo solido di un campione non irraggiato (Figura 3.6), in cui è possibile notare che il picco del PEGDA è ancora presente, ma a 8.7 °C, quindi leggermente spostato rispetto a quello del monomero puro, ciò è probabilmente dovuto ad un'interazione con l'olio di semi di girasole, di cui sono evidenti i picchi caratteristici. Tale evidenza sperimentale dimostra che il pretrattamento condotto sui campioni da sottoporre ad analisi DSC non ha portato al completo allontanamento dell'olio, ma ha comunque permesso di rilevare le transizioni termiche di interesse.

Nell'analisi DSC del residuo secco della produzione 5 (Figura 3.7), in cui il tempo di irraggiamento risulta essere insufficiente, si ha un termogramma analogo a quello della miniemulsione non polimerizzata, compare ancora il picco del monomero (9.6 °C), che scompare, invece, nel residuo solido del campione 6 (Figura 3.8). Ciò conferma che il tempo di esposizione agli UV pari a 15 minuti è sufficiente per la completa fotoreticolazione del PEGDA.

Negli spettri DSC dei differenti campioni, sono sempre presenti i picchi di fusione dell'olio di semi di girasole, che rimane, dunque, in piccole tracce nel residuo solido.

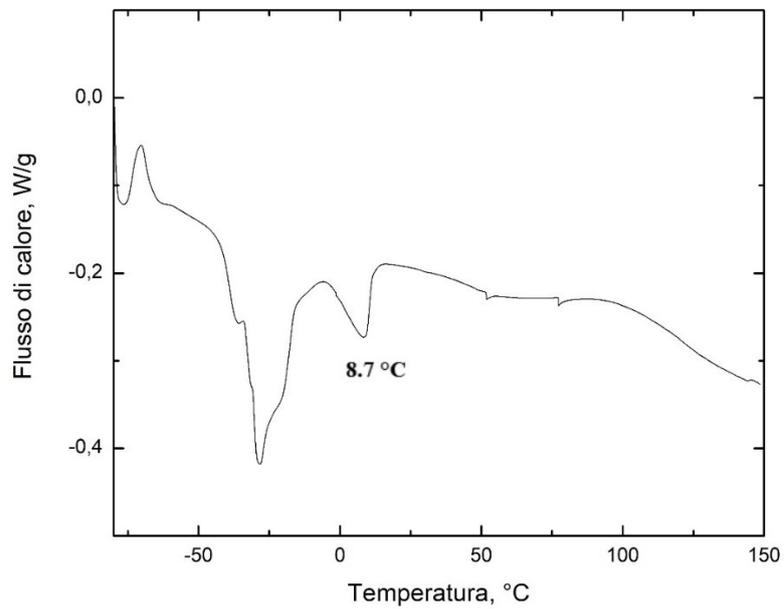


Figura 3.6 DSC del residuo della miniemulsione non polimerizzata, eseguita con Ultra Turrax e con i rapporti della formulazione E.

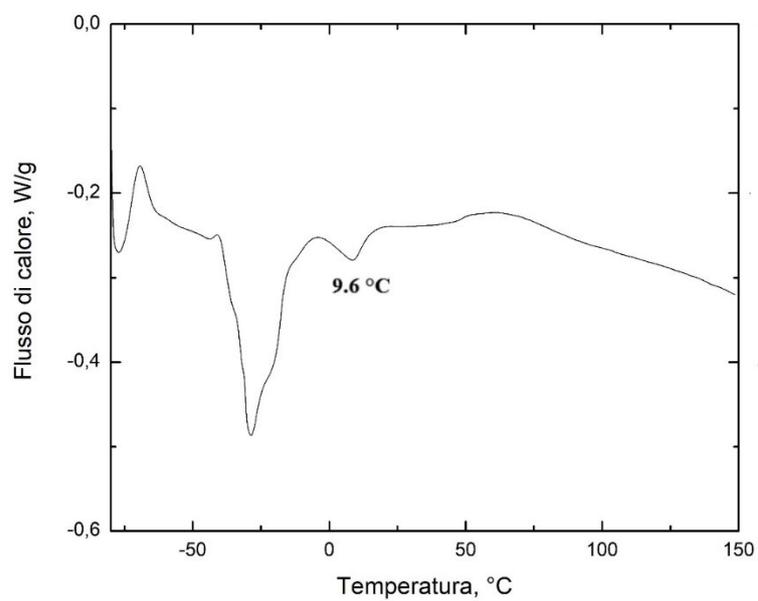


Figura 3.7 DSC del residuo del campione 5, prodotto con Ultra Turrax e tempo di irraggiamento di 10 min, con i rapporti della formulazione E.

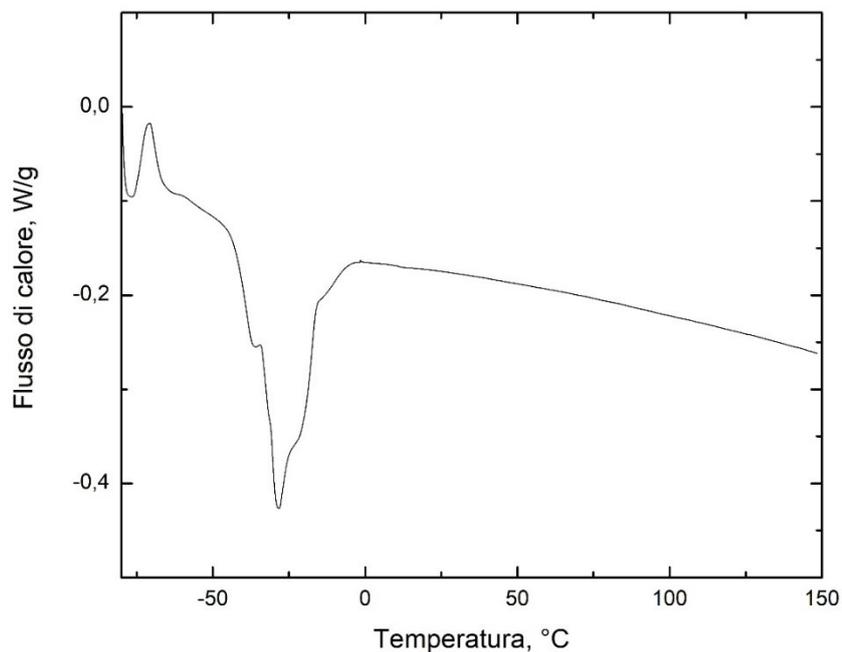


Figura 3.8 DSC del residuo solido del campione 6, eseguito con Ultra Turrax e tempo di irraggiamento di 15 min, con i rapporti della formulazione E.

Un'ulteriore prova dell'avvenuta reticolazione del monomero è stata ricavata mediante analisi FT-IR.

3.2.1.2 Caratterizzazione spettroscopica

Gli spettri FT-IR sono utilizzati per il riconoscimento delle molecole, che presentano dei gruppi funzionali caratterizzati da un picco ad una determinata lunghezza d'onda; l'intensità dell'assorbimento dipende strettamente dalla variazione del momento dipolare, da ciò si possono avere picchi intensi e ampi.

Sulla base di questa teoria, si esegue l'analisi del campione 6, mettendo a confronto lo spettro IR di tale produzione con quello del monomero puro, nell'intervallo di lunghezza d'onda di interesse (Figura 3.9).

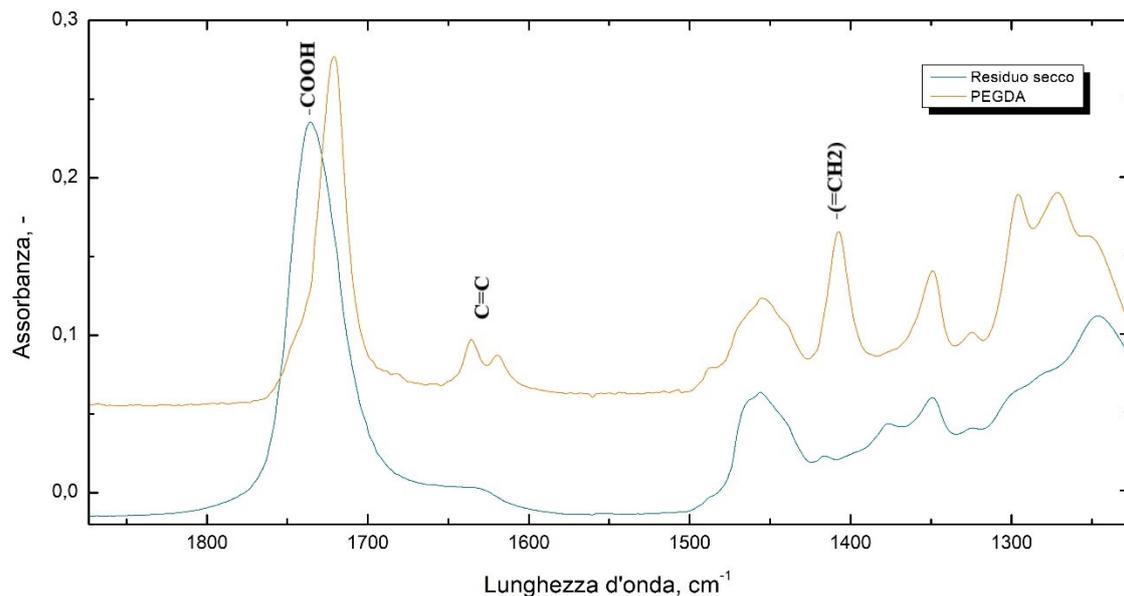


Figura 3.9 Spettro FT-IR del PEGDA e del residuo secco del campione 6, prodotto con Ultra Turrax e tempo di irraggiamento di 15 min, con i rapporti della formulazione E.

Il PEGDA ha dei picchi tra $1650-1600\text{ cm}^{-1}$ tipici di gruppi C=O e tra $1420-1410\text{ cm}^{-1}$ per il gruppo $-(=CH_2)$. Lo stretching di C=C a 1640 cm^{-1} , che non è invece visibile nel residuo solido, è indice dell'effettiva reticolazione del monomero.

L'assorbanza a 1735 cm^{-1} dovuta all'estere della struttura chimica del monomero, non è da confondere con il picco del residuo solido a $1750-1700\text{ cm}^{-1}$ indicante l'acido carbossilico dell'olio di semi di girasole, che ne conferma la sua non totale eliminazione, in accordo con quanto visto nell'analisi DSC. Si può, dunque, concludere che la misura FT-IR conferma la conversione completa del PEGDA.

Da quanto ottenuto, si considera 15 minuti come tempo ottimale per l'irraggiamento.

3.2.2 Studio delle condizioni di emulsificazione

Nell'uso dell'Ultra Turrax si determinano i migliori parametri operativi, che conducano ad ottenere delle nanoparticelle di idrogel con il minor consumo energetico, si decide di variare dunque, sia la velocità che il tempo di utilizzo dello strumento. Nella Tabella 3.5 sono mostrati le dimensioni medie e il PDI medio ottenuti nelle diverse prove, con tempo di irraggiamento di 15 minuti.

Tabella 3.5 *Analisi dimensionale al variare della velocità e del tempo di Ultra Turrax delle nanoparticelle ottenute con 15 min di irraggiamento, utilizzando i rapporti della formulazione E.*

Prova n°	Velocità (rpm)	Tempo (min)	Dimensione media (nm)	Dev Std (nm)	PDI (-)	Dev Std (-)
9	7000	10	-	-	-	-
10	14000	5	188.8	8.7	0.26	0.12
6	14000	10	115.8	5.2	0.28	0.07

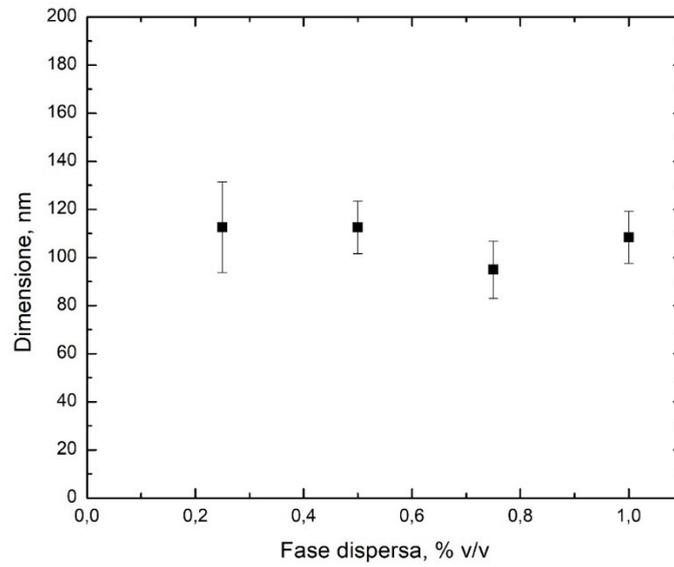
Nella produzione 10 la dimensione delle nanoparticelle risulta più elevata rispetto al caso 6, un tempo di 5 minuti è dunque insufficiente per creare una buona miniemulsione. Il limite superiore del tempo impiegato è pari a 10 minuti, per evitare eccessivi surriscaldamenti dello strumento, date le elevate velocità adottate.

Si prova a dimezzare il valore di velocità usato finora, ma risulta troppo breve per poter ottenere una miniemulsione: la fase dispersa e quella continua non sono perfettamente miscelate, in quanto la bassa velocità di rotazione non consente di aspirare ed omogenizzare le fasi liquide. Visivamente si osservano gocce di fase acquosa non disperse in olio, per tale motivo non si effettua alcuna misura DLS per il campione 9.

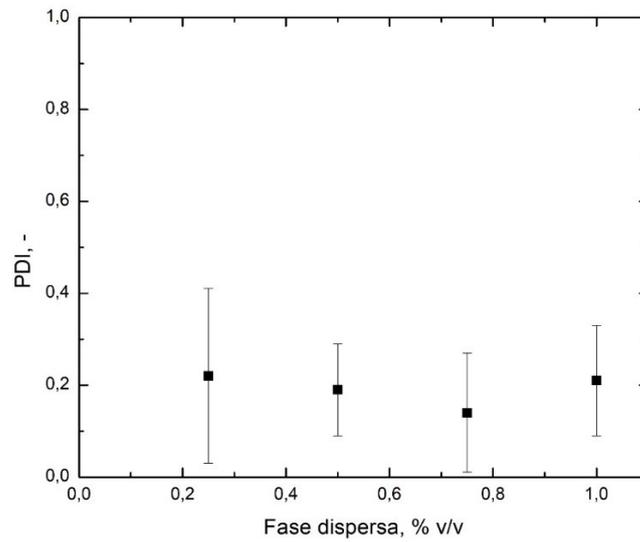
Per quanto visto, la configurazione adottata inizialmente di 10 minuti a 14000 rpm risulta essere la migliore. A queste condizioni si studia l'effetto che ha la variazione del rapporto tra fase dispersa e continua sulla dimensione degli idrogel.

3.2.3 Studio della percentuale in volume della fase dispersa in olio

Si inseriscono diversi volumi di fase acquosa all'interno dei 75 ml di olio (corrispondenti a 69 g, data la densità di ~ 0.92 g/ml dell'olio di semi di girasole). In Figura 3.10 sono mostrati gli andamenti della dimensione media delle nanoparticelle e del PDI, in funzione della condizione operativa che si sta studiando.



a)



b)

Figura 3.10 Andamento della dimensione a) e PDI b) delle particelle al variare della % di fase dispersa con Ultra Turrax a 14000 rpm per 10 minuti e irraggiamento di 15 minuti, usando i rapporti della formulazione E.

Si nota che i valori dimensionali ottenuti variando il quantitativo della fase acquosa in olio, sono molto simili, per tale ragione si ritiene più opportuno adottare il volume più grande, che consentirà di incapsulare una quantità maggiore di caffeina.

3.2.4 Studio della percentuale di monomero

È condotto un ulteriore studio sulla quantità di PEGDA adottato, in particolare si aumenta del doppio la percentuale in acqua, fino ad ora impiegata. In Tabella 3.6 è riportato il confronto dimensionale dei due differenti quantitativi di monomero.

Le prove sono condotte sempre con una velocità di Ultra Turrax di 14000 rpm per 10 minuti, e un tempo di irraggiamento di 15 minuti.

Tabella 3.6 *Analisi dimensionale al variare della percentuale di PEGDA, con Ultra Turrax a 14000 rpm per 10 min e irraggiamento per 15 minuti.*

Prova n°	PEGDA (% w/w)	Dimensione media (nm)	Dev Std (nm)	PDI (-)	Dev Std (-)
6	10	115.8	5.2	0.28	0.07
14	20	148.0	35.1	0.37	0.02

Con una percentuale di PEGDA maggiore, dopo polimerizzazione, si ha la formazione di aggregati visibili nel sistema, che vengono rimossi nell'esecuzione della misura DLS. Si assiste ad un incremento del diametro medio delle nanoparticelle, ciò è probabilmente dovuto all'uso di un tensioattivo non ionico, come il Pluronic, che essendo privo di carica, promuove solo una stabilità sterica e non una elettrostatica, risultando meno efficace nel mantenere separate le gocce in fase di polimerizzazione, rispetto ad un surfattante anionico. Tale effetto si manifesta in maniera più evidente con una massa superiore di monomero, in quanto vi sono più centri attivi che promuovono la reazione, quindi maggiore probabilità di incontrarsi e formare aggregati durante la fotoreticolazione.

Le ragioni appena esposte, confermano la validità dell'ipotesi iniziale, che prevedeva l'impiego del 10% in peso di PEGDA rispetto all'acqua.

Dallo studio degli svariati parametri si può dunque concludere che la formulazione e le condizioni operative definitive, per la creazione delle nanoparticelle di idrogel, sono le seguenti:

Fase dispersa:

2 % (w/w) Darocur 1173 rispetto al PEGDA

10 % (w/w) PEGDA in acqua

0.69 g acqua per preparazioni iniettabili

Fase continua:

69 g olio di semi di girasole

0.3 g Pluronic PE6100

Condizioni operative:

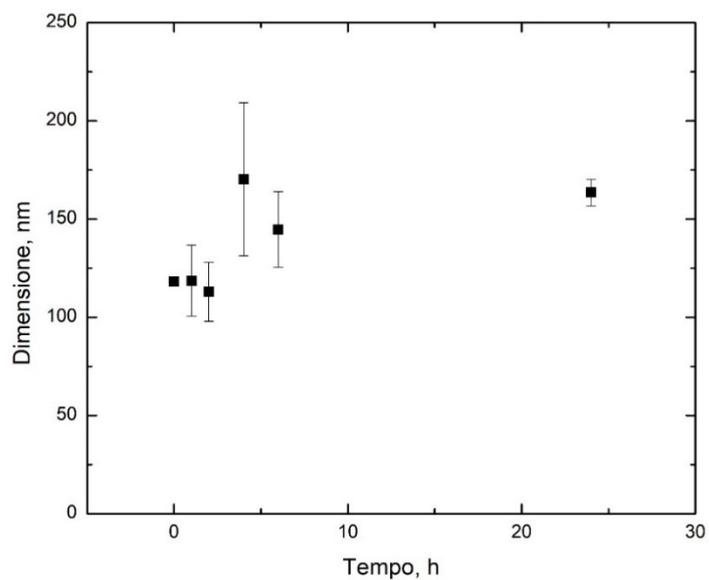
10 min di Ultra Turrax a 14000 rpm con flusso di N₂

15 min di irraggiamento

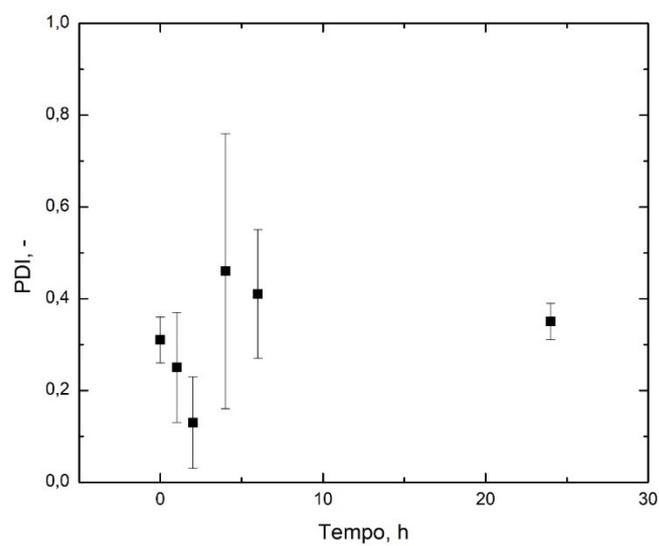
Per avere un'ulteriore conferma sulla validità dello studio di sintesi delle nanoparticelle realizzato, si osserva la stabilità del sistema.

3.2.5 Stabilità della sospensione di nanoparticelle nel tempo

Per verificare che la sospensione delle particelle sia stabile nel tempo, si effettuano una serie di misure DLS in cui si monitora la dimensione media degli idrogel e l'indice di polidispersità. La prima misura è stata condotta subito dopo la polimerizzazione e lo stesso campione è stato sottoposto ad analisi successive nel corso di 24 ore (Figura 3.12).



a)



b)

Figura 3.12 Andamento nel tempo della dimensione a) e PDI b) delle nanoparticelle con Ultra Turrax a 14000 rpm per 10 min con irraggiamento di 15 minuti, con i rapporti della formulazione E.

Si può notare un aumento del diametro medio, dopo 4 ore dalla polimerizzazione della miniemulsione, che si ipotizza sia causato dalla formazione di aggregati. L'elevata deviazione standard dell'indice di polidispersità che si osserva, è probabilmente dovuta a tale variazione dimensionale. Quanto avviene non comporta nessuno ostacolo al rilascio controllato della caffeina, di cui si discuterà in § 3.4.2.

3.3 Loading del principio attivo nel carrier

Dopo aver accertato la validità del sistema in esame, si sintetizzano le nanoparticelle di idrogel contenenti la caffeina.

Il motivo per il quale si sceglie di incapsulare tale principio attivo è legato ai suoi molteplici effetti benefici sulla salute umana, grazie alla sua tendenza ad interagire con specifici recettori biologici del corpo umano.

La caffeina è stata studiata largamente in vivo e in vitro. Uno dei metodi per poter rilasciarla è per via transdermica, la sua somministrazione sistematica avviene attraverso lo strato corneo, tuttavia, questo principio attivo non presenta le proprietà di un penetrante cutaneo ideale, in quanto è idrofila e con logP di -0,07. Possiede inoltre un'inusuale solubilità in solventi non acquosi e forma aggregati in soluzioni acquose [27].

Il principio attivo deve diffondere all'interno dello strato corneo, che rappresenta l'ostacolo maggiore, in quanto funge da barriera per le sostanze idrofile, che al contrario, diffondono bene nello strato successivo, ovvero quello germinativo. Sono stati studiati diversi approcci per superare questa limitazione e migliorare la penetrazione cutanea, uno è l'uso di nanoemulsioni w/o [40], come in questo studio.

Proprio per l'idrofilia della caffeina, di cui si è discusso, il principio attivo è inserito in fase dispersa, poiché non solubile in olio di semi di girasole.

3.3.1 Determinazione della solubilità di caffeina in acqua e individuazione del suo loading nel carrier

Per conoscere esattamente la massa di caffeina da inserire all'interno della fase dispersa, si effettuano prove sperimentali che hanno lo scopo di identificare quale sia il limite di solubilità di tale principio attivo a temperatura ambiente. Queste sono state condotte in duplicato, la procedura di laboratorio eseguita è descritta nel dettaglio in § 2.2.1.1.

Dagli esperimenti, il quantitativo totale di caffeina aggiunto in 50 g di acqua, prima di giungere alla saturazione, risulta essere di 1345 mg, quindi la solubilità stimata è pari al 2.69 % w/w, ovvero 26.9 mg/ml.

Il residuo solido, facendo la media dei tre campioni prelevati in ogni prova, è pari a 242.2 mg su 9 ml della soluzione, ciò conferma il valore di solubilità trovato

precedentemente. Tale valore è leggermente diverso da quello teorico pari a 21.6 mg/ml a 25 °C [30].

Poiché la fase dispersa della miniemulsione inversa, non contiene solo acqua, ma anche PEGDA e Darocur 1173, si verifica che la presenza di tali sostanze non modifichi il valore di solubilità trovato sperimentalmente. Partendo dalla massa di caffeina determinata precedentemente e aggiungendone una quantità superiore, si è scoperto che la presenza del monomero, favorisce la solubilità del principio attivo in acqua.

Il fotoiniziatore usato è sempre pari al 2% w/w rispetto al monomero. Si considerano due diverse quantitativi di PEGDA in acqua, 10% e 20% in peso, si esegue la prova per due volte per ogni quantità. Quanto detto è mostrato nella Figura 3.12, in cui la percentuale di caffeina per ogni quantitativo di monomero considerata, è ottenuta come media delle due prove; le barre di errore sono calcolate come deviazione standard degli esperimenti a ciascuna percentuale di PEGDA, tuttavia, queste risultano molto piccole e non osservabili.

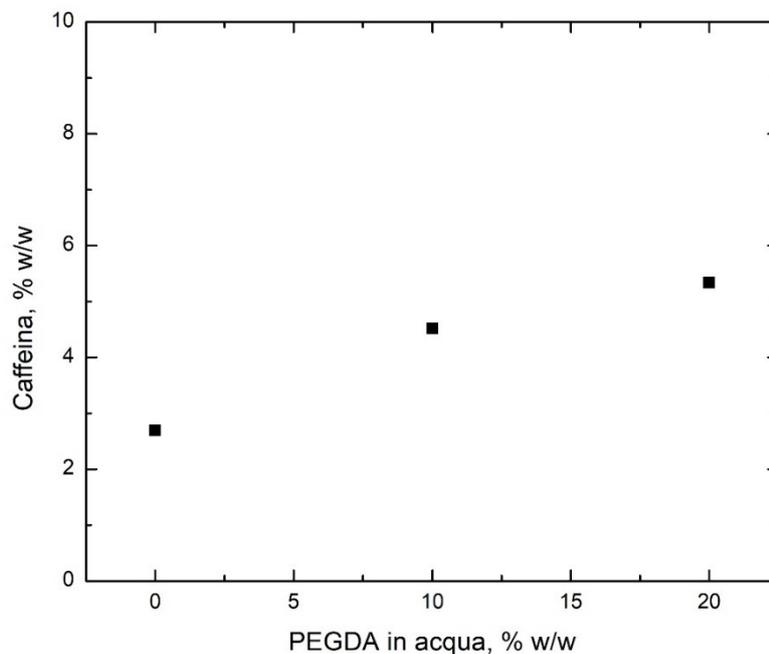


Figura 3.12 Concentrazione di caffeina in acqua al variare della concentrazione di PEGDA.

Si nota un aumento della percentuale di caffeina solubile in acqua, all'aumentare della percentuale in peso del monomero.

Per il loading nel carrier, utilizzando la configurazione che è stata assunta essere quella ottimale, si procede in modo del tutto analogo a quanto fatto per la preparazione delle nanoparticelle di idrogel in assenza del principio attivo, aggiungendo nella fase dispersa una quantità di 2.5 % in peso (25 mg/ml) di caffeina in acqua. Si impiega tale concentrazione per stare al di sotto del limite di solubilità trovato, constatato che la presenza del fotoiniziatore e del monomero non reca alcun problema, ma al contrario, favorisce la solubilizzazione della caffeina in acqua.

Nella fase di loading del principio attivo nel carrier, si decide di non considerare i valori di concentrazioni stimati con la percentuale di PEGDA che si ha nella miniemulsione, poiché quando questo polimerizza, la sua tendenza a favorire la solubilità della caffeina verrebbe meno.

3.3.2 Analisi dimensionale degli idrogel con caffeina

Si esegue una caratterizzazione dimensionale mediante DLS, facendo un confronto tra gli idrogel senza e con caffeina, di cui sono riportati i valori ottenuti in Tabella 3.7, relativi ad una media effettuata su tre campioni. In Figura 3.13 si confrontano le distribuzioni dimensionali in termini di intensità percentuale, di una produzione contenente il principio attivo e uno in cui è assente.

Tabella 3.7 Confronto dimensionale degli idrogel con e senza caffeina, con i rapporti della formulazione E con Ultra Turrax a 14000 rpm per 10 min e tempo di irraggiamento di 15 min.

Nanoparticelle	Dimensione media (nm)	Dev Std (nm)	PDI (-)	Dev Std (-)
Senza caffeina	114.1	5.1	0.27	0.05
Con caffeina	107.4	15.3	0.20	0.13

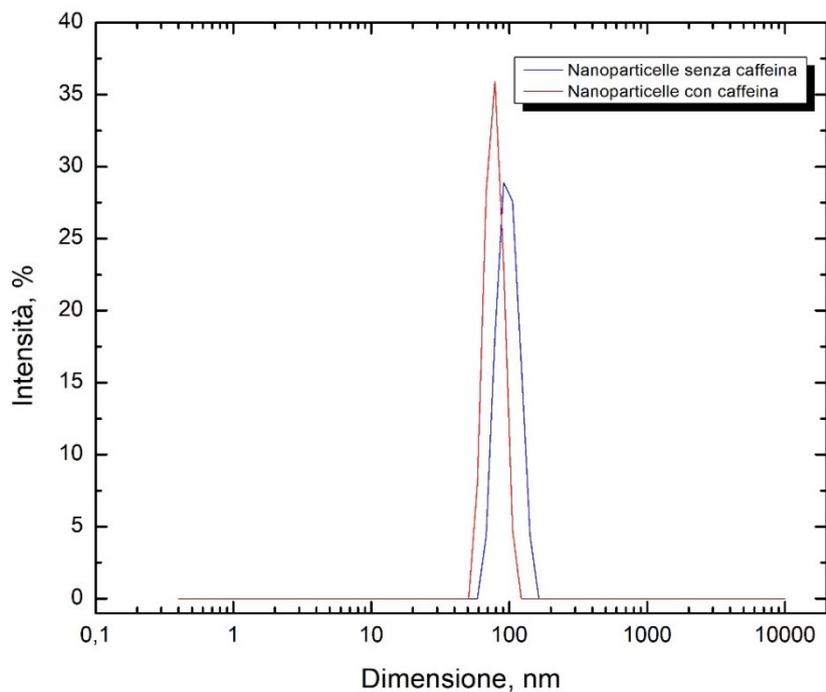


Figura 3.13 Distribuzione dimensionale degli idrogel con e senza caffeina, con i rapporti della formulazione E con Ultra Turrax a 14000 rpm per 10 min e tempo di irraggiamento di 15 min.

La dimensione degli idrogel risulta leggermente inferiore nel caso in cui si ha la caffeina, si ha una differenza comunque trascurabile, di conseguenza si possono ritenere ancora valide tutte le assunzioni formulate precedentemente.

3.3.3 Studio della conversione del PEGDA e dell'incapsulamento della caffeina

Si effettuano caratterizzazioni termiche e spettroscopiche, come fatto nel caso delle nanoparticelle prive del principio attivo; ciò consente di determinare se la polimerizzazione del monomero sia avvenuta. Si confrontano il termogramma DSC (Figura 3.14) e lo spettro FT-IR (Figura 3.16) della caffeina pura con quelli del residuo secco di nanoparticelle cariche di tale sostanza.

3.3.3.1 Caratterizzazione termica

Per l'analisi DSC si esegue una rampa da -80 °C a 300 °C con una velocità di 5°C/min.

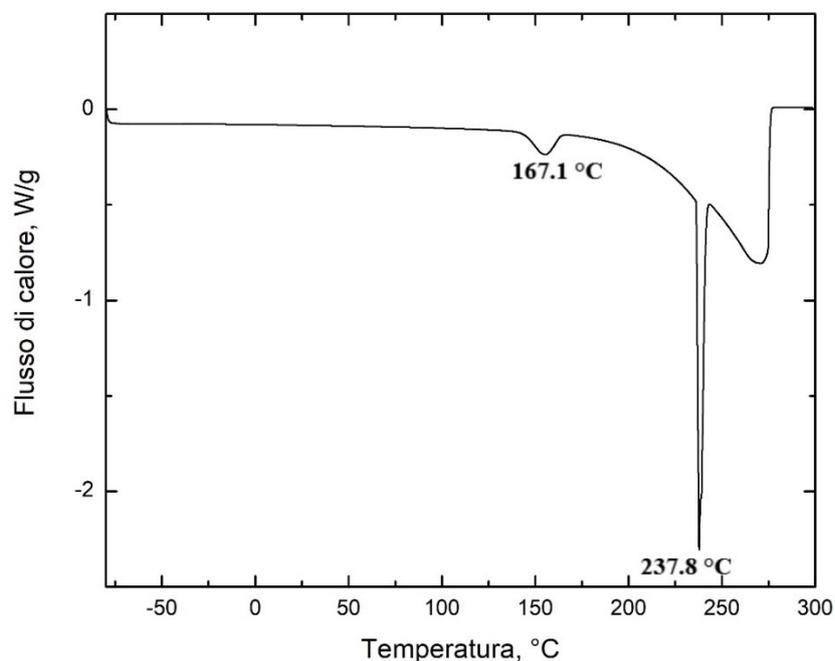


Figura 3.14 DSC della caffeina.

Si considera questo range di temperatura, in quanto da uno studio di Sun et al. [41], in cui è condotta un'analisi DSC sulla caffeina nelle medesime condizioni di questo lavoro di tesi, si nota un evento endotermico tra 147-170 °C corrispondente ad una transizione da una forma cristallina II ad una I, seguita da un picco di fusione della forma I intorno a 236 °C [41].

Dal termogramma DSC relativo a 16.9 mg si nota un picco di fusione a 237.8 °C e un ulteriore picco caratteristico a 167.1 °C, in accordo con lo studio di Sun et al. [41].

Si esegue un'analisi DSC sul residuo solido essiccato di un campione di nanoparticelle con caffeina, ottenute dopo centrifugazione e separazione dalla fase oleosa. Si riporta il termogramma in Figura 3.15, in cui scompaiono i picchi caratteristici di caffeina, ciò indica che questa è incorporata all'interno del carrier [28]. Non è più presente il picco di fusione del PEGDA, questo testimonia che si ha una sua completa conversione, anche in presenza del principio attivo. La sua aggiunta, quindi, non compromette la fotoreticolazione del monomero. Compaiono, invece, i picchi caratteristici di olio residuo, come osservato in precedenza.

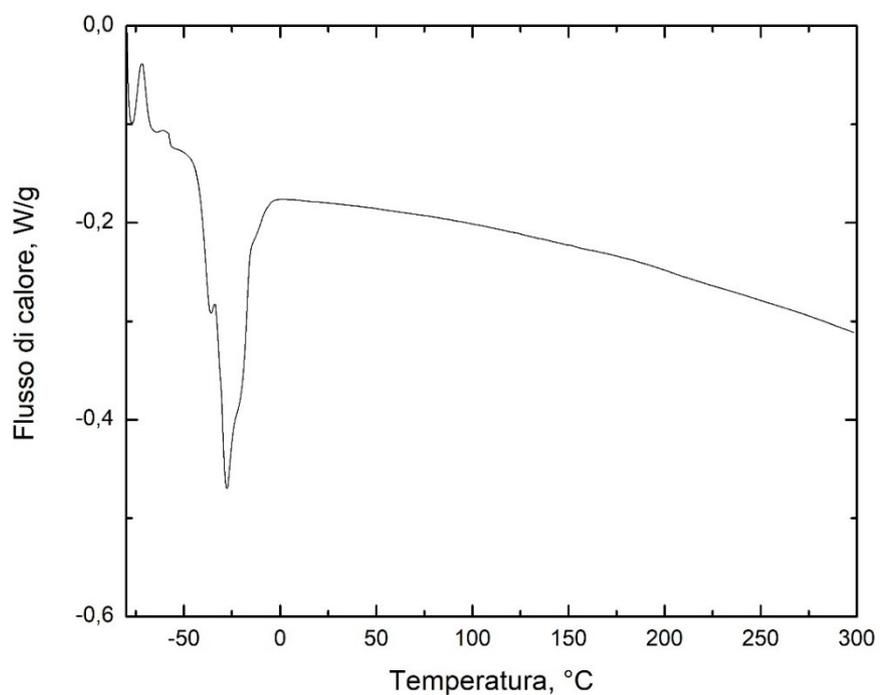


Figura 3.15 DSC del residuo secco di idrogel con caffeina, con i rapporti della formulazione E con Ultra Turrax a 14000 rpm per 10 min e tempo di irraggiamento di 15 min.

3.3.3.2 Caratterizzazione spettroscopica

Nella Figura 3.16 che segue, sono messi a confronto lo spettro FT-IR del PEGDA puro e del residuo solido secco di nanoparticelle contenenti il principio attivo, nell'intervallo di interesse di lunghezza d'onda.

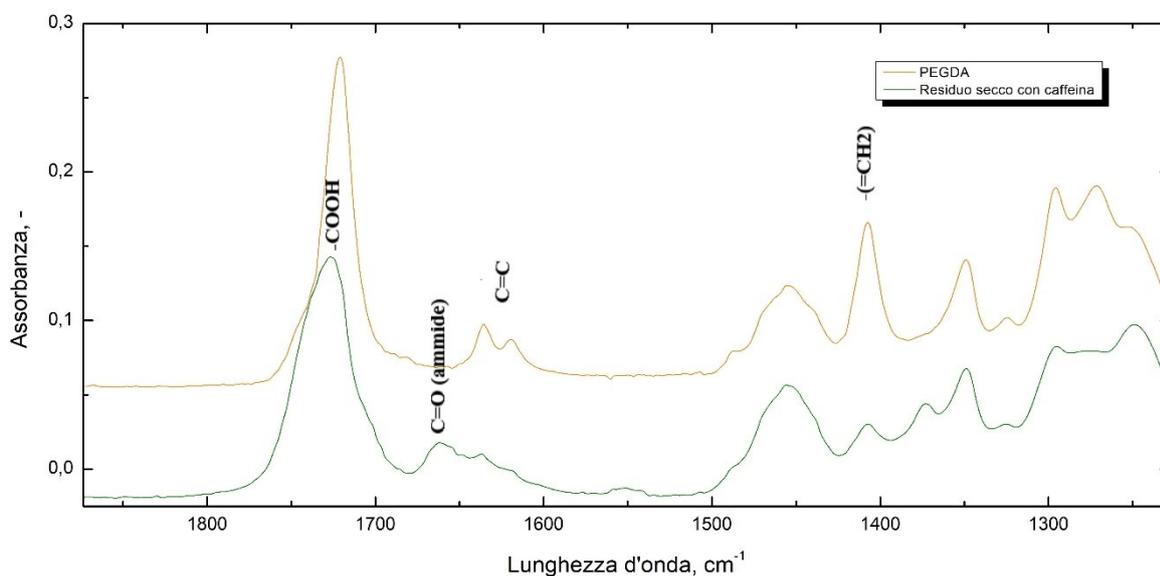


Figura 3.16 Spettri FT-IR di PEGDA e residuo secco carico di caffeina con i rapporti della formulazione E con Ultra Turrax a 14000 rpm per 10 min e tempo di irraggiamento di 15 min.

Quanto discusso in § 3.2.1.2 risulta ancora valido, quindi anche nel caso in esame si ha la completa reticolazione del monomero. Tuttavia, nella produzione vi sono dei picchi caratteristici del principio attivo, che attestano la sua presenza nell'idrogel, come quello relativo al gruppo C=O (ammide) nel range tra 1690-1640 cm^{-1} .

Per maggiore chiarezza, si riporta il confronto dello spettro FT-IR della caffeina e del residuo secco contenente il principio attivo (Figura 3.17), nello stesso range di lunghezza d'onda della Figura 3.16.

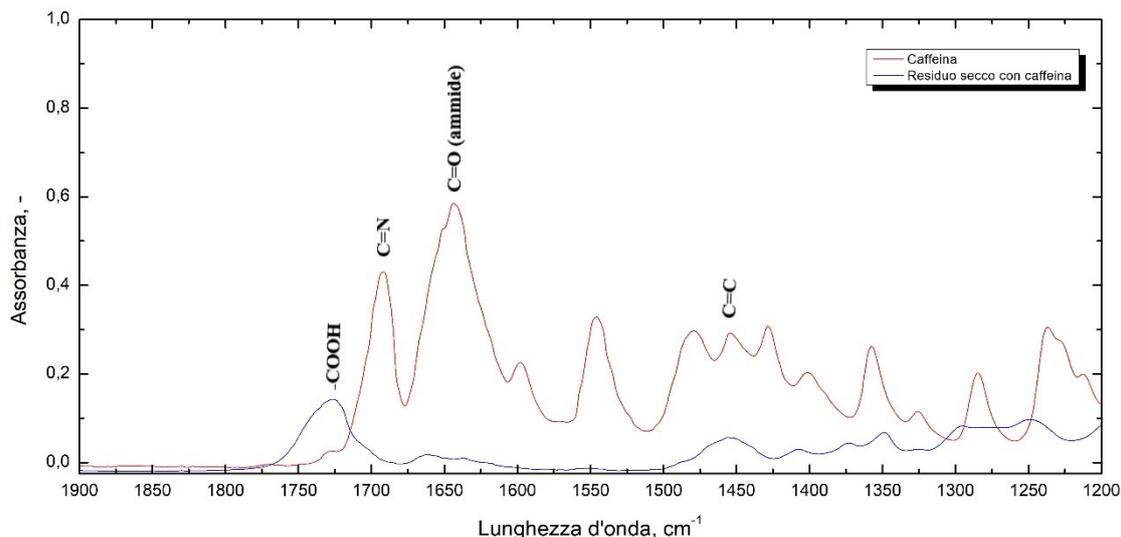


Figura 3.17 Spettri FT-IR di caffeina e residuo secco carico di caffeina con i rapporti della formulazione E con Ultra Turrax a 14000 rpm per 10 min e tempo di irraggiamento di 15 min.

Nello spettro della caffeina si possono notare altri picchi tipici, oltre a quello menzionato precedentemente: tra 1600-1400 cm^{-1} per il legame C=C dell'anello aromatico, uno tra 1800-1600 cm^{-1} per il legame C=N.

Oltre alla conversione del monomero, un aspetto che deve essere considerato nello studio del rilascio di principio attivo da nanocarrier, è la quantità effettivamente inglobata in esso.

3.3.4 Valutazione dell'efficienza di incapsulamento

Attraverso un'analisi FT-IR si verifica se tutto il principio attivo rimane all'interno delle nanoparticelle. Si effettua la centrifugazione per separare gli idrogel dalla fase oleosa, quest'ultima è poi sottoposta all'analisi dello strumento, dal quale si ottiene uno spettro, che è comparato con quello dell'olio di semi di girasole e della caffeina (Figura 3.18).

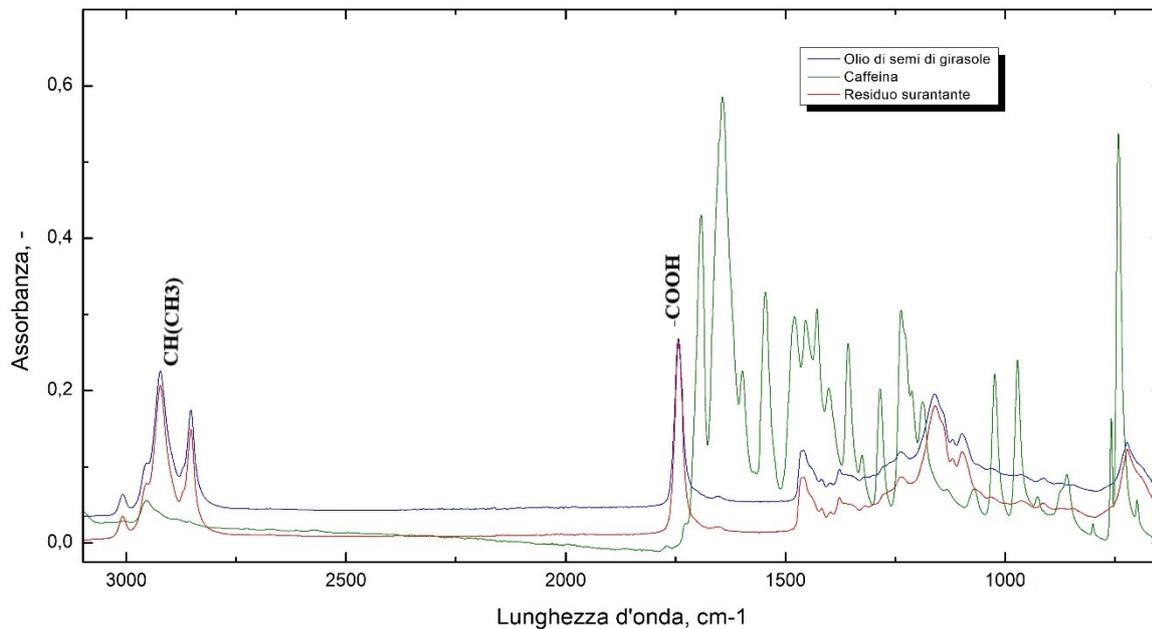


Figura 3.18 Spettri FT-IR di caffeina, olio di semi di girasole e surnatante con i rapporti della formulazione E con Ultra Turrax a 14000 rpm per 10 min e tempo di irraggiamento di 15 min.

Nel surnatante oleoso non compaiono i picchi tipici della caffeina, il suo spettro risulta coincidente con quello dell'olio di semi di girasole, traslato a valori di assorbanza leggermente inferiori. Si nota una frequenza di stretching del legame CH(CH₃) tra 2970-2950 cm⁻¹, oltre al picco tra 1750-1700 °C legato alla presenza dell'acido carbossilico dell'olio, di cui si è già accennato in § 3.2.1.2.

Come prova del fatto che se è presente la caffeina nell'olio se ne osservano comunque i suoi picchi caratteristici, si effettua un'analisi FT-IR di olio con all'interno il principio attivo, si riporta il confronto con gli spettri di solo olio e caffeina pura (Figura 3.19).

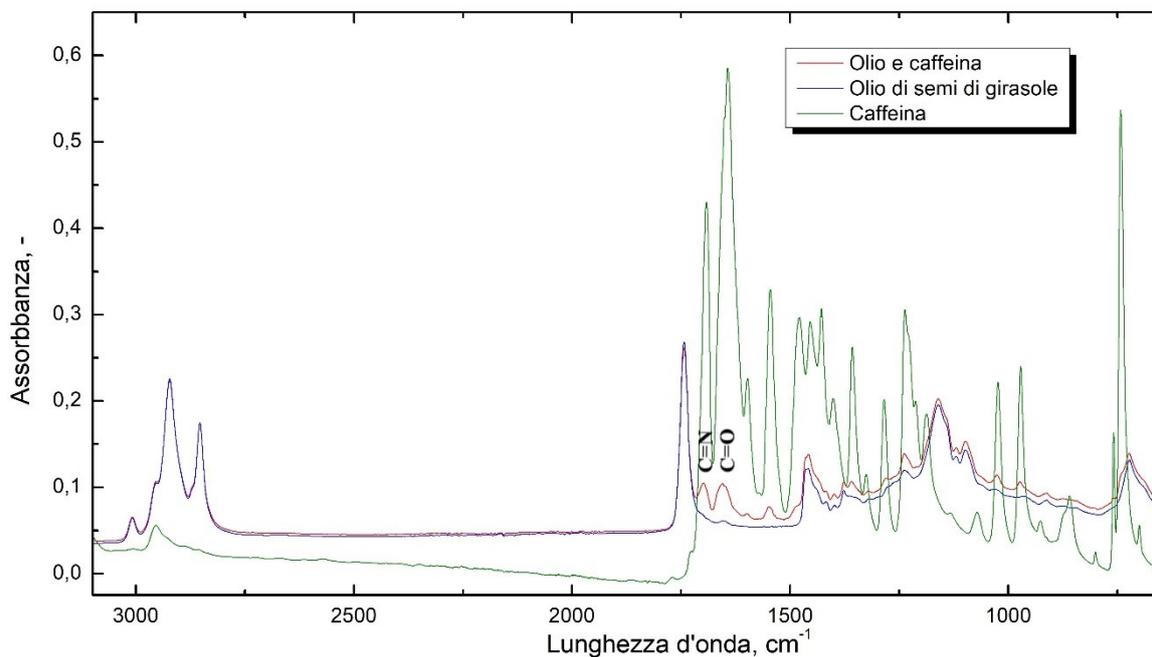


Figura 3.19 Spettri FT-IR di caffeina, olio di semi di girasole ed olio e caffeina.

Lo spettro di olio con caffeina non è più coincidente con quello dell'olio puro, come si osservava per il surnatante, si notano infatti, le frequenze di stretching dei legami C=O (ammide) e C=N nel range di lunghezza d'onda tra 1700-1600 cm^{-1} .

Si può concludere dunque, che l'efficienza di incapsulamento è del 100%, questo risultato è legato al fatto che la caffeina, essendo una sostanza idrofila, non solubilizza nell'olio di semi di girasole, che è invece lipofilo.

Quanto dimostrato ha un'importanza fondamentale nella fase di rilascio controllato del principio attivo, perché consente di affermare che la totalità della caffeina caricata nel sistema si trova effettivamente all'interno delle nanoparticelle; permette, inoltre, di conoscere la sua massa iniziale nel carrier. Tuttavia, si potrebbe avere una perdita di caffeina causata da irraggiamento, perciò si effettua una stima speculativa di tale degradazione, che è descritta nel seguito.

3.3.5 Calcolo della perdita di caffeina a causa delle radiazioni UV

Da ricerche in letteratura è stato osservato che l'applicazione topica della caffeina alla pelle di topo, dopo radiazione UV promuove la delezione del DNA dei cheratinociti (cellule principali della cute) e può parzialmente ridurre il fotodanneggiamento e anche la fotocarcinogenesi [42].

Nel processo di sintesi, per lo step di polimerizzazione, si fa uso di radiazioni UV, per tale ragione si potrebbe avere una perdita del principio attivo. Questa è valutata mettendo a confronto due soluzioni di acqua per preparazioni iniettabili e caffeina, una delle quali si sottopone a 15 minuti di irraggiamento, per simulare le condizioni operative di sintesi. La concentrazione nelle due soluzioni è identica, e pari a quella della miniemulsione.

Le due soluzioni, con opportuna diluizione di 1:3000, sono sottoposte ad analisi UV/Visibile; si leggono i valori di assorbanza a 273 nm, e si ricava il valore di concentrazione dalla (3.2), moltiplicando per il fattore di diluizione:

$$y = mx \tag{3.2}$$

dove y è l'assorbanza, x la concentrazione e m il coefficiente angolare della retta di taratura, calcolato in studi precedenti e pari a 53.1 [34].

L'assorbanza dallo spettro UV/Visibile della caffeina in acqua è nella zona tra 243-302 nm a temperatura ambiente, in particolare la banda intorno a 273 nm è legata al gruppo cromoforo C=O [43], motivo per il quale si legge il valore di assorbanza a tale lunghezza d'onda.

I risultati ottenuti sono elencati in Tabella 3.8:

Tabella 3.8 Valori di concentrazione e assorbanza per il calcolo della perdita di caffeina.

	Assorbanza	Concentrazione (mg/ml)
soluzione non irraggiata	0.439	24.8
soluzione irraggiata	0.280	15.8

Si osserva, dunque, una perdita di caffeina del 37%, calcolata dalla (3.3):

$$perdita \% = 1 - \frac{Concentrazione\ soluzione\ irraggiata}{Concentrazione\ soluzione\ non\ irraggiata} \tag{3.3}$$

Tuttavia, considerando che nella miniemulsione il principio attivo è contenuto nelle gocce di monomero e grazie anche all'effetto schermante dell'olio di semi di girasole, in cui esse si trovano, tale percentuale sarà sicuramente minore rispetto a quella stimata per una soluzione di sola acqua e caffeina.

3.4 Rilascio controllato di caffeina

Le prove di rilascio sono condotte utilizzando il metodo della membrana da dialisi, la cui procedura è stata descritta in dettaglio in § 2.2.5.2.

3.4.1 Prove preliminari

Si conducono delle prove preliminari sia rilasciando direttamente la caffeina dalle nanoparticelle disperse in olio, sia separando e ridisperdendo queste ultime in acqua, per determinare l'approccio più efficace.

3.4.1.1 Prove di rilascio da idrogel dispersi in acqua

Per il rilascio delle nanoparticelle da mezzo acquoso, è opportuno disperderle in esso. È necessario separare la fase oleosa per poi rimuoverla e sostituirla con acqua per preparazioni iniettabili; la procedura è stata descritta in § 2.2.5.1.

Gli step di centrifugazione, agitazione meccanica e bagno ad ultrasuoni, sono stati condotti cercando di minimizzare il più possibile il tempo di esecuzione della prova, per evitare il passaggio della caffeina dagli idrogel in acqua, perdendone una parte significativa già in questa fase.

L'agitazione meccanica e il bagno ad ultrasuoni hanno la funzione di rompere gli aggregati di idrogel che si sono formati in seguito alla centrifugazione, in modo da riportare le dimensioni al valore iniziale. L'agitazione, per tale ragione, è condotta alla massima velocità. Si effettua l'analisi DLS per verificare che la sospensione di nanoparticelle sia stata ricostituita con successo.

Si effettuano prove con 2 minuti di agitazione e con 5, 10, 15 minuti di ultrasuoni, ma le dimensioni risultano elevate in tutti questi casi. Si aumenta il tempo di stirring a 5 minuti, che risulta ancora insufficiente. Si impiegano quindi, 10 minuti di agitazione con 10 minuti di sonicazione. Tempi superiori di esposizione agli ultrasuoni (15 minuti) non portano a variazione della dimensione delle nanoparticelle, mentre tempi inferiori (5 minuti) non sono sufficienti a raggiungere la completa rottura degli aggregati.

È possibile confrontare le dimensioni medie e il PDI medio degli idrogel in olio e dopo dispersione in acqua, di uno stesso campione (Tabelle 3.9), di cui si riporta anche la distribuzione dimensionale in termini di intensità percentuale (Figura 3.20).

Tabella 3.9 Confronto dimensionale degli idrogel con e senza caffeina.

Fase disperdente degli idrogel	Dimensione media (nm)	Dev Std (nm)	PDI (-)	Dev Std (-)
olio	151.6	11.8	0.35	0.01
acqua	103.0	1.2	0.30	0.0

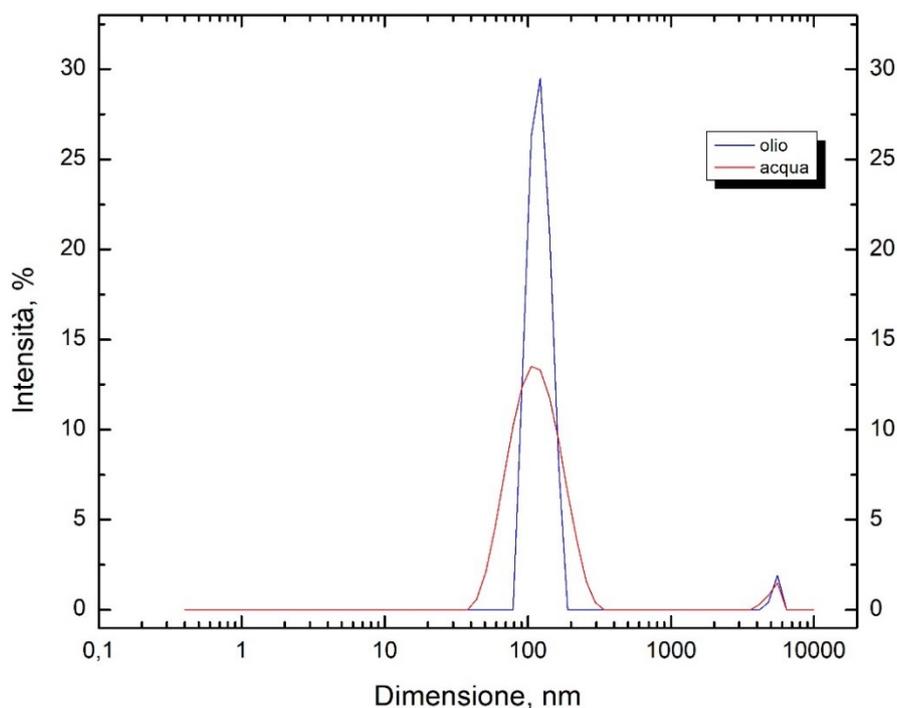


Figura 3.20 Distribuzione dimensionale degli idrogel dispersi in olio e in acqua.

Il diametro medio è dello stesso ordine di grandezza in entrambe le fasi disperdenti, si può dedurre quindi, che è possibile una ricostituzione delle nanoparticelle in acqua (dopo gli adeguati steps di cui si è discusso), evidente anche dalla sovrapposizione di un secondo picco di intensità delle due curve.

3.4.1.2 Scelta del mezzo di rilascio delle nanoparticelle

Si eseguono due prove di rilascio di caffeina da nanoparticelle in parallelo, una da olio e una da acqua, con volumi di PBS di 250 ml ed un volume di sospensione di nanoparticelle di 10 ml. Si effettuano i prelievi a diversi tempi e si analizzano allo spettrofotometro UV/Visibile, per entrambe le prove. Se per le nanoparticelle disperse in olio si osserva il picco di assorbanza della caffeina, per quelle in acqua risulta assente, anche dopo 5 giorni.

Il motivo del mancato rilascio è attribuito alla perdita del principio attivo già nella fase di dispersione degli idrogel in acqua, dovuta agli stress meccanici a cui sono sottoposti questi ultimi e al tempo impiegato per eseguire la prova. La caffeina infatti, essendo idrofila, in poco tempo tenderà ad abbandonare il carrier ed a disporsi in acqua.

Per i dati ottenuti, si sceglie di eseguire le prove di rilascio solo da olio.

3.4.2 Rilascio cumulativo di caffeina da nanoparticelle

Con la collaborazione della Dottoressa Fiora Artusio e del Dottor Daniele Massella, si eseguono tre prove di dialisi in parallelo.

Si sceglie di inserire nel sacchetto da dialisi tutta la produzione, in modo da conoscere la concentrazione iniziale di caffeina all'interno delle nanoparticelle, pari a 25 mg/ml in acqua, da cui ricavare la massa iniziale uguale a 17.1 mg. Il volume di PBS in ciascuna prova è di 1500 ml; si effettuano i prelievi da analizzare ad intervalli di 15 minuti per le prime due ore, ogni ora per 32 ore e ogni 2 h fino a 48 ore, altri con frequenza minore fino ad un tempo totale di 202 ore. Per mantenere il volume costante, ogni prelievo è rimpiazzato da uno stesso volume di buffer fosfato salino.

Tutti i prelievi sono analizzati, senza alcuna diluizione, allo spettrofotometro UV/Visibile, da cui si ricava la concentrazione tramite la legge di Lambert Bear. Si esegue il calcolo della massa cumulativa con la (3.4), per tenere conto della massa di caffeina sottratta con i prelievi precedenti.

$$M(t) = C_t V_{PBS} + V \sum_{i=0}^{t-1} C_i \quad (3.4)$$

dove $M(t)$ è la massa ad un tempo generico, C_t la concentrazione a tale tempo, V_{PBS} il volume del buffer fosfato salino (pari a 1500 ml), V il volume di ogni prelievo (pari a 5 ml) e C_i le concentrazioni ai precedenti tempi. La concentrazione calcolata in ogni tempo si ricava dalla media dei valori di assorbanza nelle tre prove.

In Figura 3.21 si riporta l'andamento della percentuale di caffeina rilasciata in funzione del tempo, data dalla massa cumulativa rispetto alla massa totale iniziale. Le barre di errore indicano l'errore percentuale calcolato come errore della massa cumulativa sulla massa totale. Dove l'errore della massa cumulativa deriva a sua volta, dal calcolo dell'errore sulla concentrazione, ottenuto dalla deviazione standard dei valori di assorbanza delle tre prove.

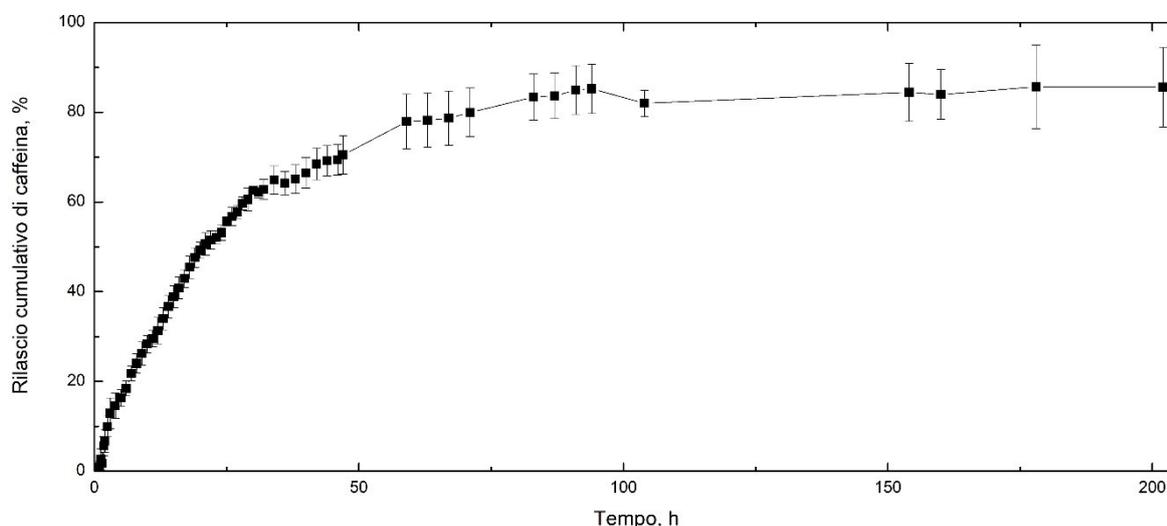


Figura 3.21 Curva del rilascio controllato di caffeina da nanoparticelle ottenute utilizzando i rapporti della formulazione E con Ultra Turrax a 14000 rpm per 10 min e 15 min di irraggiamento.

Il rilascio inizia dopo una fase di lag di circa un'ora, con una percentuale del principio attivo di circa 0.9 %. La velocità di crescita è maggiore nelle prime 24 ore con una media di circa il 2% di caffeina rilasciata ogni ora e circa l'1% nelle 24 ore successive. Dopo le prime 48 ore si può ritenere raggiunto il plateau, a 202 ore il quantitativo di caffeina rilasciato risulta essere di circa 86 %. Tale risultato è decisamente positivo, se si considera che parte del principio attivo è stato degradato dai raggi UV nella fase di polimerizzazione della miniemulsione inversa, influenzando sulla possibilità di un rilascio del 100%.

Un principio attivo solubile in acqua, incorporato in una matrice è principalmente rilasciato per diffusione, mentre per uno poco solubile in acqua il principale meccanismo di rilascio può essere quello dell'erosione della matrice stessa [44], per tale ragione il meccanismo si suppone essere quello diffusivo. La possibilità del mancato rilascio totale può essere anche attribuita al raggiungimento di un'uguale concentrazione di caffeina nel volume di PBS e nel sacchetto da dialisi, l'assenza del gradiente di concentrazione che rappresenta la forza spingente su cui si basa la diffusione, attraverso la legge di Fick (3.5), fa cessare tale fenomeno.

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (3.5)$$

dove J è il flusso di materia, C la concentrazione della specie che diffonde e D il coefficiente di diffusione.

Il rilascio avviene per l'ipotesi che le particelle si dispongono all'interfaccia della membrana, che diventa idrofila, in quanto precedentemente immersa nel buffer fosfato salino. Ciò consente alla caffeina, di abbandonare il carrier, attraversare la membrana e raggiungere il comparto accettore. Nell'ottica di un rilascio transdermico, la configurazione adottata nella presente tesi presenta un vantaggio aggiuntivo: l'olio lipofilo favorisce il passaggio attraverso lo strato corneo delle nanoparticelle, le quali rilasciano il principio attivo nello strato successivo, quello germinativo, grazie alla diffusione.

Per descrivere il rilascio è spesso utile l'utilizzo di modelli cinetici, in cui la quantità di principio attivo rilasciata è una funzione del tempo [44]. A tal proposito vi sono diverse espressioni analitiche per la linearizzazione della curva di rilascio cumulativo, in Tabella 3.10 sono riportate quelle impiegate, considerando solo la fase di crescita repentina, che si ha fino alle 32 ore, con il relativo R^2 , coefficiente di determinazione con cui è valutata la regressione lineare.

Tabella 3.10 Modelli matematici per descrivere la curva di rilascio.

Modello matematico	Equazione del modello	R²
Ordine zero	$F = k_0 t$	0.96
Primo ordine	$\ln(1-F) = -k_f t$	0.78
Higuchi	$F = k_H t^{1/2}$	0.99
Hixson-Crowell	$1-(1-F)^{1/3} = k_{1/3} t$	0.92
Baker-Lonsdale	$3/2[1-(1-F)^{2/3}] - F = k_{3/2} t$	0.89

In cui F è la frazione di principio rilasciato al tempo t ; k_0 , k_f , k_H , $k_{1/3}$, $k_{3/2}$ sono costanti del modello matematico.

La cinetica di ordine zero può essere utilizzata per descrivere il rilascio da sistemi come matrici per principio attivo con bassa solubilità e sistemi osmotici, in cui il rilascio è direttamente proporzionale al tempo. Il carrier rilascia sempre la stessa quantità di farmaco per unità di tempo

La cinetica del primo ordine descrive il profilo di rilascio da matrici porose, dove il principio attivo deve essere rilasciato ad una velocità proporzionale con quello rimanente all'interno del sistema di rilascio.

Il modello Higuchi è basato sulla legge di Fick, dove il rilascio avviene attraverso la diffusione del principio attivo dal carrier; il rilascio cumulativo, in questo caso, è proporzionale alla radice quadrata del tempo.

Hixon-Crowell è applicato quando si presume che la velocità di rilascio sia limitata dal tasso di dissoluzione delle particelle di principio attivo e non dalla diffusione che potrebbe verificarsi attraverso la matrice polimerica.

Il modello di Baker-Lonsdale descrive il rilascio controllato del farmaco da una matrice sferica, molto utilizzato per la linearizzazione dei dati di rilascio da diverse formulazioni di micro e nanoparticelle [45].

In Figura 3.22, Figura 3.23, Figura 3.24, Figura 3.25 e Figura 3.26 si riporta il fitting della curva con i modelli appena descritti.

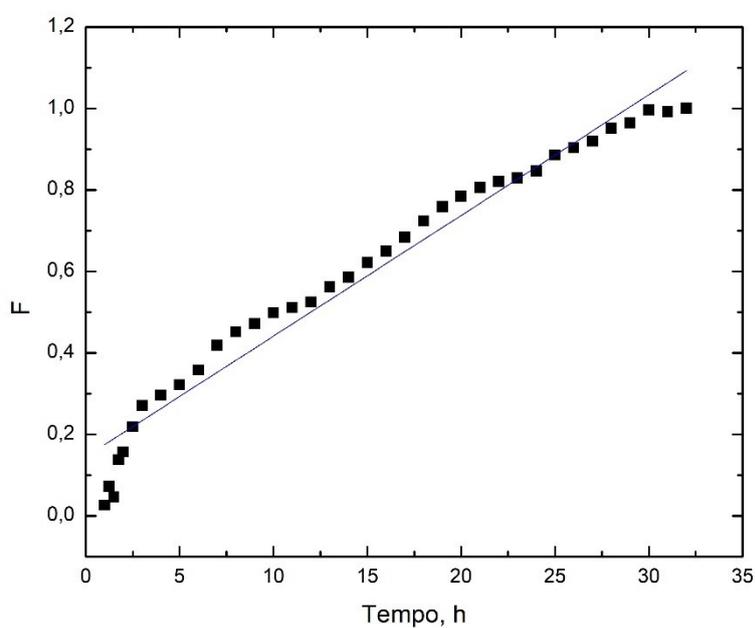


Figura 3.22 Regressione lineare del rilascio con la cinetica di ordine zero.

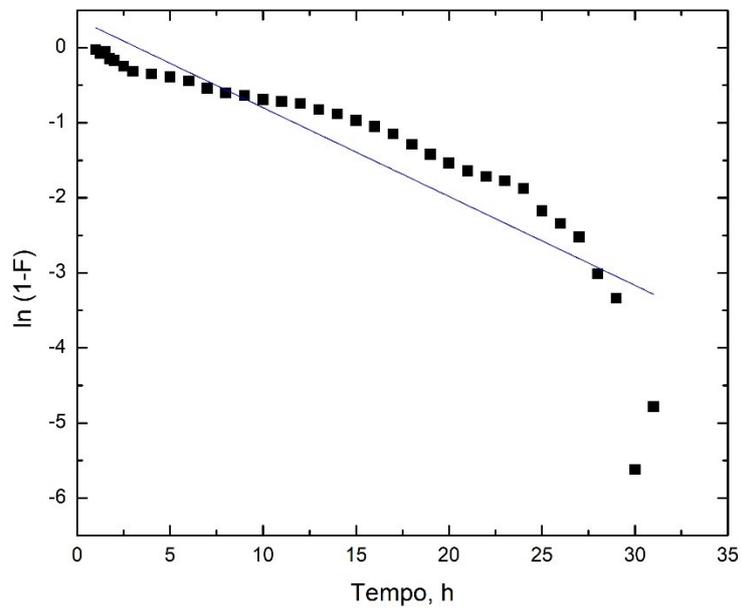


Figura 3.23 Regressione lineare del rilascio con la cinetica di primo ordine.

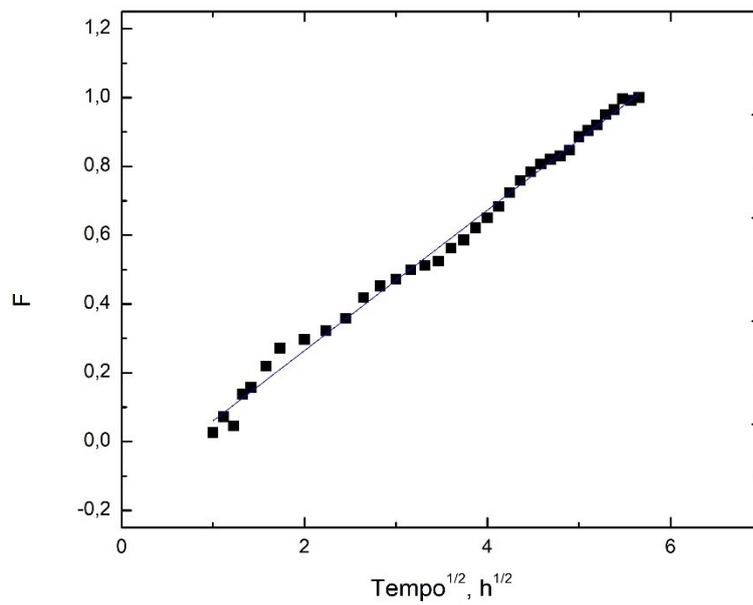


Figura 3.24 Regressione lineare del rilascio con il modello di Higuchi.

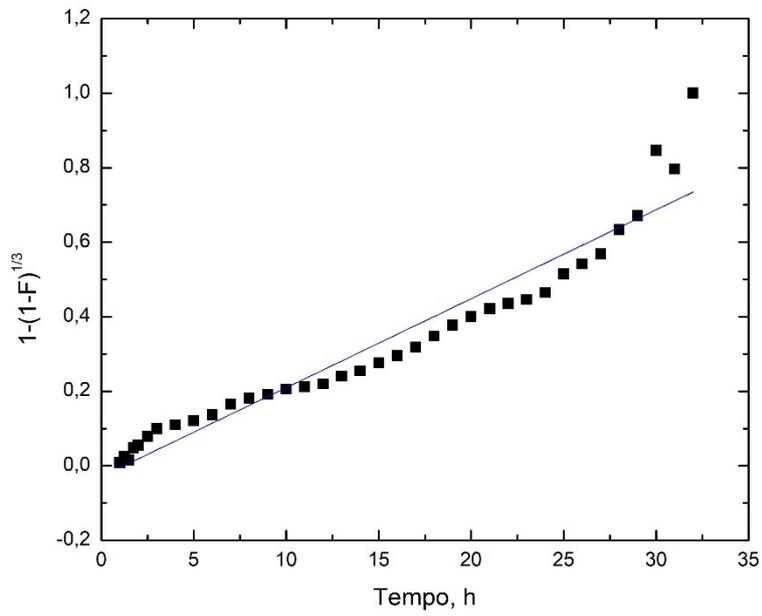


Figura 3.25 Regressione lineare del rilascio con il modello di Hixon-Crowell.

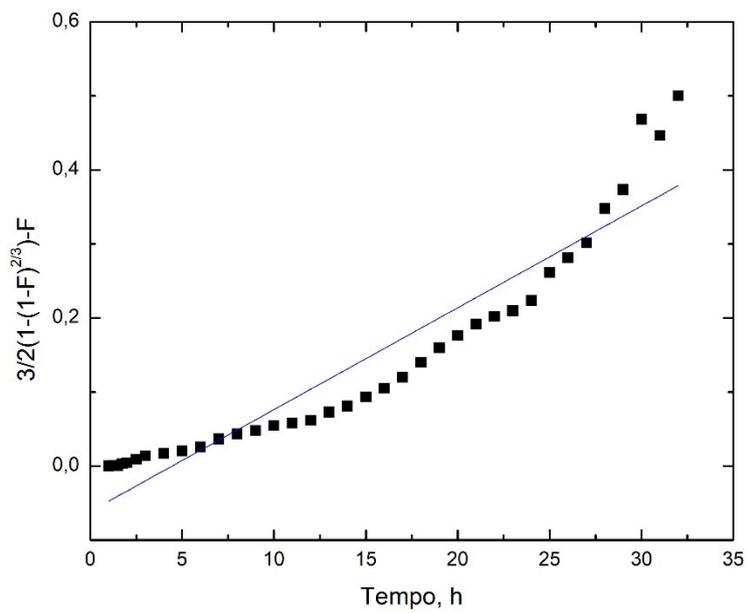


Figura 3.26 Regressione lineare del rilascio con il modello di Baker-Lonsdale.

Come mostrato nella Tabella 3.10, il modello di Higuchi, basato sulla diffusione, ha dato il valore più alto del coefficiente R^2 , indicando che questo modello matematico è il più adatto per descrivere il rilascio di caffeina da nanoparticelle di idrogel. Questi risultati suggeriscono che il rilascio è controllato dalla diffusione, come ipotizzato.

Un altro modello spesso utilizzato per il rilascio controllato è quello di Weibull, che è un modello empirico, senza alcun fondamento cinetico. Esprime la frazione di principio attivo accumulato m , al tempo t (3.6):

$$m = 1 - \exp [- t^b / a] \quad (3.6)$$

dove a è un parametro di scala e b di forma, quanto più questo valore si avvicina a 1 quanto più fitta bene una curva esponenziale.

È possibile arrangiare l'equazione (3.6) nella (3.7) per trovare i parametri a e b :

$$\log [- \ln (1 - m)] = b \log t - \log a \quad (3.7)$$

Si esegue la regressione lineare della curva che ha in ascissa $\log t$, in ordinata $\log (- \ln(1 - m))$, come si osserva dalla (3.7) [44]. Con il valore di m normalizzato con il massimo, si ottiene $a = 31.31$ e $b = 1.06$.

Dopo aver trovato i parametri a e b si esegue il fitting della curva fino a 202 h, mostrato in Figura 3.27; grazie al valore di b prossimo all'unità, il modello sembra approssimare bene la curva.

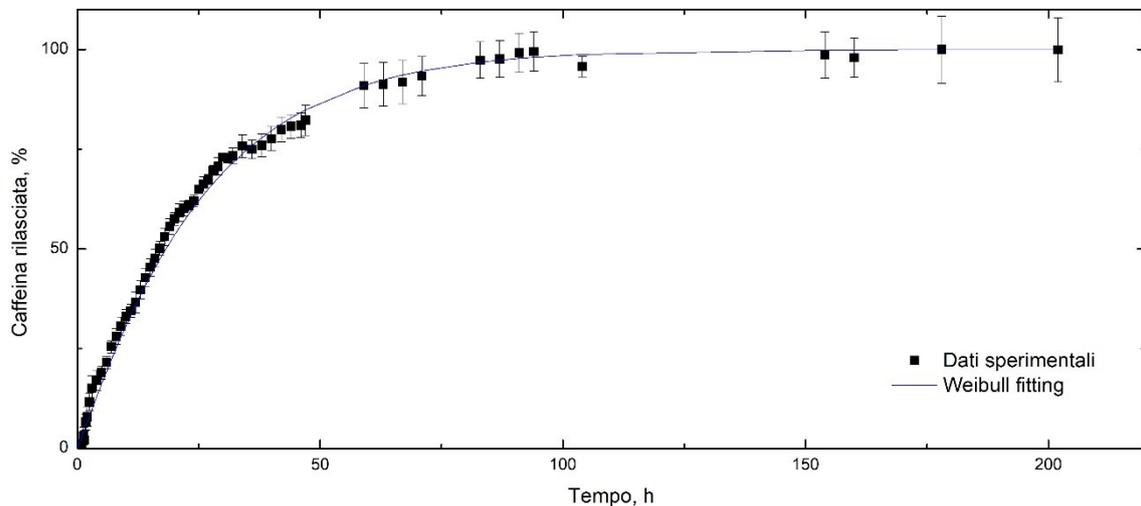


Figura 3.27 Fitting della curva di rilascio cumulativo normalizzata con il modello di Weibull.

3.4.3 Rilascio da miniemulsione e confronto con rilascio da nanoparticelle

Per dimostrare l'efficacia dell'uso delle nanoparticelle, si conduce la dialisi da una miniemulsione preparata nelle stesse condizioni operative adottate per la produzione delle nanoparticelle, ma senza monomero, dunque non si ha la creazione degli idrogel. Anche in questo caso si considerano tre produzioni che rilasciano in parallelo, si eseguono gli stessi calcoli compiuti per il rilascio cumulativo da nanoparticelle.

In questo caso il rilascio è molto rapido in quanto si ha una quantità accumulata di caffeina di circa 18 % nel volume di buffer fosfato salino già dopo 15 minuti, a differenza di quanto avviene nel caso delle nanoparticelle, in cui si ha rilascio dopo 1 ora e a valori minori.

La prova è interrotta a 52 ore, poiché dopo questo tempo si arresta la crescita della curva. Il quantitativo rilasciato è ~ 40.5 %. Questa bassa percentuale e l'andamento della curva attestano la non efficacia di questo sistema, mentre provano quella delle nanoparticelle, che svolgono il compito non solo di rilasciare in modo controllato la caffeina e di prolungare i tempi di rilascio, ma anche di proteggerla dalla degradazione dei raggi UV, che si ipotizza responsabile della bassa percentuale raggiunta. Di seguito è mostrata la curva (Figura 3.28).

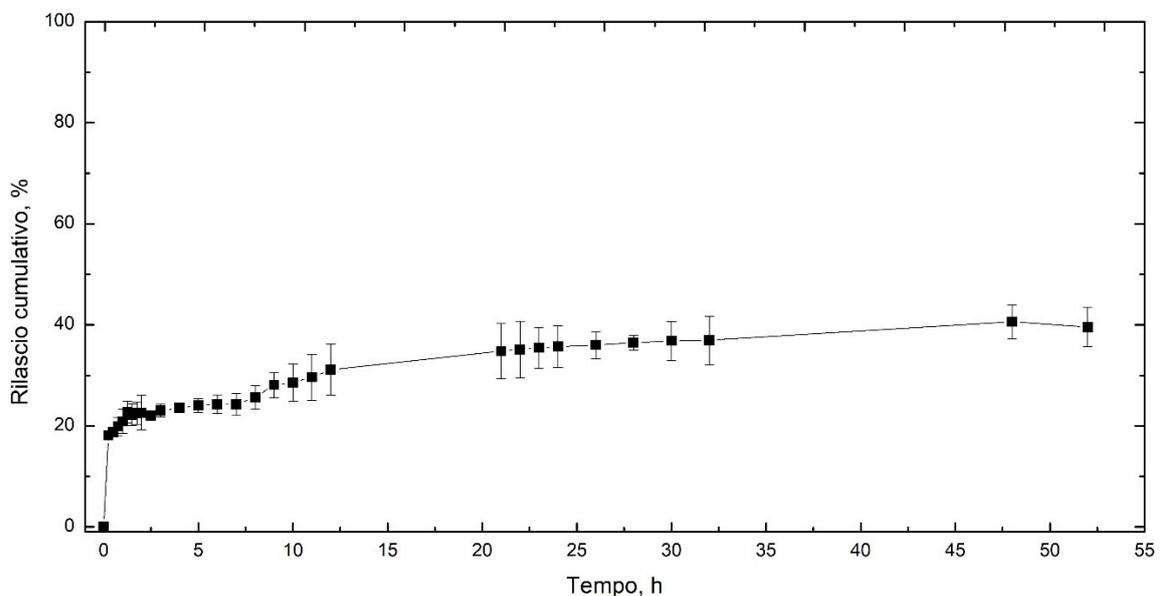


Figura 3.28 Curva del rilascio cumulativo di caffeina da miniemulsione.

In Figura 3.29 sono plottate le curve del rilascio cumulativo normalizzate sulla quantità totale di caffeina rilasciata. Mentre, in Figura 3.30 sono mostrate le quantità del principio attivo rilasciato in presenza e in assenza degli idrogel.

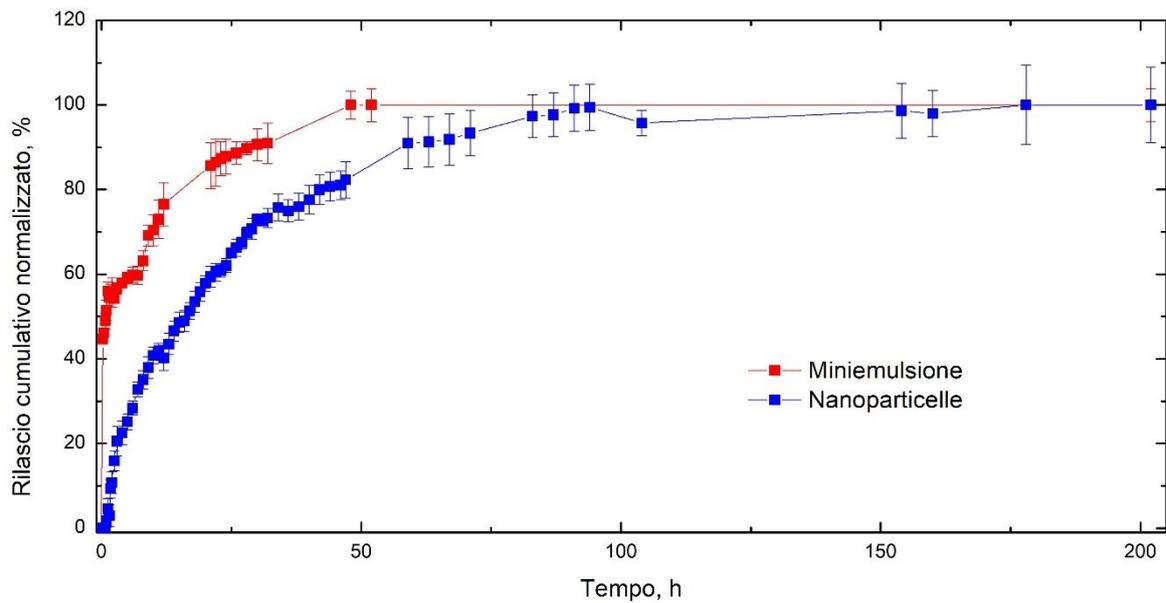


Figura 3.29 Confronto delle curve del rilascio cumulativo normalizzate per nanoparticelle ottenute utilizzando i rapporti della formulazione E con Ultra Turrax a 14000 rpm per 10 min e 15 min di irraggiamento e per la miniemulsione prodotta nelle stesse condizioni operative.

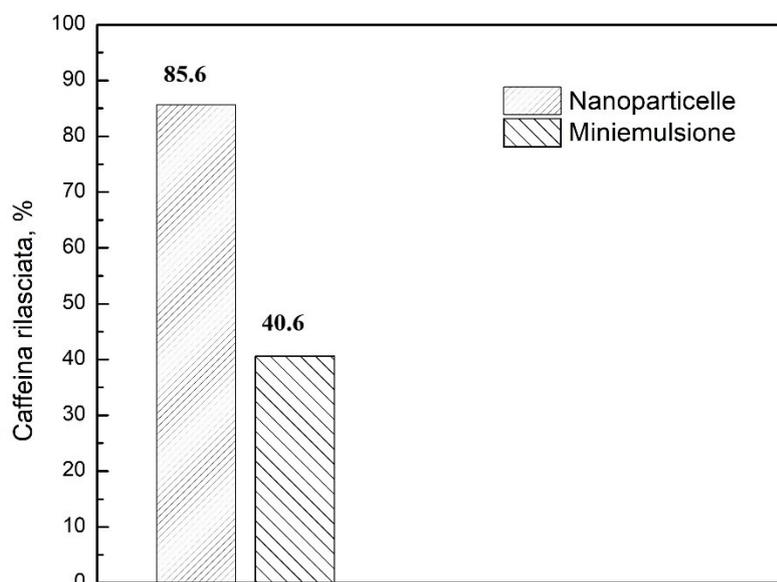


Figura 3.30 *Quantità di caffeina rilasciata da nanoparticelle prodotte utilizzando i rapporti della formulazione E con Ultra Turrax a 14000 rpm per 10 min e 15 min di irraggiamento e da miniemulsione prodotta nelle stesse condizioni operative.*

La caffeina, come precedentemente discusso, si degrada a causa delle radiazioni UV emesse dalla lampada a mercurio, tuttavia, l'esposizione prolungata alla luce naturale non comporta un'ulteriore perdita. Monitorando il valore di assorbanza di una soluzione di buffer fosfato salino in cui è aggiunta una quantità di caffeina equivalente alla massa iniziale della prova di rilascio da nanoparticelle, si è osservato che questa rimane costante nel tempo. Di conseguenza si è dimostrato che la concentrazione di caffeina nel comparto accettore, monitorata durante le prove di rilascio, non è stata alterata dall'esposizione alla luce.

4. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stata sviluppata la sintesi di nanoparticelle di idrogel di PEGDA contenenti caffeina e si è studiato il rilascio controllato del principio attivo attraverso membrana da dialisi. Il metodo di produzione applicato è la polimerizzazione in miniemulsione inversa, la cui fase continua è costituita da olio di semi di girasole e tensioattivo, mentre quella dispersa da acqua, fotoiniziatore, monomero e caffeina. Lo studio della formulazione è uno step rilevante per la sintesi delle nanoparticelle, soprattutto per quanto riguarda il tipo e il quantitativo di tensioattivo usato. Infatti, esso permette da un lato di limitare il fenomeno di coalescenza della miniemulsione e, dall'altro la formazione di aggregati solidi dopo la polimerizzazione. A tal fine l'utilizzo del tensioattivo non ionico Pluronic PE6100 allo 0.43 % in peso rispetto all'olio, si è dimostrato essere ottimale.

Sono state variate le condizioni di processo per ricercare la procedura migliore per ottenere nanoparticelle con caratteristiche desiderate e riproducibili. Particolare attenzione è stata dedicata alla scelta del metodo di dispersione, in particolare si è visto che lo strumento più opportuno da adottare è l'Ultra Turrax, i cui tempi e velocità di utilizzo risultano fondamentali per ottenere adeguate dimensioni delle nanoparticelle. Poiché la reazione di polimerizzazione è innescata da radiazioni UV, il tempo di esposizione ad esse risulta cruciale per la completa reticolazione del monomero, come dimostrato attraverso analisi DSC e FT-IR. È stato osservato che le condizioni ottimali sono un tempo di Ultra Turrax di 10 minuti a velocità di 14000 rpm e un tempo di irraggiamento di 15 minuti. Tali parametri operativi portano alla formazione di nanoparticelle di dimensioni dell'ordine dei 100 nm, determinate attraverso misure DLS.

Per quanto concerne il rilascio del principio attivo, è stato applicato il metodo della dialisi, che ha condotto ad un rilascio di caffeina dalle nanoparticelle disperse in olio di circa l'86% in 9 giorni, con cinetica rapida nelle prime 48 ore. La massa cumulativa di caffeina rilasciata è stata calcolata a partire dai valori di assorbanza misurati allo spettrofotometro UV/Visibile. La curva del rilascio cumulativo è stata fittata con diversi modelli matematici, trovando una buona approssimazione con il modello di Weibull e di Higuchi, quest'ultimo ha confermato l'ipotesi di meccanismo di rilascio per diffusione. L'efficienza di incapsulamento, valutata attraverso analisi FT-IR, è pari al 100%, grazie alla scelta di un'opportuna composizione chimica delle due fasi della miniemulsione. Il rilascio di caffeina all'86 %, insieme all'elevato loading all'interno delle nanoparticelle, rappresenta uno dei risultati più rilevanti del presente lavoro di tesi. Il rilascio non

completo è stato attribuito principalmente ad una parziale degradazione della caffeina durante la fase di irraggiamento.

Studi futuri sulla sintesi del nanocarrier potrebbero essere rivolti ad una valutazione più approfondita sul tipo di tensioattivo da adottare, per migliorare la stabilità della miniemulsione e per permettere di impiegare differenti quantitativi di PEGDA e dunque creare strutture più o meno dense. Inoltre, potrebbe essere interessante condurre una caratterizzazione morfologica degli idrogel tramite tecniche di microscopia elettronica.

Ulteriori prove potrebbero riguardare metodi alternativi più avanzati per il rilascio transdermico come le celle di Franz, che sono celle di diffusione statica con un comparto donatore e uno ricevente tra i quali è posta una membrana, con questo metodo si può avere un'idea più precisa del comportamento in vivo e delle cinetiche di rilascio. È possibile, inoltre, l'impiego della pelle di maiale, che simula molto bene la pelle umana.

Abbreviazioni

CMC	Critical micelle concentration
DEV STD	Deviazione standard
DLS	Dynamic light scattering
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSC	Differential scanning calorimetry
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
HBL	Hydrophilic lipophilic balance
IR	Infrared spectroscopy
MPS	Mononuclear phagocytic system
O/W	Oil in water
PBS	Phosphate buffered saline
PDI	Polydispersity index
PEG	Polyethylene glycol
PEGDA	Polyethylene glycol diacrylate
PGA	Polyglycolic acid
PLA	Polylactic acid
PLGA	Polylactic-co-glycolic acid

PPG	Polypropylene glycol
RES	Reticuloendothelial system
RESOLV	Rapid expansion of supercritical solution into liquid solvent
RESS	Rapid expansion of supercritical solution
SDS	Sodium dodecyl sulfate
US	Ultrasound
UV	Ultraviolet
W/O	Water in oil

Lista dei simboli

A	Costante per il controllo della diffusione
a	Parametro di scala
B	Costante per il controllo dell'erosione
b	Parametro di forma
C	Concentrazione
c	Attività
D	Coefficiente di diffusione
F	Frazione di principio attivo rilasciato
$[I]$	Concentrazione del fotoiniziatore
I_0	Intensità della luce incidente
J	Flusso di materia
k_f	Costante del modello di primo ordine
k_H	Costante del modello di Higuchi
k_0	Costante del modello di ordine zero
$k_{1/3}$	Costante del modello di Hixson-Crowell
$k_{3/2}$	Costante del modello di Baker-Lonsdale
l	Spessore del campione
M	Massa

m	Frazione di principio attivo accumulato
R	Costante universale dei gas
r_i	Velocità di iniziazione
T	Temperatura assoluta
t	Tempo
V_{PBS}	Volume del buffer fosfato salino
V	Volume prelievi
α	Costante di velocità
β	Costante di velocità
Γ	Eccesso di superficie
γ	Tensione interfacciale
ε	Coefficiente di assorbimento molare
Φ_i	Resa quantica di iniziazione
ϵ	Assorbanza

Bibliografia

- [1] Kumari A., Yadav S. K., Yadav S. C., 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **75**, 1, 1-18.
- [2] Nagavarma B. V. N., Hemant K. S. Yadav, Ayaz A., Vasudha L. S., Shivakumar H. G., 2012. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles – A review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, **5**, 3, 16-23.
- [3] Letchford K., Burt H., 2007. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticle structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **65**, 1, 259-269.
- [4] Mora-Huertas C. E., Fessi H., Elaissari A., 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Internatona Juornal of Pharmaceutics*, **385**, 1, 113-142.
- [5] Pillai O., Panchagnula R., 2001. Polymers in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, **5**, 1, 447-45.
- [6] Hamidi M., Azadi A., Rafiei P., 2008. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60**, 1, 1638-1649.
- [7] Bajpai A. K., Shukla S. K., Bhanu S., Kankane S., 2008. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science*, **33**, 1, 1088-1118.
- [8] Ahmed E. M., 2015. Hydrogel: preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, **6**, 1, 105-121.
- [9] Prasad Rao J., Geckeler K. E., 2011. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control. *Progress in Polymer Science*, **36**, 1, 887-913.
- [10] Soppimath K. S., Aminabhavi T. M., Kulkarni A. R., Rudzinski W. E., 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, **70**, 1, 1-20.
- [11] Fernandez P., André V., Rieger J., Kühnle A., 2004. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids and Surfaces A*, **251**, 1, 53-58.
- [12] Landfester K., 2001. Polyreactions in miniemulsions. *Macromoleculuar Rapid Communications*, **22**, 1, 896-936.

- [13] Lawrence M. J., Rees G. D., 2000. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **45**, 1, 89-121.
- [14] Landfester K., 2001. The generation of nanoparticles in miniemulsions. *Advanced Materials*, **13**, 10, 765-768.
- [15] Asua J. M., 2002. Miniemulsion polymerization. *Progress in Polymeric Science*, **27**, 1, 1283-1346.
- [16] Landfester K., 2009. Miniemulsion polymerization and structure of polymer and hybrid nanoparticles. *Angewandte Chemie*, **48**, 1, 4485-4507.
- [17] Constantinides P. P., Scalart J. P., 1997. Formulation and physical characterization of water-in-oil microemulsions containing long- versus medium-chain glycerides. *International Journal of Pharmaceutics*, **158**, 1, 57-68.
- [18] Capek I., 2010. On inverse miniemulsion polymerization of conventional water-soluble monomers. *Advances in Colloid and Interface Science*, **156**, 1, 35-61.
- [19] Yagci Y., Jockusch S., Turro N. J., 2010. Photoinitiated polymerization: advances, challenges, and opportunities. *Macromolecules*, **43**, 15, 6245-6260.
- [20] Decker C., 1996. Photoinitiated crosslinked polymerization. *Progress Polymer Science*, **21**, 1, 593-650.
- [21] Decker. C., 1998. The use of UV irradiation in polymerization. *Polymer International*, **45**, 2, 133-141.
- [22] Fairbanks B. D., Schwartz M. P., Bowman C. N., Anseth K. S., 2009. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility. *Biomaterials*, **30**, 1, 6702-6707.
- [23] Alexander A., Dwivedi S., Ajazuddin, Giri T. K., Saraf S., Saraf S., Tripathi D. K., 2012. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **164**, 1, 26-40.
- [24] Godin B., Touitou E., 2007. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **59**, 1, 1152-1161.
- [25] Naik A., Kalia Y. N., Guy R. H., 2000. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Research Focus*, **3**, 9, 318-326.

- [26] Owens III D. E., Peppas N. A., 2006. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, **307**, 1, 93-102.
- [27] Luo L., Lane M. E., 2015. Topical and transdermal delivery of caffeine. *International Journal of Pharmaceutics*, **490**, 1, 155-164.
- [28] Puglia C., Offerta A., Tirendi G. G., Tarico M. S., Curreri S., Bonina F., Perrotta R. E., 2016. Design of solid lipid nanoparticles for caffeine topical administration. *Drug Delivery*, **23**, 1, 36-40.
- [29] Bolzinger M.-A., Briançon S., Pelletier J., Fessi H., Chevalier Y., 2008. Percutaneous release of caffeine from microemulsion, emulsion and gel dosage forms. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **68**, 1, 446-451.
- [30] Yalkowsky S.H., He Y., Jain P., 2010. Handbook of Aqueous Solubility Data. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA 506.
- [31] Al-Maaieh A., Flanagan D. R., 2002. Salt effect on caffeine solubility, distribution and self-association. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **91**, 4, 1000-1008.
- [32] Malvern - Dynamic Light Scattering Training Achieving reliable nano particle sizing. Consultato il 30 gennaio 2018.
<http://149.171.168.221/partcat/wp-content/uploads/Malvern-Zetasizer-LS.pdf>.
- [33] Höhne G. W. H., Hemminger W. F., Flammersheim H.-J., 2003. Differential Scanning Calorimetry. Springer, Berlin, Germany, 1-2.
- [34] Massella D., Ferri A., Barresi A., 2017. Production of PCL nanoparticles by flash nanoprecipitation for controlled release of caffeine. *Merck Young Chemists Symposium (MYCS 2017)*, (F. Bella, L. Botta, A. Buchicchio, R. Cuccinello, A. D'Urso, A. D'Erba, P. Franco, E. Lenci, G. Mazzone, A. Soldà, S. Staderini, L. Triggiani and D. Spinelli), Milano Marittima, 13-15 Novembre 2017, p. 80.
- [35] Cikalleshi K., 2017. Produzione di nanoparticelle polimeriche per il rilascio controllato di caffeina. Tesi di laurea magistrale, Politecnico di Torino.
- [36] Landfester K., 2003. Miniemulsions for nanoparticle synthesis. *Topics in Current Chemistry*, **227**, 1, 75-123.
- [37] Hecht L. L., Wagner C., Landfester K., Schuchmann H. P., 2011. Surfactant concentration regime in miniemulsion polymerization for the formation of MMA nanodroplets by high-pressure homogenization. *Langumir*, **27**, 1, 2279-2285.

- [38] Canselier J. P., Delmas H., Wilhelm A. M., Abismaïl B., 2002. Ultrasound emulsification. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **23**, 1, 333-349.
- [39] Chemat F., Grondin I., Costes P., Moutoussamy L., Shum Cheong Sing A., Smadja J., 2004. High power ultrasound effects on lipid oxidation of refined sunflower oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, **11**, 1, 281-285.
- [40] Shakeel F., Ramadan W., 2010. Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **75**, 1, 356-362.
- [41] Sun C. C., Hou H., 2008. Improving mechanical properties of caffeine and methyl gallate crystals by cocrystallization. *Crystal Growth & Design*, **8**, 5, 1575-1579.
- [42] Koo S. W., Hirakawa S., Fujii S., Kawasumi M., Nghiem P., 2007. Protection from photodamage by topical application of caffeine after ultraviolet irradiation. *British Journal of Dermatology*, **156**, 5, 957-964.
- [43] Dobrină S., Soceanu A., Popescu V., Stanciu G., Smalberger S., 2013. Optimization of a UV-Vis spectrometric method for caffeine analysis in tea, coffee and other beverages. *Scientific Study & Research*, **14**, 2, 71-78.
- [44] Costa P., Lobo J. M. S., 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **13**, 1, 123-133.
- [45] Rodrigues M. R., Lanzarini C. M., and Ricci-Junior E., 2011. Preparation, in vitro characterization and in vivo release of naproxen loaded in poly-caprolactone nanoparticles. *Pharmaceutical Development and Technology*, **16**, 1, 12-21.

Ringraziamenti

Ringrazio il mio relatore, il prof. Roberto Pisano, per la professionalità e disponibilità dimostrata nel seguire il presente progetto di tesi.

Ringrazio i dottorandi, Marco, per avermi introdotto nel lavoro sperimentale, Daniele, per aver messo a disposizione le sue conoscenze e per il suo aiuto nello svolgimento delle prove di rilascio. Un grazie particolare va a Fiora, per la precisione e l'attenzione con cui mi ha seguita in questi mesi e per i suoi utili consigli.

Questo lavoro di tesi è sola la conclusione di anni di studio, fatti di rinunce e sacrifici, in cui tra delusioni e soddisfazioni, ho trovato sempre il sostegno delle persone che amo. Dedico tutto questo ai miei genitori, perché i miei sforzi sono anche i loro, per avermi permesso di intraprendere questo percorso e aver creduto in me e in quello che ho fatto. Grazie alle mie sorelle, lontane ma sempre vicine. A tutta la mia famiglia, a chi in questi anni mi è stato accanto, anche solo con il pensiero.

Agli amici di sempre e a quelli nuovi. Alle mie coinquiline, colleghe, ma soprattutto amiche, con cui abbiamo condiviso ogni momento. E a Jessica, grazie per esserci stata sempre e nonostante tutto.

Grazie a chi tra le stelle mi guarda ed è felice per i miei traguardi.

Ho imparato che solo credendo fortemente in quello che si fa, si possono raggiungere dei buoni risultati. Esistono compiti difficili ma non impossibili, se si affronta ogni cosa con forza di volontà, impegno e passione. Che puntare in alto richiede coraggio, ma ci vuole più coraggio ad accettare di non raggiungere la perfezione. Un grazie lo devo anche a me stessa, perché senza la determinazione non sarei arrivata a realizzare il mio obiettivo.

