UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Corso di Laurea Triennale in Ingegneria Biomedica

"Nanovettori per il trasporto di proteine. Incapsulamento dell'insulina in cubosomi"

"Nanocarriers for protein transport. Insulin encapsulation in cubosomes"

Relatore:

Prof. Pisani Michela

Correlatori:

Dr.ssa Astolfi Paola

Dr.ssa Logrippo Serena

Candidata:

Iafelice Delia

Matricola:

1074350

Anno Accademico 2018/2019

INDICE

INTRODUZIONE **1**

1. NANOVETTORI A MATRICE LIPIDICA **3**

1.1 CRISTALLI LIQUIDI LIOTROPICI 3

1.2 LA MONOLEINA E IL SUO POLIMORFISMO 5

2. L'INSULINA..... **11**

2.1 LA STRUTTURA DELL'INSULINA..... 11

2.2 L'INSTABILITA DELL'INSULINA E LA FIBRILLAZIONE 16

3. METODI DI PREPARAZIONE DELLE NANODISPERSIONI **18**

4. TECNICHE ANALITICHE PER LA CARATTERIZZAZIONE DEI CAMPIONI E DETERMINAZIONE DELL'EFFICIENZA DI INCAPSULAMENTO (EE%) **20**

4.1 DYNAMIC LIGHT SCATTERING (DLS) 20

4.2 SPETTROSCOPIA UV 24

4.3 EFFICIENZA DI INCASPULAMENTO 27

5. RISULTATI E DISCUSSIONE **30**

6. CONCLUSIONI **37**

BIBLIOGRAFIA..... **38**

INTRODUZIONE

I nanovettori sono sistemi nanoparticellari utilizzati come sistemi di "drug delivery" grazie alle loro caratteristiche di direzionare in maniera selettiva i composti farmaceutici all'interno del corpo. Di grande interesse sono i nanovettori di natura lipidica che possono inglobare e trasportare una vasta gamma di farmaci solubili e non solubili in acqua, sono biodegradabili e hanno una viscosità tale da garantire un lento ma sostenuto rilascio di farmaci. [1]

La matrice lipidica presa in esame, in questa tesi, per la preparazione di nanoparticelle da utilizzare per il trasporto di proteine è costituita da monoleina (GMO), utilizzata già a partire dagli anni 80 per la realizzazione di sistemi per il "drug delivery". [2] La monoleina è una molecola di natura anfilica, costituita cioè da una parte idrofila e da una idrofobica, che se disciolta in acqua in opportune condizioni porta alla formazione di strutture liquido-cristalline caratterizzate da mesofasi diverse. Le fasi assunte dalla GMO al variare della temperatura e della composizione acquosa sono solitamente riassunte in opportuni diagrammi di fase, descritti nel Capitolo 1, nei quali è ben chiaro il polimorfismo di tale molecola.

La proteina incapsulata all'interno dei nanovettori è l'insulina, ormone proteico naturalmente prodotto da cellule presenti nel pancreas la cui funzione principale è quella di regolare il livello di glucosio nel sangue; in caso di patologie, come il diabete, è necessario una somministrazione esterna di insulina in quanto la produzione di tale ormone è nulla o insufficiente. Il metodo di somministrazione più comune è quello sottocutaneo in cui però l'insulina segue un percorso diverso da quello dell'insulina secreta dal pancreas e, inoltre, questo tipo di somministrazione spesso provoca stress e ansia nei

pazienti. Nasce così la necessità di trovare metodi alternativi, come ad esempio l'assunzione orale, per la terapia insulinica e le nanodispersioni lipidiche potrebbero essere una valida soluzione.

Per la preparazione dei sistemi nanoparticellari contenenti insulina sono stati utilizzati due metodi diversi, il metodo Top-Down e quello Bottom-Up, che non sempre danno nanoparticelle con le stesse dimensioni e stabilità. Le caratteristiche di tali sistemi, dimensione ed efficienza di incapsulamento, sono state determinate utilizzando rispettivamente il Dynamic Light Scattering e la Spettrofotometria Ultravioletta.

Lo scopo di questa tesi è stato dunque quello di determinare l'efficienza di incapsulamento di una proteina modello al fine di individuare il miglior metodo di realizzazione dei sistemi nanoparticellari.

1. NANOVETTORI A MATRICE LIPIDICA

I nanovettori analizzati in questa tesi sono di natura lipidica; i lipidi sono delle particolari molecole che in ambiente acquoso si auto-assemblano formando strutture liquido cristalline (mesofasi) che variano a seconda della concentrazione di acqua e della temperatura. Questi sistemi prendono il nome di cristalli liquidi liotropici.

1.1 CRISTALLI LIQUIDI LIOTROPICI

I cristalli liquidi sono una classe di composti organici in grado di organizzarsi in diverse mesofasi, che presentano proprietà intermedie tra quelle di un solido cristallino (ordine orientazionale e anisotropia delle proprietà macroscopiche) e quelle di un liquido isotropo (disordine posizionale e fluidità).

I cristalli liquidi possono essere: [6]

- **Liotropici** che danno mesofasi diverse al variare della concentrazione e della temperatura;
- **Termotropici** che danno transizioni di fase solamente al variare della temperatura.

Poiché i nanovettori di natura lipidica sono di grande interesse nell'ambito della ricerca sui sistemi di trasporto di farmaci e proteine ("Drug Delivery System") e quindi anche per la seguente tesi, di seguito verranno brevemente descritte le loro proprietà strutturali e i fattori che le determinano.

I lipidi sono particolari molecole di natura anfilica formati da una testa polare idrofila e da una coda non polare idrofoba; la coda a sua volta è costituita da

una o due catene di idrocarburi alifatici, eventualmente connesse da un linker alla testa polare (Figura 1).

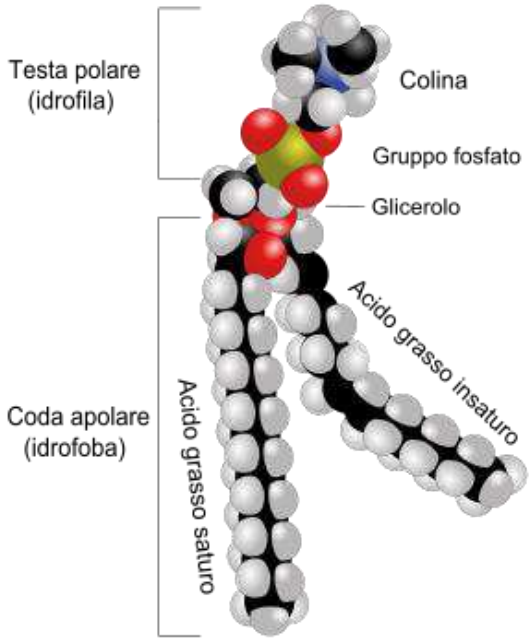

Figura 1 Struttura di un lipide anfilico

Tali molecole organiche se disciolte in ambiente acquoso sono in grado di auto-assemblarsi in mesofasi liquido cristalline di natura liotropica, termodinamicamente stabili e ben definite; il processo di auto-assemblamento è guidato dall'effetto idrofobico che si genera quando i lipidi sono disciolti in acqua, dovuto alla doppia natura polare e non polare della molecola. Le teste polari idrofile sono sempre a contatto con l'acqua mentre le catene idrocarburiche idrofobe sono schermate da essa e ciò porta alla formazione di diverse strutture, le più comuni sono quella lamellare, cubica ed esagonale.

Il lipide utilizzato in questo lavoro di tesi per la preparazione di nanoparticelle e in particolare di cubosomi, è la monoleina.

1.2 LA MONOLEINA E IL SUO POLIMORFISMO

La monoleina è una delle molecole maggiormente utilizzate per la preparazione di nanoparticelle di natura lipidica utilizzate per il trasporto di molecole bioattive.

La monoleina, denominata anche "glicerol monoleate" ("GMO"), è ottenuta tramite un processo di esterificazione dell'acido oleico con glicerolo; la coda è legata alla testa, formata dal glicerolo, tramite un legame estere. [2]

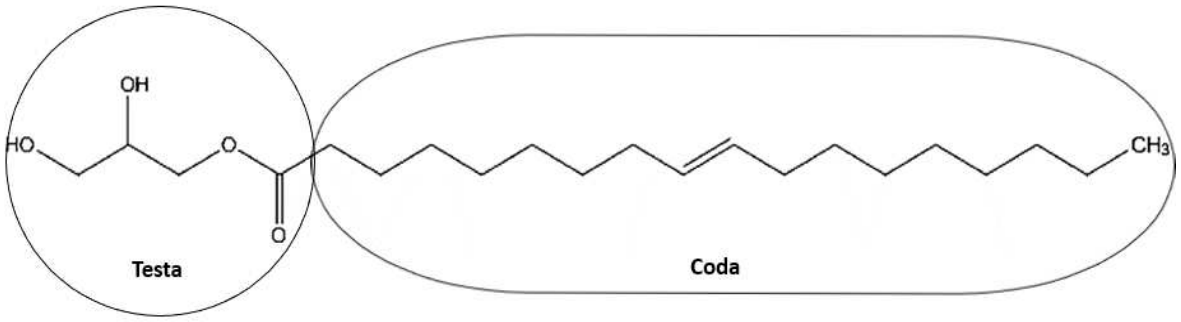

Figura 2 Struttura chimica della monoleina

Il glicerolo è una molecola a tre atomi di carbonio ciascuno avente un gruppo ossidrilico -OH; nell'esterificazione uno di questi gruppi viene utilizzato per formare il legame estere con l'acido oleico mentre i due gruppi ossidrili attivi che rimangono conferiscono carattere polare alla testa della monoleina. La coda, invece, è formata da una catena idrocarburica insatura a 18 atomi di carbonio con il doppio legame in posizione 9 e questa conferisce caratteristiche idrofobiche alla molecola (Figura 2).

La monoleina è una sostanza non tossica, biodegradabile e biocompatibile e per questo molto interessante per possibili utilizzi in campo biologico e medico.

La monoleina in soluzione acquosa può dare origine a fasi diverse caratterizzate da una periodicità mono-, bi- o tri-dimensionale. Mediante l'uso della Diffrazione ai Raggi X tali fasi sono state identificate e corrispondono, come mostrato nel diagramma di fase in Figura 3, a fasi lamellari L (con il pedice α per conformazioni liquide o c per conformazioni cristalline), cubiche Q ed esagonali H. Nello specifico, si tratta di fasi cubiche ed esagonali di tipo II o inverse (acqua in olio) distinte da quelle di tipo I o dirette (olio in acqua)

I diagrammi di fase (Figura 3) permettono di stabilire, all'equilibrio termodinamico del sistema, le fasi presenti in funzione della temperatura e della concentrazione acquosa.

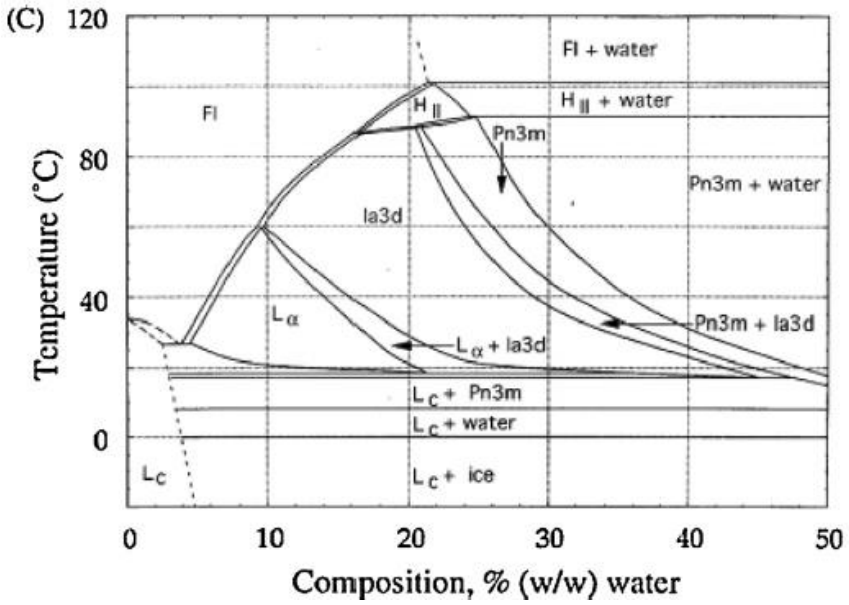

Figura 3 Diagramma di fase della monoleina, in funzione della temperatura e della % di acqua

Partendo dal diagramma di fase della monoleina (Figura 3) [7], si prenderanno in considerazione le differenti fasi assunte da essa alla temperatura di 25 °C in funzione della concentrazione acquosa in cui è disciolta.

FASE LAMELLARE

A concentrazioni acquose minori dell'8 %, alla temperatura di 25 °C, la monoleina forma una fase lamellare di tipo L_c per transitare ad una fase lamellare L_α a concentrazioni acquose fino a circa il 20 % (Figura 4).

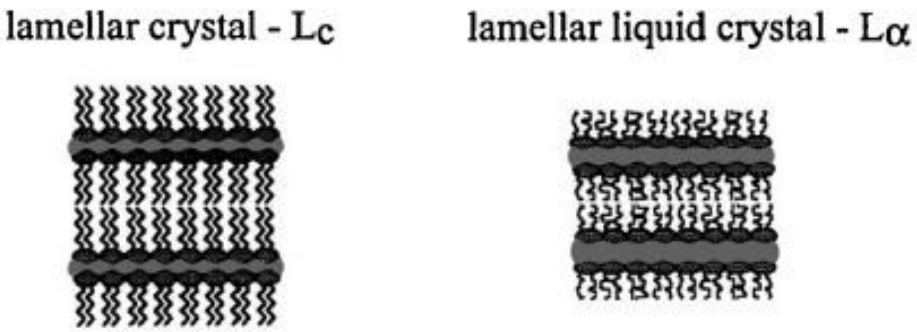

Figura 4 Fasi della monoleina: Fase Lamellare Cristallina (L_c), Lamellare Liquido Cristallina (L_α)

La fase lamellare è caratterizzata da doppi strati lipidici planari, sovrapposti l'uno all'altro e separati da strati acquosi. In questo modo la porzione polare (idrofila) è a contatto con l'acqua mentre le catene idrocarburiche (parte idrofoba) è rivolta all'interno. Tali strutture presentano una periodicità monodimensionale lungo la perpendicolare ai doppi strati.

FASE CUBICA

Aumentando la concentrazione di acqua (~ 20 – 30%) la monoleina passa da una fase lamellare a una cubica Ia3d e, per concentrazioni di acqua maggiori del 30%, ad una cubica Pn3m.

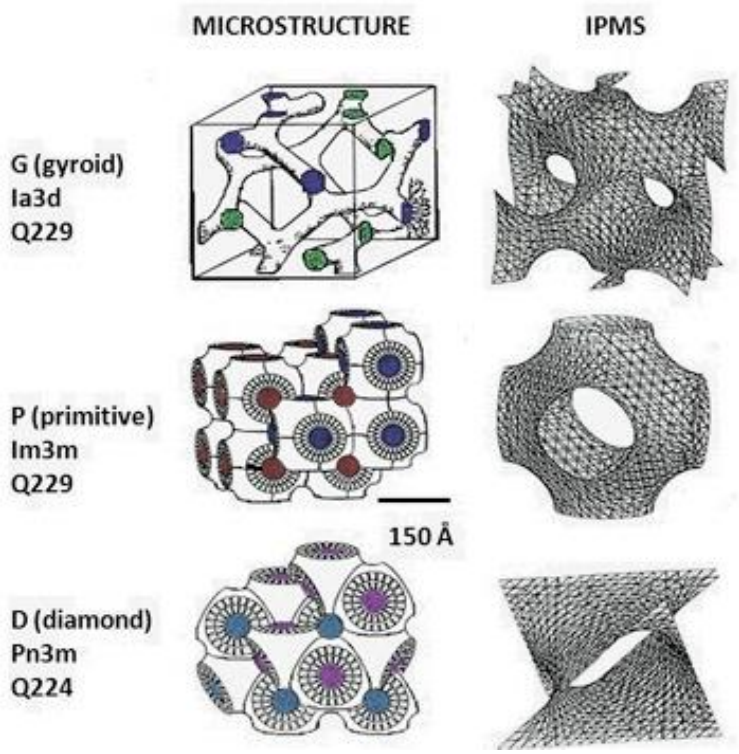

Figura 5 Fasi della monoleina: Cubica (Q)

Le fasi cubiche inverse sono formate da un doppio strato lipidico, con periodicità tridimensionale, che separa due network di canali acquosi continui interconnessi ma non collegati. La presenza di domini idrofobici e acquosi conferisce a tali fasi la possibilità di incapsulare molecole di diversa natura, accomodandole o nei canali d'acqua o negli strati lipidici.

In generale sono possibili tre tipi diversi di strutture cubiche inverse caratterizzata da una diversa disposizione dei canali acquosi riportate in Figura 5: la fase cubica **Ia3d (G-Gyroid)** che consiste di due network acquosi interconnessi a tre a tre ma non collegati, la fase cubica **Im3m (P-Primitive)** che ha networks ortogonali di canali acquosi connessi a sei a sei e quella **Pn3m (D-Diamond)** che consiste di due canali acquosi a simmetria tetraedrica disposti in un reticolo a doppio diamante. [3]

FASE ESAGONALE

Anche se solitamente non osservata alla temperatura di 25 °C considerata in questa tesi, la fase esagonale inversa H_{II} è un'altra delle mesofasi tipiche della monoleina che si ottiene per concentrazioni di acqua maggiori del 20% e ad una temperatura superiore ad 84°C (Figura 6).

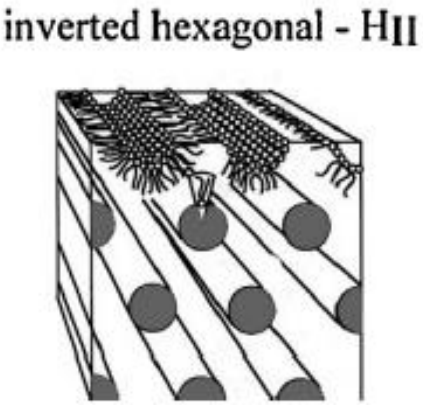

Figura 6 Fasi della monoleina: Esagonale Inversa (H_{II})

Nella fase esagonale inversa, la fase acquosa è sostituita da cilindri indefinitamente lunghi disposti ai vertici di un reticolo esagonale immersi in una matrice costituita dalle catene alifatiche della monoleina.

Quando la monoleina viene lasciata ad idratare con un'opportuna quantità di acqua, si forma un gel avente quindi una struttura o cubica o esagonale o lamellare ma che, però, risulta essere di difficile utilizzo come vettore a causa delle aggregazioni nanoparticellari. Al fine di evitare ciò le nanodispersioni vengono realizzate aggiungendo alla monoleina un polimero. L'aggiunta del polimero potrebbe in alcuni casi modificare la fase che si forma: è questo il caso della monoleina che passa da una fase cubica Pn3m ad una cubica Im3m; ciò però permette di ottenere una dispersione più stabile e di più facile utilizzo per applicazioni farmaceutiche.

Le nanoparticelle disperse a struttura cubica prendono il nome di "Cubosomi".

2. L'INSULINA

In questo capitolo viene riportata una descrizione della struttura e delle proprietà dell'insulina, la proteina utilizzata in questo lavoro di tesi per la valutazione dell'efficienza di incapsulamento dei sistemi di nanoparticelle preparati con due metodiche operative differenti.

2.1 LA STRUTTURA DELL'INSULINA

L'insulina è un ormone proteico prodotto dalle cellule beta delle "isole di Langerhans" che sono agglomerati di cellule sferiche concentriche, altamente vascolarizzate, situate nel pancreas. [9]

Essendo una proteina, l'insulina può essere descritta considerando le quattro diverse strutture che la caratterizzano:

- **Struttura Primaria**
- **Struttura Secondaria**
- **Struttura Terziaria**
- **Struttura Quaternaria**

STRUTTURA PRIMARIA

La struttura primaria rappresenta il primo livello organizzativo strutturale delle proteine ed indica l'ordine con cui gli amminoacidi sono legati tra loro tramite legami peptidici. [10]

L’insulina umana contiene 51 residui amminoacidi, suddivisi in due catene polipeptidiche, catena A e catena B, legate tra loro da due ponti disolfuri (Figura 7). [5]

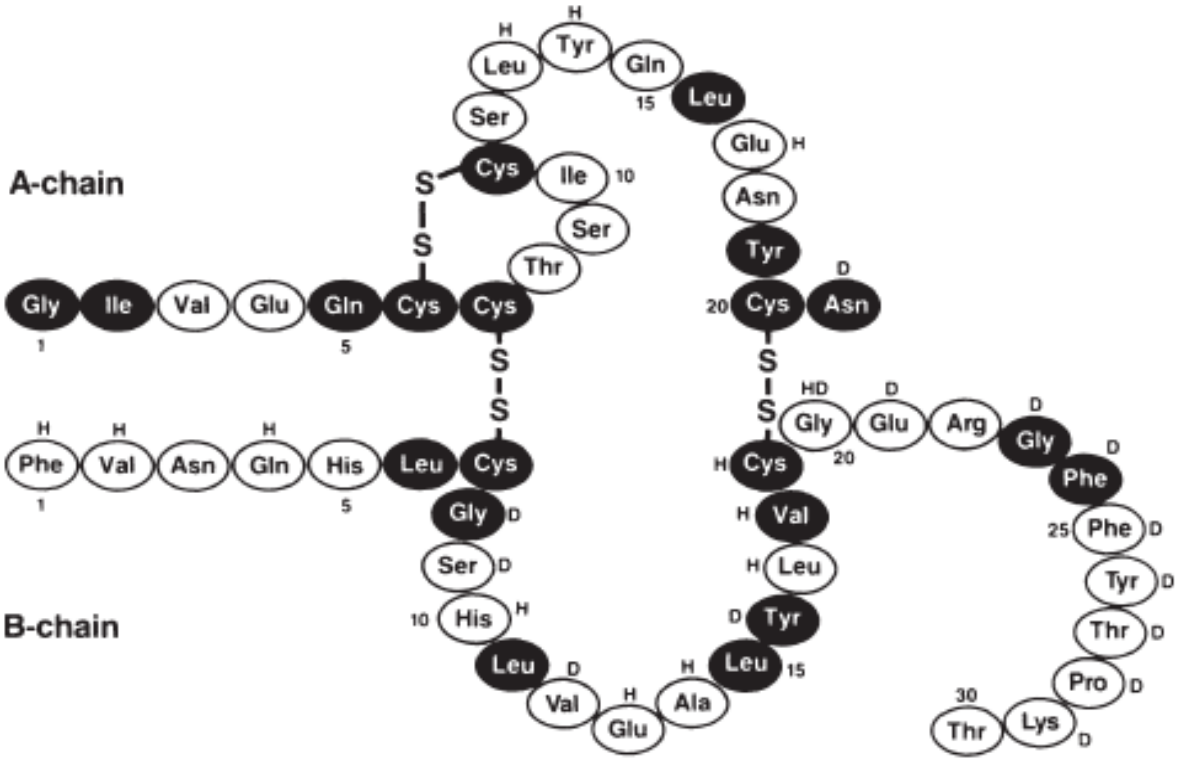

Figura 7 Struttura primaria dell'insulina umana; in nero i 10 amminoacidi in comune tra insuline appartenenti ad animali di diversa specie

La catena A è formata da 21 aminoacidi e presenta un ponte disolfuro addizionale tra A6 e A11 (Figura 7); la catena B è invece più lunga, formata da un totale di 30 residui amminoacidi. Proteine dello stesso tipo ma provenienti da organismi diversi possono avere struttura primaria differente; tramite il confronto dell’insulina umana con quella proveniente da specie animali differenti, si è notata la presenza di dieci residui amminoacidi comuni tra loro (Figura 7). [5]

STRUTTURA SECONDARIA

La struttura secondaria rappresenta la disposizione nello spazio degli atomi dello scheletro della proteina e può essere di tre tipi: α-elica, foglietto β-ripiegato, ripiegamento-β.

Nel caso dell'insulina, la catena A presenta due sezioni ad α-elica, vicine e antiparallele, dalla posizione A2 alla A8 e dalla A13 alla A20; la catena B presenta una singola sezione di tipo α-elica di dimensione maggiore, dalla B9 alla B19, seguita da un ripiegamento-β, da B21 a B30.

STRUTTURA TERZIARIA

La struttura terziaria rappresenta l'organizzazione tridimensionale che la proteina assume nello spazio determinata dalle interazioni chimiche tra i gruppi R degli amminoacidi (ponti disolfuro, interazioni elettrostatiche, legami ad idrogeno, forze di Van der Waals).

Nell'insulina la struttura terziaria è stabilizzata da ponti disolfuri, la cui posizione è stata già precedentemente commentata; la parte interna della molecola è principalmente apolare, mentre quella esterna è polare. [11]

STRUTTURA QUATERNARIA

La struttura quaternaria è rappresentata dall'organizzazione delle subunità della proteina e dal loro assemblamento; le subunità sono catene polipeptidiche, uguali o diverse tra loro, che costituiscono la proteina.

Dal punto di vista della struttura quaternaria, l'insulina, in soluzione, può esistere in diverse forme, da monomero ad esamero. In particolare, a basse concentrazioni (< 10 μM) si trova come monomero (questa è la forma farmacologicamente attiva), per concentrazioni comprese tra 10 μM e 2 mM come dimero mentre per concentrazioni superiori come esamero. La forma esamerica è anche quella favorita per concentrazioni maggiori di 0.01 mM, a valori di pH compresi tra 4 e 8 e in presenza di zinco. Quest'ultima, che prende il nome "zinco-insulina", rappresenta la forma più facilmente assunta dall'insulina ed è quella comunemente utilizzata nella terapia insulinica per il diabete.

Nel dimero le due molecole di insulina sono tenute insieme da forze non polari e da quattro ponti ad idrogeno. Ovviamente la forma esamerica, poiché costituita da tre dimeri, avrà una grandezza maggiore rispetto alle altre forme.

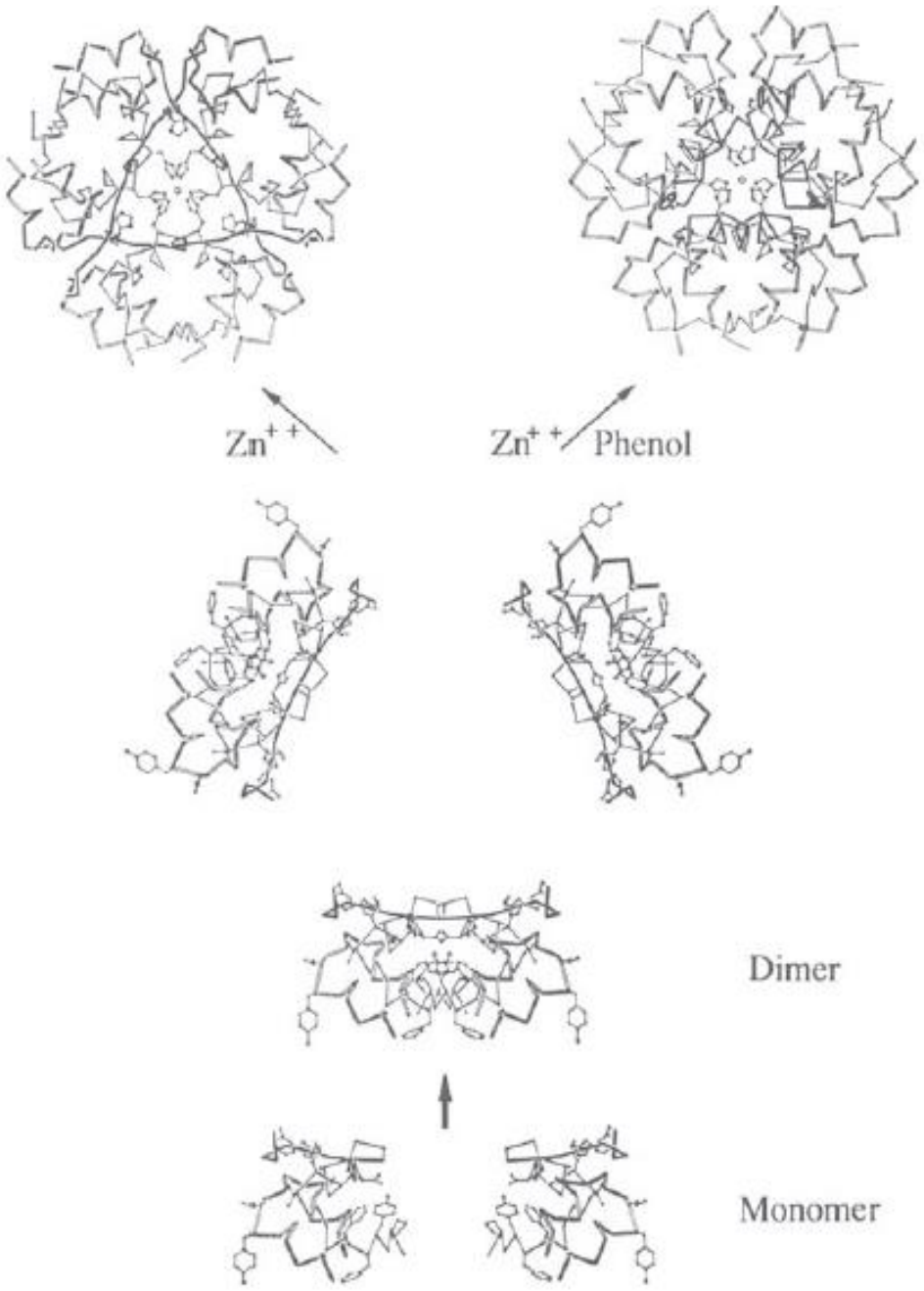

Figura 8 L'auto-assemblamento dell'insulina da monomero a dimero, da tre dimeri a esamero in presenza di ioni zinco (Zn^{++})

2.2 L' INSTABILITÀ DELL'INSULINA E LA FIBRILLAZIONE

Il mantenimento dell'integrità strutturale di una proteina terapeutica, quindi anche dell'insulina, è essenziale per il suo funzionamento farmacologico. Eventuali cambiamenti strutturali, che possono avere luogo durante l'uso o la conservazione della proteina stessa, possono essere di natura chimica o fisica. Lo scopo di questo lavoro è quello di capire come l'insulina si comporta in un ambiente confinato e come eventualmente può modificare la sua struttura, in condizioni di stress termico e a pH acidi.

Si parla di cambiamento della conformazione della proteina, in particolare un cambiamento nella struttura da secondaria a quaternaria, nota anche con il nome di denaturazione. [5] Generalmente la conformazione nativa del monomero di insulina, ovvero la struttura tridimensionale biologicamente attiva assunta dal monomero, è per la maggiorparte a α-elica, con le due catene polipeptidiche legate tra loro da due ponti disolfuro, come già precedentemente detto. Molti fattori ambientali e denaturanti, quali basso pH, calore, presenza di alcoli e agenti ossidativi, possono causare un cambiamento conformazionale, determinando una transizione della struttura da α-elica ad un foglietto β; tale transizione comporterà la formazione di aggregati filiformi insolubili in acqua, noti con il nome di fibrille. Al microscopio elettronico le fibrille dell'insulina appaiono come delle lunghe fibre, con un diametro che varia tra i 10-50 nm. [5]

La formazione delle fibrille, sia nell'insulina che in altre proteine, avviene tramite un meccanismo molto simile, che prende il nome di fibrillogenesi e che si compone di tre fasi: [12]

1. formazione di dimeri di proteina denaturata;

2. formazione di protofilamenti;
3. formazione di fibrille per associazione di protofilamenti.

Durante la formazione dei dimeri ci sarà un cambiamento nella struttura secondaria, con un aumento delle strutture foglietto β rispetto all'α-elica; tali dimeri rappresentano i nuclei per la formazione dei protofilamenti, che, associandosi tra loro, determineranno la formazione delle fibrille.

3. METODI DI PREPARAZIONE DELLE NANODISPERSIONI

Nella seguente tesi sono state utilizzate due metodiche per preparare cubosomi di monoleina, il metodo **Bottom-Up** e quello **Top-Down**. Sono state preparate dispersioni sia vuote che con insulina incapsulata.

METODO TOP-DOWN

Il metodo Top-Down prevede essenzialmente due step:

1. idratazione del lipide con formazione della fase cubica gel;
2. dispersione, tramite sonicazione, del gel con formazione di una sospensione colloidale.

Nel primo step, la monoleina (50 mg) viene sciolta in cloroformio; a questa soluzione si aggiunge il polimero Pluronic F127, anch'esso in soluzione cloroformica, all'8% in peso rispetto al peso del lipide. Il solvente viene quindi fatto evaporare mantenendo la vial sotto un flusso di azoto (N_2) fino alla formazione di un sottile film lipidico sul fondo della stessa. Per avere un campione completamente "secco", il gel viene mantenuto sottovuoto in una campana da vuoto per circa due/tre ore. Il film viene quindi idratato con 200 μL di acqua nel caso della dispersione vuota e 200 μL di una soluzione acquosa (5 mg/mL, pH3) di insulina per quella piena. La quantità di insulina aggiunta al lipide è pari al 2 % in peso del lipide. Il sistema viene lasciato equilibrare per circa 24 ore, in modo tale da avere la completa idratazione del film e il conseguente incapsulamento dell'insulina all'interno dei cubosomi. Sul fondo della vial si osserva effettivamente la formazione di un gel che, dopo ulteriore aggiunta di 2 mL di acqua, viene sonicato per 5 minuti, al 50% dell'intensità

massima del sonicatore e in modalità pulsata, ottenendo una dispersione bianca. La modalità "pulse" è stata utilizzata per evitare eventuali shock termici che possono danneggiare l'insulina.

METODO BOTTOM-UP

Il metodo Bottom-Up non prevede l'utilizzo della sonicazione e quindi di un processo di dispersione a forte impatto energetico, ma si basa sull'utilizzo di un solvente idrotropo (etanolo) che favorisce la solubilizzazione del lipide in acqua.

La monoleina (50 mg) viene sciolta in 250 µl di etanolo e lasciata in agitazione. A questa soluzione vengono aggiunti 200 µL di insulina (5 mg/mL, pH3) in modo da avere un quantitativo di insulina pari al 2% in peso del lipide. La soluzione ottenuta prende il nome di "emulsione primaria".

In una seconda vial, il polimero F127, pari all'8 % in peso rispetto al lipide, viene sciolto in 2 mL di acqua e messo in agitazione. A questa soluzione si aggiunge, goccia a goccia, l'emulsione primaria e durante l'aggiunta si osserva un intorbidimento della soluzione. Il sistema viene lasciato, aperto, in agitazione per 24 ore in modo da far evaporare l'etanolo. In assenza di etanolo, la monoleina, insolubile in acqua, forma delle nanoparticelle in sospensione. Anche se non previsto dalla procedura, anche la dispersione realizzata con il metodo Bottom-Up è stata sonicata ma per un tempo molto più breve (1 minuto), a modalità pulsata e al 50% della potenza disponibile, per assicurarsi di ottenere un sistema nanoparticellare più omogeneo.

4. TECNICHE ANALITICHE PER LA CARATTERIZZAZIONE DEI CAMPIONI E DETERMINAZIONE *DELL'EFFICIENZA DI INCAPSULAMENTO (EE%)*

Le dispersioni colloidali, ottenute con i due metodi descritti nel capitolo precedente, sono state quindi analizzate utilizzando la spettroscopia a correlazione di fotoni per determinare le dimensioni delle nanoparticelle e la spettrofotometria UV per determinare l'efficienza di incapsulamento, indicato con EE%, dell'insulina.

4.1 DYNAMIC LIGHT SCATTERING (DLS)

La spettroscopia a correlazione di fotoni, o Dynamic Light Scattering (DLS), è una tecnica utilizzata per la misura della taglia particellare e molecolare di una dispersione; tale strumento (Figura 9) misura il coefficiente di diffusione delle particelle che si muovono di moto browniano nella soluzione e lo converte in dimensioni e in distribuzione di dimensioni particellari, tramite la relazione di Stokes-Einstein [13]. Per moto browniano si intende un moto disordinato tipico di particelle di piccole dimensioni presenti in soluzioni o dispersioni. [14]

Durante la misura, un raggio laser di lunghezza d'onda pari a 633 nm incide sul campione: se la dimensione delle particelle è minore della lunghezza d'onda del laser, la luce si disperde in tutte le direzioni [15]. A causa del moto browniano delle particelle si generano delle fluttuazioni, ovvero delle oscillazioni nel tempo dell'intensità della radiazione diffusa dal campione; la velocità delle fluttuazioni dipende dalla dimensione delle particelle: tanto più sono grandi tanto più piccola è la velocità di oscillazione dell'intensità. Dal

valore della velocità delle fluttuazioni è possibile conoscere il coefficiente di diffusione con il quale, tramite la relazione Stokes-Einstein, si ricava il diametro idrodinamico della particella, assumendola di forma sferica.

Figura 9 Zetasizer utilizzato per misure di taglia e potenziale Z delle dispersioni preparate seguendo i due metodi TD e BU

I risultati vengono riportati in un grafico x, y con i valori della taglia in nm sull'asse x (scala logaritmica) e sull'asse y i valori dell'intensità percentuale. La curva che si ottiene è di tipo gaussiano che innanzitutto dà un'idea del grado di dispersione del campione: infatti tanto più la curva è stretta attorno al valore medio della taglia tanto più il campione è formato da una popolazione omogenea e monodispersa di particelle, con taglia simile. La presenza di più curve nel grafico rappresenta un campione non omogeneo e polidisperso.

I risultati sono riportati, oltre che in maniera grafica, anche in un report che prende il nome di "Intensity PSD", nel quale sono riportate due informazioni:

- la dimensione media della popolazione, Z-Average;

- il coefficiente PDI, compreso tra 0 e 1; il PDI non è altro che la deviazione standard della funzione gaussiana, che indica l'ampiezza delle distribuzioni delle dimensioni attorno al valor medio.

Le misure vengono fatte utilizzando delle cuvette di plastica (Figura 10) in cui si versano 300 µl di dispersione acquosa, in questo caso di dispersione preparata con il metodo Top-Down o con quello Bottom-Up.

Figura 10 Esempio di cuvetta utilizzata per misura della taglia particellare

Altro valore che si può ricavare utilizzando lo stesso strumento è il potenziale Z e cioè il valore della carica superficiale delle nanoparticelle, che permette di predire la stabilità delle dispersioni e, nel caso delle proteine, di individuarne il punto isoelettrico. [16]

La maggiorparte delle particelle e nanoparticelle disperse in acqua presentano una carica superficiale dovuta a fenomeni di ionizzazione; le particelle sono circondate da diversi strati ionici. Quando le particelle sono in una soluzione, esse si spostano insieme ad un doppio strato ionico: il potenziale Z è il

potenziale al livello del doppio strato ionico. La misura si effettua sottoponendo il campione, inserito in celle di misura (Figura 11) munite di due elettrodi, ad un campo elettrico ed illuminandolo con un raggio laser. A questo punto le particelle cariche (positivamente e negativamente) si sposteranno ognuna verso l'elettrodo di segno opposto, determinando una variazione di frequenza della luce diffusa dal campione.

Figura 11 Celle di misura per potenziale Z

Il valore misurato, in mV, è quindi il potenziale Z della dispersione e tanto maggiore è il valore assoluto di Z tanto più stabili saranno le dispersioni, poiché si generano delle forze di repulsione elettrostatica che impediscono alle particelle disperse di riaggregarsi.

4.2 SPETTROSCOPIA UV

Le tecniche spettroscopiche si basano sullo scambio di energia tra una radiazione elettromagnetica e la materia; in particolare la Spettroscopia UV-Visibile utilizza radiazioni elettromagnetiche sia nel campo del visibile (350 – 750 nm) che nel campo ultravioletto (190 – 350 nm). L'assorbimento di energia in questi range di lunghezze d'onda causa transizioni elettroniche tra i livelli energetici di valenza occupati e livelli elettronici vuoti e quindi il passaggio dallo stato fondamentale ad uno stato elettronico eccitato. [17]

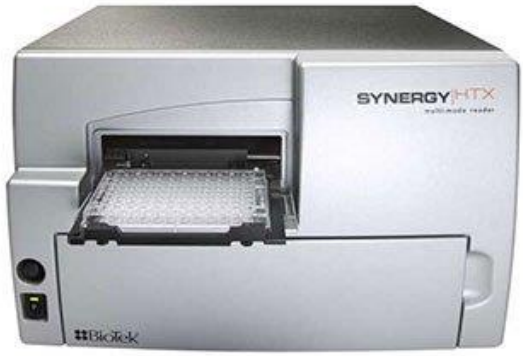

Figura 12 Lettore multipiastra UV

Tramite uno spettrometro ottico vengono registrate le lunghezze d'onda a cui avvengono gli assorbimenti, associando ad ognuna di esse l'intensità di assorbimento (assorbanza, A). Lo strumento quindi fornisce uno spettro dell'assorbanza del campione in funzione delle lunghezze d'onda.

Generalmente lo spettrometro è formato dalle seguenti componenti:

- sorgente di energia radiante nel campo UV-visibile, per lo più lampade ad incandescenza;

- monocromatore, il cui scopo è quello di isolare un intervallo il più possibile ristretto di radiazioni emesse centrato nella lunghezza d'onda d'interesse;
- portacampione;
- rilevatore.

Gli spettrofotometri possono essere a singolo o a doppio raggio; in questo caso è possibile confrontare direttamente il campione in esame con un riferimento. Nelle misure effettuate per la seguente tesi si è utilizzato un lettore di piastre al posto di un convenzionale spettrofotometro che permette di effettuare un'unica misura su un numero elevato di campioni. Ad esempio, in una piastra da 96 pozzetti si possono leggere contemporaneamente fino a 96 campioni utilizzando volumi molto piccoli (200 µl) di soluzione da analizzare. In genere è sempre bene fare almeno 2/3 repliche per ogni campione e utilizzare il solvente in cui il campione in esame è disciolto come bianco. L'assorbanza del bianco viene poi automaticamente sottratta a quella del campione.

Lo spettrofotometro UV (Figura 12) permette di effettuare misure e analisi sia qualitative che quantitative. Dall'analisi dello spettro ottenuto e dai valori delle lunghezze d'onda dei massimi di assorbimento si possono avere indizi sulla natura del composto in esame. Dai valori delle assorbanze, corrispondenti ai massimi di assorbimento, si possono avere invece indicazioni quantitative e determinare la concentrazione dell'analita utilizzando la legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon_\lambda l\, C$$

dove con ε_λ si indica il coefficiente di assorbimento molare standard alla relativa lunghezza d'onda λ, con l si indica il cammino ottico e con C la concentrazione molare della soluzione. Tale relazione lega l'assorbanza A alla concentrazione C tramite un legame di diretta proporzionalità.

Per effettuare l'analisi quantitativa è necessario avere, per l'analita in esame, una retta di calibrazione, del tipo:

$$y = kx$$

in cui y rappresenta l'assorbanza, nota poiché fornita dallo strumento, x rappresenta la concentrazione incognita dell'analita e k rappresenta il coefficiente angolare della retta, noto con il nome di coefficiente statico di calibrazione. L'individuazione di tale retta è fondamentale per l'utilizzo dello strumento, in quanto la si utilizza per individuare la concentrazione dell'analita, noto il valore dell'assorbanza.

La retta di calibrazione è ricavabile nel seguente modo:

1. si prepara una soluzione madre a concentrazione nota dell'analita;
2. dalla soluzione madre si ottengono soluzioni a diverse diluizioni;
3. si misura l'assorbanza di tali soluzioni;
4. si riportano in un grafico i valori di assorbanza misurati (asse y) in funzione della concentrazione (asse x);
5. si ricava la retta di calibrazione, ovvero la retta la cui distanza al quadrato dai valori è minima ("retta ai minimi quadrati").

Verificata la linearità della retta nel range di concentrazioni misurate, è possibile utilizzare tale retta per determinare la concentrazione incognita del campione solo in tale intervallo di concentrazioni. L'utilizzo della retta per concentrazioni al di fuori del range può determinare delle incertezze sul valore individuato.

4.3 *EFFICIENZA DI INCAPSULAMENTO*, EE%

L'insulina è una proteina idrosolubile: infatti nella preparazione dei cubosomi, durante la fase di idratazione del lipide, è stata aggiunta come soluzione acquosa. È possibile però che non tutta l'insulina aggiunta al campione venga incapsulata all'interno dei cubosomi, infatti una parte di essa può rimanere nell'acqua in cui le nanoparticelle sono disperse. Per determinare l'efficienza di incapsulamento (EE%) e quindi la quantità di insulina effettivamente presente all'interno dei cubosomi, occorre innanzitutto separare i cubosomi contenenti insulina dall'insulina libera. Per fare ciò si possono usare diverse tecniche (tra cui dialisi, gel filtrazione, centrifugazione, ultrafiltrazione, ecc..) ma in questo lavoro di tesi si è scelto di utilizzare la tecnica dell'ultrafiltrazione. In pratica si tratta di centrifugare il campione in una Amicon® (Figura 13), cioè una Falcon® contenente al proprio interno un filtro con cut-off variabile; nel seguente studio si sono utilizzati filtri con cut-off da 10 kDa e 30 kDa.

Figura 13 Amicon® utilizzate per l'incapsulamento

Verrà ora descritto nel dettaglio il procedimento seguito per ricavare il valore di EE%.

Si pesano le Amicon® con bilancia analitica, considerando il peso dell'Amicon® completa (corpo + filtro), del corpo ed infine del filtro. Il filtro viene lasciato condizionare con circa 2mL di acqua per almeno 30 minuti, successivamente si pesa nuovamente il filtro. In ogni filtro si carica 1 mL di dispersione e si centrifuga per 15 minuti a 10000 rpm.

L'Amicon® è un sistema concentratore per cui ciò che si ottiene nel filtro è una dispersione concentrata, di colore bianco, che è stata chiamata "concentrato" e che dovrebbe contenere i cubosomi con l'insulina incapsulata; ciò che si raccoglie sul fondo è invece una soluzione trasparente, che è stata chiamata "filtrato". Il filtrato contiene per lo più l'acqua in eccesso presente inizialmente nella dispersione e eventualmente l'insulina non incapsulata nei cubosomi.

Dopo la centrifugazione si pesano nuovamente corpo e filtro dell'Amicon® andando poi a determinare le quantità di dispersione o soluzione raccolte nei due diversi comparti. Il filtrato viene quindi analizzato tramite la Spettrofotometria UV, andando a determinare l'assorbanza della soluzione in corrispondenza della lunghezza d'onda di assorbimento dell'insulina (276 nm). Dalla retta di taratura per l'insulina, fatta precedentemente, si ricava il valore della concentrazione di insulina in tale soluzione e da questa, considerando il peso/volume della soluzione "filtrato", la quantità in mg di insulina raccolta nel filtrato (mg di insulina raccolti) utilizzando la formula inversa di:

$$Concentrazione\ \left[\frac{mg}{ml}\right] = \frac{mg\ di\ insulina\ raccolti\ [mg]}{volume\ del\ filtrato\ [ml]}$$

Considerando i mg di insulina caricati nella dispersione iniziale, si calcola la percentuale di efficienza di incapsulamento utilizzando la seguente formula:

$$EE\% = \frac{mg\ di\ insulina\ teorici - mg\ di\ insulina\ raccolti}{mg\ di\ insulina\ teorici} \times 100$$

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel capitolo seguente verranno descritti i risultati dall'analisi, fatta con le tecniche descritte nel capitolo precedente, dei due sistemi GMO e GMO/insulina. La quantità di insulina aggiunta nella preparazione dei campioni è pari al 2% in peso rispetto al peso del lipide.

Da un'analisi strutturale fatta precedentemente mediante Diffrazione dei Raggi X era emerso che la monoleina in presenza di un eccesso di acqua, ma in assenza di polimero, dà una fase cubica di tipo Pn3m il cui pattern di diffrazione è riportato in Figura 14. Il rapporto delle posizioni dei picchi di Bragg nello spazio reciproco corrisponde alla serie √2, √3, √4, √6, √8, √9, √10. Il valore dell'unità di cella corrisponde a *a*= 9.84 nm.

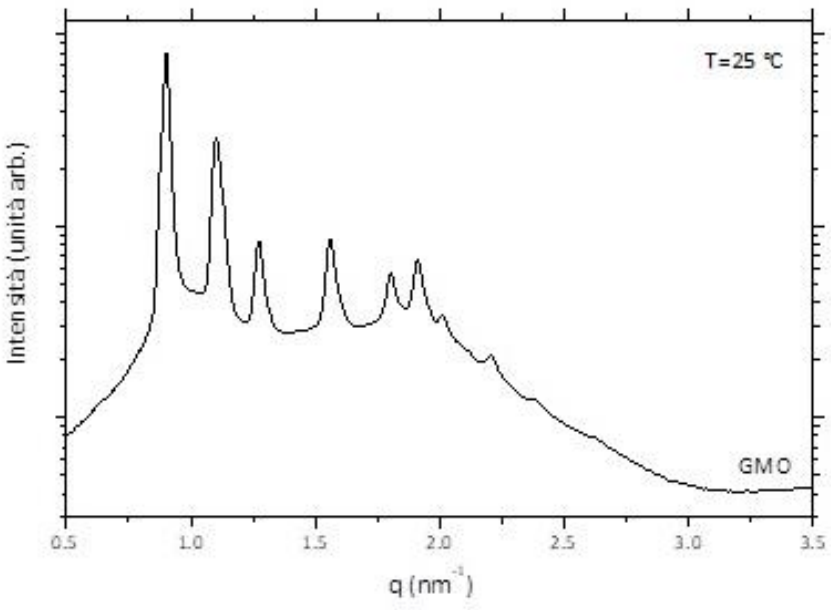

Figura 14 Spettro di diffrazione di GMO a 25 °C

L’aggiunta del polimero provoca la transizione ad una fase cubica di tipo Im3m in cui il rapporto delle posizioni dei picchi di Bragg nello spazio reciproco corrisponde alla serie √2, √4, √6, √8, √10, √12 (Figura 15). Il valore dell’unità di cella corrisponde a *a*= 13.5 nm.

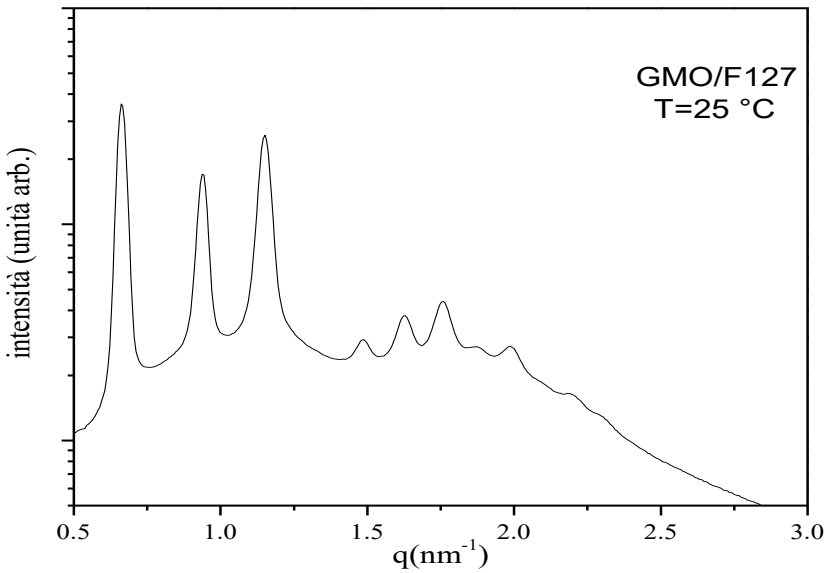

Figura 15 Spettro di diffrazione di GMO/F127

La presenza della proteina all’interno della struttura non modifica né il tipo di fase, l’Im3m è l’unica fase osservata, né la dimensione della cella unitaria che rimane intorno ai 13.5 nm.

Le misure di Diffrazione dei Raggi X erano state effettuate su campioni in fase gel ma non sono da aspettarsi differenze su campioni in fase dispersa in quanto, solitamente, la struttura si mantiene passando da un tipo di campione all’altro.

I campioni, analizzati mediante DLS e utilizzati per determinare l’efficienza di incapsulamento, sono stati preparati utilizzando due metodi diversi, il Top-Down e il Bottom-Up, descritti nel capitolo precedente.

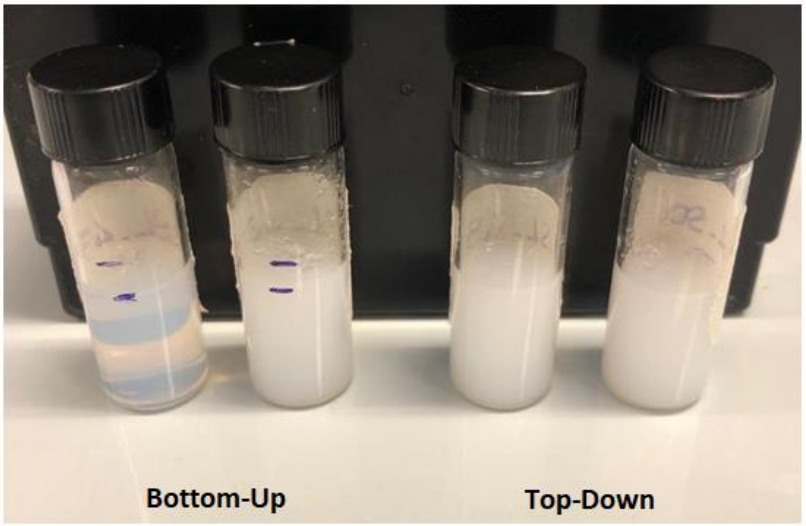

Figura 16 Confronto visivo tra le dispersioni di nanoparticelle vuote e piene realizzate con metodo Bottom-Up e Top-Down

Ad una prima analisi visiva, appare chiaro che le dispersioni ottenute nei due casi sono diverse tra loro (Figura 16): traslucida e quasi trasparente la dispersione vuota mentre bianca e lattiginosa quella piena con il metodo Bottom-Up (Figura 17), bianche e lattiginose, sia vuote che piene, con il metodo Top-Down.

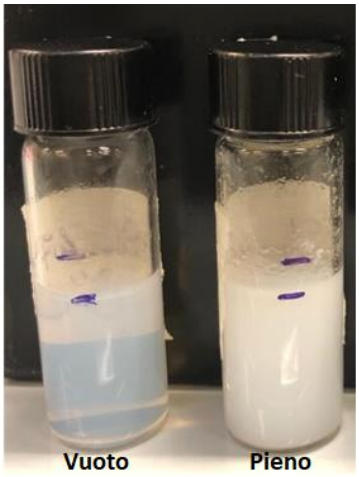

Figura 17 Confronto tra la dispersione con nanoparticelle vuote e nanoparticelle piene preparate con il metodo Bottom-Up

Anche il confronto tra i risultati ottenuti con analisi al DLS (Tabella 1) conferma che i due metodi danno dispersioni diverse e, in particolare, i sistemi realizzati utilizzando il metodo Top-Down hanno una dimensione nanoparticellare minore e sono più stabili nel tempo di quelle realizzate tramite Bottom-Up.

TOP DOWN		**BOTTOM UP**	
GMO-F127		**GMO-F127**	
SIZE	**PDI**	**SIZE**	**PDI**
143.3 ± 0.02	0.133 ± 0.002	105.7 ± 2.3	0.350 ± 0.035
GMO-F127-Insulina		**GMO-F127-Insulina**	
SIZE	**PDI**	**SIZE**	**PDI**
143.4 ± 0.4	0.134 ± 0.000	183.1 ± 3.1	0.084 ± 0.011

Tabella 1 confronto tra le taglie particellari dei sistemi realizzate con i due metodi al tempo 0

Come si può osservare in Tabella 1, i cubosomi (vuoti e con insulina incapsulata) ottenuti con il metodo Top-Down hanno un raggio idrodinamico di circa 143 nm e, come indicato dal valore molto basso del PDI, sono monodispersi e cioè costituiti da nanoparticelle delle stesse dimensioni. Con il metodo Bottom-Up si ottengono invece nanoparticelle più piccole (circa 105 nm) in assenza di insulina e cubosomi molto più grandi (183 nm) in presenza della proteina. In realtà, le nanoparticelle vuote non sono tutte della stessa dimensione come

indicato dall'elevato valore di PDI ma costituite da due popolazioni di dimensioni diverse: 180 nm (praticamente uguali a quelle contenenti insulina) e 35 nm. La presenza di particelle con dimensioni così piccole che diffondono la luce (scattering di Rayleigh) in misura minore di quelle più grandi potrebbe giustificare l'aspetto traslucido della sospensione. La stabilità di entrambi i tipi di dispersione è stata valutata nel tempo, controllando le dimensioni delle nanoparticelle nell'arco di 15 giorni. Il metodo Top-Down è risultato più efficace per preparare nanoparticelle non solo monodisperse ma anche più stabili, visto che le loro dimensioni rimangono costanti per il periodo esaminato. Al contrario, quelle ottenute con il metodo Bottom-Up hanno una maggiore tendenza all'aggregazione e le dimensioni aumentano fino a 400 nm dopo soli 7 giorni.

Successivamente si è determinato il valore della carica superficiale (potenziale Z) delle nanoparticelle ottenute con il solo metodo Top-Down e in entrambi i casi, considerando sia le nanoparticelle vuote che contenenti insulina, si è ottenuto un potenziale leggermente negativo (ca. -11 V) che comunque rientra nel range di neutralità. Infatti, generalmente le nanoparticelle si considerano elettricamente neutre se il loro potenziale Z è compreso tra -20 e + 20 V. Il potenziale Z è stato individuato analizzando le dispersioni diluite 1 a 10 con acqua.

In Tabella 2 sono riportati i valori di efficienza di incapsulamento (EE%) determinati tramite ultrafiltrazione con Amicon®, come precedentemente descritto nel Capitolo 4.

CAMPIONI	CONDIZIONI DI CENTRIFUGAZIONE	EE% (PER DIFFERENZA CON IL FILTRATO)
FILTRI AMICON CON CUT-OFF 10 KDA		
GMO-F127-INSULINA AL 2%	5’ + 5’ a 5000 rpm	99.56%
	20’ a 5000 rpm	98.90%
	+ 20’ a 5000 rpm (40’ TOTALI)	96.33%
	+ 20 a 5000 rpm (60’ TOTALI)	95.09%
	15’ a 8000 rpm	99.11%
	15’ a 8000 rpm	99.33%
FILTRI AMICON CON CUT-OFF 30 KDA		
GMO-F127-INSULINA AL 2%	15’ a 8000 rpm	98.283%

Tabella 2 EE% dei campioni realizzati con metodo TD; EE% valutato per differenza con il filtrato

I valori ottenuti con cut-off dei filtri da 10 kDa sono molto elevati e infatti raggiungono tutti circa il 99% di efficienza di incapsulamento: ciò significa che l’insulina raccolta nel filtrato è pressoché nulla ed è tutta presente nel concentrato. I risultati sono stati ottenuti utilizzando diverse condizioni di centrifugazione, come riportato nella seconda colonna della Tabella 2. L’utilizzo di tempistiche diverse nella centrifugazione ha permesso di escludere quindi che per tempi superiori fosse maggiore l’insulina raccolta nel filtrato: di fatto si

ottengono dei valori identici di EE%. Infine, si è scelto come tempo standard di centrifugazione 15 minuti alla velocità di 8000 rpm: anche in questo caso non ci sono state variazioni significative sul valore dell'EE%, nonostante si sia scelta una velocità più elevata. Poiché il peso molecolare dell'insulina in forma monomerica è circa 5.730 g/mol, anche utilizzando i filtri con un cut-off da 10 kDa se ci fosse insulina libera questa passerebbe nel filtrato. Nel caso in cui l'insulina non fosse in forma monomerica ma dimerica o esamerica, essa non riuscirebbe a passare, a causa delle dimensioni maggiori, attraverso i pori del filtro e rimarrebbe nel concentrato. Per escludere tale ipotesi si è utilizzata un'Amicon® con cut-off maggiore (30 kDa): anche in questo caso nel filtrato si sono trovate solamente tracce di insulina, verificabile da un valore elevato di EE% pari circa al 98%.

6. CONCLUSIONI

Il lavoro di questa tesi si è basato sull'analisi dei due metodi di preparazione dei nanovettori di natura lipidica, confrontandone le caratteristiche principali fino ad arrivare alla scelta di quello che è risultato essere il metodo di preparazione più conveniente.

Dopo aver preparato le dispersioni con metodo Top-Down e Bottom-Up incapsulando al loro interno insulina, si sono analizzati i campioni tramite DLS e si sono ricavati i valori relativi alla taglia particellare e al potenziale Z. Il metodo di preparazione migliore è risultato quello Top-Down anche se la sonicazione, vista l'alta energia utilizzata, potrebbe danneggiare la proteina. A questo proposito ulteriori esperimenti dovranno chiarire se la struttura quaternaria dell'insulina subisce eventuali modifiche e se il processo di degradazione e fibrillazione viene accelerato.

L'efficienza di incapsulamento EE% è stata determinata mediante ultrafiltrazione con filtri Amicon® e lettura spettrofotometrica e in entrambi i tipi di dispersione i valori ottenuti sono particolarmente alti e fanno ben sperare sulla possibilità di incapsulare effettivamente all'interno dei cubosomi una proteina modello quale l'insulina ed utilizzare tali sistemi come vettori nel "drug delivery".

BIBLIOGRAFIA

[1] Dong-Hwan Kim, Alexander Jahn, Sung-Joon Cho, Jung Sun Kim, Min-Hyo Ki, Dae-Duk Kim, "Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery: a review", Journal of Pharmaceutical Investigation, **2014**, 45(1): 1-11

[2] Adriana Ganem-Quintanar, David Quintanar-Guerrero, Pierre Buri, "Monoolein: A Review of the Pharmaceutical Applications", Drug Development and Industrial Pharmacy, **2000**, 26(8): 809-820

[3] Spomenka Milak, Andreas Zimmer, "Glycerol monooleate liquid crystalline phases used in drug delivery systems", International Journal of Pharmaceutics, **2015**, 478: 569-587

[4] Charlotte E. Conn, Calum J. Drummond, Nanostructured bicontinuous cubic lipid self-assembly materials as matrices for protein encapsulation", Soft Matter, **2013**, 9(13): 3439–3682

[5] Jens Brange, Lotte Langkjar, "Insulin Structure and Stability", Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs: Case Histories, **1993**, 5: 315-350

SITOGRAFIA

[6] https://it.wikipedia.org/wiki/Cristalli_liquidi

[7] https://www.chimicamo.org/chimica-fisica/diagrammi-di-fase-binari.html

[8] http://www.culturachimica.it/wp-content/uploads/universita/I-cristalli-liquidi.pdf

[9] https://it.wikipedia.org/wiki/Insulina#Funzioni_metaboliche

[10] http://www.federica.unina.it/farmacia/biochimica-far/struttura-proteine/

[11]https://www.embl.fr/training/scienceforschools/teacher_training/teachingbase/insulin_ital/insulin_ital_rdl.pdf

[12] http://www.scuolafn.unicz.it/docenti/alcaro/f1/aa_06_07/tesine/carbone_misfold.doc

[13] https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-pro/index.html

[14] https://it.wikipedia.org/wiki/Moto_browniano

[15] https://it.wikipedia.org/wiki/Diffusione_dinamica_della_luce

[16] https://www.alfatest.it/tecniche/potenziale-zeta

[17] https://it.wikipedia.org/wiki/Spettroscopia_ultravioletta/visibile