



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Facoltà di Ingegneria

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica

Produzione di nanoparticelle per evaporazione di solvente da emulsioni multiple

Tesi in
Principi di Ingegneria Chimica

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Prof. Ing. Anna Angela Barba

Correlatore:

Ing. Annalisa Dalmoro

Candidata:

Clara Vascello

matricola 0622200039

Anno Accademico 2012/2013

*Guarda le piccole cose perché un giorno
ti volterai e capirai che erano grandi.
Jim Morrison*

Questo testo è stato stampato in proprio, in Times New Roman
La data prevista per la discussione della tesi è il 23 Aprile 2013
Fisciano, 20 Aprile 2013

ABSTRACT

In this work a technique for the production of polymeric nanosystems based on the multiple emulsion assisted by ultrasounds has been developed. Several biopolymers have been used to test the developed method and a morphological (SEM analysis) and dimensional characterization (light scattering) has been worked.

In particular, the production of nanovectors has been led using different classes of polymeric materials: two aliphatic polyesters, the polycaprolactone (PCL) and the polylactic acid (PLA), widely used in biomedical field, a copolymer produced by LA/CL (lactide/caprolactone) monomers polymerization, ALI7 [LA/CL= 70/30] and a pH-sensitive copolymer obtained by the polymerization of MMA/AA (methylmethacrylate/ acrylic acid) monomers, Poly(MMA-AA) [MMA/AA= 73/27].

After having defined in details all the processing parameters of the different preparation steps that is the emulsification, separation, washing and drying conditions, the nanosystems have been loaded with active drugs to test the encapsulation efficiency and the drug release rates. α -tocopherol, liposoluble molecule, and tamoxifen, a hydrophobic antitumoral drug, have been chosen to be encapsulated. As a conclusion, it is possible to obtain nanometrical particles (mean diameter in the range of 100-400 nm) composed of PCL, PLA and ALI7, interesting for drug delivery systems in pharmaceutical applications. On the other hand, the particles based on Poly(MMA-AA) are microporous systems because of the mixture of solvents utilized during the emulsion preparation phase.

The technique to produce PCL, PLA and ALI7 particles loaded with α -tocopherol has shown a very good encapsulation efficiency; thanks to degradation studies no changes on morphology and dimensions have been noticed in the observation period (8 months, physiological environment, pH 7.4, temperature 37°C).

The most interesting application for these nanovectors could be their use to formulate injectable or implantable drug delivery systems. Infact, thanks to their slow degradation rate, they would guarantee the delivery of an active molecule in a very wide temporal range (from months to years) improving the patient's compliance especially when drugs are rapidly metabolized and poorly bioavailable.

The systems based on Poly(MMA-AA) loaded with α -tocopherol have shown an encapsulation efficiency lower than nanoparticles based on

PCL, PLA e ALI7, this probably due to the presence of the alcohols in the utilized mixture that tend to diffuse into the aqueous phase bringing with them a certain percentage of drug.

Particles based on Poly(MMA-AA) loaded with tamoxifen have resulted in a loading of drug significantly higher than particles based on Poly(MMA-AA) loaded with tocopherol. Tamoxifen, infact, is less soluble than tocopherol in alcohol and so resulting in a lower diffusion into the aqueous phase.

These systems based on Poly(MMA-AA) have a faster degradation rate in the experimental time. Infact, the 50% of the drug is released after one hour in physiological environment while the entire release happens in two hours. These powders could be used to produce solid pharmaceutical formulations for oral delivery in the case of breast cancer: these systems, solids and therefore more stable, would avoid the instability of the actual liquid medical devices.

In the future a transformation from a batch to a continue process, especially in the separation phase, would be a promising development of this innovative production technique.

Sommario

Sommario	I
Indice delle figure	V
Indice delle tabelle	XI
Introduzione.....	1
1.1 Introduzione	2
1.2 Tipologie di nanosistemi	6
1.2.1 Liposomi	7
1.2.2 Niosomi	9
1.2.3 Dendrimeri	10
1.2.4 Micelle	11
1.2.5 Nanogels	12
1.2.6 Nanoparticelle	13
1.3 Tecniche di preparazione delle nanoparticelle	15
1.3.1 Polimerizzazione in emulsione	15
1.3.2 Utilizzo di fluidi supercritici	16
1.3.3 Emulsione semplice con evaporazione del solvente	17
1.3.4 Doppia emulsione con evaporazione del solvente	18
1.3.5 Salting-out	19
1.4 Stabilità di un'emulsione	19
1.5 Obiettivo della tesi	21
Stato dell'arte.....	23

2.1 Analisi dei lavori di letteratura	24
2.1.1 Nanoparticelle a base di PLGA ricoperte da chitosano	24
2.1.2 Produzione di nanoparticelle caricate con tamoxifen	26
2.1.3 Produzione di nanoparticelle a base di PLGA tramite evaporazione del solvente da emulsione spontanea	29
2.1.4 Nanosfere sensibili al pH per il rilascio colon-specifico	31
2.1.5 Influenza del PVA residuo sulle nanoparticelle prodotte	33
2.1.6 Nanoparticelle a base di PCL caricate con α -tocoferolo	35
2.1.7 Emulsione assistita da ultrasuoni	37
2.1.8 Confronto tra le emulsioni ottenute con l'utilizzo di ultrasuoni e le emulsioni prodotte con agitazione meccanica	39
2.1.9 Influenza della viscosità della fase continua nell'emulsione ad ultrasuoni	41
MATERIALI E METODI	45
3.1 Scelta del polimero	46
3.1.1 PLA	47
3.1.2 PCL	49
3.1.3 Copolimeri PLA/PCL	50
3.1.4 PMMA-AA	51
3.2 Altri materiali	53
3.2.1 Il PVA	53
3.2.2 α -Tocoferolo	54
3.2.3 Tamoxifen	55
3.2.4 Solventi e reagenti	56
3.3 Metodi	57
3.3.1 Produzione di nanoparticelle mediante emulsione multipla con evaporazione del solvente	57
3.3.2 Separazione	59
3.3.3 Determinazione del carico di farmaco e delle proprietà di rilascio	61
3.3.4 Caratterizzazione dimensionale e morfologica delle nanoparticelle	64
3.3.5 Misura del PVA residuo nelle nanoparticelle	67

Risultati e discussione	69
4.1 Risultati e discussione	70
4.1.1 Produzione di nanoparticelle di PCL non caricate	70
4.1.2 Separazione delle nanoparticelle	72
4.1.3 Produzione di nanoparticelle a base di PCL caricate con α -tocoferolo.	85
4.1.4 Nanoparticelle a base di PLA	95
4.1.5 Nanoparticelle a base di ALI7	102
4.1.6 Particelle a base di PMMA-AA	108
Conclusioni.....	119
Metodi analitici.....	125
A.1 Metodo di taratura convenzionale	126
A.2 Taratura con sottrazione spettrale	126
Rette di taratura	131
B.1 Retta di taratura dell' α -tocoferolo	132
B.2 Retta di taratura del tamoxifen.....	132
B.3 Retta di taratura del PVA.....	134
Funzioni di distribuzione	137
C.1 Funzioni di distribuzione	138
Bibliografia.....	144

Indice delle figure

Figura 1. <i>Enhanced permeability and retention</i> (EPR) effect. I carriers di farmaci a lunga circolazione (1) penetrano attraverso il sistema vascolare patologico compromesso (2) nell'interstizio tumorale (3) e ivi degradano rilasciando il farmaco (4) e creando una sua alta concentrazione locale.	3
Figura 2. Intervallo dimensionale utile in farmacologia per l'utilizzo delle nanoparticelle [11].	5
Figura 3. Distribuzione delle dimensioni caratteristiche dei diversi tipi di nanoparticelle utilizzati nel trasporto di farmaci [13].	7
Figura 4. Farmaci di varia idrofobia si distribuiscono in varie zone all'interno del liposoma [15].	8
Figura 5. Liposoma unilamellare a destra, multilamellare a sinistra.	9
Figura 6. Struttura di un niosoma.	9
Figura 7. Strategie di sintesi divergente (sopra) e convergente (sotto) per dendrimeri.	10
Figura 8. Struttura schematica di una micella sferica.	12
Figura 9. Cambiamento del volume di un idrogel indotto da uno stimolo esterno. ...	13
Figura 10. A sinistra è raffigurata la struttura delle nanocapsule e la distribuzione uniforme del principio attivo nel cuore del sistema circondato dalla membrana polimerica. A destra è rappresentata la struttura delle nanosfere in cui il farmaco è intrappolato o disciolto all'interno della matrice polimerica.	14
Figura 11. Preparazione di nanoparticelle attraverso la tecnica dell'evaporazione di solvente da doppia emulsione.	18
Figura 12. Fenomeni di destabilizzazione di un'emulsione [31].	20
Figura 13. Effetto della concentrazione di chitosano sulle nanoparticelle a base di PLGA.	26
Figura 14. Rilascio in-vitro del tassolo da nanoparticelle ricoperte e non ricoperte da chitosano.	26
Figura 15. Profili di rilascio del tamoxifen dalle nanoparticelle a base di PLC 40/60-PCL (•); a base di PLC 86/14-PCL(•); a base di PLC 86/14-PDLLA (•).	28

Figura 16. Resa delle nanoparticelle a base di PLGA in funzione della concentrazione di acetone. (o) Metodo SEDS (solvente: diclorometano/acetone), (Δ) Metodo SEDS modificato (solvente:etanolo/acetone), (□) Metodo SEDS modificato (solvente:metanolo/acetone).....	30
Figura 17. Effetto dell'aumento della concentrazione di polimero sulla resa delle nanoparticelle. (•) Metodo SEDS modificato (solvente: etanolo/acetone), (○) Metodo SEDS (solvente:diclorometano/acetone).....	31
Figura 18. Rilascio budesonide da nanosfere a base di (o) PLGA/Eudragit (2:1), (•) PLGA/Eudragit (1:1) e da microparticelle a base di Eudragit (•).....	32
Figura 19. Effetto della concentrazione del PVA nella fase acquosa sulla produzione delle nanoparticelle.	34
Figura 20. Effetto del PVA residuo sul rilascio della butesonide dalle nanoparticelle.....	35
Figura 21. Effetto del solvente nella fase olio.	36
Figura 22. Effetto della concentrazione polimerica.	36
Figura 23. Meccanismo dell'emulsione acustica.	38
Figura 24. Effetto del tempo di emulsificazione sulle dimensioni delle nanoparticelle (in alto) e sull'efficienza di incapsulamento (in basso).	39
Figura 25. Variazione del diametro in funzione della tecnica e del tempo di emulsificazione.....	40
Figura 26. Variazione del diametro in funzione della concentrazione del surfattante e della tecnica di emulsificazione.	40
Figura 27. Variazione del diametro in funzione della potenza fornita (t=30s, c=10 g/L, frazione olio=0.25).....	41
Figura 28. Processo di emulsificazione tramite impiego di energia meccanica.....	42
Figura 29. Rappresentazione della sintesi del PLA per via diretta dall'Acido Lattico o attraverso il dimero.....	49
Figura 30. Rappresentazione della sintesi del PCL per via diretta dal Caprolattone.....	50
Figura 31. Rappresentazione schematica di una copolimerizzazione random.	51
Figura 32. Struttura del Poly(MMA-AA).	52
Figura 33. <i>Swelling</i> e pH di dissoluzione in funzione della percentuale in volume di MMA presente nel copolimero.	53
Figura 34. Struttura dell'alcol polivinilico.....	54
Figura 35. Struttura dell'α-tocoferolo.....	55
Figura 36. Struttura del tamoxifen.....	55
Figura 37. Schematizzazione del processo di emulsificazione.	58

Figura 38. Rappresentazione grafica del Potenziale Zeta.....	66
Figura 39. Distribuzione volumetrica e numerica dell'emulsione 1.....	71
Figura 40. Misura del potenziale Z delle particelle ottenute dall'emulsione 1.....	72
Figura 41. Analisi numerica del surnatante, dei lavaggi e delle nanoparticelle dell'emulsione 2.	74
Figura 42. Andamento nel tempo della distribuzione numerica delle particelle ottenute dall'emulsione 3.	75
Figura 43. Profilo di distribuzione numerica delle particelle ottenute dall'emulsione 4.	76
Figura 44. Distribuzioni dimensionali dei lavaggi e del surnatante ottenute per l'emulsione 4.	77
Figura 45. Rappresentazione schematica della provetta alloggiata nel rotore della centrifuga utilizzata.	79
Figura 46. Viscosità di una soluzione di PVA a 60°C in funzione della concentrazione. Le curve variano al variare del grado di polimerizzazione di PVA utilizzato.	80
Figura 47. Geometria del rotore della centrifuga utilizzata.	81
Figura 48. Distribuzione numerica delle particelle ottenute con l'emulsione 5.	82
Figura 49. Distribuzioni dimensionali dei lavaggi e del surnatante ottenute per l'emulsione 5.	83
Figura 50. Immagine scattata al SEM delle particelle costituite da PCL ottenute dall'emulsione 5.	84
Figura 51. Profilo di distribuzione numerica ottenuto da un'analisi dell'immagine delle nanoparticelle di PCL.	85
Figura 52. Distribuzione numerica delle particelle ottenute con l'emulsione 6.	86
Figura 53. Distribuzioni dimensionali dei lavaggi e del surnatante ottenute per l'emulsione 6.	87
Figura 54. Distribuzioni dimensionali dei lavaggi, del surnatante e delle particelle ottenute per l'emulsione 8.	91
Figura 55. Relazione semilogaritmica tra la viscosità intrinseca $[\eta]$ di omopolimeri e co-polimeri a blocchi e il tempo di degradazione in tampone fosfato a 37°C, 45°C e 55°C. PCL (○), 87/13 (●), 51/49 (Δ), 32/68 (▲) e PLA (□).	92
Figura 56. Immagine scattata al SEM delle particelle costituite da PCL caricate con α -tocoferolo ottenute dall'emulsione 8.	94
Figura 57. Profili di distribuzione numerica ottenuto da un'analisi dell'immagine delle nanoparticelle di PCL pre-dissoluzione e post-dissoluzione. ..	95
Figura 58. Distribuzione numerica delle particelle ottenute con l'emulsione 9.	96

Figura 59. Immagine scattata al SEM delle particelle costituite da PLA ottenute dall'emulsione 9.	97
Figura 60. Profilo di distribuzione numerica ottenuto da un'analisi dell'immagine delle nanoparticelle di PLA.	98
Figura 61. Immagine scattata al SEM delle particelle costituite da PLA caricate con α -tocoferolo pre (in alto) e post (in basso) dissoluzione ottenute dall'emulsione 11.	100
Figura 62. Profili di distribuzione numerica ottenuti da un'analisi dell'immagine delle nanoparticelle di PLA caricate con α -tocoferolo pre e post-dissoluzione.	101
Figura 63. Immagine scattata al SEM delle particelle costituite da ALI7 caricate con α -tocoferolo ottenute dall'emulsione 12.	103
Figura 64. Profilo di distribuzione numerica ottenuto da un'analisi dell'immagine delle nanoparticelle di ALI7 ottenute dall'emulsione 12.	104
Figura 65. Andamento della percentuale di massa erosa nel tempo per ALI 7 e ALI 7 + TC [56].	106
Figura 66. . Immagine scattata al SEM delle particelle costituite da ALI7 caricate con α -tocoferolo post dissoluzione ottenute dall'emulsione 13.	107
Figura 67. Profili di distribuzione numerica ottenuti da un'analisi dell'immagine delle nanoparticelle di ALI7 caricate con α -tocoferolo pre e post-dissoluzione.	108
Figura 68. Immagine scattata al SEM delle particelle costituite da PMMA-AA non caricate α -tocoferolo ottenute dall'emulsione 14.	110
Figura 69. Percentuale di farmaco rilasciato sulla massa totale di polveri prodotte dall'emulsione 18 con carico teorico pari a 5.6%.	111
Figura 70. Percentuale di farmaco rilasciato sulla massa totale di polveri prodotte dall'emulsione 16 con carico teorico pari a 9.6%.	113
Figura 71. Profilo di rilascio del tocoferolo dalle particelle a base di PMMA-AA.	114
Figura 72. Profilo di rilascio del tamoxifen dalle particelle a base di PMMA-AA.	116
Figura 73. Spettro dell'assorbanza di una soluzione di α -TC in funzione della lunghezza d'onda.	127
Figura 74. Spettro traslato rispetto al valore dell'assorbanza a 400 nm.	128
Figura 75. Funzione esponenziale da sottrarre come linea di base allo spettro.	129
Figura 76. Sottrazione tra lo spettro dell'assorbanza e l'esponenziale.	129
Figura 77. Curva ottenuta dalla sottrazione (linea tratto-punto) fittata con la gaussiana (linea continua).	130
Figura 78. Valutazione della costante di proporzionalità tra costante ed assorbanza per il tocoferolo con i valori ottenuti dal metodo della sottrazione spettrale.	132

Figura 79. Risultati ottenuti dalla cromatografia liquida di un campione di soluzione con concentrazione di 0.41 g/l di tamoxifen.	133
Figura 80. Valutazione della costante di proporzionalità tra la concentrazione di tamoxifen e i valori dell'area ottenuti all'HPLC.	134
Figura 81. Valutazione della costante di proporzionalità tra concentrazione ed assorbanza per il PVA.	135
Figura 82. Funzione di distribuzione cumulativa percentuale "undersize".	139
Figura 83. Funzione densità di probabilità.	139
Figura 84. Relazione tra distribuzione cumulativa massica e numerica.	141
Figura 85. Relazione tra distribuzione di densità massica e numerica.	141

Indice delle tabelle

Tabella 1. Intervallo dimensionale utile per l'utilizzo delle nanoparticelle con tecniche di somministrazione non invasive.	6
Tabella 2. Composizione polimerica e dimensione media delle nanoparticelle caricate e non caricate.	27
Tabella 3. Valori della potenza elettrica (P) e dei flussi di calore (Q) dissipati.	41
Tabella 4. Condizioni operative adottate per la preparazione di particelle non caricate a base di PCL.	70
Tabella 5. Ampiezza e tempi di sonicazione definiti.	72
Tabella 6. Condizioni di partenza per la preparazione dell'emulsione 2.	73
Tabella 7. Condizioni di partenza per la preparazione dell'emulsione 3.	75
Tabella 8. Condizioni di partenza per la preparazione dell'emulsione 4.	76
Tabella 9. Parametri per lo step di separazione delle nanoparticelle.	76
Tabella 10. Grado di polimerizzazione e percentuale di idrolisi per differenti tipologie di PVA.	80
Tabella 11. Condizioni di partenza per la preparazione dell'emulsione 5.	81
Tabella 12. Velocità e tempi di centrifugazione adottati durante la fase di separazione delle particelle.	82
Tabella 13. Condizioni di partenza per la preparazione dell'emulsione 6.	86
Tabella 14. Caratteristiche delle polveri ottenute dall'emulsione 6.	87
Tabella 15. Caratteristiche generali delle particelle di PCL caricate con α -tocoferolo.	88
Tabella 16. Condizioni di partenza per la preparazione dell'emulsione 7.	89
Tabella 17. Caratteristiche delle polveri ottenute dall'emulsione 7.	89
Tabella 18. Caratteristiche generali delle particelle di PCL con carico doppio di α -tocoferolo.	90
Tabella 19. Condizioni di partenza per la preparazione dell'emulsione 8.	90
Tabella 20. Condizioni di partenza per la preparazione dell'emulsione 9.	96

Tabella 21. Condizioni di partenza per la preparazione dell'emulsione 10.	98
Tabella 22. Caratteristiche delle polveri ottenute dall'emulsione 10.	98
Tabella 23. Condizioni di partenza per la preparazione dell'emulsione 11.	99
Tabella 24. Condizioni di partenza per la preparazione dell'emulsione 12.	102
Tabella 25. Caratteristiche delle polveri ottenute dall'emulsione 12.	104
Tabella 26. Condizioni di partenza per la preparazione dell'emulsione 13.	104
Tabella 27. Condizioni di partenza per la preparazione dell'emulsione 14.	109
Tabella 28. Condizioni di partenza per la preparazione dell'emulsione 15.	110
Tabella 29. Caratteristiche delle polveri ottenute dall'emulsione 15.	111
Tabella 30. Condizioni di partenza per la preparazione dell'emulsione 16.	112
Tabella 31. Caratteristiche delle polveri ottenute dall'emulsione 16.	113
Tabella 32. Caratteristiche generali delle particelle di PMMA-AA caricate con α -tocoferolo.	114
Tabella 33. Condizioni di partenza per la preparazione dell'emulsione 17.	115
Tabella 34. Caratteristiche generali delle particelle di PMMA-AA caricate con tamoxifen.	116

Bibliografia

1. Moghimi S. M., Hunter A. C. and Murray J. C. Nanomedicine: current status and future prospects, *Faseb J.*, **19** (3), 311–330 (2005)
2. Torchilin V.P., Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging, *The AAPS Journal*, **9** (2), E128-47 (2007)
3. Freitas R. A., Current status of nanomedicine and medical nanorobotics, *Computational and Theoretical Nanoscience*, **2**, 1-25 (2005)
4. Breunig M., Bauer S., Goepferich A., Polymers and nanoparticles: Intelligent tools for intracellular targeting?, *Eur J Pharm Biophar*, **68**, 112–128 (2008)
5. Muller R. H., Jacobs C. and Kayser O., Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy rational for development and what we can expect for the future, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**, 3-19 (2001)
6. Yokogawa K., Nakashima E., Ishizaki J., Maeda H., Nagano T. and Ichimura F., Relationships in the structure-tissue distribution of basic drugs in the rabbit, *Pharm. Res.*, **7**, 691-696 (1990)
7. Ansel H. C., Allen L. V. and Popovich N. G., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, *Kluwer, Norwell, Massachusetts* (1999)
8. Couvreur P. and Vauthier C., Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease, *Pharmaceutical Research*, **23** (7), 1417-1450 (2006)
9. Braet F., Riches J., Geerts W., Jahn K.A., Wisse E., Frederik P., Three-dimensional organization of fenestrae labyrinths in liver sinusoidal endothelial cells, *Liver Int.*, **29** (4) , 603-13 (2009)
10. <http://www.pharma.ethz.ch/>
11. Win K.Y., Feng S.S., Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, **26** (15) 2713-2722 (2005)
12. Arruebo M., Fernández-Pacheco R., Ricardo Ibarra M. and Santamaría J., Magnetic nanoparticles for drug delivery, **2** (3), 22-32 (2007)

13. Goins B., Phillips T., Radiolabeled liposomes for imaging and biodistribution studies. In: Torchilin V.P., Weissig V., editors. *Liposomes: A Practical Approach*, Oxford University Press, 319–336 (2003)
 14. <http://www.whoguideline.blogspot.it/>
 15. <http://www.galenotech.org>
 16. Letchford K., Burt H., A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes, *Eur J Pharm Biopharm*, **65** (3), 259-69 (2007)
 17. Jones M. and Leroux J., Polymeric micelles: a new generation of colloidal drug carriers, *Eur J Pharm Biopharm*, **48**, 101-111 (1999)
 18. Torchilin V.P., Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. *Pharm Res*, **24** (1), 1-16 (2007)
 19. Jones M. and Leroux J., Polymeric micelles: a new generation of colloidal drug carriers. *Eur J Pharm Biopharm*, **48**, 101-111.
 20. Kabanov A.V. and Vinogradov S.V., Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **48**, 5418-5429 (2009)
 21. Oishi M., Nagasaki Y., Stimuli-responsive smart nanogels for cancer diagnostics and therapy, *Nanomedicine (Lond.)*, **5**(3), 451–468 (2010)
 22. Colombo P., Castellani P.L., Gazzaniga A., Menegatti E., Vidale E., Principi di tecnologie farmaceutiche, *Casa Editrice Ambrosiana, Milano* (2004)
 23. Müller R.H., Mäder K., Gohla S., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art, *Eur J Pharm Biopharm*, **50**(1), 161-77 (2000)
 24. Jung T. et al, Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake?, *Eur J Pharm Biopharm*, **50**, 147-160 (2000)
 25. Anton N. et al., Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review, *Journal of Controlled Release*, **128**(3), 185-199 (2008)
 26. Vauthier C. and Bouchemal K., Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles, *Pharmaceutical Research*, **26**(5) (2009)
 27. Pinto Reis C., Neufeld R. J., Ribeiro A.J., Francisco Veiga, Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine J.*, **2**, 8-21 (2006)
 28. Byrappa K., Ohara S., Adschiri T., Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology – towards biomedical applications, *adv drug deliv rev*, **60** (3), 299–327, (2008)
-

29. Benoit M.A., Baras B., Gillard J., Preparation and characterization of protein-loaded poly(epsilon-caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery, *Int J Pharm.*, **184**(1),73-84 (1999)
 30. Abismail B., Canselier J.P., Wilhelm A.M., Delmas H., Gourdon C., Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability, *Ultrasonics Sonochemistry*, **6**, 75–83, (1999)
 31. Beom-Su Kim, Cheol-Sang Kim and Kang-Min Lee, The Intracellular Uptake Ability of Chitosan-coated Poly (D,L-lactide- co-glycolide) Nanoparticles, *Arch Pharm Res*, **31**(8), 1050-1054 (2008)
 32. Pérez E., Benito M., Teijón C., Olmo R., Teijón J.M. and Dolores Blanco M., Tamoxifen-loaded nanoparticles based on a novel mixture of biodegradable polyesters: characterization and in vitro evaluation as sustained release systems, *J. Microencapsul.*, **29**(4),309-22 (2012)
 33. Murakami H.,Kobayashi M., Takeuchi H., Kawashima Y., Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method, *International Journal of Pharmaceutics*, **187**, 143–152 (1999)
 34. Makhlof A., Tozuka Y., Takeuchi H., pH-Sensitive nanospheres for colon-specific drug delivery in experimentally-induced colitis rat model, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **72**, 1-8, (2009)
 35. Sahoo S.K., Panyam J., Prabha S. , Labhasetwar V., Residual polyvinyl alcohol associated with poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake, *Journal of Controlled Release*, **82**,105-114 (2002)
 36. Byun Y., Hwang J. B., Bang S. H., Darby D., Cooksey K., Dawson P. L., Park H. J., Whiteside S., Formulation and characterization of α -tocopherol loaded poly ϵ -caprolactone (PCL) nanoparticles, *LWT - Food Science and Technology*, **44**, 24-28 (2011)
 37. Li M. K. and Fogler H. S., Acoustic emulsification. Part 1. The instability of the oil-water interface to form the initial droplets, *Journal of Fluid Mechanics*, **88**(3), 499-511 (1978)
 38. Li M. K. and Fogler H. S., Acoustic emulsification. Part 2. Breakup of the large primary oil droplets in a water medium, *Journal of Fluid Mechanics*, **88**(3), 513-528 (1978)
 39. Behrend O., Ax K., Schubert H., Influence of continuous phase viscosity on emulsification by ultrasound, *Ultrasonics Sonochemistry*, **7**, 77–85 (2000)
 40. Snejdrova E. and Dittrich M., Pharmaceutical Applications of Plasticized Polymers, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Czech Republic
-

41. Middleton John C., Tipton Arthur J., Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices, *Biomaterials*, **21**, 2335-2346, (2000)
 42. Nimish Shah, R. K. Mewada and Tejal Shah, Application of biodegradable Polymers in Controlled drug Delivery, International conference on current trends in technology, NUiCONE (2011)
 43. Jayanth P., Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles, *Journal of Controlled Release*, **92**, 173–187 (2003)
 44. Tesi di laurea di Vecchione A., Sintesi e caratterizzazione di copolimeri statistici lattide/caprolattone, Laurea in Chimica, Università degli Studi di Salerno (2012)
 45. Barba A.A., Dalmoro A., De Santis F., Lamberti G., Synthesis and characterization of P(MMA-AA) copolymers for targeted oral drug delivery, *Polymer Bulletin*, **62**(5), 679-688 (2009)
 46. Barba A.A et al., Intensification of biopolymeric microparticles production by ultrasonic assisted atomization. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **48**(10), 1475-1481 (2009)
 47. Sipos P., Csóka I., Srčič S., Pintye-Hódi K., Erós I., Influence of Preparation Conditions on the Properties of Eudragit Microspheres Produced by a Double Emulsion Method, *Drug Develop.Res.*, **64** (2), 41-54 (2005)
 48. Coulson J., Richardson J., Chemical Engineering, Volume 2: Particle Technology and separation processes, Pergamon (1991)
 49. Malvern Instruments Ltd. 2003, 2004, Zetasizer Nano Series User Manual
 50. Thesis by Tao J., Effects of Molecular Weight and Solution Concentration on Electrospinning of PVA, Degree of Master of Science in Materials Science and Engineering Worcester Polytechnic Institute, 2003
 51. Ye W.P., Du F.S., Jin W.H., Yang J.Y., Xu Y., In vitro degradation of poly(caprolactone), poly(lactide) and their block copolymers: influence of composition, temperature and morphology, *Reactive & Functional Polymers*, **32**, 161-168 (1997)
 52. Koontz J., Marcy J., O'Keefe S., Duncan S., Long T., Moffitt R., Polymer Processing and Characterization of LLDPE Films Loaded with α -Tocopherol, Quercetin, and Their Cyclodextrin Inclusion Complexes, *Journal of Applied Polymer Science*, **117**, 2299-2309 (2010)
 53. Miller-Chou B. A., Koenig J. L., A review of polymer dissolution, *Progress in Polymer Science*, **28**, 1223-1270 (2003)
 54. Richards Grayson A. C., Cima M. J., Langer R., Size and Temperature effects on poly(lactic-co-glycolic acid) degradation and microreservoir device performance, *Biomaterials*, **26**, 2137-2145 (2005)
-

- 55. Tesi di laurea di Schiano P., Co-polimeri random di PLA e PCL per il rilascio di farmaci: studio dei fenomeni erosivi, Laurea in Ingegneria Chimica, Università degli Studi di Salerno (2013)
 - 56. Tesi di laurea di Vascello C., Produzione di microparticelle a base di alginato mediante atomizzazione assistita da ultrasuoni, Laurea in Ingegneria Chimica, Università degli Studi di Salerno (2010)
-

RINGRAZIAMENTI

Grazie al professore Gaetano Lamberti e alla professoressa Anna Angela Barba che mi hanno dato la possibilità di far parte di un gruppo di ricerca coinvolgente, affiatato e più che gioviale e soprattutto di avermi guidato con la loro esperienza rassicurandomi e calmandomi (solo in parte perché questo è difficile!).

Grazie a Lisi, la mia “dottoranda”: lavorare con lei è stata una vera e propria bomba (con tutti i significati annessi al termine).

Sono grata a Rossella, l’amica che tutti vorrebbero avere e che io ho.

Grazie alle amiche di sempre, Carmen, Simona, Silvia e Caterina: se mai le nostre strade dovessero separarsi sono certa che ci ritroveremo.

Ringrazio Francesco a cui spesso chiedono: “Ma come la sopporti?”. Vi assicuro che mi su/sopporta.

Grazie a Valentina, compagna di intense giornate di studio e di grasse risate (i meriti vanno soprattutto all’acqua!): senza di lei sarei ancora a – n esami!

Ringrazio, difficile a crederci, la mia amica svampita Margherita, nonchè mia personal fashion stylist!

Grazie di cuore a Silvio, Francesca, Sara e Mara, indimenticabile, instancabile e leggendario trio : con loro si vive bene.

Infine sono grata alla mia famiglia caotica: a mio fratello Enrico, per la saggezza, a mia madre MaryRose per l’energia e a papà Pino per l’indomabilità. Per loro dire grazie non sarà mai abbastanza.

Clara
