

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

DYSCYPLINA NAUKOWA - INŻYNIERIA CHEMICZNA

DZIEDZINA NAUK – NAUKI INŻYNIERYJNO-TECHNICZNE

Rozprawa doktorska

mgr inż. Ewa Rybak

**Otrzymywanie nanocząstek polimerowych metodą
nanoprecypitacji, ocena ich właściwości do zastosowania jako
potencjalne nośniki leków**

Promotor

Prof. dr hab. inż. Tomasz Ciach

Promotor pomocniczy

Dr Jakub Trzcíński

WARSZAWA 2024

Serdecznie dziękuję moim Rodzicom oraz Siostram za nieustające wsparcie, cierpliwość i wiarę w moje możliwości na każdym etapie tej pracy. Wasza obecność i motywacja były nieocenione w momentach wyzwań.

Z całego serca dziękuję mojemu Narzeczonemu za wyrozumiałość, motywację i wsparcie, które pomogły mi pokonywać codzienne trudności i realizować zamierzone cele.

Szczególne podziękowania kieruję do Profesora Tomasza Ciacha oraz dr Jakuba Trzcńskiego za ich cenne wskazówki, ogromne zaangażowanie i nieocenioną pomoc w realizacji tej rozprawy.

Wyrażam również głęboką wdzięczność Profesorowi Jakubowi Gacowi za wsparcie w opracowaniu modelu, który stał się podstawą jednego z rozdziałów niniejszej pracy oraz artykułu naukowego.

Dziękuję także Koleżankom i Kolegom z Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej za stworzenie wspierającej atmosfery oraz pomoc w pokonywaniu codziennych wyzwań badawczych.

Pracę tę dedykuję pamięci Dziadzia Tadzia.

Streszczenie

Celem pracy było opracowanie metody wytwarzania biozgodnych nanocząstek polikaprolaktonowych (PCL NP) zdolnych do transportu substancji aktywnych, które mogą znaleźć zastosowanie w systemach dostarczania leków lub diagnostyce medycznej. Syntezę nanocząstek przeprowadzono metodą nanoprecypitacji, analizując wpływ parametrów procesowych, takich jak skład faz, temperatura, metoda mieszania oraz zastosowanie dodatków, na właściwości fizykochemiczne nanocząstek, w tym ich rozmiar i stabilność koloidalną.

W ramach pracy zbadano możliwość integracji superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (SPIONów) z PCL NP, co pozwala na nadanie nanocząstkom właściwości magnetycznych. Zaprojektowano również rozwiązania pozwalające na usprawnienie procesu separacji i oczyszczania nanocząstek. W pracy uwzględniono ocenę biozgodności wytworzonych systemów, w tym ich potencjału do transportu substancji modelowych, cytotoksyczności oraz interakcji z modelowymi liniami komórkowymi. Przeanalizowano także możliwości kontrolowanego uwalniania enkapsulowanych substancji aktywnych.

Kluczowym elementem badań było opracowanie modelu numerycznego procesu nanoprecypitacji, który wspiera projektowanie i optymalizację nanocząstek pod kątem ich właściwości i zastosowań. Wyniki pracy stanowią podstawę do dalszego rozwoju technologii wytwarzania nanocząstek polimerowych i hybrydowych, umożliwiając ich wykorzystanie w biomedycynie.

Słowa kluczowe: nanoprecypitacja, nanocząstki polikaprolaktonowe, układy mikroprzepływowe, systemy dostarczania leków, nanocząstki magnetyczne, model numeryczny

Abstract

This study aimed to develop a method for producing biocompatible polycaprolactone nanoparticles (PCL NP) capable of delivering active substances, with potential applications in drug delivery systems or medical diagnostics. The synthesis of nanoparticles was carried out using the nanoprecipitation method, analyzing the influence of process parameters such as phase composition, temperature, mixing method, and the use of additives on the physicochemical properties of the nanoparticles, including their size and colloidal stability.

The study also explored the integration of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) with PCL NP, enabling the nanoparticles to acquire magnetic properties. Solutions for improving the separation and purification processes of the nanoparticles were also developed. The research included an assessment of the biocompatibility of the produced systems, including their potential for transporting model substances, cytotoxicity, and interactions with model cell lines. The controlled release capabilities of encapsulated active substances were also analyzed.

A key element of the research was developing a numerical model of the nanoprecipitation process, which supports the design and optimization of nanoparticles based on their properties and applications. The study results provide a foundation for further development of polymeric and hybrid nanoparticle production technologies, enabling their application in biomedicine.

Keywords: nanoprecipitation, polycaprolactone nanoparticles, microfluidic systems, drug delivery systems, magnetic nanoparticles, numerical model

Spis treści

Streszczenie	5
Abstract	6
Spis treści	7
Lista publikacji związanych z tematyką rozprawy doktorskiej.....	11
Lista publikacji niezwiązanych z tematyką rozprawy doktorskiej.....	11
Lista projektów uwzględnionych w rozprawie doktorskiej	12
Lista projektów nieuwzględnionych w rozprawie doktorskiej	13
Wystąpienia konferencyjne związane z tematyką doktoratu	13
Wystąpienia konferencyjne niezwiązane z tematyką doktoratu.....	13
Nagrody	14
Opieka nad studentami	14
Wykaz skrótów.....	15
Lista symboli	18
1. Wprowadzenie.....	21
1.1. Nanoprecypitacja.....	21
1.1.1. Mechanizm precypitacji	22
1.1.2. Parametry mające wpływ na proces otrzymywania nanocząstek metodą nanoprecypitacji	23
1.1.2.1. Mieszanie	24
1.1.2.2. Temperatura.....	26
1.1.2.3. Natężenie przepływu faz, stosunek objętości faz.....	27
1.1.3. Techniki mikroprzepływowe	28
1.1.4. Kryteria wyboru polimeru	31
1.1.5. Kryteria wyboru rozpuszczalnika.....	34
1.1.6. Surfaktanty	37
1.1.7. Zalety i ograniczenia nanoprecypitacji.....	39

1.2.	Metody charakterystyki nanocząstek	40
1.2.1.	Metoda dynamicznego rozpraszania światła (DLS).....	41
1.2.1.1.	Teoria rozpraszania Rayleigh'a i Mie	42
1.2.1.2.	Polidispersyjność.....	44
1.2.1.3.	Potencjał zeta.....	44
1.2.2.	Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)	46
1.3.	Zamykanie substancji w nanocząstkach.....	47
1.3.1.	Enkapsulacja substancji hydrofobowych	48
1.3.2.	Parametry oceniające efektywność enkapsulacji substancji w nanocząstkach	49
1.3.3.	Mechanizm uwalniania substancji enkapsulowanych z nanocząstek.....	50
1.4.	Badanie interakcji nanocząstek z komórkami	51
1.5.	Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza.....	52
2.	Cele i założenia pracy	53
3.	Materiały i metody	54
3.1.	Wybór polimeru i stosunku przepływu fazy wodnej do organicznej	54
3.2.	Wybór rozpuszczalników organicznych.....	54
3.3.	Wybór surfaktantu	54
3.4.	Metody syntezy nanocząstek polimerowych.....	54
3.4.1.	Metoda dozowania kroplami (DNP)	56
3.4.2.	Metoda jednorazowego wstrzyknięcia (WNP).....	57
3.4.3.	Układy mikroprzepływowe (MNP).....	57
3.4.4.	Dodatek etanolu jako współrozpuszczalnika	59
3.5.	Odparowanie rozpuszczalników	60
3.6.	Oczyszczanie i zateżnianie zawiesin nanocząstek	60
3.7.	Badanie wpływu temperatury fazy wodnej na rozmiar polimerowych nanocząstek	61
3.8.	Badanie stabilności zawiesin nanocząstek	61
3.9.	Analiza fizykochemiczna	61

3.9.1.	Dynamiczne rozpraszanie światła	61
3.9.2.	Skaningowa mikroskopia elektronowa	62
3.9.3.	Spektroskopia Fourierowska w podczerwieni.....	63
3.10.	Enkapsulacja i uwalnianie barwnika <i>in vitro</i>	64
3.11.	Badania komórkowe.....	65
3.11.1.	Hodowla komórek.....	65
3.11.2.	Test cytotoksyczności MTT	66
3.11.3.	Mikroskopia konfokalna	67
3.12.	Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (SPIONy)	68
3.12.1.	Synteza NP tlenku żelaza	68
3.12.2.	Synteza PCL NP zawierających SPIONy.....	69
3.12.3.	Metoda separacji	70
4.	Wyniki.....	73
4.1.	Wybór polimeru i dobór parametru R	73
4.2.	Wybór rozpuszczalników organicznych.....	75
4.3.	Wybór surfaktantu	77
4.4.	Metody łączenia faz	81
4.5.	Odparowanie rozpuszczalników organicznych	83
4.6.	Oczyszczanie i zatężanie zawiesin nanocząstek	85
4.7.	Wpływ temperatury fazy wodnej na rozmiar otrzymywanych nanocząstek.....	88
4.8.	Badanie stabilności zawiesin nanocząstek polimerowych.....	90
4.9.	Enkapsulacja barwnika hydrofobowego	93
4.9.1.	DLS	93
4.9.2.	SEM.....	94
4.9.3.	FTIR	94
4.9.4.	Uwalnianie barwnika <i>in vitro</i>	95
4.10.	Badania komórkowe.....	99

4.10.1.	Test cytotoksyczności MTT	99
4.10.2.	Mikroskopia konfokalna	101
4.11.	Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza.....	102
4.11.1.	Otrzymane NP tlenku żelaza	102
4.11.2.	Analiza fizykochemiczna PCL-SP NP	104
4.11.3.	Separacja magnetyczna w układzie przepływowym.....	106
5.	Wnioski	108
6.	Model	112
6.1.	Wprowadzenie.....	112
6.2.	Opis wykorzystanego modelu	113
6.3.	Metody i zakres badań.....	114
6.4.	Wyniki eksperymentalne	115
6.4.1.	Wpływ stężenia PCL i etanolu jako współrozpuszczalnika	115
6.4.2.	Wpływ stężenia surfaktantu	118
6.5.	Weryfikacja modelu	120
6.6.	Dyskusja	121
7.	Podsumowanie	123
	Materiały i sprzęt.....	125
	Spis rysunków	127
	Spis tabel	131
	Bibliografia.....	132

Lista publikacji związanych z tematyką rozprawy doktorskiej

1. **Ewa Rybak**, Piotr Kowalczyk, Sylwia Czarnocka-Śniadała, Michał Wojasiński, Jakub Trzciniński, Tomasz Ciach. „Microfluidic-Assisted Formulation of ϵ -Polycaprolactone Nanoparticles and Evaluation of Their Properties and In Vitro Cell Uptake”, *Polymers (Basel)*. 15 (2023). DOI: 10.3390/polym15224375. (IF: 4,7; CS: 8; punkty ministerialne: 100).
2. **Ewa Rybak**, Jakub Trzciniński, Jakub Gac, Tomasz Ciach. „Modeling and Experimental Verification of Polycaprolactone Nanoparticle Precipitation”, *Journal of Colloid and Interface Science*. Artykuł w recenzji.

Rozdziały w monografii

3. **Ewa Rybak**, Tomasz Ciach. „Preparation of polycaprolactone nanoparticles via nanoprecipitation method and evaluation of their properties”, *EYEC Monograph: 9th European Young Engineers Conference (2021) Warszawa, Politechnika Warszawska, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej*, s.69-74, Numer artykułu: 6.6, ISBN 978-83-936575-9-9.
4. **Ewa Rybak**, Tomasz Ciach. ”Investigation of the properties of polymeric nanoparticles obtained by nanoprecipitation method” *Chemical and process engineering for the environment and health*, Tomasz Sosnowski, Maciej Szwaast (*red.*) (2020), Radom, Sieć Badawcza Łukasiewicz - Instytut Technologii Eksploatacji, s.134-142, ISBN 978-83-7789-629-7.

Lista publikacji niezwiązanych z tematyką rozprawy doktorskiej

1. Paulina Trzaskowska, **Ewa Rybak**, Krystyna Jabłońska-Ławniczak, Aleksandra Drzewiecka-Antonik, Anna Wolska, Jakub Krzemiński, Beata Butruk-Raszeja, Tomasz Ciach. „The potential of electropolymerized crosslinked PEGDMA coating on steel for further functionalization: Surface parameters and HMEC-1 cells attachment correlations”, *Appl. Surf. Sci.* 635 (2023). DOI: 10.1016/j.apsusc.2023.157761. (IF: 6,3; CS: 12,5; punkty ministerialne: 140).
2. Paulina Trzaskowska, Aleksandra Kuźmińska, Beata Butruk-Raszeja, **Ewa Rybak**, Tomasz Ciach. “Electropolymerized hydrophilic coating on stainless steel for biomedical applications”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (2018) vol. 167, ss.

499-508. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.04.052. (IF: 5,4; CS: 11,1; punkty ministerialne: 100).

3. **Ewa Rybak**, Paulina Trzaskowska, Tomasz Ciach. „Preparation and analysis of the surface of modified materials and their applications as a surface for endothelial cell culture” EYEC Monograph: 8th European Young Engineers Conference (2019) Warszawa, Politechnika Warszawska, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, s.326-326, ISBN 978-83-936575-7-5.

Lista projektów uwzględnionych w rozprawie doktorskiej



Otrzymywanie nanocząstek polikaprolaktonowych metodą precypitacji w układzie mikroprzepływowym

Grant dziekański (2019/2020)

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska



Nanosystemy sprzężone z fragmentami przeciwciał do celowanej terapii infekcji mózgu

[Nanosystems conjugated with antibody fragments for treating brain infections]

EuroNanoMed III (TARBRAINFECTION), 16/EuroNanoMed/2019

Lista projektów nieuwzględnionych w rozprawie doktorskiej



Nowa metoda regeneracji krążka międzykręgowego

[A new regeneration method of intervertebral disc]

Dyskopol, POIR.04.01.04-00-0007/17



Nanoporowate membrany do dooponowego (pseudo)podawania leków

[Nanoporous-membranes for intrathecal (pseudo)delivery of drugs]

ENM3/IV/1/INTREPIDUS/2021

Wystąpienia konferencyjne związane z tematyką doktoratu

1. Prezentacja ustna “*Preparation of polycaprolactone nanoparticles via nanoprecipitation method and evaluation of their properties*”, 9th European Young Engineers Conference, 2021, Warszawa

Wystąpienia konferencyjne niezwiązane z tematyką doktoratu

2. Prezentacja ustna “*Preparation and analysis of the surface of modified steel materials and their applications as a surface for endothelial cell culture*”, 8th European Young Engineers Conference, 2019, Warszawa

Nagrody

1. Nagroda dziekana za wybitne osiągnięcia naukowe w semestrze zimowym roku akademickiego 2023/2024, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska
2. Stypendium pro Jakościowe dla najlepszych doktorantów (2018-2023), Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska
3. Reprezentowanie Politechniki Warszawskiej w VI Ogólnopolskich Mistrzostwach Doktorantek i Doktorantów w Siatkówce Halowej (1 miejsce)

Opieka nad studentami

1. Praca magisterska, Konrad Siwiec, „Otrzymywanie nanocząstek polimerowych w układzie mikroprzepływowym” (2022).
2. Praca magisterska, Tymoteusz Kraska, „Zastosowanie układu mikroprzepływowego do wytwarzania nanocząstek polimerowych” (2021).
3. Praca magisterska, Sandra Pacin Lopez, „Study of the parameters influencing nanoprecipitation for polymeric particle size minimization using a microfluidic technique”, (2020).
4. Opieka nad stażystą ze Stanów Zjednoczonych, 3 miesiące, 2019, IChIP PW
5. Opieka nad 2 studentkami z Hiszpanii, 6 miesięcy, 2018/2019, IChIP PW.

Wykaz skrótów

Ac	- aceton
BSA	- surowicza albumina wołowa (<i>ang. bovine serum albumin</i>)
CAF	- fibroblasty związane z rakiem (<i>ang. cancer-associated fibroblasts</i>)
CFD	- obliczeniowa mechanika płynów (<i>ang. computational fluid dynamics</i>)
CQMOM	- warunkowa kwadraturowa metoda momentów (<i>ang. conditional quadrature method of moments</i>)
DAPI	- 4',6-diamidyno-fenylindol
DCM	- dichlorometan
DL%	- % załadowania substancją aktywną (<i>ang. drug loading</i>)
DLA	- agregacja ograniczona dyfuzją (<i>ang. diffusion-limited aggregation</i>)
DLC	- koalescencja ograniczona dyfuzją (<i>ang. diffusion-limited coalescence</i>)
DLS	- dynamiczne rozpraszanie światła (<i>ang. Dynamic Light Scattering</i>)
DMA	- dimetyloacetamid
DMEM	- medium hodowlane do komórek L929 i MG63 (<i>ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	- dimetylosulfotlenek
DNP	- nanocząstki otrzymane metodą dozowania fazy organicznej kroplami/ metoda dozowania fazy organicznej kroplami
DPBS	- roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanami, niezawierająca jonów magnezu (Mg^{2+}) i wapnia (Ca^{2+})
DQMOM	- bezpośrednia kwadraturowa metoda momentów (<i>ang. direct quadrature method of moments</i>)
EDL	- podwójna warstwa elektryczna (<i>ang. electrical double layer</i>)
EDTA	- kwas wersenowy
EE%	- efektywność enkapsulacji (<i>ang. encapsulation efficiency</i>)
F127	- Pluronic® F-127
FDA	- amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (<i>ang. Food and Drug Administration</i>)
FTIR	- spektroskopia fourierowska w podczerwieni
H ₂ O	- woda

He	- hel
ISO	- Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (<i>ang. International Organization of Standardization</i>)
KBr	- bromek potasu
MD	- dynamika molekularna (<i>ang. molecular dynamics</i>)
MNP	- nanocząstki otrzymane z wykorzystaniem układu mikroprzepływowego/ metoda z wykorzystaniem układu mikroprzepływowego
MTT	- bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu
Ne	- neon
NP	- nanocząstki
OE	- octan etylu
PACA	- poli(cyjanoakrylan) alkilu
PBS	- bufor fosforanowy
PCL	- polikaprolakton
PCS	- spektroskopia korelacji fotonów (<i>ang. photon correlation spectroscopy</i>)
PDI	- indeks polidispersyjności (<i>ang. polydispersity index</i>)
PDMS	- żywica polidimetylosiloksanowa
PEG	- poli(glikol etylenowy)
Pen-Strep	- penicylina-streptomycyna
PGA	- poliglikolid, poli(kwas glikolowy)
PLA	- polilaktyd, poli(kwas mlekowy)
PLGA	- kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego
PMMA	- poli(metakrylan metylu)
PVA	- poli(alkohol winylowy)
QMOM	- kwadraturowa metoda momentów (<i>ang. quadrature method of moments</i>)
RT	- temperatura pokojowa (<i>ang. room temperature</i>)
RC	- regenerowana celuloza
RM	- rezonans magnetyczny
SEM	- skaningowa mikroskopia elektronowa
T	- dihydrat trehalozy, trehaloza
T80	- Tween®80
t_{dyf}	- czas spotkania łańcuchów polimerowych w wyniku dyfuzji
T_g	- temperatura zeszklenia (<i>ang. glass temperature</i>)

t_k	- czas krytyczny
t_m	- czas mieszania
T_m	- temperatura topnienia (<i>ang. melting temperature</i>)
TME	- mikrośrodowisko guza (<i>ang. tumor microenvironment</i>)
THF	- tetrahydrofuran
Tol	- toluen
t_z	- czas reorganizacji lub zapadania się łańcuchów polimerowych
UE	- Unia Europejska
WNP	- nanocząstki otrzymane metodą jednorazowego wstrzyknięcia fazy organicznej do wodnej/ metoda jednorazowego wstrzyknięcia fazy organicznej do wodnej
ZP	- potencjał zeta (ζ)

Lista symboli

S	- współczynnik przesylenia [-]
C_i	- rozpuszczalność substancji i [mol/m^3 lub mol/L]
C_∞	- stężenie równowagowe [mol/m^3 lub mol/L]
ΔG	- energia swobodna tworzenia zarodka (bariera energetyczna) [J]
σ	- napięcie międzyfazowe [J/m^2 lub N/m]
v	- objętość molowa substancji rozpuszczonej [m^3/mol]
k_B	- stała Boltzmanna ($1,38064852 \cdot 10^{-23}$ J/K)
T	- temperatura [K]
N_r	- szybkość zarodkowania [$\text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$]
s	- przesylenie [mol/m^3 lub mol/L]
c_i	- stężenie składnika w roztworze [mol/m^3 lub mol/L]
c^*_i	- rozpuszczalność substancji i [mol/m^3 lub mol/L]
Q_w	- szybkość przepływu fazy wodnej [m^3/s]
Q_{org}	- szybkość przepływu fazy organicznej [m^3/s]
K_g	- stała szybkości wzrostu cząstek [m/s]
Re	- liczba Reynoldsa [-]
d	- charakterystyczna długość [m]
u	- prędkość płynu [m/s]
ρ	- gęstość płynu [kg/m^3]
μ	- lepkość dynamiczna płynu [$\text{Pa} \cdot \text{s} = \text{N} \cdot \text{s}/\text{m}^2$]
Pe	- liczba Pecleta [-]
D	- współczynnik dyfuzji [m^2/s]
t	- czas [s]
R	- stała gazowa ($8314 \text{ J} \cdot \text{kmol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
R_h	- promień hydrodynamiczny [m]
κ	- przewodność elektryczna [S/m]
ε	- przenikalność dielektryczna ośrodka [F/m]
ε_r	- względna przenikalność dielektryczna ośrodka [-]
ε_0	- przenikalność dielektryczna próżni ($8,85 \cdot 10^{-12}$ F/m)

K	- odwrotność grubości podwójnej warstwy elektrycznej (promienia Debye'a) [m ⁻¹]
N_A	- stała Avogadra ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
a	- promienia cząstki [m]
e	- ładunek elementarny ($1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$)
I	- siła jonowa [mol/L]
μ_e	- ruchliwość elektroforetyczna [m ² /(V·s)]
V	- prędkość naładowanych cząstek w polu elektrycznym [m/s]
E	- natężenie pola elektrycznego [V/m]
η	- współczynnik lepkości ośrodka [Pa·s]
$D_{h,0}$	- początkowa wartość średnicy cząstek [m]
D_h	- średnica cząstki w czasie t [m]
τ_{cs}	- skala czasowa koalescencji [s]
c_{p0}	- początkowe stężenie liczbowe cząstek na jednostkę objętości [m ⁻³]
A	- całkowita powierzchnia cząstek [m ² /m ³]
a	- równoważna średnica cząsteczki środka powierzchniowo czynnego [m]

1. Wprowadzenie

1.1. Nanoprecypitacja

Metodę nanoprecypitacji, nazywaną także wypieraniem rozpuszczalnika PCL NP wykazują wysoki stopień tolerancji komórkowej i zdolność do efektywnego wychwytu przez modelowe linie komórkowe, co sugeruje ich przydatność w inżynierii biomedycznej i terapii ukierunkowanej [1], [2], po raz pierwszy opisali Fessi i in. w 1989 r. [3]. Od tego czasu jest szeroko stosowana do wytwarzania szerokiej gamy nanocząstek (NP): polimerowych [4], białek załadowanych lekiem [5], czy nieorganicznych [6].

Zwykle hydrofobowe substancje rozpuszczone są w rozpuszczalniku organicznym mieszalnym z wodą, w którym mają wysoką rozpuszczalność. Następnie roztwór rozpuszczalnika dodaje się do nierozpuszczalnika objętościowo o dużo większym stosunku do rozpuszczalnika organicznego, takiego jak woda lub roztwory buforowe. Rzeczywiście, NP powstają w wyniku szybkiej dyfuzji rozpuszczalnika polimeru do nierozpuszczalnika, co prowadzi do wytrącenia polimeru i utworzenia NP [1]. Na koniec rozpuszczalnik organiczny usuwa się przez odparowanie. Technika ta nie wymaga sonikacji ani wysokich temperatur, w przeciwieństwie do niektórych procesów emulsyjnych [7]. Pozwala uzyskać wysoką skuteczność enkapsulacji, jest procesem ekonomicznym i prostym do implementacji [8]. Jednakże nanoprecypitacja ogranicza się do całkowicie mieszalnych z wodą rozpuszczalników i można ją stosować jedynie do skutecznego włączania leków lipofilowych do NP [7].

Zbadano nanoprecypitację w celu wytwarzania szerokiego spektrum składników hydrofobowych, w tym leków hydrofobowych, polimerów, białek hydrofobowych itp. Około 40% klinicznie zatwierdzonych leków i 90% opracowywanych leków to leki hydrofobowe o niskiej rozpuszczalności w wodzie [9]–[11]. Zamykanie leków hydrofobowych w NP zapewnia kilka korzyści, w tym poprawę rozpuszczalności i szybkości rozpuszczania w środowisku wodnym, zwiększając w ten sposób ich biodostępność, poprawę stabilności chemicznej niektórych leków i kontrolę kinetyki uwalniania leków, aby uzyskać dodatkowe funkcje i pożądane właściwości, m.in. wydłużenie okresu cyrkulacji leku w krwiobiegu czy podawanie dwóch leków jednocześnie dając efekt synergistyczny [12], [13]. Jednakże czyste NP leku są niestabilne i mają tendencję do agregacji. Dlatego środki powierzchniowo czynne, polimery lub lipidy zwykle współstrąca się z lekami, aby ustabilizować cząstki [14]. Nanoprecypitacja jest bardzo prostym i szybkim procesem wytwarzania NP polimerowych. Pozostają jednak pewne wyzwania, m.in. stabilność cząstek, precyzyjna kontrola ich wielkości

i rozkładu wielkości, pomyślnie ładowanie NP hydrofobowych oraz kontrolowane uwalnianie enkapsulowanych substancji.

1.1.1. Mechanizm precypitacji

Nanoprecypitacja polega na obniżeniu jakości rozpuszczalnika do rozpuszczania głównego składnika tworzącego NP. Taką różnicę w jakości rozpuszczalnika można osiągnąć poprzez zmianę pH, stężenia soli, warunków rozpuszczalności lub poprzez dodanie fazy nierozpuszczalnika [15]. Proces nanoprecypitacji obejmuje cztery etapy: wytwarzanie przesylenia, zarodkowanie, wzrost i koagulację [16]. Szybkość każdego etapu determinuje wielkość cząstek, a siłą napędową tych zjawisk jest stosunek stężenia polimeru do rozpuszczalności polimeru w mieszaninie rozpuszczalnika i nierozpuszczalnika. Krytycznym czynnikiem jednolitego tworzenia cząstek jest oddzielenie etapów zarodkowania i wzrostu [17], [18]. Korzystnie, warunki procesu powinny umożliwiać wysoki stopień zarodkowania silnie zależny od przesylenia i niskie tempo wzrostu [19]. Przesylenie ma miejsce, gdy roztwór zawiera więcej rozpuszczonej substancji niż wynika z równowagowej wartości nasycenia. W rzeczywistości dodatek nierozpuszczalnika zmniejsza siłę rozpuszczalnika organicznego do rozproszenia substancji, co wprowadza układ w stan przesylenia. Współczynnik przesylenia (S) wyraża się w następujący sposób:

$$S = \frac{C_i}{C_\infty} \quad (1)$$

gdzie C_i jest rozpuszczalnością substancji i , a C_∞ jest stężeniem równowagowym.

Szybkość przesylenia może wpływać na końcowe właściwości NP, gdzie wyższe przesylenie prowadzi do zmniejszenia wielkości cząstek. W celu uzyskania stabilności termodynamicznej, po przesyleniu rozpoczyna się etap zarodkowania. Występuje, gdy przesylenie układu osiąga granice poziomu krytycznego, który jest specyficzny dla stosunku rozpuszczalnika do nierozpuszczalnika. Innymi słowy, aby utworzyć zarodki, należy pokonać barierę energetyczną (ΔG).

$$\Delta G = \frac{16\pi\sigma^3v^3}{3k_B^2T^2(\ln S)^2} \quad (2)$$

gdzie σ jest napięciem międzyfazowym na granicy faz ciało stałe-ciecz, v jest objętością molową substancji rozpuszczonej, k_B jest stałą Boltzmanna, T jest temperaturą [20].

Lokalne wahania stężenia spowodowane przesyleniem prowadzą do powstania zarodków pierwotnych, które z kolei zwiększają swój rozmiar w wyniku połączenia cząsteczek substancji rozpuszczonej, aż osiągną rozmiar krytyczny, który jest stabilny przed rozpuszczeniem. Etap zarodkowania jest kontynuowany aż do momentu, gdy wzrost wcześniejszych zarodków wyczerpie przesylenie roztworu. Szybkość zarodkowania (N_r) w zależności od stopnia przesylenia S wytrącanej substancji w roztworze można wyrazić za pomocą następującego równania matematycznego [20], [21].

$$N_r = c \cdot \exp \left[-\frac{16\pi\sigma^3 v^2}{3k_B^3 T^3 (\ln S_r)^2} \right] \quad (3)$$

gdzie c jest stałą.

Zarodkowanie zatrzymuje się, gdy stężenie substancji rozpuszczonej spadnie poniżej krytycznego stężenia przesylenia, a zarodki rosną w wyniku kondensacji lub koagulacji. Kondensacja polega na dodawaniu pojedynczych cząsteczek do powierzchni cząstek. Odbywa się to w dwóch etapach: etap dyfuzji, w którym substancja rozpuszczona jest transportowana z płynu masowego przez warstwę graniczną roztworu przylegającą do powierzchni zarodków oraz etap osadzania, w którym zaadsorbowane cząsteczki substancji rozpuszczonej są integrowane z macierzą zarodków. Kiedy stężenie niezaadsorbowanej substancji rozpuszczonej spadnie poniżej równowagowego stężenia nasycenia, kondensacja ustaje. Szybkość kondensacji zmniejsza się w wyniku koagulacji [20], [21]. Z drugiej strony koagulacja polega na przyleganiu cząstek do siebie. Zachodzi to wtedy, gdy oddziaływania przyciągające (van der Waalsa, oddziaływania hydrofobowe itp.) są silniejsze od oddziaływań odpychających (odpychanie steryczne lub elektrostatyczne). Czynnikiem decydującym o etapie koagulacji jest częstotliwość zderzeń, która zależy od stężenia cząstek, wielkości i ich ruchu. Liczba zderzeń prowadzących do koagulacji nazywana jest efektywnością zderzeń i zależy od stosunku przyciągania i odpychania interakcji pomiędzy cząstkami. Aby zabezpieczyć cząstki przed koagulacją, podczas przygotowania można dodać środki stabilizujące. Takie środki mogą adsorbować się na powierzchni NP i wprowadzać interakcję odpychającą [16].

1.1.2. Parametry mające wpływ na proces otrzymywania nanocząstek metodą nanoprecypitacji

W nanoprecypitacji modyfikacja wielu parametrów powoduje istotne zmiany właściwości fizycznych NP pod względem m.in. wielkości, rozkładu średnic, skuteczności enkapsulacji leku [21]. Wpływ parametrów procesu, takich jak rodzaj, ilość i masa

cząsteczkowa polimeru, rodzaj rozpuszczalnika i nierozpuszczalnika, stosunek objętości użytego rozpuszczalnika do nierozpuszczalnika, wpływ stabilizatora i szybkość mieszania mają duży wpływ na wielkość NP [22]–[24]. Ze względu na wzrost lepkości utrudniający dyfuzję polimeru z rozpuszczalnika do nierozpuszczalnika, wzrost stężenia polimeru prowadzi do powstania większych NP [23]. Mniejsze NP w wąskim zakresie wielkości są produkowane przez rozpuszczalniki o wysokich współczynnikach dyfuzji, takie jak aceton i acetonitryl [25]. Ustalono również, że zmniejszenie stosunku objętościowego rozpuszczalnika do nierozpuszczalnika powoduje zmniejszenie rozmiarów NP [26]. Wykazano, że charakter stabilizatora i jego stężenie wpływają na wielkość NP [27], [28]. Badania dowiodły, że zwiększenie ilości środka powierzchniowo czynnego (np. Pluronic®F-127) zmniejsza wielkość NP, poprzez obniżenie napięcia międzyfazowego [29].

Ponieważ nanoprecypitacja jest procesem kontrolowanym kinetycznie, precyzyjna kontrola właściwości NP stanowi wyzwanie [20], [30], [31]. Wpływ parametrów procesu, takich jak: stężenie polimeru [31], [32] rodzaj rozpuszczalnika [33], szybkość mieszania [20], [34], [35] silnie wpływa na wytwarzanie NP polimerowych, a w szczególności na ich średnią wielkość NP i rozkład wielkości [36]–[39].

1.1.2.1. Mieszanie

Kinetycznie kontrolowany charakter nanoprecypitacji powoduje, że sposób i szybkość mieszania dwóch faz może silnie wpływać na tworzenie się NP, a poprzez to na wielkość, rozkład wielkości oraz zdolność do inkorporacji leku [20], [40]. Wiązą się z tym różne parametry, które bezpośrednio wpływają na kinetykę tworzenia cząstek. Należą do nich stężenie polimeru oraz zastosowany rozpuszczalnik organiczny. Podczas gdy ten pierwszy wpływa na odległości dyfuzji, drugi wpływa na granicę rozpuszczalności polimeru w mieszaninie woda-rozpuszczalnik [41].

Mieszanie jest procesem złożonym, który można scharakteryzować kilkoma skalami czasowymi charakteryzującymi różne etapy rozprowadzania jednego materiału w drugim, a następnie homogenizację mieszaniny. Mieszanie wpływa na redystrybucję przesylenia (s) zdefiniowanego równaniem (4), w całym układzie. Rozcieńcza ono przesycony roztwór mniej przesyconymi lub nienasyconymi płynami, a także umożliwia kontakt utworzonych wcześniej cząstek z obszarami o większym przesyleniu. W tych obszarach cząstki mogą rosnąć, co naturalnie prowadzi do zmniejszenia ogólnego przesylenia. Zwiększanie szybkości mieszania skraca także okres, w którym przesylenie jest wysokie. Etapy zarodkowania

i wzrostu zwykle różnią się znacznie pod względem wrażliwości na przesylenie, co wyjaśnia wpływ rozkładu przesylenia na wielkość cząstek.

$$S = c_i - c^*_i \quad (4)$$

gdzie c_i to stężenie składnika w roztworze, a c^*_i to rozpuszczalność substancji i .

Wartości stopnia przesylenia (S , równ. (1), podrozdział 1.1.1.) oraz przesylenia określają nadwyżkę aktualnego stężenia wytrącanej substancji w stosunku do stężenia równowagowego w danych warunkach i wraz ze stopniem przesylenia stanowią miarę siły napędowej procesu precypitacji [42]. Ogólnie przyjmuje się, że tworzenie NP w nanoprecypitacji staje się wrażliwe na mieszanie, gdy charakterystyczny czas mieszania (t_m) jest większy niż czas krytyczny (t_k , zwykle zależny od układu i warunków), podczas gdy jest praktycznie niezależny od mieszania, jeśli $t_m < t_k$ (tj. dla „szybkiego mieszania” w nanoprecypitacji błyskawicznej, *ang. flash nanoprecipitation*) [34], [43], [44].

Na poziomie molekularnym zostało to zinterpretowane w kategoriach względnych szybkości trzech procesów: mieszania fazy wodnej i organicznej, związanych z czasem mieszania (t_m), reorganizacji lub zapadania się łańcuchów polimerowych (z charakterystycznym czasem t_z) oraz spotkania łańcuchów polimerowych w wyniku dyfuzji (t_{dyf}) [45], [46]. Uważa się, że w przypadku szybkiego mieszania, zapadanie się łańcucha jest szybsze niż dyfuzyjne spotkanie łańcuchów polimerowych. W tym przypadku zapadanie się łańcuchów polimerowych prowadzi do powstawania cząstek pierwotnych w procesie kontrolowanym przez dyfuzję, przy niewielkim lub żadnym wpływie rzeczywistego mieszania na tworzenie się NP. Z drugiej strony, jeśli mieszanie jest powolne (duży $t_m > t_k$), oczekuje się stopniowego zapadania się łańcuchów polimerowych, co prowadzi do wydłużenia efektywnego czasu zapadania się łańcuchów, z $t_z \sim t_m$. W konsekwencji dyfuzyjne spotkania łańcuchów konkurują z ich reorganizacją wraz z tworzeniem się NP, co prowadzi do wyraźnego wpływu szybkości mieszania na wytwarzanie NP.

Mieszanie jest szczególnie ważnym parametrem w przypadku prowadzenia procesu nanoprecypitacji w układach mikroprzepływowych. Jeśli mieszanie w systemie jest wystarczająco szybkie, cząstki są blokowane kinetycznie, a ich średnice i rozkład wielkości można kontrolować [47]. Trudno nad nimi zapanować w dużych systemach, w których mieszanie jest wolniejsze, cząstki agregują, a dojrzewanie Ostwalda zwiększa polidispersyjność. Niemniej jednak udane wytwarzanie NP metodą nanoprecypitacji wciąż napotyka szereg wyzwań, takich jak niska wydajność produkcji, duże różnice między partiami,

krótki czas przebywania i niespełniające norm zwiększenie skali procesu produkcyjnego. Dlatego zdecydowanie pożądane jest podejście, które pozwala na otrzymywanie NP o pożądanych właściwościach fizykochemicznych w sposób wysokowydajny i powtarzalny [48]. Konwencjonalne metody zwykle stosowane do otrzymywania polimerowych NP (tj. metoda dozowania kroplami fazy organicznej do fazy wodnej) zazwyczaj powodują otrzymanie produktu o szerokim rozkładzie wielkości ze względu na brak precyzyjnej kontroli nad procesem mieszania. Alternatywnie do wytwarzania NP można zastosować technikę mikroprzepływową, ponieważ pozwala ona na szybkie mieszanie i precyzyjną kontrolę różnych strumieni w celu uzyskania kontroli nad wielkością i rozkładem NP [49]–[53]. Są dwa sposoby kontrolowania nanoprecypitacji poprzez mieszanie. Jednym z nich jest wytworzenie turbulentnego mieszania, takiego jak nanoprecypitacja błyskawiczna, a drugim zmniejszenie odległości dyfuzji w warunkach przepływu laminarnego, takich jak nanoprecypitacja oparta na mikroprzepływach [40]. Technika mikroprzepływowa zostanie szerzej opisana w podrozdziale 1.1.3. Dodatkowo warto zaznaczyć, że w przypadku metody nanoprecypitacji wymagana jest umiarkowana szybkość mieszania zamiast dużych szybkości mieszania, która podnosi temperaturę [39], [54], [55].

1.1.2.2. Temperatura

Temperatura jest kolejnym istotnym parametrem w procesie nanoprecypitacji. Jest powiązana z mieszaniem, gdyż jak wspomniano wyżej, duże szybkości mieszania, które skutkują mniejszym, czyli pożądanym rozmiarem NP, mogą prowadzić do wzrostu temperatury układu. Temperatura odgrywa kluczową rolę wpływając na wielkość cząstek, dyfuzję i temperaturę zeszklenia nanokompozytów polimerowych.

W metodzie nanoprecypitacji, temperatura została uznana za ważny czynnik określający wielkość NP, poprzez usprawnienie procesu dyfuzji rozpuszczalnika. W wysokich temperaturach dyfuzja translacyjna polimerów może zostać przyspieszona ze względu na dużą odkształcalność powierzchni NP. I odwrotnie, w niższych temperaturach odkształcalność powierzchni NP maleje, nakładając duże bariery nadmiaru wolnej energii na dyfuzję polimeru, co prowadzi do spowolnienia dyfuzji [56].

Dotychczas w literaturze opisane zostały przypadki, gdzie w metodzie nanoprecypitacji badano temperaturę układu sięgającą do 50°C, czyli niższej od temperatury wrzenia większości mieszalnych z wodą rozpuszczalników organicznych [57]. Dlatego można postawić hipotezę, że jeśli temperatura nanoprecypitacji jest wyższa niż temperatura wrzenia rozpuszczalnika organicznego, dodanie polimeru/roztworu organicznego do gorącej wody może doprowadzić

do powstania cząstek polimerowych w wyniku wrzenia i szybkiego odparowania rozpuszczalnika organicznego [57].

Zhang i in. badali wpływ temperatury na proces precypitacji amorficznych NP antybiotyku (acetylu cefuroksymu) i stwierdzili, że niższa temperatura precypitacji prowadziła do powstawania mniejszych NP [58]. Wynikało to prawdopodobnie z faktu, że w niskiej temperaturze rozpuszczalność leku zmniejszała się, a strefa metastabilności stawała się węższa, co ułatwiało osiągnięcie wysokiego przesylenia po zmieszaniu faz. Dodatkowo, zarodkowanie jest procesem, który wiąże się ze spadkiem energii swobodnej i wydzielaniem ciepła, dlatego niższe temperatury sprzyjały wyższemu tempu zarodkowania. Jednocześnie, niższe temperatury mogły hamować wzrost cząstek [59]. W rezultacie, przy niskiej temperaturze, połączenie dużej szybkości zarodkowania i małej szybkości wzrostu prowadziło do powstawania mniejszych cząstek [58]. Z kolei wyższa temperatura nanoprecypitacji poprawiała mieszanie płynów dzięki zmniejszeniu lepkości i zwiększeniu dyfuzyjności, co, jak przewidywano, obniżało indeks polidispersyjności (PDI) [60].

1.1.2.3. Natężenie przepływu faz, stosunek objętości faz

Stosunek fazy organicznej do wodnej jest kolejnym czynnikiem mającym wpływ na rozmiar NP polimerowych utworzonych w procesie nanoprecypitacji. Zwiększenie objętości fazy organicznej w stosunku do fazy wodnej może prowadzić do większych rozmiarów NP, ponieważ większa ilość polimeru rozpuszczonego w fazie organicznej ma tendencję do tworzenia większych agregatów podczas procesów desolwatacji i koalescencji. Z drugiej strony, większa ilość rozpuszczalnika organicznego umożliwia lepszą dyfuzję i zapobiega koalescencji kropeł, co sprzyja tworzeniu mniejszych cząstek. Dodatkowo większa objętość fazy wodnej może sprzyjać szybszemu i bardziej efektywnemu rozproszeniu polimeru, co może prowadzić do mniejszych i bardziej jednorodnych NP [24], [61], [62].

Rivas i in. [21] stwierdzili, że zwiększenie objętości fazy organicznej z 1 ml do 5 ml przy stałej objętości fazy wodnej prowadziło do zmniejszenia rozmiaru NP z 430 nm do 345 nm. Z kolei, przy wyższych stosunkach fazy wodnej do organicznej, proces dyfuzji rozpuszczalnika do fazy wodnej staje się szybszy, co może prowadzić do szybkiego wytrącania polimeru i tworzenia większych cząstek [63]. Ponadto, stosunek objętościowy rozpuszczalnika do nierozpuszczalnika odgrywa kluczową rolę w ciągłej produkcji jednolitych NP hydrożelu alkoholu poliwinylowego. Nanoprecypitacja membranowa pozwoliła na ciągłe otrzymywanie jednolitych NP hydrożelowych, a stosunek objętościowy rozpuszczalnika

do nierozpuszczalnika został zidentyfikowany jako najważniejszy czynnik wpływający na proces nanoprecypitacji [64].

Othman i in. prowadzili badania w urządzeniu mikroprzepływowym przy stałej szybkości przepływu fazy wodnej (Q_w), i zmiennej szybkości przepływu fazy organicznej (Q_{org}). Analizowany stosunek $R = Q_w/Q_{org}$ był z zakresu 1,5 do 10. Rozmiar NP malał wraz ze wzrostem R , ponieważ po utworzeniu zarodki NP są bardziej rozcieńczone, co hamuje szybkość wzrostu cząstek w procesie nukleacji, określoną wzorem:

$$\frac{dl}{dt} = K_g(C_i - C^*)^b \quad (5)$$

gdzie K_g jest stałą szybkości wzrostu cząstek, a C_i i C^* są odpowiednio stężeniem polimeru na powierzchni cząstek i stężeniem nasycenia.

Wartość parametru b wynosi zwykle od 1 do 3 [65], dt określa zmiana czasu, a „(...) jako charakterystyczny wymiar l przyjmuje się zwykle długość odcinka prostej przechodzącej przez środek ciężkości cząstki i przecinającej jej dwie przeciwległe krawędzie, bądź też jako średnicę kuli o tej samej szybkości opadania co rozważana cząstka.”[42].

Zwiększona objętość wody zmniejsza również tendencję do agregacji cząstek ze względu na niższą częstotliwość, z jaką cząstki zderzają się i przylegają do siebie [49], co potwierdzają również wyniki Zhao i in. [65]. Agregacja cząstek jest najbardziej prawdopodobna w pobliżu wylotu z układu mikroprzepływowego, gdzie lokalne stężenia NP są wysokie. Ponadto wyższy współczynnik natężenia przepływu zapewnia szybsze mieszanie w systemie mikroprzepływowym [66].

Podsumowując, stosunek fazy organicznej do wodnej jest kluczowym parametrem wpływającym na rozmiar NP polimerowych w procesie nanoprecypitacji. Optymalizacja tego parametru może prowadzić do uzyskania NP o pożądanym właściwościach, co jest istotne dla zastosowań w dostarczaniu leków i inżynierii tkankowej.

1.1.3. Techniki mikroprzepływowe

W ciągu ostatnich kilku dekad byliśmy świadkami pojawienia się i rozwoju platform mikroprzepływowych jako alternatywnych dróg syntezy chemicznej zarówno w kierunku cząstek, jak i materiałów [67]. Do otrzymywania NP polimerowych wykorzystuje się technologię mikroprzepływową o wysokim stopniu kontroli nad wielkością, kształtem i składem cząstek [68]. Podejście to zapewnia skalowalny proces wytwarzania tych materiałów i ma potencjalne zastosowania w dostarczaniu leków i diagnostyce [18], [53], [69], [70].

Technika mikroprzepływowa opiera się na procesie nanoprecypitacji w mikroskalowych kanałach. Systemy mikroprzepływowe projektowane są tak, aby umożliwić kontrolę szybkości mieszania między fazami rozpuszczalnika i nierozpuszczalnika, wyraźnie wykazując liczne zalety w otrzymywaniu NP w porównaniu z klasycznymi procesami nanoprecypitacji. Co ważne, miniaturyzacja procesu pozwala na znaczne zmniejszenie zużycia odczynników, szybszą analizę, lepszą kontrolę nad warunkami procesu, niskie zużycie energii i niższe koszty [68], [71]. Ponadto, mają tę zaletę, że nadają się do ponownego użycia.

Na przykład Vladisavljevic i in. [72] wytworzyli monodispersyjne mikrocząstki poli(kwasu mlekowego) (PLA) i polikaprolaktanu (PCL) wykorzystując metodę emulsyfikacji w szklanym urządzeniu kapilarnym skupiającym przepływ. Badali oni wpływ szybkości przepływu dwóch faz i struktury geometrycznej urządzenia na wielkość cząstek. Stwierdzili, że wielkość cząstek zmniejsza się wraz ze wzrostem stosunku natężenia przepływu fazy ciągłej do fazy rozproszonej. Yang i in. [73] przygotowali mikrokapsułki PCL przy użyciu metody emulsyfikacji mikroprzepływowej. Wykazali oni, że mikrokapsułki PCL mogą być stosowane jako inteligentny system dostarczania leków.

Wąskie kanały w urządzeniach mikroprzepływowych o średnicy w zakresie od 1 do 100 μm [71] skuteczniej utrzymują siły ścinające i położenie cząstek podczas przepływu, co ułatwia tworzenie wysoce wydajnych dyspersji. Dodatkowo wymiary kanału o średnicy mniejszej niż 100 μm pozwalają na uzyskanie wysokiego ciśnienia w kanale bez całkowitej utraty przepływu. NP polimerowe można formułować przy pomocy mikroprzepływów w celu poprawy ich właściwości [70]. Ponieważ urządzenia mikroprzepływowe można zaprojektować jako bardzo wydajne mieszalniki, szybkość mieszania rozpuszczalnika i nierozpuszczalnika może przesunąć szybkość wytrącania w stronę etapu wysokiego zarodkowania, a nie etapu wzrostu [19]. Co więcej, stosując precyzyjny sprzęt dozujący (np. pompy strzykawkowe), możliwe jest odtworzenie protokołu syntezy bez zmiany charakterystyki NP.

Na poziomie molekularnym reakcja zachodzi, gdy dwie cząsteczki zderzają się ze sobą, co w ujęciu makroskopowym nazywamy mieszaniami reagentów. Często osiągnięcie jednorodnego roztworu w reaktorach okresowych poprzez mieszanie zajmuje kilka minut, co znacznie przekracza czas życia zderzenia molekularnego ($< \text{ps}$) i może powodować niekorzystne konsekwencje, takie jak intensywne wydzielanie ciepła i zmniejszenie wydajności, szczególnie w przypadku procesów o szybkiej kinetyce. Mieszanie w mikropłynach różni się od mieszania w roztworach. Kluczowy parametr, liczba Reynoldsa (Re), wyjaśnia tę różnicę:

$$Re = \frac{d u \rho}{\mu} \quad (6)$$

gdzie d jest charakterystyczną skalą długości kanału, a u , ρ i μ to odpowiednio prędkość, gęstość i lepkość dynamiczna płynu.

Z równania tego wynika, że wraz ze zmniejszeniem charakterystycznych wymiarów układu zmniejsza się również liczba Reynoldsa. Gdy $Re < 2000$, system wchodzi w tzw. reżim przepływu laminarnego, tzn. opiera się głównie na dyfuzji molekularnej na granicy faz i wymaga dość długiej ścieżki przepływu by osiągnąć intensywne mieszanie [74]. Przepływ laminarny, dzięki stałym liniom strumieni płynu, umożliwia precyzyjne sterowanie tymi strumieniami, a transfer masy w urządzeniu mikroprzepływowym odbywa się głównie przez pasywną dyfuzję molekularną i adwekcję [75].

W systemach mikroprzepływowych stosuje się dwa główne rodzaje kontroli przepływu: kontrolę ciśnienia i kontrolę objętości. Ze względu na ograniczoną wielkość i objętość takich urządzeń, intensyfikacja przepływu jest zazwyczaj trudna. Jednym z rozwiązań tego problemu jest zastosowanie przegród w kanałach mikroreaktora (*ang. static mixer*), które zwiększają intensywność mieszania [76].

Oprócz liczby Reynoldsa, liczba Pecleta (równanie (7)) również dostarcza informacji na temat transportu w przepływie.

$$Pe = \frac{u d}{D} \quad (7)$$

gdzie D to współczynnik dyfuzji, a liczba Pecleta opisuje stosunek konwekcyjnego do dyfuzyjnego transportu cząsteczek płynu.

Z równania (7) wynika, że zmniejszenie wymiarów układu prowadzi do zmniejszenia liczby Pecleta.

W układach mikroprzepływowych siły kapilarne dominują nad siłami grawitacyjnymi w miarę zmniejszania wymiarów charakterystycznych systemu, co pozwoliło na opracowanie wielu urządzeń analitycznych, takich jak glukometry i testy ciążowe [77]. Wreszcie, czasy reakcji w systemach mikroprzepływowych są znacznie krótsze niż w konwencjonalnych urządzeniach. Wynika to z mniejszych wymiarów systemów, co prowadzi do krótszego czasu dyfuzji dla danej cząsteczki. Przybliżenie czasu dyfuzji przedstawiono na równaniu (8):

$$t = \frac{x^2}{2D} \quad (8)$$

gdzie x jest odległością przebytą przez jedną cząsteczkę substancji rozpuszczonej wzdłuż jednej osi po czasie t , a D jest współczynnikiem dyfuzji substancji rozpuszczonej. Z powyższego równania wynika, że:

$$t \propto x^2 \quad (9)$$

W związku z tym staje się jasne, że wraz ze zmniejszeniem charakterystycznych wymiarów układu, czas dyfuzji cząsteczek w tym układzie ulega skróceniu, co prowadzi do skrócenia czasu reakcji w urządzeniach mikroprzepływowych. Staje się to coraz ważniejsze, gdy rozważane są większe cząsteczki o niższym współczynniku dyfuzji, takie jak DNA [78]. Powyższe zjawiska zostały wykorzystane w urządzeniach, które mogą posłużyć w badaniach biologicznych i chemicznych. Praktyczne zastosowania mikroprzepływowych nanosystemów dostarczania leków zostały zademonstrowane na przykład w udanej produkcji szczepionek mRNA zamkniętych w nanocząstkach lipidowych przez Pfizer-BioNTech i Moderna na COVID-19. Sukces ten nie tylko zapobiega ciężkim przypadkom COVID-19 na całym świecie, ale także pokazuje wykonalność skalowania mikroprzepływowych nanosystemów dostarczania leków do zastosowań klinicznych.

1.1.4. Kryteria wyboru polimeru

Wybór polimerów używanych w procesie nanoprecypitacji zależy od kilku kryteriów, takich jak biogodność, rozpuszczalność w odpowiednich rozpuszczalnikach, stabilność chemiczna, biodegradacja i bioakumulacja oraz możliwość funkcjonalizacji powierzchni. Nanoprecypitacja jest rutynowo stosowana w przypadku otrzymywania NP z różnych polimerów, w tym poli(kwasu mlekowego) (PLA), poli(kwasu mlekowo-ko-glikolowego) (PLGA), poli(cyjanoakrylanu alkilu) (PACA), poli(kaprolaktanu) (PCL), poli(metakrylanu metylu) (PMMA) i ich kopolimerów z poli(glikolem etylenowym) (PEG); jednak wpływ chemii polimeru na powstawanie NP podczas nanoprecypitacji został niewystarczająco zbadany. W kilku przypadkach oceniano wpływ masy cząsteczkowej polimeru, ale nie wykazał on większego wpływu na wielkość cząstek [79], [80]. Niedawno ustalono wpływ charakteru i stężenia naładowanych grup w polimerach na wielkość NP powstałych w procesie nanoprecypitacji [81]. Już niewielkie ilości naładowanych grup umożliwiły otrzymanie NP polimerowych zawierających barwnik o rozmiarach do 10 nm. Porównując NP polimerowe

zawierające barwnik wykonane z PLGA, PMMA i PCL pod względem ich właściwości fluorescencyjnych, pokazano, w jaki sposób chemię polimerów można wykorzystać do poprawy ich jasności [82]. Jednak do chwili obecnej w dużej mierze brakuje bardziej ogólnych badań na temat roli chemii polimerów [83]. Z drugiej strony zaobserwowano również, że charakter polimeru, zwłaszcza jego skład chemiczny i struktura, może wpływać na syntezę i właściwości NP. Na przykład względną i całkowitą długość bloków hydrofilowych w kopolimerach blokowych można wykorzystać do kontrolowania tworzenia się cząstek.

Teorię opisującą proces zarodkowania w roztworach przesyconych, prowadzący do powstania nanodispersji, przedstawił Lamer [84]. Ostateczny rozmiar NP po zakończeniu agregacji jest silnie skorelowany ze stężeniem polimeru, a co za tym idzie z lepkością roztworu [32]. Aby umożliwić prawidłowe formowanie się NP, lepkość roztworu powinna być na tyle niska, aby zapobiec splątaniom między łańcuchami polimeru. Jeśli takie splątania występują, mogą skutecznie uniemożliwić tworzenie się NP [85]. Dodatkowo, właściwości polimeru odgrywają kluczową rolę w ograniczaniu wzrostu NP w trakcie dojrzewania Ostwalda. W przeciwnym razie, aby zapobiec nadmiernemu wzrostowi, konieczne jest zastosowanie środków stabilizujących [32]. Ponieważ podczas nanoprecypitacji cała ilość polimeru jest równomiernie rozprowadzona w roztworze, preferowanym kształtem powstających cząstek jest kula.

Stężenie, przy którym roztwór polimeru staje się wystarczająco rozcieńczony, aby osiągnąć stan metastabilny i umożliwić zarodkowanie polimeru, określa się mianem regionu „ouzo”. Nazwa ta pochodzi od greckiego aperitif, który mętnieje w wyniku spontanicznej emulgacji wody i anetolu [85]. Efekt ten, poza nanoprecypitacją, znajduje zastosowanie również w innych procesach związanych z chemią polimerów. Przykładem może być wykorzystanie spontanicznej emulgacji w technikach polimeryzacji do wytwarzania polimerowych NP [86] lub tworzenia oligomerów, które następnie kondensują, prowadząc do powstawania nanokapsułek [85].

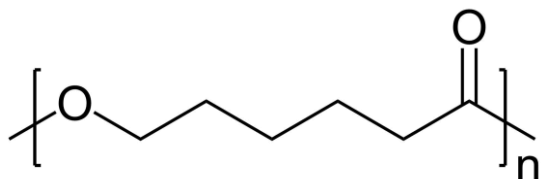
Känkänen i in. w swoich badaniach wykazali, że stopień polimeryzacji (lub masa cząsteczkowa) polimeru wykazuje ujemną korelację z PDI. Oznacza to, że polimery o wyższej masie cząsteczkowej prowadzą do powstania cząstek o węższym PDI [60]. Zjawisko to można częściowo wyjaśnić wyższym stopniem przesylenia, osiąganym w przypadku polimerów o dużej masie cząsteczkowej, ze względu na ich niższą rozpuszczalność. Wysokie przesylenie sprzyja procesowi zarodkowania zamiast wzrostu cząstek, co skutkuje formowaniem małych cząstek o niskim PDI [17], [60].

W przypadku polimerowych NP stosowanych w biomedycynie kluczowym wymogiem jest użycie polimerów biodegradowalnych, które są biozgodne i nietoksyczne. Wśród polimerów naturalnych najczęściej stosowanym materiałem jest chitozan [87]–[89]. Alternatywę dla polimerów naturalnych stanowią biodegradowalne poliestry, takie jak PLA [79], [90], PLGA [91], [92] i PCL [93], [94], które również cechują się biozgodnością, stabilnością i nietoksycznością [95]. Dwa biozgodne polimery – PLA i PCL nie wykazują żadnych niepożądanych efektów miejscowych ani ogólnoustrojowych w zastosowaniach terapeutycznych *in vivo* [22]. PCL jest bardziej hydrofobowy niż PGA (poliglikolid) i PLA, co sprawia, że ma najmniejszą szybkość degradacji spośród tych trzech polimerów. Kolejność szybkości degradacji *in vivo* dla tych biodegradowalnych polimerów jest następująca: PCL<PLA<PGA. Dzięki bardzo wolnej degradacji *in vivo* oraz wysokiej przepuszczalności dla leków, PCL jest idealnym materiałem do zastosowań wymagających długiego czasu rozkładu [96]–[98]. To czyni go istotnym kandydatem w rozwoju systemów dostarczania leków. Oprócz niskiej szybkości degradacji, plastyczność jest kolejną unikalną właściwością PCL. W porównaniu do PLA i PGA charakteryzuje się niską wytrzymałością na rozciąganie (ok. 23 MPa), ale jednocześnie bardzo dużym wydłużeniem przy zerwaniu, wynoszącym aż 4700% [10]. Dzięki temu PCL jest doskonałym elastycznym biomateriałem, który może być wykorzystywany w różnorodnych zastosowaniach biomedycznych [97].

PCL jest wytwarzany w procesie polimeryzacji z otwarciem pierścienia cyklicznego monomeru ϵ -kapolaktonu i został po raz pierwszy zbadany przez grupę Carothers już w latach trzydziestych XX wieku [99]. Charakteryzuje się bardzo niską temperaturą zeszklenia (T_g) wynoszącą -60°C oraz niską temperaturą topnienia (T_m , $59\text{--}64^\circ\text{C}$), co umożliwia stosunkowo łatwe wytwarzanie nanosystemów dostarczania substancji w warunkach niskotemperaturowych [98]. Co więcej, PCL wykazuje doskonałą kompatybilność mieszania z innymi polimerami, ułatwiając dostosowanie pożądanych właściwości, takich jak kinetyka degradacji czy hydrofilowość [100], [101]. Całkowity czas degradacji PCL trwa od 2 do 5 lat, a proces ten zachodzi w dwóch etapach. W pierwszej fazie dochodzi do nieenzymatycznego hydrolytycznego rozszczepienia grup estrowych. W drugiej fazie, gdy polimer staje się bardziej krystaliczny i jego masa cząsteczkowa spada poniżej 3000 g/mol, następuje degradacja wewnątrzkomórkowa. Dowodem na to jest obserwacja fragmentów PCL w fagosomach^a makrofagów oraz komórek olbrzymich w fibroblastach [102]. Te wyniki potwierdzają, że PCL

^a Pęcherzyk powstający okresowo w komórce w przebiegu fagocytozy lub pinocytozy, przyczyniający się do trawienia i zużytkowania substancji wchłoniętych do komórki.

może być całkowicie resorbowany i degradowany poprzez mechanizm wewnątrzkomórkowy po obniżeniu masy cząsteczkowej do 3000 g/mol lub mniej, co czyni go obiecującym materiałem w zastosowaniach biomedycznych.



Rysunek 1. Wzór strukturalny PCL.

1.1.5. Kryteria wyboru rozpuszczalnika

Odpowiednio dobrane rozpuszczalniki są używane do tworzenia NP dla różnych zastosowań biomedycznych, takich jak dostarczanie leków, obrazowanie medyczne i inżynieria tkankowa. Istnieje kilka kryteriów wyboru rozpuszczalnika, tj. rozpuszczalnik musi skutecznie rozpuszczać polimer, który ma być użyty do formowania NP, rozpuszczalnik musi być mieszalny z wodą, aby umożliwić efektywną nanoprecypitację, dodatkowo powinien być łatwo usuwalny po procesie. Niski poziom toksyczności również jest kluczowy.

Rozpuszczalność polimeru w danym rozpuszczalniku zależy od kilku czynników, takich jak temperatura, właściwości fizyczne polimeru oraz jego charakter chemiczny. Do przewidywania zdolności polimeru do rozpuszczania w danym rozpuszczalniku wykorzystuje się parametry rozpuszczalności Hildebranda (równanie (10)) oraz Hansena (równanie (11)). Parametry te zazwyczaj pozostają względnie stałe w różnych temperaturach [103]. Jeśli parametry rozpuszczalności rozpuszczalnika i polimeru są do siebie zbliżone, istnieje większe prawdopodobieństwo, że polimer ulegnie rozpuszczeniu w danym rozpuszczalniku [104]. Parametr rozpuszczalności Hildebranda (HSI, δ) wyraża się równaniem:

$$\delta = \sqrt{CED} = \frac{\sqrt{(\Delta H_v - RT)}}{V} \quad (10)$$

gdzie δ – HSI wyrażony w jednostkach $(\text{cal}/\text{cm}^3)^{0,5}$ w USA a jednostka SI to $\text{MPa}^{0,5}$, CED – gęstość energii kohezji, ΔH_v – to entalpia parowania, R – to stała gazowa ($8314 \text{ J kmol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T – temperatura, V – objętość molowa.

Podstawową zasadą stosowania parametru rozpuszczalności jest „podobne rozpuszcza podobne”, czyli ciecze o podobnych parametrach rozpuszczalności będą się mieszać. Również polimery będą rozpuszczać się w rozpuszczalnikach, których parametry rozpuszczalności

są podobne. Wskaźnik rozpuszczalności Hansena (HSP) jest rozszerzeniem HSI i wyraża się następującym wzorem:

$$Ra^2 = 4(\delta_{D2} - \delta_{D1})^2 + (\delta_{P2} - \delta_{P1})^2 + (\delta_{H2} - \delta_{H1})^2 \quad (11)$$

gdzie Ra – parametr rozpuszczalności Hildebranda, δ_D – energia pochodząca od oddziaływań międzycząsteczkowych, δ_P – energia oddziaływań między dipolami, δ_H – energia międzycząsteczkowych oddziaływań wodorowych.

Hansen zaproponował rozszerzenie HSI do trzech składowych parametrów rozpuszczalność δ_D , δ_P , δ_H tzw. parametrów Hansena [105]. Jak wspomniano wcześniej, materiały o podobnych wartościach HSP mają wysokie powinowactwo do siebie. Jeśli dwa punkty w przestrzeni HSP, reprezentujące dane związki, znajdują się blisko siebie, prawdopodobieństwo rozpuszczenia jednego związku w drugim jest wysokie. W przypadku polimerów tylko te rozpuszczalniki, które mieszczą się w określonej odległości od punktu odpowiadającego polimerowi w przestrzeni HSP, są w stanie go rozpuścić. Ten zakres odległości zazwyczaj przedstawia się jako elipsoidę, a jedynie rozpuszczalniki wewnątrz tej elipsoidy mogą skutecznie rozpuszczać polimer. Jeżeli oś dyspersji elipsoidy zostanie podwojona, przestrzeń rozpuszczalności przyjmuje kształt zbliżony do sfery. W tej przestrzeni odległość współrzędnych rozpuszczalnika od punktu centralnego sfery, określonego przez parametry polimeru (δ_{D1} , δ_{P1} , δ_{H1}), wyraża się jako δ_{D2} , δ_{P2} , δ_{H2} . Wskaźnik RED (względna różnica energii układu, *ang. Relative Energy Difference*), czyli stosunek Ra / R_0 pozwala ocenić, jak dobrze rozpuszczalnik nadaje się do rozpuszczenia danego polimeru.

Odległość Ra w równaniu (11) można porównać z promieniem rozpuszczalności polimeru (R_0). Jeżeli:

- $RED < 1$ - mamy duże prawdopodobieństwo, że rozpuszczalnik rozpuści polimer,
- $RED > 1$ - mamy duże prawdopodobieństwo, że rozpuszczalnik nie rozpuści polimeru
- $RED = 1$ - rozpuszczalnik będzie powodować pęcznienie polimeru.

Na przykład, parametry rozpuszczalności δ_D , δ_P , δ_H dla PCL wynoszą, odpowiednio, 17,8, 6,1 i 7,8 [106], a dla acetonu mają wartość, odpowiednio, 15,5, 10,4 i 7,0. Po podstawieniu tych wartości do równania (11) otrzymuje się $Ra = 6,3$. Biorąc pod uwagę, iż dla PCL $R_0 = 7,1$ [106], otrzymujemy $RED < 1$. To oznacza, iż aceton będzie dobrze rozpuszczał PCL. W przypadku tetrahydrofuranu Ra osiąga wartość 2, $RED < 1$, tzn. że jest lepszym rozpuszczalnikiem dla PCL niż aceton.

Aby dokładniej zrozumieć wpływ rozpuszczalników na proces nanoprecypitacji, Othman i in. [49] przeanalizowali szereg lotnych rozpuszczalników, takich jak aceton (Ac),

tetrahydrofuran (THF), dimetylosulfotlenek (DMSO), alkohol izopropylowy (IPA), etanol (EtOH) oraz mleczan etylu (EL). W swoich badaniach uwzględnili parametr interakcji rozpuszczalnik-woda ($\chi_{rozp-woda}$), który opisuje oddziaływania między rozpuszczalnikiem a wodą [107]:

$$\chi_{rozp-woda} = \frac{V_{rozp}}{RT} (\delta_{rozp} - \delta_{woda})^2 \quad (12)$$

gdzie V_{rozp} to objętość molowa rozpuszczalnika, R to uniwersalna stała gazowa, T to temperatura bezwzględna, a δ_{rozp} i δ_{woda} to parametry całkowitej rozpuszczalności odpowiednio rozpuszczalnika i wody.

Wartości parametru $\chi_{rozp-woda}$ obliczone za pomocą równania (12) układają się w następującej kolejności: EtOH<DMSO<IPA<Ac<THF<EL. Rozpuszczalniki o wysokim powinowactwie do wody, charakteryzujące się niskimi wartościami $\chi_{rozp-woda}$, sprzyjają szybkiemu procesowi dyfuzji oraz migracji polimeru do fazy wodnej, co prowadzi do powstawania mniejszych NP [79], [108]. W kontekście tej analizy THF wyróżnia się stosunkowo niskim powinowactwem do wody w porównaniu z innymi badanymi rozpuszczalnikami. Może to wynikać z niskiej polarności tego rozpuszczalnika, co wpływa na jego ograniczoną zdolność do interakcji z wodą.

Toksyczność rozpuszczalników jest istotnym aspektem, który należy uwzględnić w zastosowaniach farmaceutycznych. Spośród wymienionych wcześniej rozpuszczalników wszystkie, z wyjątkiem THF, zostały sklasyfikowane przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) jako rozpuszczalniki klasy 3. Początkowo dopuszczalna dzienna ekspozycja (PDE) dla THF wynosiła 121 mg/dzień, co również kwalifikowało go do klasy 3. Jednak nowe dane toksykologiczne obniżyły PDE dla THF do 7,2 mg/dzień, co skłoniło FDA do rekomendacji przeniesienia THF z klasy 3 do klasy 2 [49], [109].

W przypadku NP obecność rozpuszczalników organicznych może przyspieszać proces dojrzewania Ostwalda, czyli zwiększania rozkładu wielkości cząstek. Zjawisko to polega na rozpuszczaniu mniejszych cząstek i wzroście większych, co wynika z zależności rozpuszczalności od promienia cząstek [62]. Liu i in. badali wpływ rozpuszczalności karotenu na szybkość dojrzewania Ostwalda w roztworach THF-woda. Zmiana stosunku objętości rozpuszczalnika do nierozpuszczalnika (THF/woda) z 1:4 do 1:20 zmniejszyła rozpuszczalność karotenu aż 40-krotnie i spowolniła średnią szybkość wzrostu cząstek 10-krotnie [110]. Dlatego kluczowym etapem w procesie przygotowywania stabilnych NP jest jak najszybsze usunięcie

rozpuszczalnika organicznego. Dzięki temu można ograniczyć proces dojrzewania Ostwalda i uzyskać bardziej stabilny preparat NP.

Rozpuszczalniki organiczne wykorzystywane w procesie nanoprecypitacji powinny być dobrze mieszalne z wodą (faza wodna), co wspomaga proces dyfuzji i wpływa na kontrolę wielkości NP. Pożądana jest także niska temperatura wrzenia rozpuszczalnika, ponieważ ułatwia to jego odparowanie z fazy organicznej, co sprzyja efektywnemu formowaniu się nanocząstek. Wybór odpowiedniego rozpuszczalnika zależy zatem od jego zdolności do rozpuszczania konkretnego polimeru, polarności (determinującej mieszalność z wodą) oraz temperatury wrzenia [24].

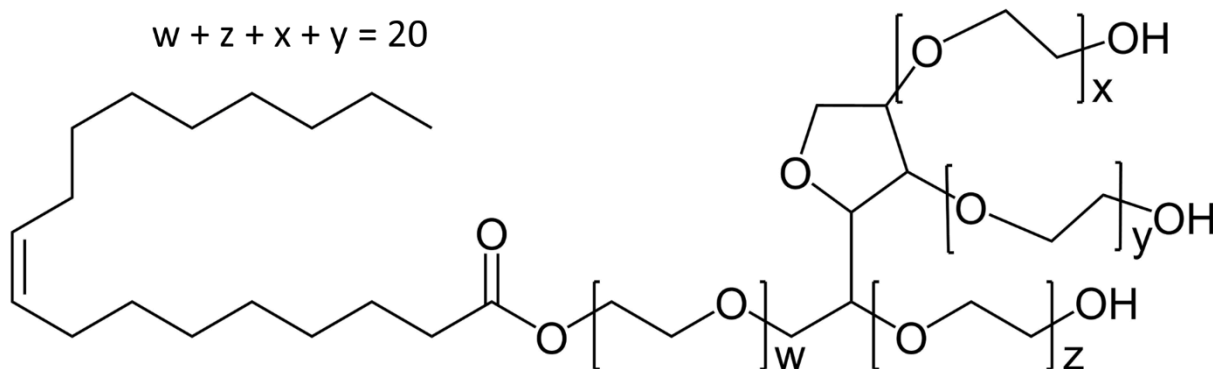
1.1.6. Surfaktanty

W procesach nanoprecypitacji często (choć nie zawsze) stosuje się środki powierzchniowo czynne, takie jak alkohole poliwinylowe, poloksamery i polisorbaty, w celu zmniejszenia napięcia międzyfazowego w strefie rozpuszczalnik-nerozpuszczalnik, co umożliwia wytwarzanie NP o wąskim rozkładzie wielkości [111]. Obniżenie napięcia międzyfazowego wpływa na rozpuszczalność i dynamikę mieszania polimeru, co w konsekwencji determinuje wielkość powstających cząstek [112]. Oprócz funkcji stabilizujących, środki powierzchniowo czynne oddziałują także na właściwości biologiczne cząstek, takie jak efektywność wychwytu komórkowego [113]. Surfaktanty są kluczowe dla długoterminowej stabilności NP, przeciwdziałając agregacji wynikającej z wysokiej energii powierzchniowej cząstek [114].

Mechanizm stabilizacji NP opiera się na odpychaniu sterycznym, które stabilizuje cząstki poprzez ich rozmieszczenie na granicy faz wodnej i organicznej [115]. Niejonowe środki powierzchniowo czynne adsorbują się na powierzchni NP w sposób zwarty, co skutecznie zapobiega ich łączeniu się (koalescencji) oraz eliminuje oddziaływania van der Waalsa między cząstkami. Rodzaj i stężenie środka powierzchniowo czynnego mają kluczowe znaczenie nie tylko dla stabilności cząstek, ale także wpływają na efektywność enkapsulacji substancji aktywnych, szybkość uwalniania oraz właściwości farmakokinetyczne NP.

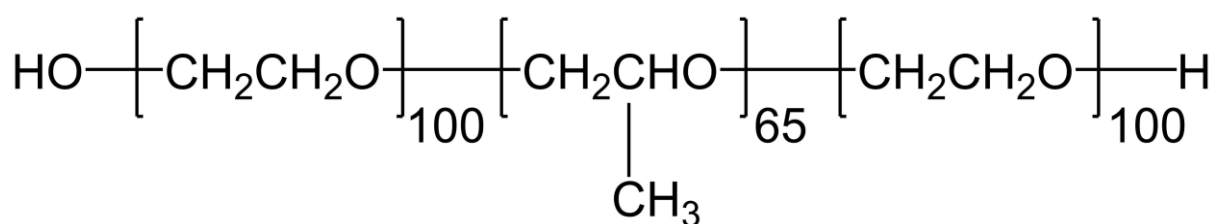
Często stosowanymi biozgodnymi surfaktantami są Tween®80 (T80) i Pluronic®F-127 (F127). T80, znany również jako polisorbat 80, jest niejonowym środkiem powierzchniowo czynnym powszechnie wykorzystywanym w produkcji polimerowych NP [116]. Składa się z mieszaniny polioksyetylenowych pochodnych sorbitanu oraz kwasu oleinowego (rys. 2). T80 jest uznawany za bezpieczny dla organizmu ludzkiego i znajduje szerokie zastosowanie

w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym. Co więcej, T80 ma zdolność wspomagania przenikania NP przez błony komórkowe, co jest szczególnie istotne w kontekście systemów dostarczania leków. Umożliwia to skuteczniejszy transport substancji aktywnych do docelowych miejsc w organizmie, zwiększając efektywność terapii [117].



Rysunek 2. Wzór strukturalny T80.

F127 to hydrofilowy niejonowy środek powierzchniowo czynny, zatwierdzony przez FDA do stosowania w systemach dostarczania leków u ludzi [118]. Zawiera dwa hydrofilowe łańcuchy poli(glikolu etylenowego) i hydrofobowy segment poli(glikolu propylenowego), co ilustruje rys. 3. Dzięki tej strukturze F127 skutecznie stabilizuje wodne emulsje. F127 nie tylko wpływa na rozmiar NP i zapobiega ich agregacji, ale także jest skutecznym stabilizatorem do długotrwałego przechowywania zawiesin NP oraz środkiem ochronnym w procesie liofilizacji. Dodatkowo, dzięki swojej amfifilowej naturze, wykazuje właściwości bioadhezyjne i zwiększa rozpuszczalność leków hydrofobowych [114].



Rysunek 3. Wzór strukturalny F127.

Fonte i in. przeanalizowali wpływ stabilizatorów takich jak PVA, T80 i F127, na rozmiar oraz stabilność NP PLGA po procesie liofilizacji. Stabilizatory te zmniejszają napięcie powierzchniowe i sprzyjają rozproszeniu cząstek po liofilizacji. Zmniejszenie rozmiaru cząstek prowadzi do znacznego zwiększenia ich powierzchni, co wspomaga stabilizację NP. Po liofilizacji niektóre preparaty NP mogą ulegać aglomeracji. Jednak wykazano, że dzięki

zastosowaniu stabilizatorów można je stosunkowo łatwo ponownie zawiesić w wodzie. Analizy potwierdziły również, że wzrost stężenia środka powierzchniowo czynnego ogólnie prowadzi do zmniejszenia indeksu polidispersyjności (PDI). Wyjątek stanowiły preparaty, w których jako stabilizator zastosowano T80 [119].

Dobór stężenia surfaktantów jest kluczowym czynnikiem w procesie otrzymywania NP przeznaczonych do zastosowań biomedycznych. Chociaż T80 jest szeroko stosowany w preparatach farmaceutycznych, jego wysokie stężenia mogą prowadzić do toksyczności i wywoływać reakcje alergiczne [120]. Badania wskazują, że T80 może powodować efekty uboczne, takie jak nadwrażliwość oraz zmiany w immunologicznej odpowiedzi komórkowej, zwłaszcza przy długotrwałym stosowaniu lub w wysokich dawkach [121]. W porównaniu do T80, F127 wykazuje niższą immunogenność, co czyni go bezpieczniejszym wyborem w przypadku zastosowań wymagających długoterminowej stabilności [121], [122]. Dlatego też stężenie oraz sposób użycia surfaktantów powinny być starannie dobrane, aby zminimalizować ryzyko toksyczności, jednocześnie maksymalizując stabilność i skuteczność polimerowych NP.

1.1.7. Zalety i ograniczenia nanoprecypitacji

Metodę nanoprecypitacji można uznać za mało inwazyjną, a za razem precyzyjną procedurę, wymagającą minimalnego zaplecza sprzętowego i niskich kosztów energii [32]. Chociaż przewidywanie wielkości i kształtu cząstek może być trudne, stosunkowo łatwo można kontrolować ich formowanie poprzez zmianę stężenia polimeru, stosunku rozpuszczalnika do nierozpuszczalnika oraz parametrów procesowych [123], [124]. W odróżnieniu od metody emulsyfikacji/dyfuzji rozpuszczalnika, nanoprecypitacja nie wymaga stosowania środków powierzchniowo czynnych, które mogą wpływać na właściwości powierzchniowe lub powodować efekty toksyczne [123]. Jednak jak wspomniano wcześniej, są one często stosowane, jednak konieczny jest dobór odpowiednich stężeń. W przeciwieństwie do emulsyfikacji/odparowania rozpuszczalnika, która zazwyczaj wykorzystuje wysoce lotne rozpuszczalniki organiczne, takie jak dichlorometan czy heksan, nanoprecypitacja umożliwia również użycie nielotnych rozpuszczalników, takich jak dimetylosulfotlenek (DMSO) lub dimetyloacetamid (DMA), które nie mogą być łatwo usunięte jedynie poprzez mieszanie lub łagodne ogrzewanie. Metodą nanoprecypitacji można otrzymać NP charakteryzujące się wysoką wydajnością enkapsulacji leków hydrofobowych [21], jednak nie jest odpowiednia do enkapsulacji substancji hydrofilowych (np. białek) ze względu na ich słabą rozpuszczalność

w rozpuszczalnikach organicznych stosowanych w nanoprecypitacji. Ponadto, nawet po utworzeniu NP istnieje ryzyko wycieku substancji aktywnych z matrycy cząstek do fazy wodnej [39], [125]. Hydrofilowe leki są zazwyczaj słabo inkorporowane w matrycy polimerowej. Aby temu zaradzić, podejmowano próby zwiększenia ich enkapsulacji poprzez zmianę pH (np. w przypadku chlorowodoru prokainy) [126] lub wybór odpowiednich rozpuszczalników i nierozpuszczalników (np. polarne i aprotonowe rozpuszczalniki do enkapsulacji białek) [127]. Dzięki tym rozwiązaniom można poprawić skuteczność uwięzienia hydrofilowych substancji w NP, co czyni nanoprecypitację bardziej uniwersalną metodą.

1.2. Metody charakterystyki nanocząstek

Właściwości fizykochemiczne nanomateriałów mają kluczowy wpływ na ich zachowanie w środowisku biologicznym. Dlatego dokładna charakterystyka NP jest niezbędna, aby uzyskać wiarygodne dane dotyczące ich działania i bezpieczeństwa. Charakterystyka ta jest szczególnie istotna w kontekście czynników wpływających na bezpieczeństwo, takich jak właściwości fizyczne (np. rozmiar cząstek [128], kształt [129], ładunek powierzchniowy [130]) oraz chemiczne (np. zanieczyszczenie [131], funkcjonalizacja powierzchni [132]).

Rozmiar NP jest jednym z kluczowych parametrów definiujących ich właściwości. UE (Unia Europejska) wydała dyrektywę (2011/696/UE), która precyzuje definicję nanomateriału [133]. Dokument ten rozszerzył powszechnie przyjęty zakres wielkości 1–100 nm, który tradycyjnie określa nanomateriały. Zgodnie z dyrektywą, materiał jest uznawany za nanomateriał, jeśli przynajmniej jeden jego wymiar zewnętrzny wynosi ≤ 100 nm. Ponadto, nawet mieszaniny cząstek o różnych rozmiarach mogą być klasyfikowane jako nanomateriały, jeśli co najmniej 50% cząstek w próbce (liczbowo) ma wielkość ≤ 100 nm. W związku z tym precyzyjne określenie rozkładu wielkości cząstek w mieszaninie nabiera szczególnego znaczenia. Obecnie ważna jest nie tylko znajomość średniej wielkości NP, ale także ich liczbowego rozkładu w próbce [134]. Najczęściej stosowaną metodą do pomiaru wielkości NP jest dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), które umożliwia szybkie i precyzyjne określenie ich rozmiaru oraz rozkładu wielkości.

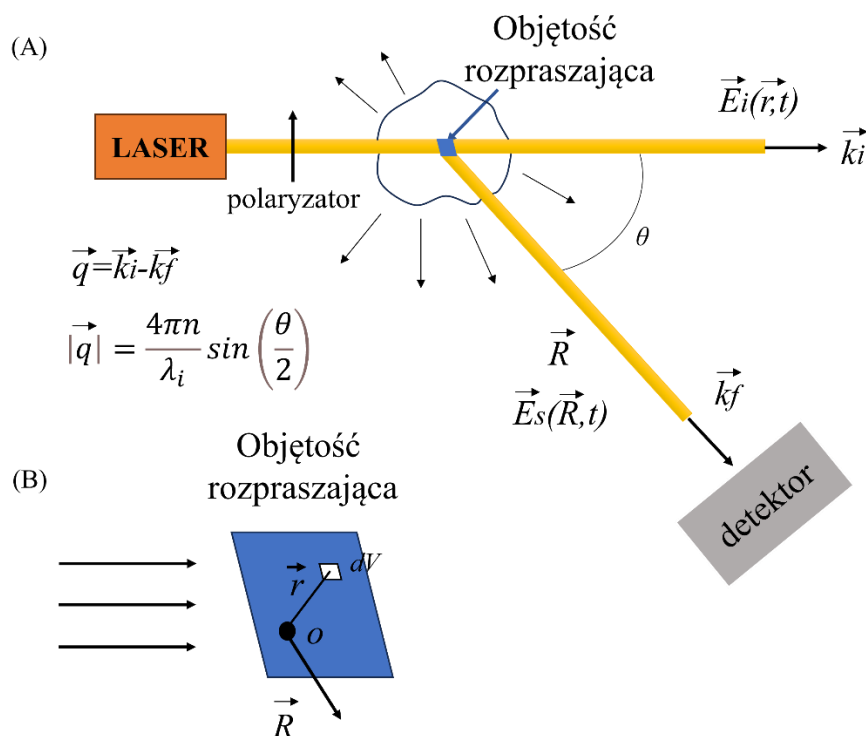
1.2.1. Metoda dynamicznego rozpraszania światła (DLS)

Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), zwane również spektroskopią korelacji fotonów (PCS) [135] lub quasi-elastycznym rozpraszaniem światła [136] jest ważną techniką stosowaną w nauce i przemyśle. Umożliwia badanie właściwości zawiesin, roztworów koloidów, biologicznych roztworów, makromolekuł i polimerów. Jest to nieinwazyjna metoda, która pozwala na analizę cząstek w szerokim zakresie rozmiarów, od około 1 nm do kilku μm (w zależności od czułości aparatu). Podczas pomiaru wiązka światła rozprasza się na cząstkach w zawieszynie, które znajdują się w ciągłym, losowym ruchu Browna. Poprzez zmiany natężenia rozproszonego światła, spowodowane tym ruchem, uzyskuje się informację dotyczącą współczynnika dyfuzji badanych cząstek. W przypadku cząstek sferycznych pozwala to na obliczenie ich promienia hydrodynamicznego R_h przy wykorzystaniu równania Stokes'a – Einstein'a. Jest to promień hipotetycznej twardej kuli, która porusza się z taką samą prędkością dyfuzji jak badane cząstki [137], [138].

$$D_t = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (13)$$

gdzie k_B - stała Boltzmanna ($1,38064852 \cdot 10^{-23}$ J/K), T - temperatura, η – lepkość dynamiczna i R_h - promień hydrodynamiczny.

W rzeczywistości jednak rozproszone cząstki są uwodnione lub solwatowane, a ich kształt może odbiegać od idealnej sfery. Dodatkowo, ich powierzchnia (tzw. korona) jest dynamiczna i zależy od siły jonowej, obecności innych cząstek w środowisku oraz rodzaju rozpuszczalników [139], [140]. Na Rys. 4 przedstawiono schemat działania układu DLS. System składa się z lasera (najczęściej He-Ne, o długości fali 633 nm), który oświetla próbkę, oraz detektora ustawionego pod kątem rozpraszania (θ). Detektor mierzy natężenie światła rozproszonego $I(\theta, t)$. Zwykle światło padające i rozproszone jest formowane za pomocą elementów optycznych, takich jak apertury, szczeliny lub soczewki. Obszar próbki, z którego rejestrowany jest sygnał, to strefa przecięcia wiązki padającej i rozproszonej (zaznaczona na schemacie kolorem niebieskim, rys. 4). Najczęściej stosowane kąty pomiaru to 90° lub 173° [137], [141].



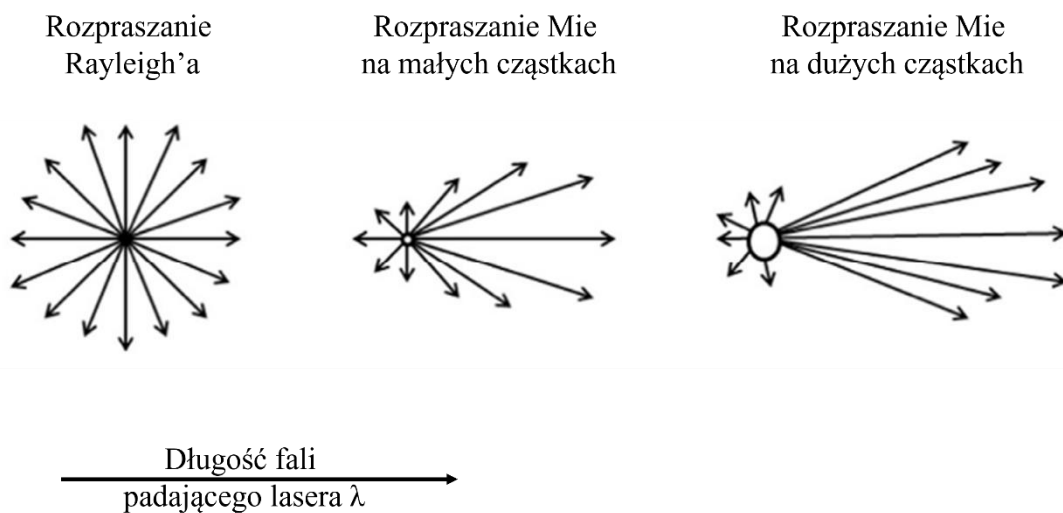
Rysunek 4. Zasada pomiarów metodą DLS.

Oświetlone cząstki znajdują się pod wpływem pola elektromagnetycznego padającej wiązki. Na ich ładunki działa przyspieszająca siła, co powoduje emisję światła w różnych kierunkach. Jeśli oświetlone obszary różnią się optycznie, tzn. mają różne stałe dielektryczne, rozproszone światło będzie miało różne amplitudy. Oznacza to, że rozpraszanie światła jest efektem lokalnych zmian stałej dielektrycznej w badanym ośrodku. Cząsteczki w zawiesinie są w ciągłym ruchu Browna, co prowadzi do dynamicznych zmian lokalnej stałej dielektrycznej. Te zmiany bezpośrednio wpływają na intensywność i charakter rozproszonego światła [133].

1.2.1.1. Teoria rozpraszania Rayleigh'a i Mie

Jednym z założeń klasycznej teorii rozpraszania, wprowadzonej przez Lorda Rayleigh'a, jest to, że rozmiar cząstek jest znacznie mniejszy od długości fali światła. W takich warunkach zdyspergowane NP rozpraszają światło padające proporcjonalnie do szóstej potęgi ich promieni [142]. Jeśli rozmiar cząstek wynosi mniej niż 1/10 długości fali światła (tj. $\lambda/10$), rozproszenie jest elastyczne, co oznacza, że energia rozproszonego światła jest taka sama jak światła padającego, a intensywność rozpraszania nie zależy od kąta [143]. Przykładowo, dla lasera He-Ne o długości fali 633 nm, dotyczy to cząstek o rozmiarach mniejszych niż 60 nm.

Jednakże, gdy wielkość cząstek przekracza ten próg ($\lambda/10$), wówczas rozpraszanie Rayleigha zostaje zastąpione anizotropowym rozpraszaniem Mie. W tym przypadku rozproszone światło ma nierówną energię (rozpraszanie nieelastyczne) w stosunku do światła padającego, a intensywność rozpraszania staje się zależna od kąta [144]. Jak pokazano na rys. 5, światło rozproszone jest najsilniejsze w kierunku zgodnym z propagacją światła padającego [145]. Dzięki teorii Mie można przeliczyć rozkład intensywności rozproszonego promieniowania na rozkład objętości lub liczby cząstek, co czyni ją szczególnie użyteczną w analizie większych cząstek [144].



Rysunek 5. Schematyczne przedstawienie różnic pomiędzy rozpraszaniem Rayleigh'a i Mie.

Gdy rozmiar cząstki przekracza długość fali, rozproszone promieniowanie ma większą intensywność w kierunku zgodnym z kierunkiem fali padającej. Natomiast, gdy rozmiar cząstki jest porównywalny z długością fali, intensywność światła rozproszonego zmienia się w zależności od kąta obserwacji, tworząc charakterystyczne minima i maksima. Teoria Mie, która dokładnie rozwiązuje równania Maxwella, przewiduje te zmiany intensywności w zakresie, gdzie średnica cząstki $d \sim \lambda$. Z kolei światło rozproszone przez cząstki o wymiarach mniejszych niż długość fali jest rozpraszane izotropowo, czyli z równą intensywnością we wszystkich kierunkach. W takich przypadkach wystarczająca jest prostsza teoria Rayleigh'a, która opisuje rozproszenie w tym zakresie rozmiarów.

1.2.1.2. Polidispersyjność

Polidispersyjność jest parametrem używanym do określania szerokości rozkładu wielkości cząstek. Przy założeniu, że cząstki należą do jednej populacji opisywanej rozkładem Gaussa, wskaźnik polidispersyjności (PDI) będzie związany z odchyleniem standardowym w następujący sposób:

$$PDI = \frac{\sigma^2}{Z^2} \quad (14)$$

Gdzie σ – odchylenie standardowe, Z – średni ważony promień hydrodynamiczny [141].

1.2.1.3. Potencjał zeta

Zeta potencjał (ZP, ζ), zwany także potencjałem elektrokinetycznym, jest kluczowym parametrem kontrolującym oddziaływania elektrostatyczne w dyspersjach cząstek. Jest szczególnie istotny dla analizy stabilności dyspersji koloidalnych [146]. Można go stosować do optymalizacji receptur zawiesin i emulsji oraz jako pomoc w przewidywaniu długoterminowej stabilności [147]. Większość dyspersji koloidalnych w ośrodkach wodnych posiada ładunek elektryczny, a jego rozkład na powierzchni cząstek wpływa na jonową strukturę otaczającej warstwy granicznej. Rozkład ładunku na powierzchni cząstki tworzy podwójną warstwę elektryczną (EDL), która składa się z dwóch regionów: wewnętrznego (warstwa Sterna), gdzie jony są silnie związane, oraz zewnętrznego (rozproszonego), gdzie jony są słabiej związane (rys. 6). Grubość tej podwójnej warstwy elektrycznej zależy od rodzaju i stężenia jonów w roztworze. Wynosi ona zwykle kilka nm i określana jest parametrem zwanym odległością Debye'a (κ^{-1}). Długość Debye'a można oszacować za pomocą pomiarów przewodności, zgodnie z metodą opisaną przez Dukhina i Goetza. Metoda ta jest ujęta w Międzynarodowej Normie ISO 13099, Część 1: 2012, „Układy koloidalne – Metody wyznaczania potencjału Zeta” [148]. Poniższe równanie przedstawia wzór na takie obliczenia:

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\varepsilon D}{K}} \quad (15)$$

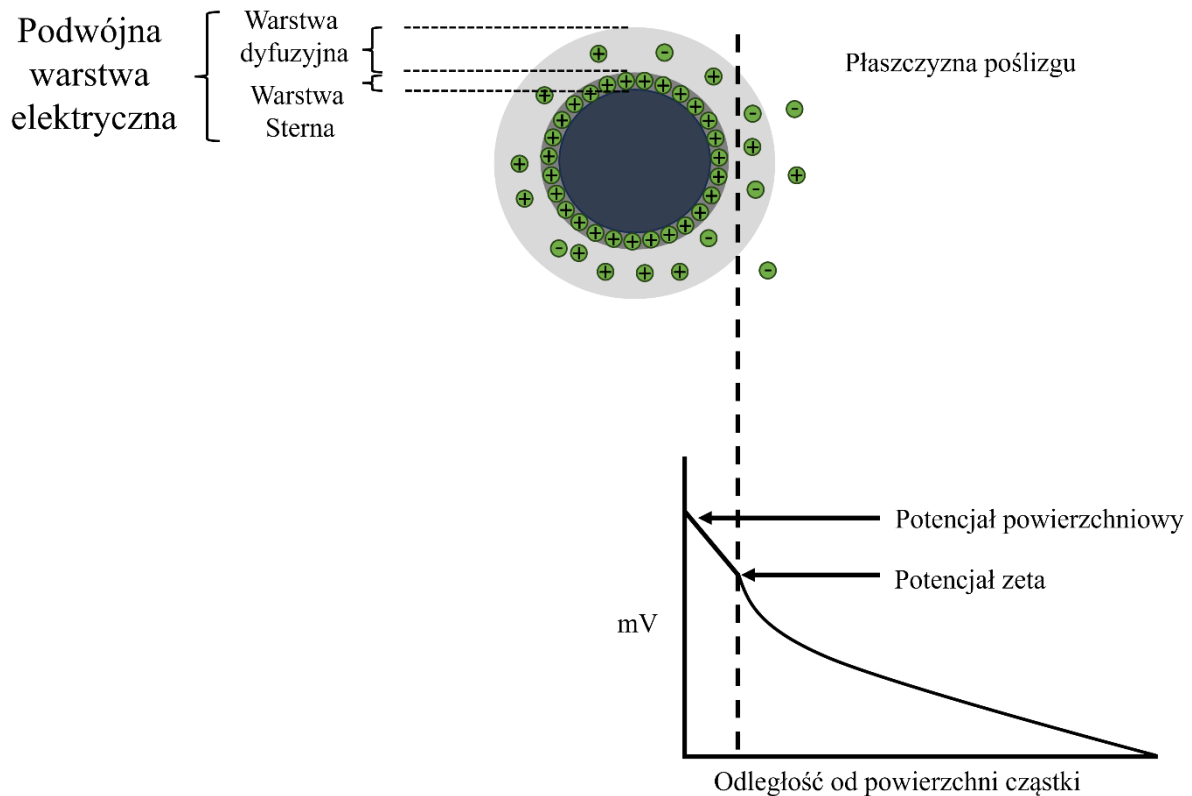
gdzie κ – przewodność, ε – przenikalność dielektryczna, D – współczynnik dyfuzji.

Lub:

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 k_B T}{2 N_A e^2 I}} \quad (16)$$

gdzie ε_r – względna przenikalność dielektryczna, ε_0 – przenikalność dielektryczna próżni, k_B – stała Boltzmanna, T – temperatura, N_A – stała Avogadra, e – ładunek elementarny, I – siła jonowa.

W warstwie dyfuzyjnej występuje granica, określana jako płaszczyzna poślizgu, która wyznacza obszar, w którym jony i cząstki tworzą stabilną strukturę. Podczas ruchu cząstki (np. w wyniku elektroforezy), jony znajdujące się w obrębie tej granicy poruszają się razem z cząstką. Natomiast jony znajdujące się poza tą granicą pozostają w stacjonarnej fazie dyspergującej. Potencjał na tej granicy (powierzchnia ścinania hydrodynamicznego lub płaszczyzny poślizgu) określany jest mianem potencjału zeta [133].



Rysunek 6. Schemat przedstawiający podwójną warstwę elektryczną otaczającą cząstkę w ośrodku wodnym oraz położenie płaszczyzny poślizgu. Potencjał zeta to potencjał elektryczny w płaszczyźnie poślizgu.

ZP nie można zmierzyć bezpośrednio i oblicza się go na podstawie ruchliwości elektroforetycznej naładowanych cząstek pod przyłożonym polem elektrycznym. Ruchliwość elektroforetyczną cząstek (μ_e) oblicza się ze wzoru:

$$\mu_e = \frac{V}{E} \quad (17)$$

gdzie V – prędkość naładowanych cząstek w polu elektrycznym, E – natężenie pola elektrycznego.

ZP powiązany jest z ruchliwością elektroforetyczną (równanie Henry'ego):

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta f(Ka)}{3\eta} \quad (18)$$

gdzie ε_r – względna przenikalność dielektryczna, ε_0 – przenikalność dielektryczna próżni, η – współczynnik lepkości, $f(Ka)$ – funkcja Henry'ego; K – odwrotność grubości podwójnej warstwy elektrycznej (promienia Debye'a), a – promień cząstki, $K \cdot a$ – stosunek promienia cząstki do promienia podwójnej warstwy elektrycznej; dla roztworów wodnych o umiarkowanym stężeniu elektrolitu najczęściej stosuje się przybliżenie Smoluchowskiego, gdzie $f(Ka) \approx 1,5$ [146].

Wielkość ZP dostarcza informacji o stabilności dyspersji lub roztworu koloidalnego. Cząstki o dużej bezwzględnej wartości ZP wykazują wzajemne odpychanie, co przeciwdziała ich agregacji. Przyjmuje się że dyspersja jest stabilna, jeśli $|\zeta| > 30$ mV.

Na wartość ZP mają wpływ różne czynniki, takie jak pH i przewodność roztworu. Grubość podwójnej warstwy elektrycznej (odległość Debye'a κ^{-1}) zależy od stężenia jonów w roztworze. A zatem im większa siła jonowa roztworu, tym mniejsza odległość Debye'a. Warto zauważyć, że zmiana grubości EDL może wpływać na dyfuzję cząstki, co z kolei może zmieniać wartość mierzonego promienia hydrodynamicznego cząstki za pomocą metody DLS.

1.2.2. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Skaningowy mikroskop elektronowy (SEM) o wysokiej rozdzielczości doskonale nadaje się do charakteryzowania wielkości, kształtu i morfologii NP, ponieważ niezbędne przygotowanie próbki i uzyskanie obrazu są stosunkowo szybkie i proste. Zasada pomiaru za pomocą SEM polega na poddaniu próbki ekspozycji na wiązkę elektronów, uformowaną przez elektrono- optyczny układ mikroskopu, która jednocześnie skanuje powierzchnię próbki linia po linii. Pod wpływem wiązki elektronów, próbka emituje różne sygnały, które odbierane

są przez detektor, a następnie otrzymany sygnał zostaje przetworzony na obraz próbki. Uzyskany obraz jest obrazem wirtualnym, zbudowanym na podstawie sygnałów emitowanych przez próbkę. Sygnały wytwarzane podczas interakcji elektron – próbka dostarczają wielu informacji na temat badanej próbki, takich jak: morfologia, rozmiar badanego związku, czy struktura krystaliczna.

1.3. Zamykanie substancji w nanocząstkach

W ostatnich latach enkapsulacja leków w NP z polimerów syntetycznych i naturalnych stała się jednym z najczęściej badanych systemów dostarczania leków. Powstałe nanosystemy cechują się wysoką biogodnością i biodegradowalnością, zapewniają powtarzalność w procesie wytwarzania i nadają się do masowej produkcji [149]. Są projektowane tak, aby były stabilne, miały wysoką pojemność ładunkową i umożliwiały transport jednego lub kilku składników aktywnych (zarówno o podobnych, jak i różnych właściwościach fizykochemicznych) w jednym preparacie. Takie rozwiązania są szczególnie atrakcyjne w kontekście dostarczania leków różnymi drogami oraz w realizacji wielozadaniowych strategii terapeutycznych [150]–[152]. Parametry takie jak rozmiar, ładunek powierzchniowy i morfologia nanocząstek można precyzyjnie kontrolować poprzez odpowiednie dostosowanie warunków syntezy. Jednak osiągnięcie pożądaných właściwości jest wyzwaniem, ponieważ zależą one od wielu zmiennych, takich jak rodzaj substancji aktywnej, typ i długość polimeru czy metoda przygotowania [153]–[155].

Pierwsza generacja terapii opartych na NP obejmowała systemy lipidowe, takie jak liposomy i micelle, które są obecnie zatwierdzone przez FDA [156]. Systemy te mogą zawierać nieorganiczne NP, takie jak złoto lub NP magnetyczne [157]. Takie właściwości umożliwiły rozwój funkcjonalnych nanosystemów dostarczania leków, obrazowania oraz terapii. Co więcej, nanostruktury wspomagają transport leków słabo rozpuszczalnych w wodzie bezpośrednio do miejsca docelowego. NP leków wykazują również wyższą biodostępność po podaniu doustnym dzięki mechanizmom absorpcyjnej endocytozy^b [158].

Wielkość NP oraz mechanizmy ich usuwania mają kluczowe znaczenie przy projektowaniu skutecznych preparatów farmaceutycznych [159]. Na przykład Toti i in. opisali PLGA NP o wielkości od 100 do 300 nm, które były efektywnie internalizowane przez komórki

^b To proces zachodzący w komórkach, w którym materiały zewnątrzkomórkowe lub ładunek są transportowane do przedziałów wewnątrzkomórkowych poprzez wpuklenie błony komórkowej i wytworzenie pęcherzyka.

śródbłonna ssaków poprzez mechanizmy endocytozy i pinocytozy^c, co umożliwiło długotrwałe uwalnianie leku [160].

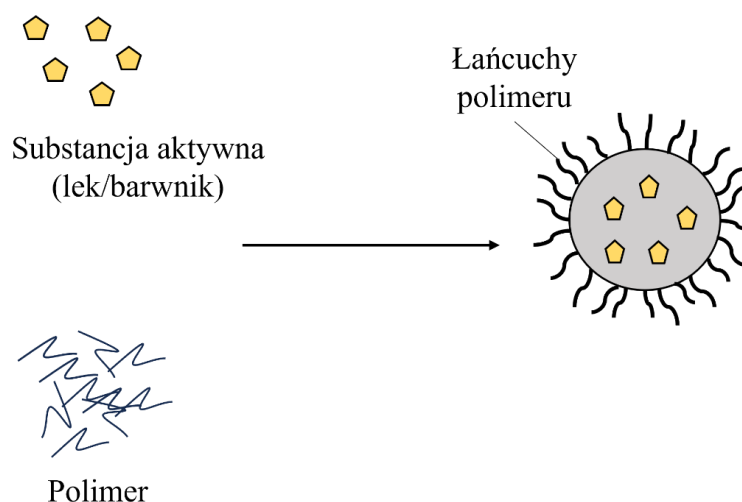
Jednym z największych wyzwań związanych z nanonośnikami jest zwiększenie ich zdolności do transportowania substancji aktywnych, co pozwala na podanie mniejszej dawki, wystarczającej jednak do osiągnięcia terapeutycznego stężenia leku w miejscu docelowym. Taki proces pozwala zminimalizować ryzyko toksyczności i skutków ubocznych [158], [161]. Dodatkowe wyzwania obejmują poprawę stabilności NP oraz precyzyjną kontrolę nad profilem uwalniania leku.

W procesie opracowania nanonośników substancji aktywnych konieczna jest analiza szeregu parametrów, takich jak efektywność enkapsulacji, procent załadowania substancją i profil uwalniania substancji aktywnych NP. Często w tych testach wykorzystuje się substancje modelowe, takie jak barwniki fluorescencyjne, dzięki którym można ocenić w badaniach *in vitro* miejsce, w którym gromadzi się uwalniana z NP substancja aktywna.

1.3.1. Enkapsulacja substancji hydrofobowych

Enkapsulacja hydrofobowych barwników fluorescencyjnych w NP polimerowych ma istotne znaczenie w różnych dziedzinach nauki i technologii [162]. Hydrofobowe barwniki, takie jak fluoresceina, są szeroko stosowane ze względu na swoje wyjątkowe właściwości optyczne oraz zastosowanie w badaniach fluorescencyjnych [163]. Ponadto, często pełnią funkcję substancji modelowych w badaniach nad transportem związków aktywnych przez NP [164]. Zamknięcie tych barwników w hydrofobowym rdzeniu NP tworzy warstwę ochronną, która chroni barwniki przed cząsteczkami wody, co znacząco zwiększa ich stabilność oraz funkcjonalność w środowisku badawczym i aplikacyjnym [165].

^c To forma endocytozy, gdzie pochłaniany jest płyn pozakomórkowy wraz z rozpuszczonymi substancjami.



Rysunek 7. Schemat enkapsulacji substancji aktywnych w NP.

Opracowano różne metody zamykania hydrofobowych barwników fluorescencyjnych w NP polimerowych, oferując badaczom elastyczność i kontrolę nad procesem enkapsulacji [162], [166]. Na przykład metoda wymiany rozpuszczalnika umożliwia skuteczne zamknięcie związków hydrofobowych w NP, oferując innowacyjne podejście do zwiększenia wydajności i stabilności enkapsulacji [167]. Z kolei technika polimeryzacji miniemulsyjnej pozwala na inkorporację różnych barwników za pomocą kopolimerów, co umożliwia dostosowanie procesu do specyficznych właściwości barwników [165], [166]. Stosowanie takich nowoczesnych strategii, które umożliwiają kontrolowanie zamknięcia barwników w hydrofobowym rdzeniu NP, znacząco zwiększa ich wydajność oraz potencjał zastosowań w wielu dziedzinach nauki i technologii. Enkapsulacja hydrofobowych barwników fluorescencyjnych w NP polimerowych otwiera szerokie możliwości zastosowań w różnych dziedzinach [168]. Zamykając barwniki w NP polimerowych lub liposomach poprzez oddziaływanie hydrofobowe, naukowcy mogą tworzyć wszechstronne platformy o różnych funkcjach [162]. Barwniki te mogą być wykorzystywane jako cząsteczki kontrastujące do obrazowania *in vivo*, czujniki polarności i sztywności, a także jako narzędzia do analiz opartych na fluorescencji [165], [167].

1.3.2. Parametry oceniające efektywność enkapsulacji substancji w nanocząstkach

Istnieje kilka parametrów, które należy poddać analizie w przypadku enkapsulacji substancji aktywnych w NP. Efektywność enkapsulacji ($EE_{\%}$), jest to procent masy substancji

aktywnej zamkniętej w NP względem całkowitej ilości substancji użytej w procesie. Wysoka EE jest kluczowa dla zmniejszenia ilości marnowanego leku i zapewnienia odpowiedniej dawki terapeutycznej [169], [170].

$$EE_{\%} = \frac{m_{cała} - m_{substancji\ niezwiązanej}}{m_{cała}} * 100 \quad (19)$$

Procent załadowania substancją (barwnikiem/lekiem) ($DL_{\%}$) wyraża stosunek masy substancji aktywnej do masy NP. Wysokie wartości $DL_{\%}$ oznaczają, że więcej leku jest dostarczane na jednostkę masy NP, co jest korzystne dla zmniejszenia dawki i potencjalnych skutków ubocznych [170], [171].

$$DL_{\%} = \frac{m_{cała} - m_{substancji\ niezwiązanej}}{m_{NP}} * 100 \quad (20)$$

Badanie uwalniania substancji aktywnej z NP w czasie pozwala na ocenę, jak efektywnie i w jakim tempie substancja ta jest uwalniana w środowisku biologicznym. Idealne NP powinny zapewniać kontrolowane, przedłużone uwalnianie, minimalizując przy tym przedwczesne uwalnianie (*ang. burst release*) [96], [172].

Skuteczność ładowania i enkapsulacji to zmienne związane z oznaczaniem ilościowym włączonych składników aktywnych w NP. Parametry te można określić metodami analitycznymi, takimi jak spektrofotometria w zakresie promieniowania UV, wysokosprawna chromatografia cieczowa lub chromatografia gazowa (w przypadku lotnych substancji czynnych, tj. olejków eterycznych) [21].

1.3.3. Mechanizm uwalniania substancji enkapsulowanych z nanocząstek

NP uwalniają substancje terapeutyczne poprzez transportowanie ich początkowo z matrycy polimerowej na zewnętrzną powierzchnię, a następnie do otaczającego środowiska. Proces uwalniania leku przebiega według różnych mechanizmów lub ich kombinacji, co można opisać za pomocą modeli matematycznych [149].

W przypadku NP wrażliwych na bodźce [173], uwalnianie substancji aktywnych jest regulowane przez trzy główne mechanizmy: (i) standardowe uwalnianie kontrolowane dyfuzją; (ii) degradacja NP z biodegradowalnych polimerów; oraz (iii) uwalnianie wywołane warunkami środowiskowymi, takimi jak pH, temperatura lub promieniowanie. Proces uwalniania rozpoczyna się, gdy polimer absorbuje wodę z otoczenia dzięki swojej porowatej

strukturze. Pory w matrycy powiększają się i zwiększają swoją liczbę, co umożliwia dyfuzję substancji aktywnej na zasadzie gradientu stężeń.

W przypadku małych cząsteczek hydrofobowych transport może odbywać się poprzez bezpośrednią dyfuzję przez łańcuchy polimerowe. Takie uwalnianie występuje w nierozkładalnych systemach dostarczania leku, gdzie szybkość procesu zależy głównie od właściwości membrany polimerowej, takich jak jej przepuszczalność i grubość, a nie od gradientu stężeń. Porowatość nanostruktury może również powodować powstawanie ciśnienia osmotycznego, umożliwiającego aktywny transport substancji w procesie nazywanym pompowaniem osmotycznym. Kontrolowane przez dyfuzję uwalnianie leku zależy od efektywnego współczynnika dyfuzji substancji przez matrycę polimerową [174].

1.4. Badanie interakcji nanocząstek z komórkami

Fibroblasty odgrywają kluczową rolę w rozwoju wielu nowotworów złośliwych, w tym raka endometrium. Ich udział we wzroście guza, procesach przerzutowych i oporności na terapię sprawia, że są obiecującym celem dla strategii terapeutycznych wykorzystujących NP. Badania pokazują, że celowanie w fibroblasty za pomocą NP może znacznie zwiększyć skuteczność leczenia nowotworów.

Fibroblasty związane z rakiem (CAF), odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu mikrośrodowiska guza (TME). CAF wspierają progresję nowotworu poprzez przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej, wydzielanie czynników wzrostu oraz interakcje z komórkami nowotworowymi, co prowadzi do rozwoju bardziej agresywnych fenotypów guza. W przypadku raka endometrium ich działanie promuje wzrost guza, angiogenezę i zdolności przerzutowe, a także wspiera oporność na terapię przeciwnowotworowe [175], [176].

NP stanowią nowoczesne narzędzie do celowania w fibroblasty w leczeniu nowotworów. Mogą być zaprojektowane w taki sposób, aby dostarczać środki terapeutyczne bezpośrednio do fibroblastów, zakłócając ich funkcję wspierającą TME. Na przykład Zhang i in. [176] opisali wykorzystanie systemów opartych na NP do precyzyjnego celowania w fibroblasty w różnych nowotworach, w tym w raku endometrium, co pozwoliło na poprawę dostarczania leków i efektów terapeutycznych.

Niektóre NP mają właściwości teranostyczne, co oznacza, że mogą jednocześnie dostarczać leki i markery obrazowania. Pozwala to nie tylko na terapię, ale również na monitorowanie odpowiedzi guza w czasie rzeczywistym, co ułatwia lepsze zarządzanie leczeniem. Dodatkowo, NP mogą być zaprojektowane do jednoczesnego dostarczania wielu leków, które działają synergistycznie. Na przykład połączenie chemioterapii z modulatorami

TME pozwala na atakowanie zarówno komórek nowotworowych, jak i fibroblastów, zmniejszając ich rolę wspierającą rozwój guza [175], [177].

Fibroblasty są integralną częścią progresji raka endometrium i innych nowotworów złośliwych, co czyni je strategicznym celem dla terapii opartych na NP. Terapie tego typu oferują nowe możliwości zwiększenia skuteczności leczenia poprzez równoczesne działanie na komórki nowotworowe i mikrośrodowisko guza.

1.5. Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza

Nanocząstki tlenku żelaza (*ang. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*, SPION) to NP, które wykazują właściwości superparamagnetyczne – właściwość, która zanika w momencie usunięcia zewnętrznego pola magnetycznego, co zapobiega ich agregacji w roztworze. SPIONy mają wielkość zazwyczaj poniżej 100 nm i są najczęściej zbudowane z magnetytu (Fe_3O_4) lub maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) [178], [179]. SPIONy znajdują szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach biomedycyny, w tym są akredytowane przez FDA do stosowania jako środki kontrastowe w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego (RM), dzięki czemu można uzyskać lepsze obrazy tkanek i organów [180]. Mogą być używane do celowanego dostarczenia leków [181], w terapii hipertermicznej, gdzie są podgrzewane za pomocą pola magnetycznego do temperatury, która jest szkodliwa dla komórek rakowych, ale nie uszkadza zdrowych tkanek, dzięki temu można selektywnie niszczyć komórki nowotworowe [182], [183]. Dodatkowo mogą być używane do izolowania i oczyszczania biomolekuł, takich jak DNA, RNA czy białka, dzięki swoim właściwościom magnetycznym, które pozwalają na łatwe oddzielanie ich od reszty próbki pod wpływem pola magnetycznego [184].

SPIONy mogą być integrowane z NP polimerowymi, tworząc hybrydowe systemy, które łączą właściwości magnetyczne SPIONów z zaletami NP polimerowych. Powlekanie SPIONów polimerami może poprawić ich stabilność w roztworach biologicznych, zapobiegając ich agregacji i degradacji. Dodatkowo, polimerowe powłoki mogą być zaprojektowane tak, aby kontrolować uwalnianie leków, które są związane z SPIONami, co umożliwia precyzyjne dostarczanie terapeutyczne. Powlekanie SPIONów biogodnymi polimerami, takimi jak PEG (polietylenoglikol) czy ich zamykanie w PCL, może zmniejszyć ich toksyczność i poprawić ich biogodność, co jest kluczowe dla zastosowań *in vivo*. Powierzchnia NP polimerowych może być funkcjonalizowana różnymi grupami chemicznymi lub biologicznymi, co umożliwia celowane dostarczanie do określonych komórek lub tkanek.

2. Cele i założenia pracy

Celem pracy było opracowanie metody syntezy biogodnych transporterów leków, bazując na syntetycznym polimerze polikaprolaktonie (PCL), o rozmiarze zbliżonym do 100 nm oraz projektowanie ich biogodności podczas badań *in vitro*. Kluczowym aspektem tej pracy jest wykorzystanie zasad inżynierii chemicznej do kontrolowanego wytwarzania NP o określonych właściwościach, tj. rozmiarze, rozkładzie rozmiaru, oraz potencjale zeta (ζ). Aby to osiągnąć, zastosowano zaawansowane metody, takie jak mikroprzepływowe systemy do produkcji i separacji NP, które stanowią innowację w tej dziedzinie.

Sformułowano następujące hipotezy badawcze:

1. Kontrolowane wytwarzanie biogodnych PCL NP jest możliwe dzięki zastosowaniu metody nanoprecypitacji oraz mikroprzepływowych systemów produkcji, które umożliwiają precyzyjną regulację kluczowych właściwości produktu.
2. Wpływ parametrów procesowych, takich jak stężenie polimeru, stosunek faz oraz warunki mieszania, mają kluczowe znaczenie w uzyskaniu nanocząstek o pożądanych właściwościach, takich jak rozmiar zbliżony do 100 nm i kontrolowany profil uwalniania substancji aktywnych, w tym hydrofobowych barwników fluorescencyjnych.
3. Integracja superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (SPIONów) z PCL NP umożliwia stworzenie hybrydowych systemów o właściwościach magnetycznych łączących zalety SPIONów i PCL, co rozszerza potencjalne zastosowania tych nanocząstek w terapiach ukierunkowanych i obrazowaniu medycznym. Dodatkowo, zastosowanie układu mikroprzepływowego z magnesem neodymowym znacząco usprawnia separację nanocząstek magnetycznych, skracając czas oczyszczania produktu i zwiększając wydajność procesu.
4. Model numeryczny nanoprecypitacji, oparty na równaniach dyfuzji i koalescencji, umożliwia przewidywanie rozmiaru NP, co stanowi efektywne narzędzie wspomagające projektowanie procesów syntezy NP.

Te tezy odzwierciedlają interdyscyplinarny charakter pracy, łączący inżynierię chemiczną, bioinżynierię i biomedycynę, oraz osiągnięcia w zakresie precyzyjnej syntezy, modelowania procesów i zastosowania funkcjonalnych nanomateriałów.

3. Materiały i metody

3.1. Wybór polimeru i stosunku przepływu fazy wodnej do organicznej

Pierwszy etap badań obejmował analizę wpływu stężeń polimerów oraz stosunku przepływu faz wodnej i organicznej na proces nanoprecypitacji, w celu uzyskania NP o możliwie najmniejszych rozmiarach i wąskim rozkładzie średnic. Do syntezy wykorzystano polikaprolakton (PCL) oraz kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA). Jako rozpuszczalniki organiczne zastosowano dichlorometan (DCM) oraz dimetylosulfotlenek (DMSO), a proces prowadzono z wykorzystaniem prostego układu mikroprzepływowego. Na tym etapie zbadano również wpływ parametru R, definiującego stosunek przepływu fazy wodnej (Q_w) do fazy organicznej (Q_{org}) na rozkład średnic NP.

3.2. Wybór rozpuszczalników organicznych

Drugi etap polegał na doborze mniej toksycznych rozpuszczalników organicznych, które umożliwiałyby zarówno syntezę NP o wąskim rozkładzie wielkości, jak i łatwe usunięcie rozpuszczalnika po zakończeniu procesu. Oprócz DCM i DMSO zastosowano octan etylu (OE), tetrahydrofuran (THF), toluen (Tol), aceton (Ac) oraz etanol (EtOH).

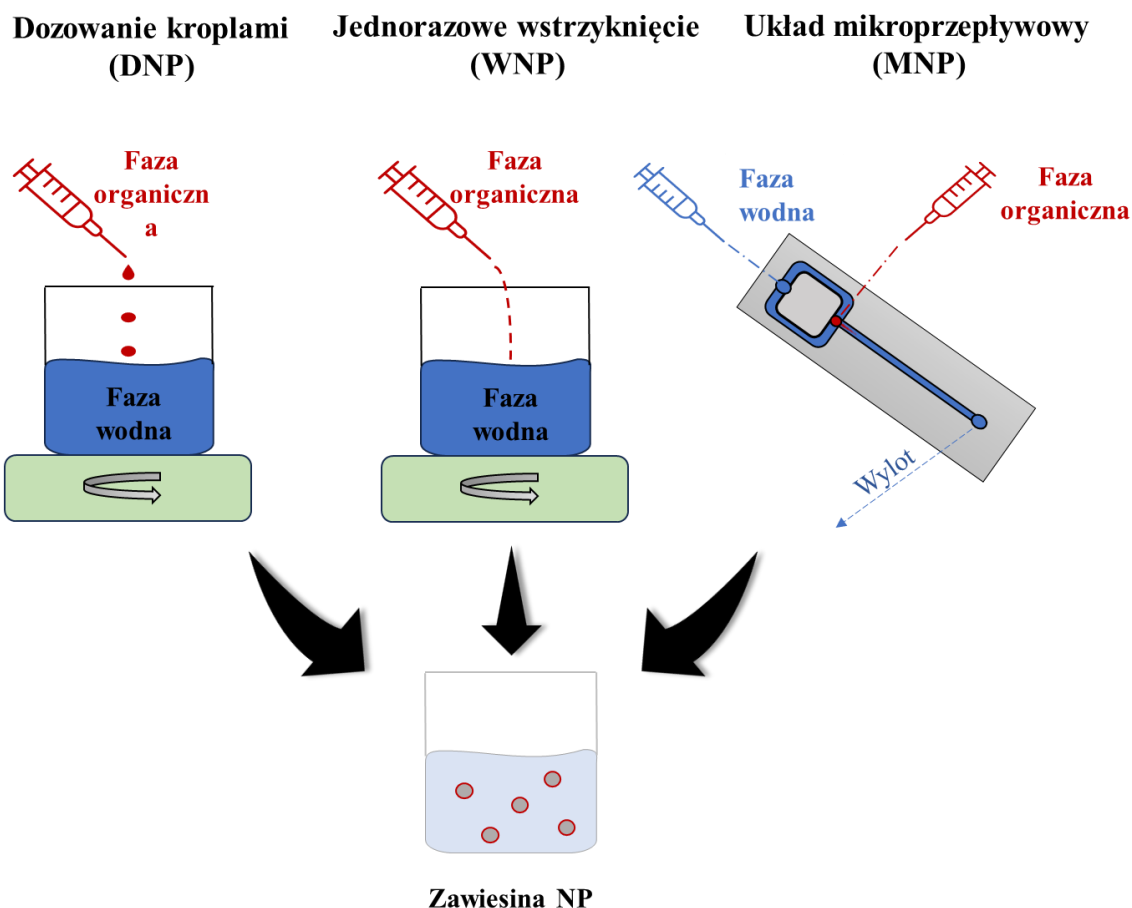
3.3. Wybór surfaktantu

Kolejnym etapem było wprowadzenie surfaktantów, w celu stabilizacji zawiesin NP oraz ograniczenia ich agregacji. W tym celu wykorzystano Tween®80 (T80) oraz Pluronic®F-127 (F127), które są powszechnie stosowane ze względu na swoją biogodność i zdolność do tworzenia stabilnych układów koloidalnych. Po wyborze rodzaju surfaktantu przeprowadzono systematyczne badania w celu optymalizacji jego stężenia. Analizowano stężenia w zakresie od 0,01% wag./obj. do 1% wag./obj. w fazie wodnej. Kryterium doboru odpowiedniego stężenia była minimalizacja średnicy hydrodynamicznej NP, zmniejszenie indeksu polidispersyjności (PDI) oraz zapewnienie stabilności koloidalnej układu przez określony czas przechowywania. Tak przeprowadzona analiza pozwoliła na wybór najbardziej efektywnego stężenia surfaktantu, które zostało wykorzystane w kolejnych etapach badań nad syntezą i funkcjonalizacją NP.

3.4. Metody syntezy nanocząstek polimerowych

Syntezę NP polimerowych metodą nanoprecypitacji prowadzono w temperaturze pokojowej. Analizowano trzy warianty łączenia fazy wodnej z organiczną. Pierwsza metoda

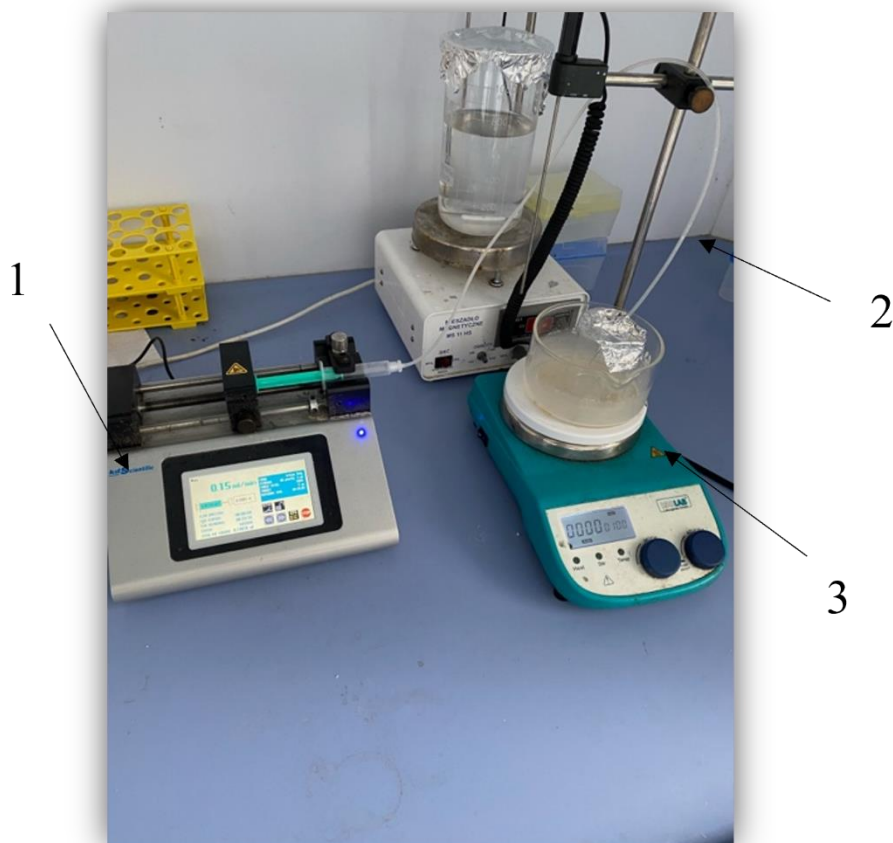
(dozowanie kroplami, DNP) polegała na wykorzystaniu pompy strzykawkowej do stopniowego dozowania fazy organicznej do fazy wodnej przy stałym mieszaniu na mieszadle magnetycznym. Taki kontrolowany sposób dozowania miał na celu powolne mieszanie faz, co mogło sprzyjać lepszej kontroli nad wielkością cząstek i ich jednorodnością. Druga metoda (jednorazowe wstrzyknięcie, WNP) polegała na jednorazowym wstrzyknięciu całej objętości fazy organicznej do fazy wodnej podczas ciągłego mieszania na mieszadle magnetycznym. Ten sposób, będący szybszym wariantem łączenia faz, miał na celu wywołanie natychmiastowego wytrącenia NP oraz skrócenie czasu procesu. Trzecią metodą (układ mikroprzepływowy, MNP) było wykorzystanie specjalnie zaprojektowanego układu mikroprzepływowego, który umożliwia precyzyjną kontrolę nad przepływem obu faz w mikroskali, co zapewnia jednorodne i kontrolowane warunki wytrącania NP. Mikroprzepływowy układ może minimalizować różnice w rozmiarze cząstek oraz ich polidispersyjność, dzięki równomiernemu i stabilnemu mieszaniu faz. Każda z tych metod oferuje różne zalety i ograniczenia, a ich zastosowanie pozwoliło na wyciągnięcie wniosków dotyczących wpływu sposobu łączenia faz na jakość i stabilność uzyskiwanych NP. Schematyczne przedstawienie opisanych metod przedstawiono na rys. 8.



Rysunek 8. Schemat metod łączenia faz do otrzymywania PCL NP metodą nanoprecypitacji.

3.4.1. Metoda dozowania kroplami (DNP)

Na rys. 9 przedstawiono układ użyty do metody dozowania fazy organicznej kroplami. W strzykawce na pompie strzykawkowej umieszczono fazę organiczną, do którego przyłączono wężyk PTFE, zakończony igłą 25G. Końcówka igły znajdowała się w fazie wodnej umieszczonej w naczyniu na mieszadle magnetycznym, szybkość mieszania ustawiono na 1000 obr./min. Po zakończeniu dozowania fazy organicznej zawiesinę NP pozostawiono na mieszadle magnetycznym na 10 min. Następnym krokiem było odparowanie rozpuszczalnika.



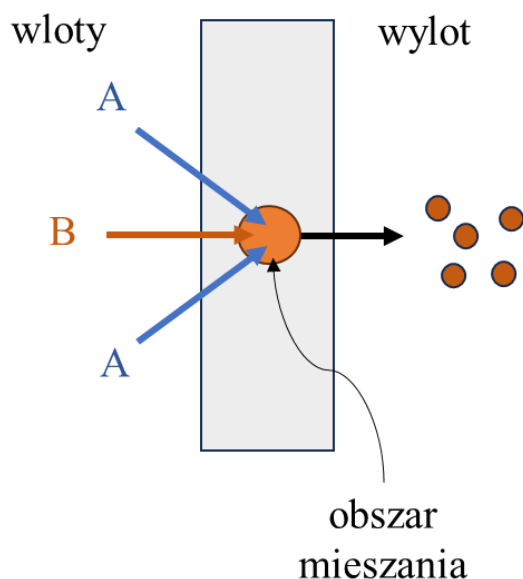
Rysunek 9. Aparatura do nanoprecypitacji metodą dozowania fazy organicznej kroplami (1 - pompa strzykawkowa z fazą organiczną, 2 - wężyk z PTFE doprowadzający fazę organiczną do wodnej, 3 - zlewka z fazą wodną w łaźni wodnej na mieszadle magnetycznym.

3.4.2. Metoda jednorazowego wstrzyknięcia (WNP)

Druga metoda polega na podaniu całości fazy organicznej przy użyciu strzykawki lub pipety automatycznej do fazy wodnej przy stałej szybkości mieszania (1000 obr./min). Po zmieszaniu faz, zawiesinę NP pozostawiono na mieszadle magnetycznym na 10 min. Następnym krokiem było odparowanie rozpuszczalnika.

3.4.3. Układy mikroprzepływowe (MNP)

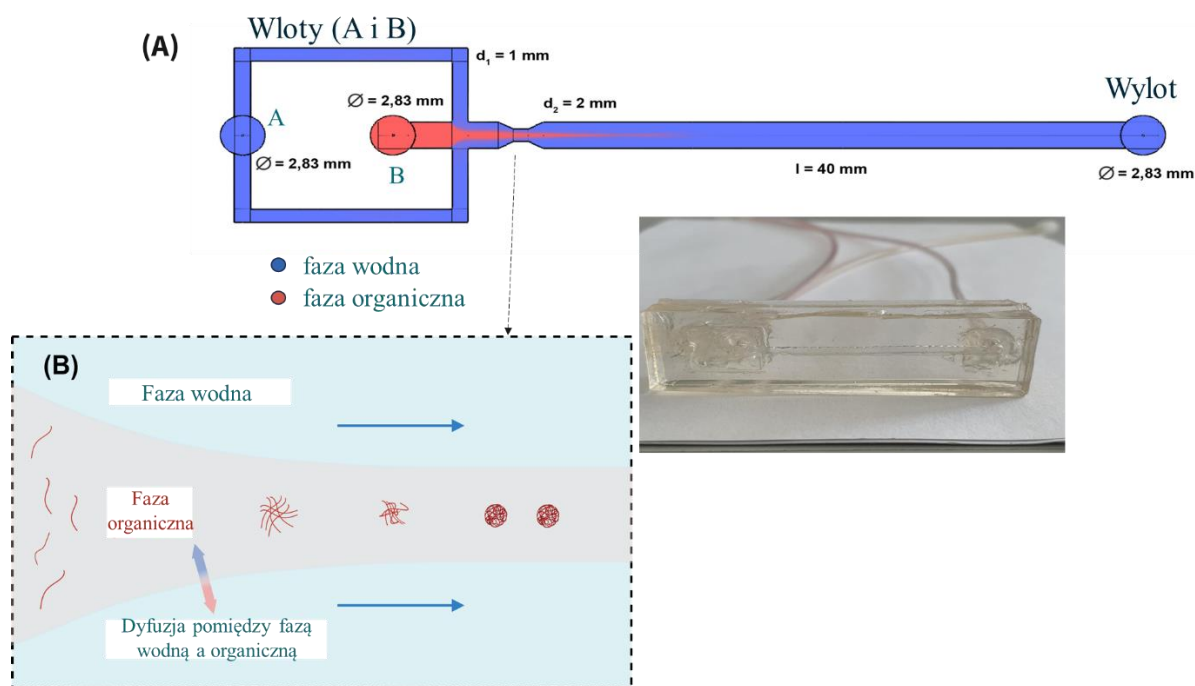
Pierwsze eksperymenty prowadzono na prostym układzie mikroprzepływowym przedstawionym na rys. 10. Celem była weryfikacja czy metoda mikroprzepływowa może posłużyć do otrzymywania polimerowych NP.



Rysunek 10. Schemat układu mikroprzepływowego składającego się z 4 igieł (3 wloty, 1 wylot) umieszczonych pomiędzy 2 szkiełkami nakrywkowymi. Wloty A i niebieskie strzałki odnoszą się do fazy wodnej, a wlot B i strzałka czerwona do fazy organicznej, wylot z układu oznaczony jest czarną strzałką.

Po wstępnym sprawdzeniu metody, kolejnym krokiem było wytworzenie zaawansowanego systemu mikroprzepływowego, za pomocą którego doskonalono proces wytwarzania polimerowych NP metodą nanoprecypitacji.

Dr inż. Piotr Kowalczyk zaprojektował urządzenie mikroprzepływowe z wykorzystaniem oprogramowania Blender 3.0 (rys. 11A). Geometria kanału wewnętrznego została wydrukowana na drukarce 3D przy użyciu drukarki ZMorph VX (ZMorph, Wrocław, Polska). Zastosowanym materiałem drukarskim był żarnik acetonitryl-butadien-styren (ABS) o średnicy 1,75 mm (ZMorph). Wydrukowany model następnie umieszczono w prostokątnej formie, a następnie nałożono żywicę polidimetylosiloksanową (PDMS) – Sylgard 184 Silicone Elastomer (Dow Chemical, Midland, MI, USA). Przed nałożeniem zmieszana żywicę odgazowano pod próżnią. Po 15 minutach utwardzania w temperaturze 90°C, wydrukowany w 3D model usunięto, a pustą przestrzeń pozostawioną przez model przykryto drugim płaskim kawałkiem częściowo utwardzonego PDMS i 1 kg odważnikiem w celu dociśnięcia elementów do siebie. Ułożone urządzenie utwardzono dalej w temperaturze 90°C przez noc. Na wlotach i wylotach chipa PDMS zainstalowano rurkę silikonową o średnicy 3 mm i uszczelniono niewielką ilością kleju silikonowego.



Rysunek 11. (A) Schemat urządzenia mikroprzepływowego oraz zdjęcie prezentujące wytworzony układ. (B) Proponowany mechanizm otrzymywania NP. Utworzono przy użyciu BioRender.com.

Rysunek 11A przedstawia konstrukcję zastosowanego urządzenia mikroprzepływowego. Posiada dwa wloty i jeden wylot. Organiczną fazę rozproszoną wprowadzono z kanału centralnego (wlot B), a fazę ciągłą (roztwór wodny) wprowadzono przez wlot A. Fazę organiczną i wodną pompowano za pomocą pomp strzykawkowych. Do połączenia strzykawki z urządzeniem mikroprzepływowym wykorzystano wężyki PTFE (faza organiczna) i silikonowe (faza wodna). Zawiesinę NP zbierano do naczynia ustawionego na mieszadle magnetycznym, mieszano 10 min. Następnym krokiem było odparowanie rozpuszczalnika.

3.4.4. Dodatek etanolu jako współrozpuszczalnika

Po przeanalizowaniu danych literaturowych [185] postanowiono zbadać wpływ dodatku etanolu (EtOH) do fazy organicznej na proces formowania NP polimerowych oraz na późniejszy etap ich oczyszczania. EtOH, jako współrozpuszczalnik dobrze mieszający się z wodą, wspomaga dyfuzję THF do fazy wodnej podczas nanoprecypitacji, co może wpływać na wielkość i jednorodność powstających NP.

W celu optymalizacji procesu, dodawano EtOH w różnych proporcjach względem THF do fazy organicznej przed etapem mieszania z fazą wodną. Taka modyfikacja miała na celu poprawę kontroli nad procesem wytrącania cząstek, zmniejszenie ich polidispersyjności

oraz ułatwienie późniejszego usuwania pozostałości rozpuszczalników w trakcie oczyszczania. Dodatkowo, do fazy organicznej wprowadzano 0,1% obj./obj. roztworu 0,1M wodorotlenku sodu (NaOH), co miało wpłynąć na stabilność cząstek w zawieszynie i sprzyjać ich lepszej separacji w późniejszych etapach. Taki zabieg pozwalał nie tylko na zwiększenie wydajności procesu formowania NP, ale również na uproszczenie ich dalszego oczyszczania, co jest kluczowe dla uzyskania stabilnej, jednorodnej zawiesiny.

3.5. Odparowanie rozpuszczalników

Kolejnym etapem, po połączeniu fazy wodnej z organiczną i wytworzeniu NP, było usunięcie rozpuszczalników organicznych poprzez odparowanie. Odparowanie prowadzono na 2 sposoby, z użyciem wyparki obrotowej oraz poprzez odparowanie na mieszadle magnetycznym (odparowanie swobodne).

- a) Wyparka obrotowa - badane zawiesiny NP były umieszczane w kolbie na wyparce rotacyjnej i odparowywane w temperaturze 35°C przy obniżonym ciśnieniu maksymalnie do 40 mbar, przez około 60 minut.
- b) Odparowanie swobodne - naczynie z zawiesziną NP umieszczano na mieszadle magnetycznym na około 24-48 godz. przy obrotach 250-400 obr./min., aż do całkowitego usunięcia rozpuszczalnika organicznego.

3.6. Oczyszczanie i zateżnienie zawiesin nanocząstek

W metodzie nanoprecypitacji po wytworzeniu NP, konieczne jest usunięcie pozostałości rozpuszczalnika, nieenkapsulowanych substancji aktywnych oraz nadmiaru surfaktantu, w celu uzyskania czystej, jednorodnej zawiesiny NP. Standardowe metody, takie jak ultrafiltracja, dializa, wirowanie oraz liofilizacja, zapewniają efektywne oczyszczanie, jednak mogą wiązać się z pewnymi problemami. Częstym wyzwaniem jest agregacja NP, szczególnie podczas procesu liofilizacji, co utrudnia ich późniejszą redispersję. Dodatkowo, w przypadku ultrafiltracji i dializy może dochodzić do blokowania membran przez NP, co wpływa na wydajność procesu i wymaga dostosowania warunków, takich jak ciśnienie i czas filtracji. Typowe techniki filtracyjne obejmują użycie filtrów membranowych o odpowiednich rozmiarach porów (zwykle w zakresie 0,2–0,45 μm), które są zdolne do zatrzymania większych cząstek i zanieczyszczeń, przepuszczając jedynie czyste NP o pożądanym rozmiarze.

W niektórych przypadkach stosuje się również ultrafiltrację, która umożliwia dokładniejsze oczyszczenie oraz koncentrację NP, szczególnie przy dużych objętościach próbek.

Po odparowaniu rozpuszczalnika w celu oczyszczenia filtrowano zawiesiny NP z wykorzystaniem filtrów strzykawkowych 0,45 μm z regenerowanej celulozy (RC). Następnie próbki zatężano na wyparce obrotowej i ponownie filtrowano.

3.7. Badanie wpływu temperatury fazy wodnej na rozmiar polimerowych nanocząstek

Temperatura procesu ma niezwykle ważny wpływ na wytwarzanie NP, dlatego zbadano wpływ temperatury fazy wodnej na rozmiar otrzymywanych cząstek PCL NP. Zbadano rozkład średnic dla szeregu temperatur fazy wodnej: 20, 40, 60, 80°C. Po dodaniu całej fazy organicznej, zawiesinę NP chłodzono w kąpeli lodowej. F127 dodawano po odparowaniu rozpuszczalnika na wyparce rotacyjnej a rozmiar NP badano przed i po dodaniu surfaktantu (0,5% wag./obj.). Następnie przeprowadzono analizę dla różnych stężeń polimeru przy temperaturze fazy wodnej 20°C i 80°C. Próbki badano z wykorzystaniem DLS przed i po dodaniu surfaktantu.

3.8. Badanie stabilności zawiesin nanocząstek

Badania stabilności NP obejmowały dostosowanie warunków liofilizacji, jednej z najpowszechniejszych metod długoterminowego przechowywania układów koloidalnych. Zawiesiny NP zamrażano w temperaturze -20°C i -80°C z dodatkiem stabilizatora (F127) i krioprotektantu (trehalozy, T). Przeprowadzono 3 cykle liofilizacji, po każdym cyklu wysuszone NP zawieszano w wodzie (1 godz., 1000 obr./min.) i analizowano z wykorzystaniem DLS.

3.9. Analiza fizykochemiczna

3.9.1. Dynamiczne rozpraszanie światła

Rozkłady wielkości cząstek analizowano metodą DLS przy użyciu Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Pomiar przeprowadzono w temperaturze 25°C i przy kącie rozproszenia 173°. Cząstki zawieszane w próbce poruszają się ruchami Browna, co powoduje zmiany intensywności światła docierającego do detektora. Oprogramowanie Zetasizer (wersja 7.11) oblicza średnią średnicę hydrodynamiczną i PDI w oparciu o analizę czasowej korelacji

intensywności światła rozproszonego przez zawiesinę cząstek. Średni rozmiar cząstek (podany jako średnia średnica w nanometrach \pm SD) jest obliczany przez oprogramowanie urządzenia na podstawie sygnału siły cząstek zgodnie z normą ISO (ISO 13321: 1996E i 22412). Wskaźnik polidispersyjności jest bezwymiarową wartością wyrażającą szerokość rozkładu wielkości cząstek emulsji, tj. jednorodność analizowanej próbki, obliczoną zgodnie z normą ISO 13321: 1996E i 22412. Przed pomiarem DLS nie przeprowadzono żadnej obróbki wstępnej (np. filtrowania), żeby mieć pełen zakres otrzymanych średnic. Wszystkie pomiary przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Ładunek powierzchniowy otrzymanych NP, charakteryzowany przez potencjał zeta (ζ), mierzono za pomocą urządzenia Zetasizer Nano ZS w temperaturze 25°C. Badane były zawiesiny NP w wodzie ultraczystej z dodatkiem 0,1M buforu PBS (pH 7,4) w stosunku objętościowym 9:1. Wszystkie pomiary przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Wartości średnie średnic NP i PDI wyrażono jako średnie \pm SD. Przeprowadzono analizę statystyczną za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) dla $p < 0,05$ z testem post hoc Tukeya (OriginPRO 2020b, OriginLab Corporation).

3.9.2. Skaningowa mikroskopia elektronowa

Zawiesiny wybranych PCL NP (około 1 ml) umieszczano w eppendorfach. Następnie dzięki uprzejmości dr inż Michała Wojasińskiego zostawały poddawane analizie z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego (SEM, SU8230, Hitachi) znajdującego się w Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii (CEZAMAT). Po analizie wielkości cząstek i potencjału ζ w sekcji 3.9.1., próbki rozcieńczono 1000 razy ultraczystą wodą i przygotowano do obrazowania. Rozcieńczone zawiesiny NP (10 μ L) umieszczono na powierzchni płytki krzemowej, którą najpierw przyklejono taśmą węglową do aluminiowego króćca. Zawiesiny na powierzchni płytek krzemowych pozostawiono do odparowania przez noc w temperaturze otoczenia. Takie przygotowanie pozwoliło na obrazowanie oddzielnych NP jako pojedynczych cząstek na powierzchni płytki krzemowej. Obrazy zostały zebrane przy napięciu przyspieszającym 10 kV, przy odległości roboczej około 10 mm, przy użyciu górnego detektora elektronów rozproszonych (SE(U)). Dla każdej analizowanej próbki wykonano minimum 5 obrazów i wybrano reprezentatywne.

SPIONy jak i PCL-SP NP obserwowano przy użyciu tego samego mikroskopu SEM, niemniej wykorzystano inny tryb preparacji próbek. Zawiesiny NP poddawano rozbiciu w myjce ultradźwiękowej (SONOSWISS SW 1H) przez 30 s. Następnie наносzono 2 μ L

zawiesiny na siatkę TEM (Siatki z pokryciem: Lacey Carbon, miedziane, 200 mesh, - Agar Scientific) i po 30 s usuwano nadmiar kawałkiem bibuły filtracyjnej oraz suszono na wolnym powietrzu przez 10 minut. Następnie cząstki PCL obrazowano w mikroskopie przy napięciu przyspieszającym 10 kV, przy odległości roboczej około 8,6 mm oraz prądzie 10 μ A, a cząstki tlenku żelaza przy 30 kV oraz 20 μ A.

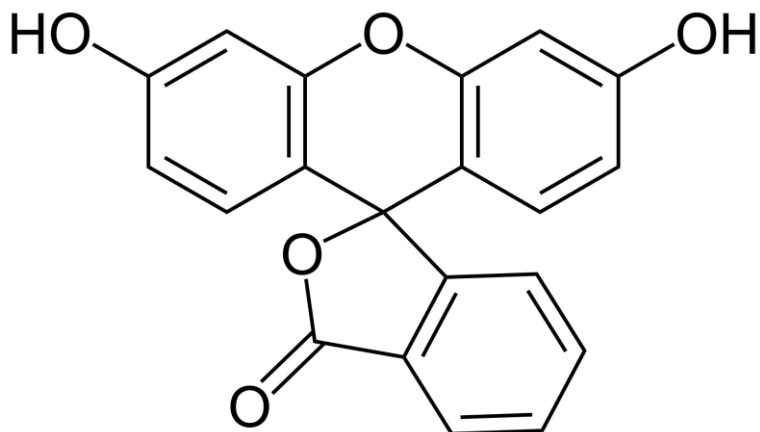
3.9.3. Spektroskopia Fourierowska w podczerwieni

Analizę oddziaływań chemicznych liofilizowanych pustych NP i zawierających barwnik NP przeprowadzono za pomocą spektroskopii Fourierowskiej w podczerwieni (FTIR) przy użyciu Nicolet 6700 FTIR (ThermoFisher Scientific). Próbki przygotowano przez zmieszanie drobnego proszku próbki uzyskanego po liofilizacji z bromkiem potasu (KBr), a następnie sprasowano z wykorzystaniem prasy (200 bar) oraz pastylkarki. Zakres skanowania wynosił 4000-500 cm^{-1} .

Przeprowadzone badania (3.1. - 3.9.) umożliwiły wybór metod oraz parametrów procesowych, które pozwoliły na powtarzalne otrzymywanie NP polimerowych o małych rozmiarach i niskich wartościach PDI. Wybrane warianty zostały następnie wykorzystane w badaniach enkapsulacji i uwalniania hydrofobowego barwnika fluorescencyjnego oraz w analizach interakcji NP z komórkami.

3.10. Enkapsulacja i uwalnianie barwnika *in vitro*

Do zbadania procesu enkapsulacji substancji i jej uwalniania z PCL NP wykorzystano fluoresceinę (rys. 12), hydrofobowy barwnik fluorescencyjny, służący jako substancja modelowa przenoszenia związków aktywnych przez NP. Analizowano efektywność enkapsulacji (EE%, zgodnie z równaniem (19), 1.3.2.), procent załadowania NP barwnikiem (DL%, zgodnie z równaniem (20), 1.3.2.) oraz uwalnianie barwnika z NP w czasie.



Rysunek 12. Wzór strukturalny fluoresceiny.

Uwalnianie fluoresceiny z NP badano *in vitro* dla trzech próbek wytworzonych metodą DNP i MNP. Wybrano frakcje NP z 1% PCL, ponieważ charakteryzowały się one najmniejszą średnią średnicą i wartością PDI. Uwalnianie fluoresceiny z PCL NP badano przy użyciu membrany dializacyjnej z regenerowanej celulozy (RC) o odcięciu molekularnym 12 000 – 14 000 Daltonów (Spectra/Por Membranes, Spectrum Laboratories, Inc.). Membrany dializacyjne napełniano 3 ml wybranych preparatów, zamykano klipsami dializacyjnymi, a następnie umieszczano w szklanym naczyniu zawierającym 200 ml roztworu PBS (10 mM, pH 7,4) i DMSO (4:1 obj./obj.). Eksperymenty przeprowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny, z zachowaniem całkowitego zanurzenia próbki. Po 0, 1, 2, 3, 4 i 24 godz. pobierano 1 ml medium, zastępowano je taką samą objętością świeżego roztworu PBS i DMSO, a następnie natychmiast analizowano za pomocą spektrofotometru UV-Vis przy 490 nm (BMG, Labtechnologies). Każdy pomiar wykonano w trzech powtórzeniach. Roztwory fluoresceiny w zakresie od 0,001 do 0,1 mg/ml przygotowano w celu skonstruowania krzywej kalibracyjnej, która została wykorzystana do ilościowego określenia ładunku uwalnianego z NP, zgodnie z następującym równaniem:

$$y = 102,17x + 0,1401 \quad (21)$$

gdzie x oznacza stężenie fluoresceiny (mg/ml), a y absorbancję UV/Vis (nm). Wartość R^2 wyniosła 0,9912. Nie zaobserwowano interferencji przy λ_{\max} fluoresceiny 490 nm z innymi składnikami badanego roztworu.

3.11. Badania komórkowe

Aby określić kontrolowane uwalnianie ładunku z fluorescencyjnych NP, przeprowadzono inkubacje NP z komórkami ssaków. Do hodowli linii komórkowej fibroblastów mysich L929 i ludzkich komórek kostniakomięsa o morfologii fibroblastów, MG63, dodano NP zawierające fluoresceinę. Kriotuba z komórkami L929 została dostarczona z hodowli prowadzonej w Centrum Zaawansowanych Technologii i Materiałów (CEZAMAT) przez dr inż. Paulinę Trzaskowską, a kriotuba z komórkami MG63 z hodowli prowadzonej przez mgr inż. Rafała Podgórskiego na Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej.

3.11.1. Hodowla komórek

Dzień 1. Suplementacja pożywki i rozmrożenie komórek

Medium DMEM zasuplementowano poprzez dodanie FBS (końcowe stężenie 10% obj./obj.), PenStrep (1% obj./obj.), L-glutaminy (1% obj./obj.), zawartość butelki dokładnie wymieszano. Ogrzano suplementowane medium hodowlane w łaźni wodnej do temperatury 37°C. Przygotowano butelkę hodowlaną T75 – napełniono medium w objętości 5 ml i umieszczono w inkubatorze. Następnie rozmrożono komórki (odpowiednio L929 lub MG63) poprzez ogrzewanie w łaźni wodnej, przeniesiono kriotubę z komórkami do komory laminarnej, wcześniej spryskując etanolem. Pod komorą komórki przeniesiono z kriotuby do Falconu, dodano kroplami medium hodowlane do objętości 5 ml i komórki zwirowano (5- 10 min, 192 RCF) w celu usunięcia krioprotektantu. Odpipetowano supernatant z nad zwirowanych komórek, pellet zawieszono w 2 ml świeżego medium hodowlanego. Zawiesinę komórkową przeniesiono do butelki hodowlanej, dopełniono medium do objętości 15 ml. Komórki obejrzano pod mikroskopem, podpisano naczynie i umieszczono w inkubatorze.

Dzień 5. Pasaż komórek i sterylizacja szkiełek

Po osiągnięciu konfluencji przeprowadzono pasaż komórek. Odciągnięto pożywkę z nad zadherowanych komórek, przepłukano dwukrotnie buforem PBS bez jonów wapnia

i magnezu (jony te zaburzają działanie enzymu trypsyny). Następnie w celu odklejenia komórek od podłoża, dodano 2 ml roztworu trypsyny, butelkę umieszczono na 2 min w inkubatorze. Po odklejeniu komórek od podłoża dodano 4 ml świeżego medium hodowlanego zawierającego jony wapnia i magnezu w celu dezaktywacji trypsyny i zawartość butelki przeniesiono do Falcona. Komórki zwirowano (5 min, 192 RCF), następnie usunięto supernatant, komórki zawieszono w 2 ml świeżego medium hodowlanego. Umieszczono zawiesinę komórek w 6 butelkach hodowlanych, uzupełniono medium do 15 ml i butelki umieszczono w inkubatorze.

Następnie przeprowadzono sterylizację szkiełek do hodowli komórek w płytce 24- dołkowej. Przygotowano sterylny (przefiltrowany na filtrze 0,22 μm) 70% roztwór EtOH pod komorą, i w płytce dołkowej zalano szkiełka po 1 ml EtOH na 30 min. Pod komorą laminarną przeniesiono szkiełka do nowych dołków przepłukując sterylnym DPBS, następnie zalano szkiełka w dołkach DPBS (po 1 ml) i inkubowano w inkubatorze 12-24 godz. Przed wysianiem na szkiełkach komórek przeniesiono szkiełka do nowych dołków.

Dzień 7. Test MTT i obserwacje z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego

W celu przygotowania zawiesiny komórkowej postępowano jak w procedurze pasażu. Po zwirowaniu komórek, policzono ilość komórek za pomocą hemocytometru, stosując barwienie błękitem trypanu, aby rozróżnić komórki żywe i martwe. Przygotowano zawiesinę komórkową o gęstości 1×10^5 kom/ml. Szkiełka sterylne umieszczono w dołkach płytki 24- dołkowej. Rozcieńczoną zawiesinę komórkową wysiano odpowiednio do płytek 96- dołkowych do testu MTT oraz 24- dołkowych ze szkiełkami do obserwacji na mikroskopie konfokalnym.

3.11.2. Test cytotoksyczności MTT

Test MTT jest obecnie najczęściej stosowany do oceny działania cytotoksycznego i zalecany jako referencyjny przez międzynarodowe organizacje normotwórcze oraz ISO [186]. Test MTT jest oparty na zdolności enzymu - dehydrogenazy mitochondrialnej do przekształcania pomarańczowej, rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5 dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenyloctetrazoliowy) do nierozpuszczalnego formazanu, będącego ciemnoniebieskim produktem powyższej reakcji [187]. Po rozpuszczeniu kryształów formazanu w DMSO lub izopropanolu, powstaje barwny roztwór, którego intensywność zabarwienia mierzona jest spektrofotometrycznie w zakresie długości fal 492–570 nm. Ilość barwnego zredukowanego MTT jest proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej

mitochondriów komórki, a w ściśle określonych warunkach doświadczalnych do liczby aktywnych metabolicznie (żywych) komórek w populacji [188].

Zawiesiny NP wybrane do badań komórkowych sterylizowano z wykorzystaniem światła UV- C (zakres długości fal od 200 do 280 nm) pod komorą laminarną. Czas sterylizacji wynosił 3 godziny. Następnie sterylne zawiesiny NP rozcieńczano medium hodowlanym bez czerwieni fenolowej do testowanych stężeń od 0,01 do 10 mg/ml. Przygotowane rozcieńczone zawiesiny NP były wykorzystane od razu po przygotowaniu.

Żywotność komórek MG63 i L929 określono przy użyciu standardowego testu MTT, 24 godziny po ekspozycji na NP. Jak wspomniano wyżej, komórki zawieszono w pożywce hodowlanej o gęstości 1×10^5 /ml wysiano do 96-dołkowych płytek i hodowano przez 24 godziny w 37°C i 5% CO₂. Następnego dnia wysterylizowano stężone zawiesiny NP pod komorą laminarną lampą UV. Sterylne NP rozcieńczono medium hodowlanym bez czerwieni fenolowej do wybranych wartości badanych stężeń. Po 24 godz. inkubacji odciągnięto medium z dołków testowych płytki 96-dołkowej, naniesiono kolejne rozcieńczenia NP na płytkę – 0,01; 0,1; 1,0 i 10 mg/ml – (12 dołków na wariant). Nietraktowane komórki służyły jako pozytywna kontrola żywotności. Komórki inkubowano w standardowych warunkach przez 24 godziny. Następnie usunięto medium zawierające NP, komórki przepłukano trzykrotnie PBS, dodano roztwór MTT w medium bez czerwieni fenolowej (końcowe stężenie MTT 1 mg/ml) i inkubowano (3 godz., 37°C). Roztwór MTT usunięto bez naruszenia komórek, dodano 100 µl/dołek DMSO, płytki delikatnie wytrząsano (5 min) w celu rozpuszczenia kryształów formazanu i odczytano absorbancję na czytniku mikropłytek przy 570 nm i 650 nm.

3.11.3. Mikroskopia konfokalna

Badane komórki zawieszono w pożywce hodowlanej o stężeniu 1×10^5 kom/ml wysiano na 24- dołkową płytkę ze szkiełkami w każdym dołku i hodowano przez 24 godziny w 37°C i 5% CO₂. W międzyczasie przygotowano sterylne zawiesiny NP z barwnikiem w medium hodowlanym w 2 stężeniach - 1,0 mg/ml i 0,1 mg/ml. Następnie komórki traktowano NP w stężeniach 1 mg/ml i 0,1 mg/ml (1 ml na dołek) przez 1 godz., 2 godz. i 24 godz. w standardowych warunkach. W danym punkcie czasowym usuwano zawiesinę NP i dodawano świeże medium, inkubowano przez 2 godz. Po stymulacji komórki utrwalono 4% PFA przez 15 minut, po tym czasie usunięto roztwór PFA i przepłukano komórki PBS (3-krotnie na wytrząsarce w temperaturze pokojowej (RT)). Następnie w celu permeabilizacji błony

komórkowej inkubowano komórki z 0,2% roztworem Tritonu X-100 w PBS w RT przez 8 minut na wytrząsarce, po czym usunięto roztwór Tritonu i przepłukano komórki PBS (3-krotnie na wytrząsarce, RT). Kolejnym etapem było blokowanie komórek z 0,1% roztworem BSA w PBS w RT przez 60 minut na wytrząsarce. Po tym czasie usunięto roztwór BSA i przepłukano dokładnie 3-krotnie PBS. W celu wybarwienia jąder komórkowych utrwalone komórki inkubowano z roztworem DAPI (300 nM w PBS) w RT przez 6 minut w ciemności, po czym usunięto DAPI, przepłukano komórki PBS (3-krotnie). Następnie szkiełka z komórkami przeniesiono do nowej płytki 24-dołkowej, materiały zalano buforem PBS, owinięto parafilmem oraz folią aluminiową i tak przygotowaną płytkę przechowywano w lodówce. Komórki wizualizowano za pomocą mikroskopu konfokalnego (Zeiss) przy odpowiednich długościach fal dla fluoresceiny (wzbudzenie 470 nm, emisja 519 nm) i DAPI (wzbudzenie 358 nm, emisja 461 nm) przy powiększeniu 20×. Dla każdego wariantu eksperymentu wykonano cztery niezależne powtórzenia.

3.12. Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (SPIONy)

Ten etap pracy obejmował zamknięcie NP tlenku żelaza w PCL NP. Na wstępie zsyntetyzowano SPIONy w 2 wariantach, pokryte kwasem oleinowym (OA-SP) oraz bez pokrycia (SP), przeprowadzono ich analizę fizykochemiczną, a następnie przy wykorzystaniu metody nanoprecypitacji otrzymywano PCL NP zawierające SPIONy (PCL- SP NP). Kolejnym etapem było usprawnienie etapu oczyszczania PCL-SP NP. W tym celu zaprojektowano specjalny układ przepływowy, w którym przy pomocy magnesu neodymowego oczyszczano NP.

3.12.1. Synteza NP tlenku żelaza

Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (SPIONów) otrzymano metodą współstrącania. Proces ten polegał na jednoczesnym strąceniu jonów Fe^{2+} i Fe^{3+} w zasadowym środowisku, co prowadziło do powstania tlenku żelaza o strukturze magnetytu (Fe_3O_4). W tym celu odważono 5,56 g (0,020 mol) $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ oraz 11,60 g (0,043 mol) $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. W kolbie okrągłodennej na mieszadle magnetycznym umieszczono 350 ml ultraczystej wody, przez 5 min przepuszczano argon żeby stworzyć warunki beztlenowe, następnie mieszadło magnetyczne ustawiono na 1200 obr./min., do kolby dodano odważony siarczan żelaza oraz chlorek żelaza, mieszano aż do całkowitego rozpuszczenia. Następnie kolbę przeniesiono

pod wyciąg, założono chłodnicę, aby uniknąć dostępu tlenu, u góry chłodnicy umieszczono balonik wypełniony argonem. W strzykawce na pompie strzykawkowej umieszczono 30 ml 25% wody amoniakalnej, dodawano całość z szybkością 5 ml/min przez 30 min w temperaturze 100°C. Roztwór zmienił barwę z ceglanej na czarną. Dla wariantu z kwasem oleinowym, kolejnym krokiem było dodanie 5 ml kwasu oleinowego, całość mieszano w temperaturze 100°C przez 30 min. Dzięki temu pokryciu z kwasu oleinowego nanocząstki zyskały charakter hydrofobowy. Następnym etapem było oczyszczanie. Należało otrzymane cząstki Fe₃O₄ przepłukać EtOH w celu usunięcia nadmiaru kwasu oleinowego, a następnie kilkakrotnie wodą. Zawiesiny NP wirowano w celu oczyszczenia i zatężenia (12000 obr./min., 10 min). Odwirowane NP tlenku żelaza zawieszono w acetonie w stężeniu 25 mg/ml i przechowywano w lodówce. Otrzymane NP zmierzono za pomocą DLS w celu określenia ich rozkładu rozmiarów i potencjału ζ analogicznie do PCL NP jak opisano w 3.9.1. Rozmiar i morfologię badano również za pomocą SEM jak opisano w 3.9.2. SPIONów wysuszono i przeprowadzono analizę FTIR zgodnie z procedurą opisaną w 3.9.3.

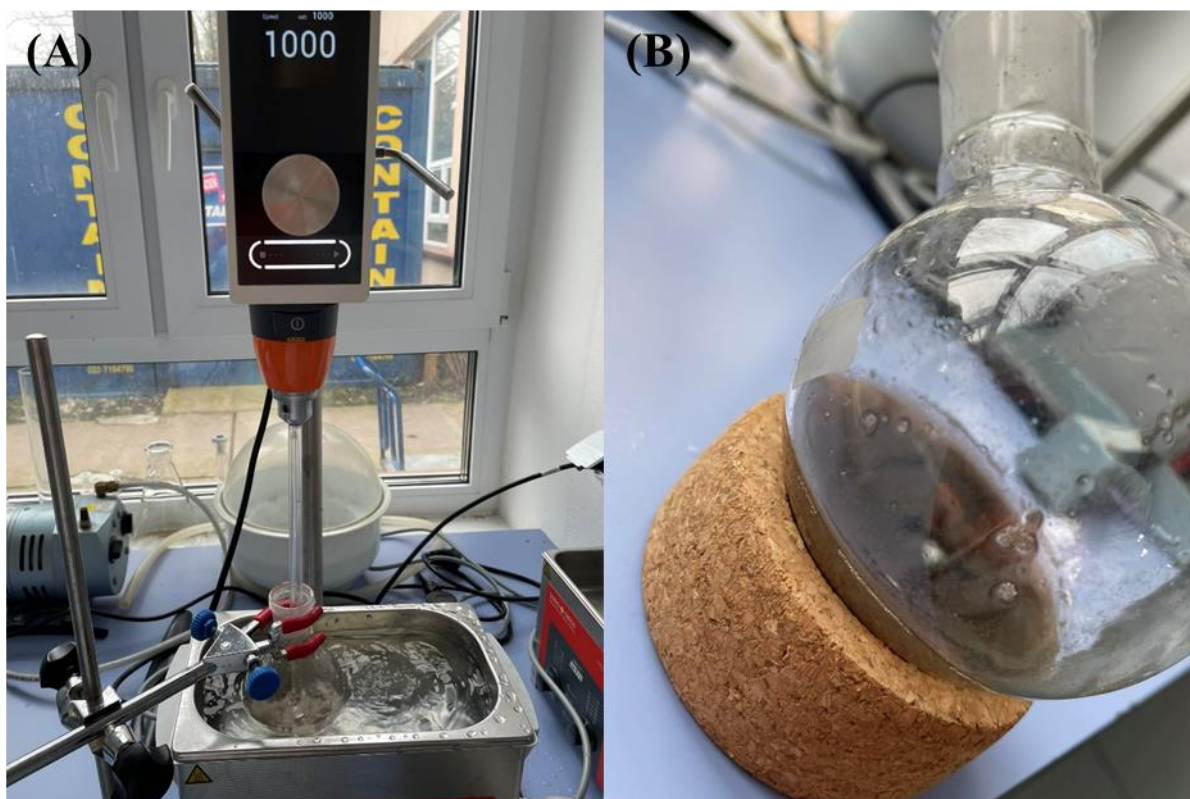
3.12.2. Synteza PCL NP zawierających SPIONy

Tabela 1. Badane stężenia SPIONów w PCL NP.

Nazwa	SP0	SP01	SP10	SP20
Stężenie SPIONów [%]	0	1	10	20

Do probówki eppendorfa odważono PCL, dodano THF oraz odpowiednie stężenie SPIONów (wagowo na masę użytego PCL). Do eppendorfa wrzucono również kulkę szklaną, żeby zintensyfikować mieszanie fazy organicznej. Eppendorfy z fazą organiczną wytrząsano na wytrząsarce do płytek przez około 24 godz. Następnie dodano EtOH (1:2 EtOH/THF obj./obj.), 0,1M NaOH, dokładnie wymieszano.

Do kolby okrągłodennej dodano ultraczystą H₂O, kolbę umieszczono na statywie w myjce ultradźwiękowej oraz umieszczono w środku mieszadło mechaniczne. Mieszanie ustawiono na 1000 obr./min. Do kolby dodano fazę organiczną za pomocą jednorazowego wstrzyknięcia i zawiesinę dokładnie mieszano przez około 1 godz. aż do odparowania THF. W międzyczasie mieszaninę ochładzano poprzez dodawanie lodu do myjki ultradźwiękowej by temperatura w myjce nie przekraczała 30°C.

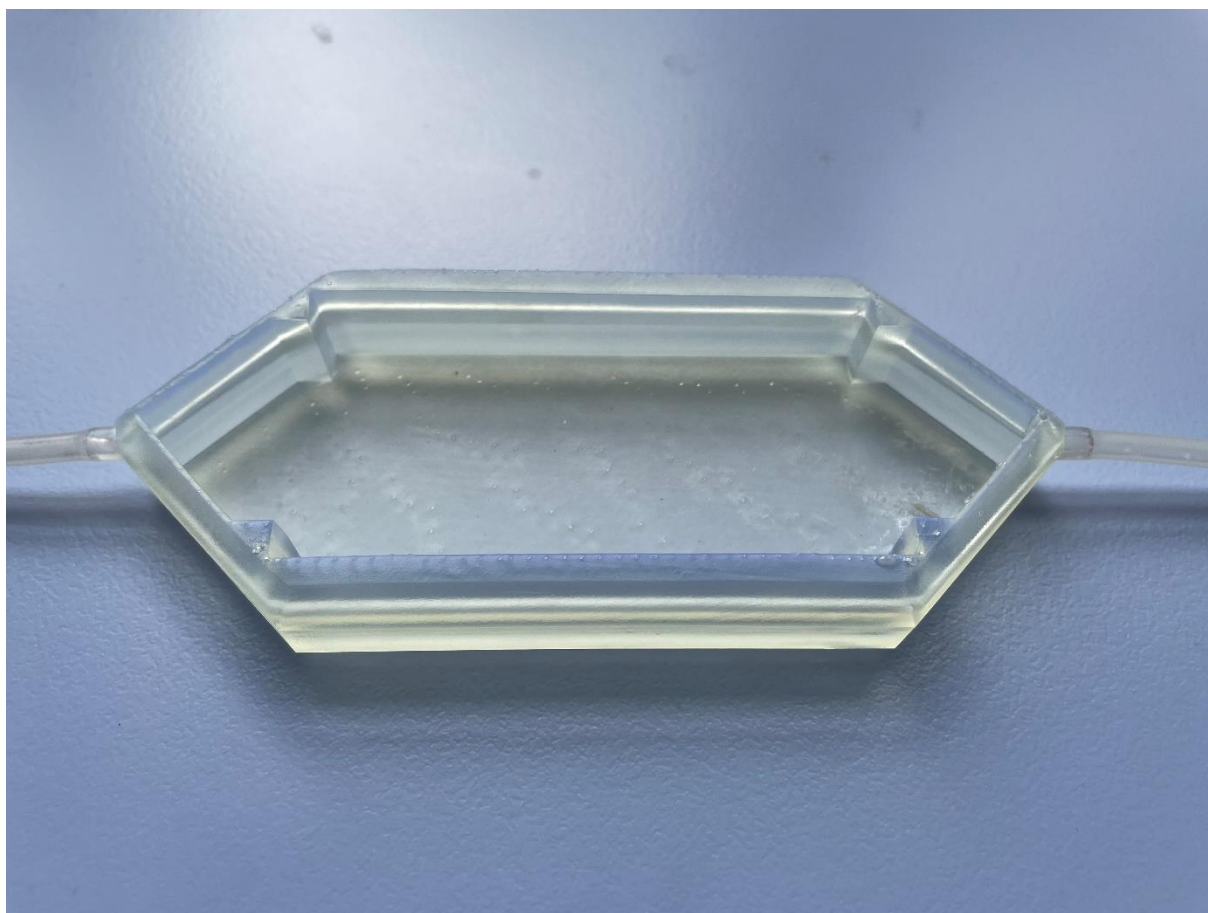


Rysunek 13. (A) Układ do nanoprecypitacji PCL NP ze SPIONami, z mieszaniem mechanicznym na myjce ultradźwiękowej. (B) Zawiesina PCL NP (SP20) po nanoprecypitacji i odparowaniu rozpuszczalnika organicznego.

Otrzymane zawiesiny PCL-SP NP (rys. 13B) mierzono za pomocą DLS oraz wizualizowano za pomocą SEM. Następnie w celu oczyszczenia NP próbki wirowano i przepłukiwano wodą MiliQ. Proces wirowania w celu oczyszczenia NP jest długotrwały, dlatego poszukiwano innej metody separacji PCL-SP NP.

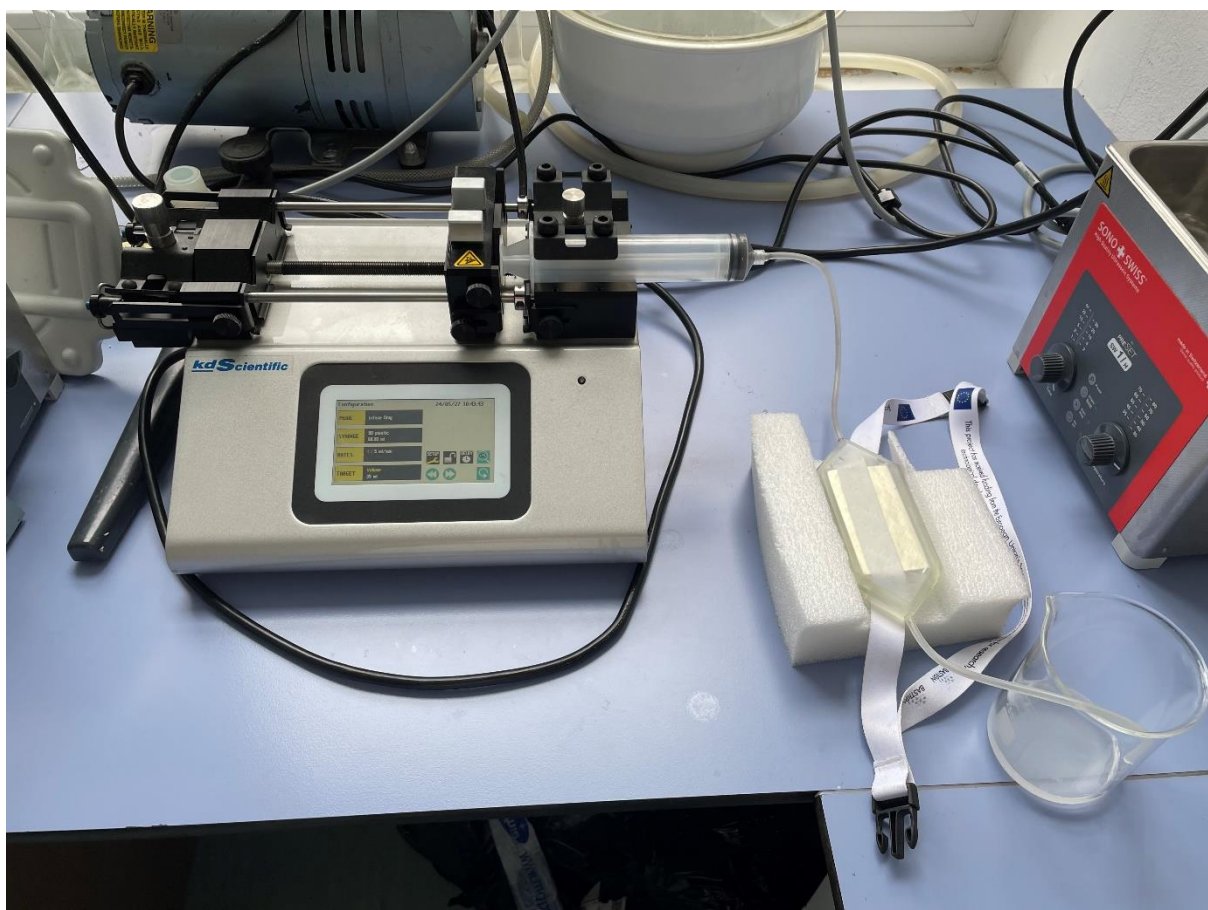
3.12.3. Metoda separacji

Z pomocą mgr inż. Daniela Wylezińskiego zaprojektowano i wytworzono układ mikroprzepływowy, w którym umieszczano magnes neodymowy do szybkiego oczyszczenia i separacji NP (rys. 14). Założenie było takie, że po zmieszaniu fazy organicznej z wodną, po odparowaniu rozpuszczalnika organicznego lub gdy w mieszaninie był on jeszcze obecny, otrzymaną zawiesinę przepuszczano przez układ z magnesem. Poprzez siły magnetyczne PCL-SP NP zatrzymywały się w układzie a reszta, tj. THF oraz nadmiar wody wypływał z układu. Następnie magnes wyjmowano z układu i odseparowane PCL-SP NP wypłukiwano czystą wodą MiliQ. Następnie poddawano je analizie fizykochemicznej.



Rysunek 14. Układ przepływowy z miejscem na magnes neodymowy do szybkiej separacji PCL-SP NP.

Przygotowano zawiesinę NP jak opisano wcześniej. Po zmieszaniu fazy organicznej i wodnej pominięto odparowanie rozpuszczalnika na wyparce rotacyjnej, całość zawiesiny umieszczono w strzykawce 60 ml na pompie strzykawkowej. Strzykawkę połączono wężykiem silikonowym (d zew = 4 mm, d wew = 2 mm) z układem, magnes umieszczono w układzie, do wylotu z układu podłączono wężyk i jego drugi koniec umieszczono w zlewce. Dozowanie ustawiono na 5 ml/min, po przejściu całości zawiesiny przez układ magnes wyjęto i wypłukano wodą PCL-SP NP z kanałów układu (rys. 15). Następnie NP badano z wykorzystaniem DLS i SEM jak opisano wcześniej.

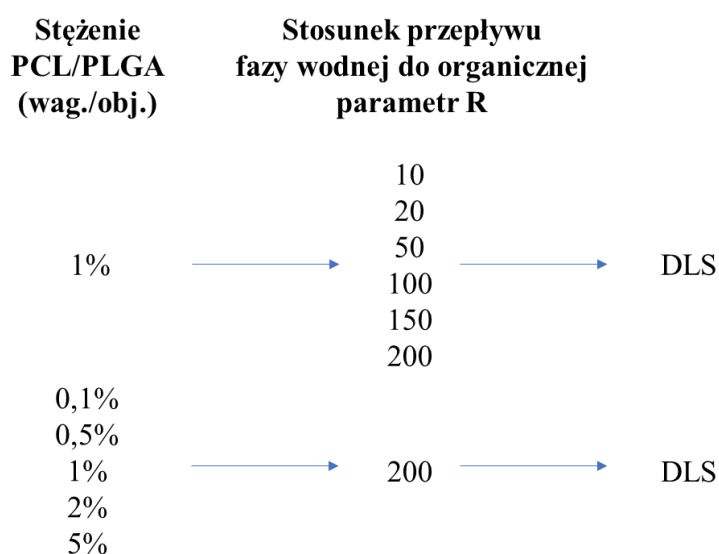


Rysunek 15. Układ do separacji PCL-SP NP na układzie przepływowym z magnesem neodymowym.

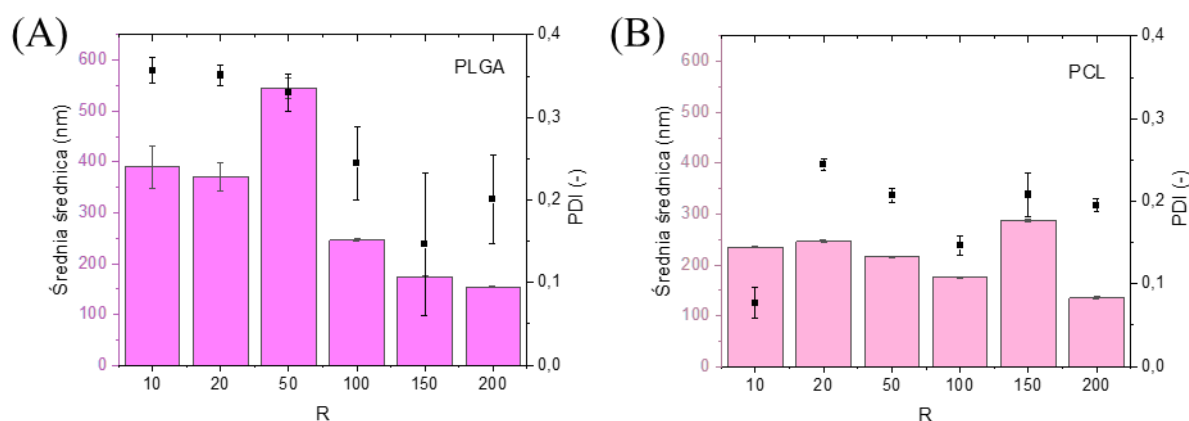
4. Wyniki

4.1. Wybór polimeru i dobór parametru R

Przeprowadzono eksperyment wstępny na podstawie pracy Xu i in. [189]. W tym celu wykorzystano PLGA oraz parę rozpuszczalników, DCM/DMSO w stosunku objętościowym 1/10. Jako że DCM jest dobrym rozpuszczalnikiem dla PCL przeprowadzono równolegle eksperyment z użyciem PCL. Analizowane parametry zebrano na rys. 16.

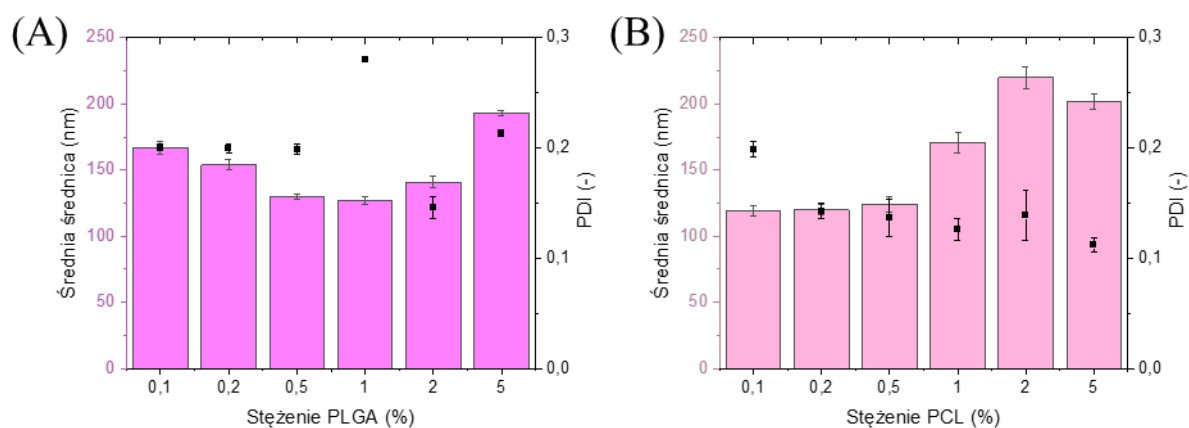


Rysunek 16. Schemat testowanych parametrów procesowych.



Rysunek 17. Średnia średnica i PDI cząstek otrzymanych metodą mikroprzepływową przy różnych wartościach R dla PLGA (A) i PCL (B) (stężenie polimeru 1% = 10 mg/ml). Brak różnic istotnych statystycznie.

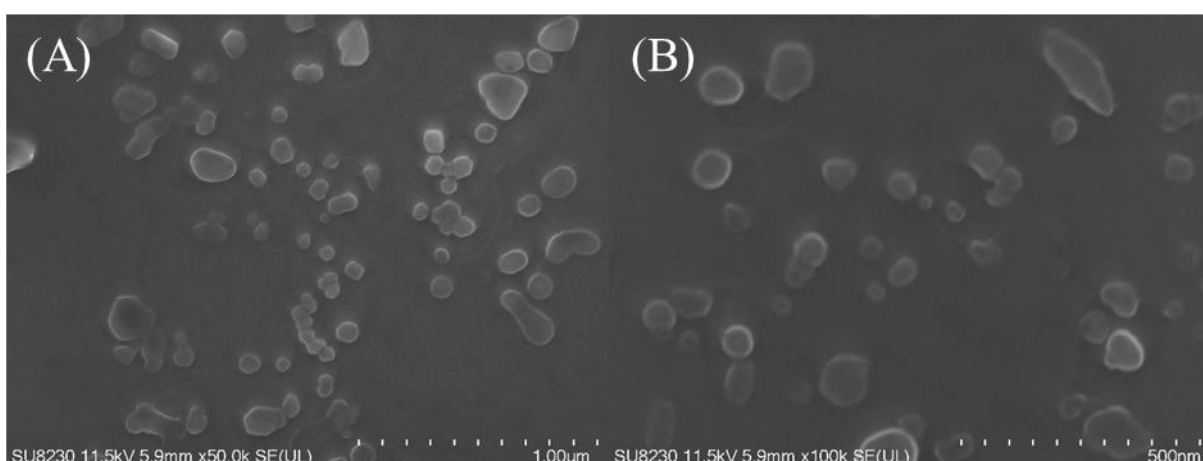
Wyniki pokazują, że dla PLGA jak i PCL najmniejsze cząstki o stosunkowo niskim PDI uzyskano dla R=200.



Rysunek 18. Zależność średniej średnicy i PDI od stężenia użytego polimeru dla PLGA (A) i PCL (B). Brak różnic istotnych statystycznie.

Dla PLGA najmniejszy rozmiar cząstek (ok. 120 nm) i dobrą wartość PDI otrzymano dla stężenia polimeru 0,5%, a dla PCL w przypadku stężenia 0,2% (ok. 110 nm) przy PDI ok. 0,15. PCL pozwoliło na otrzymanie mniejszych NP w szerszym zakresie badanych stężeń niż PLGA. Jednoczynnikowa analiza wariancji nie wykazała statystycznie istotnych różnic między średnimi grupowymi pomiędzy PCL a PLGA na rys. 17 i 18.

W dalszych badaniach przyjęto R=200, ponieważ ten stosunek przepływu faz pozwolił na wytworzenie NP o najmniejszych rozmiarach i PDI (rys. 19).



Rysunek 19. NP wytworzone przy wykorzystaniu prostego układu mikroprzepływowego, R=200, 0,1% PCL, DCM/DMSO. (A) skala 1 μm, (B) skala 500 nm.

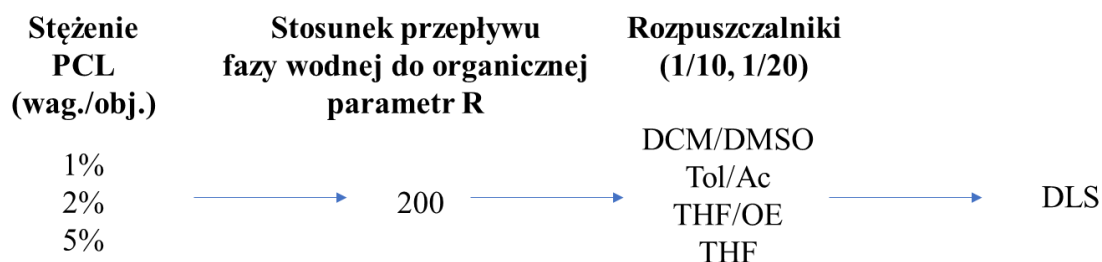
4.2. Wybór rozpuszczalników organicznych

W kolejnym etapie badań skupiono się na wyborze pary rozpuszczalników oraz doborze ich stosunku. Badania prowadzono dla 3 stężeń polimeru: 1%, 2% oraz 5% (wag./obj.) (rys. 20). Pożądane było otrzymanie NP o jednorodnym rozkładzie ($PDI < 0,3$) i o jak najmniejszym rozmiarze. W tabeli 2 przedstawiono zestawienie rozpuszczalników organicznych wykorzystywanych w pracy.

Tabela 2. Pary rozpuszczalników wykorzystywane w pracy.

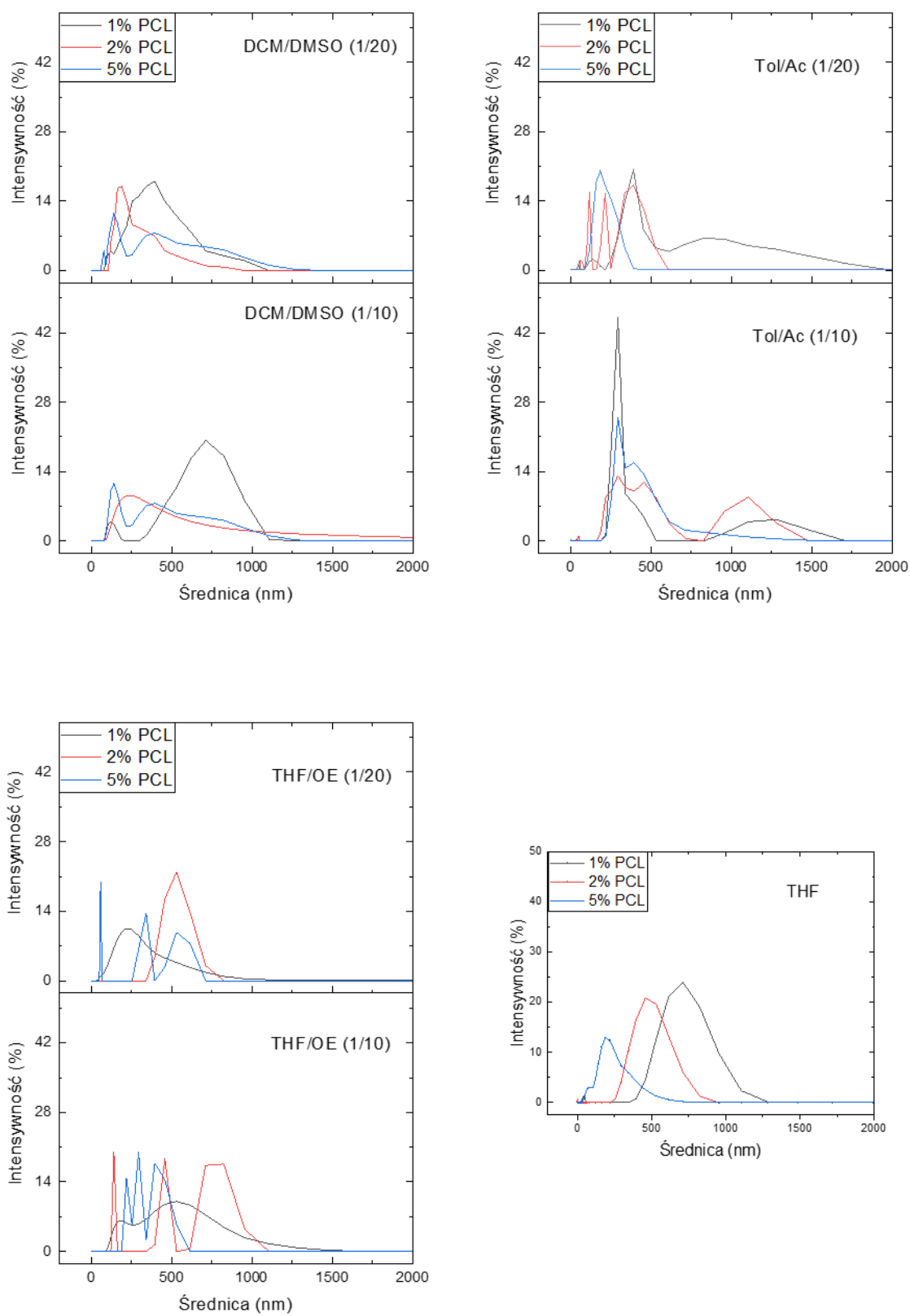
Rozpuszczalniki	
Mieszalne z wodą	Niemieszalne z wodą
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	Dichlorometan (DCM)*
Aceton (Ac)	Toluen (Tol)*
Tetrahydrofuran (THF)*	Octan etylu (OE)

*rozpuszczalniki, które dobrze rozpuszczają PCL.



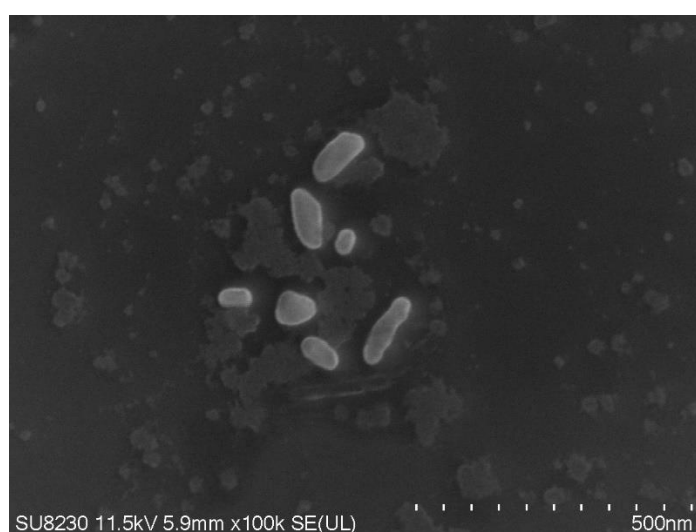
Rysunek 20. Schemat testowanych parametrów i analizowanych rozpuszczalników.

Ponieważ jak wynika z Tabeli 1. THF jest dobrym rozpuszczalnikiem PCL oraz jest mieszalny z wodą, uwzględniono również wykorzystanie THF jako jedynego rozpuszczalnika w fazie organicznej. Poniżej (rys. 21) zebrano wyniki analizy DLS dla testowanych rozpuszczalników.



Rysunek 21. Procent intensywności sygnału w zależności od rozmiaru NP dla użytych rozpuszczalników.

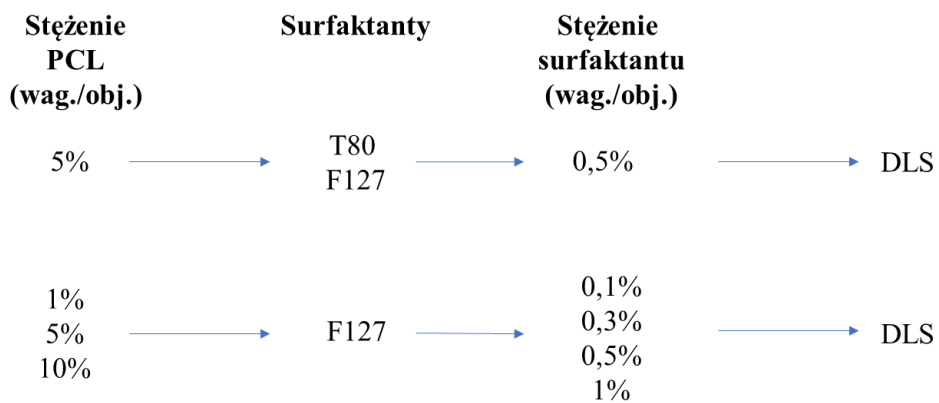
Z testowanych par rozpuszczalników najbardziej jednorodne NP i o najmniejszym rozmiarze uzyskano przy użyciu DCM/DMSO w stosunku 1:20 z 1% PCL. Jednak przy wykorzystaniu THF jako jedyne rozpuszczalnika otrzymano pojedyncze piki dla każdego z badanych stężeń. Świadczy to o uzyskaniu bardziej jednorodnych zawiesin NP niż w przypadku wykorzystania par rozpuszczalników. Wnioski z wykresów (rys. 21) pokazują, że zarówno stężenie PCL, jak i wybór oraz stosunek rozpuszczalników mają kluczowy wpływ na rozkład wielkości NP. We wszystkich układach rozpuszczalników zwiększenie stężenia PCL z 1% do 5% skutkowało zwiększeniem rozmiarów cząstek i szerszymi rozkładami rozmiarów. Przedstawione wyniki pokazują, że najlepszymi składowymi fazy organicznej są PCL i THF.



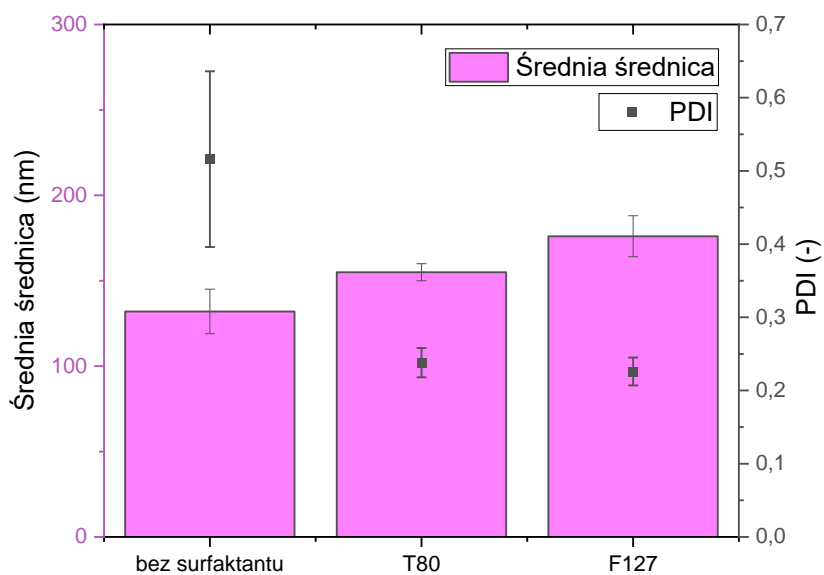
Rysunek 22. NP wytworzone przy wykorzystaniu układu mikroprzepływowego, R=200, 5% PCL, THF, skala 500 nm.

4.3. Wybór surfaktantu

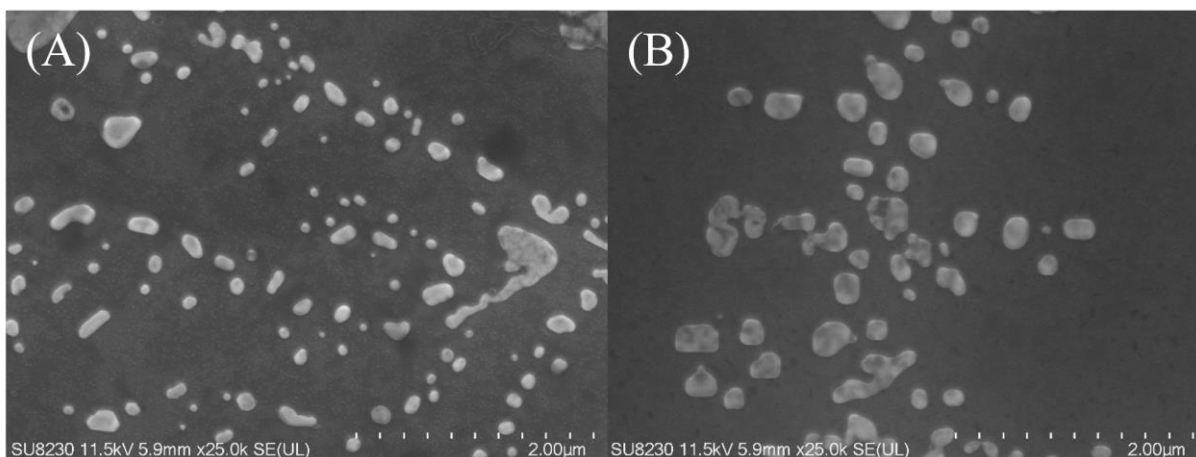
Kolejnym parametrem zbadanym w pracy był dodatek surfaktantów do fazy wodnej, w celu poprawy stabilizacji NP i zniwelowania agregacji. Analizowano Tween® 80 (T80) i Pluronic®F-127 (F127), środki powierzchniowo czynne, które są zatwierdzone przez FDA do zastosowań u ludzi w systemach dostarczania leków.



Rysunek 23. Schemat badanych stężeń PCL i surfaktantu.



Rysunek 24. Zależność średniej średnicy i PDI dla preparatów bez i z użyciem 2 surfaktantów, T80 i F127.



Rysunek 25. NP otrzymane z wykorzystaniem układu mikroprzepływowego, R=200. 5% PCL i T80 (A) i F127 (B). Skala 2 μm .

W porównaniu do T80, F127 ma wyższą masę cząsteczkową, co może wpływać na średni rozmiar NP. Rys. 24 pokazuje, że dodatek surfaktantów wpływa na zmniejszenie PDI. Dodatkowo zarówno wykres z rys. 24 jak i obrazy SEM (rys. 25) pokazują, że NP otrzymane z wykorzystaniem F127 miały mniejszy rozkład rozmiarów. Dalej prowadzono badania z wykorzystaniem F127, analizowano różne stężenia F127 żeby dobrać takie, które pozwolą na stabilizację otrzymanych NP, przy zachowaniu niskiego PDI.

Tabela 3. Średnia średnica i PDI dla NP otrzymanych dla różnych stężeń PCL z wykorzystaniem różnych stężeń F127.

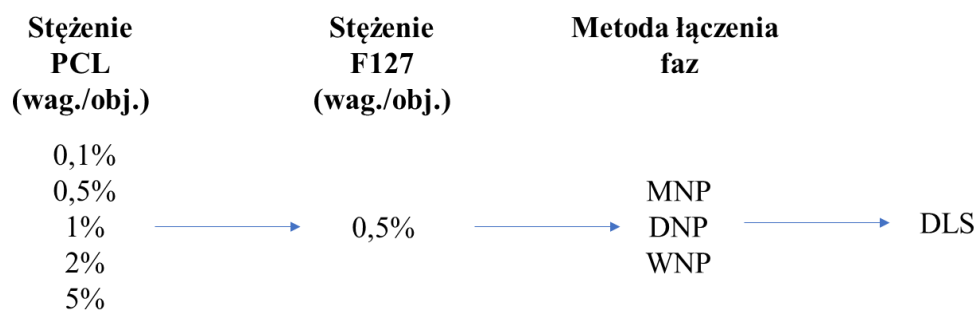
Lp.	Stężenie PCL [%]	Stężenie F127 [%] wag./obj.	Średnia średnica ± SD [nm]	PDI ± SD [-]
1	1	0,1	189 ± 2	0,12 ± 0,02
2		0,3	182 ± 0	0,20 ± 0,02
3		0,5	140 ± 1	0,14 ± 0,01
4		1,0	139 ± 1	0,16 ± 0,02
5	5	0,1	136 ± 3	0,14 ± 0,03
6		0,3	203 ± 2	0,16 ± 0,02
7		0,5	139 ± 1	0,17 ± 0,01
8		1,0	149 ± 6	0,32 ± 0,02
9	10	0,1	183 ± 1	0,22 ± 0,01
10		0,3	160 ± 2	0,22 ± 0,01
11		0,5	160 ± 1	0,22 ± 0,02
12		1,0	164 ± 3	0,32 ± 0,02

Po analizie przedstawionych wyników można stwierdzić, że wartości średnich średnic NP dla poszczególnych wariantów nie różnią się statystycznie istotnie od siebie, pozostają w zakresie nano-rozmiarów. Wartości indeksów PDI osiągają wartości z zakresu 0,12 przy najniższym stężeniu PCL, do 0,32 przy najwyższym stężeniu PCL. Wpływ ilości stężenia środka powierzchniowo czynnego jest wyraźnie widoczny dla wszystkich wariantów. W przypadku NP zawierających 0,1% F127 oraz 1% polimeru wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu maleje średnia średnica NP, jednak rośnie PDI NP, co świadczy o otrzymaniu NP o większym rozkładzie rozmiarów. Podobna zależność dotycząca PDI pojawia się w przypadku próbek zawierających 5% i 10% PCL. Dodatek surfaktantu pozwala na stabilizację otrzymanych zawiesin NP i ograniczenie agregacji cząstek, jednak jego stężenie w procesie otrzymywania NP ma duży wpływ na ich właściwości. Widzimy, że najmniejszy rozmiar jak i PDI w przypadku wszystkich testowanych stężeń PCL otrzymano dla 0,5% wag./obj. F127. Przeprowadzone badania pozwoliły na wybór polimeru, rozpuszczalnika oraz surfaktantu, (Tabela 4).

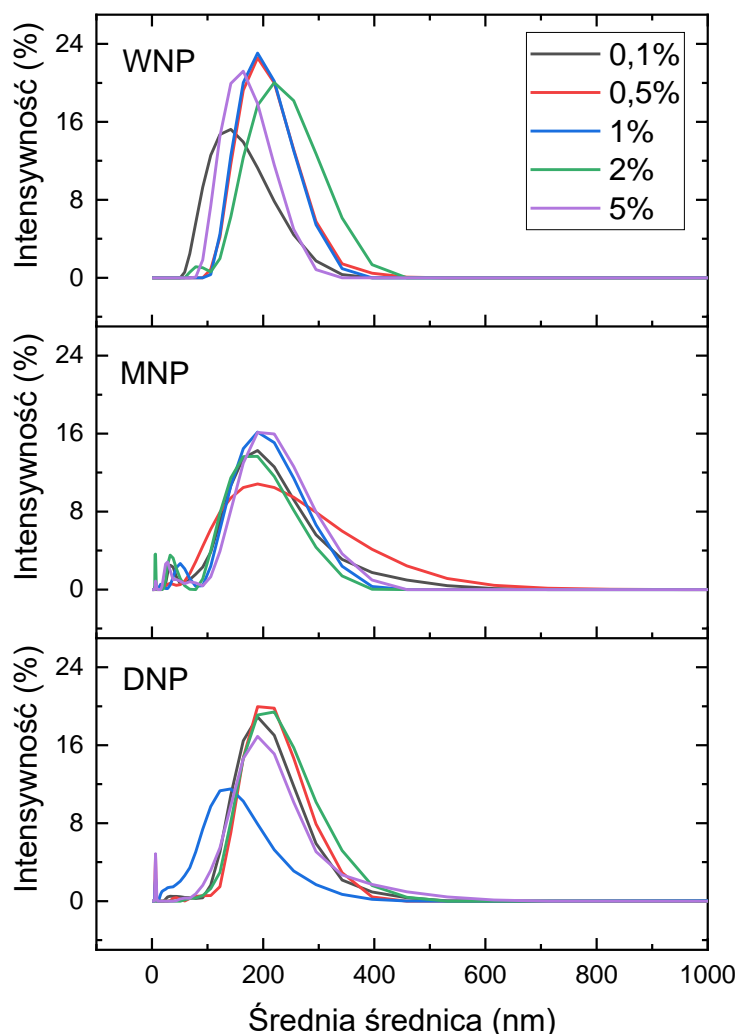
Tabela 4. Zestawienie wybranych odczynników do otrzymywania PCL NP.

Polimer	Rozpuszczalnik	R	Surfaktant	Stężenie surfaktantu
PCL	THF	200	F127	0,5 % wag./obj.

4.4. Metody łączenia faz



Rysunek 26. Schemat testowanych parametrów (stężenie PCL, metoda łączenia faz).

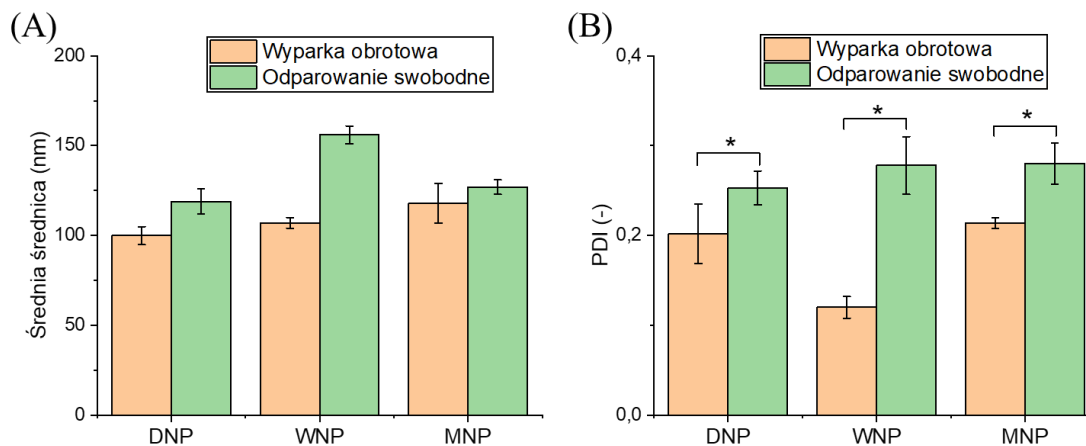


Rysunek 27. Rozkład rozmiarów NP dla próbek otrzymanych metodą jednorazowego wstrzyknięcia (WNP), mikroprzepływową (MNP) i dozowania kroplami fazy organicznej do wodnej (DNP). Procent intensywności sygnału w zależności od rozmiaru cząstek. 0,1, 0,5, 1, 2, 5% - stężenie użytego PCL.

Metoda pojedynczego wstrzyknięcia zapewnia szeroki rozkład wielkości, co wskazuje na znaczne różnice w wielkości NP. Ta metoda jest szybka, jednak pozwala uzyskać większe średnie rozmiary cząstek w porównaniu z innymi metodami, szczególnie przy wyższych stężeniach PCL (2% i 5%). Metoda dozowania kroplowego wykazuje lepszą kontrolę wielkości cząstek w porównaniu z metodą pojedynczego wstrzyknięcia. Rozkład wielkości jest węższy, chociaż wielkość cząstek nadal wzrasta wraz ze wzrostem stężenia. Układ mikroprzepływowy pozwala na otrzymanie najmniejszych i najbardziej jednolitych NP we wszystkich badanych stężeniach polimeru. Metoda ta konsekwentnie zapewnia wąski rozkład wielkości cząstek.

4.5. Odparowanie rozpuszczalników organicznych

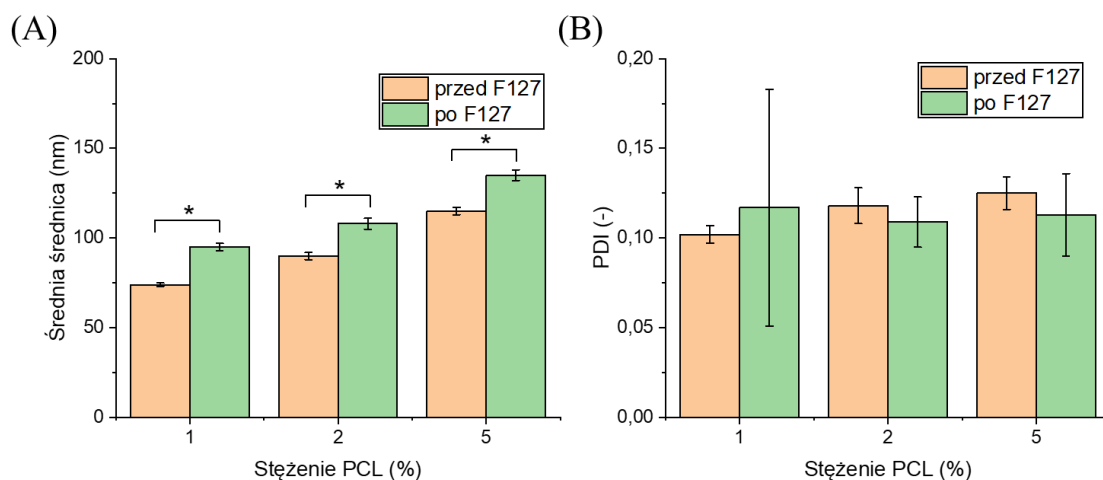
Zależność rozmiaru i PDI wybranych NP (1% PCL) od metody usuwania rozpuszczalnika został przedstawiony na rys. 28.



Rysunek 28. Porównanie wpływu metody odparowania rozpuszczalnika na rozmiar (A) i PDI (B) NP dla 3 analizowanych metod łączenia faz. * $p < 0,05$.

Możemy stwierdzić, że obie badane wartości, średnia średnica i PDI, były mniejsze dla wyparki obrotowej, przy czym w przypadku PDI różnice te były statystycznie istotne. Metoda odparowania na wyparce pozwala na szybsze usunięcie rozpuszczalnika, co wpływa na rozmiar NP. Szybkie usuwanie rozpuszczalnika organicznego z zawiesin NP pozwala uniknąć wzrostu w wyniku dojrzewania Ostwalda. Ponadto, jest to pomocne w przypadku wytwarzania NP leków hydrofobowych, które mają zwiększoną rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych [62].

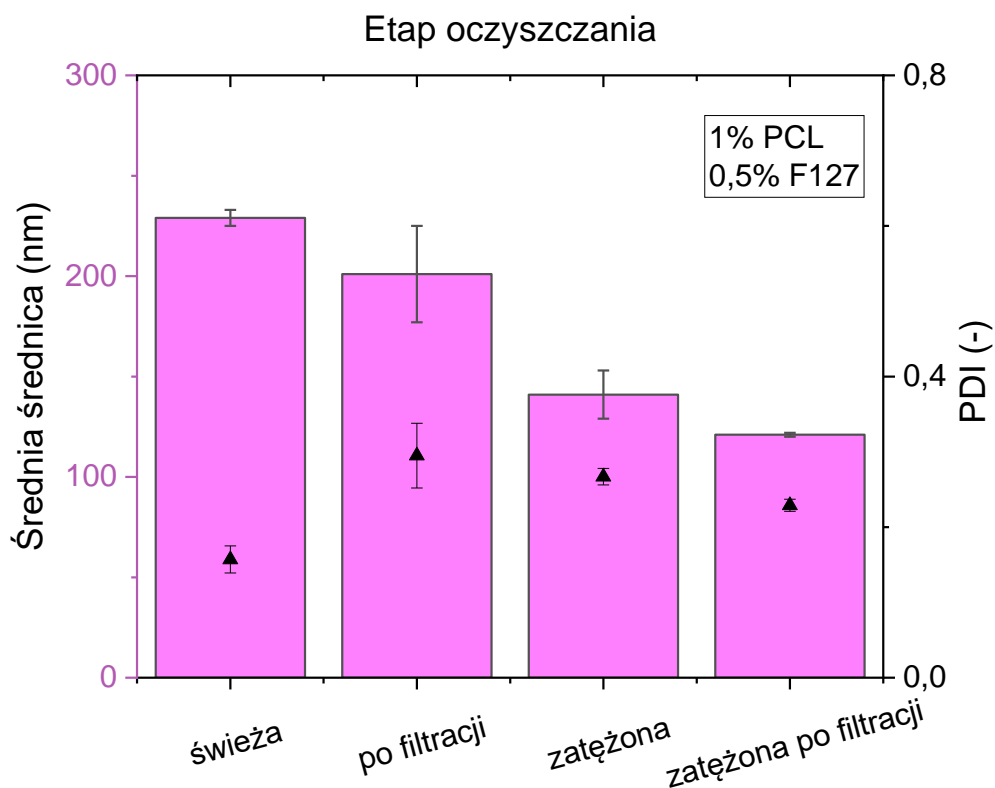
W otrzymywanych zawiesinach NP wykorzystywany jest F127, który przy odparowaniu rozpuszczalnika z wykorzystaniem wyparki rotacyjnej powoduje mocne pienienie się zawiesiny, co wpływa na czas procesu. W celu usunięcia tego problemu postanowiono sprawdzić, czy dodatek surfaktantu po odparowaniu rozpuszczalnika zamiast przed procesem wytwarzania NP, pozwoli na osiągnięcie takich samych efektów i pomoże w skróceniu procesu odparowania rozpuszczalnika. Po odparowaniu NP niezawierających surfaktantu, zmierzono rozmiar NP na DLS, następnie do zawiesiny NP dodawano 0,5% wag./obj., dokładnie mieszano na mieszadle magnetycznym około 30 minut i ponownie analizowano z wykorzystaniem DLS. Wyniki zestawiono na rys. 29.



Rysunek 29. Średnia średnica (A) i PDI (B) NP przed i po dodaniu surfaktantu. * $p < 0,05$.

Wyniki przedstawione na rys. 29 pokazują, że dodanie surfaktantu w późniejszym etapie otrzymywania NP, tj. po odparowaniu rozpuszczalnika, daje podobne rezultaty co przy dodawaniu F127 do fazy wodnej. Rozmiar NP (rys. 29A) wzrasta po dodaniu F127 dla wszystkich badanych stężeń PCL, a PDI maleje dla stężenia 2% i 5%. W wyniku jednoczynnikowej analizy wariancji uzyskano istotny statystycznie efekt zmiennej średnicy przed i po dodaniem F127 ($p < 0,05$), natomiast w przypadku PDI (rys. 29B) analiza nie wykazała statystycznie istotnych różnic. W zawiesinie NP bez F127 przy odparowaniu nie następuje pienienie, co znacznie skraca czas procesu (do 20 minut). Nasuwa się wniosek, że możliwe jest stosowanie F127 po odparowaniu rozpuszczalnika w celu skrócenia czasu odparowywania, co pozwoli na osiągnięcie podobnej stabilizacji zawiesiny NP.

4.6. Oczyszczanie i zatężanie zawiesin nanocząstek



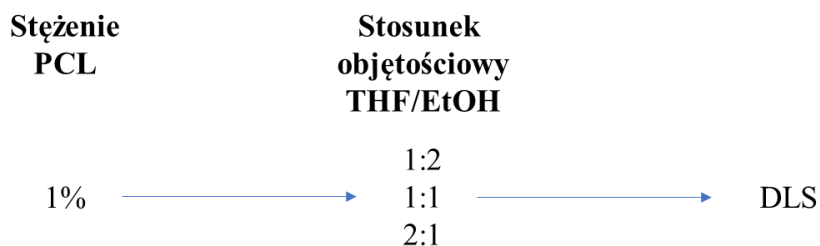
Rysunek 30. Zmiany w średniej średnicy oraz PDI po każdym z etapów oczyszczania. Zateżenie prowadzono na wyparce obrotowej. 1% PCL, 0,5% F127.

Przedstawione wyniki pokazały, że filtracja próbek z 1% PCL pozwala na oczyszczenie zawiesin NP z agregatów i NP o większych rozmiarach. Problemem jest wydajność filtracji, gdyż cząstki agregują i zostają na filtrze. Dlatego szukano rozwiązań na usprawnienie oczyszczania zawiesin NP lub uzyskanie węższych rozmiarów bardziej stabilnych cząstek w zawieszynie i całkowite pominięcie etapu oczyszczania.

Dodanie współrozpuszczalnika i NaOH

Dodanie EtOH do fazy organicznej spowalnia proces precypitacji, dając zarodkom więcej czasu na wzrost, jednak korzystnie wpływając na rozkład rozmiarów cząstek, o czym świadczą wartości PDI (Tabela 5 i 6). Dodatkowo dodanie NaOH do procesu nanoprecypitacji zwiększyło stabilność i jednorodność PCL NP poprzez utworzenie środowiska zasadowego, które wpływa na rozpuszczalność [190], indukuje ładunek powierzchniowy w celu

wzmocnienia oddziaływań repulsywnych pomiędzy NP oraz kontroluje wielkość i rozkład cząstek [61], [190]. Najlepsze rezultaty uzyskano przy stosunku 2:1 (THF/EtOH). EtOH miesza się z wodą lepiej niż THF i wspomaga dyfuzję rozpuszczalnika do fazy wodnej. Dodatek EtOH jako współrozpuszczalnika pozwolił na otrzymanie metodą jednorazowego wstrzyknięcia bardziej stabilnych i jednorodnych zawiesin, które nie wymagały dalszego oczyszczania.



Rysunek 31. Schemat badanych parametrów (stosunek objętościowy THF/EtOH).

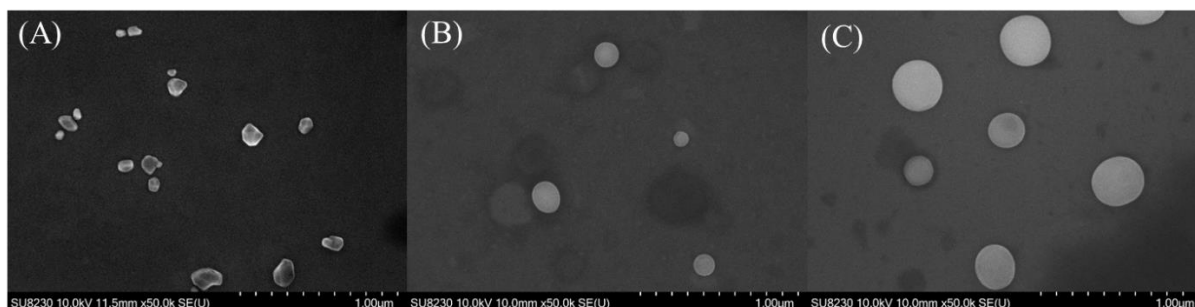
Tabela 5. Rozmiar i PDI wybranych WNP otrzymanych z dodatkiem EtOH w stosunku w stosunku 1:1 i 1:2 (THF/EtOH). Zawiesiny NP otrzymane bez dodatku surfaktantu.

Stosunek objętościowy		Objętość [ml]			Średnia średnica ± SD [nm]	PDI ± SD [-]	Potencjał ζ [mV]
THF	EtOH	THF	EtOH	H ₂ O			
1	2	4	8	48	164 ± 1	0,043 ± 0,008	-10
				96	80 ± 5	0,084 ± 0,012	-11
				48	119 ± 2	0,034 ± 0,009	-12
		10	20	220	231 ± 6	0,114 ± 0,018	-8
1	1	4	4	48	155 ± 4	0,049 ± 0,003	-10
				96	121 ± 3	0,065 ± 0,012	-11
				48	162 ± 3	0,094 ± 0,013	-12
		10	10	220	248 ± 9	0,078 ± 0,007	-9

Tabela 6. Rozmiar i PDI wybranych WNP (1% PCL) otrzymanych z dodatkiem EtOH w stosunku 2:1 (THF/EtOH). Zawiesiny otrzymane bez dodatku surfaktantu.

Stosunek		Objętość [ml]			Średnia średnica ± SD [nm]	PDI ± SD [-]	Potencjał ζ [mV]
THF	EtOH	THF	EtOH	H ₂ O			
2	1	4	2	48	141 ± 2	0,059 ± 0,005	-14
		8	4	96	153 ± 3	0,063 ± 0,007	-15
		12	6	144	186 ± 5	0,056 ± 0,005	-11

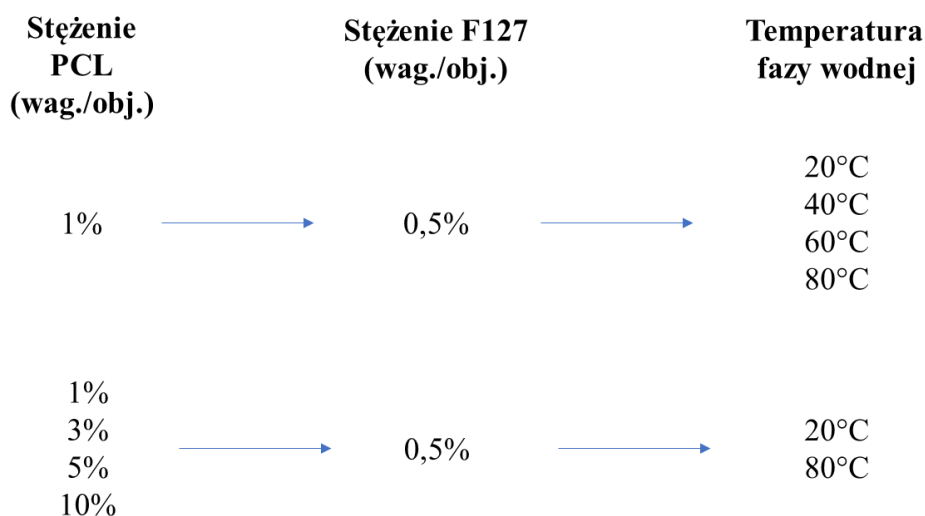
Wyniki z Tabeli 5. pokazują, że przy tej samej objętości wody, im mniejsza ilość fazy organicznej, tym mniejszy rozmiar cząstek oraz PDI, co jest potwierdzeniem wyników uzyskanych przez Pulingam i in. [24] oraz Miladi i in. [61]. Zwiększona ilość wody zmniejsza tendencję cząstek do aglomeracji, ponieważ cząstki zderzają się i skleją rzadziej. Przy szybszym procesie mieszania krytyczne przesycenie wymagane do zarodkowania zostaje osiągnięte szybciej, co skutkuje utworzeniem większej liczby zarodków, których wzrost jest ograniczony ilością polimeru dostępnego w fazie ciekłej. Dlatego im większa liczba zarodków, tym mniejszy jest rozmiar NP.



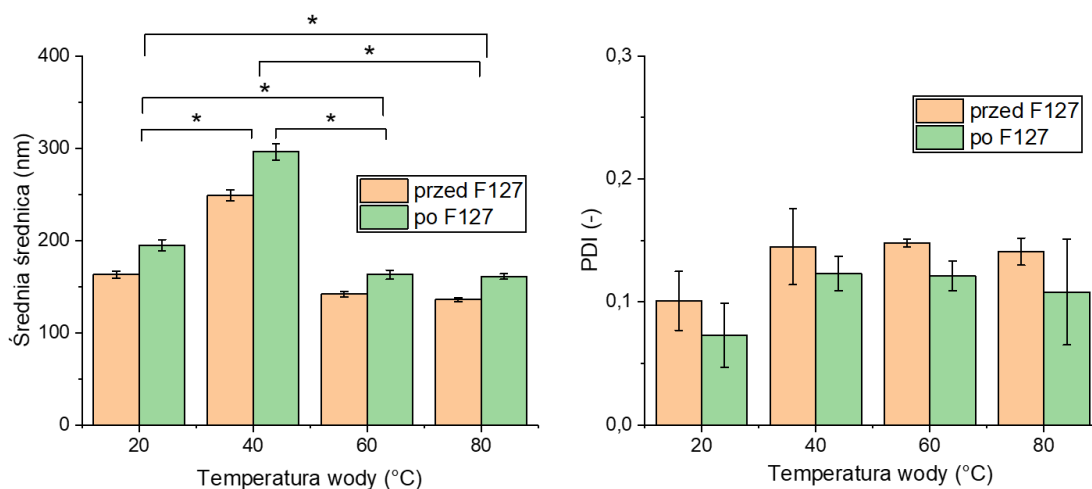
Rysunek 32. NP otrzymane z dodatkiem EtOH i 0,1M NaOH metodą DNP (A), MNP (B), WNP (C). Bez surfaktantu. Skala 1 μm.

Na obrazach SEM przedstawiono NP otrzymane trzema badanymi metodami łączenia faz (DNP, MNP, WNP), z dodatkiem EtOH i NaOH, i bez użycia surfaktantu. W przypadku metody mikroprzepływowej oraz jednorazowego wstrzyknięcia (rys. 32B i C) otrzymane NP są kuliste o jednorodnej powierzchni, w przypadku metody dozowania kroplami mają mniej regularne kształty. Obrazy pokazują, że dodatek współrozpuszczalnika oraz NaOH poprawił znacząco kształt i morfologię NP.

4.7. Wpływ temperatury fazy wodnej na rozmiar otrzymywanych nanocząstek



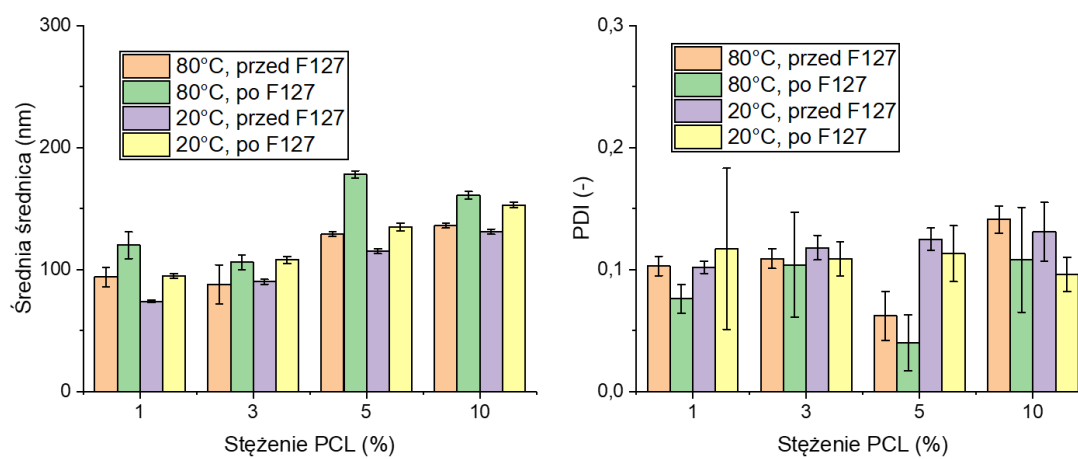
Rysunek 33. Schemat testowanych parametrów (stężenie PCL, temperatura fazy wodnej).



Rysunek 34. Wyniki DLS dla WNP (1% PCL) otrzymanych przy różnych temperaturach fazy wodnej przed i po dodaniu F127. * $p < 0,05$.

Analiza pokazała, że wyższa temperatura fazy wodnej pozwala na zmniejszenie rozmiaru NP zwłaszcza w przypadku 60°C i 80°C i zmiany te są statystycznie istotne, w porównaniu rozmiaru i PDI pomiędzy resztą analizowanych temperatur zmiany są statystycznie istotne. Wartości PDI dla temperatury 20°C były najmniejsze zarówno przed, jak i po dodaniu F127, a zmiany PDI pomiędzy analizowanymi temperaturami są statystycznie

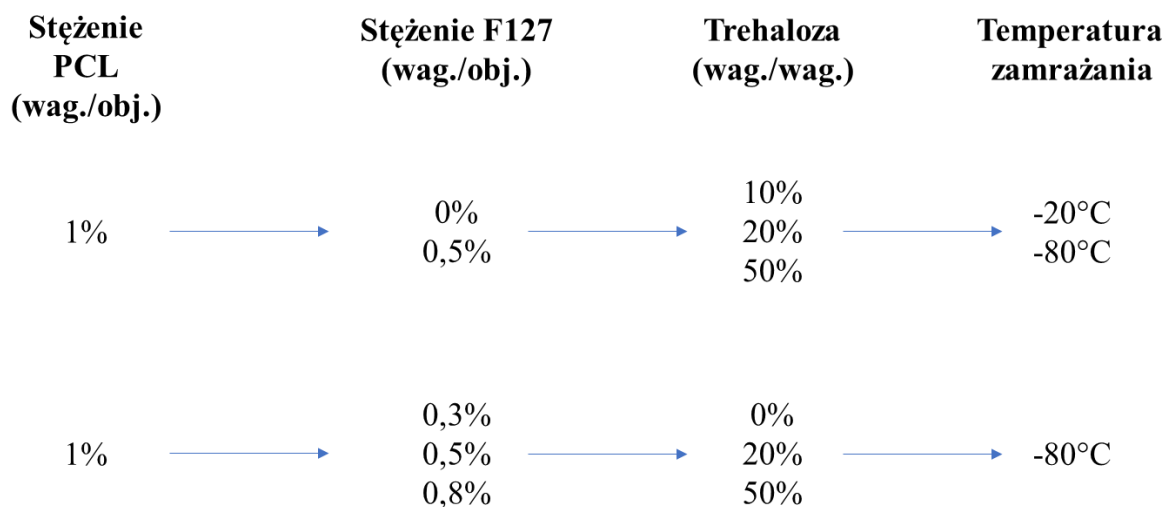
nieistotne. Zwiększenie temperatury fazy wodnej z 20°C do 40°C prowadziło do zwiększenia średnicy PCL NP. Przypisuje się to większej mobilności cząsteczek PCL w podwyższonych temperaturach, co ułatwia tworzenie większych aglomeratów przed szybkim schłodzeniem. Natomiast przy temperaturze powyżej 60°C, czyli temperaturze powyżej temperatury topnienia PCL, wartości średniej średnicy PCL NP zmniejszają się do ok. 150 nm bez surfaktantu i 170 nm po dodaniu F127. Dodanie F127 po odparowaniu rozpuszczalnika zmniejszyło rozkład rozmiarów NP we wszystkich badanych temperaturach, jednak zmiany te nie są statystycznie istotne.



Rysunek 35. Wyniki DLS dla WNP otrzymanych z wykorzystaniem różnych stężeń PCL przy temperaturze wody 20°C i 80°C przed i po dodaniu F127.

Niezależnie od stężenia użytego polimeru wyższe temperatury fazy wodnej prowadzą do większych rozkładów rozmiarów NP, zwłaszcza przy wyższych stężeniach użytego PCL. Wyniki podkreślają rolę temperatury fazy wodnej i dodatku środka powierzchniowo czynnego w formulacji NP. Podwyższone temperatury ułatwiają tworzenie większych NP ze względu na zwiększoną mobilność łańcucha polimerowego. Jednak dodatek F127 łagodzi ten efekt poprzez stabilizację zawiesiny NP, prowadząc do bardziej jednolitego rozkładu wielkości.

4.8. Badanie stabilności zawiesin nanocząstek polimerowych



Rysunek 36. Schemat badanych stężeń krioprotektantu, surfaktantu oraz badane temperatury zamrażania zawiesin NP.

W tabelach 7 i 8 przedstawiono jedynie warianty zawierające zarówno T, jak i F127 (nr próbki 2 i 4), gdyż w przypadku braku F127, liofilizowanych PCL NP nie udało się ich ponownie zawiesić w wodzie.

Tabela 7. Wartości średniej średnicy NP liofilizowanych przed i po każdym z 3 cykli liofilizacji z dodatkiem różnych stężeń F127 i T, w różnych temperaturach zamrażania (temp. z.) NP.

Nr próbki	Stężenie T [%]	Temp. z. [°C]		Średnia średnica [nm]			
		-20	-80	przed liofilizacją	po 1 liofilizacji	po 2 liofilizacji	po 3 liofilizacji
2	50	+		104	156	173	184
			+		140	155	164
+			150	230	264	277	
		+		222	255	309	
2	20	+		101	155	171	173
			+		137	147	159
+			149	227	259	266	
		+		227	259	302	
2	10	+		101	164	182	192
			+		143	154	168
+			148	208	250	303	
		+		216	259	293	

Tabela 8. Wartości PDI NP liofilizowanych przed i po każdym z 3 cykli liofilizacji z dodatkiem różnych stężeń F127 i T, w różnych temperaturach zamrażania (temp. z.) NP.

Nr próbki	Stężenie T [%]	Temp. z. [°C]		PDI [-]			
		-20	-80	przed liofilizacją	po 1 liofilizacji	po 2 liofilizacji	po 3 liofilizacji
2	50	+		0,195	0,266	0,342	0,357
			+		0,266	0,289	0,313
+			0,087	0,211	0,235	0,283	
		+		0,247	0,296	0,384	
2	20	+		0,153	0,312	0,357	0,324
			+		0,279	0,276	0,298
+			0,099	0,228	0,246	0,257	
		+		0,249	0,262	0,302	
2	10	+		0,145	0,313	0,354	0,382
			+		0,302	0,288	0,297
+			0,109	0,198	0,229	0,269	
		+		0,245	0,261	0,291	

Wyniki DLS pokazały, że w przypadku zawiesin PCL NP lepsze rezultaty osiągnięto dla mrożenia w temperaturze -80°C. Różnice w średniej średnicy oraz PDI dla poszczególnych cykli liofilizacji są statystycznie istotne ($p < 0,05$).

Wiedząc, że konieczna jest obecność surfaktantu do ponownego zawieszenia cząstek po liofilizacji, w kolejnym badaniu analizowano 3 różne stężenia F127 oraz 3 stężenia trehalozy. Surfaktant dodawano do zawiesin NP po odparowaniu rozpuszczalnika. Zawiesiny NP zamrażano w -80°C.

Tabela 9. Wartości średniej średnicy NP liofilizowanych przed i po każdym z 3 cykli liofilizacji z dodatkiem różnych stężeń F127 i T.

Stężenie F127 [% wag./obj.]	Stężenie T [% wag./wag.]	Średnia średnica [nm]			
		przed liofilizacją	po 1 liofilizacji	po 2 liofilizacji	po 3 liofilizacji
0,8	0	160	476	441	462
	20		309	322	331
	50		259	271	271
0,5	0	116	214	263	259
	20		199	225	247
	50		183	200	202
0,3	0	109	325	329	379
	20		284	297	342
	50		251	287	297

Tabela 10. Wartości PDI NP liofilizowanych przed i po każdym z 3 cykli liofilizacji z dodatkiem różnych stężeń F127 i T.

Stężenie F127 [% wag./obj.]	Stężenie T [% wag./wag.]	PDI [-]			
		przed liofilizacją	po 1 liofilizacji	po 2 liofilizacji	po 3 liofilizacji
0,8	0	0,143	0,323	0,267	0,257
	20		0,249	0,218	0,203
	50		0,199	0,179	0,204
0,5	0	0,096	0,303	0,264	0,318
	20		0,279	0,259	0,275
	50		0,257	0,271	0,264
0,3	0	0,185	0,463	0,351	0,391
	20		0,359	0,356	0,359
	50		0,351	0,327	0,351

Po każdym cyklu liofilizacji zauważono wzrost rozmiaru oraz PDI i różnice są statystycznie istotne. Najmniejsze PDI uzyskano dla najwyższego stężenia F127 (0,8% wag./obj.) i trehalozy (50% wag./wag.). Najniższe wartości średniej średnicy otrzymano przy stężeniu F127 0,5% wag./obj. i trehalozy 50% wag./wag.

4.9. Enkapsulacja barwnika hydrofobowego

4.9.1. DLS

W tabeli 11 przedstawiono średnią średnicę i PDI NP bez dodatku fluoresceiny, w tabeli 12 przedstawiono średnią średnicę i PDI NP z fluoresceiną.

Tabela 11. Średnia średnica i PDI NP bez dodatku fluoresceiny.

Stężenie PCL [%]	DNP		MNP	
	Średnia średnica ± SD [nm]	PDI ± SD [-]	Średnia średnica ± SD [nm]	PDI ± SD [-]
0,1	122 ± 2	0,183 ± 0,010	122 ± 1	0,147 ± 0,010
0,5	150 ± 4	0,090 ± 0,008	140 ± 2	0,150 ± 0,007
1,0	189 ± 2	0,146 ± 0,016	121 ± 4	0,140 ± 0,008
2,0	171 ± 3	0,187 ± 0,011	184 ± 1	0,060 ± 0,006
5,0	139 ± 2	0,252 ± 0,010	188 ± 3	0,123 ± 0,020

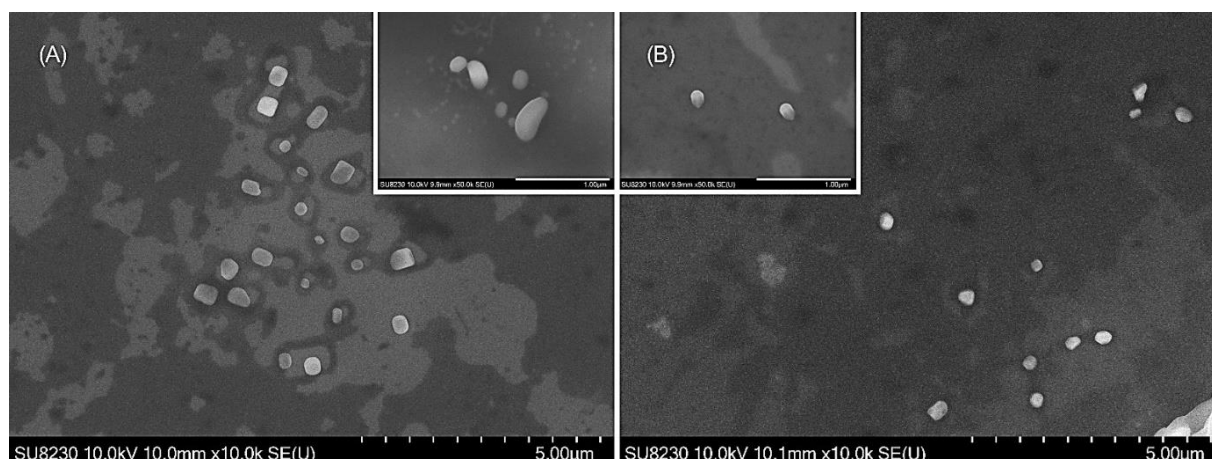
Tabela 12. Średnia średnica i PDI NP z fluoresceiną.

Stężenie PCL [%]	DNP		MNP	
	Średnia średnica ± SD [nm]	PDI ± SD [-]	Średnia średnica ± SD [nm]	PDI ± SD [-]
0,1	159 ± 3	0,424 ± 0,069	167 ± 5	0,201 ± 0,003
0,5	136 ± 5	0,585 ± 0,008	130 ± 2	0,199 ± 0,004
1,0	151 ± 0	0,653 ± 0,002	127 ± 3	0,180 ± 0,009
2,0	185 ± 4	0,154 ± 0,006	141 ± 5	0,146 ± 0,013
5,0	106 ± 2	0,609 ± 0,004	193 ± 2	0,214 ± 0,007

MNP miały bardziej jednorodny rozmiar, nawet przy zastosowaniu wyższych stężeń polimeru. Metoda mikroprzepływowa umożliwiła wytworzenie NP o pożądanej wielkości i PDI w szerszym zakresie stężeń polimeru niż DNP. Dodanie fluoresceiny do NP zwiększa ich rozmiar, jednak zmiany te są statystycznie nieistotne. Wpływ na PDI jest statystycznie istotny i szczególnie widoczny w przypadku DNP, gdzie maksymalna wartość wyniosła aż 0,653 przy stężeniu PCL 1%.

NP miały ujemny ładunek powierzchniowy, co może wynikać z obecności grupy karbonylowej na powierzchni polimeru PCL [191]. Wartości potencjału zeta wahały się od -14,6 do -21,0 mV we wszystkich wariantach, a metoda otrzymywania i zmiany stężenia polimeru nie miały wpływu na te wartości. W rezultacie można wywnioskować, że NP pozostaną fizycznie stabilne [170].

4.9.2. SEM

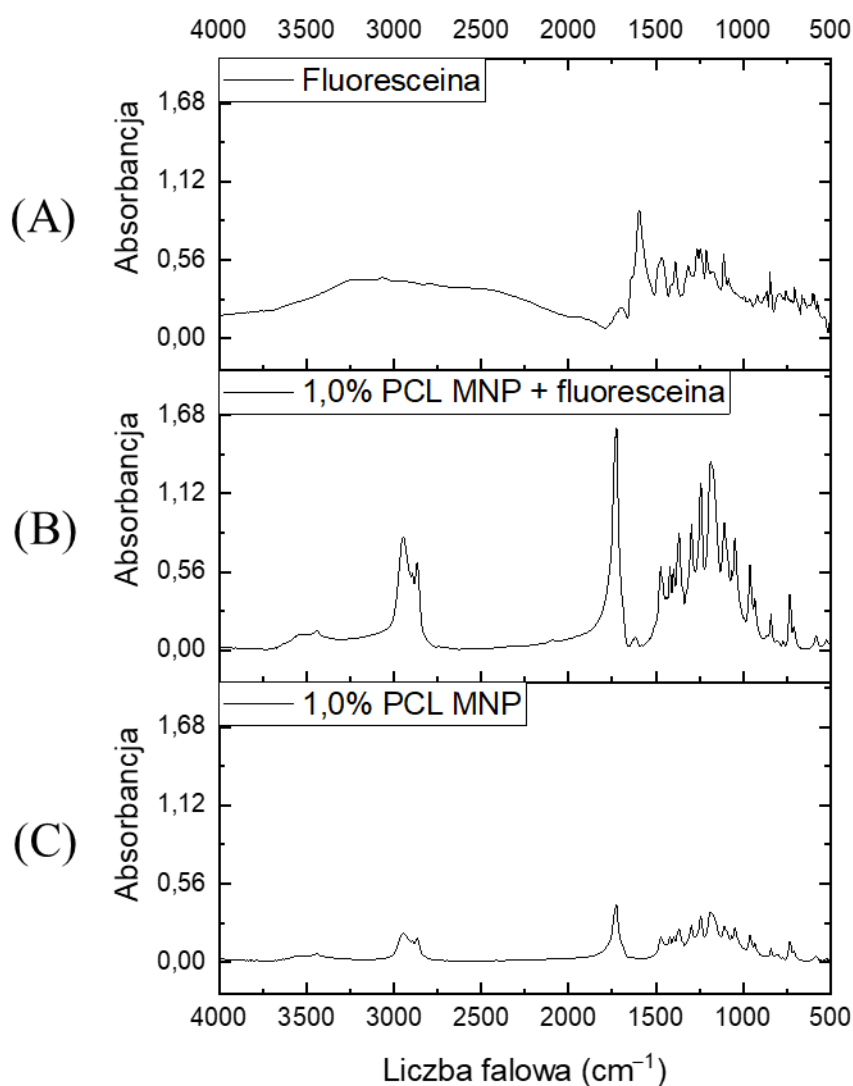


Rysunek 37. (A) DNP i (B) MNP zawierające barwnik. Oba warianty przygotowane w obecności 0,5% wag./obj. F127. Powiększone zdjęcia przedstawiają najmniejsze NP z analizowanych próbek. Skala na powiększonych zdjęciach to 1 µm.

Morfologię NP zawierających fluoresceinę wizualizowano za pomocą SEM, a przygotowane NP oceniono pod względem wielkości i kształtu. Reprezentatywne obrazy 1% DNP i MNP PCL przedstawiono na rys. 37. NP mają gładkie powierzchnie, MNP (rys. 37B) mają mniejszą średnią średnicę i węższy rozkład wielkości niż DNP (rys. 37A), co jest spójne z wartościami uzyskanymi przy użyciu techniki DLS. DNP mają wydłużone kształty, podczas gdy MNP są prawie kuliste w wyniku kontrolowanego procesu formowania. Urządzenie mikroprzepływowe ma krótki czas mieszania i czas przebywania, co zapobiega nadmiernemu wzrostowi cząstek. Z drugiej strony, w metodzie kroplowej mechanizmy zarodkowania i wzrostu NP nie mogą być rozdzielone ze względu na brak precyzyjnej kontroli nad warunkami mieszania, co prowadzi do nadmiernego wzrostu cząstek, który wpływa na ich rozmiar i kształt [71], [192], [193]. Morfologia NP wydaje się być lekko zniekształcona, co można przypisać łatwemu rozpuszczaniu środka powierzchniowo czynnego na powierzchni NP. Dodatek fluoresceiny nie wpływa na morfologię otrzymywanych NP.

4.9.3. FTIR

Na rys. 38 przedstawiono widma otrzymane dzięki analizie spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni. Wykazano, że badane próbki zawierały wszystkie charakterystyczne grupy funkcyjne.

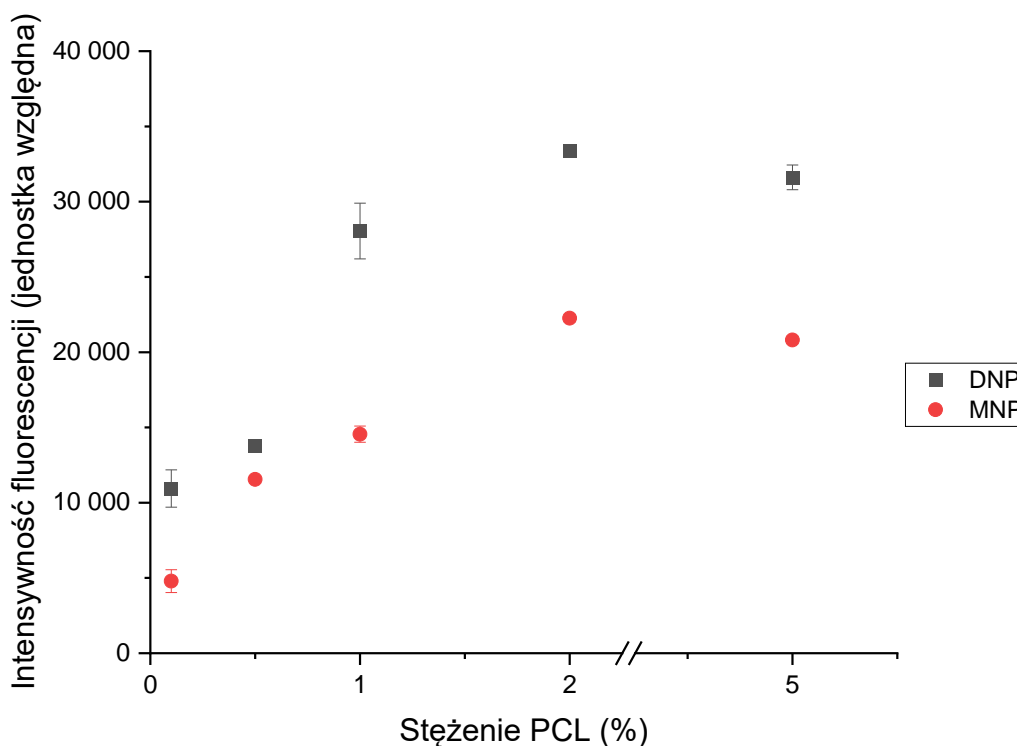


Rysunek 38. Widmo FTIR czystej fluoresceiny (A), 1,0% PCL MNP z (B) i bez (C) fluoresceiny.

MNP wykazały charakterystyczne dla PCL pasma C-H₂ przy 2940 cm⁻¹ i 2869 cm⁻¹ oraz pik odpowiadający grupie karbonylowej przy 1722 cm⁻¹. Pasma przy 2867 cm⁻¹ było związane z drganiami rozciągającymi wiązania C-H z Pluronic®F-127; przy 1187 cm⁻¹ pojawiło się pasmo rozciągania wiązania C-O. Dla fluoresceiny zaobserwowano rozciągnięcie C=C w zakresie 1643–1465 cm⁻¹.

4.9.4. Uwalnianie barwnika *in vitro*

Na rys. 39 przedstawiono zależność pomiędzy intensywnością fluorescencji a rosnącym stężeniem PCL w NP otrzymanych metodą DNP oraz MNP.



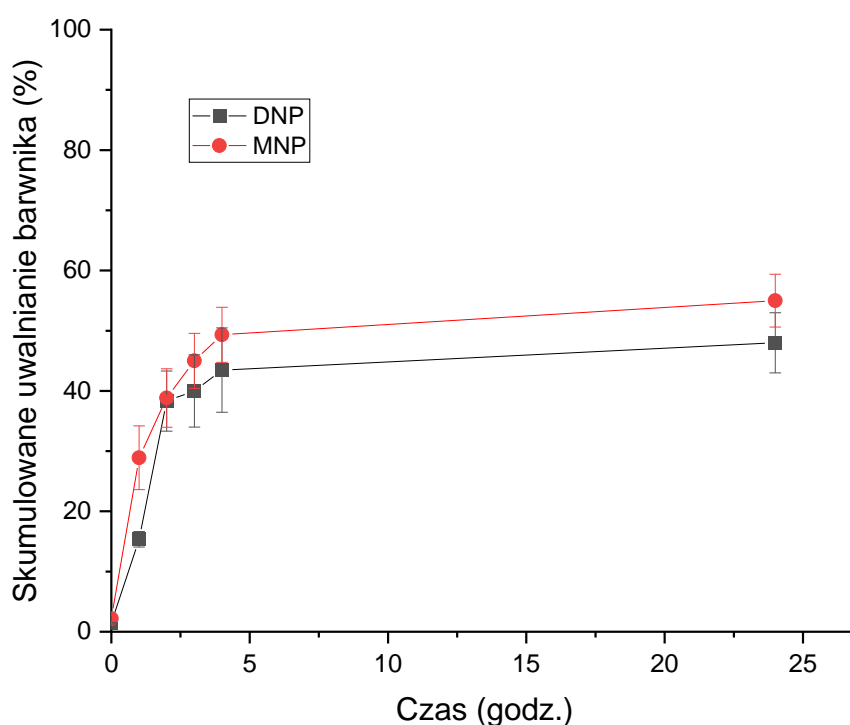
Rysunek 39. Zależność pomiędzy intensywnością fluorescencji a rosnącym stężeniem DNP i MNP zawierających fluoresceinę.

Przygotowano NP z różnymi ilościami użytego polimeru i proporcjonalnymi ilościami użytego barwnika. Na podstawie danych przedstawionych na rys. 39 można zaobserwować, że intensywność fluorescencji fluoresceiny wyraźnie wzrasta wraz ze wzrostem stężenia DNP i MNP zawierających fluoresceinę. Warto zauważyć, że wartości intensywności fluorescencji dla DNP są wyższe w porównaniu do tych dla MNP.

Uwalnianie barwnika *in vitro* z DNP i MNP zawierających fluoresceinę przeprowadzono w PBS (10 mM, pH 7,4) zawierającym DMSO (4:1 obj./obj.). DMSO zastosowano w celu rozpuszczenia hydrofobowego barwnika. Ze względu na brak rozpuszczalności fluoresceiny w wodzie, dodanie tego składnika zwiększającego rozpuszczalność było konieczne w celu zapewnienia całkowitego zanurzenia próbki i osiągnięcia wykrywalnych stężeń UV/VIS podczas badań uwalniania [194].

Rys. 40 ilustruje, że NP PCL zawierające barwnik wykazywały standardowy dwufazowy wzór uwalniania barwnika z matrycy NP. Profil uwalniania barwnika wykazywał początkowe gwałtowne uwalnianie na poziomie 44% dla DNP i 49% dla MNP w ciągu pierwszych 4 godzin, a następnie utrzymujące się uwalnianie barwnika z matrycy polimerowej

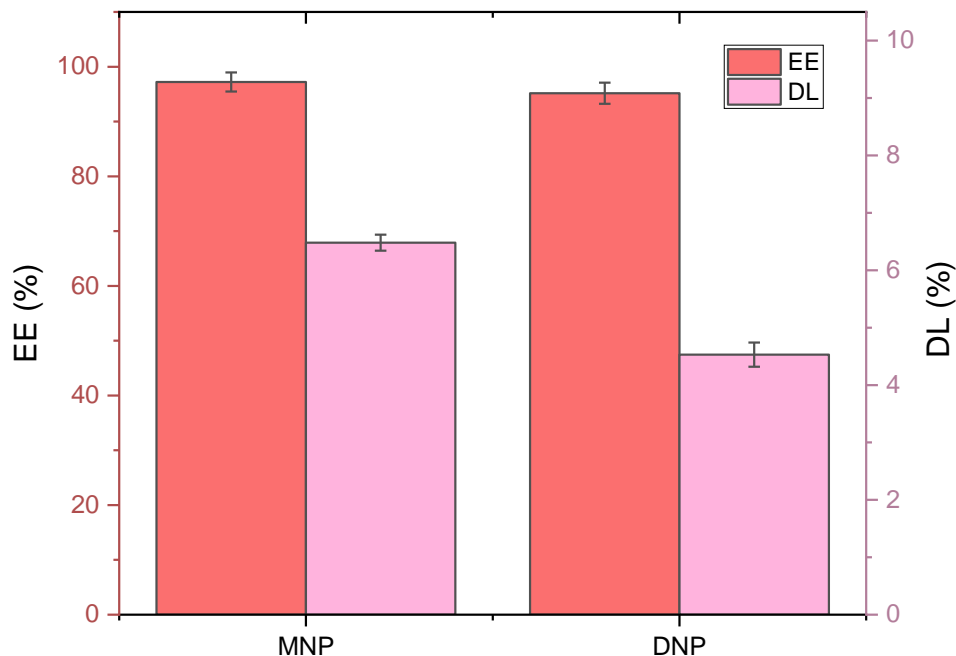
przez 24 godziny. Początkową fazę uwalniania barwnika przypisuje się głównie desorpcji lub dyfuzji barwnika znajdującego się na dużej powierzchni NP lub luźno związanego z matrycą polimerową. Uważa się, że pozostały niewolniony barwnik jest ściśle związany z cząsteczkami PCL i/lub dobrze uwięziony w matrycy NP i pochodzi głównie z dyfuzji lub erozji matrycy przy całkowitym zanurzeniu próbki. Jeśli dyfuzja barwnika jest szybsza niż erozja matrycy, mechanizm uwalniania jest w dużej mierze kontrolowany przez proces dyfuzji [71], [195]–[198].



Rysunek 40. Skumulowane profile uwalniania fluoresceiny z 1% PCL DNP i MNP z trzech niezależnych pomiarów. Próbkę mierzono po 0, 1, 2, 3, 4 i 24 godz. Dane przedstawiono jako średnie \pm SD.

W tym badaniu obie grupy miały stosunkowo małe średnie średnice - DNP 151 nm a MNP 127 nm. Podczas eksperymentu zauważono, że DNP wykazywały niższe skumulowane uwalnianie barwnika wynoszące 48% w porównaniu do MNP, które wykazywały stosunkowo wyższe skumulowane uwalnianie wynoszące 55%. Różnicę tę można wyjaśnić faktem, że mniejsze NP mają większą powierzchnię, co skutkuje wyższym stężeniem cząsteczek barwnika na powierzchni NP, co ostatecznie prowadzi do szybszego uwalniania barwnika [195], [196], [199]. Obserwacja ta ma znaczące implikacje w dziedzinie dostarczania leków,

ponieważ zapewnia głębsze zrozumienie wpływu wielkości cząstek na kinetykę uwalniania leku.



Rysunek 41. Wydajność enkapsulacji (EE%) barwnika oraz % załadowania (DL%) barwnikiem dla 1% PCL DNP i MNP.

Wydajność enkapsulacji (EE%) oraz % załadowania fluoresceiny (DL%) w DNP i MNP przedstawiono na rys. 41. Oba parametry osiągnęły wyższe wartości dla MNP (odpowiednio 97,22% i 6,48%).

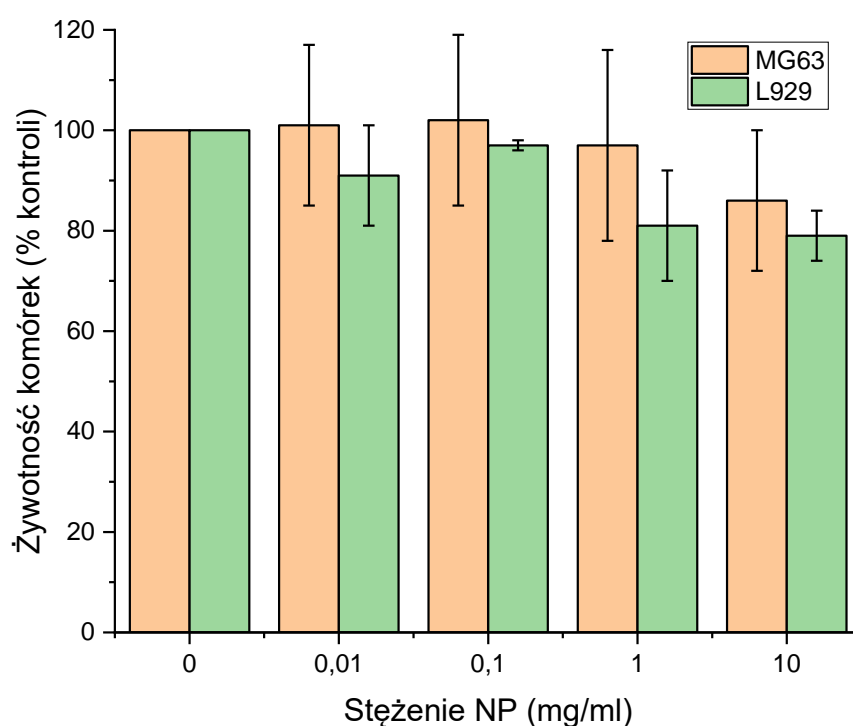
4.10. Badania komórkowe

4.10.1. Test cytotoksyczności MTT

Testy MTT przeprowadzono dla wariantów NP zebranych w Tabeli 13.

Tabela 13. Wariant NP wykorzystane do testów MTT (rys. 42 i 43).

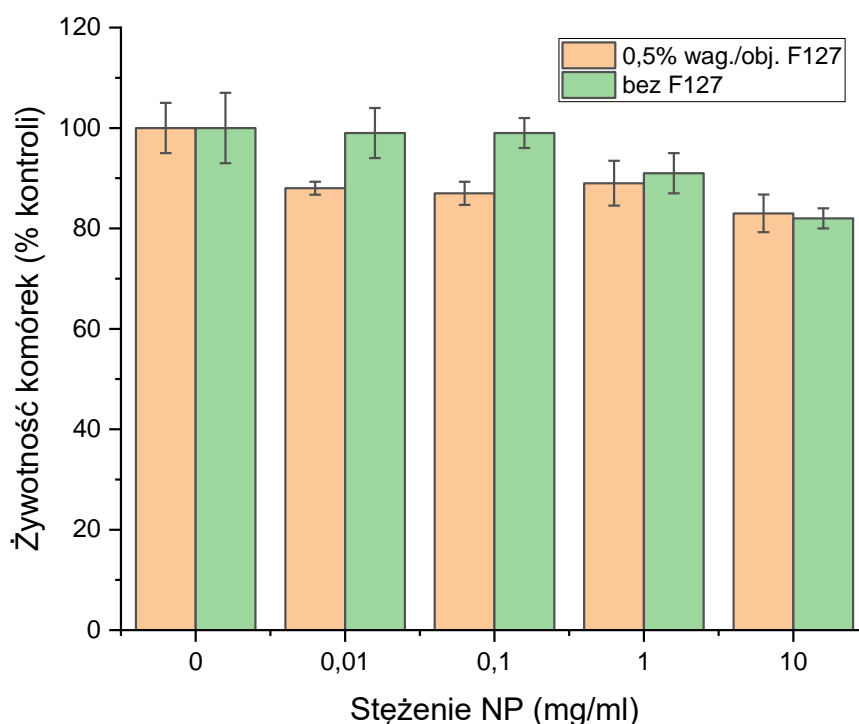
Metoda	Stężenie PCL [%]	Stężenie F127 [%]	Fluoresceina	Rozpuszczalnik	Rozmiar [nm]	PDI [-]
MNP	1	0,5	+	THF	120	0,100
WNP			-	THF/EtOH (2:1)	178	0,165
		-			152	0,056



Rysunek 42. Ocena cytotoksyczności 1,0% MNP PCL w dwóch różnych liniach komórkowych, komórkach kostniakomięsaka MG63 i linii komórkowej fibroblastów mysich L929. Wartości reprezentują średnie \pm SD (n = 6).

Według normy ISO 10993-5:2009, materiał można uznać za nietoksyczny, jeśli żywotność komórek po kontakcie z badanym materiałem wynosi powyżej 70% [186]. Komórki nowotworowe MG63 po inkubacji z PCL MNP nie wykazały zauważalnej toksyczności. Ten nietoksyczny trend można zaobserwować aż do 10 mg/ml, gdyż przy tym stężeniu NP żywotność komórek spadła do 86%. Dla porównania, komórki L929 były bardziej wrażliwe

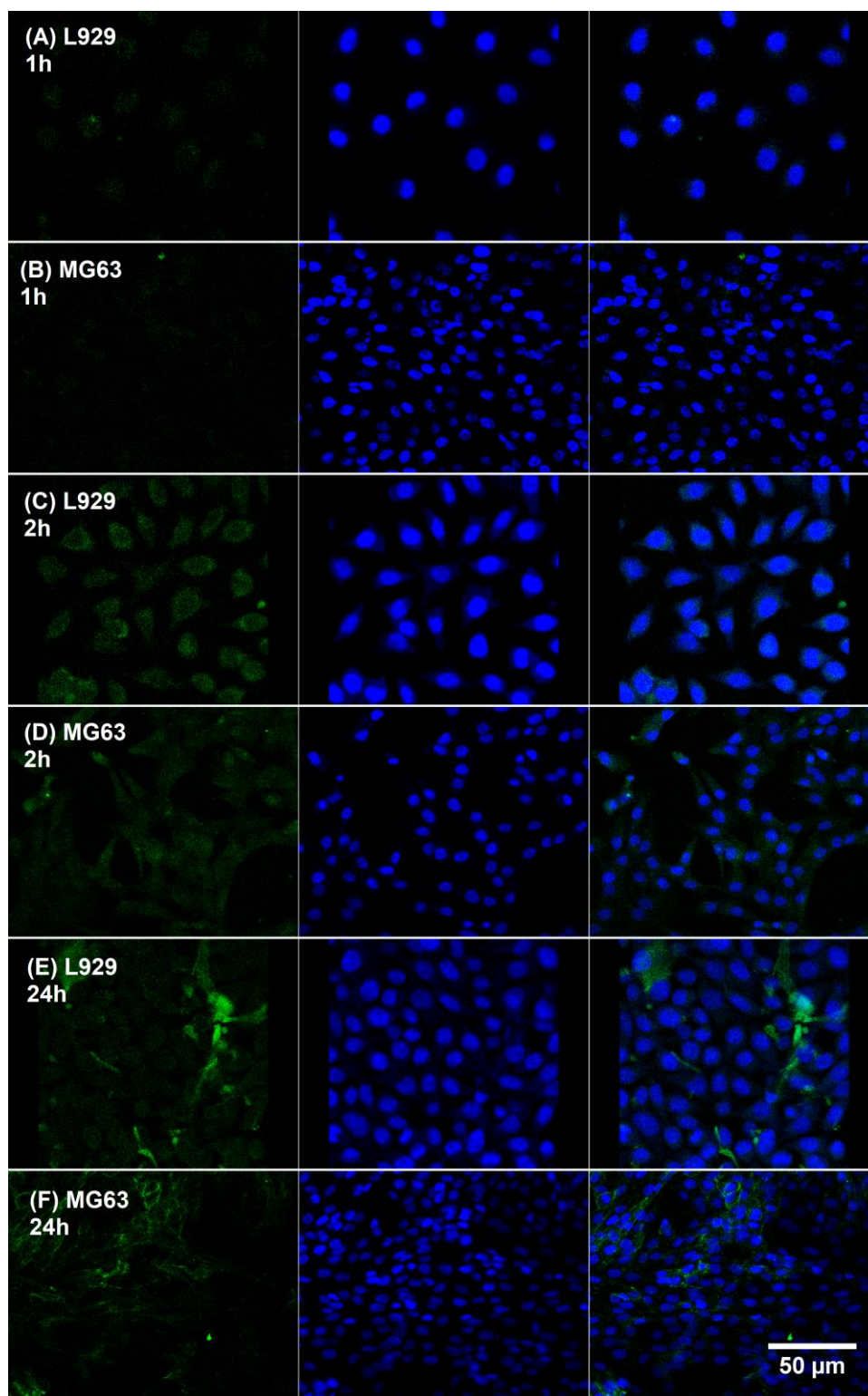
na NP, żywotność komórek przy stężeniu NP 10 mg/ml spadła do 79%. Dlatego możemy stwierdzić, że badane NP są nietoksyczne dla komórek linii L929 i MG63.



Rysunek 43. Ocena cytotoxyczności 1,0% WNP PCL z i bez F127 z wykorzystaniem komórek linii komórkowej L929. Wartości reprezentują średnie \pm SD (n = 6).

Przeprowadzono również test MTT dla WNP otrzymanych z dodatkiem EtOH i NaOH z i bez surfaktantu. PCL WNP otrzymane z wykorzystaniem EtOH jako współrozpuszczalnika również można uznać za nietoksyczne dla komórek linii komórkowej L929 w badanym zakresie stężeń. Natomiast obecność 0,5% F127 wag./obj. spowodowała spadek żywotności komórek w stosunku do wariantów bez F127, jednak nie są to różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

4.10.2. Mikroskopia konfokalna



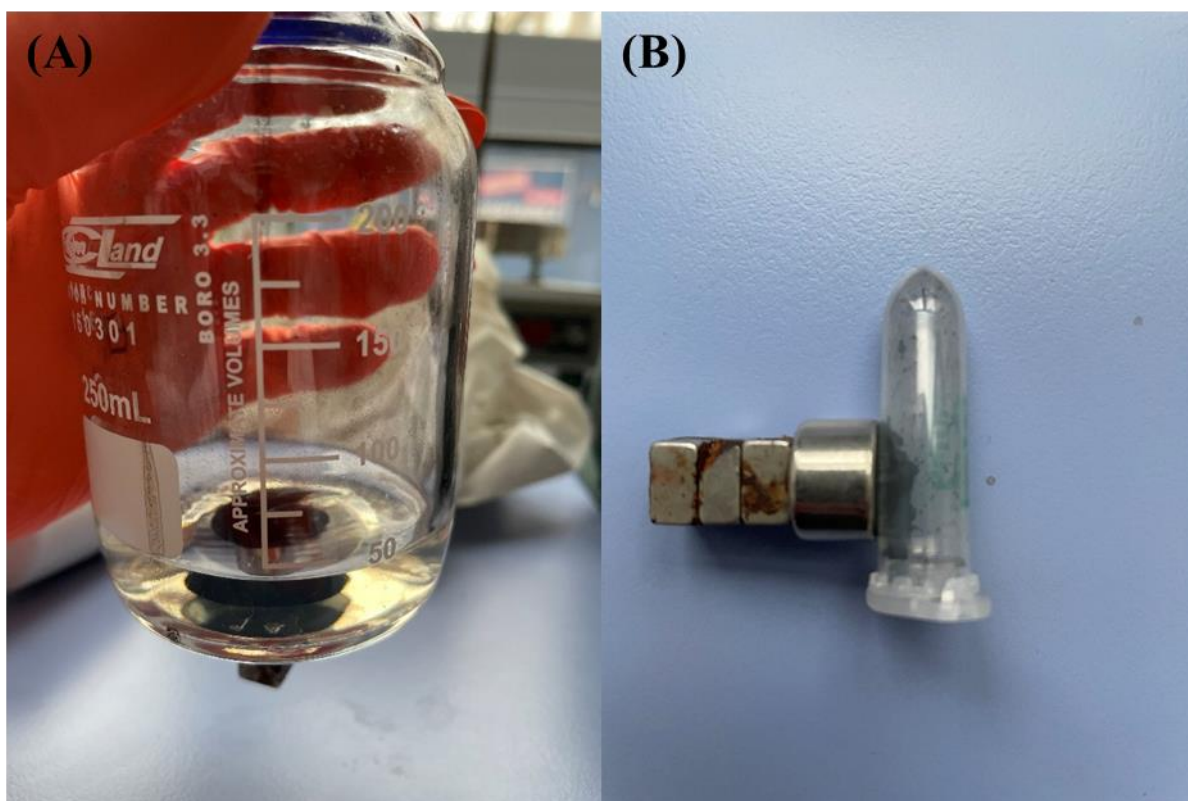
Rysunek 44. Obrazy z mikroskopu konfokalnego komórek L929 i MG63 po 1, 2 i 24 godz. inkubacji w temperaturze 37°C z MNP PCL o średnicy 120 nm (stężenie NP 1 mg/ml). Fluoresceina (po lewej), DAPI (w środku), razem (po prawej). Powiększenie 20x, 1% PCL.

Badania komórkowe potwierdziły dane uzyskane za pomocą testu MTT, jak pokazano na rys. 44. NP zawierające barwnik fluorescencyjny wydawały się skuteczne w dostarczaniu ładunku w ciągu zaledwie godziny zarówno do komórek normalnych, jak i nowotworowych. Rys. 44 przedstawia obrazy komórek inkubowanych z NP w stężeniu 1 mg/ml. Dla stężenia NP 0,1 mg/ml wyniki były podobne.

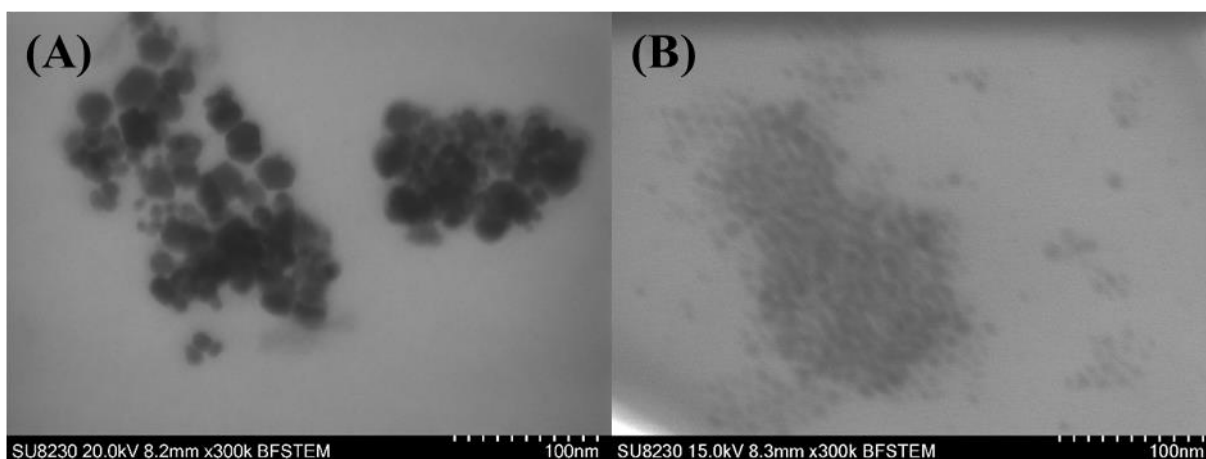
4.11. Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza

4.11.1. Otrzymane NP tlenku żelaza

Rysunek 45 przedstawia NP tlenku żelaza pokryte kwasem oleinowym otrzymane metodą opisaną w sekcji 3.12.1.



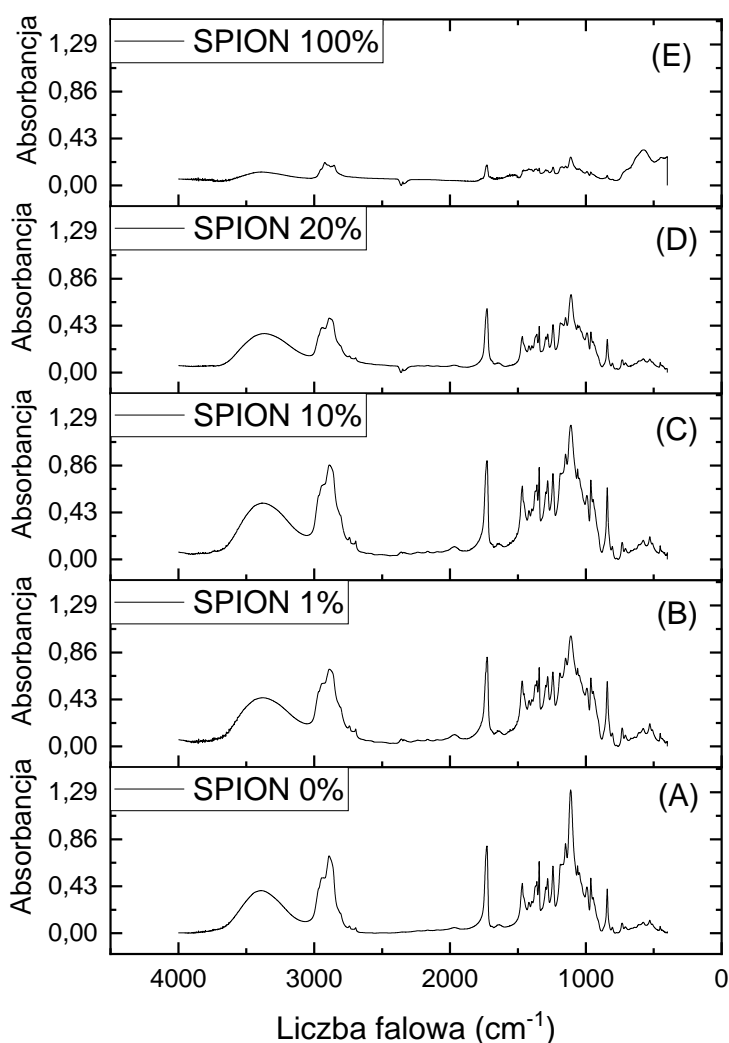
Rysunek 45. Otrzymane NP tlenku żelaza. (A) OA-SPIONy zawieszony w acetonie. (B) Wysuszone SPIONy.



Rysunek 46. Obrazy SEM przedstawiające otrzymane NP tlenku żelaza (A) pokryte kwasem oleinowym (OA-SP) oraz (B) bez pokrycia (SP).

Na podstawie obrazów SEM przedstawionych na rys. 46 można zaobserwować różnice w morfologii i agregacji NP tlenku żelaza w zależności od obecności pokrycia kwasem oleinowym. Obraz 48A przedstawia nanocząstki tlenku żelaza pokryte kwasem oleinowym (OA-SP). NP wydają się być dobrze rozdzielone, co sugeruje, że powłoka kwasu oleinowego działa jako stabilizator, zapobiegając agregacji. Pokrycie kwasem oleinowym skutkuje bardziej ujemnym potencjałem zeta ($ZP -25 \text{ mV}$), co może sprzyjać stabilności koloidalnej przez wzajemne odpychanie się cząstek. Rys. 48B obrazuje NP tlenku żelaza bez pokrycia (SP). Widoczna jest tendencja do większej agregacji, co może wynikać z braku powłoki stabilizującej, takiej jak kwas oleinowy. Potencjał zeta tych cząstek jest mniej ujemny ($ZP -15 \text{ mV}$), co wskazuje na niższy poziom stabilności elektrostatycznej w porównaniu do OA-SP.

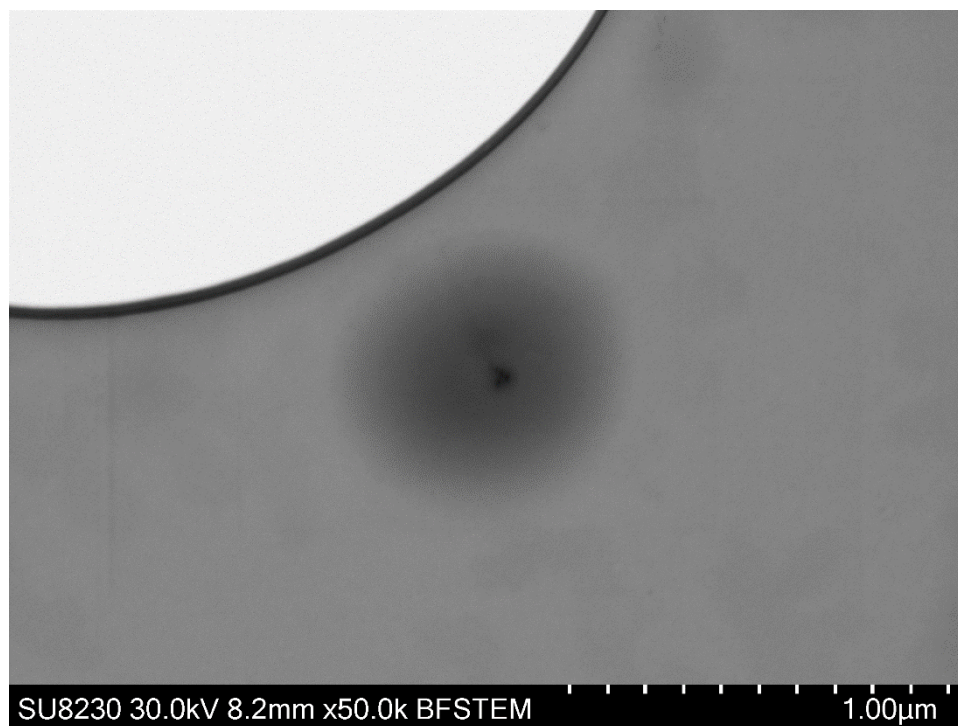
4.11.2. Analiza fizykochemiczna PCL-SP NP



Rysunek 47. Widmo FTIR PCL NP zawierających różne stężenia OA-SPIONów (B-D). (A) widmo samych PCL NP, (E) widmo dla samych OA-SPIONów.

Widmo FTIR tlenku żelaza (rys. 47E) wykazuje silne pasma w obszarze niskich częstotliwości ($1000-500\text{ cm}^{-1}$) ze względu na szkielet tlenku żelaza. Typowe pasma kwasu oleinowego to np. pasmo C=O w zakresie około 1700 cm^{-1} (pochodzące z grupy karboksylowej) i pasma CH₂ w zakresie $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ [200] (co jest zgodne z przedstawionym wyżej widmem FTIR rys. 47E). Jednakże sygnały te mogą być trudne do odróżnienia od pasm PCL, zwłaszcza jeśli stosunek SPIONów do PCL jest niski, ponieważ intensywne pasma PCL mogą maskować sygnały kwasu oleinowego. Wykrycie samego rdzenia SPIONów (Fe_3O_4 lub Fe_2O_3) jest jeszcze

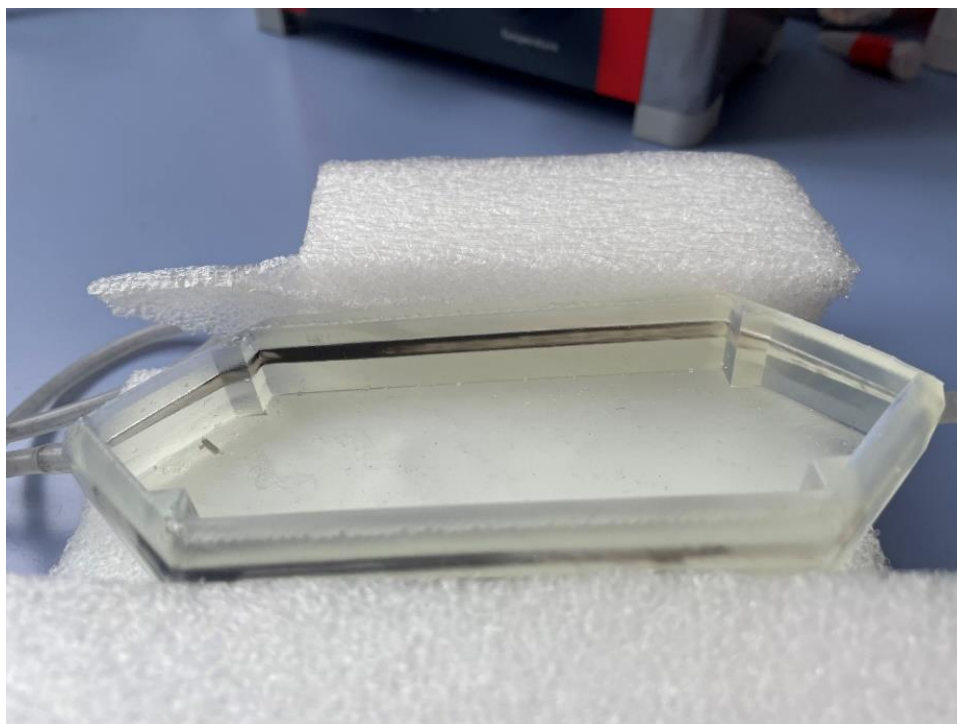
trudniejsze przy użyciu FTIR, ponieważ tlenki żelaza nie mają silnych pasm w zakresie podczerwieni, a pasma charakterystyczne dla grup funkcyjnych PCL i kwasu oleinowego dominują w widmie.



Rysunek 48. Cząstka PCL-SP NP zawierająca NP tlenku żelaza (SP20).

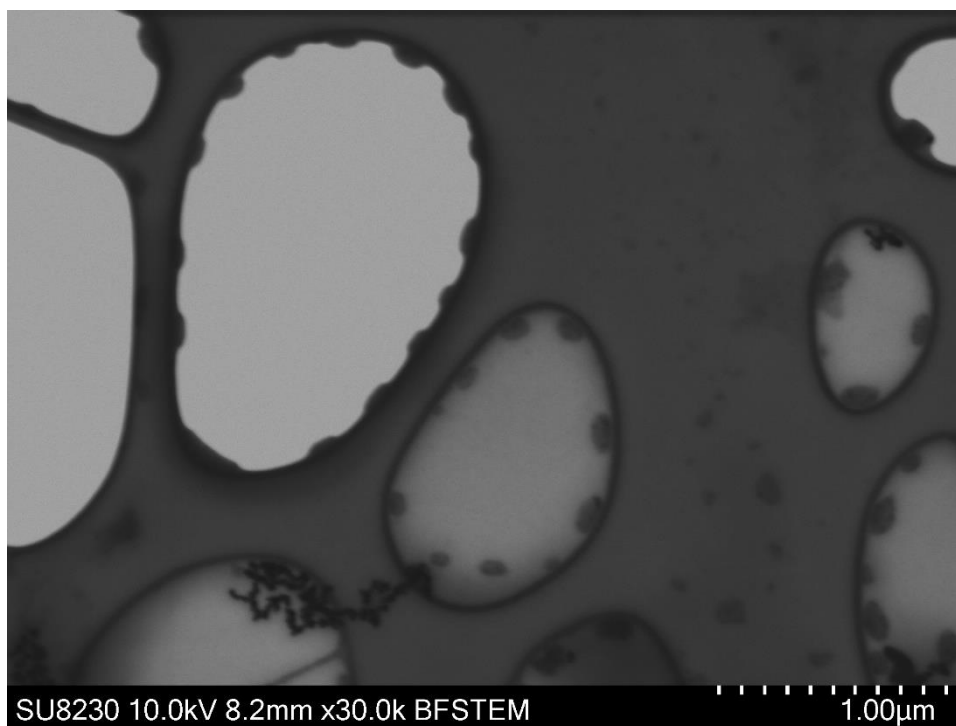
Najbardziej obiecujący okazał się wariant SP20, tj. z 20% stężeniem OA-SP. Na rys. 48 widać wyraźnie SPIONy znajdujące się wewnątrz PCL NP. Przedstawiona cząstka ma średnicę około 700 nm. Jest to stosunkowo duża średnica NP, jednak na tym etapie najistotniejsze było zamknięcie NP tlenku żelaza w PCL NP.

4.11.3. Separacja magnetyczna w układzie przepływowym



Rysunek 49. PCL-SP NP zatrzymane w układzie z wykorzystaniem magnesu neodymowego.

Na rys. 49 przedstawiono układ mikroprzepływowy, w kanałach którego dzięki użyciu magnesu neodymowego zatrzymano PCL-SP NP. Jest to efektywna metoda pozwalająca na szybkie oczyszczenie zawiesin NP magnetycznych.



Rysunek 50. PCL-SP NP po oczyszczeniu na magnesie neodymowym.

Na obrazie SEM (rys. 50) widoczne są zarówno PCL-SP NP, jak i niezwiązane SPIONy. Obserwacja ta potwierdza, że zastosowanie układu przepływowego z magnesem neodymowym stanowi skuteczną metodę separacji magnetycznych nanocząstek. Należy jednak zauważyć, że istnieje potrzeba poprawy wydajności enkapsulacji SPIONów w nanocząstkach PCL. Mimo to uzyskane wyniki stanowią solidną podstawę do dalszych badań w tym obszarze.

5. Wnioski

Zebrane analizy umożliwiły dobór najkorzystniejszych parametrów procesowych i metod wytwarzania, które pozwoliły na powtarzalne otrzymywanie polimerowych NP o zadanych właściwościach, tj. jak najmniejszym rozmiarze oraz jak najmniejszej wartości PDI.

PLGA jest polimerem dobrze poznanym i wykorzystywanym w badaniach na nanomateriałach już od kilku dekad, co potwierdza literatura [2], [111], [126], [153], [201]–[204]. Wstępne wyniki badań przeprowadzonych w tej pracy wykazały obiecujący potencjał PCL, co skłoniło do jego dalszego wykorzystania w pracach nad nanoosiłkami leków.

Faza organiczna złożona z 1% PCL w THF w badanym zakresie analizowanych parametrów dawała najlepsze rezultaty, a dodatek F127 do fazy wodnej w stężeniu 0,5% wag./obj. umożliwiał stabilizację otrzymanych zawiesin NP. Metoda mikroprzepływowa oraz dozowanie fazy organicznej kroplami pozwoliły na lepszą kontrolę procesu nanoprecypitacji, jednak po dodaniu EtOH jako współrozpuszczalnika oraz NaOH możliwe było wykorzystanie szybkiej metody jednorazowego wstrzyknięcia do otrzymania stabilnych zawiesin NP o powtarzalnych rozmiarach poniżej 200 nm i PDI ok. 0,1 bez dodatku surfaktantu.

Przeprowadzone badania pozwoliły na istotne usprawnienie procesu formowania PCL NP, dzięki dopracowaniu składu faz organicznej i wodnej oraz zastosowaniu odpowiednich metod nanoprecypitacji. W rezultacie proces stał się bardziej efektywny, eliminując konieczność stosowania surfaktantów w fazie wodnej podczas nanoprecypitacji. Wprowadzono również możliwość dodawania surfaktantu dopiero po odparowaniu rozpuszczalnika, co skróciło czas całego procesu przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej stabilności zawiesin. Ta strategia znacząco uprościła i przyspieszyła proces formowania NP, czyniąc go bardziej wydajnym i praktycznym zarówno dla zastosowań laboratoryjnych, jak i przemysłowych.

Zbadano również wpływ temperatury fazy wodnej na właściwości NP. Stwierdzono, że rozmiar NP był istotnie mniejszy przy temperaturze fazy wodnej 80°C, natomiast wartości PDI były niższe przy temperaturze 20°C, choć różnice te nie były statystycznie istotne. Analiza stabilności wykazała konieczność zastosowania zarówno stabilizatora, jak i krioprotektantu w zawiesinach NP przed procesem liofilizacji.

W przypadku enkapsulacji barwnika hydrofobowego w PCL NP, obie zastosowane metody nanoprecypitacji pozwoliły na otrzymanie NP o małych rozmiarach i niskim PDI, jednak MNP z barwnikiem miały szerszy zakres rozmiarów (127-193 nm) i niższe PDI (0,146- 0,214) niż DNP (106-185 nm, PDI 0,154-0,653). Potencjał ζ jest cennym parametrem

do przewidywania stabilności przechowywania dyspersji koloidalnych, o czym donoszą Thode i in [205]. Gdy potencjał ζ wykazuje wysokie wartości ujemne, wskazuje to na obecność odpychania elektrostatycznego między cząstkami, co zapobiega agregacji i stabilizuje dyspersję NP [170], [206], [207]. Co więcej, ujemnie naładowane NP mają niską toksyczność dla komórek [208]. By osiągnąć bardziej stabilny koloid i zapobiec niekontrolowanej agregacji świeżo utworzonych cząstek, do mieszaniny dodawano NaOH w celu zwiększenia siły jonowej, co wspomagało stabilizację układu poprzez wzmocnienie odpychania elektrostatycznego między cząstkami. Wartości potencjału ζ dla opisywanych DNP i MNP były z zakresu - 14,6 do -21 mV, co świadczy o tym, że otrzymane NP pozostaną fizycznie stabilne. Z obrazów SEM jasno wynika, że przygotowane NP miały gładkie powierzchnie. Uwalnianie fluoresceiny zarówno z DNP, jak i MNP przebiegało dwuetapowo. Wdrożenie systemu kontrolowanego i przedłużonego uwalniania jest wysoce pożądane dla skutecznego utrzymania optymalnego poziomu terapeutycznego leku przez dłuższy czas [209], [210]. MNP, które są mniejsze i mają wyższy EE% i DL% niż DNP, mogą lepiej nadawać się do zastosowań wymagających szybszego uwalniania leku.

Aby ocenić przenikanie NP do komórek i efekty celowania NP z barwnikiem, wychwyty komórkowy MNP przeprowadzono przy użyciu linii komórkowych L929 i MG63. Do badania wybrano barwnik lipofilowy – fluoresceinę, ze względu na jej słabą rozpuszczalność w wodzie i łatwość enkapsulacji w hydrofobowych rdzeniach nanocząstek [211]. Internalizację NP zawierających fluoresceinę inkubowanych przez 1, 2 i 24 godziny wizualizowano za pomocą mikroskopu konfokalnego. Aby obserwować rozkłady komórkowe NP, zastosowano zieloną fluorescencję z fluoresceiny i niebieską fluorescencję ze znakowania jąder DAPI. Fakt, że pobieranie NP przez komórki L929 i MG63 było znacznie wyższe po 24 godzinach w porównaniu z 1 lub 2 godzinami inkubacji, podkreśla zależną od czasu akumulację tych NP w komórkach. Wykazano, że wielkość cząstek determinuje zarówno mechanizm i szybkość wychwyty wewnątrzkomórkowego, jak i zdolność cząstki do przenikania przez tkankę [212], [213]. Rzeczywiście, rozmiar cząstki może wpływać na wydajność i drogę jej wychwyty komórkowego, wpływając na jej adhezję i interakcję z komórkami [214]. Jakościowe podejście do fluorescencji komórkowej ujawniło stopniowy wzrost w ciągu 24 godzin, z dowodem znacznego wzrostu uwalniania barwnika w czasie. Co więcej, po 24 godzinach można zaobserwować, że barwnik kumulował się w obszarach wokół jądra. Wyniki te wskazują, że NP zawierające fluoresceinę uwalniają swój ładunek wewnątrzkomórkowo.

Jednym z głównych problemów związanych z wizualizacją NP polikaprolaktonowych za pomocą mikroskopii elektronowej jest specyficzne środowisko, jakie wymaga ten rodzaj

mikroskopu, zwłaszcza warunki próżni. PCL charakteryzuje się niską temperaturą topnienia (około 60°C), a przy wysokich powiększeniach wiązka elektronów może wywoływać lokalne nagrzewanie nanocząstek. To prowadzi do ich topienia lub deformacji, co utrudnia uzyskanie wiarygodnych obrazów oraz dokładną ocenę ich morfologii.

Dodatkowym utrudnieniem jest obecność surfaktantu, takiego jak F127, który często jest stosowany do stabilizacji nanocząstek w trakcie syntezy. Surfaktant może tworzyć warstwę na powierzchni nanocząstek oraz siatki TEM, co zaburza kontrast i rozdzielczość obrazu w mikroskopie elektronowym. Pod wpływem próżni oraz ciepła generowanego przez wiązkę elektronów, surfaktant może się degradować lub odparowywać, co jeszcze bardziej komplikuje wizualizację PCL NP. Dlatego konieczne może być stosowanie takich technik, jak powlekanie nanocząstek materiałami przewodzącymi lub dopasowanie parametrów mikroskopu, np. zmniejszenie energii wiązki elektronów, aby uniknąć zniszczenia próbek podczas obrazowania.

Napylanie próbek metalami ciężkimi, takimi jak złoto lub platyna, rzeczywiście może wpłynąć negatywnie na zdolność wizualizacji SPIONów zamkniętych w nanocząstkach polimerowych poprzez uniemożliwienie wykorzystania funkcji S(T)EM. Proces napylania jest zwykle stosowany w celu poprawy przewodnictwa próbek, co pozwala na uzyskanie lepszej jakości obrazów w SEM. Alternatywnym rozwiązaniem mogłoby być stosowanie niskonapięciowej mikroskopii elektronowej (*ang. low voltage SEM*), która zmniejsza potrzebę powlekania próbek metalami, lub innych technik obrazowania, takich jak transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM), która może lepiej ukazać wewnętrzne struktury bez potrzeby napylania. W ten sposób można uzyskać lepszy kontrast pomiędzy SPIONami a polimerem, unikając wpływu metalowej powłoki na jakość obrazów.

Dzięki metodzie nanoprecypitacji możliwe jest otrzymanie PCL-SP NP. SPIONy znajdują szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach biomedycyny, w tym są akredytowane przez FDA do stosowania jako środki kontrastowe w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego, dzięki czemu można uzyskać lepsze obrazy tkanek i organów [180]. Mogą być używane do celowanego dostarczenia leków [181], w terapii hipertermicznej, gdzie są podgrzewane za pomocą pola magnetycznego do temperatury, która jest szkodliwa dla komórek rakowych, ale nie uszkadza zdrowych tkanek, dzięki temu można selektywnie niszczyć komórki nowotworowe [182], [183]. Dodatkowo mogą być używane do izolowania i oczyszczania biomolekuł, takich jak DNA, RNA czy białka, dzięki swoim właściwościom magnetycznym, które pozwalają na łatwe oddzielenie ich od reszty próbki pod wpływem pola magnetycznego [184]. Dalsze badania powinny koncentrować się na zwiększeniu wydajności

zamykania SPIONÓW w PCL NP. Zastosowanie układu przepływowego z magnesem neodymowym umożliwiło skuteczną separację otrzymanych PCL-SP NP, co znacząco skraca czas oczyszczania otrzymanego produktu. Dzięki temu możliwe jest wyeliminowanie etapu wirowania lub długotrwałego procesu sedymentacji NP, co upraszcza i przyspiesza cały proces.

6. Model

6.1. Wprowadzenie

Wszechstronność nanoprecypitacji opiera się na szeregu regulowanych parametrów, które zapewniają elastyczność w otrzymywaniu NP o różnych właściwościach, co czyni ją korzystną technologią produkcyjną. Jednak ta wszechstronność staje się mieczem obosiecznym podczas projektowania. Wynika to z faktu, że znalezienie odpowiedniej kombinacji istotnych parametrów w celu osiągnięcia pożądanej wydajności jest skomplikowane. Z jednej strony, liczba możliwych kombinacji parametrów rośnie wykładniczo wraz z liczbą zmiennych związanych z metodą nanoprecypitacji. Co więcej, scharakteryzowanie otrzymanych NP wymaga dodatkowego czasu i wysiłku, co sprawia, że optymalizacja preparatów jest procesem czasochłonnym i wymagającym dużych zasobów. Dlatego też istnieje pilne zapotrzebowanie na narzędzia, które mogą przewidywać idealne parametry w czasie rzeczywistym, aby przyspieszyć otrzymywanie pożądanych produktów [215].

Symulacje komputerowe mogą być wykorzystywane jako wstępne narzędzie przesiewowe przed przeprowadzeniem prób eksperymentalnych, prowadząc do znacznego usprawnienia procesu a tym samym zmniejszenia zużycia odczynników i kosztów procesu [216].

Istnieje wiele sposobów podejścia do numerycznego modelowania procesu nanoprecypitacji. Wśród nich trzy grupy modeli wydają się być najbardziej użyteczne: (i) oparte na dynamice molekularnej (MD), (ii) oparte na modelu bilansu populacji, zwykle w połączeniu z obliczeniową dynamiką płynów (CFD), oraz (iii) oparte na bezpośrednich równaniach opisujących dyfuzję i koalescencję cząstek. Pierwsza z wymienionych grup, grupa oparta na MD, przewiduje bezpośrednie śledzenie (makro)cząsteczek zaangażowanych w tworzenie cząstek, a także cząsteczek rozpuszczalników organicznych, wody i środków powierzchniowo czynnych.

Chociaż metody z tej grupy pozwalają na osiągnięcie wysokiej dokładności, wymagają również dużej mocy obliczeniowej, co ogranicza ich zastosowanie jako narzędzia do planowania eksperymentu - znaczenie tej grupy metod jest raczej poznawcze. Stąd też metody te stosowane są głównie w przypadku rozważania interakcji różnych substancji tworzących nanocząstkę podczas nanoprecypitacji, np. w powlekanii [217], enkapsulacji [218] itp.

Druga z wymienionych metod numerycznych polega na połączeniu algorytmu CFD z bilansem populacji [219]. Algorytm CFD jest wykorzystywany do rozwiązywania układu równań dynamiki płynów. Ogromną zaletą tego podejścia jest możliwość opisanie wpływu turbulencji przepływu na dynamikę powstawania NP poprzez zastosowanie odpowiednich technik zamknięcia, np. modelu podsiatkowego Smagorinsky'ego-Lilly'ego [220]. Sam model populacji jest tu uwzględniony w postaci kwadraturowej metody momentów (QMOM) [221] lub jej modyfikacji: bezpośredniej kwadraturowej metody momentów (DQMOM) [222] lub warunkowej kwadraturowej metody momentów (CQMOM) [219]. Pomimo swoich niewątpliwych zalet, ta grupa modeli wymaga również stosunkowo dużej mocy obliczeniowej, dlatego jest stosowana głównie w układach o złożonym polu przepływu, zwłaszcza w obecności przepływu turbulentnego.

Wreszcie, ostatnia grupa modeli, oparta bezpośrednio na równaniach dyfuzji i koalescencji, jest najczęściej wykorzystywana w modelowaniu numerycznym nanoprecypitacji.

Niniejsze badania miały na celu sprawdzenie, czy przedstawiony model może z powodzeniem przewidywać rozkład wielkości formułowanych PCL NP przy szeregu zmiennych mających wpływ na finalny rozmiar NP:

- (1) dodatek EtOH jako współrozpuszczalnika
- (2) zmienne stężenie PCL
- (3) dodatek surfaktantu (F127) w różnych stężeniach

6.2. Opis wykorzystanego modelu

Badania numeryczne opierają się na modelu zaproponowanym przez Lebouille i in. [223]. Zgodnie z tym modelem zmiana stężenia NP jest opisana równaniem drugiego rzędu:

$$\frac{dc_{NP}}{dt} = -K \cdot h \cdot c_{NP}^2 \quad (22)$$

gdzie c_{NP} oznacza stężenie NP, a h jest efektywnością zderzeń ($h = 1$ oznacza, że zderzenie dwóch cząstek zawsze prowadzi do koalescencji, a $h = 0$ – koalescencja nigdy nie występuje). Wartość ta zależy od liczby cząstek surfaktantu osadzonych na powierzchni NP. Wartość K jest stałą szybkości koalescencji cząstka-cząstka. W [223] zakłada się, że zderzenie NP, po którym następuje koalescencja, jest wynikiem wyłącznie dyfuzji, co oznacza, że szybkość ta jest wyrażona jako:

$$K = 4\pi D'R' \quad (23)$$

W powyższym równaniu D' oznacza sumę współczynników dyfuzji reagujących cząstek, a R' jest sumą ich promieni (podczas zderzenia dwóch cząstek o tych samych promieniach R mamy $D' = 2D$ i $R' = 2R$). Najprostszym sposobem obliczenia współczynnika dyfuzji jest równanie Stokesa-Einsteina:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\mu R} \quad (24)$$

Za opisem reprezentowanym przez układ równań (22-24) stoją dwa dość istotne założenia:

- względny ruch powstających cząstek polimeru jest wynikiem wyłącznie dyfuzji (ruch Browna)
- bardzo krótki (pomijalny) czas mieszania w stosunku do czasu dyfuzji - oznacza to, że po dodaniu roztworu PCL w rozpuszczalniku organicznym do wody, rozpuszczalnik ten natychmiast miesza się z wodą i od początku rozpatrywany jest układ izolowanych cząstek polimeru w ubogim rozpuszczalniku.

Taki zestaw warunków opisuje tak zwaną koalescencję ograniczoną dyfuzją (DLC) [80], która jest analogiem agregacji ograniczonej dyfuzją (DLA), szeroko stosowanego modelu tworzenia agregatów cząstek stałych.

Opis ten należy uznać za wystarczający dla przypadku dozowania kroplowego. W przypadku jednorazowego wstrzyknięcia konieczne jest uwzględnienie skończonego czasu mieszania. W przypadku mikroprzepływu należy wziąć pod uwagę, że oprócz dyfuzji (laminarne) pole przepływu ma znaczący wpływ na dynamikę zderzeń cząstek, co oznacza, że równanie (23) musi zostać zastąpione bardziej szczegółowym opisem ruchu cząstek w przepływie laminarnym.

6.3. Metody i zakres badań

PCL NP przygotowano metodą WNP jak opisano wcześniej (3.4.2). W skrócie, polimer rozpuszczono w THF i dodano do nierozpuszczalnika metodą jednorazowego wstrzyknięcia. W przypadku wariantów z etanolem dodatkowym krokiem przed zmieszaniem faz było dodanie EtOH do PCL rozpuszczonego w THF (EtOH/THF (1:2) obj./obj.) i dokładnie wymieszano.

Następnie rozpuszczalniki organiczne odparowano z zawiesiny NP z wykorzystaniem wyparki obrotowej. Zakres badanych stężeń PCL w THF wynosił od 0,03 do 25% wag./obj., a stężenie F127 w ultraczystej wodzie wynosiło od 0,01 do 0,64% wag./obj. We wszystkich

testach stosowano stałe mieszanie magnetyczne 1000 obr./min. Każdy preparat został przygotowany i zmierzony trzykrotnie.

6.4. Wyniki eksperymentalne

6.4.1. Wpływ stężenia PCL i etanolu jako współrozpuszczalnika

Rozważania modelowe rozpoczęto od układu z EtOH jako współrozpuszczalnikiem. Przy uwzględnieniu faktu, że objętość cząstki jest proporcjonalna do sześcianu jej średnicy, równania (22-24) można przekształcić do równania opisującego ewolucję średnicy cząstki w czasie t w postaci:

$$\frac{dD_h}{dt} = \frac{8}{3} \frac{k_B T}{\mu} \frac{c_{p0} D_{h,0}^3}{D_h^2} \quad (25)$$

gdzie $D_{h,0}$ jest początkową wartością średnicy cząstek. Rozwiązaniem (25) jest:

$$D_h(t) = D_{h,0} \left(1 + \frac{t}{\tau_{cs}}\right)^{1/3} \quad (26)$$

gdzie $\tau_{cs} = \frac{3}{8} \frac{\mu}{c_{p0} k_B T}$ jest skalą czasową koalescencji. Równanie (26) pozwala nam obliczyć końcową wartość średnicy cząstek, gdy znamy wartości początkowej średnicy cząstek $D_{h,0}$, czas procesu t i początkowe stężenie liczbowe cząstek na jednostkę objętości c_{p0} . Ostatnia wielkość jest powiązana z początkową średnicą cząstek i stężeniem masowym PCL $c_{0,mass}$ za pomocą wzoru:

$$c_{p0} = \frac{c_{0,mass}}{m_p} = \frac{6c_{0,mass}}{\pi D_{h,0}^3 \rho_{PCL}} \quad (27)$$

Łącząc ze sobą (26) i (27) otrzymujemy:

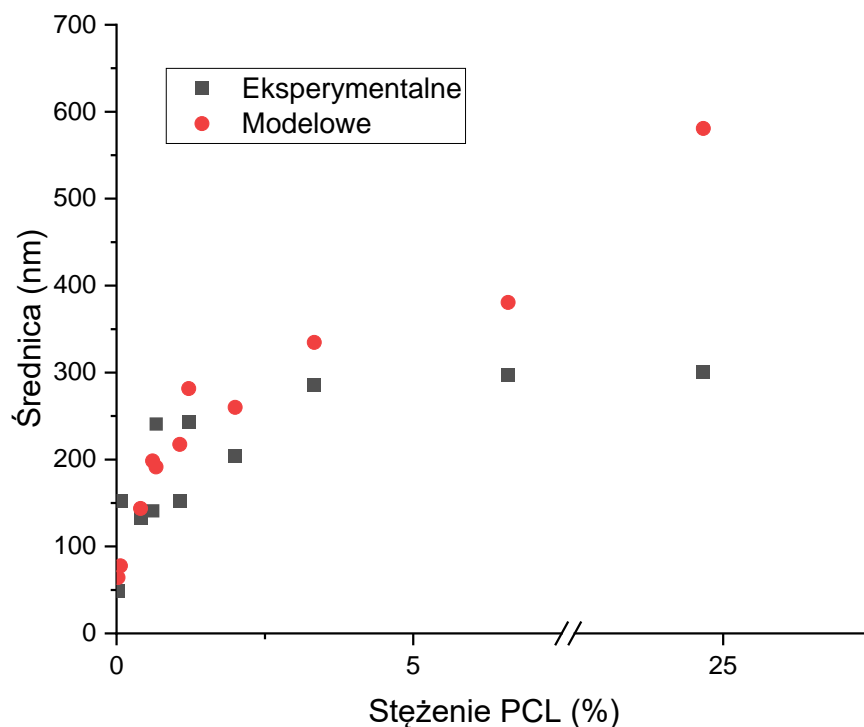
$$D_h(t) = D_{h,0} \left(1 + 16 \frac{k_B T}{\mu} \frac{c_{0,mass}}{\pi \rho_{PCL}} \frac{t}{D_{h,0}^3}\right)^{1/3} \quad (28)$$

W powyższym równaniu, wszystkie wartości są stałe poza $c_{0,mass}$ (która jest jednym z warunków eksperymentu), oraz czas formowania cząstek t i ich średnią średnicę początkową $D_{h,0}$. Te ostatnie można jednak znaleźć, dopasowując rozwiązanie (28) do wyników eksperymentalnych. Na przykład, dla wyników układu z dodatkiem etanolu, najlepsze dopasowanie uzyskuje się dla wartości parametrów podanych w Tabeli 14. Porównanie wyników teoretycznych i eksperymentalnych przedstawiono na Rys. 51.

Tabela 14. Parametry stałe i dopasowane dla modelu wzrostu cząstek.

Parametry stałe				Parametry dopasowane	
k_B [J/K]	T [K]	μ [mPa·s] *	ρ_{PCL} [$\frac{g}{cm^3}$]	$D_{h,0}$ [nm]	t [ms]
$1,380649 \cdot 10^{-23}$	300	0,9321	1,145	41,0	16,0

*Przyjęto jako lepkość wody w temperaturze 300 K



Rysunek 51. Porównanie wpływu stężenia PCL na średnicę hydrodynamiczną NP PCL otrzymanych eksperymentalnie i za pomocą modelu.

W przypadku braku współrozpuszczalnika (EtOH), wzór (28) jest nadal ważny dla stosunkowo niskiego (do 0,7%) stężenia PCL. Różnica między obliczonymi i zmierzonymi wartościami średnicy cząstek wzrasta dla większych wartości. W szczególności ta ostatnia maleje wraz ze wzrostem stężenia PCL, czego nie przewiduje równanie (28).

Aby opisać ten efekt, Lebouille i wsp. [223] zaproponowali modyfikację (25) poprzez dodanie współczynnika h po prawej stronie tego wzoru:

$$\frac{dD_h}{dt} = \frac{8 k_B T c_{p0} D_{h,0}^3}{3 \mu D_h^2} h(x) \quad (29)$$

gdzie x jest zdefiniowana jako ułamek powierzchni cząstek zablokowana przez cząsteczki surfaktantu. Wynika z tego, że gdy $x = 0$ (brak cząsteczek surfaktantu na powierzchni PCL NP) mamy $h(x) = 1$, a (25) jest nadal ważne. Natomiast gdy $x = 1$ (surfaktant blokuje powierzchnię) koalescencja nie jest możliwa ($h(x) = 0$). Poza tymi skrajnymi przypadkami wartość $h(x)$ pozostaje nieznana. Można jednak oczekiwać, że dyfuzja cząsteczek surfaktantu jest znacznie szybsza niż dyfuzja cząsteczek PCL, a zatem końcowa frakcja x jest osiągana w stosunkowo krótkim czasie w porównaniu z czasem wzrostu cząstek. Środek powierzchniowo czynny na powierzchni cząstek zwiększa efektywny współczynnik napięcia powierzchniowego, spowalniając w ten sposób sam proces koalescencji. W rzeczywistości (25) przewiduje, że gdy dwie cząstki spotykają się, natychmiast tworzą końcową kulistą cząstkę o objętości równej sumie objętości obu cząstek. Gdy środek powierzchniowo czynny częściowo blokuje powierzchnię cząstek, akt koalescencji nie jest już natychmiastowy. W pracach Garabedian i Helble [224], [225], dwie łączące się krople przyjmują kształt opisany we współrzędnych biegunowych r, ϑ równaniem:

$$r^2(\vartheta) = D_{h,0}^2 \cdot b \cdot c(b) \cdot (1 - b \cdot \sin^2(\vartheta)) \quad (30)$$

gdzie b jest parametrem kształtu ($b \rightarrow 1$ oznacza dwie oddzielne stykające się sfery, $b = 0$ – jedną większą sferę), a $c(b)$ jest parametrem zapewniającym zachowanie objętości łączących się cząstek (więcej szczegółów w [224]). Grubość “szyjki” łączących się sfer jest uzyskiwana dla $\vartheta = \pi/2$ i jest równa:

$$L = D_{h,0} \sqrt{b \cdot c(b) \cdot (1 - b)} \quad (31)$$

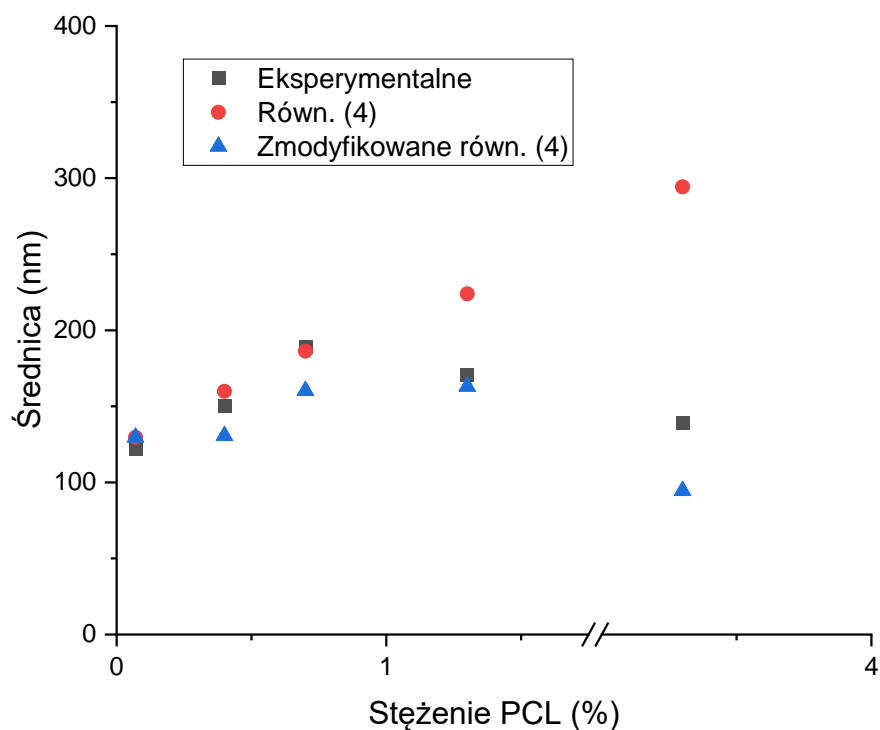
i zależy od bezwymiarowego czasu procesu [224]:

$$\frac{L}{D_{h,0}} = \min(1, 0.1436 * \ln \tau + 0.5347) \quad (32)$$

gdzie bezwymiarowy czas τ , będący miarą czasu pomiędzy dwoma kolejnymi zderzeniami, jest proporcjonalny do odwrotności częstotliwości zderzeń, która z kolei jest proporcjonalna do kwadratu stężenia PCL:

$$\tau \propto \frac{1}{f} \propto \frac{1}{c_{p0}^2} \quad (33)$$

Ostateczna średnica cząstek jest następnie obliczana na podstawie (28) i korygowana współczynnikiem (32). Wyniki przedstawiono na rys. 52.



Rysunek 52. Zależność średniej średnicy cząstek od stężenia PCL; wyniki numeryczne z i bez uwzględnienia niezerowego czasu koalescencji.

6.4.2. Wpływ stężenia surfaktantu

Aby przeanalizować układ z surfaktantem, równanie (25) powinno być spełnione ze współczynnikiem h , który oznacza stopień blokowania powierzchni przez surfaktant [223].

W ten sposób równanie przyjmie postać:

$$\frac{dD_h}{dt} = \frac{8}{3} \frac{k_B T}{\mu} \frac{c_{p0} D_{h,0}^3}{D_h^2} h \quad (34)$$

Współczynnik h zasadniczo zależy od stężenia cząsteczek środka powierzchniowo czynnego przyłączonych do powierzchni kropli. Oczywiście jest, że w przypadku braku surfaktantu – a także na początku procesu, gdy nie ma cząsteczek surfaktantu przyczepionych do powierzchni cząstek, jest równa zero - powinniśmy przyjąć $h = 1$. Dalej, gdy na powierzchni pojawiają się cząsteczki środka powierzchniowo czynnego, wartość

h maleje i ostatecznie osiąga 0, gdy cała powierzchnia jest zablokowana przez środek powierzchniowo czynny.

Dokładna postać zależności $h(c_{s,att})$, gdzie $c_{s,att}$ oznacza stężenie cząsteczek surfaktantu przyłączonych do powierzchni cząstek - nie jest znana [223]. Można jednak założyć, że współczynnik ten będzie proporcjonalny do ilorazu powierzchni cząstek pokrytych surfaktantem do całkowitej powierzchni cząstek. Całkowita powierzchnia cząstek jest dana równaniem:

$$A = c_p \cdot \frac{\pi D_h^2}{4} \quad (35)$$

gdzie c_p jest koncentracją liczbową cząstek; z prawa zachowania masy mamy $c_p = c_{p,0} \frac{D_{h,0}^3}{D_h^3}$.

Powierzchnia "zablokowana" przez środek powierzchniowo czynny może być wyrażona w postaci:

$$A_{block} = c_{s,att} \frac{\pi a^2}{4} \quad (36)$$

W powyższym wzorze, $c_{s,att}$ oznacza stężenie cząsteczek środka powierzchniowo czynnego przyłączonych do powierzchni cząstki, a a – równoważną średnicę cząsteczki środka powierzchniowo czynnego. W rzeczywistości może ona różnić się od rzeczywistej średnicy cząstki (i oczekuje się, że będzie większa niż rzeczywista średnica), ponieważ cząsteczki nie układają się na powierzchni cząstki w sposób zapewniający najściślejsze upakowanie.

Zatem wartość współczynnika h jest podana jako:

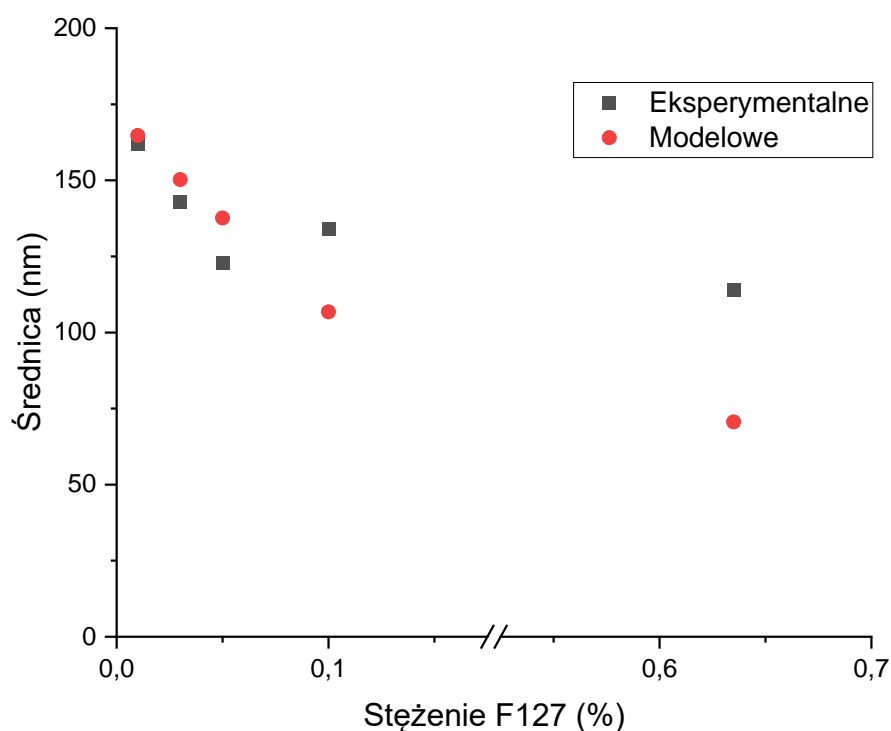
$$h = \begin{cases} 1 - \frac{A_{blok}}{A} & \text{for } A_{blok} < A \\ 0 & \text{w innym razie} \end{cases} \quad (37)$$

Równanie (33) należy również uzupełnić równaniem opisującym dyfuzję środka powierzchniowo czynnego do powierzchni cząstek. Równanie to ma postać:

$$\frac{dc_{s,att}}{dt} = \frac{2}{3} \frac{k_B T}{\mu} \frac{D_h}{D_s} (c_{s,0} - c_{s,att}) c_p h \quad (38)$$

W powyższym równaniu, D_s oznacza równoważną dyfuzji średnicę cząsteczki surfaktantu, która może – ale nie musi – być równa a , a $c_{s,0}$ – początkowe stężenie surfaktantu.

Równoległe rozwiązanie równań (34) i (38) z warunkami (35-37) daje wyniki przedstawione na rys. 53.

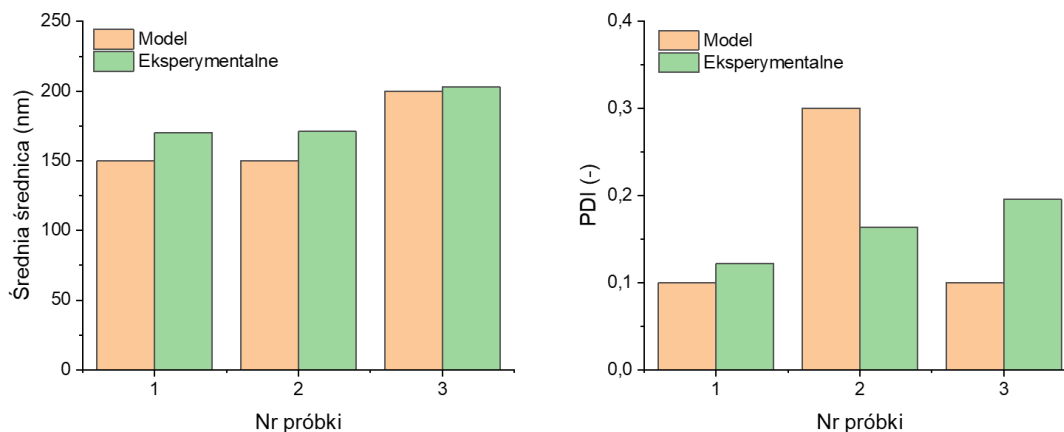


Rysunek 53. Zależność średniej średnicy NP od stężenia użytego surfaktantu.

Można zatem zauważyć, że wyniki numeryczne - podobnie jak eksperymentalne - przewidują spadek średnicy cząstek uzyskanych wraz ze wzrostem stężenia środka powierzchniowo czynnego. Jednak przewidywany numerycznie spadek jest większy niż obserwowany. Może to wynikać z różnych przyczyn, takich jak osadzanie się środka powierzchniowo czynnego na swobodnej powierzchni cieczy lub tworzenie się miceli, co obniża efektywne stężenie środka powierzchniowo czynnego.

6.5. Weryfikacja modelu

Aby zweryfikować poprawność modelu, przeprowadzono syntezę trzech różnych zawiesin PCL NP o określonych właściwościach metodą WNP, które następnie zmierzono za pomocą DLS. Wyniki przedstawiono na rysunku 54.



Rysunek 54. Porównanie wartości modelowych średniej średnicy oraz PDI z eksperymentalnymi dla 3 próbek.

Wyniki eksperymentalne potwierdziły skuteczność modelu w przewidywaniu parametrów procesowych, zwłaszcza biorąc pod uwagę średnicę otrzymanych NP. Ustalono akceptowalną różnicę 15-20% między wynikami eksperymentalnymi i modelowymi, z zachowaniem trendu (tj. średnica 3 większa niż 1, PDI 2 większa niż 1). Różnice w średnicy wahały się od 1,5% do 14%, podczas gdy różnice w PDI były znacznie większe i wynosiły od 22% do 96%. Tak duża różnica w wartości PDI może wynikać z faktu, że model nie uwzględnia w wystarczającym stopniu różnic w stężeniu cząstek w różnych częściach układu.

6.6. Dyskusja

Nanocząstki zostały utworzone przy użyciu metody nanoprecypitacji, z PCL jako materiałem rdzeniowym i F127 jako stabilizatorem. Do syntezy cząstek wykorzystano metodę jednorazowego wstrzyknięcia fazy organicznej do fazy wodnej. Dodanie EtOH do fazy organicznej ma tendencję do zwiększania średnicy cząstek i PDI, poprzez zmniejszenie efektu solubilizującego THF. Prawdopodobnie EtOH spowalnia proces precypitacji, dając zarodkom więcej czasu na wzrost, a tym samym zwiększając PDI i rozmiar.

Zwiększenie stężenia środka powierzchniowo czynnego powoduje zmniejszenie średnicy cząstek. Cząsteczki surfaktantu mają tendencję do wyrównywania się z powierzchnią kropli, co zmniejsza energię swobodną powierzchni styku faz i zapobiega koalescencji kropli [226]. Mniejsze nanokrople mają większą powierzchnię, więc do stabilizacji NP wymagana jest większa ilość środka powierzchniowo czynnego [227].

Zwiększenie stężenia polimeru przy jednoczesnym utrzymaniu stałej objętości fazy organicznej, powoduje wzrost lepkości tej fazy. Wyższa lepkość zwiększa siły oporu lepkościowego, które przeciwdziałają rozpadowi kropli w emulsji. W rezultacie powstają większe krople, co skutkuje większymi rozmiarami cząstek [228].

Model numeryczny oparty na równaniu dyfuzji przewiduje końcową średnicę cząstek, szczególnie przy niskich stężeniach PCL. Przy wyższych stężeniach należy wziąć pod uwagę niezerowy czas koalescencji, ponieważ cząstki powstające w tych warunkach są niesferyczne, a metody pomiarowe interpretują to jako zmniejszenie średnicy.

Co więcej, model numeryczny dla wpływu środka powierzchniowo czynnego prawidłowo opisuje trend zmniejszania się średnicy cząstek wraz z jego wzrostem stężenia, ale niedoszacowuje średnicę przy wysokich stężeniach środka powierzchniowo czynnego, potencjalnie ze względu na wpływ tworzenia się miceli.

Różnice między wartościami eksperymentalnymi a wynikami modelowania można przypisać kilku założeniom przyjętym podczas procesu walidacji, które mogą nie w pełni odzwierciedlać złożoność rzeczywistych warunków. Jednym z kluczowych założeń jest idealne mieszanie w roztworze, w którym stężenie cząstek PCL i innych składników, takich jak środki powierzchniowo czynne, jest uważane za jednolite w całym medium. Ta idealizacja pomija potencjalne lokalne zmiany stężenia, które mogą wpływać na tworzenie się i stabilność cząstek. Dodatkowo, model zakłada brak przestrzennej segregacji cząstek w oparciu o ich rozmiar, ignorując tym samym potencjalne wzorce dystrybucji zależne od rozmiaru, które mogą wystąpić podczas wzrostu i agregacji cząstek.

Kolejne założenie dotyczy czasu interakcji między cząstkami, który został ustalony na podstawie danych eksperymentalnych, ale w modelu pozostaje stały (uwzględniając jedynie zależność od średnic oddziałujących cząstek). W rzeczywistości na czas interakcji wpływają takie czynniki, jak szybkość suszenia, która może zmieniać się w trakcie procesu, prowadząc do odchyień od modelowych przewidywań. Ponadto model upraszcza dynamikę kolizji, zakładając, że jednocześnie zderzają się tylko dwie cząstki. To przybliżenie nie odzwierciedla w pełni złożoności interakcji wielocząsteczkowych, które mogą wystąpić, zwłaszcza w układach o wysokim stężeniu cząstek. Tego rodzaju interakcje mogą być przyczyną rozbieżności w wartościach indeksu polidispersyjności. Niemniej jednak warto zauważyć, że założenie to nie ma znaczącego wpływu na średnią średnicę cząstek.

7. Podsumowanie

W ramach rozprawy doktorskiej opracowano biogodne nanocząstki polikaprolaktonowe metodą nanoprecypitacji zdolne do transportu enkapsulowanych substancji, służące jako potencjalne systemy dostarczania leków lub systemy diagnostyczne. Badania skupiały się na analizie kluczowych parametrów procesowych wpływających na właściwości wytwarzanych NP, takich jak rozmiar, PDI oraz stabilność koloidalna.

Jednym z istotnych etapów pracy był wybór odpowiedniego polimeru oraz jego stężenia. Wykazano, że stężenie PCL wynoszące 1% wag./obj. umożliwia wytworzenie NP o małych rozmiarach (ok. 120 nm) i wąskim rozkładzie wielkości ($PDI < 0,1$). Dla porównania, wyższe stężenia polimeru prowadziły do zwiększenia rozmiaru NP oraz wzrostu wartości PDI, co wskazuje na trudności w utrzymaniu jednorodności koloidalnej przy tych warunkach. Dodatkowo przeanalizowano wpływ stosunku przepływu faz (R), który okazał się kluczowym parametrem. Stosunek $R=200$ zapewnił odpowiednie warunki do formowania cząstek o jednolitym rozkładzie wielkości zarówno w przypadku PCL, jak i PLGA. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem układu mikroprzepływowego potwierdziły skuteczność zastosowania tego stosunku faz w procesach nanoprecypitacji, niezależnie od stężenia użytego polimeru.

Dobór rozpuszczalnika okazał się istotnym aspektem procesu nanoprecypitacji. Wykorzystanie THF jako jedyne go rozpuszczalnika w fazie organicznej pozwoliło uzyskać bardziej jednorodne zawiesiny NP w porównaniu z układami opartymi na parach rozpuszczalników, takich jak DCM/DMSO. THF, jako rozpuszczalnik dobrze mieszalny z wodą, zapewnił warunki sprzyjające efektywnemu mieszaniu faz i formowaniu cząstek o kontrolowanych właściwościach. Dodatkowo, zastosowanie EtOH jako współrozpuszczalnika zwiększyło efektywność interakcji między fazą organiczną a wodną, co prowadziło do jeszcze bardziej jednorodnego formowania NP podczas procesu nanoprecypitacji. Wprowadzenie NaOH do fazy organicznej znacząco poprawiło proces formowania NP, zwiększając ich stabilność koloidalną i kontrolując napięcie międzyfazowe, co wpłynęło na jakość końcowego produktu.

Kolejnym kluczowym elementem było zastosowanie surfaktantów do stabilizacji zawiesin NP. Analiza różnych stężeń surfaktantu wykazała, że Pluronic@F-127 w stężeniu 0,5% wag./obj. skutecznie zapewnia stabilność zawiesin oraz ogranicza agregację cząstek, co jest szczególnie istotne w przypadku nanoprecypitacji. Dodatkowo, wprowadzenie modyfikacji polegającej na dodawaniu surfaktantu po procesie odparowania rozpuszczalnika

znacznie skróciło czas wytwarzania i oczyszczania NP. Eksperymenty wykazały, że taka zmiana nie wpływa negatywnie na jakość uzyskiwanych cząstek, zapewniając porównywalne właściwości stabilizacyjne oraz parametry fizykochemiczne.

W pracy zbadano również możliwość enkapsulacji SPIONów w PCL NP. Wyniki pokazały, że zastosowanie SPIONów pokrytych kwasem oleinowym (OA-SP) sprzyja zamknięciu nanocząstek tlenku żelaza w NP polimerowych, co pozwala na uzyskanie hybrydowych systemów o właściwościach magnetycznych. Badania wykazały jednak, że w zawiesinach nadal mogą występować niezwiązane SPIONy, co sugeruje potrzebę dalszych prac nad kontrolą procesu enkapsulacji. Specjalnie zaprojektowany układ mikroprzepływowy z magnezem neodymowym umożliwił skuteczną separację magnetycznych NP, co znacznie usprawniło proces oczyszczania, eliminując konieczność stosowania czasochłonnych metod, takich jak dializa czy wirowanie. Uzyskane hybrydowe systemy PCL- SP NP wykazywały właściwości magnetyczne oraz możliwość dalszego dostosowania ich parametrów w zależności od zastosowania.

Dodatkowym elementem pracy było opracowanie modelu numerycznego procesu nanoprecypitacji, opartego na równaniach dyfuzji i koalescencji. Model ten pozwala na przewidywanie parametrów procesowych niezbędnych do syntezy NP o określonych właściwościach, takich jak rozmiar i PDI. Wdrożenie tego podejścia w praktyce pozwala na bardziej precyzyjne projektowanie procesów oraz przeniesienie technologii z poziomu laboratoryjnego do skali przemysłowej.

Przeprowadzone badania dostarczyły kompleksowych informacji na temat parametrów procesowych, które mają kluczowe znaczenie dla syntezy NP o stabilnych właściwościach. Opracowane strategie projektowania, wytwarzania, oczyszczania NP polikaprolaktonowych, w tym hybrydowych PCL-SP NP, otwierają nowe możliwości zastosowań w biomedycynie, takich jak celowane dostarczanie leków, obrazowanie medyczne czy terapie wykorzystujące właściwości magnetyczne.

Materiały i sprzęt

Materiały do syntezy polimerowych NP:

- kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA) (Purasorb)
- polikaprolakton (PCL, o masie cząsteczkowej 14000 g/mol) (Sigma Aldrich/Merck)
- dichlorometan (DCM) (Sigma Aldrich/Merck)
- dimetylosulfotlenek (DMSO) (Sigma Aldrich/Merck)
- Pluronic® F-127 (F127) (Sigma Aldrich/Merck)
- Tween® 80 (T80) (Sigma Aldrich/Merck)
- fluoresceina (Sigma Aldrich/Merck)
- bufor fosforanowy (PBS) (Sigma Aldrich/Merck)
- toluen (Chempur)
- octan etylu (Chempur)
- aceton (Chempur)
- alkohol etylowy (96%) (EtOH) (Stanlab)
- wodorotlenek sodu (NaOH) (Stanlab)
- dihydrat trehalozy (T) (PolAura)

Materiały do hodowli i testów komórkowych:

- medium hodowlane (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium) z i bez czerwieni fenolowej (Thermo Fisher Scientific)
- płodowa surowica bydlęca (FBS, ang. fetal bovine serum) (Thermo Fisher Scientific)
- L-glutamina (Thermo Fisher Scientific)
- mieszanina antybiotyków penicylina-streptomycyna (Pen-Strep, 10000 jednostek/ml penicyliny, 10 mg/ml streptomycyny, klasa do hodowli komórkowych) (Thermo Fisher Scientific)
- roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanami, niezawierająca jonów magnezu (Mg^{2+}) i wapnia (Ca^{2+}) (DPBS) (Thermo Fisher Scientific)
- roztwór trypsyny-EDTA 0,25% z dodatkiem czerwieni fenolowej (Thermo Fisher Scientific)
- roztwór błękitu trypanu 0,4% (Thermo Fisher Scientific)
- bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu (MTT) (Sigma-Aldrich/Merck)
- dimetylosulfotlenek (DMSO) (Sigma-Aldrich/Merck)

- paraformaldehyd (PFA), 4% w PBS (AlfaAesar)
- bufor fosforanowy (PBS) (tabletki) (MP Biochemicals)
- surowicza albumina wołowa (BSA) (Sigma Aldrich/Merck)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich/Merck)
- 4',6-diamidyno-fenylindol (DAPI) (Thermo Fisher Scientific)
- szkiełka nakrywkowe (okrągłe, 12 mm) (Bionovo)

Materiały do syntezy SPIONów:

- uwodniony siarczan żelaza ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Sigma Aldrich/Merck)
- uwodniony chlorek żelaza ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Acros organics)
- woda amoniakalna 25% (Chempur)
- kwas oleinowy zakupiono od (Chempur)
- alkohol etylowy (96%) (EtOH) (Stanlab)

Sprzęt:

- pompy strzykawkowe (KD Scientific i Ascor AP-14)
- spektrofotometr UV-Vis (BMG, Labtechnologies)
- mieszadło magnetyczne (IKA)
- mieszadło mechaniczne (heidolph)
- myjka ultradźwiękowa (SONO SWISS SW 3H)
- myjka ultradźwiękowa (SONOSWISS SW 1H)
- wyparka obrotowa (heidolph)
- DLS (Malvern, Zetasizer Nano ZS)
- Nicolet 6700 FTIR (ThermoFisher Scientific)
- skaningowy mikroskop elektronowy (SEM, SU8230, Hitachi, Chiyoda)
- skaningowy mikroskop konfokalny (Zeiss)
- drukarka 3D ZMorph VX (ZMorph)

Spis rysunków

Rysunek 1. Wzór strukturalny PCL.....	34
Rysunek 2. Wzór strukturalny T80.....	38
Rysunek 3. Wzór strukturalny F127.....	38
Rysunek 4. Zasada pomiarów metodą DLS.	42
Rysunek 5. Schematyczne przedstawienie różnic pomiędzy rozpraszaniem Rayleigh'a i Mie.	43
Rysunek 6. Schemat przedstawiający podwójną warstwę elektryczną otaczającą cząstkę w ośrodku wodnym oraz położenie płaszczyzny poślizgu. Potencjał zeta to potencjał elektryczny w płaszczyźnie poślizgu.	45
Rysunek 7. Schemat enkapsulacji substancji aktywnych w NP.	49
Rysunek 8. Schemat metod łączenia faz do otrzymywania PCL NP metodą nanoprecypitacji.	56
Rysunek 9. Aparatura do nanoprecypitacji metodą dozowania fazy organicznej kroplami (1 - pompa strzykawkowa z fazą organiczną, 2 - wężyk z PTFE doprowadzający fazę organiczną do wodnej, 3 - zlewka z fazą wodną w łaźni wodnej na mieszadle magnetycznym.....	57
Rysunek 10. Schemat układu mikroprzepływowego składającego się z 4 igieł (3 wloty, 1 wylot) umieszczonych pomiędzy 2 szkiełkami nakrywkowymi. Wloty A i niebieskie strzałki odnoszą się do fazy wodnej, a wlot B i strzałka czerwona do fazy organicznej, wylot z układu oznaczony jest czarną strzałką.	58
Rysunek 11. (A) Schemat urządzenia mikroprzepływowego oraz zdjęcie prezentujące wytworzony układ. (B) Proponowany mechanizm otrzymywania NP. Utworzono przy użyciu BioRender.com.	59
Rysunek 12. Wzór strukturalny fluoresceiny.	64
Rysunek 13. (A) Układ do nanoprecypitacji PCL NP ze SPIONami, z mieszaniem mechanicznym na myjce ultradźwiękowej. (B) Zawiesina PCL NP (SP20) po nanoprecypitacji i odparowaniu rozpuszczalnika organicznego.....	70
Rysunek 14. Układ przepływowy z miejscem na magnes neodymowy do szybkiej separacji PCL-SP NP.	71
Rysunek 15. Układ do separacji PCL-SP NP na układzie przepływowym z magnesem neodymowym.	72
Rysunek 16. Schemat testowanych parametrów procesowych.	73

Rysunek 17. Średnia średnica i PDI cząstek otrzymanych metodą mikroprzepływową przy różnych wartościach R dla PLGA (A) i PCL (B) (stężenie polimeru 1% = 10 mg/ml). Brak różnic istotnych statystycznie.....	73
Rysunek 18. Zależność średniej średnicy i PDI od stężenia użytego polimeru dla PLGA (A) i PCL (B). Brak różnic istotnych statystycznie.	74
Rysunek 19. NP wytworzone przy wykorzystaniu prostego układu mikroprzepływowego, R=200, 0,1% PCL, DCM/DMSO. (A) skala 1 μ m, (B) skala 500 nm.....	74
Rysunek 20. Schemat testowanych parametrów i analizowanych rozpuszczalników.	75
Rysunek 21. Procent intensywności sygnału w zależności od rozmiaru NP dla użytych rozpuszczalników.	76
Rysunek 22. NP wytworzone przy wykorzystaniu układu mikroprzepływowego, R=200, 5% PCL, THF, skala 500 nm.	77
Rysunek 23. Schemat badanych stężeń PCL i surfaktantu.....	78
Rysunek 24. Zależność średniej średnicy i PDI dla preparatów bez i z użyciem 2 surfaktantów, T80 i F127.	78
Rysunek 25. NP otrzymane z wykorzystaniem układu mikroprzepływowego, R=200. 5% PCL i T80 (A) i F127 (B). Skala 2 μ m.	79
Rysunek 26. Schemat testowanych parametrów (stężenie PCL, metoda łączenia faz).....	81
Rysunek 27. Rozkład rozmiarów NP dla próbek otrzymanych metodą jednorazowego wstrzyknięcia (WNP), mikroprzepływową (MNP) i dozowania kroplami fazy organicznej do wodnej (DNP). Procent intensywności sygnału w zależności od rozmiaru cząstek. 0,1, 0,5, 1, 2, 5% - stężenie użytego PCL.	82
Rysunek 28. Porównanie wpływu metody odparowania rozpuszczalnika na rozmiar (A) i PDI (B) NP dla 3 analizowanych metod łączenia faz. *p < 0,05.....	83
Rysunek 29. Średnia średnica (A) i PDI (B) NP przed i po dodaniu surfaktantu. *p < 0,05. ...	84
Rysunek 30. Zmiany w średniej średnicy oraz PDI po każdym z etapów oczyszczania. Zateżnianie prowadzono na wyparce obrotowej. 1% PCL, 0,5% F127.	85
Rysunek 31. Schemat badanych parametrów (stosunek objętościowy THF/EtOH).....	86
Rysunek 32. NP otrzymane z dodatkiem EtOH i 0,1M NaOH metodą DNP (A), MNP (B), WNP (C). Bez surfaktantu. Skala 1 μ m.	87
Rysunek 33. Schemat testowanych parametrów (stężenie PCL, temperatura fazy wodnej)....	88
Rysunek 34. Wyniki DLS dla WNP (1% PCL) otrzymanych przy różnych temperaturach fazy wodnej przed i po dodaniu F127. * p < 0,05.....	88

Rysunek 35. Wyniki DLS dla WNP otrzymanych z wykorzystaniem różnych stężeń PCL przy temperaturze wody 20°C i 80°C przed i po dodaniu F127.	89
Rysunek 36. Schemat badanych stężeń krioprotektantu, surfaktantu oraz badane temperatury zamrażania zawiesin NP.	90
Rysunek 37. (A) DNP i (B) MNP zawierające barwnik. Oba warianty przygotowane w obecności 0,5% wag./obj. F127. Powiększone zdjęcia przedstawiają najmniejsze NP z analizowanych próbek. Skala na powiększonych zdjęciach to 1 µm.	94
Rysunek 38. Widmo FTIR czystej fluoresceiny (A), 1,0% PCL MNP z (B) i bez (C) fluoresceiny.	95
Rysunek 39. Zależność pomiędzy intensywnością fluorescencji a rosnącym stężeniem DNP i MNP zawierających fluoresceinę.	96
Rysunek 40. Skumulowane profile uwalniania fluoresceiny z 1% PCL DNP i MNP z trzech niezależnych pomiarów. Próbki mierzono po 0, 1, 2, 3, 4 i 24 godz. Dane przedstawiono jako średnie ± SD.	97
Rysunek 41. Wydajność enkapsulacji (EE%) barwnika oraz % załadowania (DL%) barwnikiem dla 1% PCL DNP i MNP.	98
Rysunek 42. Ocena cytotoksyczności 1,0% MNP PCL w dwóch różnych liniach komórkowych, komórkach kostniakomięsaka MG63 i linii komórkowej fibroblastów mysich L929. Wartości reprezentują średnie ± SD (n = 6).	99
Rysunek 43. Ocena cytotoksyczności 1,0% WNP PCL z i bez F127 z wykorzystaniem komórek linii komórkowej L929. Wartości reprezentują średnie ± SD (n = 6).	100
Rysunek 44. Obrazy z mikroskopu konfokalnego komórek L929 i MG63 po 1, 2 i 24 godz. inkubacji w temperaturze 37°C z MNP PCL o średnicy 120 nm (stężenie NP 1 mg/ml). Fluoresceina (po lewej), DAPI (w środku), razem (po prawej). Powiększenie 20x, 1% PCL.	101
Rysunek 45. Otrzymane NP tlenku żelaza. (A) OA-SPIONy zawieszony w acetonie. (B) Wysuszone SPIONy.	102
Rysunek 46. Obrazy SEM przedstawiające otrzymane NP tlenku żelaza (A) pokryte kwasem oleinowym (OA-SP) oraz (B) bez pokrycia (SP).	103
Rysunek 47. Widmo FTIR PCL NP zawierających różne stężenia OA-SPIONów (B-D). (A) widmo samych PCL NP, (E) widmo dla samych OA-SPIONów.	104
Rysunek 48. Cząstka PCL-SP NP zawierająca NP tlenku żelaza (SP20).	105
Rysunek 49. PCL-SP NP zatrzymane w układzie z wykorzystaniem magnezu neodymowego.	106

Rysunek 50. PCL-SP NP po oczyszczeniu na magneście neodymowym.	107
Rysunek 51. Porównanie wpływu stężenia PCL na średnicę hydrodynamiczną NP PCL otrzymanych eksperymentalnie i za pomocą modelu.....	116
Rysunek 52. Zależność średniej średnicy cząstek od stężenia PCL; wyniki numeryczne z i bez uwzględnienia niezerowego czasu koalescencji.....	118
Rysunek 53. Zależność średniej średnicy NP od stężenia użytego surfaktantu.	120
Rysunek 54. Porównanie wartości modelowych średniej średnicy oraz PDI z eksperymentalnymi dla 3 próbek.	121

Spis tabel

Tabela 1. Badane stężenia SPIONów w PCL NP.	69
Tabela 2. Pary rozpuszczalników wykorzystywane w pracy.....	75
Tabela 3. Średnia średnica i PDI dla NP otrzymanych dla różnych stężeń PCL z wykorzystaniem różnych stężeń F127.	80
Tabela 4. Zestawienie wybranych odczynników do otrzymywania PCL NP.....	81
Tabela 5. Rozmiar i PDI wybranych WNP otrzymanych z dodatkiem EtOH w stosunku w stosunku 1:1 i 1:2 (THF/EtOH). Zawiesiny NP otrzymane bez dodatku surfaktantu.....	86
Tabela 6. Rozmiar i PDI wybranych WNP (1% PCL) otrzymanych z dodatkiem EtOH w stosunku 2:1 (THF/EtOH). Zawiesiny otrzymane bez dodatku surfaktantu.	87
Tabela 7. Wartości średniej średnicy NP liofilizowanych przed i po każdym z 3 cykli liofilizacji z dodatkiem różnych stężeń F127 i T, w różnych temperaturach zamrażania (temp. z.) NP. ..	90
Tabela 8. Wartości PDI NP liofilizowanych przed i po każdym z 3 cykli liofilizacji z dodatkiem różnych stężeń F127 i T, w różnych temperaturach zamrażania (temp. z.) NP.....	91
Tabela 9. Wartości średniej średnicy NP liofilizowanych przed i po każdym z 3 cykli liofilizacji z dodatkiem różnych stężeń F127 i T.	92
Tabela 10. Wartości PDI NP liofilizowanych przed i po każdym z 3 cykli liofilizacji z dodatkiem różnych stężeń F127 i T.....	92
Tabela 11. Średnia średnica i PDI NP bez dodatku fluoresceiny.	93
Tabela 12. Średnia średnica i PDI NP z fluoresceiną.	93
Tabela 13. Wariant NP wykorzystane do testów MTT (rys. 42 i 43).	99
Tabela 14. Parametry stałe i dopasowane dla modelu wzrostu cząstek.	116

Bibliografia

- [1] A. Luísa Pécurto Cartaxo, “Optimization of the size of biodegradable polymeric nanoparticles as intracellular drug delivery devices,” no. June, 2015.
- [2] U. Bairagi, P. Mittal, J. Singh, and B. Mishra, “Preparation, characterization, and in vivo evaluation of nano formulations of ferulic acid in diabetic wound healing,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 44, no. 11, pp. 1783–1796, 2018.
- [3] H. Fessi, F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury, and S. Benita, “Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement,” *Int. J. Pharm.*, vol. 55, no. 1, pp. 1–4, 1989.
- [4] R. Karnik *et al.*, “Microfluidic platform for controlled synthesis of polymeric nanoparticles,” *Nano Lett.*, vol. 8, no. 9, pp. 2906–2912, 2008.
- [5] M. Tarhini *et al.*, “Protein-based nanoparticle preparation via nanoprecipitation method,” *Materials (Basel)*, vol. 11, no. 3, pp. 1–18, 2018.
- [6] A. Hamberger, U. Ziener, and K. Landfester, “Encapsulation of in situ nanoprecipitated inorganic materials in confined geometries into a polymer shell using inverse miniemulsion,” *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 214, no. 6, pp. 691–699, 2013.
- [7] P. Ahlin Grabnar and J. Kristl, “The manufacturing techniques of drug-loaded polymeric nanoparticles from preformed polymers,” *J. Microencapsul.*, vol. 28, no. 4, pp. 323–335, 2011.
- [8] C. Pinto Reis, R. J. Neufeld, A. J. Ribeiro, and F. Veiga, “Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 2, no. 1, pp. 8–21, 2006.
- [9] D. Douroumis and A. Fahr, “Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs,” *Drug Deliv. Strateg. Poorly Water-Soluble Drugs*, pp. 403–416, 2013.
- [10] T. T. D. Tran, P. H. L. Tran, J. Lim, J. B. Park, S. K. Choi, and B. J. Lee, “Physicochemical principles of controlled release solid dispersion containing a poorly water-soluble drug,” *Ther. Deliv.*, vol. 1, no. 1, pp. 51–62, 2010.
- [11] M. Li, H. Tang, Y. Xiong, Z. Yuan, L. He, and L. Han, “Pluronic F127 coating performance on PLGA nanoparticles: Enhanced flocculation and instability,” *Colloids*

- Surfaces B Biointerfaces*, vol. 226, no. April, p. 113328, 2023.
- [12] R. K. Jain, "Transport of molecules, particles, and cells in solid tumors," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, no. 1, pp. 241–263, 1999.
- [13] S. M. Moghimi, A. C. Hunter, and J. C. Murray, "Nanomedicine: current status and future prospects," *FASEB J.*, vol. 19, no. 3, pp. 311–330, 2005.
- [14] K. M. Pustulka *et al.*, "Flash nanoprecipitation: Particle structure and stability," *Mol. Pharm.*, vol. 10, no. 11, pp. 4367–4377, 2013.
- [15] K. Miladi, D. Ibraheem, M. Iqbal, S. Sfar, H. Fessi, and A. Elaissari, "Particles from preformed polymers as carriers for drug delivery," *EXCLI J.*, vol. 13, pp. 28–57, 2014.
- [16] I. J. Joye and D. J. McClements, "Production of nanoparticles by anti-solvent precipitation for use in food systems," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 34, no. 2, pp. 109–123, 2013.
- [17] B. K. Johnson and R. K. Prud'homme, "Flash NanoPrecipitation of Organic Actives and Block Copolymers using a Confined Impinging Jets Mixer," *Aust. J. Chem.*, vol. 56, no. 10, pp. 1021–1024, 2003.
- [18] S. I. Hamdallah *et al.*, "Microfluidics for pharmaceutical nanoparticle fabrication: The truth and the myth," *Int. J. Pharm.*, vol. 584, no. January, 2020.
- [19] J. Tao, S. F. Chow, and Y. Zheng, "Application of flash nanoprecipitation to fabricate poorly water-soluble drug nanoparticles," *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 9, no. 1, pp. 4–18, 2019.
- [20] S. M. D'Addio and R. K. Prud'homme, "Controlling drug nanoparticle formation by rapid precipitation," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 6, pp. 417–426, 2011.
- [21] C. J. Martínez Rivas *et al.*, "Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 532, no. 1, pp. 66–81, 2017.
- [22] N. A. Mugheirbi, K. J. Paluch, and L. Tajber, "Heat induced evaporative antisolvent nanoprecipitation (HIEAN) of itraconazole," *Int. J. Pharm.*, vol. 471, no. 1–2, pp. 400–411, 2014.
- [23] S. Salatin, J. Barar, M. Barzegar-Jalali, K. Adibkia, F. Kiafar, and M. Jelvehgari, "Development of a nanoprecipitation method for the entrapment of a very water soluble

- drug into Eudragit RL nanoparticles,” *Res. Pharm. Sci.*, vol. 12, no. 1, p. 1, 2017.
- [24] T. Pulingam, P. Foroozandeh, J. A. Chuah, and K. Sudesh, “Exploring Various Techniques for the Chemical and Biological Synthesis of Polymeric Nanoparticles,” *Nanomaterials*, vol. 12, no. 3, 2022.
- [25] W. Huang and C. Zhang, “Tuning the size of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles fabricated by nanoprecipitation,” pp. 1–25, 2017.
- [26] F. Madani, S. S. Esnaashari, B. Mujokoro, F. Dorkoosh, M. Khosravani, and M. Adabi, “Investigation of effective parameters on size of paclitaxel loaded PLGA nanoparticles,” *Adv. Pharm. Bull.*, vol. 8, no. 1, pp. 77–84, 2018.
- [27] S. K. Pandey, D. K. Patel, R. Thakur, D. P. Mishra, P. Maiti, and C. Haldar, “Anti-cancer evaluation of quercetin embedded PLA nanoparticles synthesized by emulsified nanoprecipitation,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 75, pp. 521–529, 2015.
- [28] P. R. Vuddanda, A. Mishra, S. K. Singh, and S. Singh, “Development of polymeric nanoparticles with highly entrapped herbal hydrophilic drug using nanoprecipitation technique: An approach of quality by design,” *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 20, no. 5, pp. 579–587, 2015.
- [29] A. Kara, “Investigation of Formulation Parameters of PLGA Nanoparticles Prepared By Nanoprecipitation Technique,” *Czech Repub.*, no. 94, pp. 4–6, 2014.
- [30] D. Horn and J. Rieger, “Organic nanoparticles in the aqueous phase - Theory, experiment, and use,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 40, no. 23, pp. 4330–4361, 2001.
- [31] F. Lince, D. L. Marchisio, and A. A. Barresi, “Strategies to control the particle size distribution of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 322, no. 2, pp. 505–515, 2008.
- [32] J. Aubry, F. Ganachaud, J. P. C. Addad, and B. Cabane, “Nanoprecipitation of polymethylmethacrylate by solvent shifting: 1. Boundaries,” *Langmuir*, vol. 25, no. 4, pp. 1970–1979, 2009.
- [33] J. Cheng *et al.*, “Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 5, pp. 869–876, 2007.
- [34] B. K. Johnson and R. K. Prud’homme, “Chemical processing and micromixing in

- confined impinging jets,” *AIChE J.*, vol. 49, no. 9, pp. 2264–2282, 2003.
- [35] M. O. Jara, J. Catalan-Figueroa, M. Landin, and J. O. Morales, “Finding key nanoprecipitation variables for achieving uniform polymeric nanoparticles using neurofuzzy logic technology,” *Drug Deliv. Transl. Res.*, vol. 8, no. 6, pp. 1797–1806, 2018.
- [36] E. Lepeltier, C. Bourgaux, and P. Couvreur, “Nanoprecipitation and the ‘Ouzo effect’: Application to drug delivery devices,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 71, pp. 86–97, 2014.
- [37] E. Galindo-Rodríguez, Sergio; Alleman, Eric; Fessi, Hatem; Doelker, “Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods,” *Pharm. Res.*, no. October 2004, 2004.
- [38] A. M. de Oliveira, E. Jäger, A. Jäger, P. Stepánek, and F. C. Giacomelli, “Physicochemical aspects behind the size of biodegradable polymeric nanoparticles: A step forward,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 436, pp. 1092–1102, 2013.
- [39] U. Bilati, E. Allémann, and E. Doelker, “Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 24, no. 1, pp. 67–75, Jan. 2005.
- [40] S. Ding, N. Anton, T. F. Vandamme, and C. A. Serra, “Microfluidic nanoprecipitation systems for preparing pure drug or polymeric drug loaded nanoparticles: an overview,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 13, no. 10, pp. 1447–1460, 2016.
- [41] A. Combes, C. Rieb, L. Haye, A. S. Klymchenko, C. A. Serra, and A. Reisch, “Mixing versus Polymer Chemistry in the Synthesis of Loaded Polymer Nanoparticles through Nanoprecipitation,” *Langmuir*, vol. 39, no. 46, pp. 16532–16542, 2023.
- [42] Marek Henczka, “Inżynieria produktu farmaceutycznego,” 2011.
- [43] Y. Liu, C. Cheng, Y. Liu, R. K. Prud’homme, and R. O. Fox, “Mixing in a multi-inlet vortex mixer (MIVM) for flash nano-precipitation,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 63, no. 11, pp. 2829–2842, 2008.
- [44] N. Li, A. Nikoubashman, and A. Z. Panagiotopoulos, “Multi-scale simulations of polymeric nanoparticle aggregation during rapid solvent exchange,” *J. Chem. Phys.*, vol. 149, no. 8, 2018.

- [45] A. Nikoubashman, V. E. Lee, C. Sosa, R. K. Prud'homme, R. D. Priestley, and A. Z. Panagiotopoulos, "Directed assembly of soft colloids through rapid solvent exchange," *ACS Nano*, vol. 10, no. 1, pp. 1425–1433, 2016.
- [46] J. C. Cheng, R. D. Vigil, and R. O. Fox, "A competitive aggregation model for Flash NanoPrecipitation," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 351, no. 2, pp. 330–342, 2010.
- [47] A. M. Gañán-Calvo and J. M. Gordillo, "Perfectly monodisperse microbubbling by capillary flow focusing," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 87, no. 27 I, pp. 2745011–2745014, 2001.
- [48] J. P. Martins, G. Torrieri, and H. A. Santos, "The importance of microfluidics for the preparation of nanoparticles as advanced drug delivery systems," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 15, no. 5, pp. 469–479, 2018.
- [49] R. Othman, G. T. Vladislavljević, and Z. K. Nagy, "Preparation of biodegradable polymeric nanoparticles for pharmaceutical applications using glass capillary microfluidics," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 137, pp. 119–130, 2015.
- [50] S. Soleimani, M. M. Hasani-Sadrabadi, F. S. Majedi, E. Dashtimoghadam, M. Tondar, and K. I. Jacob, "Understanding biophysical behaviours of microfluidic-synthesized nanoparticles at nano-biointerface," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 145, pp. 802–811, 2016.
- [51] M. Michelon, D. R. B. Oliveira, G. de Figueiredo Furtado, L. Gaziola de la Torre, and R. L. Cunha, "High-throughput continuous production of liposomes using hydrodynamic flow-focusing microfluidic devices," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 156, pp. 349–357, 2017.
- [52] A. S. Lari, A. Khatibi, P. Zahedi, and H. Ghourchian, "Microfluidic-assisted production of poly(ϵ -caprolactone) and cellulose acetate nanoparticles: effects of polymers, surfactants, and flow rate ratios," *Polym. Bull.*, vol. 78, no. 10, pp. 5449–5466, 2021.
- [53] Y. Liu, G. Yang, Y. Hui, S. Ranaweera, and C. X. Zhao, "Microfluidic Nanoparticles for Drug Delivery," *Small*, vol. 18, no. 36, pp. 1–33, 2022.
- [54] M. J. Ansari, "Factors Affecting Preparation and Properties of Nanoparticles by Nanoprecipitation Method, Indo Am," *Indo Am. J. P. Sci.*, vol. 4, no. 12, pp. 4854–4858, 2017.
- [55] J. Zhuang, R. H. Fang, and L. Zhang, "Preparation of Particulate Polymeric Therapeutics

- for Medical Applications,” *Small Methods*, vol. 1, no. 9, pp. 1–16, 2017.
- [56] G. S. Jiao, H. J. Qian, and Z. Y. Lu, “Temperature induced transition from acceleration to deceleration of the diffusion of polymers by soft nanoparticles in their composite,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 677, pp. 152–155, 2017.
- [57] J. Zhou, R. Ni, and Y. Chau, “Polymeric vesicle formation via temperature-assisted nanoprecipitation,” *RSC Adv.*, vol. 7, no. 29, pp. 17997–18000, 2017.
- [58] J. Y. Zhang *et al.*, “Preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles by controlled nanoprecipitation method without surfactants,” *Int. J. Pharm.*, vol. 323, no. 1–2, pp. 153–160, 2006.
- [59] B. L. Cushing, V. L. Kolesnichenko, and C. J. O’Connor, “Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles,” *Chem. Rev.*, vol. 104, no. 9, pp. 3893–3946, 2004.
- [60] V. Känkänen *et al.*, “Evaluation of the effects of nanoprecipitation process parameters on the size and morphology of poly(ethylene oxide)-block-polycaprolactone nanostructures,” *Int. J. Pharm.*, vol. 590, p. 119900, 2020.
- [61] K. Miladi, S. Sfar, H. Fessi, and A. Elaissari, *Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications*. 2016.
- [62] V. Kumar and R. K. Prud’homme, “Nanoparticle stability: Processing pathways for solvent removal,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 64, no. 6, pp. 1358–1361, 2009.
- [63] S. Bohrey, V. Chourasiya, and A. Pandey, “Polymeric nanoparticles containing diazepam: Preparation, optimization, characterization, in-vitro drug release and release kinetic study,” *Nano Converg.*, vol. 3, no. 1, pp. 3–9, 2016.
- [64] E. Piacentini, T. Poerio, F. Bazzarelli, and L. Giorno, “Continuous production of PVA-based hydrogel nanoparticles by membrane nanoprecipitation,” *J. Memb. Sci.*, vol. 637, no. July, p. 119649, 2021.
- [65] H. Zhao, J. X. Wang, Q. A. Wang, J. F. Chen, and J. Yun, “Controlled liquid antisolvent precipitation of hydrophobic pharmaceutical nanoparticles in a MicroChannel reactor,” *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 46, no. 24, pp. 8229–8235, 2007.
- [66] V. Génot *et al.*, “Synthesis of organic nanoparticles in a 3D flow focusing microreactor,”

- Chem. Eng. J.*, vol. 161, no. 1–2, pp. 234–239, 2010.
- [67] Y. Liu and X. Jiang, “Why microfluidics? Merits and trends in chemical synthesis,” *Lab Chip*, vol. 17, no. 23, pp. 3960–3978, 2017.
- [68] M. Bramosanti, L. Chronopoulou, F. Grillo, A. Valletta, and C. Palocci, “Microfluidic-assisted nanoprecipitation of antiviral-loaded polymeric nanoparticles,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 532, no. April, pp. 369–376, 2017.
- [69] A. G. Niculescu, C. Chircov, A. C. Bîrcă, and A. M. Grumezescu, “Nanomaterials synthesis through microfluidic methods: An updated overview,” *Nanomaterials*, vol. 11, no. 4, 2021.
- [70] W. Li *et al.*, “Insight into drug encapsulation in polymeric nanoparticles using microfluidic nanoprecipitation,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 235, p. 116468, 2021.
- [71] F. Heshmatnezhad, A. R. Solaimany Nazar, H. Aghaei, and J. Varshosaz, “Production of doxorubicin-loaded PCL nanoparticles through a flow-focusing microfluidic device: Encapsulation efficacy and drug release,” *Soft Matter*, vol. 17, no. 47, pp. 10675–10682, 2021.
- [72] H. Vladisavljevic, Goran T, Shahmohamadi, D. B. Das, and E. E. Ekanem, “Glass capillary microfluidics for production of monodispersed poly (DL -lactic acid) and polycaprolactone microparticles : Experiments and numerical simulations,” *ournal Colloid Interface Sci.*, vol. 418, pp. 163–170, 2014.
- [73] C. Yang *et al.*, “Microfluidic assisted synthesis of multi-functional polycaprolactone microcapsules : Incorporation of CdTe quantum dots , Fe₃O₄ superparamagnetic nanoparticles and tamoxifen anticanc ... Microfluidic assisted synthesis of multi-functional polycaprolactone,” *Lab Chip*, no. May, 2009.
- [74] P. J. A. Kenis, R. F. Ismagilov, and G. M. Whitesides, “Microfabrication inside capillaries using multiphase laminar flow patterning,” *Science (80-.)*, vol. 285, no. 5424, pp. 83–85, 1999.
- [75] H. Zhang, J. Yang, R. Sun, S. Han, Z. Yang, and L. Teng, “Microfluidics for nano-drug delivery systems: From fundamentals to industrialization,” *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 13, no. 8, pp. 3277–3299, 2023.
- [76] A. Ota, A. Mochizuki, K. Sou, and S. Takeoka, “Evaluation of a static mixer as a new

- microfluidic method for liposome formulation,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 11, no. August, pp. 1–13, 2023.
- [77] N. Convery and N. Gadegaard, “30 Years of Microfluidics,” *Micro Nano Eng.*, vol. 2, no. November 2018, pp. 76–91, 2019.
- [78] R. M. Robertson, S. Laib, and D. E. Smith, “Diffusion of isolated DNA molecules : Dependence on length and topology,” vol. 2006, 2006.
- [79] P. Legrand *et al.*, “Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation,” *Int. J. Pharm.*, vol. 344, no. 1–2, pp. 33–43, Nov. 2007.
- [80] R. Stepanyan, J. G. J. L. Lebouille, J. J. M. Slot, R. Tuinier, and M. A. C. Stuart, “Controlled nanoparticle formation by diffusion limited coalescence,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 109, no. 13, pp. 1–5, 2012.
- [81] A. Reisch, A. Runser, Y. Arntz, Y. Mély, and A. S. Klymchenko, “Charge-controlled nanoprecipitation as a modular approach to ultrasmall polymer nanocarriers: Making bright and stable nanoparticles,” *ACS Nano*, vol. 9, no. 5, pp. 5104–5116, 2015.
- [82] A. Reisch, K. Trofymchuk, A. Runser, G. Fleith, M. Rawiso, and A. S. Klymchenko, “Tailoring Fluorescence Brightness and Switching of Nanoparticles through Dye Organization in the Polymer Matrix,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 49, pp. 43030–43042, 2017.
- [83] V. Rosiuk, A. Runser, A. Klymchenko, and A. Reisch, “Controlling Size and Fluorescence of Dye-Loaded Polymer Nanoparticles through Polymer Design,” *Langmuir*, vol. 35, no. 21, pp. 7009–7017, 2019.
- [84] R. H. Lamer, Victor K.; Dinegar, “Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 72, no. 11, 1950.
- [85] F. Ganachaud and J. L. Katz, “Nanoparticles and nanocapsules created using the ouzo effect: Spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices,” *ChemPhysChem*, vol. 6, no. 2, pp. 209–216, 2005.
- [86] M. K. Chan-Seng, Delphine; Georges, “Living Radical Emulsion Polymerization Using the Nanoprecipitation Technique: An Extension to Atom Transfer Radical Polymerization,” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, 2006.

- [87] S. M. Bashir *et al.*, “Chitosan Nanoparticles: A Versatile Platform for Biomedical Applications,” *Materials (Basel)*., vol. 15, no. 19, pp. 1–28, 2022.
- [88] M. Yanat and K. Schroën, “Preparation methods and applications of chitosan nanoparticles; with an outlook toward reinforcement of biodegradable packaging,” *React. Funct. Polym.*, vol. 161, no. February, 2021.
- [89] A. Ghadi, S. Mahjoub, F. Tabandeh, and F. Talebnia, “Synthesis and optimization of chitosan nanoparticles: Potential applications in nanomedicine and biomedical engineering,” *Casp. J. Intern. Med.*, vol. 5, no. 3, pp. 156–161, 2014.
- [90] I. Seyler, M. Appel, J. P. Devissaguet, P. Legrand, and G. Barratt, “Macrophage activation by a lipophilic derivative of muramyl dipeptide within nanocapsules: Investigation of the mechanism of drug delivery,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 91–97, 1999.
- [91] B. J. Nehilla, M. Bergkvist, K. C. Papat, and T. A. Desai, “Purified and surfactant-free coenzyme Q10-loaded biodegradable nanoparticles,” *Int. J. Pharm.*, vol. 348, no. 1–2, pp. 107–114, 2008.
- [92] J. P. Rao and K. E. Geckeler, “Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, no. 7, pp. 887–913, 2011.
- [93] M. R. Tavares, L. R. de Menezes, J. C. Dutra Filho, L. M. Cabral, and M. I. B. Tavares, “Surface-coated polycaprolactone nanoparticles with pharmaceutical application: Structural and molecular mobility evaluation by TD-NMR,” *Polym. Test.*, vol. 60, pp. 39–48, 2017.
- [94] T. K. Dash and V. B. Konkimalla, “Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review,” *J. Control. Release*, vol. 158, no. 1, pp. 15–33, 2012.
- [95] B. Begines *et al.*, “Polymeric nanoparticles for drug delivery: Recent developments and future prospects,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 7, pp. 1–41, 2020.
- [96] K. P. Seremeta, D. A. Chiappetta, and A. Sosnik, “Poly(ϵ -caprolactone), Eudragit® RS 100 and poly(γ -caprolactone)/Eudragit® RS 100 blend submicron particles for the sustained release of the antiretroviral efavirenz,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 102, pp. 441–449, 2013.

- [97] M. A. Woodruff and D. W. Hutmacher, "Progress in Polymer Science The return of a forgotten polymer — Polycaprolactone in the 21st century," vol. 35, pp. 1217–1256, 2010.
- [98] P. Karuppuswamy and J. Reddy, "Polycaprolactone nano fi bers for the controlled release of tetracycline hydrochloride," *Mater. Lett.*, vol. 141, pp. 180–186, 2015.
- [99] V. Patel, Kavan A., Patel, J.R., Duseja, Sareen, Raval, Harekrishna Jayendra, Parmar, "Polycaprolactone: The forgotten polymer," vol. 13, no. 7, pp. 4254–4256, 2022.
- [100] E. Bilensoy, C. Sarisozen, and N. A. Mungan, "Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of Mitomycin C to bladder tumors," vol. 371, pp. 170–176, 2009.
- [101] S. S. Payyappilly, S. Panja, P. Mandal, S. Dhara, and S. Chattopadhyay, "Organic Solvent-free Low Temperature Method of Preparation for Self Assembled Amphiphilic Poly(ϵ -caprolactone)-Poly(ethylene glycol) Block Copolymer based Nanocarriers for Protein Delivery," *Elsevier B.V.*, 2015.
- [102] S. C. Woodward, P. S. Brewer, F. Moatamed, A. Schindler, and C. G. Pitt, "The intracellular degradation of poly(ϵ -caprolactone)," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 19, no. 4, pp. 437–444, 1985.
- [103] C. M. Hansen, *Hansen solubility parameters*, no. 0. 2016.
- [104] A. Eckelt, J. Eckelt, and B. Wolf, "Solubility of Polymers," *Encycl. Polym. Sci. Technol.*, 2011.
- [105] C. M. Hansen, *Hansen solubility parameters: A user's handbook: Second edition*. 2007.
- [106] C. Bordes *et al.*, "Determination of poly(ϵ -caprolactone) solubility parameters: Application to solvent substitution in a microencapsulation process," *Int. J. Pharm.*, vol. 383, no. 1–2, pp. 236–243, Jan. 2010.
- [107] A. Martin, *Physical pharmacy. Physical chemical principles in the pharmaceutical sciences*, vol. 15, no. 4. 1984.
- [108] S. Galindo-Rodríguez, E. Alle, H. Fessi, and E. Doelker, "Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-out , Nanoprecipitation Methods," *Pharm. Res.*, vol. 21, no. 8, pp. 1428–1439, 2004.

- [109] FDA, “Tables and List Guidance for Industry Q3C,” *U.S. Dep. Heal. Hum. Serv. Food Drug Adm.*, vol. 9765, no. February, pp. 1–8, 2017.
- [110] Y. Liu, K. Kathan, W. Saad, and R. K. Prud’homme, “Ostwald ripening of β -carotene nanoparticles,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 98, no. 3, pp. 8–11, 2007.
- [111] B. Shkodra-Pula *et al.*, “Effect of surfactant on the size and stability of PLGA nanoparticles encapsulating a protein kinase C inhibitor,” *Int. J. Pharm.*, vol. 566, no. May, pp. 756–764, 2019.
- [112] S. M. I. Morsy, “Role of surfactants in nanotechnology and their applications,” *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, vol. 3, no. 5, pp. 237–260, 2014.
- [113] H. Heinz *et al.*, “Nanoparticle decoration with surfactants: Molecular interactions, assembly, and applications,” *Surf. Sci. Rep.*, vol. 72, no. 1, pp. 1–58, 2017.
- [114] M. Sakhi *et al.*, “Effect of polymeric stabilizers on the size and stability of PLGA paclitaxel nanoparticles,” *Saudi Pharm. J.*, vol. 31, no. 9, p. 101697, 2023.
- [115] I. Fernando, T. Qian, and Y. Zhou, “Long term impact of surfactants & polymers on the colloidal stability, aggregation and dissolution of silver nanoparticles,” *Environ. Res.*, vol. 179, no. September, p. 108781, 2019.
- [116] Y. Zhao, Z. Wang, W. Zhang, and X. Jiang, “Adsorbed Tween 80 is unique in its ability to improve the stability of gold nanoparticles in solutions of biomolecules,” *Nanoscale*, vol. 2, no. 10, pp. 2114–2119, 2010.
- [117] N. A. Petushkova *et al.*, “Proteomic characterization of HaCaT keratinocytes provides new insights into changes associated with SDS exposure,” *Biomed. Dermatology*, vol. 4, no. 1, pp. 1–13, 2020.
- [118] N. U. Khaliq, J. Lee, S. Kim, D. Sung, and H. Kim, “Pluronic F-68 and F-127 Based Nanomedicines for Advancing Combination Cancer Therapy,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 8, 2023.
- [119] P. Fonte *et al.*, “Effect of cryoprotectants on the porosity and stability of insulin-loaded PLGA nanoparticles after freeze-drying,” *Biomatter*, vol. 2, no. 4, pp. 329–339, 2012.
- [120] K. Mehnert, W.; Mader, “Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 47, pp. 165–196, 2001.

- [121] M. D. Aşık, M. Kaplan, B. Çetin, and N. Sağlam, “Synthesis of iron oxide core chitosan nanoparticles in a 3D printed microfluidic device,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 23, no. 3, 2021.
- [122] R. A. Gutiérrez-Saucedo *et al.*, “Pluronic F127 and P104 Polymeric Micelles as Efficient Nanocarriers for Loading and Release of Single and Dual Antineoplastic Drugs,” *Polymers (Basel)*, vol. 15, no. 10, 2023.
- [123] C. L. Domínguez-Delgado, Z. Akhtar, G. Awuah-Mensah, B. Wu, and H. D. C. Smyth, “Effects of Process and Formulation Parameters on Submicron Polymeric Particles Produced by a Rapid Emulsion-Diffusion Method,” *Nanomaterials*, vol. 12, no. 2, 2022.
- [124] S. Schubert, J. T. Delaney, and U. S. Schubert, “Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: From history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid),” *Soft Matter*, vol. 7, no. 5, pp. 1581–1588, 2011.
- [125] B. Shkodra-Pula, A. Vollrath, U. S. Schubert, and S. Schubert, *Polymer-based nanoparticles for biomedical applications*, 1st ed., vol. 16. Elsevier Ltd., 2020.
- [126] T. Govender, S. Stolnik, M. C. Garnett, L. Illum, and S. S. Davis, “PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Drug loading and release studies of a water soluble drug,” *J. Control. Release*, vol. 57, no. 2, pp. 171–185, 1999.
- [127] Y. Chen, F. Wang, and H. A. E. Benson, “Effect of formulation factors on incorporation of the hydrophilic peptide dalargin into PLGA and mPEG-PLGA nanoparticles,” *Biopolym. - Pept. Sci. Sect.*, vol. 90, no. 5, pp. 644–650, 2008.
- [128] S. Bhattacharjee *et al.*, “Cytotoxicity and cellular uptake of tri-block copolymer nanoparticles with different size and surface characteristics,” *Nanotoxicology*, vol. 9, no. 1, pp. 71–84, 2012.
- [129] P. M. Favi *et al.*, “Shape and surface effects on the cytotoxicity of nanoparticles: Gold nanospheres versus gold nanostars,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 103, no. 11, pp. 3449–3462, 2015.
- [130] S. Bhattacharjee *et al.*, “Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells,” *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 7, p. 25, 2010.
- [131] S. B. Kong, Bokyoung; Seog, Ji Hyun; Graham, Lauren M; Lee, “Experimental

- considerations on the cytotoxicity of nanoparticles,” *Nanotoxicology Mater. Methods*, vol. 6, no. 5, pp. 929–941, 2011.
- [132] J. V. Jokerst, T. Lobovkina, R. N. Zare, and S. S. Gambhir, “Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy,” *Nanomedicine*, vol. 6, no. 4, pp. 715–728, 2011.
- [133] S. Bhattacharjee, “DLS and zeta potential - What they are and what they are not?,” *J. Control. Release*, vol. 235, pp. 337–351, 2016.
- [134] M. Jurewicz, “Kontrowersje wokół definicji nanomateriału w ujęciu prawa Unii Europejskiej,” *Chemik*, vol. 68, no. 12, pp. 1090–1095, 2014.
- [135] M. A. Digman and E. Gratton, “Lessons in fluctuation correlation spectroscopy,” *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 62, pp. 645–668, 2011.
- [136] R. Dzakpasu and D. Axelrod, “Dynamic light scattering microscopy. A novel optical technique to image submicroscopic motions. I: Theory,” *Biophys. J.*, vol. 87, no. 2, pp. 1279–1287, 2004.
- [137] L. Jitkang, Y. S. Pin, C. H. Xin, and L. S. Chun, “Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering,” *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 8, no. 1, pp. 308–381, 2013.
- [138] D. Saha *et al.*, “The role of solvent swelling in the self-assembly of squalene based nanomedicines,” *Soft Matter*, vol. 11, no. 21, pp. 4173–4179, 2015.
- [139] M. A. Dobrovolskaia *et al.*, “Protein corona composition does not accurately predict hematocompatibility of colloidal gold nanoparticles,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 10, no. 7, pp. 1453–1463, 2014.
- [140] M. Hadjidemetriou, Z. Al-Ahmady, and K. Kostarelos, “Time-evolution of in vivo protein corona onto blood-circulating PEGylated liposomal doxorubicin (DOXIL) nanoparticles,” *Nanoscale*, vol. 8, no. 13, pp. 6948–6957, 2016.
- [141] D. Arzenšek, “Dynamic light scattering and application to proteins in solutions,” 2010.
- [142] P. Rademeyer, D. Carugo, J. Y. Lee, and E. Stride, “Microfluidic system for high throughput characterisation of echogenic particles,” *Lab Chip*, vol. 15, no. 2, pp. 417–428, 2015.
- [143] X. Fan, W. Zheng, and D. J. Singh, “Light scattering and surface plasmons on small

- spherical particles,” *Light Sci. Appl.*, vol. 3, no. November 2013, pp. 1–14, 2014.
- [144] D. J. Ross and R. Sigel, “Mie scattering by soft core-shell particles and its applications to ellipsometric light scattering,” *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, vol. 85, no. 5, pp. 1–13, 2012.
- [145] S. H. Hong and J. Winter, “Size dependence of optical properties and internal structure of plasma grown carbonaceous nanoparticles studied by in situ Rayleigh-Mie scattering ellipsometry,” *J. Appl. Phys.*, vol. 100, no. 6, 2006.
- [146] M. Kaszuba, J. Corbett, F. M. N. Watson, and A. Jones, “High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques,” *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 368, no. 1927, pp. 4439–4451, 2010.
- [147] D. J. Shaw, “Introduction to colloid and surface chemistry,” 1992.
- [148] “ISO 13099-1: Colloidal systems — Methods for zeta- potential determination — Part 1: Electroacoustic and electrokinetic phenomena,” *Int. Organ. Stand.*, vol. 2012, 2015.
- [149] A. Sánchez, S. P. Mejía, and J. Orozco, “Recent advances in polymeric nanoparticle-encapsulated drugs against intracellular infections,” *Molecules*, vol. 25, no. 16, pp. 1–45, 2020.
- [150] H. Zazo, C. I. Colino, and J. M. Lanao, “Current applications of nanoparticles in infectious diseases,” *J. Control. Release*, vol. 224, pp. 86–102, 2016.
- [151] M. Mir, N. Ahmed, and A. ur Rehman, “Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 159, pp. 217–231, 2017.
- [152] N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, and O. C. Farokhzad, “Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release,” *Chem. Rev.*, vol. 116, no. 4, pp. 2602–2663, 2016.
- [153] S. Rezvantalab *et al.*, “PLGA-based nanoparticles in cancer treatment,” *Front. Pharmacol.*, vol. 9, no. NOV, pp. 1–19, 2018.
- [154] J. W. Hickey, J. L. Santos, J. M. Williford, and H. Q. Mao, “Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery,” *J. Control. Release*, vol. 219, pp. 536–547, 2015.

- [155] T. Cowen, K. Karim, and S. A. Piletsky, "Solubility and size of polymer nanoparticles," *Polym. Chem.*, vol. 9, no. 36, pp. 4566–4573, 2018.
- [156] X. Shi, K. Sun, and J. R. Baker, "Spontaneous formation of functionalized dendrimer-stabilized gold nanoparticles," *J. Phys. Chem. C*, vol. 112, no. 22, pp. 8251–8258, 2008.
- [157] S. H. Park, S. G. Oh, J. Y. Mun, and S. S. Han, "Loading of gold nanoparticles inside the DPPC bilayers of liposome and their effects on membrane fluidities," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 48, no. 2, pp. 112–118, 2006.
- [158] J. K. Patra *et al.*, "Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects," *J. Nanobiotechnology*, vol. 16, no. 1, pp. 1–33, 2018.
- [159] E. Blanco, H. Shen, and M. Ferrari, "Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery," *Nat. Biotechnol.*, vol. 33, no. 9, pp. 941–951, 2015.
- [160] U. S. Toti *et al.*, "Targeted delivery of antibiotics to intracellular chlamydial infections using PLGA nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 32, no. 27, pp. 6606–6613, 2011.
- [161] E. P. Cunha-Azevedo *et al.*, "In vivo evaluation of the efficacy, toxicity and biodistribution of PLGA-DMSA nanoparticles loaded with itraconazole for treatment of paracoccidioidomycosis," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 45, no. February, pp. 135–141, 2018.
- [162] M. Umezawa, Y. Ueya, K. Ichihashi, D. T. K. Dung, and K. Soga, "Controlling Molecular Dye Encapsulation in the Hydrophobic Core of Core–Shell Nanoparticles for In Vivo Imaging," *Biomed. Mater. Devices*, vol. 1, no. 2, pp. 605–617, 2023.
- [163] A. Reisch and A. S. Klymchenko, "Fluorescent Polymer Nanoparticles Based on Dyes: Seeking Brighter Tools for Bioimaging," *Small*, vol. 12, no. 15, pp. 1968–1992, 2016.
- [164] E. Zingale *et al.*, "Fluorescent Nanosystems for Drug Tracking and Theranostics: Recent Applications in the Ocular Field," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 5, 2022.
- [165] G. Yang, Y. Liu, and C. X. Zhao, "Quantitative comparison of different fluorescent dye-loaded nanoparticles," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 206, no. May, p. 111923, 2021.
- [166] J. L. Chávez, J. L. Wong, and R. S. Duran, "Core-shell nanoparticles: Characterization and study of their use for the encapsulation of hydrophobic fluorescent dyes," *Langmuir*,

- vol. 24, no. 5, pp. 2064–2071, 2008.
- [167] M. Ben Yehuda Greenwald, S. Ben Sasson, and H. Bianco-Peled, “A new method for encapsulating hydrophobic compounds within cationic polymeric nanoparticles,” *J. Microencapsul.*, vol. 30, no. 6, pp. 580–588, 2013.
- [168] J. Li, J. Fan, R. Cao, Z. Zhang, J. Du, and X. Peng, “Encapsulated Dye/Polymer Nanoparticles Prepared via Miniemulsion Polymerization for Inkjet Printing,” *ACS Omega*, vol. 3, no. 7, pp. 7380–7387, 2018.
- [169] D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, H. Fessi, and E. Doelker, “Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 24, no. 12, pp. 1113–1128, 1998.
- [170] M. M. Badran, A. E. Alanazi, M. A. Ibrahim, and D. H. Alshora, “Optimization of Bromocriptine-Mesylate-Loaded Polycaprolactone Nanoparticles Coated with Chitosan for Nose-to-Brain Delivery: In Vitro and In Vivo Studies,” 2023.
- [171] B. and characterization of diosgenin encapsulated poly- ϵ -caprolactone-pluronic nanoparticles and its effect on brain cancer cells Rabha, K. K. Bharadwaj, D. Baishya, T. Sarkar, H. A. Edinur, and S. Pati, “Synthesis and characterization of diosgenin encapsulated poly- ϵ -caprolactone-pluronic nanoparticles and its effect on brain cancer cells,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 8, 2021.
- [172] C. E. Mora-Huertas, H. Fessi, and A. Elaissari, “Polymer-based nanocapsules for drug delivery,” *Int. J. Pharm.*, vol. 385, no. 1–2, pp. 113–142, 2010.
- [173] C. Vauthier and G. Ponchel, *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*, no. January 2016. 2016.
- [174] E. Jäger *et al.*, “Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area,” *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 1, pp. 130–140, 2009.
- [175] Y. Song, H. Liu, S. Pan, X. Xiang, M. Ye, and X. Zhu, “Emerging role of mesenchymal stromal cells in gynecologic cancer therapy,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–14, 2023.
- [176] F. Zhang, J. Jiang, H. Qian, Y. Yan, and W. Xu, “Exosomal circRNA: emerging insights into cancer progression and clinical application potential,” *J. Hematol. Oncol.*, vol. 16,

no. 1, pp. 1–25, 2023.

- [177] M. Xue, Y. Tong, Y. Xiong, and C. Yu, “Role of cancer-associated fibroblasts in the progression, therapeutic resistance and targeted therapy of oesophageal squamous cell carcinoma,” *Front. Oncol.*, vol. 13, no. October, pp. 1–15, 2023.
- [178] T. Vangijzegem *et al.*, “Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION): From Fundamentals to State-of-the-Art Innovative Applications for Cancer Therapy,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 1, 2023.
- [179] P. Jaswal, Nancy; Justa, Purnima; Kumar, Hemant; Deepshikha; Krishna; Pani, Balaram; Kumar, “Biomedical Applications of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONS) as a Theranostic Agent,” *IntechOpen*, 2022.
- [180] L. Li *et al.*, “Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as MRI contrast agents for non-invasive stem cell labeling and tracking,” *Theranostics*, vol. 3, no. 8, pp. 595–615, 2013.
- [181] M. Izci, C. Maksoudian, B. B. Manshian, and S. J. Soenen, “The Use of Alternative Strategies for Enhanced Nanoparticle Delivery to Solid Tumors,” *Chem. Rev.*, vol. 121, no. 3, pp. 1746–1803, 2021.
- [182] C. Pucci, A. Degl’Innocenti, M. Belenli Gümüş, and G. Ciofani, “Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia: recent advancements, molecular effects, and future directions in the omics era,” *Biomater. Sci.*, vol. 10, no. 9, pp. 2103–2121, 2022.
- [183] M. Szwed and A. Marczak, “Application of Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia for Cancer Treatment—The Current State of Knowledge,” *Cancers (Basel)*, vol. 16, no. 6, 2024.
- [184] T. Do Le, I. Suttikhana, and T. J. Ashaolu, “State of the art on the separation and purification of proteins by magnetic nanoparticles,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 21, no. 1, pp. 1–18, 2023.
- [185] S. Witt, T. Scheper, and J. G. Walter, “Production of polycaprolactone nanoparticles with hydrodynamic diameters below 100 nm,” *Eng. Life Sci.*, vol. 19, no. 10, pp. 658–665, 2019.
- [186] “ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity,” *Int. Organ. Stand.*, vol. 10406–1:20, pp. 3–6, 2015.

- [187] A. M. Goodwin, "In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents," *Microvasc. Res.*, vol. 74, no. 2–3, pp. 172–183, 2007.
- [188] B. Butruk-Raszeja, "ĆWICZENIE 3 : Wizualizacja komórek," 2020.
- [189] J. Xu *et al.*, "Controllable Microfluidic Production of Drug-Loaded PLGA Nanoparticles Using Partially Water-Miscible Mixed Solvent Microdroplets as a Precursor," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, 2017.
- [190] O. I. M.-M. and L. F. O.-G. and C. E. Mora-Huertas, "Nanoprecipitation: Applications for Entrapping Active Molecules of Interest in Pharmaceuticals," *IntechOpen*, 2020.
- [191] M. Mahmoudi, H. Saeidian, Z. Mirjafary, and J. Mokhtari, "Preparation and characterization of memantine loaded polycaprolactone nanocapsules for Alzheimer's disease," *J. Porous Mater.*, vol. 28, no. 1, pp. 205–212, 2021.
- [192] F. Heshmatnezhad and A. R. Solaimany Nazar, "On-chip controlled synthesis of polycaprolactone nanoparticles using continuous-flow microfluidic devices," *J. Flow Chem.*, vol. 10, no. 3, pp. 533–543, 2020.
- [193] B. P. Nair, D. Vaikkath, D. S. Mohan, and P. D. Nair, "Fabrication of a microvesicles-incorporated fibrous membrane for controlled delivery applications in tissue engineering," *Biofabrication*, vol. 6, no. 4, 2014.
- [194] L. Duse *et al.*, "Photodynamic therapy of ovarian carcinoma cells with curcumin-loaded biodegradable polymeric nanoparticles," *Pharmaceutics*, vol. 11, no. 6, 2019.
- [195] S. Ali *et al.*, "Lipoparticles for synergistic chemo-photodynamic therapy to ovarian carcinoma cells: In vitro and in vivo assessments," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 16, no. February, pp. 951–976, 2021.
- [196] R. Dinarvand, S. H. Moghadam, L. Mohammadyari-Fard, and F. Atyabi, "Preparation of biodegradable microspheres and matrix devices containing naltrexone," *AAPS PharmSciTech*, vol. 4, no. 3, 2003.
- [197] Y. Jiang, Y. Zhou, C. Y. Zhang, and T. Fang, "Co-delivery of paclitaxel and doxorubicin by pH-responsive prodrug micelles for cancer therapy," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 15, pp. 3319–3331, 2020.
- [198] Y. Wang and Y. Tan, "Enhanced drug loading capacity of 10-hydroxycamptothecin-

- loaded nanoparticles prepared by two-step nanoprecipitation method,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 36, pp. 183–191, 2016.
- [199] A. P. Dayanandan *et al.*, “Emerging nano-scale delivery systems for the treatment of osteoporosis,” *Biomater. Res.*, vol. 27, no. 1, pp. 1–25, 2023.
- [200] J. Ibarra *et al.*, “Synthesis and characterization of magnetite/PLGA/chitosan nanoparticles,” *Mater. Res. Express*, vol. 2, no. 9, p. 95010, 2015.
- [201] F. Yan *et al.*, “The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 6, no. 1, pp. 170–178, 2010.
- [202] A. Vila, A. Sánchez, M. Tobío, P. Calvo, and M. J. Alonso, “Design of biodegradable particles for protein delivery,” *J. Control. Release*, vol. 78, no. 1–3, pp. 15–24, 2002.
- [203] A. Saez, M. Guzmán, J. Molpeceres, and M. R. Aberturas, “Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 50, no. 3, pp. 379–387, 2000.
- [204] H. O. Alsaab *et al.*, “PLGA-Based Nanomedicine: History of Advancement and Development in Clinical Applications of Multiple Diseases,” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 12, pp. 1–30, 2022.
- [205] K. Thode, R. H. Müller, and M. Kresse, “Two-time window and multiangle photon correlation spectroscopy size and zeta potential analysis - Highly sensitive rapid assay for dispersion stability,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 89, no. 10, pp. 1317–1324, 2000.
- [206] S. shen Feng and G. Huang, “Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol®) from nanospheres of biodegradable polymers,” *J. Control. Release*, vol. 71, no. 1, pp. 53–69, 2001.
- [207] A. Kumar and K. Sawant, “Encapsulation of exemestane in polycaprolactone nanoparticles: Optimization, characterization, and release kinetics,” *Cancer Nanotechnol.*, vol. 4, no. 4–5, pp. 57–71, 2013.
- [208] X. R. Shao *et al.*, “Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells,” *Cell Prolif.*, vol. 48, no. 4, pp. 465–474, 2015.

- [209] F. C. Kusumasari, L. H. Samada, and E. Budianto, "Preparation, characterization and in vitro release study of microcapsule simvastatin using biodegradable polymeric blend of poly(L-lactic acid and poly(ϵ -caprolactone) with double emulsifier," *Mater. Sci. Forum*, vol. 977 MSF, pp. 178–183, 2020.
- [210] V. Nozal, E. Rojas-Prats, I. Maestro, C. Gil, D. I. Perez, and A. Martinez, "Improved controlled release and brain penetration of the small molecule S14 using PLGA nanoparticles," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 6, pp. 1–14, 2021.
- [211] E. Scarpa *et al.*, "Quantification of intracellular payload release from polymersome nanoparticles," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. June, pp. 1–13, 2016.
- [212] H. Guo *et al.*, "Hollow mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of fluorescent dye," *Chem. Cent. J.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–10, 2011.
- [213] A. M. Smith, H. Duan, A. M. Mohs, and S. Nie, "Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 11, pp. 1226–1240, 2008.
- [214] K. D. Lee, S. Nir, and D. Papahadjopoulos, "Quantitative Analysis of Liposome-Cell Interactions in Vitro: Rate Constants of Binding and Endocytosis with Suspension and Adherent J774 Cells and Human Monocytes," *Biochemistry*, vol. 32, no. 3, pp. 889–899, 1993.
- [215] F. Wang, M. Elbadawi, S. L. Tsilova, S. Gaisford, A. W. Basit, and M. Parhizkar, "Machine learning predicts electrospray particle size," *Mater. Des.*, vol. 219, p. 110735, 2022.
- [216] A. T. R. Narayan, P. A. Shenoy, and U. Y. Nayak, "Computational modeling for the design and development of nano based drug delivery systems," *J. Mol. Liq.*, vol. 368, p. 120596, 2022.
- [217] I. D. Styliari, V. Taresco, A. Theophilus, C. Alexander, M. Garnett, and C. Laughton, "Nanoformulation-by-design: an experimental and molecular dynamics study for polymer coated drug nanoparticles," *RSC Adv.*, vol. 10, no. 33, pp. 19521–19533, 2020.
- [218] S. Megy *et al.*, "Molecular dynamics studies of poly(Lactic acid) nanoparticles and their interactions with vitamin E and TLR agonists Pam1CSK4 and Pam3CSK4," *Nanomaterials*, vol. 10, no. 11, pp. 1–18, 2020.

- [219] J. C. Cheng and R. O. Fox, “Kinetic modeling of nanoprecipitation using CFD coupled with a population balance,” *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 49, no. 21, pp. 10651–10662, 2010.
- [220] V. M. Canuto, “Large-Eddy Simulation Of Turbulence - A Subgrid Scale-Model Including Shear, Vorticity, Rotation, And Buoyancy.,” *Astrophys. J.*, vol. 428, no. 1, pp. 729–752, 1994.
- [221] D. L. Marchisio, J. T. Pikturna, R. O. Fox, R. D. Vigil, and A. A. Barresi, “Quadrature method of moments for population-balance equations,” *AIChE J.*, vol. 49, no. 5, pp. 1266–1276, 2003.
- [222] D. L. Marchisio and R. O. Fox, “Solution of population balance equations using the direct quadrature method of moments,” *J. Aerosol Sci.*, vol. 36, no. 1, pp. 43–73, 2005.
- [223] J. G. J. L. Lebouille, R. Stepanyan, J. J. M. Slot, M. A. Cohen Stuart, and R. Tuinier, “Nanoprecipitation of polymers in a bad solvent,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 460, pp. 225–235, 2013.
- [224] R. S. Garabedian and J. J. Helble, “A model for the viscous coalescence of amorphous particles,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 234, no. 2, pp. 248–260, 2001.
- [225] R. S. Garabedian and J. J. Helble, “Modeling coalescence in multiple-particle systems,” *J. Aerosol Sci.*, vol. 39, no. 1, pp. 71–81, 2008.
- [226] H. H. Q. Dinh, E. Santanach-Carreras, M. Lalanne-Aulet, V. Schmitt, P. Panizza, and F. Lequeux, “Effect of a Surfactant Mixture on Coalescence Occurring in Concentrated Emulsions: The Hole Nucleation Theory Revisited,” *Langmuir*, vol. 37, no. 29, pp. 8726–8737, 2021.
- [227] N. Sharma, P. Madan, and S. Lin, “Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: A co-surfactant study,” *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 11, no. 3, pp. 404–416, 2016.
- [228] M. L. T. Zweers, D. W. Grijpma, G. H. M. Engbers, and J. Feijen, “The Preparation of Monodisperse Biodegradable Polyester Nanoparticles with a Controlled Size,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 66, no. 2, pp. 559–566, 2003.