

## Traduzione del testo del brevetto europeo

No. 3 930 686

a nome: Renibus Therapeutics, Inc.

a: Southlake, TX 76092 - USA

dal titolo: Nuove composizioni a base di ferro e metodi di realizzazione e uso delle stesse.

## DESCRIZIONE

Questa domanda di brevetto rivendica la priorità sulla domanda provvisoria n. 62/812.028, depositata il 28 febbraio 2019, intitolata Novel Iron Compositions and Methods of Marking and Using the Same.

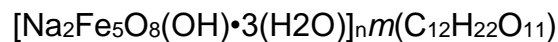
Sfondo dell'invenzione

Gli agenti di ferro(IV) endovenosi sono colloidali che consistono in nanoparticelle di carboidrati di ferro sferoidali come mostrato nella Fig. 1. In corrispondenza del nucleo di ciascuna particella vi è un gel di ossiidrossido di ferro e il nucleo è circondato da un guscio di carboidrato che stabilizza l'ossiidrossido di ferro (la funzione principale del ligando è di stabilizzare il complesso e proteggerlo da un'ulteriore polinucleazione).

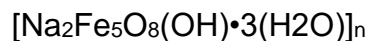
I complessi di carboidrati di ferro si comportano come profarmaci, dal momento che il ferro deve essere rilasciato dal nucleo di idrossido di ferro(III). Secondo il meccanismo proposto, dopo la somministrazione, i complessi stabili (tipo 1) come carbossimaltoso ferrico e destrano di ferro sono ripresi per endocitosi dai macrofagi del sistema reticoloendoteliale (RES). *Si veda* Danielson, J. Structure, chemistry, and pharmacokinetics of intravenous iron agents. Am. Soc. Nephrol. 2004, 15, S93-S98.

Nel caso di carboidrati di ferro(III) meno stabili (tipo 2), quantità significative di ferro labile dal complesso possono essere rilasciate e portano alla saturazione della transferrina e, dunque, a quantità significative di ferro non legato a transferrina (NTBI), in particolare se sono somministrate alte dosi. Questo Fe<sup>3+</sup> legato debolmente è prontamente ripreso in modo non regolato dalle cellule e può indurre stress ossidativo. Evans, R.W.; Rafique, R.; Zarea, A.; Rapisarda, C.; Cammack, R.; Evans, P.J.; Porter, J.B.; Hider, R.C. Nature of non-transferrin-bound iron: studies on iron citrate complexes and the thalassemic era. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2008, 13, 57-74.

Esistono cinque tipi di prodotti iniettabili a base di carboidrato di ferro attualmente approvati dalla FDA (1) INFeD<sup>®</sup>/Dexferrum<sup>®</sup> (destrano di ferro), Ferahem<sup>®</sup> (ferumossitolo), Injectafer<sup>®</sup> (carbossilattosio ferrico), Venofer<sup>®</sup> (saccarosio di ferro), Ferrlecit<sup>®</sup> (complesso di gluconato ferrico di sodio). Saccarosio di ferro, venduto con il nome Venofer<sup>®</sup>, è formulato come sospensione colloidale avente un peso molecolare (P<sub>m</sub>) di circa 34.000-60.000 dalton e una formula molecolare come segue:



dove n è il grado di polimerizzazione del ferro e m è il numero di molecole di saccarosio (C.sub.12 H.sub.22 O.sub.11) in complesso con il nucleo di ferro polimerizzato polinucleare;



Ciascun ml contiene 20 mg di ferro elementare come saccarosio di ferro in acqua per iniezione. Venofer<sup>®</sup> è disponibile in fiale a dose singola da 5 ml (100 mg di ferro elementare per 5 ml) e fiale a dose singola da 10 ml (200 mg di ferro elementare per 10 ml). Il prodotto di farmaco contiene approssimativamente il 30%

di saccarosio p/v (300 mg/ml) e ha un pH di 10,5-11,1. Il prodotto non contiene conservanti. L'osmolarità dell'iniezione è 1.250 mOsmol/l.

Metodi per sintetizzare carboidrati di ferro sono descritti in WO 97/11711 (1997) da Lawrence et al., che hanno divulgato composizioni a base di ossiidrossido ferrico-destrano per trattare la carenza di ferro aventi particelle ellissoidali con un intervallo di peso molecolare preferito da circa 250.000 a 300.000 dalton.

Recentemente, saccarosio di ferro è stato usato in combinazione con protoporfirina di stagno (SnPP) per indurre citoresistenza acquisita senza causare lesione all'organo. *Si veda* il brevetto U.S. n. 9.844.563 concesso a Zager et al. I presenti inventori hanno trovato la necessità di una formulazione di saccarosio di ferro che può essere facilmente combinata con protoporfirina di stagno (SnPP), che sia stabile, e possa essere iniettata in un paziente per trattare carenza di ferro o per i suoi effetti protettivi renali da sola o in combinazione con un altro agente come SnPP.

Il brevetto tedesco numero DE862482 divulga un processo per preparare soluzioni iniettabili stabili di sale di ferro trivalente. La pubblicazione di domanda di brevetto US n. US 2005/309187 divulga un processo per preparare un complesso di saccarosio di ferro, sostanzialmente privo di eccipienti, per fornire un complesso di saccarosio di ferro fatto co-precipitare con saccarosio, e per fornire complessi di saccarosio di ferro in soluzione acquosa. Il brevetto tedesco numero DE19547356 divulga un adsorbente per fosfato da un mezzo acquoso, in particolare per fosfato inorganico o legato a nutrienti da fluidi corporei o nutrienti. L'adsorbente contiene beta-idrossido di ferro polinucleare stabilizzato mediante carboidrati e/o acido umico. La pubblicazione PCT numero

WO2018148217A1 divulga composizioni, kit, e metodi per proteggere organi inducendo una citoresistenza acquisita senza causare lesione all'organo. Le composizioni, kit, e metodi utilizzano complessi di Me-porfirina, proteine dell'eme, molecole contenenti ferro, e/o vitamina B12 e, facoltativamente, agenti che influenzano il metabolismo delle proteine dell'eme.

### Sommario dell'invenzione

La divulgazione riguarda composizioni a base di saccarosio di ferro acquose aventi proprietà desiderabili. In un aspetto della divulgazione, la composizione a base di saccarosio di ferro acquosa comprende saccarosio e bicarbonato di ferro. In un aspetto, l'invenzione riguarda una composizione farmaceutica a base di ferro acquosa comprendente: saccarosio; bicarbonato; e un veicolante acquoso farmaceuticamente accettabile. In un altro aspetto, l'invenzione riguarda una composizione a base di ferro acquosa comprende saccarosio e bicarbonato di ferro per l'uso in un metodo per la prevenzione o il trattamento di una malattia o disturbo del rene comprendente la somministrazione per via endovenosa di una composizione a base di ferro acquosa in una quantità terapeuticamente efficace, in cui la composizione a base di ferro acquosa comprende saccarosio e bicarbonato di ferro.

### Descrizione delle figure

La Fig. 1 mostra la struttura di un carboidrato di ferro.

La Fig. 2 è un Western blot di un rene a 18 ore post-somministrazione di composizioni di ferro acquose.

La Fig. 3 mostra cromatogrammi GPC di tre preparazioni di S1.

La Fig. 4 mostra una vista zoomata della Fig. 3.

La Fig. 5 mostra cromatogrammi GPC di tre preparazioni di S1.

La Fig. 6 mostra una vista zoomata della Fig. 5.

La Fig. 7 mostra cromatogrammi GPC di tre preparazioni di S1.

La Fig. 8 mostra una vista zoomata della Fig. 7

La Fig. 9 mostra un confronto tra GPC per S1, S2, e S3.

La Fig. 10 mostra una vista dall'alto e laterale di AFM per S1.

La Fig. 11 mostra S1, l'analisi della taglia delle particelle in corrispondenza dell'ubicazione 1.

La Fig. 12 mostra S1, l'analisi della sezione manuale di tre particelle.

La Fig. 13 mostra spettri FTIR di S1 e la migliore corrispondenza di libreria, saccarosio.

La Fig. 14 mostra spettri FTIR di S2 e la migliore corrispondenza di libreria, saccarosio.

La Fig. 15 mostra spettri FTIR di S3 e la migliore corrispondenza di libreria, destrano.

La Fig. 16 mostra spettri  $^1\text{H}$  NMR della preparazione 1 di S1

La FIG. 17 mostra spettri  $^1\text{H}$  NMR della preparazione 1 di S2

La FIG. 18 mostra spettri  $^1\text{H}$  NMR della preparazione 1 di S3

La FIG. 19 mostra spettri  $^{13}\text{C}$  NMR della preparazione 1 di S1

La FIG. 20 mostra spettri  $^{13}\text{C}$  NMR della preparazione 1 di S2

La FIG. 21 mostra spettri  $^{13}\text{C}$  NMR della preparazione 1 di S3

La FIG. 22 mostra il confronto di dati grezzi per i tre campioni (liofilizzati)

La FIG. 23 mostra la sovrapposizione di sfalsamento dei dati da tutti e tre i campioni (due repliche per S3)

La Fig. 24 mostra il termogramma TGA di S1, S2 ed S3 in condizione di spurgo con azoto.

La Fig. 25 mostra termogrammi DSC di S1, S2 e S3.

#### Descrizione dettagliata dell'invenzione

In un aspetto, la presente divulgazione implica una composizione a base di saccarosio (FeS) e bicarbonato (FeS-bicarb) di ferro acquosa. I presenti inventori hanno trovato che questa composizione ha proprietà benefiche. In un aspetto, la composizione a base di FeS-bicarb della presente divulgazione può essere utilizzata come agente protettivo renale. Gli inventori hanno scoperto che la composizione a base di FeS-bicarb secondo aspetti della divulgazione è preferibilmente assorbita nel rene in confronto a forme disponibili in commercio di FeS. Inoltre, gli inventori hanno trovato che FeS-bicarb dà come risultato una sovraregolazione preferenziale della molecola/delle molecole protettiva/e del rene relativamente a FeS da solo. In un altro aspetto, la composizione a base di FeS-bicarb della presente divulgazione può essere vantaggiosamente combinata con altri agenti protettivi renali come protoporfirina di stagno (SnPP) per formare agenti protettivi renali prontamente iniettabili.

Un vantaggio dell'uso di FeS-bicarb è che questa composizione dà come risultato effetti protettivi renali elevati. Specificamente, gli inventori hanno trovato che FeS-bicarb ha sovraregolato preferenzialmente le molecole protettive renali relativamente a FeS da solo. Pur non volendo essere vincolati dalla teoria, i presenti inventori hanno proposto che il bicarb. in aggiunta a FeS può alterare i livelli relativi di Fe(III) e Fe(II) presenti. A causa dell'arrossamento osservato nel prodotto a base di FeS-bicarb, gli inventori hanno proposto che le composizioni della divulgazione possano includere livelli elevati di Fe(II). Ciò può spiegare gli effetti protettivi renali

elevati, data la più alta reattività di Fe(II) relativamente a Fe(III).

Un vantaggio dell'uso del FeS-bicarb è che il bicarb. ha un effetto tamponante. Quando si usa una composizione a base di protoporfirina di stagno, ciò può essere vantaggioso, dal momento che SnPP è meglio stoccato a pH basso per prevenire una dimerizzazione non voluta durante lo stoccaggio. Secondo la presente divulgazione, la composizione a base di SnPP può essere combinata con la composizione a base di FeS-bicarb in un rapporto minore di o uguale a SnP:FeS circa 1:1, come circa 1:2, circa 1:4, circa 1:8, circa 1:10, circa 1:20, circa 1:50, circa 1:100, circa 1:1000, circa 1:10.000, circa 1:100.000, circa 1:1.000.000.

In un aspetto, la composizione ha un peso molecolare misurato usando GPC come descritto nell'Esempio 1. L'Mp è preferibilmente all'interno dell'intervallo tra 25.000 e 35.000 dalton, più preferibilmente tra 28.000 e 32.000 dalton, e in maniera massimamente preferibile circa 29.000 dalton. Il Pm è preferibilmente all'interno dell'intervallo tra 25.000 e 45.000 dalton, più preferibilmente tra 30.000 e 40.000 dalton, persino più preferibilmente tra 33.000 e 38.000 dalton, e in maniera massimamente preferibile circa 34.000 dalton. L'Mn è preferibilmente all'interno dell'intervallo tra 15.000 e 30.000 dalton, più preferibilmente tra 20.000 e 25.000 dalton, e in maniera massimamente preferibile circa 24.000 dalton. La polidispersità (PDI) è preferibilmente all'interno dell'intervallo da 1,35 a 1,60, più preferibilmente all'interno dell'intervallo di 1,38 e 1,5, persino più preferibilmente all'interno dell'intervallo 1,40 e 1,48, e in maniera massimamente preferibile circa 1,4.

In un aspetto, la composizione ha un potenziale zeta stabile di -3,0 mV o meno, più preferibilmente -7,0 mV o meno, e in maniera massimamente preferibile circa -10 mV. In un aspetto, la composizione ha un carbonio organico totale minore dell'8,5%, preferibilmente minore dell'8,0%, e in maniera

massimamente preferibile circa il 7,7%. In un aspetto, l'osmolalità come misurata conformemente all'Esempio 1 è all'interno dell'intervallo di 550 e 1600 mOsm/kg, preferibilmente all'interno dell'intervallo di 1500 e 1580 mOsm/kg, e in maniera massimamente preferibile circa 1540 mOsm/kg.

Eventuali esempi che fuoriescono dall'ambito delle rivendicazioni sono forniti a solo scopo comparativo.

### Esempio 1

La presente divulgazione implica una composizione che è preparata dissolvendo abbastanza complesso di saccarosio di ferro in acqua (ca. 3,5 l) per dare una soluzione di 12 mg/ml (espressa come ferro) quando diluita a 6,0 l. La quantità di saccarosio di ferro necessaria è stata calcolata per il volume finale di liquido, 6100 ml (6,1 l), così che la concentrazione finale sia 12 mg/ml. Questo richiede 73,2 g di ferro. La potenza d'uso del saccarosio di ferro è 0,0550. Dunque, sono necessari  $73,2 \text{ g} / 0,0550$  o  $1331 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$  di saccarosio di ferro. Saccarosio di ferro,  $1331 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$ , è stato pesato direttamente in una beuta Erlenmeyer da 6,0 l. Approssimativamente 3-3,5 l di acqua sono addizionati alla beuta Erlenmeyer, e i contenuti della beuta sono agitati.

Bicarbonato di sodio è addizionato in una quantità tale che la concentrazione finale di bicarbonato di sodio sia 10 mg/ml quando diluito a 6,0 l. Bicarbonato di sodio,  $109,8 \pm 0,1 \text{ g}$ , è pesato e addizionato alla beuta da 6,0 l.

Cloruro di sodio è addizionato in una quantità tale che la concentrazione finale di cloruro di sodio sia 9,0 mg/ml alla diluizione. Cloruro di sodio,  $54,9 \pm 0,1$ , è pesato e addizionato alla beuta da 6,0 l. La sospensione è agitata per 30-120 minuti per dare una soluzione opaca nera.

Il pH della soluzione è monitorato con un pH-metro mentre idrossido di

sodio 1 M è addizionato in piccole porzioni fino a quando un pH di 10,30 è raggiunto e rimane stabile. Idrossido di sodio,  $40,0 \pm 0,1$  g, è stato addizionato a una beuta Erlenmeyer da 1,0 l.  $1,0 \pm 0,1$  l di acqua sono addizionati alla beuta Erlenmeyer da 1,0 l e agitati fino a quando tutto l'idrossido di sodio si è dissolto. È apposta una sonda di pH per monitorare il pH della beuta Erlenmeyer da 6,0 l e l'idrossido di sodio è addizionato in porzioni da < 100 ml fino a quando il pH =  $10,3 \pm 0,1$ . La soluzione è quindi agitata per 10 minuti. Il pH è nuovamente verificato dopo 10 minuti e, se necessario, regolato entro un pH =  $10,3 \pm 0,1$ .

La soluzione è quindi trasferita a una beuta volumetricamente accurata e diluita a 6,1 l con acqua. Un beuta volumetrica da 2 l è usata due volte per trasferire esattamente 4 l della soluzione a pH 10,3 a una beuta Erlenmeyer da 6 l. La rimanente soluzione a pH 10,3 è diluita a 2 l in una beuta volumetrica e addizionata alla beuta Erlenmeyer da 6 l. Il cilindro graduato da 100 ml è usato per addizionare  $100 \pm 0,1$  ml alla Erlenmeyer da 6,0 l, e la soluzione risultante è agitata per 10 minuti.

La soluzione di prodotto risultante appare da rosso scuro a marrone. Nella preparazione di campione sono presenti due isotopi di ferro in un rapporto coerente con quello della preparazione standard. Il materiale risultante aveva un pH di 10,3, che è all'interno dei limiti preferiti di 10,1-10,4. Il materiale risultante aveva 11,5/11,6 parti per mille (mg/ml) di ferro secondo SOP 174472, che determina il ferro attraverso spettroscopia di massa a plasma accoppiato induttivamente.

Proprietà aggiuntive della composizione risultante sono trovate nella Tabella 1 nel seguito:

Tabella 1: proprietà della Composizione dell'Esempio 1			
Prova	Osservazione/Risultati	Specificazione	Riferimento al metodo di prova
Descrizione	Polvere da marrone a marrone scuro	Polvere da marrone a marrone scuro	In azienda
Solubilità	Liberamente solubile in acqua. Praticamente insolubile in metanolo	Liberamente solubile in acqua. Praticamente	

		insolubile in metanolo	
Identificazione			
Ferro	Scarico di colore rosso	Il colore rosso deve scaricare	Monografie USP38 di iniezione di saccarosio di ferro
Saccarosio	È conforme	Il tempo di ritenzione del picco maggiore nel cromatogramma della Preparazione di saggio corrisponde a quello nel cromatogramma della Preparazione standard, come ottenuto nel saggio per saccarosio.	Monografie USP38 di iniezione di saccarosio di ferro.
Peso molecolare			
Pm	52149 Da	Tra 34000 e 60000 Da	Monografie USP 38 di iniezione di saccarosio di ferro_Metodo di convalida
Mn	35897 Da	Non inferiore a 24000 Da	
Pm/Mn	1,453	Non più di 1,70	
pH	11,04	Tra 10,50 e 11,0	Monografia USP38<791> di iniezione di saccarosio di ferro
Densità relativa	1,156	Tra 1,135 e 1,165 a 20 °C	Monografia USP38<841> di iniezione di saccarosio di ferro

Torbidità	A pH 4,67	pH tra 4,40 e 5,30	Monografia USP38 di iniezione di saccarosio di ferro
Alcalinità	0,68 ml	Tra 0,5 ml e 0,8 ml di acido cloridrico 0,1 N consumati per ml.	Monografia USP38 di iniezione di saccarosio di ferro
Limite di ferro(II)	0,16% p/v	Non più dello 0,40% p/v	Monografia USP38 di iniezione di saccarosio di ferro
Complessi di Fe(II) e Fe(III) a basso peso molecolare	Nessun picco addizionale nei polarogrammi del limite di ferro(II) osservato	Nessun picco addizionale nei polarogrammi del limite di ferro(II) deve essere osservato	Monografia USP38 di iniezione di saccarosio di ferro
Contenuto di cloruro	0,013% p/p	Tra lo 0,012% p/p e lo 0,025% p/p	Monografie USP 38 di iniezione di saccarosio di ferro_Metodo di convalida
Saggio di saccarosio (mediante HPLC)	85,21% p/p	Tra l'80,00% (p/p) e il 90,00% (p/p) su base essiccata	Monografie USP 38 di iniezione di saccarosio di ferro_Metodo di convalida
Saggio di ferro(III) totale (mediante AAS)	5,66% p/p	Tra il 5,00% p/p e il 6,00% p/p su base essiccata.	Monografie USP 38 di iniezione di saccarosio di ferro
Perdita all'essiccamento	1,24% p/p	Non più del 5,00% p/p	USP38
Metalli pesanti			

Arsenico	Meno di 2,0 ppm	Non più di 2,0 ppm	In azienda
Rame	Meno di 20 ppm	Non più di 20 ppm	In azienda
Piombo	Meno di 20 ppm	Non più di 20 ppm	In azienda
Solventi residui	Metanolo: 2624,41 ppm	Metanolo: NMT 3000 ppm	USP 38<467>
	Acetone: 366 ppm	Acetone: NMT 5000 ppm	USP 38<467>
Osmolarità	1220 mOsmol/l	Tra 1150 e	Monografie USP38<785>
		1350 mOsmol/l	di iniezione di saccarosio di ferro
Materia particolata	54,66	≤10 µm 6000 per contenitore	Monografie USP38<785> di iniezione di saccarosio di ferro
	1,66	≤25 µm 600 per contenitore	Monografie USP38<785> di iniezione di saccarosio di ferro
Endotossina batterica	Meno di 3,70 UE/mg di ferro	Non più di 3,7 UE/mg di ferro	Monografie USP38<785> di iniezione di saccarosio di ferro
Limite microbico			
Batteri aerobici totali	20 CFU/g	Non più di 100 CFU/g	USP38<61>
Lievito e muffa totali	Meno di 10 CFU/g	Non più di 10 CFU/g	
Conteggio di Enterobatteriacee	Meno di 10 CFU/g	Non più di 10 CFU/g	

E. Coli totale	Assente	Deve essere assente	
Staph. aureus	Assente	Deve essere assente	
Pseudomonas Aeruginosa	Assente	Deve essere assente	
Salmonella	Assente	Deve essere assente	

La composizione a base di FeS-bicarb risultante ha la seguente stechiometria e le costanti fisiche sono mostrate nella Tabella 2 nel seguito:

Tabella 2: stechiometria e costanti fisiche			
Reagente	PM	Percentuale di agenti attivi	Quantità nominale
Saccarosio di ferro	736	5,5	1331 g
Bicarbonato di sodio	84	100	110 g
Cloruro di sodio	58	100	55 g
Idrossido di sodio	40	100	39 g
Acqua	46,07	1000	6,1 l

### Esempio 2

La somministrazione endovenosa della composizione a base di bicarb di saccarosio di ferro (FeS) dell'Esempio 1 è stata condotta per 4 ore e ha dato come risultato un'elevata ossigenasi 1 dell'eme (HO-1) renale relativamente alla composizione a base di saccarosio di ferro (FeS) disponibile in commercio venduta con il nome di marca Venofer®. I risultati sono mostrati nella Tabella 3 nel seguito.

Tabella 3: mRNA di rene HO-1/GAPDH			
Sessione n.	Controllo	4 h di FeS I.V., Venofer®	4 h di FeS-bicarb I.V.
1	0,22	1,52	3,2
2	0,04	1,23	2,01
3	0,06	1,11	1,99
4	0,07	2,23	2,23
5		1,86	1,86
Media	0,1	1,59	2,34
Err. std.	0,04	0,21	0,23

Il livello elevato di HO-1 osservato nel rene non è stato osservato nel fegato. Invece, non è stato osservato che il livello di HO-1 fosse aumentato per FeS-bicarb relativamente a quanto è stato osservato per Venofer®. I risultati sono mostrati nella Tabella 4 di seguito.

Tabella 4: mRNA del fegato HO-1/GAPDH			
Sessione n.	Controllo	4 h di FeS I.V., Venofer®	4 h di FeS-bicarb I.V.
1	0,09	0,99	0,49
2	0,13	1,06	0,36
3	0,11	0,51	0,93
4	0,08	1,24	0,92
5		1,07	0,49
Media	0,1	0,97	0,64
Err. std.	0,01	0,12	0,12

Il BUN e la creatinina plasmatici erano simili per entrambi FeS, Venofer® e FeS-bicarb come mostrato nelle Tabelle 5 e 6 nel seguito.

Tabella 5:			
BUN - Plasma			
Sessione n.	Controllo	4 h di FeS I.V., Venofer®	4 h di FeS-bicarb I.V.
1	28	20	23
2	22	18	23
3	23	22	22
4	35	25	24
5		25	28
Media	27	22	24

Tabella 6:			
Creatinina - Plasma			
Sessione n.	Controllo	4 h di FeS I.V., Venofer®	4 h di FeS-bicarb I.V.
1	0,32	0,27	0,34
2	0,31	0,29	0,31
3	0,31	0,28	0,31
4	0,31	0,25	0,32
5		0,32	0,30
Media	0,31	0,28	0,32

### Esempio 3

La composizione a base di FeS-bicarb dell'Esempio 1 è stata filtrata e posta in una fiala e aveva una concentrazione di FeS di 12 mg/ml (CoreRx lotto n. 111002-18011). L'osmolarità di questa soluzione da 12 mg/ml era di 831 mOsm. Per iniezione di saccarosio di ferro Venofer® 20 mg/ml, American Regent, lotto n. 8243A, l'osmolarità era 1742 mOsm. Queste misurazioni di osmolarità sono state realizzate senza diluizione.

### Esempio 4

Un Western blot di rene a 18 ore post-somministrazione di composizioni di ferro acquose è mostrato nella Fig. 2 e nella Tabella 7:

Tabella 7

<b>Rene</b>	<b>Normale</b>	<b><u>Venofer</u></b>	<b>RBT3</b>
<b>HO-1 mRNA</b>	0,1 ± 0,04	1,59 ± 0,21	2,34 ± 0,23
		<0,001	<0,001 (<0,05)
<b>Ftn LC mRNA</b>	1,10 ± 0,06	1,36 ± 0,04	1,47 ± 0,09
		<0,01	<0,02 (NS)
<b>Ftn HC mRNA</b>	1,38 ± 0,01	1,38 ± 0,03	1,49 ± 0,06
		NS	NS (<0,05)*
<b>Fegato</b>			
<b>Fegato</b>	<b>Normale</b>	<b><u>Venofer</u></b>	<b>RBT3</b>
<b>HO-1 mRNA</b>	0,10 ± 0,01	0,97 ± 0,012	0,64 ± 0,12
		<0,001	<0,01 (0,085)
<b>Ftn LC mRNA</b>	3,65 ± 0,15	4,02 ± 0,1	3,63 ± 0,13
		NS	NS
<b>Ftn HC mRNA</b>	1,71 ± 0,11	1,82 ± 0,1	1,71 ± 0,14
		NS	NS

A sinistra, è un Western blot specifico della catena pesante di rene a 18 h post-SnPP, FeS (Venofer) o Fe+ SnPP. N = controllo normale. Glic è glicerolo, usato come controllo positivo di ferritina di catena H. N = campioni normali (controlli). Come è evidente, Fe induce un aumento della catena pesante nel rene.

Esempio 5

Un paziente affetto da malattia cronica del rene è trattato mediante iniezione endovenosa usando la composizione a base di ferro acquosa di saccarosio di ferro e bicarbonato dell'Esempio 1.

#### Esempio 6

Un paziente sottoposto a trapianto di organo è trattato mediante iniezione endovenosa usando la composizione a base di ferro acquosa di saccarosio di ferro e bicarbonato dell'Esempio 1.

#### Esempio 7

Un paziente sottoposto a trapianto di organo è trattato mediante iniezione endovenosa usando la composizione a base di ferro acquosa di saccarosio di ferro e bicarbonato dell'Esempio 1, in combinazione con protoporfirina di stagno.

#### Esempio 8

Tre campioni di ferro-saccarosio (S1, S2) e ferro-destrano (S3) sono stati caratterizzati mediante una varietà di tecniche analitiche. S1 è stato preparato conformemente all'Esempio 1 di cui sopra. S2 è il prodotto disponibile in commercio, Venofer® (iniezione di saccarosio di ferro). S3 è il prodotto disponibile in commercio INFED® (iniezione di destrano di ferro). I risultati sono riassunti nella Tabella 8 nel seguito.

<b>TABELLA 8: confronto tra l'Esempio 1 e Venofer® e INFED®</b>				
<b>ANALISI</b>		<b>S1 5 ML DI LIQUIDO STERILE DI FES FIALA NON MARCATA (6R) LOTTO: AK2087</b>	<b>S2 VENOFER (INIEZIONE DI SACCAROSIO DI FERRO, USP) (20 MG/ML) LOTTO: 9043</b>	<b>S3 INFED (INIEZIONE DI DESTRANO DI FERRO, USP) (50 MG/ML) LOTTO: 18W11A</b>
GPC	M <sub>P</sub>	29.239	35.709	83.090
	P <sub>m</sub>	34.355	50.855	92.838
	M <sub>n</sub>	23.881	31.345	70.640
	PDI	1,44	1,62	1,31
DLS	Media Z	15,30 nm	15,41 nm	16,88 nm

	PDI	0,32		0,31		0,21	
Potenziale zeta	Potenziale zeta	-10,16 mV		Nessuna lettura stabile ottenuta		-2,61 mV	
	Temp. di potenziale zeta	25,0 °C				25,0 °C	
	pH	10,70				10,23	
	Temp. di pH	25,0 °C				22,2 °C	
AFM	Ubicazione	1	2	1	2	1	2
	Altezza media	2,38 nm	2,43 nm	3,88 nm	3,49 nm	4,20 nm	3,23 nm
	Altezza min	1,34 nm	1,16 nm	0,99 nm	1,20 nm	1,19 nm	0,91 nm
	Altezza max	3,62 nm	3,73 nm	8,35 nm	7,76 nm	10,19 nm	7,23 nm
	$\sigma$	0,61	0,73	1,53	1,33	1,46	1,47
	N. di particelle	21	29	84	52	117	49
TOC		7,69%		12,14%		8,69%	
Osmolalità		1540 mOsm/kg		1681 mOsm/kg		529 mOsm/kg	
Fe <sup>3+</sup> contro Fe <sup>2+</sup>	Fe(II)	0,41 mg/ml		3,16 mg/ml		0,44 mg/ml	
	Fe(III)	11,43 mg/ml		16,90 mg/ml		50,90 mg/ml	
	Fe totale	11,87 mg/ml		20,02 mg/ml		51,33 mg/ml	
	% di Fe(II)	3,4%		15,8%		0,8%	
ICP-OES	Fe totale	1,07% in peso		1,77% in peso		4,51% in peso	
	Na totale	1,26% in peso		0,50% in peso		0,42% in peso	
Screening ICP-MS per elementi aggiuntivi	Sommario	Nessun elemento trovato >50 ppm, si veda il corpo di rapporto per ulteriori		Nessun elemento trovato >80 ppm, si veda il corpo di rapporto per		Nessun elemento trovato >30 ppm, si veda il corpo di rapporto per ulteriori	
	Elemento a conc. più alta	Si, 50 ppm		Si, 80 ppm		Si, 30 ppm	
Famiglia chimica mediante FT-IR		Saccarosio		Saccarosio		Destrano	

<b>TABELLA 8: confronto tra l'Esempio 1 e Venofer® e INFED® (continua)</b>							
<b>ANALISI</b>		<b>S1 FIALA NON MARCATA DA 5 ML DI LIQUIDO STERILE DI FES (6R) LOTTO: AK2087</b>		<b>S2 VENOFER (INIEZIONE DI SACCAROSIO DI FERRO, USP; 20 MG/ML) LOTTO: 9043</b>		<b>S3 INFED (INIEZIONE DI DESTRANO DI FERRO, USP; 50 MG/ML) LOTTO: 18W11A</b>	
Spettroscopia NMR	<sup>1</sup> H NMR	Picchi ampi osservati, gli spostamenti chimici sono coerenti con destrano		Picchi molto ampi osservati, gli spostamenti chimici sono coerenti con saccarosio		Picchi ampi osservati, gli spostamenti chimici sono coerenti con destrano	
	<sup>13</sup> C NMR	I picchi sono coerenti con saccarosio		I picchi sono coerenti con saccarosio, sebbene leggermente più ampi di S1		I picchi sono coerenti con destrano	
XRD (materiale liofilizzato)		Fasi rilevate	% in peso	Fasi rilevate	% in peso	Fasi rilevate	% in peso
		Na <sub>4</sub> Fe <sub>2</sub> O <sub>5</sub> : ossido di ferro sodico monoclino, SG: P21/n (14) PDF n. 04- 013-8809	5,2	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> : saccarosio monoclino, S.G.: P21 (4) PDF n. 02- 063-8998	42,9	Na <sub>4</sub> Fe <sub>2</sub> O <sub>5</sub> : ossido di ferro sodico monoclino, SG: P21/n (14) PDF n. 04-013- 8809	18,8
		Materiali amorfi	94,8	Materiali amorfi	57,1	Materiali amorfi	81,2
XRD (materiale purificato con MWCO per rimuovere zuccheri)		Fasi rilevate	% in peso	Fasi rilevate	% in peso	Fasi rilevate	% in peso
		Fe <sub>2,67</sub> O <sub>4</sub> : maghemite cubica, SG:P4332 (212) PDF n. [04-021- 3968]	81,0	Fe <sub>2,67</sub> O <sub>4</sub> : maghemite cubica, SG:P4332 (212) PDF n. [04-021-3968]	89,9	Fe <sub>2,67</sub> O <sub>4</sub> : maghemite cubica, SG:P4332 (212) PDF n. [04-021- 3968]	74,0
		FeOOH: ossiidrossido di ferro ortorombico	19,0	FeOOH: ossiidrossido di ferro ortorombico	10,1	FeOOH: ossiidrossido di ferro ortorombico	26,0

			PDF n. [04-003-2900]		PDF n. [04-003-2900]		PDF n. [04-003-2900]		
Degradazione da acido per ferro(III) labile			1,48%		2,27%		1,34%		
TGA	Temp.	Cond.	Perdita di peso (%)						
	TA a 100°	Azo.	3,4		1,1		3,7		
		Aria	2,5		0,9		4,7		
	da 100 °C a 245°	Azo.	42,7		45,0		8,2		
		Aria	43,2		43,0		7,8		
	da 245 °C a 530°	Azo.	30,2		35,4		47,1		
		Aria	37,4		45,1		63,0		
	da 245 °C a 530°	Azo.	11,8		8,7		20,8		
		Aria	5,7		0,7		3,0		
	Residuo a 800 °C	Azo.	12,0		9,8		20,0		
		Aria	11,2		10,3		21,4		
	Transizioni termiche osservate								
		Teso <sub>1</sub> (°C)		33,8		29,2		39,2	
		ΔHeso <sub>1</sub> (J/g)		88,0		47,6		99,9	
	Teso <sub>2</sub> (°C)		154,9		144,6		N/A		
	Insorgenza Teso <sub>2</sub> (°C)		141,0		127,1		N/A		
	ΔHeso <sub>2</sub> (J/g)		171,7		148		N/A		

Infine, il campione S1 come ricevuto è stato titolato in triplicato con HCl diluito per determinare il valore di idrossido in soluzione iniettabile di saccarosio di ferro. I punti di estremità delle titolazioni erano pH = 7,0. Usando l'ipotesi che tutte le specie basiche titolate fossero dall'idrossido associato ai nuclei di ossiidrossido ferrico, si è assunto che il numero totale di moli di H<sup>+</sup> usate nella titolazione fosse uguale al numero di moli di OH<sup>-</sup>. Considerando TOC, e Pm (o Mn) mediante GPC, la formula molecolare di saccarosio di ferro in S1 è stata calcolata come nel seguito:

Calcolo basato su Pm:  $[\text{Na}_6\text{Fe}_5\text{O}_8(\text{OH})_5 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]_{13} \cdot 73(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11})$   
 Calcolo basato su Mn:  $[\text{Na}_6\text{Fe}_5\text{O}_8(\text{OH})_5 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]_9 \cdot 51(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11})$ . La Tabella 9 nel seguito mostra dettagli della preparazione e identificazione del campione.

<b>TABELLA 9: preparazione e identificazione del campione</b>		
<b>NUMERO DI CAMPIONE</b>	<b>DESCRIZIONE</b>	<b>DATA DI RICEZIONE</b>
S1	Fiala non marcata da 5 ml di liquido sterile di FeS (6R) Lotto: AK2087 Quantitativo: 15	11 luglio 2019
S2	Venofer (iniezione di saccarosio di ferro, uSP) 100 mg di ferro elementare per 5 ml (20 mg/ml) Lotto: 9043 Scad.: FEB 21 (2 ciascuno di 10 x 5 ml)	11 luglio 2019
S3	INFeD (iniezione di destrano di ferro, uSP) 100 mg di ferro elementare/2 ml (50 mg/ml) Scad.: 10/2021 Lotto: 18W11A (4 ciascuno di 10 x 2 ml)	11 luglio 2019

Preparazione del campione: i campioni sono stati liofilizzati a un residuo essiccato precedentemente all'analisi, salvo altrimenti dichiarato.

Cromatografia a permeazione di gel (GPC): GPC è usata per determinare la distribuzione dei pesi molecolari di polimeri. Nell'analisi GPC, una soluzione del polimero è fatta passare attraverso una colonna impaccata con un gel poroso. Il campione è separato in base alla taglia molecolare con molecole più grandi che eluiscono più velocemente delle molecole più piccole. Il tempo di ritenzione di ciascun componente è rilevato e confrontato con una curva di calibrazione, e i dati risultanti sono quindi usati per calcolare la distribuzione dei pesi molecolari per il campione.

Una distribuzione di pesi molecolari invece che un peso molecolare unico è caratteristica di tutti i tipi di polimeri sintetici. Per caratterizzare questa distribuzione, sono usate medie statistiche. Le più comuni di queste medie sono il "peso molecolare medio numerico" ( $M_n$ ) e il "peso molecolare medio ponderale" ( $M_w$ ).

Il peso molecolare medio numerico è simile alla media aritmetica standard associata a un gruppo di numeri. Quando applicato a polimeri, il peso molecolare medio numerico si riferisce al peso molecolare medio delle molecole nel polimero. Il peso molecolare medio numerico è calcolato dando la stessa quantità di significatività a ciascuna molecola indipendentemente dal suo peso molecolare individuale. Il peso molecolare medio numerico è calcolato mediante la seguente formula dove  $N_i$  è il numero di molecole con una massa molare uguale a  $M_i$ .

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}$$

Leggermente differente nel calcolo e molto differente per significato è il peso molecolare medio ponderale,  $M_w$ . Il peso molecolare medio ponderale è un altro descrittore statistico della distribuzione dei pesi molecolari che fornisce più significatività delle molecole più grandi che delle molecole più piccole nella distribuzione. La formula nel seguito mostra il calcolo statistico del peso molecolare medio ponderale.

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i}$$

Per GPC, i campioni sono stati preparati diluendo in tampone di fosfato (secondo il metodo a monografia USP) e analizzati per determinare le distribuzioni dei pesi molecolari in ciascun campione. I risultati sono riassunti nel seguito nelle Tabelle 10-12. I cromatogrammi rappresentativi dall'analisi sono presentati nelle Figg. 3-9.

Vi sono due ragioni generali per il peso molecolare medio ponderale. Primo,

se si confronta, per esempio, la tenacità, le molecole più lunghe influenzano la tenacità della distribuzione del polimero più di quanto facciano le molecole più corte. Il calcolo del peso molecolare medio ponderale dà enfasi a queste molecole più lunghe, e fornisce un numero comparativo che può descrivere il contributo relativo delle molecole lunghe presenti in una distribuzione dei pesi molecolari. Il peso molecolare medio ponderale è anche un numero che è direttamente correlato alla determinazione del peso molecolare dei polimeri mediante diffusione della luce, diffusione di neutroni a piccolo angolo (SANS), e velocità di sedimentazione.

Secondo, il peso molecolare medio ponderale fornisce una conoscenza sulla sagoma di una distribuzione dei pesi molecolari. Questo valore, in connessione con il peso molecolare medio numerico, fornisce una determinazione del rapporto dell'ampiezza della distribuzione dei pesi molecolari definita come indice di polidispersità o PI. Il PI è definito come il rapporto di  $P_m/M_n$ . Più grande è il PI, più dispersa è la distribuzione. Il valore più basso che il PI può avere è 1. Questo rappresenta un campione monodisperso, un polimero con tutte le molecole nella distribuzione che sono dello stesso peso molecolare.

Non come comunemente riferito, ma fornito è anche il "peso molecolare di media z" ( $M_z$ ). Questa media del peso molecolare è un valore che descrive ulteriormente la distribuzione dei pesi molecolari. Questo valore può essere prontamente determinato dall'equilibrio di sedimentazione.

Talvolta è incluso anche il peso molecolare di picco,  $M_p$ . Il valore del peso molecolare di picco è definito come la moda della distribuzione dei pesi molecolari. Significa il peso molecolare che è più abbondante nella distribuzione. Questo valore dà anche una conoscenza sulla distribuzione dei pesi molecolari.

La maggior parte delle misurazioni di GPC è fatta relativamente a uno

standard di polimero differente (solitamente polistirene). L'accuratezza dei risultati dipende da quanto da vicino le caratteristiche del polimero che è analizzato combaciano con quelle dello standard usato. L'errore atteso nella riproducibilità tra serie differenti di determinazioni, calibrate separatamente, è ca. il 5-10% ed è caratteristico della precisione limitata delle determinazioni GPC. Pertanto, i risultati di GPC sono massimamente utili quando è realizzato un confronto tra la distribuzione dei pesi molecolari di campioni differenti durante la stessa serie di determinazioni.

Precisioni e bias di GPC sono basati su dati statistici come una media delle misurazioni, deviazione standard, differenza percentuale relativa, e/o deviazione standard relativa percentuale. Per le analisi quantitative, le quantità elencate nelle tabelle di cui sopra sono state riferite a una quantità nota di standard e sono quantitative. Sono state preparate curve di calibrazione, e le informazioni sulla deviazione standard relativa e la differenza percentuale relativa sono riportate nel rapporto di cui sopra. Per la semiquantitativa, una riproducibilità tipica come determinato mediante un controllo del processo statistico del sistema di misurazione è stimata a circa il 10% (a un livello di confidenza del 95%,  $k \sim 2$ ). Questa riproducibilità è una stima dell'incertezza di una singola misurazione standard nel tempo, e l'incertezza di una misurazione specifica deve essere determinata su una base caso per caso. Per le analisi qualitative, gli standard di riferimento analitici non sono stati analizzati per confermare la presenza dei componenti individuali. In tali casi non è possibile assegnare un valore numerico all'"incertezza" delle corrispondenze fornite.

Si noti che i campioni S1 e S2 contenevano due picchi con distribuzioni dei pesi molecolari uniche mentre il campione S3 conteneva tre picchi. Si noti

anche che un  $M_p$  non si è potuto calcolare per il "Picco 2" (picco a piccola molecola, verosimilmente saccarosio) perché il picco ha saturato il rilevatore; i campioni sono stati analizzati a una concentrazione che era appropriata per la caratterizzazione delle specie di peso molecolare più alto, a scapito della saturazione del rilevatore con le specie di peso molecolare inferiore di minore interesse.

TABELLA 10: sommario dei dati GPC per il campione S1									
DESCRIZIONE DEL CAMPIONE	PREPARAZIONE	INIEZIONE	$M_p$	$M_n$	$P_m$	$M_z$	PD		
Picco di S1 1	1	1	28.558	23.158	33.501	49.457	1,45		
		2	28.558	22.954	34.613	52.469	1,51		
	2	1	29.137	24.149	33.976	47.218	1,41		
		2	29.727	24.329	34.908	51.148	1,44		
	3	1	29.727	24.188	34.658	48.687	1,43		
		2	29.727	24.510	34.471	47.718	1,41		
	<b>Media</b>			<b>29.239</b>	<b>23.881</b>	<b>34.355</b>	<b>49.450</b>	<b>1,44</b>	
	Deviazione standard			575	655	520	2.028	0,04	
	% di RSD			2,0	2,7	1,5	4,1	2,6	
	Picco di S1 2	1	1	rivelatore saturo; max di picco non disponibile <sup>1</sup>	256	281	306	1,10	
2			256		281	306	1,10		
2		1	249		278	307	1,12		
		2	249		278	307	1,12		
3		1	251		279	306	1,11		
		2	251		279	306	1,11		
<b>Media</b>			<b>N/A</b>		<b>252</b>	<b>279</b>	<b>306</b>	<b>1,11</b>	
Deviazione standard			N/A		3	1	1	0,01	
% di RSD			N/A		1,3	0,5	0,2	0,8	

TABELLA 11: sommario dei dati GPC per il campione S2									
DESCRIZIONE DEL CAMPIONE	PREPARAZIONE	INIEZIONE	M <sub>P</sub>	M <sub>n</sub>	P <sub>m</sub>	M <sub>z</sub>	PD		
Picco di S2 1	1	1	35.587	30.778	51.407	91.042	1,67		
		2	34.884	31.180	50.455	83.903	1,62		
	2	1	35.587	31.206	51.080	86.265	1,64		
		2	35.587	31.442	50.835	84.143	1,62		
	3	1	36.303	31.997	50.985	82.454	1,59		
		2	36.303	31.469	50.368	80.420	1,60		
	<b>Media</b>			<b>35.709</b>	<b>31.345</b>	<b>50.855</b>	<b>84.705</b>	<b>1,62</b>	
	Deviazione standard			535	404	392	3.660	0,03	
	% di RSD			1,5	1,3	0,8	4,3	1,7	
Picco di S2 2	1	1	rivelatore saturo; max di picco non	242	286	327	1,18		
		2		243	286	328	1,18		
	2	1		241	287	331	1,19		
		2		240	287	331	1,20		
	3	1		245	286	326	1,17		
		2		243	288	332	1,19		
	<b>Media</b>			<b>N/A</b>	<b>242</b>	<b>287</b>	<b>329</b>	<b>1,18</b>	
	Deviazione standard			N/A	2	1	2	0,01	
	% di RSD			N/A	0,7	0,3	0,8	0,9	

TABELLA 12: sommario dei dati GPC per il campione S3							
DESCRIZIONE DEL CAMPIONE	PREPARAZIONE	INIEZIONE	M <sub>P</sub>	M <sub>N</sub>	P <sub>m</sub>	M <sub>z</sub>	PD
Picco di S3 1	1	1	83.090	71.378	93.965	124.983	1,32
		2	83.090	70.426	92.618	121.641	1,32
	2	1	83.090	70.660	92.582	121.443	1,31
		2	83.090	70.030	92.525	123.025	1,32
	3	1	83.090	70.719	92.723	121.912	1,31

		2	83.090	70.627	92.615	121.900	1,31
	<b>Media</b>		<b>83.090</b>	<b>70.640</b>	<b>92.838</b>	<b>122.484</b>	<b>1,31</b>
	Deviazione standard		0	440	556	1.342	0,00
	% di RSD <sup>1</sup>		0,0	0,6	0,6	1,1	0,3
Picco di S3 2	1	1	6.749	4.235	6.558	9.203	1,55
		2	6.607	4.209	6.503	9.096	1,55
	2	1	6.607	4.179	6.492	9.135	1,55
		2	6607	4.156	6.434	8.988	1,55
	3	1	6607	4.175	6.496	9.143	1,56
		2	6607	4.162	6.488	9.140	1,56
	<b>Media</b>		<b>6.631</b>	<b>4.186</b>	<b>6.495</b>	<b>9.118</b>	<b>1,55</b>
	Deviazione standard		58	30	40	72	0,01
	% di RSD <sup>1</sup>		0,9	0,7	0,6	0,8	0,3
Picco di S3 3	1	1	373	305	331	353	1,09
		2	373	310	334	355	1,08
	2	1	373	334	353	367	1,06
		2	373	342	359	373	1,05
	3	1	373	342	360	374	1,05
		2	373	344	361	375	1,05
	<b>Media</b>		<b>373</b>	<b>330</b>	<b>350</b>	<b>366</b>	<b>1,06</b>
	Deviazione standard		0	17	14	10	0,02
	% di RSD <sup>1</sup>		0,0	5,3	3,9	2,7	1,4

### Diffusione dinamica della luce

Un'analisi PSD è stata condotta con un diffrattore laser. La misurazione calcola una distribuzione di volume dal motivo di diffrazione laser di una nuvola di particelle. Questi dati di diffusione grezzi sono quindi elaborati con un algoritmo e presentati sulla base del diametro sferico equivalente. I risultati sono stati riassunti su una base di volume (massa) in un istogramma che dà la percentuale di volume differenziale minore e maggiore della taglia indicata.

L'analisi granulometrica è stata condotta su uno strumento di diffusione dinamica della luce (DLS) Malvern® Zetasizer Nano ZS. La DLS è una tecnica di assieme che analizza la luce diffusa da particelle che si muovono con moto browniano e genera una distribuzione granulometrica basata sul tasso di diffusione delle particelle. I dati di diffusione grezzi sono elaborati usando un algoritmo complesso e presentati sulla base di un DIAMETRO IDRODINAMICO a intensità ponderata. La tecnica analitica è riassunta in ISO 22412:2008 Particle Size Analysis - Dynamic Light Scattering (DLS) come anche in ASTM E2490-09(2015) Standard Guide for Measurement of Particle Size Distribution of Nanomaterials in Suspension by Photon Correlation Spectroscopy (PCS).

I campioni come ricevuti erano acqua per iniezione (WFI) e analizzati mediante DLS per dare la dimensione fisica complessiva delle particelle. I risultati ponderati per intensità e volume dall'analisi sono presentati rispettivamente nella Tabella 13 e nella Tabella 14.

TABELLA 13: sommario dei risultati di DLS (intensità ponderata)									
ID DEL CAMPIONE	REPLICA	RISULTATI CUMULATIVI		RISULTATI DI NNLS <sup>1</sup>					
		MEDIA Z <sup>2</sup>	PDI <sub>3</sub>	PICCO 1 (nm)	LARGHEZZA DI PICCO 1 (nm)	PICCO 2 (nm)	LARGHEZZA DI PICCO 2 (nm)	PICCO 3 (nm)	LARGHEZZA DI PICCO 3 (nm)
S1	Replica 1	13,55	0,30	17,12	10,45	2419	1460	nessun picco	nessun picco
	Replica 2	14,72	0,35	14,48	6,11	522,4	218,3	4668	838,3
	Replica 3	17,64	0,30	16,22	6,91	705,5	425,1	4527	959,1
	<b>Media</b>	<b>15,30</b>	<b>0,32</b>	<b>15,94</b>	<b>7,82</b>	<b>1215,6</b>	<b>701,1</b>	<b>4598</b>	<b>898,7</b>
S2	Replica 1	15,76	0,32	18,79	10,60	3271	1497	nessun picco	nessun picco
	Replica 2	15,69	0,35	16,39	7,83	1017	574,5	4213	977,6
	Replica 3	14,79	0,27	18,33	11,76	4037	1136	672,2	377,2
	<b>Media</b>	<b>15,41</b>	<b>0,31</b>	<b>17,84</b>	<b>10,06</b>	<b>2775</b>	<b>1069,2</b>	<b>2442,6</b>	<b>677,4</b>
S3	Replica 1	17,35	0,22	20,9	11,18	3726	1240	379,5	232,3
	Replica 2	16,17	0,20	18,43	8,10	3444	1425	nessun picco	nessun picco
	Replica 3	17,13	0,22	20,27	9,95	3466	1276	812,4	370,1
	<b>Media</b>	<b>16,88</b>	<b>0,21</b>	<b>19,87</b>	<b>9,74</b>	<b>3545,3</b>	<b>1313,7</b>	<b>596,0</b>	<b>301,2</b>

TABELLA 13: sommario dei risultati di DLS (intensità ponderata)									
ID DEL CAMPIONE	REPLICA	RISULTATI CUMULATIVI		RISULTATI DI NNLS <sup>1</sup>					
		MEDIA Z <sup>2</sup>	PDI <sub>3</sub>	PICCO 1 (nm)	LARGHEZZA DI PICCO 1 (nm)	PICCO 2 (nm)	LARGHEZZA DI PICCO 2 (nm)	PICCO 3 (nm)	LARGHEZZA DI PICCO 3 (nm)
<sup>1</sup> NNLS = dati dei minimi quadrati non negativi <sup>2</sup> Media Z = distribuzione granulometrica media, <sup>3</sup> PDI = indice di polidispersità									

TABELLA 14: sommario dei risultati di DLS (volume ponderato)									
ID DEL CAMPIONE	REPLICA	RISULTATI CUMULATIVI		RISULTATI DI NNLS <sup>1</sup>					
		MEDIA Z <sup>2</sup>	PDI <sub>3</sub>	PICCO 1 (nm)	LARGHEZZA DI PICCO 1 (nm)	PICCO 2 (nm)	LARGHEZZA DI PICCO 2 (nm)	PICCO 3 (nm)	LARGHEZZA DI PICCO 3 (nm)
S1	Replica 1	13,55	0,30	7,94	3,89	1354	455,9	nessun picco	nessun picco
	Replica 2	14,72	0,35	2,89	0,65	9,292	3,711	714,3	317,9
	Replica 3	17,64	0,30	10,70	4,11	970,4	413,9	4904	993,8
	<b>Media</b>	<b>15,30</b>	<b>0,32</b>	<b>7,18</b>	<b>2,88</b>	<b>777,9</b>	<b>291,2</b>	<b>2809</b>	<b>655,9</b>
	Replica 1	15,76	0,32	8,55	4,46	1398	406,3	4450	1157
	Replica 2	15,69	0,35	8,19	4,39	1138	406,7	nessun picco	nessun picco
	Replica 3	14,79	0,27	8,88	4,21	nessun picco	nessun picco	nessun picco	nessun picco
	<b>Media</b>	<b>15,41</b>	<b>0,31</b>	<b>8,54</b>	<b>4,35</b>	<b>1268,0</b>	<b>406,5</b>	<b>4450</b>	<b>1157,0</b>
S3	Replica 1	17,35	0,22	11,66	5,03	nessun picco	nessun picco	nessun picco	nessun picco
	Replica 2	16,17	0,20	11,61	4,62	4511	1135	nessun picco	nessun picco
	Replica 3	17,13	0,22	11,66	5,03	1210	430,7	nessun picco	nessun picco
	<b>Media</b>	<b>16,88</b>	<b>0,21</b>	<b>11,64</b>	<b>4,89</b>	<b>2860,5</b>	<b>782,9</b>	<b>nessun picco</b>	<b>nessun picco</b>
<sup>1</sup> NNLS = dati dei minimi quadrati non negativi; <sup>2</sup> Media Z = distribuzione granulometrica media; <sup>3</sup> PDI = indice di polidispersità									

### Potenziale zeta

I campioni sono stati preparati per il potenziale zeta diluendo in tampone (lo strumento non è riuscito a conseguire letture stabili quando diluito in NaCl 10 mM secondo Nanomaterials 2018, 8, 25). Il pH e la temperatura sono stati registrati al

momento dell'analisi del potenziale zeta. I risultati sono riassunti dalla Tabella 6 alla Tabella 8 nel seguito. Non si è potuta ottenere una lettura stabile per S2. I risultati per l'esecuzione di prove del potenziale zeta sono riportati nelle Tabelle 15-17.

TABELLA 15: dati di potenziali zeta per S1 di campione										
ID DEL CAMPIONE	ALI-QUOTA	RIP.	POTENZIALE ZETA (mV)	MEDIA POTENZIALE ZETA (mV)	TEMP DI POTENZIALE ZETA (°C)	pH	TEMPERATURA DI pH (°C)	CONDUTTIVITÀ (mS/cm)	MEDIA CONDUTTIVITÀ (mS/cm)	TEMP. DI CONDUTTIVITÀ (°C)
V1KCJ40 5 S1	1	1	-8,77	-10,42	25	10,7	25	10,0	11,2	25
		2	-8,87					11,1		
		3	-12,2					11,6		
		4	-9,08					11,7		
		5	-13,2					11,8		
	2	1	-10,1	-9,90	25	10,6	25	10,1	11,4	25
		2	-8,86					11,4		
		3	-8,25					11,7		
		4	-11,4					11,8		
			5	-10,9					11,9	

TABELLA 16: dati di potenziali zeta per S2 di campione (non si è potuta raggiungere una lettura stabile)											
ID DEL CAMPIONE	ALI-QUOTA	RIP.	POTENZIALE ZETA (mV)	MEDIA POTENZIALE ZETA (mV)	TEMP DI POTENZIALE ZETA (°C)	pH	TEMPERATURA DI pH (°C)	CONDUTTIVITÀ (mS/cm)	MEDIA CONDUTTIVITÀ (mS/cm)	TEMP. DI CONDUTTIVITÀ (°C)	
V1KCJ405 S2	1	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
		2	N/A					N/A			
		3	N/A					N/A			
		4	N/A					N/A			
		5	N/A					N/A			
	2	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		2	N/A						N/A		
		3	N/A						N/A		
		4	N/A						N/A		
		5	N/A								

TABELLA 17: dati di potenziali zeta per S3 di campione										
ID DEL CAMPIONE	ALI-QUOTA	RIP.	POTENZIALE ZETA (mV)	MEDIA POTENZIALE ZETA (mV)	TEMP DI POTENZIALE ZETA (°C)	pH	TEMPERATURA DI pH (°C)	CONDUTTIVITÀ (mS/cm)	MEDIA CONDUTTIVITÀ (mS/cm)	TEMP. DI CONDUTTIVITÀ (°C)
V1KCJ405 S3	1	1	-3,35	-2,972	25	10,25	22,0	7,15	7,828	25
		2	-2,23					7,80		
		3	-2,13					8,00		
		4	-3,41					8,08		
		5	-3,74					8,11		
	2	1	-1,78	-2,254	25	10,2	22,4	7,32	8,012	25
		2	-3,07					7,99		
		3	-0,37					8,19		
		4	-2,53					8,27		
		5	-3,52					8,29		

### Microscopio a forza atomica (AFM)

I campioni come ricevuti sono stati diluiti 50 x usando acqua filtrata MilliQ (18,2 MΩ/cm, 4 ppb di TOC). Circa 10 µl di queste soluzioni diluite sono stati depositati su pezzi appena clivati di mica e lasciati incubare per circa un minuto. I campioni sono stati quindi risciacquati 5 x con acqua MilliQ ed essiccati con azoto. Due aree da 1 µm x 1 µm sono state sottoposte a formazione di immagini su ciascun campione. Le differenze di topografia di queste immagini sono presentate in colori dove il marrone è basso e il bianco è alto. Gli intervalli di z sono annotati sulla barra in scala verticale sul lato destro delle immagini. Viste prospettive (3D) di queste superfici sono incluse anch'esse con esagerazioni verticali annotate nelle didascalie.

Analisi granulometriche sono state eseguite per caratterizzare le altezze delle particelle presenti all'interno di ciascuna area. È stata usata una soglia di altezza di 0,5 nm per identificare le particelle d'interesse escludendo al contempo le peculiarità non rappresentative. I risultati di altezza massima, altezza minima, e altezza media sono riassunti nella Tabella 18.

<b>TABELLA 18: risultati dell'analisi granulometrica</b>						
<b>ID DEL CAMPIONE</b>	<b>UBICAZIONE</b>	<b>ALTEZZA MEDIA (nm)</b>	<b>ALTEZZA MINIMA (nm)</b>	<b>ALTEZZA MASSIMA (nm)</b>	<b><math>\sigma</math></b>	<b>N. DI PARTICELLE</b>
S1	1	2,38	1,34	3,62	0,61	21
	2	2,43	1,16	3,73	0,73	29
S2	1	3,88	0,99	8,35	1,53	84
	2	3,49	1,20	7,76	1,33	52
S3	1	4,20	1,19	10,19	1,46	117
	2	3,23	0,91	7,23	1,47	49
Bianco	1	n/a	n/a	n/a	n/a	0

Le analisi della sezione sono state eseguite per misurare manualmente le altezze di particelle rappresentative. L'analisi in sezione per S1 in corrispondenza dell'ubicazione 1 è mostrata nelle Figg. 10, 11, e 12. I risultati sono riassunti nella Tabella 19 per ciascuno tra S1, S2, un S3.

<b>TABELLA 19: risultati dell'analisi granulometrica</b>				
<b>ID DEL CAMPIONE</b>	<b>UBICAZIONE</b>	<b>ALTEZZA DI PARTICELLA 1 (nm)</b>	<b>ALTEZZA DI PARTICELLA 2 (nm)</b>	<b>ALTEZZA DI PARTICELLA 3 (nm)</b>
S1	1	3,50	3,35	2,63
	2	3,67	2,67	2,44
S2	1	4,96	2,68	4,77
	2	3,51	3,95	6,48
S3	1	3,75	6,81	3,89
	2	4,37	4,27	3,81

Carbonio organico totale (TOC)

Il carbonio organico totale (TOC) nei campioni è stato calcolato sottraendo il carbonio inorganico al carbonio totale (determinato usando un analizzatore di carbonio a combustione). I risultati sono riassunti nella Tabella 20 nel seguito.

TABELLA 20: calcoli per carbonio organico totale (TOC)								
ID DEL CAMPIONE	REPLICA	CARBONIO TOTALE (% in peso) <sup>1</sup>	CARBONIO TOTALE MEDIO	% di RSD	CARBONIO INORGANICO TOTALE	CARBONIO TOTALE MEDIO	% di RSD <sub>2</sub>	CARBONIO ORGANICO TOTALE MEDIO (% in peso) <sup>1</sup>
S1	Rep 1	8,07	7,92	1,8%	0,23%	0,23	0,0%	7,69
	Rep 2	7,89			0,23%			
	Rep 3	7,79			0,23%			
S2	Rep 1	12,27	12,17	0,8%	0,03%	0,03	0,0%	12,14
	Rep 2	12,15			0,03%			
	Rep 3	12,08			0,03%			
S3	Rep 1	8,56	8,69	2,5%	< 0,03%	< 0,03	-	8,69
	Rep 2	8,57			< 0,03%			
	Rep 3	8,94			< 0,03%			

*1% in peso = percentuale in peso;<sup>2</sup> % di RSD = deviazione standard relativa*

### Osmolalità

L'osmolalità dei campioni è stata misurata usando un metodo a pressione di vapore. Il metodo a pressione di vapore determina l'osmolalità a temperatura ambiente con il campione in equilibrio naturale. I risultati della prova di osmolalità sono riassunti nella Tabella 21.

TABELLA 21: sommario dei risultati di osmolalità				
ID DEL CAMPIONE	REPLICA	OSMOLALITÀ (mOsm/kg)	OSMOLALITÀ MEDIA (mOsm/kg)	% di RSD <sup>1</sup>
S1	Replica 1	1539	1540	0,1%
	Replica 2	1541		
	Replica 3	1539		
S2	Replica 1	1677	1681	0,2%
	Replica 2	1682		

	Replica 3	1683		
S3	Replica 1	533	529	0,7%
	Replica 2	527		
	Replica 3	526		

### Fe<sup>+3</sup> contro Fe<sup>+2</sup>

Un'aliquota di ciascun campione è stata diluita in acido cloridrico concentrato secondo il riferimento del metodo fornito dal cliente, Gupta et al.1 I campioni sono stati quindi analizzati conformemente al metodo delineato da Strokey.2 I risultati sono mostrati nella Tabella 22.

TABELLA 22: sommario della speciazione del ferro											
ID DEL CAMPIONE	REPLICA	Fe(II) (mg/ml)	MEDIA Fe(II) (mg/ml)	% di RSD	Fe(III) (mg/ml)	MEDIA Fe(III) (mg/ml)	% di RSD	Fe (RIDOTTO; FERRO TOTALE, mg/ml)	MEDIA Fe(III) (mg/ml)	% di RSD	% di Fe(II)
S1	Replica 1	0,43	0,41	4,3%	11,20	11,43	1,8%	11,70	11,87	1,3%	3,4%
	Replica 2	0,41			11,60			12,00			
	Replica 3	0,39			11,50			11,90			
S2	Replica 1	3,16	3,16	1,6%	16,80	16,90	1,0%	19,90	20,03	1,2%	15,8%
	Replica 2	3,21			17,10			20,30			
	Replica 3	3,11			16,80			19,90			
S3	Replica 1	0,45	0,44	2,0%	51,70	50,90	1,7%	52,20	51,33	1,8%	0,8%
	Replica 2	0,43			51,00			51,40			
	Replica 3	0,43			50,00			50,40			

% di RSD = deviazione standard relativa

Screening elementare mediante spettrometria di massa/plasma  
accoppiato induttivamente (ICP/MS) e contenuto di ferro e di sodio totale  
mediante spettroscopia di emissione ottica/plasma accoppiato  
induttivamente (ICP/OES)

ICP/OES è una tecnica spettroscopica usata per identificare e quantificare componenti per elemento. In ICP, l'accoppiamento induttivo trasferisce energia ad alta frequenza a un flusso di gas inerte, che contiene il campione come aerosol. L'energia fa vaporizzare l'aerosol, eccitando al contempo gli atomi liberi risultanti così che emettano luce. L'intensità di questa luce è quindi correlata alla concentrazione degli atomi emettitori. Questa tecnica richiede una calibrazione dello strumento e una verifica della calibrazione della seconda sorgente prima, durante e dopo il completamento della sequenza di sessione analitica. In aggiunta, bianchi di strumento seguono ciascuno standard di verifica di controllo. Ciò garantisce assenza di trascinamento durante la sequenza analitica. Le misurazioni della concentrazione degli elementi rilevanti fatte mediante ICP hanno un'incertezza tipicamente nell'intervallo dal 3 al 5% (al livello di confidenza del 95%). L'incertezza delle concentrazioni di elementi in tracce può essere significativamente più alta.

I campioni da S1 a S3 sono stati analizzati mediante ICP-MS per metalli e/o altri elementi. I campioni sono stati analizzati anche mediante ICP-OES per determinare il contenuto totale di ferro e sodio. I campioni sono stati analizzati come ricevuti in triplicato. I risultati sono riassunti nella Tabella 23-25.

<b>TABELLA 23: sommario degli elementi rilevati mediante ICP in S1</b>				
<b>ELEMENTO</b>	<b>CONCENTRAZIONE di S1 (ppm in % in peso)<sup>1</sup> REPLICA 1</b>	<b>CONCENTRAZIONE di S1 (ppm in % in peso)<sup>1</sup> REPLICA 2</b>	<b>CONCENTRAZIONE di S1 (ppm in % in peso)<sup>1</sup> REPLICA 3</b>	<b>MEDIA DI S1 CONCENTRAZIONE (ppm in % in peso)</b>
Li	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Be	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
B	4,2	4,1	4,1	4,1
Na <sup>2</sup>	1,27%	1,25%	1,25%	1,26%
Mg	0,9	0,9	0,9	0,9
Al	6,9	6,8	7,0	6,9
Si	50	49	51	50
P	2,3	2,5	2,5	2,4
K	10	10	10	10
Ca	2	1	<1	<2
SC	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ti	0,2	0,2	0,2	0,2
V	0,4	0,4	0,4	0,4

Cr	4,6	4,4	4,6	4,5
Mn	8,4	8,5	8,7	8,5
Fe <sup>2</sup>	1,07%	1,07%	1,07%	1,07%
Co	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ni	1,1	1,1	1,1	1,1
Cu	0,3	0,3	0,3	0,3
Zn	1,2	1,2	1,2	1,2
Ga	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ge	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
As	0,2	0,2	0,2	0,2
Se	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Rb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Sr	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Y	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Zr	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Nb	0,2	0,2	0,2	0,2
Mo	0,6	0,6	0,6	0,6
Ru	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Rh	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ag	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

TABELLA 23: sommario degli elementi rilevati mediante ICP in S1 (continua)

ELEMENTO	CONCENTRAZIONE di S1	CONCENTRAZIONE di S1	CONCENTRAZIONE di S1	MEDIA DI S1 CONCENTRAZIONE (ppm in % in peso)
	(ppm in % in peso) <sup>1</sup> REPLICA 1	(ppm in % in peso) <sup>1</sup> REPLICA 2	(ppm in % in peso) <sup>1</sup> REPLICA 3	
Cd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
In	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Sn	0,2	0,1	0,1	0,1
Sb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Te	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Cs	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ba	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
La	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ce	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pr	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Nd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

Sm	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Eu	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Gd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Tb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Dy	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ho	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Er	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Tm	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Yb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Lu	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Hf	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ta	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
W	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Re	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Os	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ir	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pt	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Au	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Hg	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Tl	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Bi	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Th	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
U	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

<b>TABELLA 24: sommario degli elementi rilevati mediante ICP in S2</b>				
<b>ELEMENTO</b>	<b>CONCENTRAZIONE di S2 (ppm in % in peso)<sup>1</sup> REPLICA 1</b>	<b>CONCENTRAZIONE di S2 (ppm in % in peso)<sup>1</sup> REPLICA 2</b>	<b>CONCENTRAZIONE di S2 (ppm in % in peso)<sup>1</sup> REPLICA 3</b>	<b>MEDIA DI S2 CONCENTRAZIONE (ppm in % in peso)<sup>1</sup></b>
Li	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Be	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
B	6,8	6,8	6,8	6,8
Na <sup>2</sup>	0,50%	0,50%	0,50%	0,50%
Mg	1,9	1,9	1,9	1,9
Al	5,6	5,8	5,7	5,7
Si	78	80	79	78,5
P	1	1	1	1

K	10	10	10	10
Ca	11	12	12	11,7
Sc	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ti	1,0	1,0	1,0	1
V	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Cr	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Mn	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Fe <sup>2</sup>	1,77%	1,76%	1,77%	1,77%
Co	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ni	0,1	0,1	0,1	0,1
Cu	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Zn	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ga	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ge	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
As	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Se	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Rb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Sr	0,2	0,2	0,2	0,2
Y	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Zr	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Nb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Mo	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ru	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Rh	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ag	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Cd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
In	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Sn	0,4	0,4	0,4	0,4
Sb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Te	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Cs	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

<b>TABELLA 24: sommario degli elementi rilevati mediante ICP in S2 (continua)</b>				
<b>ELEMENTO</b>	<b>CONCENTRAZIONE di S2 (ppm in % in peso)<sup>1</sup> REPLICA 1</b>	<b>CONCENTRAZIONE di S2 (ppm in % in peso)<sup>1</sup> REPLICA 2</b>	<b>CONCENTRAZIONE di S2 (ppm in % in peso)<sup>1</sup> REPLICA 3</b>	<b>MEDIA DI S2 CONCENTRAZIONE (ppm in % in peso)<sup>1</sup></b>
Ba	3,7	3,7	3,6	3,7
La	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ce	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pr	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Nd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Sm	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Eu	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Gd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Tb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Dy	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ho	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Er	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Tm	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Yb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Lu	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Hf	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ta	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
W	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Re	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Os	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ir	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pt	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Au	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Hg	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Tl	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Bi	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Th	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
U	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

<b>TABELLA 25: sommario degli elementi rilevati mediante ICP in S3</b>				
<b>ELEMENTO</b>	<b>CONCENTRAZIONE di S3 (ppm in % in peso)<sup>1</sup> REPLICA 1</b>	<b>CONCENTRAZIONE di S3 (ppm in % in peso)<sup>1</sup> REPLICA 2</b>	<b>CONCENTRAZIONE di S3 (ppm in % in peso)<sup>1</sup> REPLICA 3</b>	<b>MEDIA DI S3 CONCENTRAZIONE (ppm in % in peso)<sup>1</sup></b>
Li	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Be	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
B	1,0	0,9	0,9	0,9
Na <sup>2</sup>	0,42%	0,42%	0,42%	0,42%
Mg	1,5	1,6	1,5	1,5
Al	1,0	1,1	1,0	1,1

<b>TABELLA 25: sommario degli elementi rilevati mediante ICP in S3 (continua)</b>				
<b>ELEMENTO</b>	<b>CONCENTRAZIONE di S3 (ppm in % in peso)<sup>1</sup> REPLICA 1</b>	<b>CONCENTRAZIONE di S3 (ppm in % in peso)<sup>1</sup> REPLICA 2</b>	<b>CONCENTRAZIONE di S3 (ppm in % in peso)<sup>1</sup> REPLICA 3</b>	<b>MEDIA DI S3 CONCENTRAZIONE (ppm in % in peso)<sup>1</sup></b>
Si	30	30	30	30,0
p	3	3	3	3,0
K	3	4	3	3,3
Ca	3	4	3	3,3
Sc	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ti	0,4	0,4	0,4	0,4
V	0,1	0,1	0,1	0,1
Cr	0,3	0,2	0,2	0,2
Mn	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Fe <sup>2</sup>	4,50%	4,52%	4,52%	4,51%
Co	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ni	0,7	0,5	0,5	0,6
Cu	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Zn	0,6	0,7	0,5	0,6
Ga	0,2	0,2	0,2	0,2
Ge	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
As	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Se	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Rb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Sr	0,1	0,1	0,1	0,1
Y	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Zr	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

Nb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Mo	0,5	0,5	0,5	0,5
Ru	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Rh	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ag	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Cd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
In	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Sn	2,0	1,9	1,9	1,9
Sb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Te	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Cs	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ba	0,5	0,5	0,5	0,5
La	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ce	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pr	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Nd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Sm	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Eu	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

<b>TABELLA 25: sommario degli elementi rilevati mediante ICP in S3 (continua)</b>				
<b>ELEMENTO</b>	<b>CONCENTRAZIONE di S3 (ppm in % in peso)<sup>1</sup> REPLICA 1</b>	<b>CONCENTRAZIONE di S3 (ppm in % in peso)<sup>1</sup> REPLICA 2</b>	<b>CONCENTRAZIONE di S3 (ppm in % in peso)<sup>1</sup> REPLICA 3</b>	<b>MEDIA DI S3 CONCENTRAZIONE (ppm in % in peso)<sup>1</sup></b>
Gd	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Tb	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Dy	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Ho	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Er	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Tm	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Yb	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Lu	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Hf	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Ta	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
W	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Re	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Os	<0,1	<0,1	<0,1	0,1

Ir	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Pt	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Au	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Hg	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Tl	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Pb	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Bi	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Th	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
U	<0,1	<0,1	<0,1	0,1

### Spettroscopia a infrarossi a trasformata di Fourier (FT-IR)

La spettroscopia a infrarossi a trasformata di Fourier (FT-IR) è uno strumento di scelta per l'identificazione di materiali. Nella FT-IR, le bande di assorbimento degli infrarossi sono assegnate a gruppi funzionali caratteristici. In base alla presenza di un numero di tali bande, può essere identificato un materiale in esame. La disponibilità di spettri di composti noti aumenta la probabilità di realizzare un'identificazione positiva. I campioni liofilizzati sono stati analizzati mediante riflettanza totale attenuata orizzontale (HATR), in base alla riflessione interna della radiazione infrarossa (IR). Lo spettro FT-IR di S1 con una corrispondenza di libreria spettrale è presentato nella Fig. 13 nel seguito. I dati suggeriscono che il materiale è coerente con saccarosio. Gli spettri FT-IR di S2 e S3 sono presentati nella Fig. 14 e nella Fig. 15. L'assegnazione dell'assorbimento contro i gruppi funzionali è mostrata nella Tabella 26 - Tabella 28.

**TABELLA 26: assegnazioni di banda di assorbimento di IR caratteristica per saccarosio in preparazioni di S1 liofilizzate**

<b>SACCAROSIO<sup>3</sup></b>	<b>NUMERI D'ONDA DI S1P1 LIOFILIZZATO (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>NUMERI D'ONDA DI S1P2 LIOFILIZZATO (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>NUMERI D'ONDA DI S1P3 LIOFILIZZATO (cm<sup>-1</sup>)</b>
Estensione di OH 3.566-3.263 cm <sup>-1</sup>	3.301 cm <sup>-1</sup>	3.315 cm <sup>-1</sup>	3.319 cm <sup>-1</sup>
Estensione di C-H 3.014 cm <sup>-1</sup>	Non rilevato	Non rilevato	Non rilevato
Estensione di CH <sub>2</sub> 2.995-2.914 cm <sup>-1</sup>	2.923 cm <sup>-1</sup>	2.907 cm <sup>-1</sup>	2.918 cm <sup>-1</sup>

Estensione di CH 2,896-2,847 cm <sup>-1</sup>	Non rilevato	Non rilevato	Non rilevato
Deformazione di CH <sub>2</sub> , wagging 1.477-1.391 cm <sup>-1</sup>	Non rilevato	Non rilevato	Non rilevato
Estensione simmetrica di OH 1.386 cm <sup>-1</sup>	1.372 cm <sup>-1</sup>	1.375 cm <sup>-1</sup>	1.371 cm <sup>-1</sup>
Rocking di CH 1.366-1.280 cm <sup>-1</sup>	Non rilevato	Non rilevato	Non rilevato
Deformazione di OH 1.238-1.209, 1.161 cm <sup>-1</sup>	Non rilevato	Non rilevato	Non rilevato
Stiramento di C-C 1.171, 1.073, 1.069, 943, 921 cm <sup>-1</sup>	924 cm <sup>-1</sup>	926 cm <sup>-1</sup>	926 cm <sup>-1</sup>
Estensione di CO 1.138-1.087, 1.053-991, 914, 909, 868 cm <sup>-1</sup>	1.135, 1.050, 993 cm <sup>-1</sup>	1.135, 1.050, 993 cm <sup>-1</sup>	1.135, 1.050, 993 cm <sup>-1</sup>
Torsione di CH <sub>2</sub> 850 cm <sup>-1</sup>	832 cm <sup>-1</sup>	831 cm <sup>-1</sup>	833 cm <sup>-1</sup>
Estensione di C-O 734 cm <sup>-1</sup>	Non rilevato	Non rilevato	Non rilevato

**TABELLA 27: assegnazioni di banda di assorbimento di IR caratteristica per saccarosio in preparazioni di S2 liofilizzate**

<b>SACCAROSIO<sup>3</sup></b>	<b>NUMERI D'ONDA DI S2P1 LIOFILIZZATO (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>NUMERI D'ONDA DI S2P2 LIOFILIZZATO (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>NUMERI D'ONDA DI S2P3 LIOFILIZZATO (cm<sup>-1</sup>)</b>
Estensione di OH 3.566-3.263 cm <sup>-1</sup>	3.560 cm <sup>-1</sup>	3.562, 3.386, 3.337 cm <sup>-1</sup>	3.619, 3.338 cm <sup>-1</sup>
Estensione di C-H 3.014 cm <sup>-1</sup>	Non rilevato	Non rilevato	Non rilevato
Estensione di CH <sub>2</sub> 2.995- 2.914 cm <sup>-1</sup>	Non rilevato	2.941 cm <sup>-1</sup>	2.926 cm <sup>-1</sup>
Estensione di CH 2,896-2,847 cm <sup>-1</sup>	Non rilevato	2.891 cm <sup>-1</sup>	2.891 cm <sup>-1</sup>
Deformazione di CH <sub>2</sub> , wagging 1.477-1.391 cm <sup>-1</sup>	1.450, 1.404 cm <sup>-1</sup>	1.476, 1.432, 1.406 cm <sup>-1</sup>	1.463, 1.450, 1.435 cm <sup>-1</sup>

Estensione simmetrica di OH 1.386 cm <sup>-1</sup>	Non rilevato	Non rilevato	Non rilevato
Rocking di CH 1.366-1.280 cm <sup>-1</sup>	1.343, 1.320, 1.279 cm <sup>-1</sup>	1,344, 1.322, 1.279 cm <sup>-1</sup>	1,344, 1.320, 1.278 cm <sup>-1</sup>
Deformazione di OH 1.238-1.209, 1.161 cm <sup>-1</sup>	1.237, 1.205, 1.161 cm <sup>-1</sup>	1.238, 1.207 cm <sup>-1</sup>	1.236, 1.208 cm <sup>-1</sup>
Stiramento di C-C 1.171, 1.073, 1.069, 943, 921 cm <sup>-1</sup>	1.116, 1.066, 921 cm <sup>-1</sup>	1.170, 1.116, 1.067, 943 cm <sup>-1</sup>	1.116, 1.067, 942 cm <sup>-1</sup>
Estensione di CO 1.138-1.087, 1.053- 991, 914, 909, 868 cm <sup>-1</sup>	1.050, 990 cm <sup>-1</sup>	1.052, 1.013, 1.004, 989, 909 cm <sup>-1</sup>	1.051, 1.013, 1.004, 989, 910 cm <sup>-1</sup>
Torsione di CH <sub>2</sub> 850 cm <sup>-1</sup>	867, 850 cm <sup>-1</sup>	868, 850 cm <sup>-1</sup>	867, 849 cm <sup>-1</sup>
Estensione di C-O 734 cm <sup>-1</sup>	Non rilevato	731 cm <sup>-1</sup>	Non rilevato

**TABELLA 28: assegnazioni di banda di assorbimento di IR caratteristica per saccarosio in preparazioni di S3 liofilizzate**

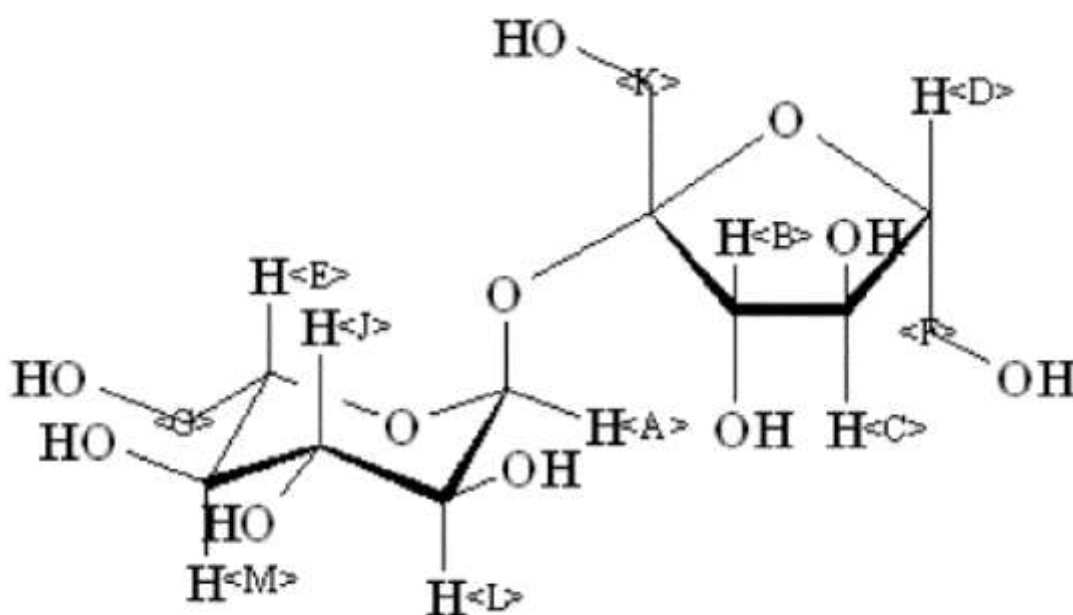
DESTRANO <sup>4</sup>	NUMERI D'ONDA DI S3P1 LIOFILIZZATO (cm <sup>-1</sup> )	NUMERI D'ONDA DI S3P2 LIOFILIZZATO (cm <sup>-1</sup> )	NUMERI D'ONDA DI S3P3 LIOFILIZZATO (cm <sup>-1</sup> )
Estensione <sup>2</sup> di OH 3.566-3.263 cm <sup>-1</sup>	3.304 cm <sup>-1</sup>	3.353 cm <sup>-1</sup>	3.340 cm <sup>-1</sup>
Estensione di CO esociclica 1.150 cm <sup>-1</sup>	1.154 cm <sup>-1</sup>	1.153 cm <sup>-1</sup>	1.153 cm <sup>-1</sup>
Estensione di CO + deformazione di C- C 1.107 cm <sup>-1</sup>	1.106 cm <sup>-1</sup>	1.105 cm <sup>-1</sup>	1.107 cm <sup>-1</sup>
Stiramento di C-O-C 1.080 cm <sup>-1</sup>	1.075 cm <sup>-1</sup>	1.075 cm <sup>-1</sup>	1.079 cm <sup>-1</sup>
Estensione di CH 1.018 cm <sup>-1</sup>	1.016 cm <sup>-1</sup>	1.016 cm <sup>-1</sup>	1.015 cm <sup>-1</sup>

### Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare 1H (NMR)

La spettroscopia NMR è un metodo estremamente utile per la caratterizzazione di un materiale. L'NMR è un fenomeno fisico basato sulla

proprietà magnetica del nucleo di un atomo. L'NMR studia un nucleo magnetico (più comunemente quello di un atomo di idrogeno), allineandolo con un campo magnetico esterno molto potente e perturbando questo allineamento usando un impulso elettromagnetico. La risposta alla perturbazione è registrata, con ciascun nucleo individuale che dà una risposta specifica per il suo ambiente chimico, elettronico, e spaziale.

I campioni liofilizzati sono stati ricostituiti in ossido di deuterio (D<sub>2</sub>O) e analizzati mediante spettroscopia <sup>1</sup>H NMR.

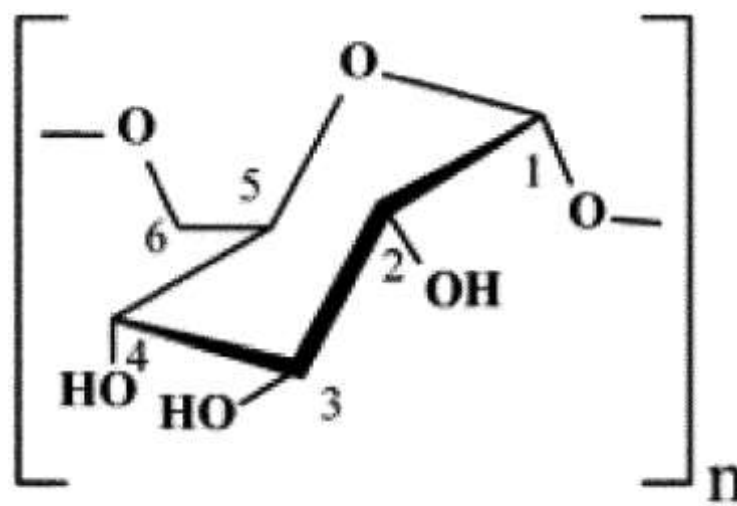


Formula (I)

La struttura per saccarosio è mostrata sopra con l'annotazione di idrogeno di Formula (I). L'<sup>1</sup>H RMN per S1 è mostrato nella Tabella 29 nel seguito:

<b>TABELLA 29: assegnazioni di <sup>1</sup>H RMN di tentativo di S1 in preparazioni di D<sub>2</sub>O</b>				
<b>ASSEGNAZIONI</b>	<b>SPOSTAMENTO CHIMICO (6 ppm)</b>			
	<b>SACCAROSIO</b>	<b>S1P1</b>	<b>S1P2</b>	<b>S1P3</b>
A	5,418	5,43	5,43	5,43
B	4,219	4,22	4,22	4,22

C	4,055	4,06	4,07	4,06
D	3,89	3,83 (ampio)	3,83 (ampio)	3,83 (ampio)
E	3,86			
F	3,826			
G	3,817			
J	3,762			
K	3,679	3,69	3,69	3,69
L	3,563	3,58	3,58	3,57
M	3,476	3,49	3,49	3,48



Destrano  $\alpha$ -(1-6)

Formula (II)

La struttura di destrano è mostrata sopra con l'annotazione di idrogeno della formula (II). La seguente Tabella 30 mostra l' $^1\text{H}$  NMR per S3.

TABELLA 30: assegnazioni di $^1\text{H}$ RMN di tentativo di S3 in D2O				
ASSEGNAZIONI	SPOSTAMENTO CHIMICO (6 ppm)			
	DESTRANO	S3P1	S3P2	S3P3
1	4,99	5,01 (spallatura)	5,01 (spallatura)	5,00 (spallatura)
2	3,58	3,60 (ampio)	3,61 (ampio)	3,60 (ampio)

<b>TABELLA 30: assegnazioni di <math>^1\text{H}</math> RMN di tentativo di S3 in D2O</b>				
<b>ASSEGNAZIONI</b>	<b>SPOSTAMENTO CHIMICO (6 ppm)</b>			
	<b>DESTRANO</b>	<b>S3P1</b>	<b>S3P2</b>	<b>S3P3</b>
4	3,52			
3	3,74	3,77 (ampio)	3,78 (ampio)	3,77 (ampio)
5	3,92	3,97 (ampio)	3,97 (ampio)	3,97 (ampio)
6	3,99			

Gli spettri NMR dei campioni preparati sono presentati nelle Figg. 16-18. Dove possibile, assegnazioni di tentativo per gli spostamenti chimici rilevanti osservati negli spettri NMR erano basate su spettri di riferimento di composti correlati disponibili in letteratura.

I dati indicano che il saccarosio è presente nel S1 di campione, e gli spostamenti chimici corrispondono bene a quelli riportati in letteratura. Tuttavia, non sono stati osservati motivi di suddivisione di picco, il che può essere dovuto a molteplici ragioni come la presenza di nanoparticelle o il ferro paramagnetico stesso.

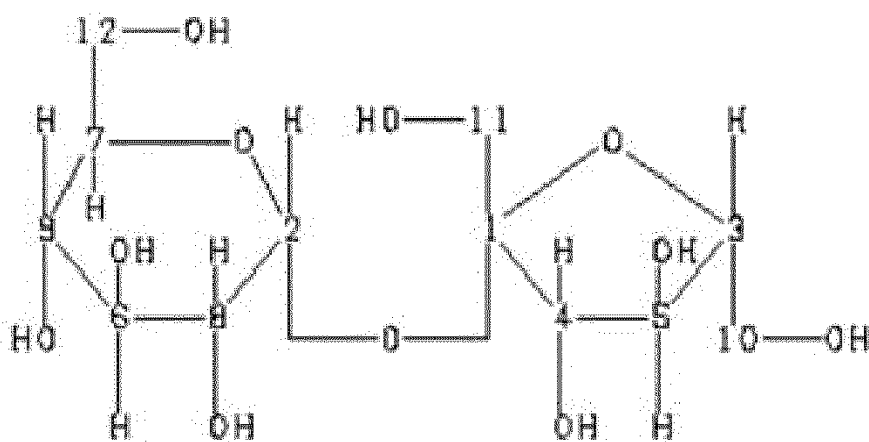
Gli spettri  $^1\text{H}$  NMR per il S2 di campione mostrano una quantità significativa di ampliamento del picco. Non è noto se ciò sia dovuto a particolati che creano un numero aumentato di ambienti chimici, o se la natura del ferro nel campione possa essere responsabile della mancanza di risoluzione. A causa dell'entità dell'ampliamento, non si sono potute fare assegnazioni di picco. Tuttavia, le intensità di picco generali e gli spostamenti chimici sono coerenti con quelli osservati per il saccarosio, in quanto una grande risposta ampia è stata osservata dallo spostamento chimico 2,5-4,2 ppm, con una leggera spallatura visibile sul picco del solvente vicino a 5,5 ppm.

#### Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare $^{13}\text{C}$ (NMR)

I campioni liofilizzati sono stati ricostituiti in ossido di deuterio ( $\text{D}_2\text{O}$ ) e analizzati mediante spettroscopia  $^{13}\text{C}$  NMR.

I risultati sono riassunti nelle Tabelle 28-30. Gli spettri NMR dei campioni preparati sono presentati nelle Figg. 19-21. Dove possibile, assegnazioni di tentativo per gli spostamenti chimici rilevanti osservati negli spettri NMR erano basate su spettri di riferimento di composti correlati disponibili in letteratura.

I dati indicano che il saccarosio è presente nel campione S1 e S2, e gli spostamenti chimici corrispondono bene a quelli riportati in letteratura. Si noti che, come gli spettri protonici, il campione S2 sembrava avere un ampliamento in entità maggiore del campione S1. Infine, i picchi osservati nel campione S3 corrispondono bene ai valori della letteratura per il destrano, indicando che esso è presente nel campione.

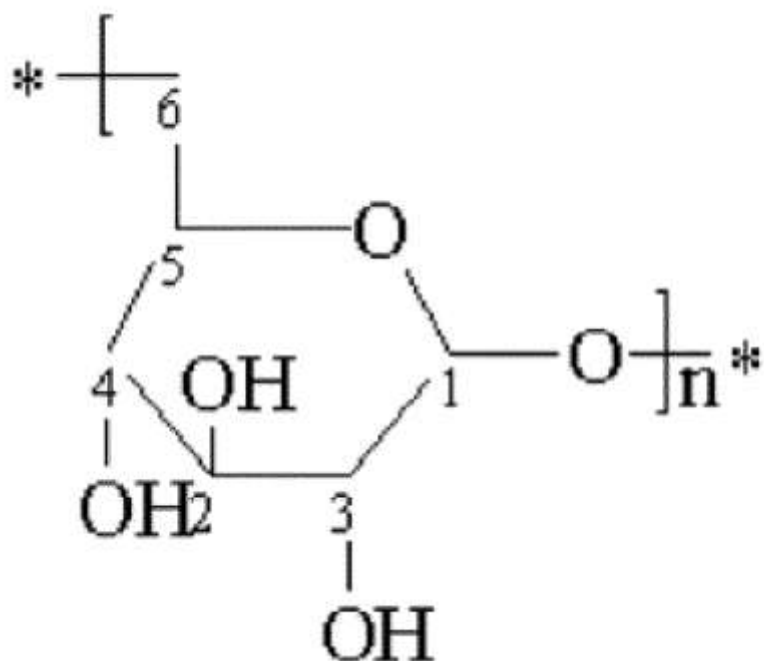


La struttura del saccarosio è mostrata sopra con annotazione di carbonio. I risultati di  $^{13}\text{C}$  NMR sono mostrati nelle Tabelle 31 nel seguito.

<b>Tabella 31: assegnazioni di <math>^{13}\text{C}</math> NMR di saccarosio e S1 in <math>\text{D}_2\text{O}</math></b>				
<b>ASSEGNAZIONI</b>	<b>Spostamento chimico (6 ppm)</b>			
	<b>SACCAROSIO</b>	<b>S1P1</b>	<b>S1P2</b>	<b>S3P3</b>
1	104,71	102,23	102,24	103,58
2	93,20	90,73	90,73	92,07
3	82,42	79,90	79,90	81,25
4	77,51	74,98	74,98	76,33
5	75,09	72,55	72,55	73,89

<b>Tabella 31: assegnazioni di <math>^{13}\text{C}</math> NMR di saccarosio e S1 in <math>\text{D}_2\text{O}</math></b>				
<b>ASSEGNAZIONI</b>	<b>Spostamento chimico (6 ppm)</b>			
	<b>SACCAROSIO</b>	<b>S1P1</b>	<b>S1P2</b>	<b>S3P3</b>
6	73,68	71,10	71,10	72,45
7	73,44	70,95	70,95	72,30
8	72,14	69,61	69,61	70,97
9	70,31	67,76	67,76	69,11
10	63,44	60,94	60,94	62,29
11	62,46	59,89	59,89	61,23
12	61,24	58,67	58,66	60,01

<b>Tabella 32. Assegnazioni di <math>^{13}\text{C}</math> NMR di saccarosio e S2 in <math>\text{D}_2\text{O}</math></b>				
<b>ASSEGNAZIONI</b>	<b>Spostamento chimico (6 ppm)</b>			
	<b>SACCAROSIO</b>	<b>S2P1</b>	<b>S2P2</b>	<b>S2P3</b>
1	104,71	103,53	103,71	103,69
2	93,20	91,97	92,19	92,23
3	82,42	81,15	81,42	81,38
4	77,51	76,17	76,41	76,28
5	75,09	73,75	73,98	74,01
6	73,68			
7	73,44			
8	72,14	70,93	70,97	70,97
9	70,31	68,99	69,38	69,14
10	63,44	62,06	62,34	62,29
11	62,46	61,07	61,36	61,16
12	61,24	59,85	60,11	59,98



Formula (III)

La struttura del destrano è mostrata sopra con annotazioni del carbonio di formula (III). La seguente Tabella 33 mostra  $^{13}\text{C}$  RMN per destrano di S3 in  $\text{D}_2\text{O}$ :

Tabella 33. Assegnazioni di $^{13}\text{C}$ NMR di destrano e S3 in $\text{D}_2\text{O}$				
ASSEGNAZIONI	SPOSTAMENTO CHIMICO ( $\delta$ ppm)			
	DESTRANO	S3P1	S3P2	S3P3
1	98,76	97,65	97,64	97,65
2	74,52	73,34	73,33	73,32
3	72,51	71,35	71,33	71,33
4	71,21	70,13	70,11	70,10
5	70,75	69,49	69,46	69,47
6	66,69	65,50	65,48	65,49

#### Analisi di diffrazione dei raggi X (XRD) (materiale liofilizzato)

L'analisi XRD è un metodo mediante il quale un campione inorganico cristallino è irradiato con raggi x monoenergetici. L'interazione della struttura di reticolo del campione con questi raggi x è registrata e fornisce informazioni sulla

struttura cristallina che è irradiata. La risultante "impronta digitale" caratteristica consente l'identificazione dei composti cristallini presenti nel campione. Usando un'analisi di adattamento a motivi interi (l'affinamento Rietveld), è possibile eseguire analisi quantitative su campioni contenenti più di un composto cristallino.

I campioni liofilizzati sono stati analizzati mediante XRD per caratterizzare la struttura chimica e le fasi presenti nei campioni. I risultati dall'analisi sono presentati nella Tabella 34. Si noti che questo metodo di preparazione del campione ha dato come risultato campioni appiccicosi per S1 e S2 specificamente (S3 era meno appiccicoso). Per S1 e S2, una goccia di metanolo è stata addizionata al campione e il materiale è stato distribuito in piano nel porta-campioni. Il campione S3 è stato macinato in un mortaio e pestello.

<b>Tabella 34: identificazione di fase di XRD e analisi quantitativa per campioni liofilizzati</b>		
<b>ID DEL CAMPIONE</b>	<b>FASI IDENTIFICATE</b>	<b>% in peso di CONCENTRAZIONE <sup>1</sup></b>
<b>S1</b>	Na <sub>4</sub> Fe <sub>2</sub> O <sub>5</sub> : ossido di ferro di sodio monoclino, SG: P21/n (14) PDF n. 04-013-8809	5,2
	Materiali amorfi	94,8
<b>S2</b>	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> : saccarosio monoclino, S.G. P21 (4) PDF n. 02-063-8998	42,9
	Materiali amorfi	57,1
<b>S3</b>	Na <sub>4</sub> Fe <sub>2</sub> O <sub>5</sub> : ossido di ferro di sodio monoclino, SG: P21/n (14) PDF n. 04-013-8809	18,8
	Materiali amorfi	81,2

La Fig. 22 si sovrappone ai dati grezzi di XRD dai tre campioni con piccoli scostamenti per chiarezza. Il campione S2 è differente dagli altri due campioni in termini di intensità complessive, posizioni di picco come anche sagoma del picco.

Le sagome ampie del picco nei campioni S1 e S3 indica che questi campioni consistono in una miscela di materiali nanocristallini e amorfi.

Usando le corrispondenze migliori ottenute confrontando i dati sperimentali modellati sullo sfondo al database di diffrazione ICDD/ICSD per il campione S1, S2, e S3, rispettivamente, è stato determinato che i campioni S1 e S3 contengono una miscela di materiali amorfi e nanocristallini. Il motivo di riferimento di ossido di ferro di sodio è stato sovrapposto a questi dati sperimentali. I marcatori indicano l'ubicazione dei picchi di diffrazione attesi per ciascuna fase e le altezze dei marcatori indicano le intensità di picco relative per un materiale orientato casualmente a grana fine. Diversamente dagli altri due campioni, il campione S3 è composto principalmente da saccarosio e materiali amorfi.

Un'analisi semiquantitativa è stata eseguita usando WPF (adattamento a motivi interi), che è un sottoinsieme della raffinazione di Rietveld che dà conto di tutte le aree al di sopra della curva di sfondo. Questa tecnica richiede che i fattori di struttura e le ubicazioni atomiche o il rapporto di intensità di riferimento (un modo per confrontare la potenza di diffrazione di fasi differenti) siano noti per tutte le fasi identificate. Durante questo processo, il fattore di struttura (che riguarda la concentrazione), i parametri di reticolo (che riguardano la posizione di picco), la larghezza di picco e la sagoma di picco sono raffinati per ciascuna fase per ridurre al minimo il valore di R, una stima dell'accordo tra il modello e i dati sperimentali sull'intero motivo.

Per ottenere risultati quantitativi dal campione che contiene quantità misurabili di materiale amorfo, la densità dell'amorfo deve essere assegnata al fine di determinare quanto materiale amorfo sia presente. Come risultato, la concentrazione di materiale amorfo è incerta. Si assume che le ubicazioni dei picchi amorfi in questi

campioni siano dal saccarosio amorfo che ha una densità approssimativamente di 1,59 g/cm<sup>3</sup>. Poiché il WPF tenta di dare conto di tutto nel campione, qualsiasi errore nella concentrazione dell'amorfo dà come risultato errori anche nelle fasi cristalline. Ciò significa che le concentrazioni relative delle fasi cristalline sono corrette, ma i valori assoluti sono in errore di quantità proporzionali all'errore nella concentrazione dell'amorfo.

Analisi di diffrazione di raggi X (XRD) (materiale privo di zucchero)

I campioni come ricevuti sono stati diluiti in acqua e posti in un filtro di limite di esclusione di peso molecolare (MWCO) di 10000 Da e centrifugati per rimuovere le piccole molecole nella formulazione (zuccheri) che hanno causato il materiale amorfo nell'analisi di XRD precedente. I campioni sono stati quindi lavati altre cinque volte con acqua per rimuovere le piccole molecole residue. Il materiale risultante (in capace di passare attraverso il filtro) è stato liofilizzato e analizzato mediante XRD per caratterizzare la struttura chimica e le fasi presenti nei campioni. Si noti che il campione S3 conteneva due strati distinti a seguito della centrifugazione, uno strato viscoso denso e uno strato di sommità meno denso. Questi strati sono stati separati e liofilizzati separatamente e analizzati come due campioni. È stata calcolata la media dei risultati per rendere i valori osservati nella Tabella 35, ma repliche individuali di ciascuno strato sono presentate nelle figure nel seguito. I risultati dall'analisi sono presentati nella Tabella 35.

<b>Tabella 35: identificazione di fasi di XRD e analisi quantitativa per campioni purificati usando filtri MWCO, quindi liofilizzati</b>		
<b>ID DEL CAMPIONE</b>	<b>FASI IDENTIFICATE</b>	<b>% in peso di CONCENTRAZIONE<sup>1</sup></b>
<b>S1 (S1 ≡ S22)</b>	Fe <sub>2,67</sub> O <sub>4</sub> : maghemite cubica, SG: P4332 (212) PDF n. [04-021-3968]	81,0
	FeOOH: ossiidrossido di ferro ortorombico PDF n. [04-003-2900]	19,0
<b>S2 (S2 ≡ S23)</b>	Fe <sub>2,67</sub> O <sub>4</sub> : maghemite cubica, SG: P4332 (212) PDF n. [04-021-3968]	89,9

<b>Tabella 35: identificazione di fasi di XRD e analisi quantitativa per campioni purificati usando filtri MWCO, quindi liofilizzati</b>		
<b>ID DEL CAMPIONE</b>	<b>FASI IDENTIFICATE</b>	<b>% in peso di CONCENTRAZIONE<sup>1</sup></b>
	FeOOH: ossiidrossido di ferro ortorombico PDF n. [04-003-2900]	10,1
<b>S3<sup>2</sup> (S3 <math>\equiv</math> S24 e S25)</b>	Fe <sub>2,67</sub> O <sub>4</sub> : maghemite cubica, SG: P4332 (212) PDF n. [04-021-3968]	74,0
	FeOOH: ossiidrossido di ferro ortorombico PDF n. [04-003-2900]	26,0
% in peso = percentuale in peso, $\pm$ 5%; 2 media di preparazioni in duplicato (due strati osservati)		

Una sovrapposizione dei motivi di XRD da tutti e quattro i campioni (due repliche per S3) è mostrata nella Fig. 23. I motivi sono sfalsati per chiarezza. L'identificazione di fase è stata eseguita confrontando le corrispondenze migliori tra i dati di XRD sperimentali modellati sullo sfondo e il database di diffrazione di ICDD/ICSD per il campione. I marcatori di riferimento per la fase mostrano dove in due-teta devono essere ubicati i picchi sperimentali attesi e l'altezza dei marcatori indica l'intensità attesa dei picchi sperimentali, se il campione è a grana fine e orientato casualmente. Si noti che XRD è sensibile alla struttura dei cristalli, ma relativamente insensibile alla composizione elementare o di stato chimico. L'identificazione di fase per questi campioni è stata difficile per via della natura nanocristallina dei campioni che amplia significativamente il picco nei motivi di XRD.

Le corrispondenze migliori ai picchi presenti in tutti e quattro i campioni sono una fase di ossido di ferro nota come maghemite e una fase di ossiidrossido di ferro. La fase di ossiidrossido di ferro è atipica in quanto è formata dal riscaldamento dell'ossiidrossido di ferro di fase beta a circa 300 °C. Sfortunatamente, questa scheda di riferimento non ha il rapporto di intensità di riferimento (RIR) incluso che è necessario per un'analisi semiquantitativa. Ma poiché la simmetria e le composizioni sono simili a quelle del minerale di ossiidrossido di ferro goethite (alfa-FeOOH), l'RIR medio della goethite è stato usato per l'ossiidrossido di ferro per l'analisi semiquantitativa.

Un'analisi semiquantitativa è stata eseguita usando WPF (adattamento a motivi interi), che è un sottoinsieme della raffinazione di Rietveld che dà conto di tutta l'intensità al di sopra della curva di sfondo. Questa tecnica richiede che i fattori di struttura e le ubicazioni atomiche o il rapporto di intensità di riferimento (un modo per confrontare la potenza di diffrazione di fasi differenti) siano noti per tutte le fasi identificate. Durante questo processo, il fattore di struttura (che riguarda la concentrazione), i parametri di reticolo (che riguardano la posizione di picco), la larghezza di picco e la sagoma di picco sono affinati per ciascuna fase per ridurre al minimo il valore R, una stima dell'accordo tra i dati di modello e sperimentali sull'intero motivo.

#### Degradazione di acido per ferro(III) labile usando la spettroscopia UV-visibile

La spettroscopia UV/vis è usata per determinare la concentrazione di analiti in un momento o spesso in un periodo di tempo desiderato. La tecnica misura l'assorbimento della luce attraverso le lunghezze d'onda della luce ultravioletta e visibile attraverso un campione di liquido. I campioni sono erogati in

una piccola fiala e posti tra il percorso di una luce UV/vis e un rilevatore. Secondo la legge di Beer-Lambert, con una lunghezza di percorso di luce costante e un coefficiente di assorbimento noto dipendente dalla lunghezza d'onda, la concentrazione di un composto in questione può essere determinata dalla luce assorbita dal campione a quella lunghezza d'onda.

I campioni sono stati analizzati usando il metodo adattato da B. S. Barot et al. (2014) che determina la quantità di ferro(III) labile nei campioni usando la spettroscopia UV-visibile. I risultati sono riassunti nella Tabella 36 nel seguito.

<b>Tabella 36: sommario della determinazione del ferro(III) labile</b>				
<b>CAMPIONE</b>	<b>REPLICA</b>	<b>FERRO(III) LABILE (%)</b>	<b>FERRO(III) LABILE MEDIO (%)</b>	<b>% di RSD<sup>1</sup></b>
S1	1	1,32%	1,48%	10,2%
	2	1,52%		
	3	1,61%		
S2	1	2,14%	2,27%	5,3%
	2	2,38%		
	3	2,30%		
S3	1	1,40%	1,34%	3,7%
	2	1,33%		
	3	1,30%		

#### Analisi termogravimetrica (TGA)

La TGA consiste nel misurare il cambiamento di peso di un materiale in funzione della temperatura in un'atmosfera controllata. La tecnica richiede misurazioni precise di peso, temperatura, e cambiamento di temperatura. Il termogramma risultante generato dall'analisi può determinare il contenuto di classi di ingredienti (ad es. solventi, polimeri, riempitivi inorganici, ecc.) e la stabilità termica dei polimeri. Precisione e bias tipici delle misurazioni di TGA sono disaminate in ASTM E2040.

I campioni liofilizzati sono stati analizzati mediante analisi termogravimetrica (TGA) sotto spurgo con azoto e spurgo con aria. La decomposizione termica dei campioni si verifica in tre passaggi distinti come mostrato nella Fig. 24. I risultati di questi passaggi sono riassunti nella Tabella 37.

Tabella 37: analisi termogravimetrica di S1, S2 e S3						
CONDIZIONE ATMOSFERICA	PROVINO ANALIZZATO	% di perdita IN PESO DA AMBIENTE A 100 °C	% di perdita IN PESO DA 100 °C A 245 °C	% di perdita IN PESO DA 245 °C A 530 °C	% di perdita IN PESO DA 530 °C A 800 °C	% DI RESIDUO A 800 °C
Azoto  Metodo: rampa di 10,00 °C/min a 800.00 °C (spurgo con N2)	Provino di S1	3,3	43,6	17,7	21,9	13,5
	Provino di S1	3,3	42,3	36,4	6,6	11,4
	Provino di S1	3,6	42,1	36,4	6,9	11,0
	<b>Media</b>	<b>3,4</b>	<b>42,7</b>	<b>30,2</b>	<b>11,8</b>	<b>12,0</b>
	Provino di S2	1,1	44,9	33,1	11,2	9,7
	Provino di S2	1,0	45,3	36,3	7,6	9,8
	Provino di S2	1,1	44,7	36,8	7,4	10,0
	<b>Media</b>	<b>1,1</b>	<b>45,0</b>	<b>35,4</b>	<b>8,7</b>	<b>9,8</b>
	Provino di S3	2,4	8,9	42,8	23,4	22,4
	Provino di S3	4,8	7,7	56,0	15,7	15,6
	Provino di S3	4,0	8,1	42,4	23,4	22,0
	<b>Media</b>	<b>3,7</b>	<b>8,2</b>	<b>47,1</b>	<b>20,8</b>	<b>20,0</b>
Isotermico per 2,00 min (spurgo con N2)	Provino di S1	3,0	42,8	37,5	5,8	11,0
	Provino di S1	1,9	43,8	37,2	6,0	11,0
	Provino di S1	2,5	42,9	37,6	5,4	11,5
	<b>Media</b>	<b>2,5</b>	<b>43,2</b>	<b>37,4</b>	<b>5,7</b>	<b>11,2</b>
	Provino di S2	1,1	42,8	45,0	0,6	10,5
	Provino di S2	0,7	43,4	45,0	0,7	10,2
	Provino di S2	0,8	42,9	45,3	0,8	10,1
	<b>Media</b>	<b>0,9</b>	<b>43,0</b>	<b>45,1</b>	<b>0,7</b>	<b>10,3</b>
	Provino di S3	4,2	8,2	63,1	2,9	21,6
	Provino di S3	4,8	7,8	63,7	2,9	20,8
	Provino di S3	5,2	7,4	62,3	3,1	21,9
	<b>Media</b>	<b>4,7</b>	<b>7,8</b>	<b>63,0</b>	<b>3,0</b>	<b>21,4</b>
Aria  Metodo: rampa di 10,00 °C/min a 800.00 °C (spurgo con aria)	Provino di S1	3,0	42,8	37,5	5,8	11,0
	Provino di S1	1,9	43,8	37,2	6,0	11,0
	Provino di S1	2,5	42,9	37,6	5,4	11,5
	<b>Media</b>	<b>2,5</b>	<b>43,2</b>	<b>37,4</b>	<b>5,7</b>	<b>11,2</b>
	Provino di S2	1,1	42,8	45,0	0,6	10,5
	Provino di S2	0,7	43,4	45,0	0,7	10,2
	Provino di S2	0,8	42,9	45,3	0,8	10,1
	<b>Media</b>	<b>0,9</b>	<b>43,0</b>	<b>45,1</b>	<b>0,7</b>	<b>10,3</b>
	Provino di S3	4,2	8,2	63,1	2,9	21,6
	Provino di S3	4,8	7,8	63,7	2,9	20,8
	Provino di S3	5,2	7,4	62,3	3,1	21,9
	<b>Media</b>	<b>4,7</b>	<b>7,8</b>	<b>63,0</b>	<b>3,0</b>	<b>21,4</b>
Isotermico per 2,00 min (spurgo con aria)	Provino di S1	3,0	42,8	37,5	5,8	11,0
	Provino di S1	1,9	43,8	37,2	6,0	11,0
	Provino di S1	2,5	42,9	37,6	5,4	11,5
	<b>Media</b>	<b>2,5</b>	<b>43,2</b>	<b>37,4</b>	<b>5,7</b>	<b>11,2</b>

Calorimetria a scansione differenziale (DSC) e analisi termica differenziale (DTA)

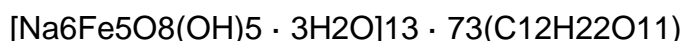
I campioni liofilizzati sono stati analizzati mediante calorimetria a scansione differenziale (DSC) sotto spurgo con argon. La calorimetria a scansione differenziale (DSC) misura la differenza dei flussi di calore associati alle transizioni tra un campione e un riferimento inerte in funzione della temperatura e del tempo. Tali misurazioni forniscono informazioni quantitative e qualitative su cambiamenti fisici e chimici che coinvolgono processi endotermici o esotermici, o cambiamenti della capacità di calore. Si veda la Fig. 25 per termogrammi di DSC. Il sommario di DTA è presentato nella Tabella 38 nel seguito.

<b>Tabella 38: sommario dei risultati di DTA</b>						
<b>Condizione atmosferica</b>	<b>Provino analizzato</b>	<b>Teso<sub>1</sub> (°C)</b>	<b>AHeso<sub>1</sub> (J/g)</b>	<b>Teso<sub>2</sub> (°C)</b>	<b>Insorgenza Teso<sub>2</sub> (°C)</b>	<b>AHeso<sub>2</sub> (J/g)</b>
	Provino di S1 1	33,2	63,8	155,8	138,2	187
	Provino di S1 2	33,2	69,3	153,1	137,6	169
	Provino di S1 3	35,1	130,9	155,9	147,3	159
Rampa da 10,00 °C/min a 200,0 °C (spurgo con N2)	<b>Media</b>	<b>33,8</b>	<b>88,0</b>	<b>154,9</b>	<b>141,0</b>	<b>171,7</b>
	Provino di S2 1	29,2	47,6	143,5	127,1	148
	Provino di S2 2	n/a	n/a1	142,8	* <sub>2</sub>	*
	Provino di S2 3	n/a	n/a	147,6	*	*
	<b>Media</b>	<b>29,2</b>	<b>47,6</b>	<b>127,1</b>	<b>127,1</b>	<b>148</b>
	Provino di S3 1	38,8	117,7	n/a	n/a	n/a
	Provino di S3 2	44	45,6	n/a	n/a	n/a
	Provino di S3 3	34,8	136,3	n/a	n/a	n/a
	<b>Media</b>	<b>39,2</b>	<b>99,9</b>	<b>n/a</b>	<b>n/a</b>	<b>n/a</b>
n/a = non osservato; 2 *Possibili transizioni sovrapposte						

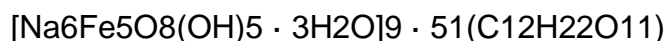
Valore di idrossido mediante titolazione e determinazione della formula molecolare

Il campione S1 come ricevuto è stato titolato in triplicato con HCl 0,00998 N per determinare il valore di idrossido in soluzione iniettabile di saccarosio di ferro. I punti di estremità delle titolazioni erano pH = 7,0. La Tabella 39 riassume i risultati di questa titolazione in S1.

Usando l'ipotesi che tutte le specie basiche titolate fossero dall'idrossido associato ai nuclei di ossiidrossido ferrico, si è assunto che il numero totale di moli di H<sup>+</sup> usate nella titolazione fosse uguale al numero di moli di OH<sup>-</sup>. Considerando TOC, e Pm mediante GPC, la formula molecolare di saccarosio di ferro in S1 è stata calcolata come nel seguito:



Se Mn è considerato per questo calcolo, la formula molecolare è:



<b>Tabella 39: sommario della titolazione di S1 con HCl 0,01 N</b>				
<b>CAMPIONE</b>	<b>REPLICA</b>	<b>MASSA DI S1 USATA (g)</b>	<b>VOLUME DI HCl 0,00998 N (ml) usato per raggiungere pH = 7,0</b>	<b>% di RSD<sup>1</sup></b>
S1	1	1,0020	20,87	2,1%
	2	1,0007	21,21	
	3	1,0038	20,35	
	<b>Media</b>	<b>1,0022</b>	<b>20,81</b>	

Altre forme di realizzazione e usi dell'invenzione sono evidenti agli esperti dell'arte dalla considerazione della specificazione e della pratica dell'invenzione divulgata nel presente contesto.

---

## RIVENDICAZIONI

1. Composizione a base di ferro acquosa comprendente saccarosio e bicarbonato di ferro per l'uso in un metodo per la prevenzione o trattamento di una malattia o disturbo del rene comprendente la somministrazione per via endovenosa di detta composizione a base di ferro acquosa in una quantità terapeuticamente efficace.
2. La composizione a base di ferro acquosa per l'uso della rivendicazione 1, in cui la composizione ha un pH maggiore di 9.
3. La composizione a base di ferro acquosa per l'uso delle rivendicazioni 1 o 2, in cui la composizione ha un pH che oscilla da circa 10,5 a circa 11,5.
4. La composizione a base di ferro acquosa per l'uso delle rivendicazioni 1-3, in cui la composizione ha una densità relativa tra 1,135 e 1,165 a 20 °C.
5. La composizione a base di ferro acquosa per l'uso delle rivendicazioni 1-4, in cui la composizione ha un Pm secondo GPC tra 30.000 e 40.000 dalton.
6. La composizione a base di ferro acquosa per l'uso delle rivendicazioni 1-5, in cui la composizione ha un Pm secondo GPC tra 33.000 e 38.000 dalton.
7. La composizione a base di ferro acquosa per l'uso delle rivendicazioni 1-6, in cui la composizione ha una concentrazione massima di ferro(II) dello 0,40% p/v.
8. La composizione a base di ferro acquosa per l'uso delle rivendicazioni 1-7, in cui la composizione ha una concentrazione di ferro(II) dallo 0,05% p/v allo 0,40% p/v.
9. La composizione a base di ferro acquosa per l'uso delle rivendicazioni 1-8, in cui la composizione ha una concentrazione di ferro(II) dallo 0,10% p/v allo 0,20% p/v.
10. La composizione a base di ferro acquosa per l'uso delle rivendicazioni 1-9, in cui il metodo comprende inoltre la somministrazione di una protoporfirina.
11. La composizione a base di ferro acquosa per l'uso delle rivendicazioni 1-10,

in cui il metodo comprende inoltre la somministrazione di protoporfirina di stagno.

12. La composizione a base di ferro acquosa per l'uso delle rivendicazioni 1-11, in cui la malattia o disturbo è una malattia del rene cronica, o, in cui la malattia o disturbo è il rigetto di trapianto di organo.

13. Composizione farmaceutica a base di ferro acquosa comprendente:

saccarosio di ferro;

bicarbonato; e

un veicolante acquoso farmaceuticamente accettabile,

in cui il saccarosio di ferro è presente in una quantità farmaceuticamente efficace per fornire un effetto protettivo al rene di un paziente, la composizione farmaceutica ha un pH che oscilla da circa 10,5 a circa 11,5, una concentrazione di ferro(II) dallo 0,05% p/v allo 0,40% p/v, e un Pm secondo GPC è tra 30.000 e 40.000 dalton.

14. La composizione a base di ferro acquosa della rivendicazione 13, in cui la composizione ha una densità relativa tra 1,135 e 1,165 a 20 °C; e/o, in cui il Pm secondo GPC è tra 33.000 e 38.000 dalton.

15. La composizione a base di ferro acquosa di qualsiasi delle rivendicazioni 13 o 14, in cui la composizione ha una concentrazione di ferro(II) dallo 0,10% p/v allo 0,20% p/v.

---

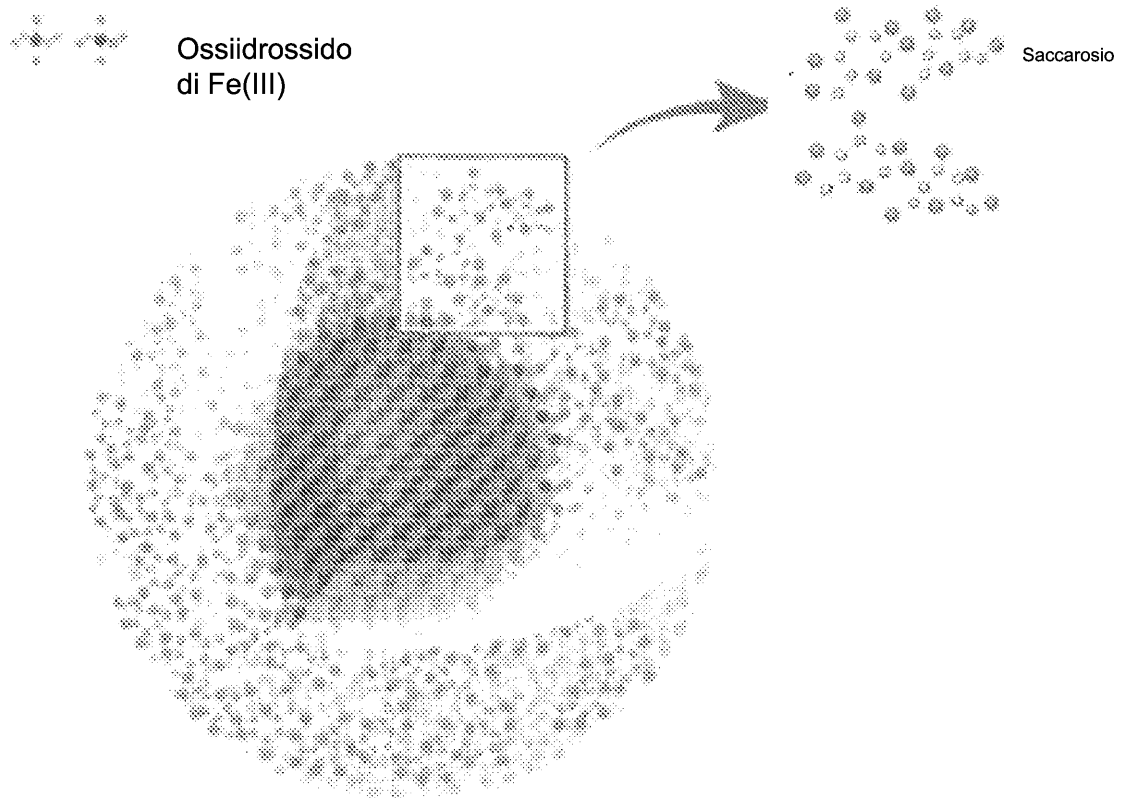


Fig. 1

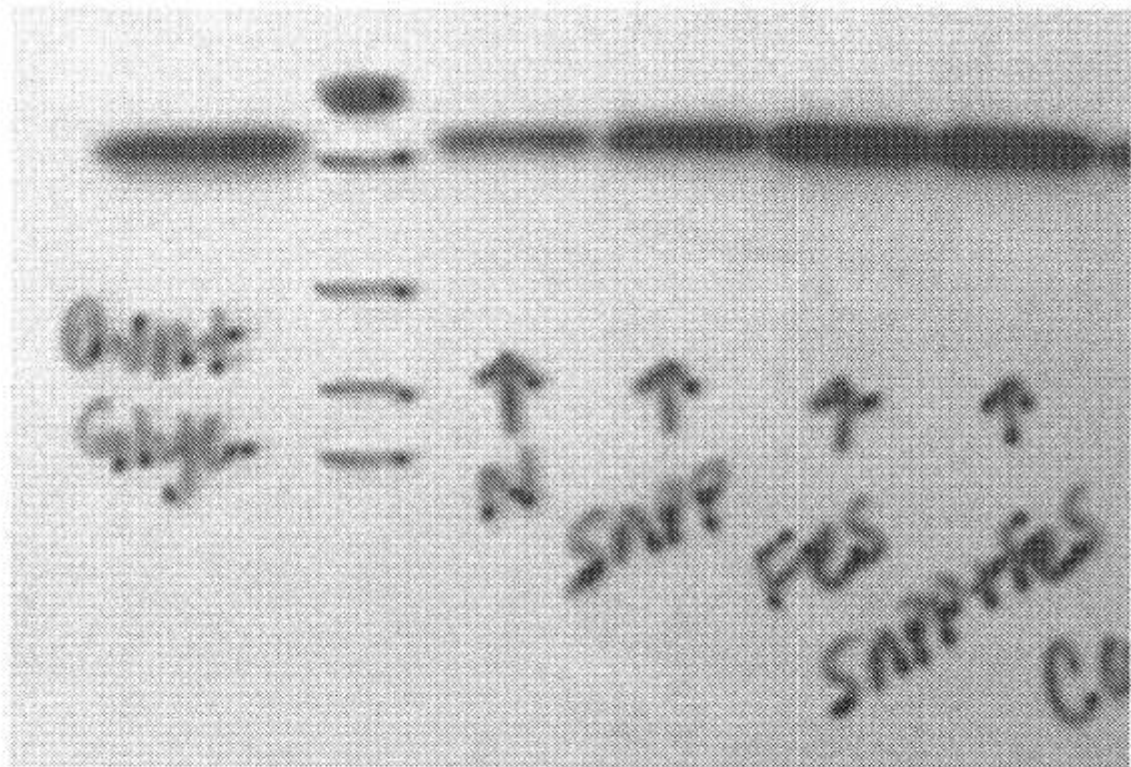


Fig. 2

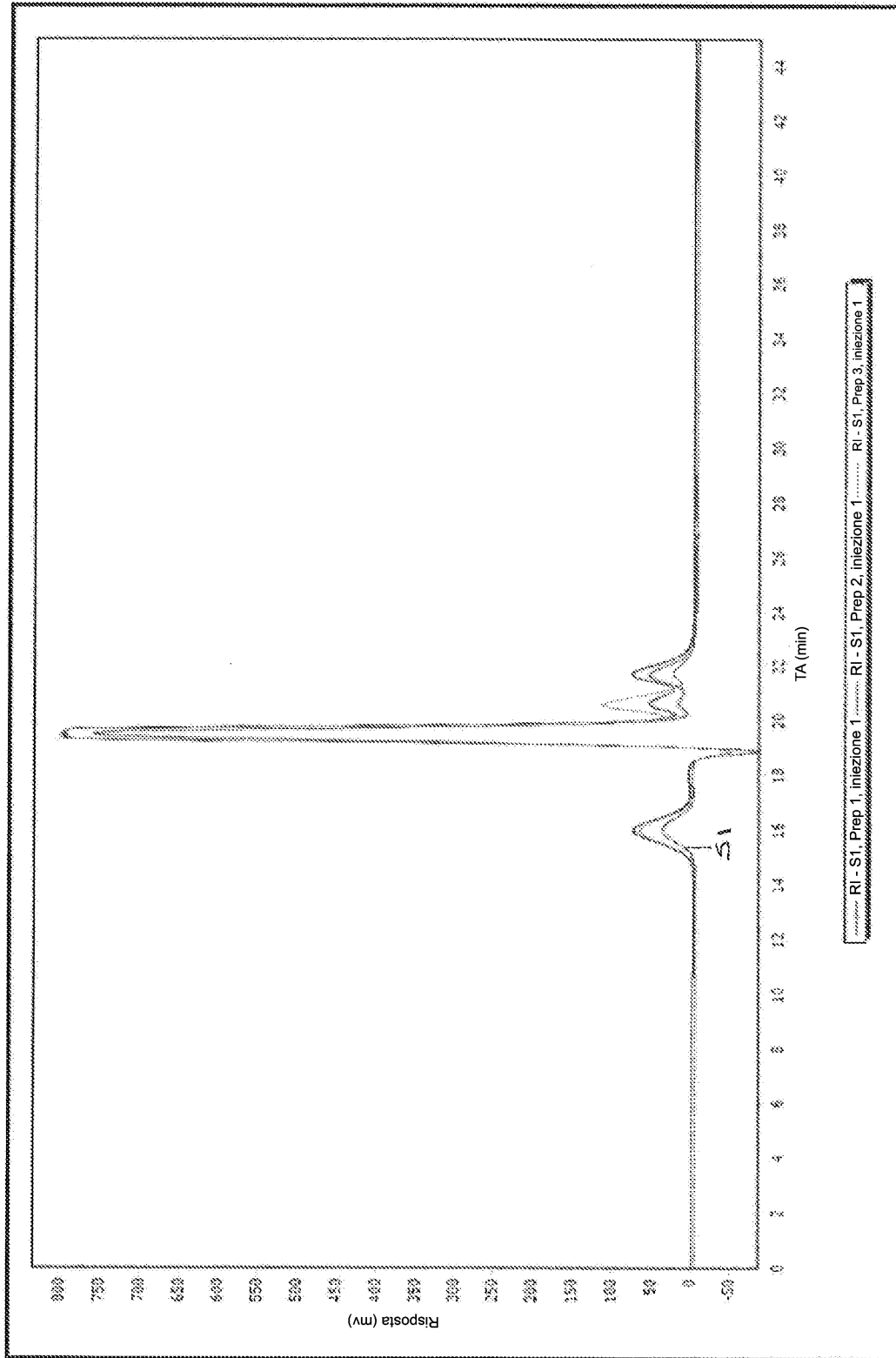


Fig. 3:

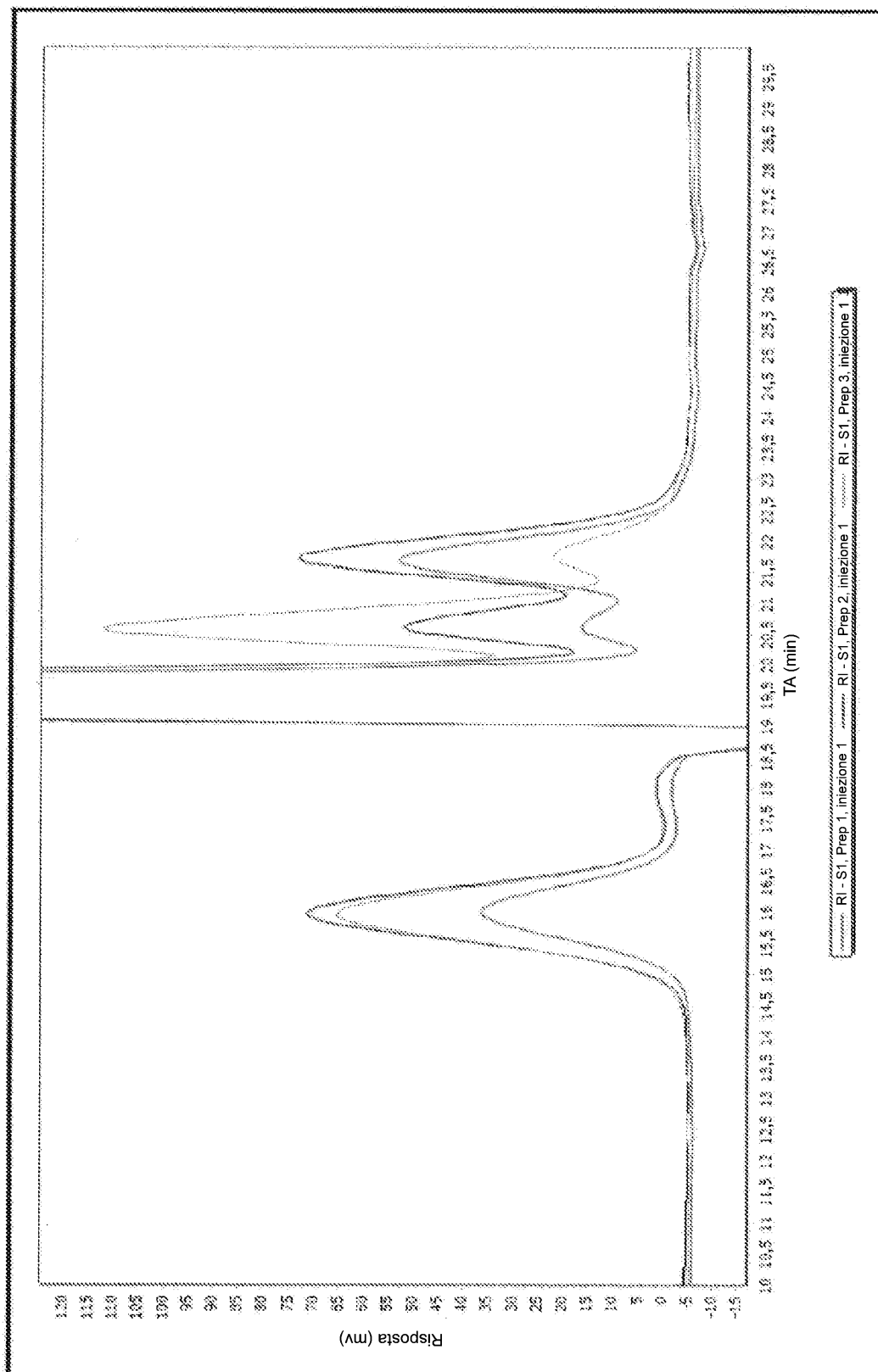


Fig. 4

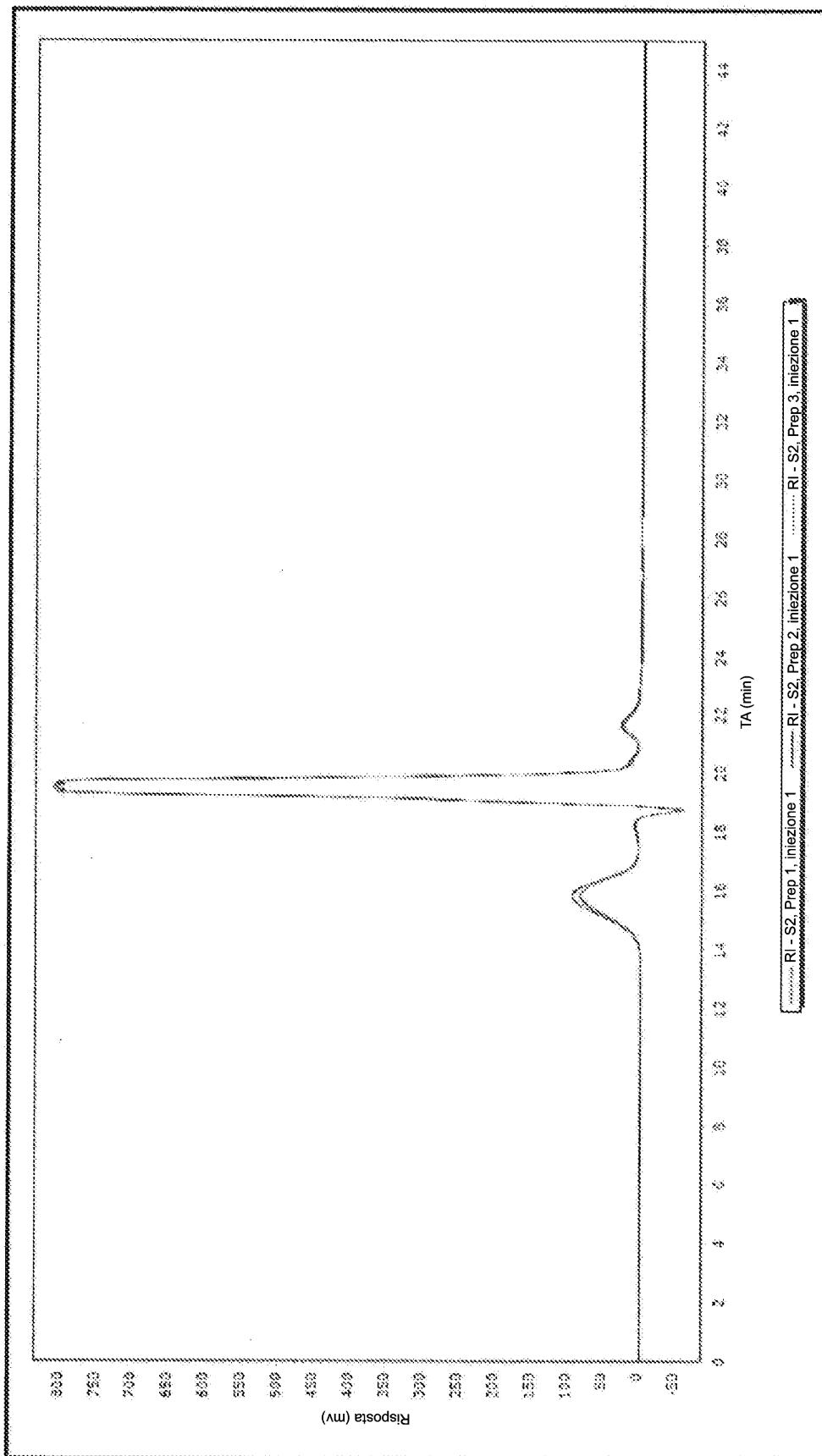


Fig. 5

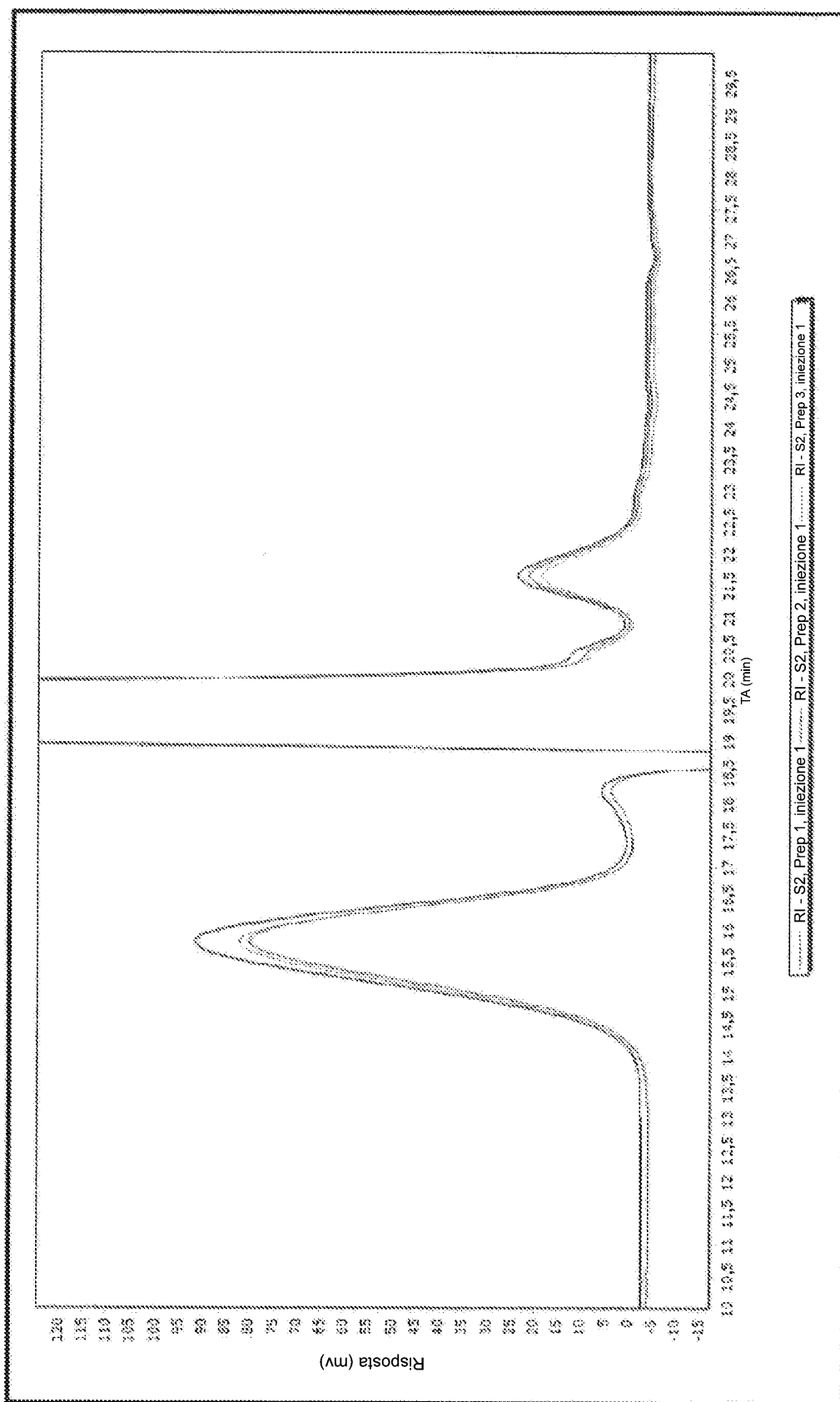


Fig. 6

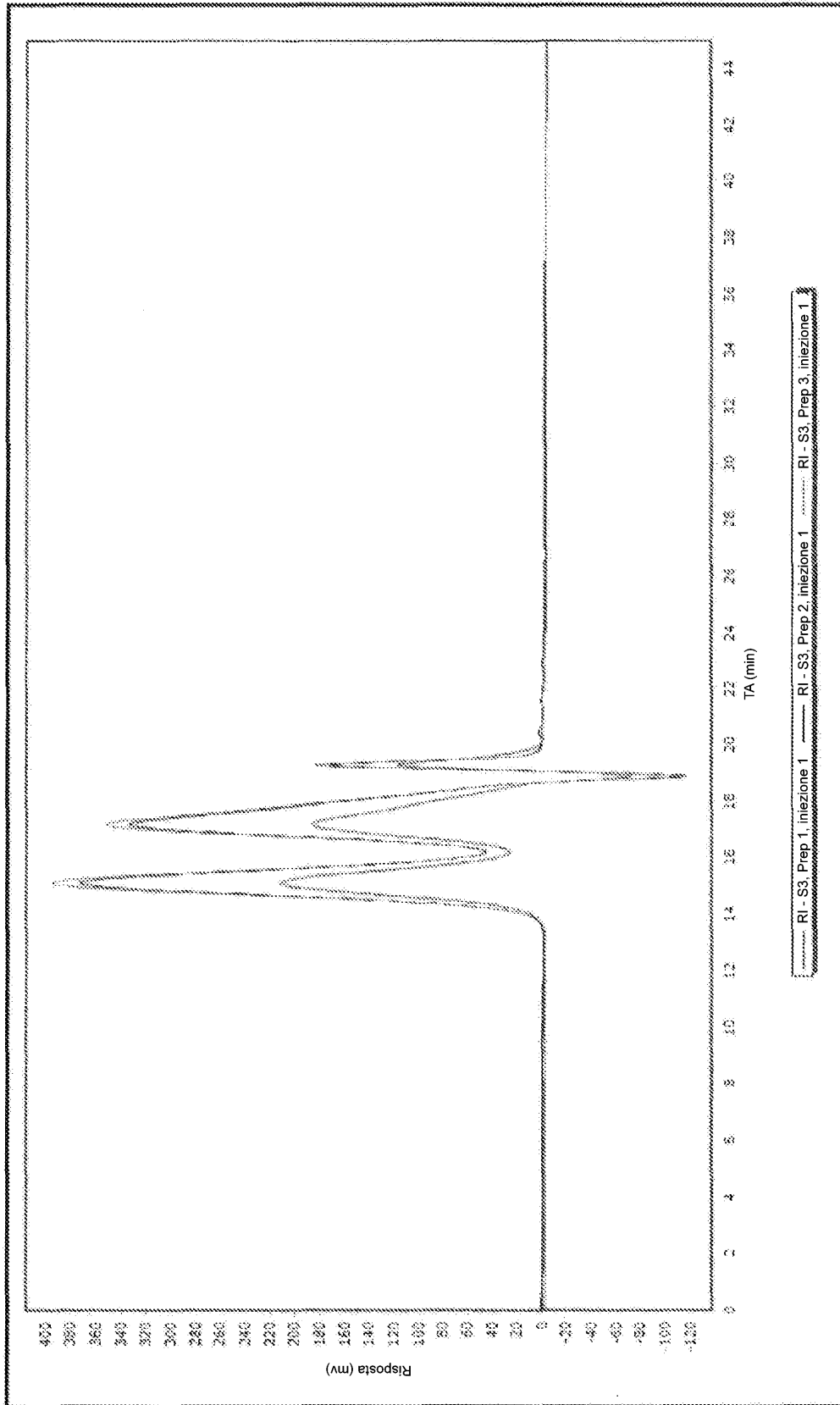


Fig. 7

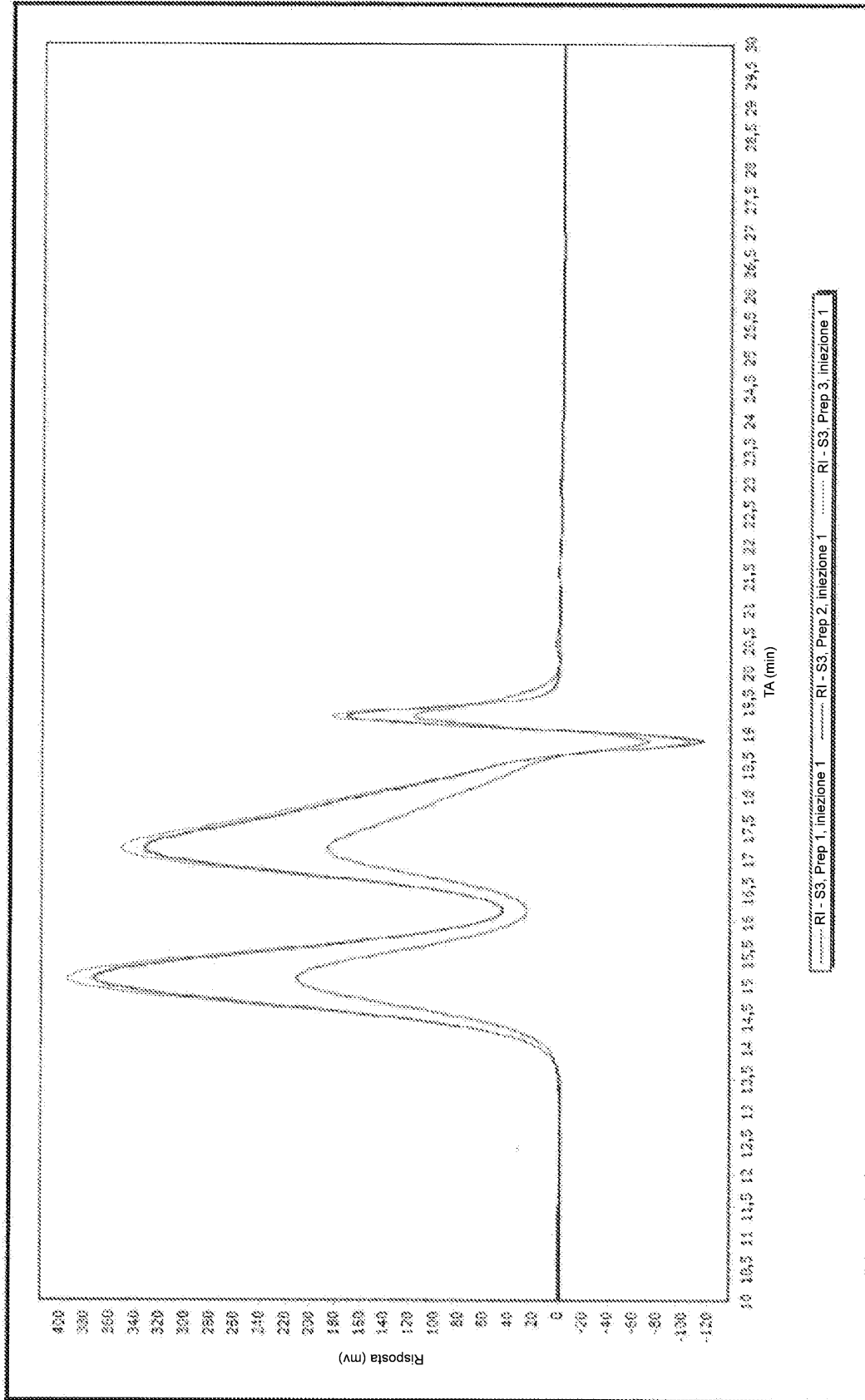


Fig. 8

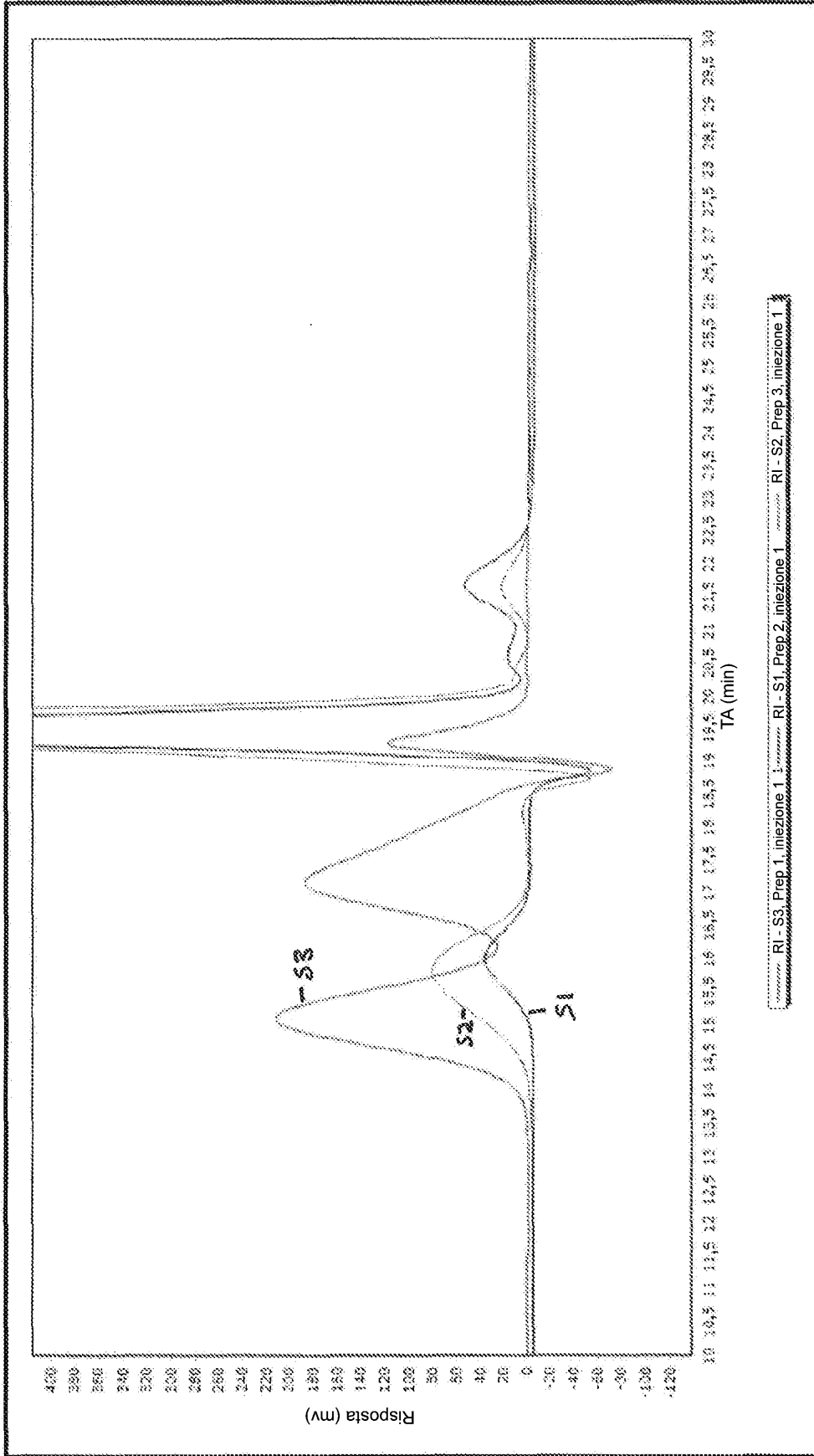


Fig. 9

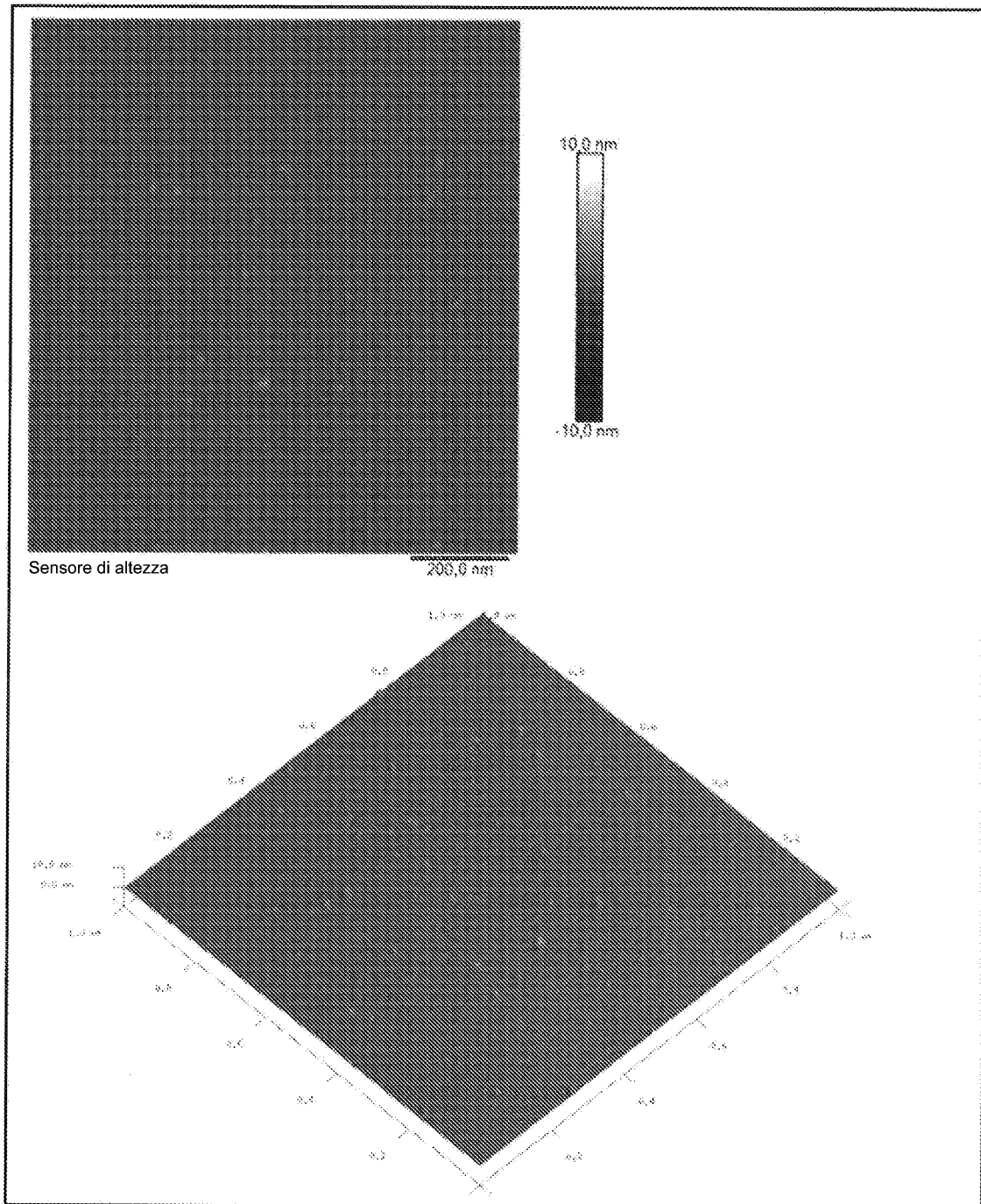


Fig. 10

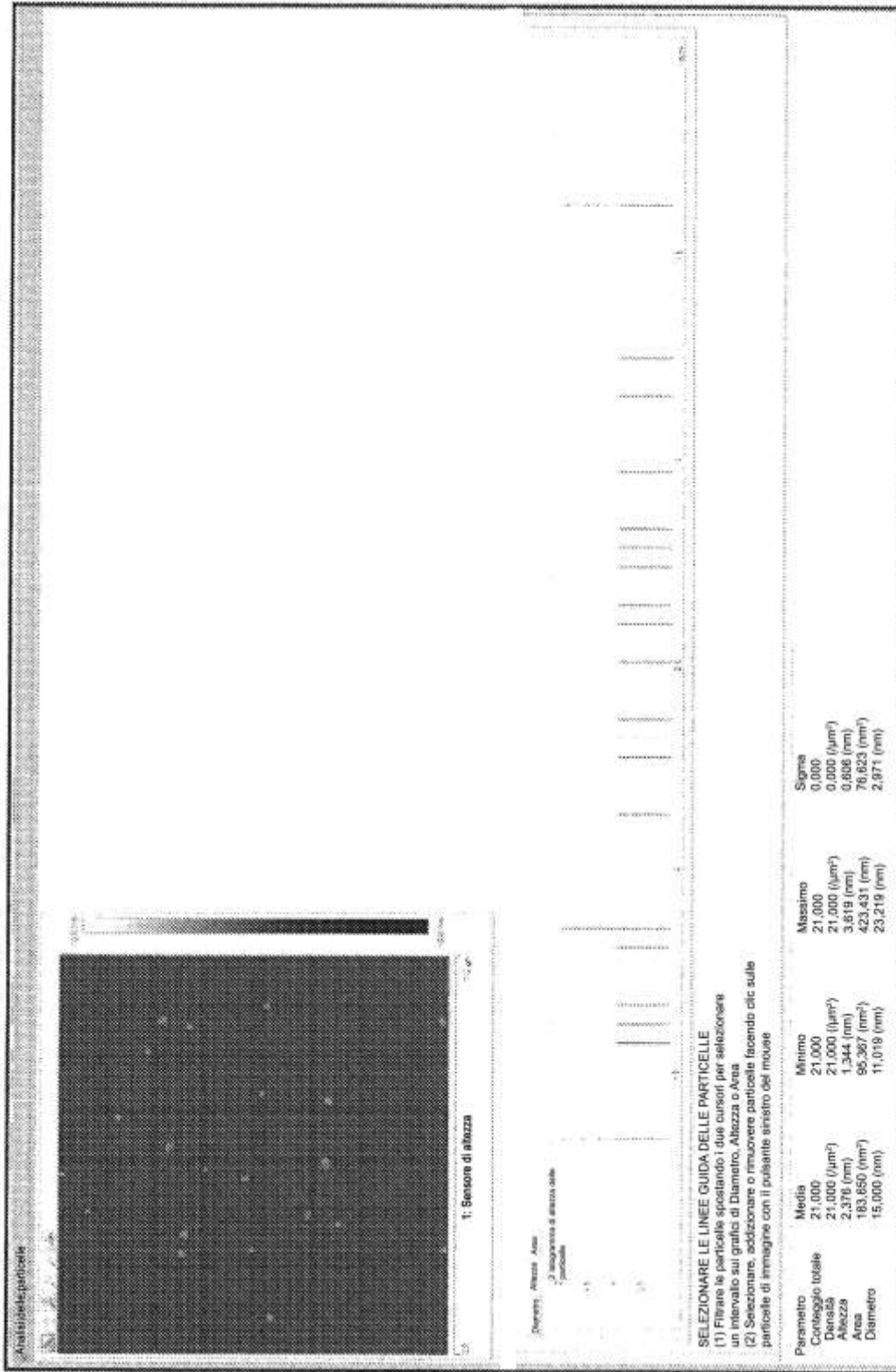


Fig. 11

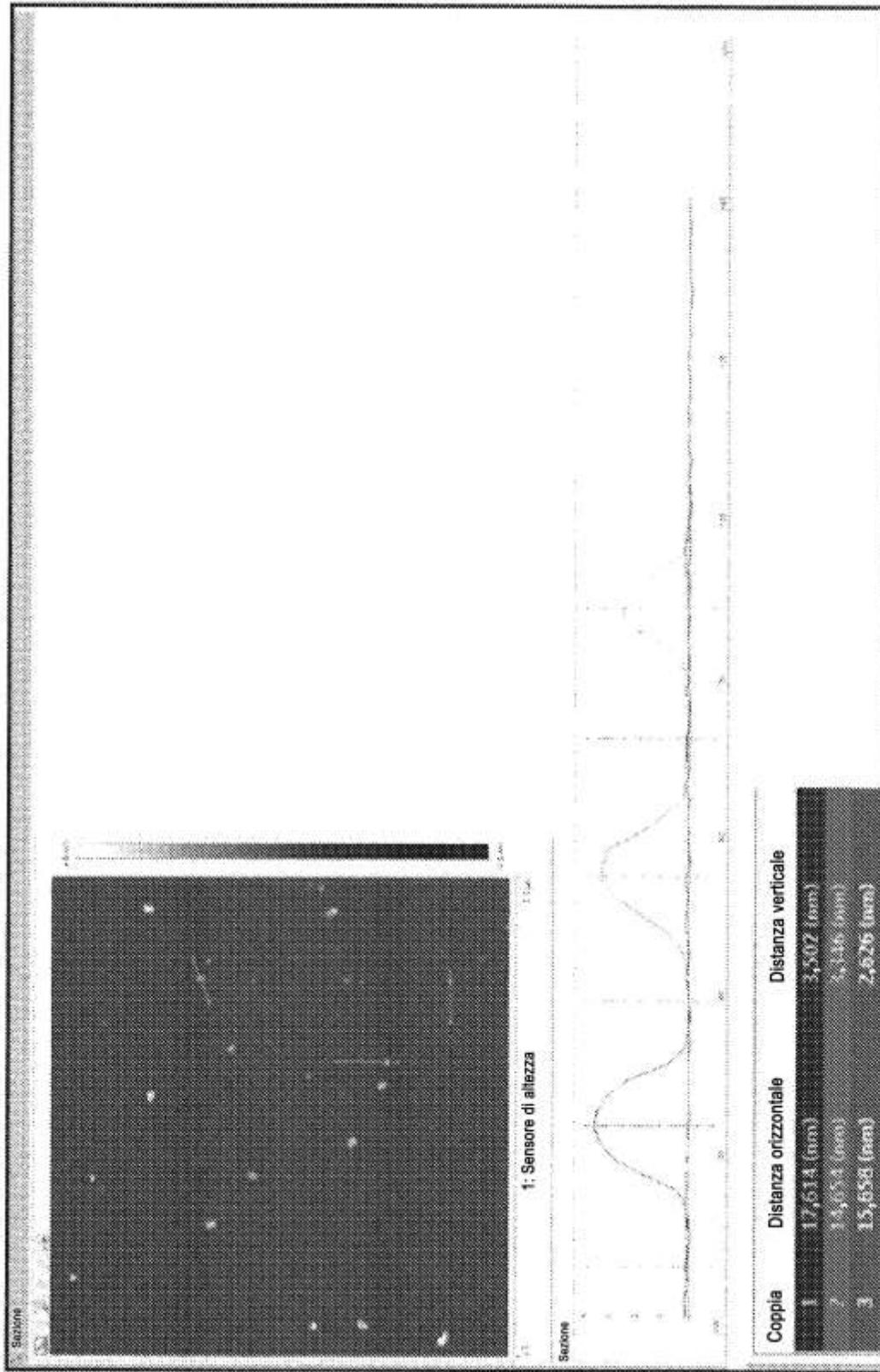


FIG. 12

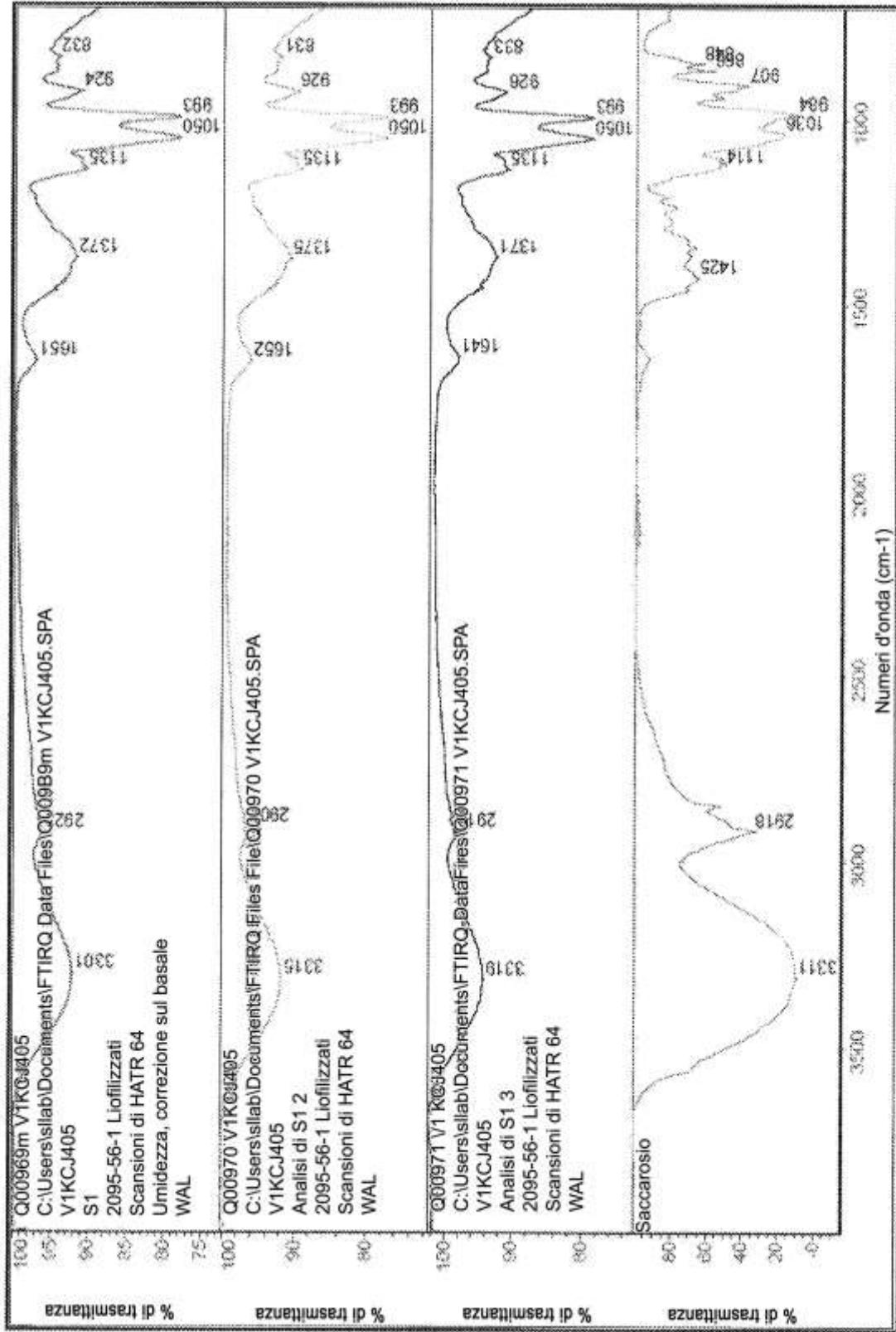


FIG. 13

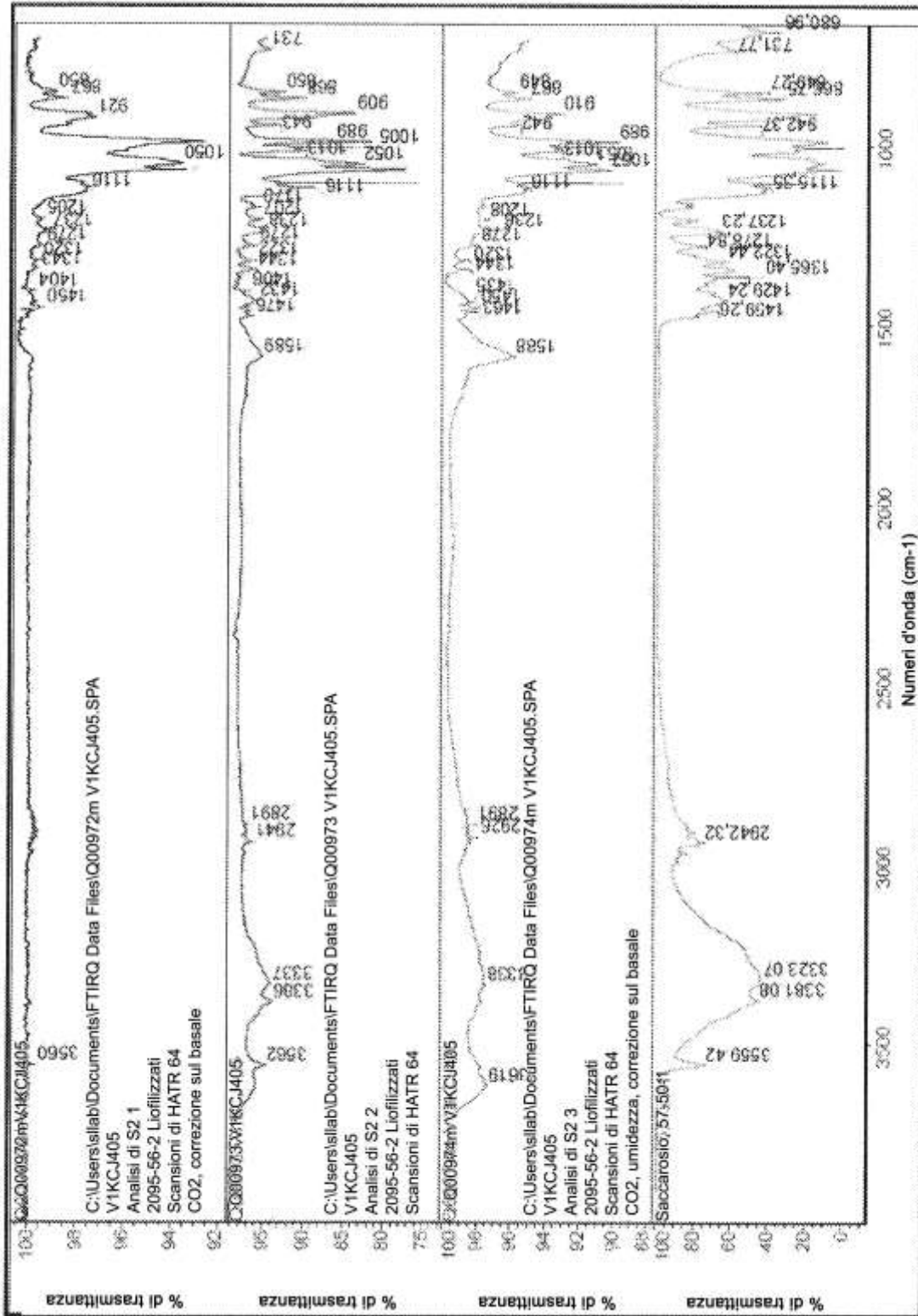


FIG. 14

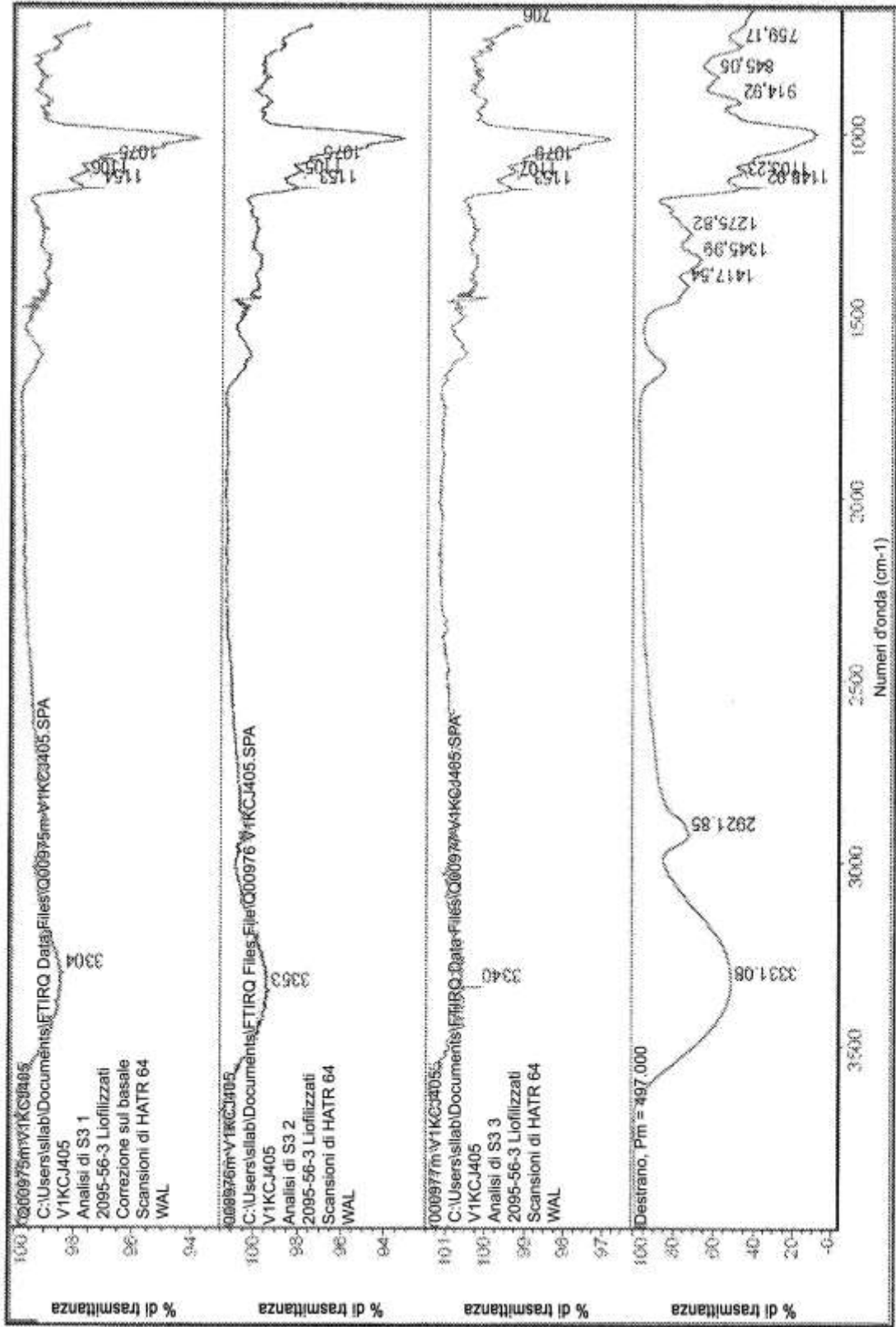


FIG. 15





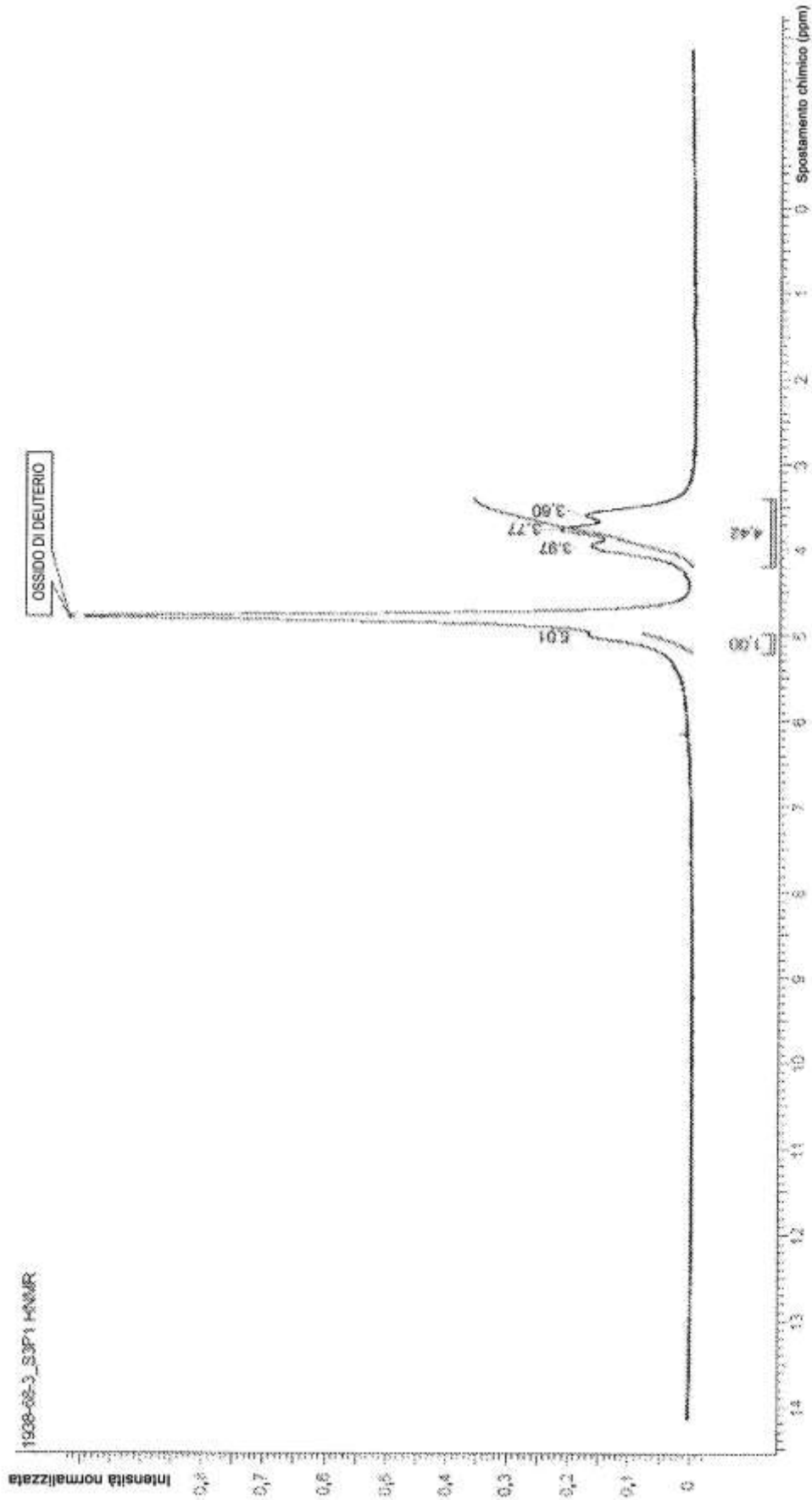
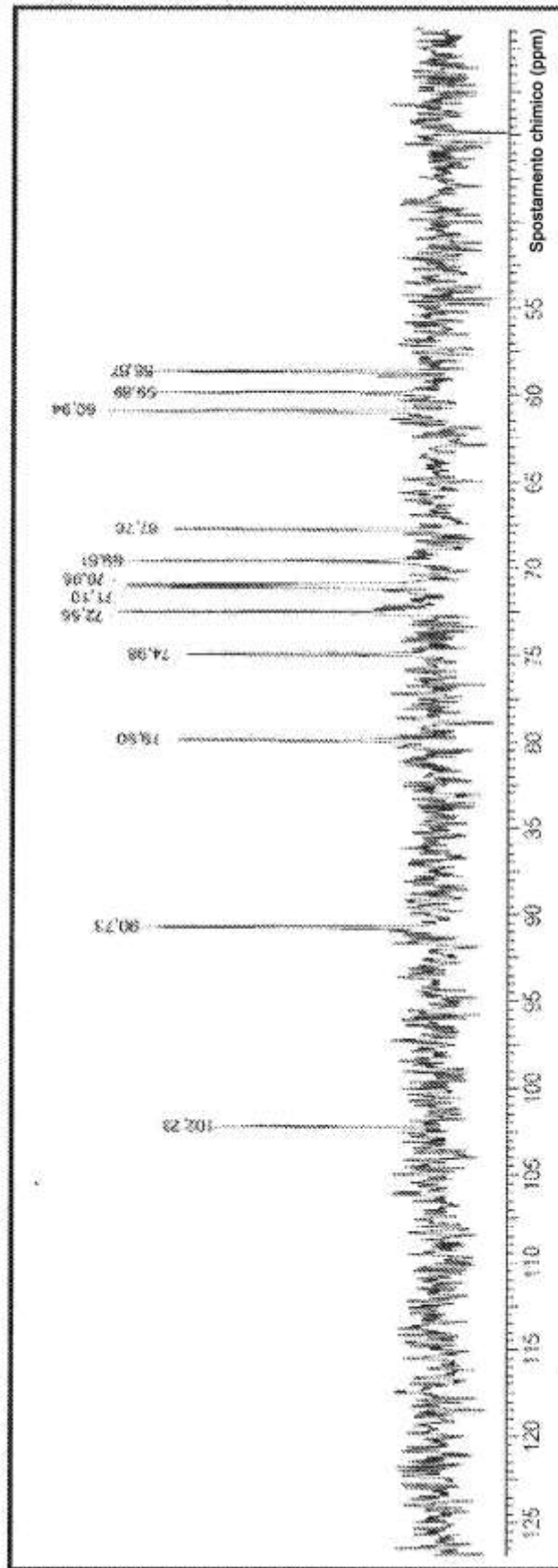


FIG. 18: Spettri  $^1\text{H}$  NMR della preparazione di S3 1



**FIG. 19: Spettri  $^{13}\text{C}$  NMR della preparazione di S1 1**

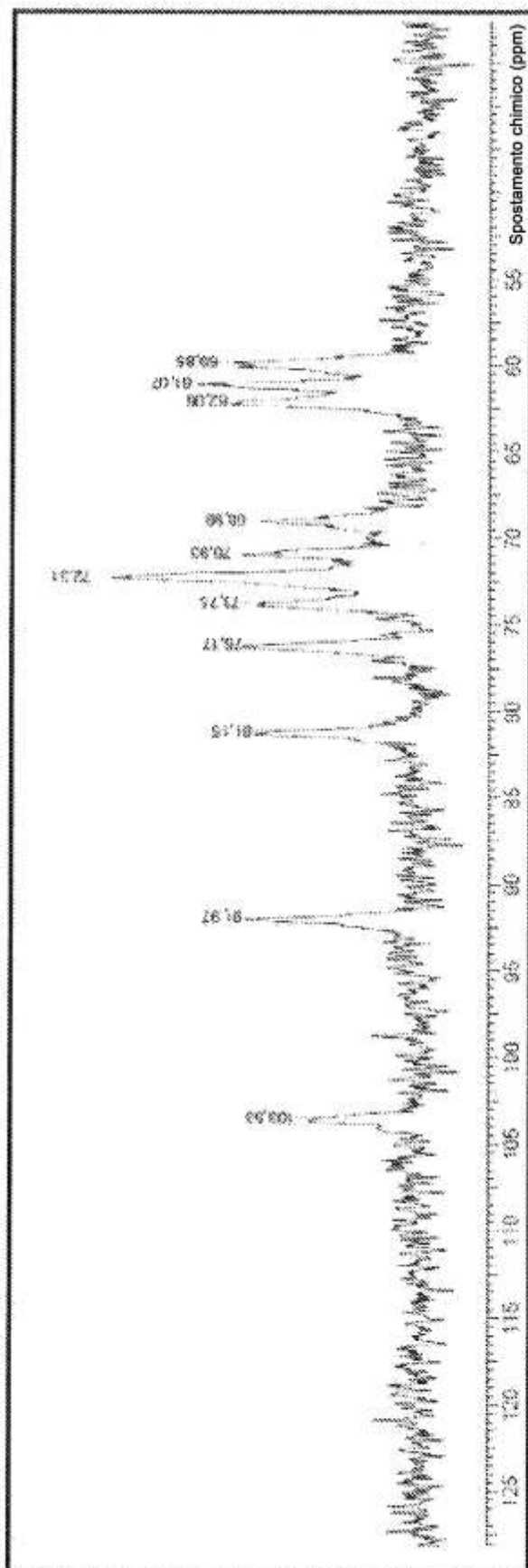


FIG. 20: Spettri  $^{13}\text{C}$  NMR della preparazione di S2 1

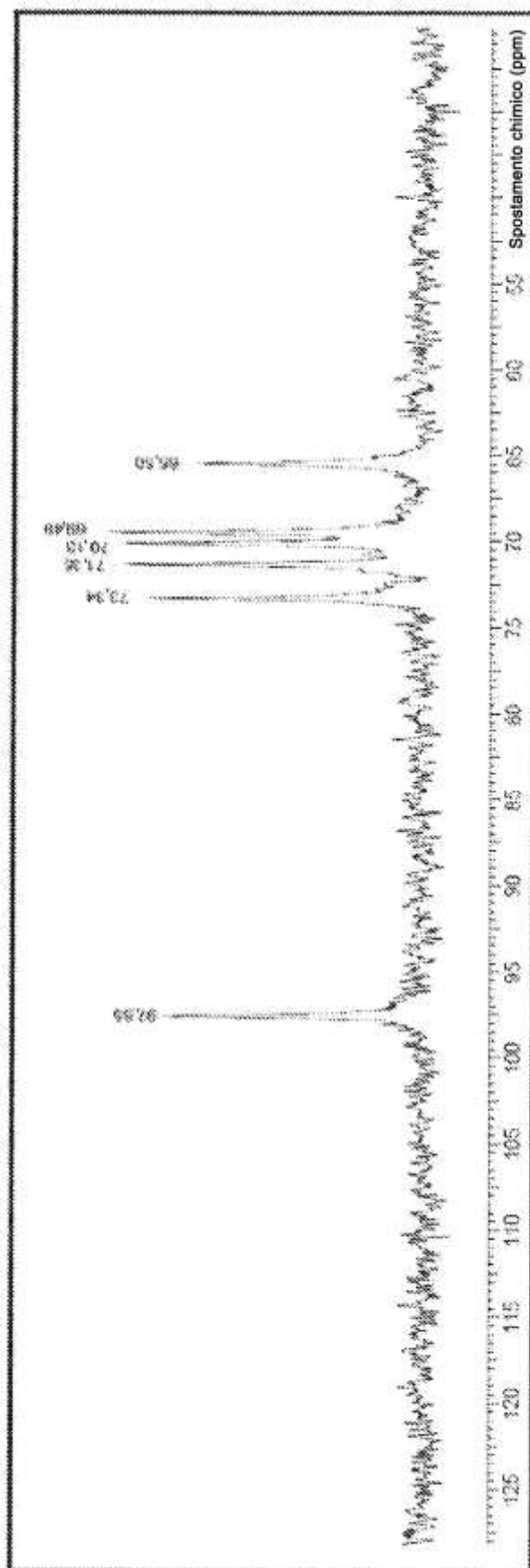


FIG. 21: Spettri  $^{13}\text{C}$  NMR della preparazione di S3 I

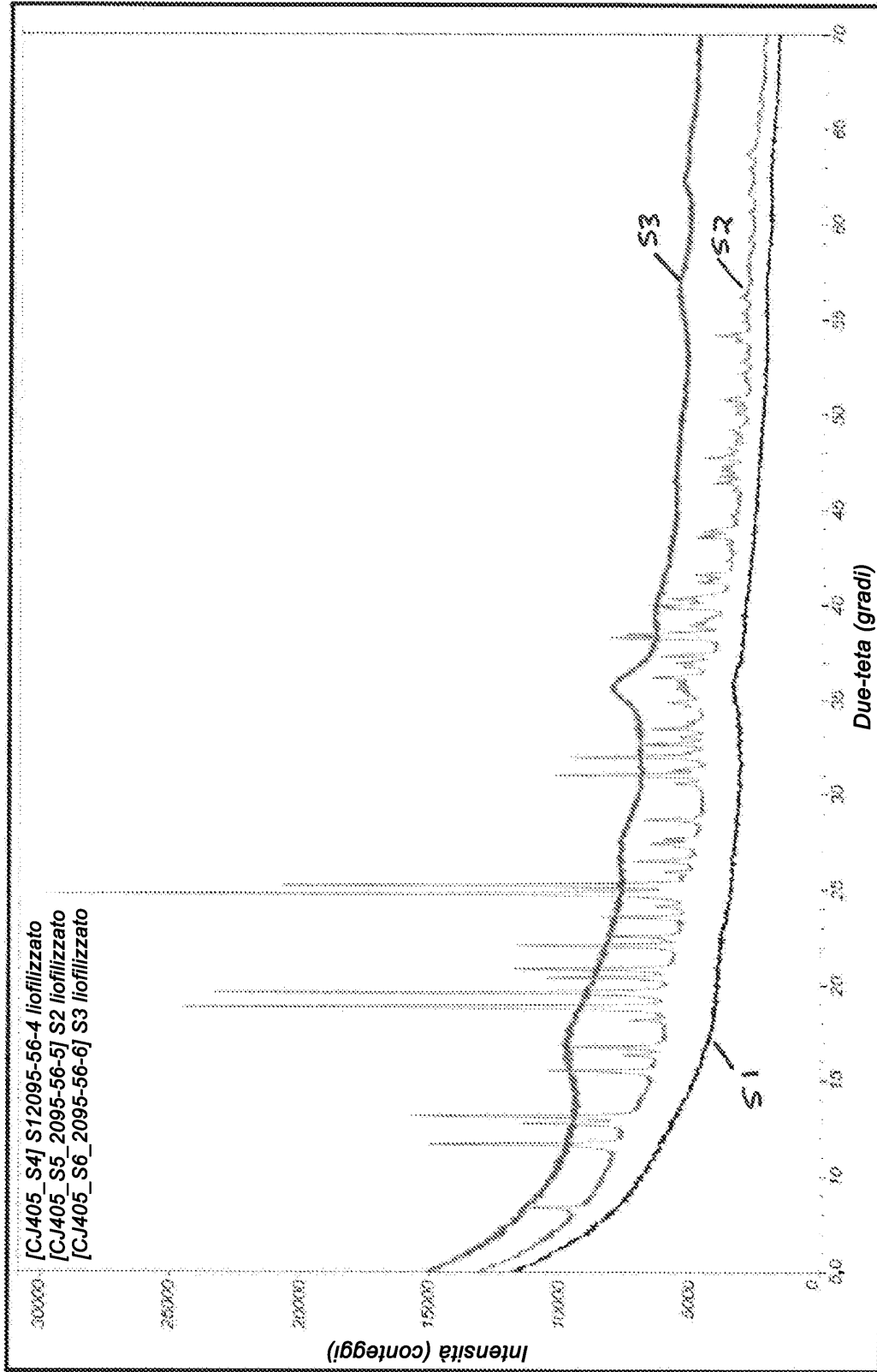


FIG. 22: Confronto dei dati grezzi per i tre campioni (liofilizzati)

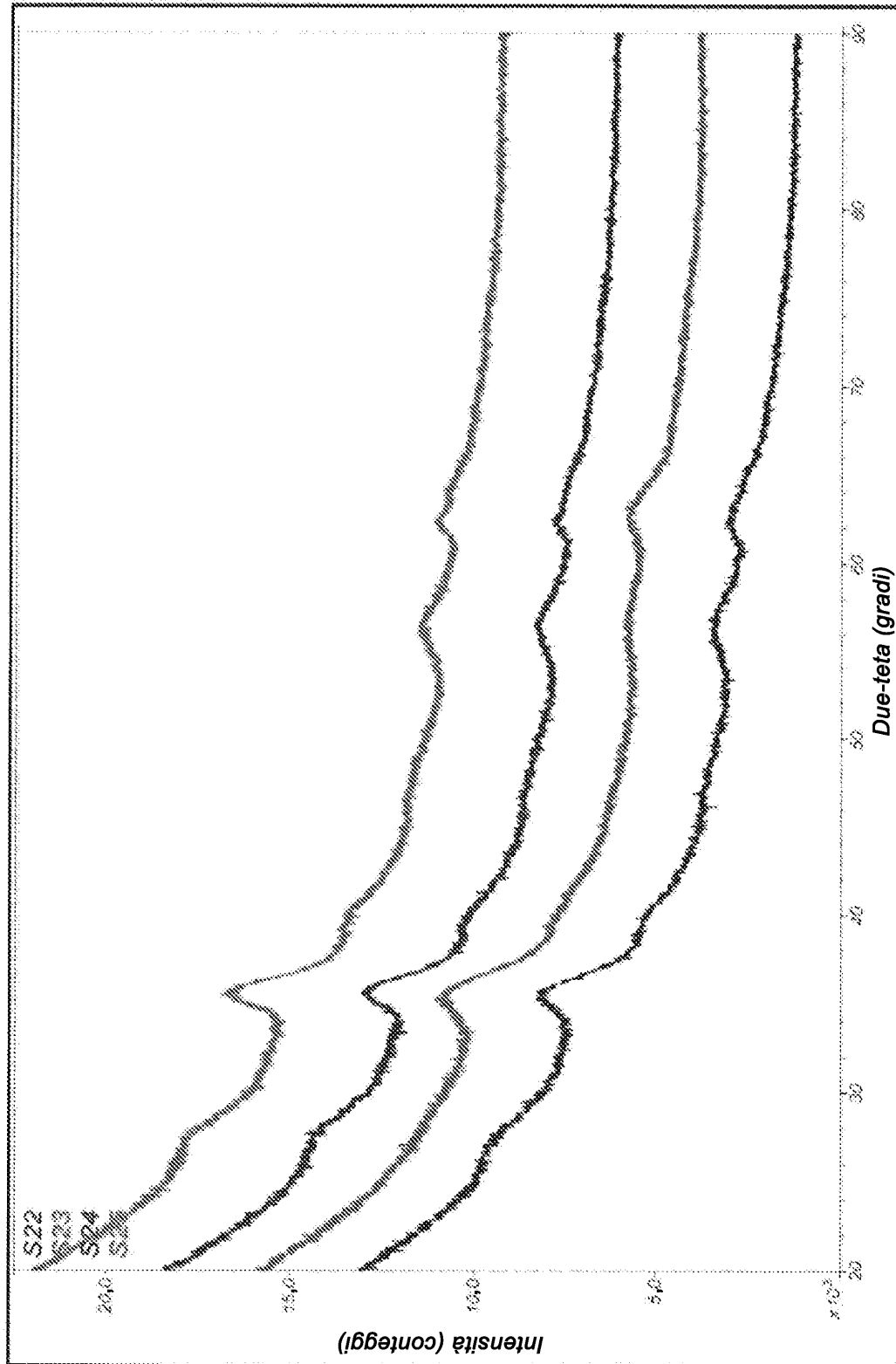


FIG. 23: Sovrapposizione di sfalsamento dei dati da tutti e tre i campioni (due repliche per S3)

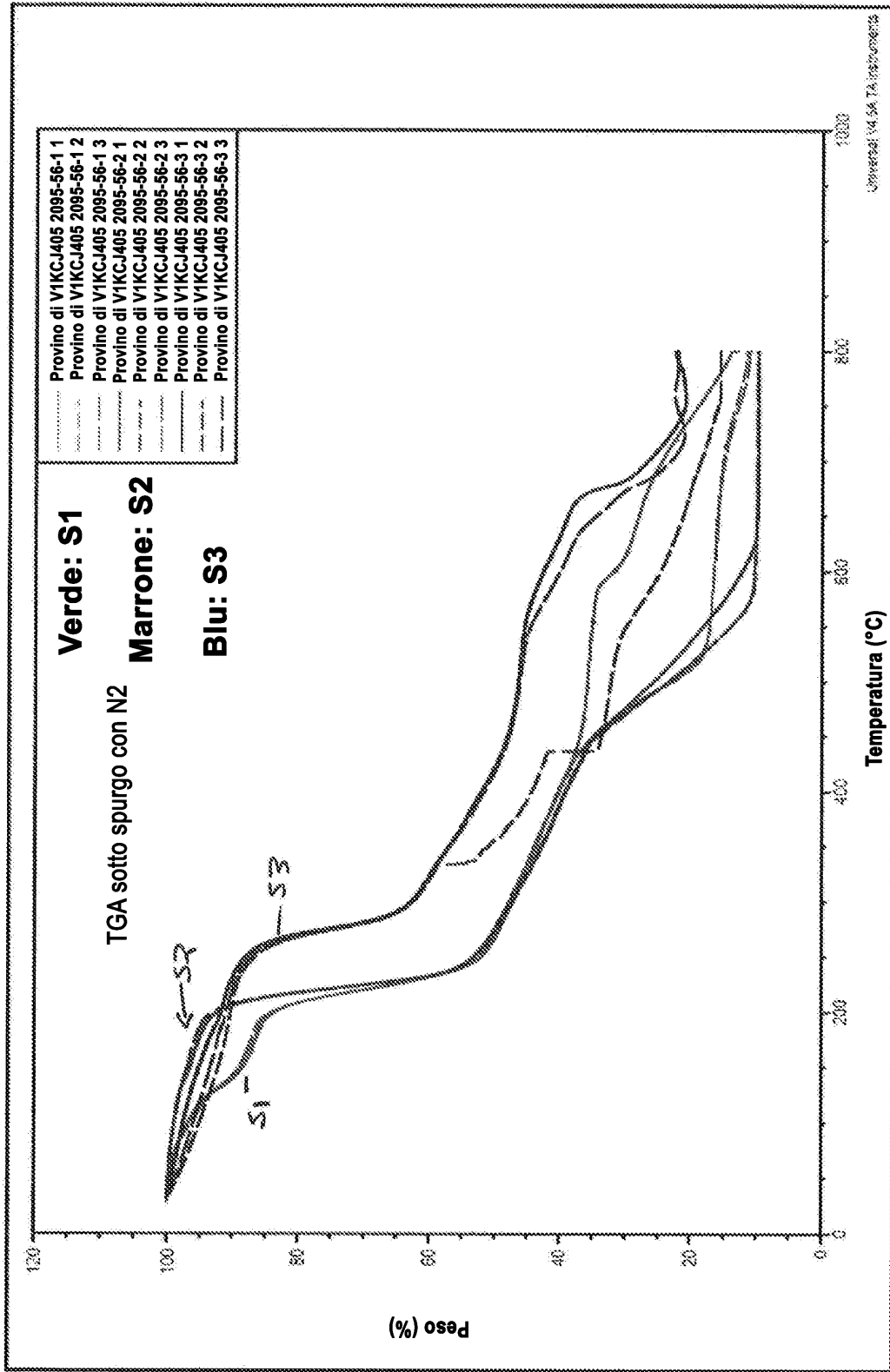


Fig. 24: Termogramma di TGA di S1, S2 ed S3 sotto condizione di spurgo con azoto

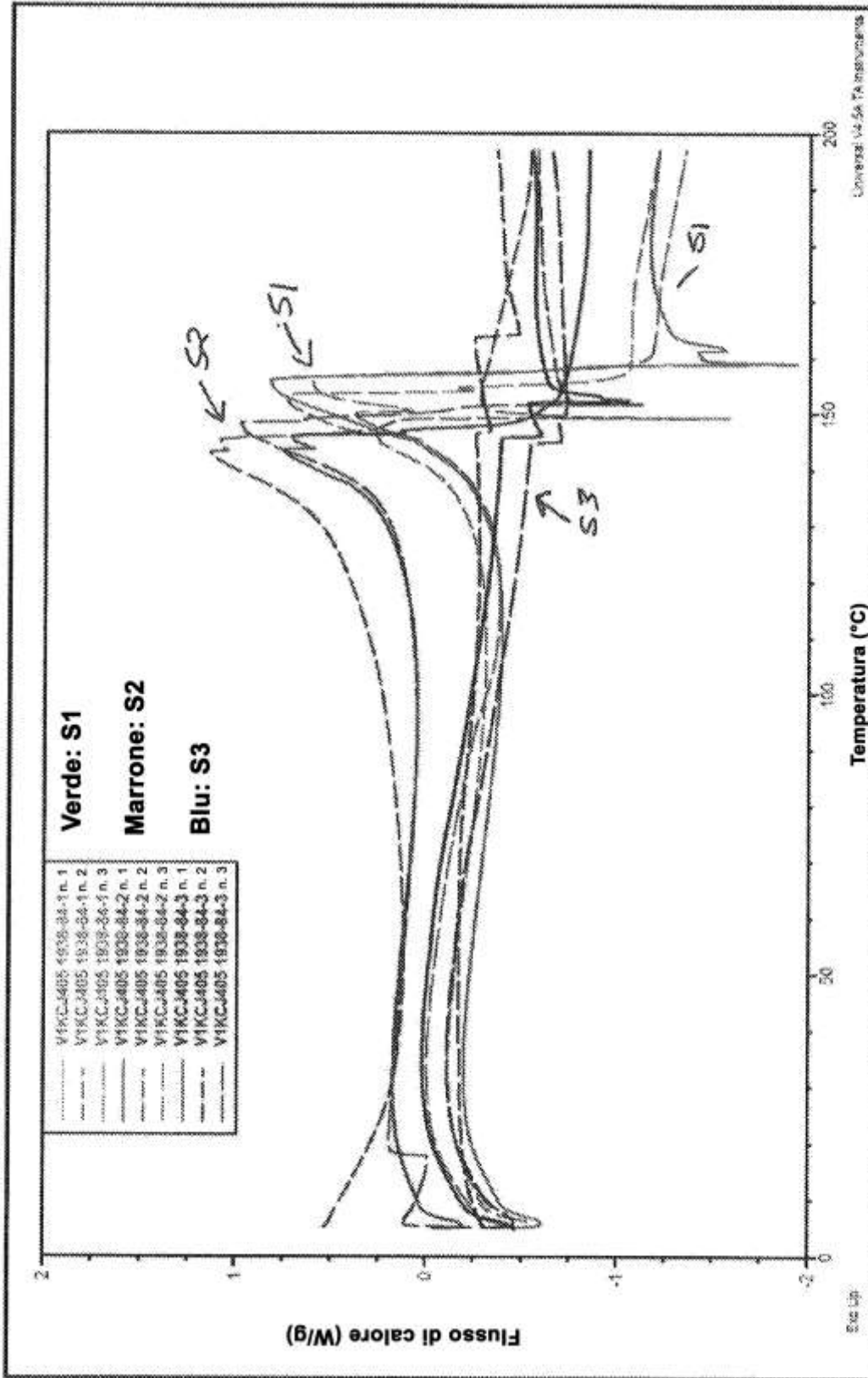


Fig. 25: Termogrammi DSC di S1, S2 e S3