



# Università della Calabria

---

Dipartimento di Farmacia  
e Scienze della Salute e della Nutrizione

Dottorato di Ricerca in  
MEDICINA TRASLAZIONALE

*XXXIII Ciclo*

## Sistemi polimerici multicomponente per la veicolazione di principi attivi

Settore Scientifico Disciplinare: CHIM/09 - Farmaceutico Tecnologico Applicativo

*Coordinatore*  
Prof. Sebastiano Andò

*Supervisore*  
Prof.ssa Francesca Iemma

*Dottoranda*  
Dott.ssa Annafranca Farfalla

  
\_\_\_\_\_

# INDICE

<b>ABSTRACT</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1 INTRODUZIONE</b>	<b>- 5 -</b>
<b>1.1 Idrogel</b>	<b>- 5 -</b>
1.1.1 Idrogel per il rilascio controllato di farmaci	- 5 -
1.1.2 Valutazione del rilascio di un farmaco da un idrogel	- 7 -
1.1.3 Idrogel per il trattamento delle ferite cutanee	- 11 -
1.1.3.1 Idrogel polisaccaridici per il trattamento delle ferite cutanee	- 13 -
1.1.3.2 Idrogel proteici per il trattamento delle ferite cutanee	- 14 -
1.1.3.3 Idrogel elettrosensibili per il trattamento delle ferite cutanee	- 16 -
<b>1.2 Sistemi polimerici micro- e nano- particellari</b>	<b>- 19 -</b>
1.2.1 Le nanotecnologie in campo biomedico e farmaceutico	- 19 -
1.2.2 Nanoparticelle a base di destrano	- 22 -
1.2.3 Nanoparticelle a base di cheratina	- 23 -
<b>1.3 Coniugati polimerici</b>	<b>- 25 -</b>
1.3.1 Coniugati polimerici in campo biomedico e farmaceutico	- 25 -
1.3.2 Coniugati polimero-polifenolo	- 26 -
1.3.2.1 Sintesi di coniugati polimero-polifenolo mediante reazione di condensazione	- 29 -
1.3.2.2 Sintesi di coniugati polimero-polifenolo mediante grafting radicalico	- 30 -
1.3.2.3 Sintesi di coniugati polimero-polifenolo mediante catalisi enzimatica	- 32 -
<b>1.4 Nanostrutture al carbonio</b>	<b>- 36 -</b>
1.4.1 Nanostrutture al carbonio in campo tecnologico farmaceutico	- 36 -
1.4.2 Nanotubi di Carbonio	- 40 -
1.4.2.1 Sintesi dei nanotubi di carbonio	- 42 -
1.4.2.2 Funzionalizzazione dei CNT per applicazioni biomediche	- 43 -
1.4.3 Grafene	- 45 -
1.4.3.1 Funzionalizzazione del grafene per applicazioni biomediche	- 46 -
<b>2 RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>- 49 -</b>
<b>2.1 Idrogel ibridi elettrosensibili per la medicazione delle ferite cutanee</b>	<b>- 49 -</b>
2.1.1 Premessa	- 49 -
2.1.2 Sintesi e caratterizzazione chimico-fisica degli idrogel ibridi	- 50 -
2.1.3 Determinazione dell'attività proteolitica	- 55 -
2.1.4 Determinazione dei profili di rilascio	- 57 -
2.1.5 Biocompatibilità e attività antimicrobica	- 61 -
2.1.6 Conclusioni	- 63 -
<b>2.2 Idrogel antiossidanti sensibili a stimoli esterni</b>	<b>- 64 -</b>
2.2.1 Premessa	- 64 -
2.2.2 Sintesi del coniugato chitosano-quercetina	- 65 -
2.2.3 Caratterizzazione del coniugato chitosano-quercetina	- 66 -
2.2.4 Sintesi degli idrogel	- 69 -
2.2.5 Caratterizzazione degli idrogel	- 70 -
2.2.6 Determinazione dei profili di rilascio	- 73 -
2.2.7 Conclusioni	- 77 -

<b>2.3</b>	<b>Sistemi multicomponente a base di idrogel antiossidanti e microparticelle autoassemblanti per il trattamento delle ferite cutanee</b>	<b>- 78 -</b>
2.3.1	Premessa	- 78 -
2.3.2	Sintesi e caratterizzazione del coniugato gelatina curcumina	- 80 -
2.3.3	Sintesi e caratterizzazione della cheratina lipidizzata	- 82 -
2.3.4	Sintesi e caratterizzazione degli idrogel	- 85 -
2.3.5	Sintesi e caratterizzazione delle microparticelle di cheratina	- 88 -
2.3.6	Sintesi e caratterizzazione del sistema composito	- 88 -
2.3.7	Valutazione dei profili di rilascio	- 90 -
2.3.8	Valutazione dell'attività antimicrobica	- 91 -
2.3.9	Conclusioni	- 92 -
<b>2.4</b>	<b>Nanoparticelle a base di Destrano-Curcumina per la veicolazione del metotrexato nel trattamento del cancro al seno</b>	<b>- 94 -</b>
2.4.1	Premessa	- 94 -
2.4.2	Sintesi e caratterizzazione del sistema nanoparticellare	- 95 -
2.4.3	Determinazione dei profili di rilascio	- 98 -
2.4.4	Attività biologica	- 99 -
2.4.5	Conclusioni	- 102 -
<b>2.5</b>	<b>Nanoibridi a base di Nanotubi di Carbonio e Chitosano per la veicolazione sito-specifica del Metotrexato in cellule di carcinoma polmonare</b>	<b>- 104 -</b>
2.5.1	Premessa	- 104 -
2.5.2	Sintesi e caratterizzazione dei nanoibridi	- 105 -
2.5.3	Valutazione dei profili di rilascio	- 109 -
2.5.4	Determinazione dell'attività antitumorale	- 110 -
2.5.5	Conclusioni	- 112 -
<b>2.6</b>	<b>Nanocarrier magnetici a base di grafene ossido per la veicolazione sito-specifica del Cisplatino nel trattamento del Glioblastoma</b>	<b>- 113 -</b>
2.6.1	Premessa	- 113 -
2.6.2	Sintesi e caratterizzazione dei nanoibridi	- 114 -
2.6.3	Determinazione dei profili di rilascio	- 118 -
2.6.4	Valutazione della citotossicità <i>in vitro</i>	- 119 -
2.6.5	Conclusioni	- 121 -
<b>2.7</b>	<b>Nanoibridi funzionali a base di ossido di grafene per la veicolazione sito-specifica della Doxorubicina in cellule di Neuroblastoma</b>	<b>- 122 -</b>
2.7.1	Premessa	- 122 -
2.7.2	Sintesi e caratterizzazione del sistema idrido	- 123 -
2.7.2.1	Sintesi e caratterizzazione della componente inorganica	- 123 -
2.7.2.2	Sintesi e caratterizzazione del rivestimento organico	- 125 -
2.7.2.3	Sintesi e caratterizzazione del sistema C@HSA-MNPs@rGO	- 125 -
2.7.3	Determinazione dei profili di rilascio	- 128 -
2.7.4	Valutazione della citotossicità <i>in vitro</i>	- 130 -
2.7.5	Conclusioni	- 132 -
<b>3</b>	<b>PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>- 133 -</b>
<b>3.1</b>	<b>Strumentazione</b>	<b>- 133 -</b>
<b>3.2</b>	<b>Sintesi delle nanoparticelle inorganiche</b>	<b>- 136 -</b>
3.2.1	Sintesi dei nanotubi di carbonio ossidati	- 136 -
3.2.2	Sintesi del Grafene Ossido	- 136 -
3.2.3	Sintesi delle nanoparticelle di magnetite	- 137 -

3.2.4	Sintesi delle nanoparticelle di maghemite	- 137 -
<b>3.3</b>	<b>Sintesi dei coniugati polimerici</b>	<b>- 138 -</b>
3.3.1	Sintesi mediante grafting radicalico	- 138 -
3.3.1.1	Sintesi del coniugato chitosano-quercetina	- 138 -
3.3.1.2	Sintesi del coniugato di cheratina lipidizzata	- 139 -
3.3.1.2.1	Estrazione della cheratina	- 139 -
3.3.1.2.2	Sintesi del PEGS	- 139 -
3.3.1.2.3	Sintesi del coniugato I-Ker	- 139 -
3.3.2	Sintesi dei coniugati polimerici mediante catalisi enzimatica	- 140 -
3.3.2.1	Sintesi del biocatalizzatore	- 140 -
3.3.2.2	Reazioni di bioconiugazione laccasi-catalizzate	- 140 -
<b>3.4</b>	<b>Sintesi degli idrogel</b>	<b>- 141 -</b>
<b>3.5</b>	<b>Sintesi dei sistemi micro- e nano-particellari</b>	<b>- 142 -</b>
3.5.1	Sintesi del sistema microparticellare PK	- 142 -
3.5.2	Sintesi del sistema nanoparticellare DC	- 142 -
3.5.3	Sintesi del sistema composito P <sub>K</sub> H <sub>GC</sub> / P <sub>K</sub> H <sub>G</sub>	- 142 -
<b>3.6</b>	<b>Sintesi dei sistemi ibridi</b>	<b>- 142 -</b>
3.6.1	Sintesi del sistema ibrido CS_MWCNT	- 142 -
3.6.2	Sintesi del sistema ibrido $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @NGO	- 142 -
3.6.3	Sintesi del sistema ibrido C@HSA-MNP@rGO	- 143 -
<b>3.7</b>	<b>Determinazione del grado di funzionalizzazione</b>	<b>- 143 -</b>
3.7.1	Determinazione dei gruppi amminici liberi	- 143 -
3.7.2	Determinazione dei gruppi tiolici liberi	- 144 -
3.7.3	Determinazione del contenuto proteico	- 144 -
3.7.4	Determinazione dell'attività proteolitica	- 144 -
3.7.4.1	Saggio del PApNA	- 145 -
3.7.4.2	Determinazione del grado di idrolisi	- 145 -
<b>3.8</b>	<b>Determinazione delle proprietà antiossidanti</b>	<b>- 145 -</b>
3.8.1	Determinazione dei gruppi fenolici disponibili	- 145 -
3.8.2	Determinazione dell'attività scavenger	- 146 -
3.8.2.1	Saggio del DPPH	- 146 -
3.8.2.2	Saggio dell'ABTS	- 147 -
3.8.2.3	Determinazione dell'attività antiossidante Trolox-equivalente	- 147 -
<b>3.9</b>	<b>Determinazione della concentrazione di aggregazione critica</b>	<b>- 148 -</b>
<b>3.10</b>	<b>Determinazione del grado di rigonfiamento degli idrogel</b>	<b>- 148 -</b>
<b>3.11</b>	<b>Caricamento dei farmaci</b>	<b>- 149 -</b>
3.11.1	Caricamento di idrogel e nanoibridi	- 149 -
3.11.2	Caricamento di sistemi micro- e nano-particellari	- 149 -
3.11.3	Determinazione dell'efficienza di caricamento	- 149 -
<b>3.12</b>	<b>Determinazione dei profili di rilascio</b>	<b>- 150 -</b>
3.12.1	Studi di rilascio in vitro	- 150 -
3.12.2	Studi di rilascio pulsati	- 152 -
<b>3.13</b>	<b>Saggi biologici</b>	<b>- 152 -</b>
3.13.1	Colture cellulari	- 152 -
3.13.2	Studi di citotossicità in vitro	- 152 -
3.13.3	Studi di citotossicità in condizioni ossidative	- 153 -
3.13.4	Studi di internalizzazione cellulare	- 153 -

3.13.4.1	Studi di internalizzazione del sistema DC	- 153 -
3.13.4.2	Internalizzazione degli ibridi CS_MWCNT e C@HSA-MNPs@rGO	- 154 -
<b>3.14</b>	<b>Saggi microbiologici</b>	<b>- 154 -</b>
3.14.1	Inoculo batterico	- 154 -
3.14.2	Attività antibatterica della quercetina	- 154 -
3.14.3	Attività antibatterica degli idrogel compositi	- 155 -
3.14.4	Attività antibatterica degli idrogel ibridi	- 155 -
<b>3.15</b>	<b>Analisi statistica</b>	<b>- 155 -</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>- 156 -</b>

## INDICE DELLE FIGURE

<b>Figura 1.1.1</b> Struttura chimica del chitosano _____	- 14 -
<b>Figura 1.1.2</b> Bending di un idrogel elettrosensibile sotto effetto di un campo elettrico _____	- 17 -
<b>Figura 1.2.1</b> Rappresentazione delle proprietà delle nanoparticelle in campo biomedico _____	- 19 -
<b>Figura 1.2.2</b> Struttura chimica del destrano _____	- 22 -
<b>Figura 1.2.3</b> Rappresentazione delle interazioni inter- ed intra-molecolari nella cheratina _____	- 23 -
<b>Figura 1.3.1</b> Rappresentazione del modello di profarmaco secondo Ringsdorf _____	- 25 -
<b>Figura 1.3.2</b> Struttura chimica della curcumina _____	- 27 -
<b>Figura 1.3.3</b> Struttura chimica della quercetina _____	- 27 -
<b>Figura 1.3.4</b> Reazione di condensazione tra PLC-g-AA e Resveratrolo _____	- 30 -
<b>Figura 1.3.5</b> Schematizzazione di un processo di grafting radicalico _____	- 31 -
<b>Figura 1.3.6</b> Rappresentazione del sito catalitico delle laccasi _____	- 33 -
<b>Figura 1.3.7</b> Ciclo catalitico della laccasi _____	- 33 -
<b>Figura 1.4.1</b> Rappresentazione schematica delle principali funzionalizzazioni covalenti delle nanostrutture al carbonio - 40 -	- 40 -
<b>Figura 1.4.2</b> Rappresentazione schematica della formazione di SWCNT e MWCNT _____	- 41 -
<b>Figura 1.4.3</b> Rappresentazione della chiralità dei CNT _____	- 41 -
<b>Figura 1.4.4</b> Rappresentazione della struttura di un singolo strato di grafene _____	- 45 -
<b>Figura 1.4.5</b> Rappresentazione della struttura del grafene ossido _____	- 47 -
<b>Figura 1.4.6</b> Rappresentazione della struttura del grafene ossido ridotto _____	- 47 -
<b>Figura 1.4.7</b> Rappresentazione dei punti quantici di grafene _____	- 48 -
<b>Figura 2.1.1</b> Rappresentazione della preparazione degli idrogel ibridi oggetto del presente studio _____	- 49 -
<b>Figura 2.1.2</b> Rappresentazione della sintesi degli idrogel ibridi _____	- 50 -
<b>Figura 2.1.3</b> Spettri Raman di GO e dei nanoibridi HG <sub>GO</sub> e HT <sub>GO</sub> _____	- 51 -
<b>Figura 2.1.4</b> Termogrammi TGA (A) and DTG (B) degli idrogel contenenti Gelatina o Tripsina (HG e HT) e degli idrogel ibridi contenenti GO (HG <sub>GO</sub> e HT <sub>GO</sub> ) _____	- 52 -
<b>Figura 2.1.5</b> Cinetica enzimatica di Try libera (■) e immobilizzata in HT (●) e HT <sub>GO</sub> (*) _____	- 56 -
<b>Figura 2.1.6</b> Profili di rilascio di Cur da HG (A); HG <sub>GO</sub> (B); HT (C); HT <sub>GO</sub> (D) a 0 (■); 12 (●); 24 (▲); e 48 (x) V _____	- 58 -
<b>Figura 2.1.7</b> Morfologia delle cellule MRC-5 in seguito ad incubazione con HG (A) e HG <sub>GO</sub> (B) _____	- 61 -
<b>Figura 2.1.8</b> Effetto della curcumina rilasciata sull'inibizione dell'adesione di Staphylococcus aureus sugli idrogel con e senza fotoattivazione _____	- 62 -
<b>Figura 2.2.1</b> Rappresentazione degli idrogel funzionali oggetto del presente studio _____	- 64 -
<b>Figura 2.2.2</b> Rappresentazione della sintesi del coniugato CHITQ _____	- 65 -
<b>Figura 2.2.3</b> Spettro <sup>1</sup> H-NMR di CHITB, Q e CHITQ _____	- 66 -
<b>Figura 2.2.4</b> Termogrammi DSC di CHITB, Q e CHITQ _____	- 68 -
<b>Figura 2.2.5</b> Rappresentazione della sintesi dell'idrogel HQ _____	- 69 -
<b>Figura 2.2.6</b> Spettri FTIR di HQ e HB _____	- 70 -
<b>Figura 2.2.7</b> Termogrammi DSC di HB e HQ _____	- 71 -
<b>Figura 2.2.8</b> Vitalità delle cellule MRC-5 in seguito ad incubazione con HB e HQ _____	- 71 -
<b>Figura 2.2.9</b> Profili di rilascio di caffeina da HQ (quadrati) e HB (triangoli) a 25°C (linee continue) e 40°C (linee tratteggiate) a pH 2.0 (simboli vuoti) e pH 7.0 (simboli pieni) _____	- 73 -
<b>Figura 2.2.10</b> Profili di rilascio di caffeina da HQ (quadrati) e HB (triangoli). Gli idrogel sono posti inizialmente a 25°C (a-b) o 40°C (c-d), e la temperatura variata ciclicamente tra 25 e 40°C, a pH 2.0 (simboli vuoti) e pH 7.0 (simboli pieni) _____	- 76 -
<b>Figura 2.3.1</b> Rappresentazione schematica dell'idrogel composito multifunzionale oggetto del presente studio _____	- 78 -
<b>Figura 2.3.2</b> Rappresentazione schematica della preparazione dell'idrogel composito multifunzionale _____	- 79 -
<b>Figura 2.3.3</b> Spettri <sup>1</sup> H-NMR di Gel, Cur e Gel-Cur _____	- 81 -
<b>Figura 2.3.4</b> Spettri UV-Vis di Cur e Gel-Cur _____	- 81 -
<b>Figura 2.3.5</b> SDS-PAGE di Ker in seguito a processo di estrazione _____	- 82 -

<b>Figura 2.3.6</b> Schematizzazione della sintesi del coniugato l-Ker	- 83 -
<b>Figura 2.3.7</b> Spettri FT-IR e <sup>1</sup> H-NMR di PEG40ST (A); PEGS (B)	- 83 -
<b>Figura 2.3.8</b> Spettri FT-IR e <sup>1</sup> H-NMR di Ker (A) e l-Ker (B)	- 84 -
<b>Figura 2.3.9</b> Determinazione del valore di CAC del coniugato l-Ker mediante saggio del Pirene	- 85 -
<b>Figura 2.3.10</b> Immagine SEM del campione H <sub>GC</sub>	- 85 -
<b>Figura 2.3.11</b> Profilo di rigonfiamento di H <sub>G</sub> (●) e H <sub>GC</sub> (■)	- 86 -
<b>Figura 2.3.12</b> Vitalità di cellule MRC-5 dopo 72 h di incubazione con H <sub>GC</sub> (●) e H <sub>G</sub> (■)	- 87 -
<b>Figura 2.3.13</b> Vitalità di cellule MRC-5 dopo 4 h di incubazione con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pretrattata con H <sub>G</sub> (●) e H <sub>GC</sub> (●)	- 87 -
<b>Figura 2.3.14</b> Immagine SEM del campione P <sub>K</sub>	- 88 -
<b>Figura 2.3.15</b> Immagine SEM del campione P <sub>K</sub> H <sub>GC</sub>	- 89 -
<b>Figura 2.3.16</b> Immagine al microscopio a fluorescenza delle cellule KELLY-GFP coltivate sul composito P <sub>K</sub> H <sub>GC</sub>	- 89 -
<b>Figura 2.3.17</b> Profili di rilascio di Q da Q@P <sub>K</sub> (●); Q@P <sub>K</sub> H <sub>GC</sub> (◆); Q@P <sub>K</sub> H <sub>G</sub> (◇); Q@H <sub>GC</sub> (■); Q@H <sub>G</sub> (□)	- 90 -
<b>Figura 2.3.18</b> Attività antibatterica di Q caricata su diversi supporti	- 92 -
<b>Figura 2.4.1</b> Schematizzazione delle nanoparticelle autoassemblanti a base di destrano-curcumina	- 94 -
<b>Figura 2.4.2</b> Schematizzazione della sintesi del sistema nanoparticellare	- 95 -
<b>Figura 2.4.3</b> (A) Spettro FT-IR e (B) termogrammi DSC di CUR (A), DEX (B) e DEX-CUR(C)	- 96 -
<b>Figura 2.4.4</b> Determinazione del valore di CAC per il coniugato DEX-CUR	- 97 -
<b>Figura 2.4.5</b> Immagini TEM del sistema nanoparticellare DC	- 97 -
<b>Figura 2.4.6</b> Profili di rilascio di MTX (●) e MTX@DC (■)	- 98 -
<b>Figura 2.4.7</b> Vitalità cellulare di cellule MCF-7 dopo (A) 24 e (B) 48 h di incubazione	- 99 -
<b>Figura 2.4.8</b> Immagini al microscopio confocale dopo trattamento con CUR a DC a 20 μmol L <sup>-1</sup> per 4h	- 100 -
<b>Figura 2.4.9</b> Vitalità di cellule MCF-7 in seguito a trattamento con MTX libero	- 101 -
<b>Figura 2.4.10</b> Vitalità di cellule MCF-7 dopo trattamento con diverse concentrazioni di (a, b) CUR e (c, d) DC in combinazione con MTX 22 e 110 μmol mL <sup>-1</sup> per (a, c) 24 o (b, d) 48 h. Per ogni concentrazione di MTX, *P < 0.01, **P < 0.001, ***P < 0.0001 vs [CUR/DC] 0 μmol mL <sup>-1</sup> ; #P < 0.01, ##P < 0.001, ###P < 0.0001 vs [CUR/DC] 5 μmol mL <sup>-1</sup> ; °P < 0.01, °°P < 0.001, °°°P < 0.0001 vs [CUR/DC] 10 μmol mL <sup>-1</sup>	- 101 -
<b>Figura 2.5.1</b> Schematizzazione di un sistema ibrido costituito da CNT e polimero cationico <sup>□</sup>	- 104 -
<b>Figura 2.5.2</b> Immagini SEM di (a) MWCNT; (d) CS_MWCNT e immagini TEM di (b,c MWCNT) e (e,f) CS-MWCNT	- 106 -
<b>Figura 2.5.3</b> (a) spettro XPS di ox-MWCNT e CS_MWCNT; (b) spettro XPS C1s di ox-MWCNT e CS_MWCNT	- 107 -
-	
<b>Figura 2.5.4</b> Spettri Raman di MWCNT, ox-MWCNT e CS_MWCNT	- 108 -
<b>Figura 2.5.5</b> Curve TGA di ox-MWCNT (linea blu), CS (linea nera) e CS_MWCNT (linea rossa)	- 108 -
<b>Figura 2.5.6</b> Profili di rilascio di MTX da CS_MWCNT a pH 5.5 (linea rossa) e 7.4 (linea nera)	- 110 -
<b>Figura 2.5.7</b> Vitalità di cellule H1299 e MRC-5 dopo trattamento con CS_MWCNT (barra piena), MTX libero (barra con strisce vuote) e MTX@CS-MWCNT (barra con strisce piene). Le concentrazioni di MTX sono 7.72 10 <sup>-5</sup> (barra a righe) e 1.51 10 <sup>-3</sup> (barra diagonale) 10 <sup>-3</sup> mg mL <sup>-1</sup> . Le concentrazioni di CS_MWCNT sono 7.72 10 <sup>-4</sup> (barra verde chiaro) e 1.51 10 <sup>-2</sup> (barra verde scuro) mg mL <sup>-1</sup> . *p < 0.01, ***p < 0.0001, vs controllo corrispondente; °°°p < 0.0001 vs MTX a concentrazioni equivalenti; \$\$\$p < 0.0001 vs stesso trattamento sulle cellule H1299	- 111 -
<b>Figura 2.5.8</b> Immagine TEM di cellule EJ28 BCa incubate con 1.51 10 <sup>-2</sup> mg mL <sup>-1</sup> CS_MWCNT	- 112 -
<b>Figura 2.6.1</b> Rappresentazione schematica dei nanoibridi a base di maghemite oggetto di studio	- 113 -
<b>Figura 2.6.2</b> Immagini SEM di (a) GO; (b) NGO. (c) Immagine AFM di NGO. Immagini TEM di (d) γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ; (e) γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @NGO. (f) Distribuzione dimensionale delle nanoparticelle γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (circa 10 nm)	- 114 -
<b>Figura 2.6.3</b> Rappresentazione schematica della sintesi del sistema ibrido γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @NGO	- 115 -
<b>Figura 2.6.4</b> Spettri XRD di Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> e γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	- 116 -
<b>Figura 2.6.5</b> Curve di magnetizzazione per Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (linee nere), γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (linee rosse) e γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @NGO (linee blu). Gli inserti mostrano le curve di magnetizzazione in funzione della temperatura in assenza (ZFC, linee nere) e in presenza (FC, linee arancioni) di campo magnetico.	- 117 -
<b>Figura 2.6.6</b> Curve TGA di (a) NGO e (b) γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @NGO	- 118 -
<b>Figura 2.6.7</b> Profili di rilascio di CisPt da NGO (linea rossa), γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (linea nera) e γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @NGO (linea blu)	- 118 -
<b>Figura 2.6.8</b> Vitalità di cellule U87 dopo incubazione con NGO (grigio), γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (rosso) e γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @NGO (nero)	- 120 -
<b>Figura 2.6.9</b> Vitalità di cellule U87 dopo incubazione con concentrazioni di CisPt 2.5 (blu); 5.0 (arancione); 10.0 (verde) μM in forma libera e dopo caricamento su γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ; NGO; γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @NGO. Le concentrazioni di	

carrier sono 2.0; 5.0; 10.0; 25.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Per  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$  (10  $\mu\text{M}$  CisPt), \*p <0.05 vs NGO; \*\*\*p <0.001 vs NGO; °°°p <0.001 vs  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ; °°°°p <0.0001 i  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  \_\_\_\_\_ - 120 -

<b>Figura 2.6.10</b> Immagine al microscopio ottico di cellule U87 dopo incubazione con CisPt 2.5 $\mu\text{M}$ caricato su $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$ _____	- 121 -
<b>Figura 2.7.1</b> Rappresentazione schematica del sistema ibrido multifunzionale oggetto del presente studio _____	- 122 -
<b>Figura 2.7.2</b> Schematizzazione della sintesi del nanoibrido C@HSA-MNPs@rGO _____	- 123 -
<b>Figura 2.7.3</b> Spettri FT-IR di GO e MNP@GO _____	- 124 -
<b>Figura 2.7.4</b> Immagine SEM del nanoibrido C@HSA-MNPs@rGO _____	- 126 -
<b>Figura 2.7.5</b> Curve di magnetizzazione di C@HSA-MNPs@rGO _____	- 126 -
<b>Figura 2.7.6</b> Curve TGA e DTG dei campioni HSA-GO, C@HSA-rGO e C@HSA-MNPs@rGO _____	- 127 -
<b>Figura 2.7.7</b> Profili di rilascio di DOX da C@HSA-MNPs@rGO e C@HSA-MNPs a pH 5.5 e 7.4 _____	- 128 -
<b>Figura 2.7.8</b> Vitalità di cellule SH-SY5Y in seguito a trattamento con DOX in forma libera e caricata su C@HSA-MNPs@rGO o HSA-MNPs@rGO _____	- 130 -
<b>Figura 2.7.9</b> Immagine TEM di cellule SH-SY5Y trattate con C@HSA-MNPs@rGO _____	- 131 -
<b>Figura 2.7.10</b> Immagine al microscopio ottico di cellule SH-Sy5Y incubate con (a) DOX-C@HSA-MNPs@rGO e (b) DOX-C@HSA@rGO per 72 h _____	- 132 -

## INDICE DELLE TABELLE

<b>Tabella 1.4.1</b> Principali funzionalizzazioni covalenti delle nanostrutture al carbonio _____	- 39 -
<b>Tabella 2.1.1</b> Caratterizzazione degli idrogel ibridi elettrosensibili _____	- 51 -
<b>Tabella 2.1.2</b> Valori di rigonfiamento degli idrogel in funzione del campo elettrico applicato _____	- 53 -
<b>Tabella 2.1.3</b> Attività proteolitica della tripsina libera e immobilizzata su HT e HT <sub>GO</sub> _____	- 56 -
<b>Tabella 2.1.4</b> Valori R <sup>2</sup> e parametri cinetici secondo il modello di Avrami per gli idrogel HG, HG <sub>GO</sub> , HT, HT <sub>GO</sub> _____	- 59 -
<b>Tabella 2.1.5</b> Valori R <sup>2</sup> e parametri cinetici secondo il modello di Peppas-Sahlin per gli idrogel HG, HG <sub>GO</sub> , HT, HT <sub>GO</sub> _____	- 59 -
<b>59 -</b>	
<b>Tabella 2.2.1</b> Grado di rigonfiamento e diametro medio dei pori per HQ e HB _____	- 72 -
<b>Tabella 2.2.2</b> Valori R <sup>2</sup> e parametri cinetici secondo il modello di Reis per gli idrogel HQ e HB _____	- 74 -
<b>Tabella 2.2.3</b> Rapporto tra i parametri cinetici ai diversi valori di pH e temperatura per gli idrogel HQ e HB _____	- 75 -
<b>Tabella 2.3.1</b> Valori R <sup>2</sup> e parametri cinetici secondo il modello di Reis per i campioni HG, HG <sub>C</sub> , P <sub>k</sub> ; P <sub>k</sub> HG; P <sub>k</sub> HG <sub>C</sub> _____	- 91 -
<b>Tabella 2.4.1</b> Valori R <sup>2</sup> e parametri cinetici secondo il modello di Reis per nanoparticelle DC _____	- 98 -
<b>Tabella 2.4.2</b> Indici combinatoriali di MTX/CUR e MTX@DC _____	- 102 -
<b>Tabella 2.5.1</b> Valori R <sup>2</sup> e parametri cinetici secondo il modello di Reis per CS_MWCNT _____	- 110 -
<b>Tabella 2.6.1</b> Valori R <sup>2</sup> e parametri cinetici secondo il modello di Reis per $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , NGO e $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @NGO _____	- 119 -
<b>Tabella 2.7.1</b> Valori R <sup>2</sup> e parametri cinetici secondo i modelli di Reis e Avrami per C@HSA-MNPs e C@HSA-MNPs@rGO _____	- 129 -
<b>Tabella 3.1.1</b> Condizioni HPLC _____	- 134 -
<b>Tabella 3.1.2</b> Condizioni TGA _____	- 134 -
<b>Tabella 3.1.3</b> Condizioni DSC _____	- 135 -
<b>Tabella 3.3.1</b> Composizione delle miscele di reazione utilizzate per la sintesi dei coniugati polimerici _____	- 141 -
<b>Tabella 3.4.1</b> Composizione degli Idrogel _____	- 141 -
<b>Tabella 3.10.1</b> Condizioni degli esperimenti di rigonfiamento _____	- 149 -
<b>Tabella 3.11.1</b> Condizioni utilizzate per il caricamento dei farmaci _____	- 150 -
<b>Tabella 3.12.1</b> Condizioni utilizzate per gli studi di rilascio _____	- 151 -
<b>Tabella 3.13.1</b> Condizioni utilizzate per le colture cellulari _____	- 152 -
<b>Tabella 3.13.2</b> Condizioni utilizzate nei test di citotossicità _____	- 153 -

## ABSTRACT

L'attività di ricerca riportata nel presente lavoro di tesi di dottorato si inserisce nel contesto della sintesi e caratterizzazione di materiali multifunzionali per la veicolazione e il direccionamento di principi attivi.

Nello specifico, all'interno del panorama di materiali proposti per il *drug delivery*, l'interesse è stato incentrato sulla realizzazione di sistemi multicomponente costituiti principalmente da due classi di materiali: i sistemi polimerici di natura organica e le nanostrutture al carbonio di natura inorganica.

Per quanto riguarda la componente polimerica sono stati presi in considerazione sistemi macromolecolari coniugati ottenuti mediante derivatizzazione funzionale di polimeri di origine naturale, quali polisaccaridi (chitosano e destrano) e proteine (gelatina e albumina serica umana), con polifenoli dalle note attività antitumorali e antibatteriche quali curcumina e quercetina. L'inserimento di tali bioconiugati in idrogel o sistemi nanoparticellari ha permesso di ottenere sistemi di rilascio funzionali per la veicolazione di principi attivi in cui l'attività biologica è riconducibile non solo al farmaco trasportato ma anche alle caratteristiche del carrier.

Per la componente inorganica sono stati presi in considerazione i Nanotubi di carbonio a parete multipla (MWCNT) e il grafene Ossido (GO) che, grazie alle loro proprietà di elevata affinità per molecole farmacologicamente attive, rapida internalizzazione cellulare e conducibilità elettrica, permettono, quando vengono inseriti nei veicoli funzionali precedentemente descritti, di realizzare sistemi per il trasporto mirato di farmaci ad elevata efficienza e in grado di modulare il rilascio di un principio attivo in seguito all'applicazione di un campo elettrico e magnetico. In questo modo è stato possibile ottenere materiali innovativi con proprietà superiori a quelle dei singoli componenti che, date le funzionalità biologiche selezionate, sono stati sintetizzati e proposti per il trattamento delle ferite cutanee e di diversi tipi di tumori solidi quali carcinoma mammario, neuroblastoma e glioblastoma.

L'attività di ricerca è stata svolta nell'ambito di collaborazioni nazionali ed internazionali attive presso il gruppo di ricerca di Tecnologie Farmaceutiche e Cosmetologiche del dipartimento di Farmacia e Scienze della Salute e della Nutrizione con la Charité – Universitätsmedizin Berlin (Germania), il Leibniz Institute of Solid State and Material Research Dresden (Germania), l'University of New South Wales (Sydney, Australia), e il Dipartimento di Biologia dell'Università di Pisa.

Tale attività si è articolata nello studio, realizzazione e caratterizzazione dei seguenti materiali compositi:

1) ***Idrogel ibridi elettrosensibili.***

Idrogel contenenti grafene ossido e gelatina o tripsina e caricati con curcumina sono stati proposti come strumento per il trattamento delle ferite cutanee. Il GO conferisce stabilità termica e meccanica al reticolo polimerico, nonché un'elevata elettrosensibilità che consente la modulazione dell'entità e della cinetica di rilascio in funzione delle diverse esigenze terapeutiche

La presenza dei materiali proteici, gelatina e tripsina, assicura elevati livelli di biocompatibilità all'idrogel finale, come evidenziato dagli studi morfologici effettuati su cellule MRC-5 incubate in presenza dei materiali di medicazione nei quali non viene registrata alcuna variazione strutturale.

Nel caso degli idrogel contenenti tripsina, il mantenimento dell'attività proteolitica all'interno del reticolo polimerico ha permesso di ampliare le potenzialità applicative dei dispositivi ibridi ai casi in cui è richiesta la degradazione delle proteine nel sito di guarigione.

Il rilascio da questi materiali della Curcumina si è rivelata una strategia utile per realizzare un dispositivo funzionale in grado di preservare il sito di guarigione dalle infezioni microbiche.

2) ***Idrogel multifunzionali con attività antiossidante***

Idrogel il cui rigonfiamento dipende dalla variazione di stimoli esterni a base di un coniugato chitosano-quercetina sono stati proposti come dispositivi in grado di modulare il rilascio di molecole bioattive in risposta a variazioni di pH e temperatura. La sensibilità alle variazioni di temperatura ha permesso anche di modulare le proprietà antiossidanti della quercetina, sfruttando le transizioni di fase volumetrica, mentre le variazioni di pH si sono dimostrate più efficaci nel modulare il rilascio: a pH 2.0, il maggior rilascio si è registrato a 40°C, mentre a pH 7.0 la contrazione dell'idrogel diventa predominante.

3) ***Sistemi compositi idrogel/microparticelle***

È stato realizzato un sistema composito idrogel/microparticelle. L'idrogel, formato da un network polimerico ottenuto dalla polimerizzazione radicalica tra monomeri acrilici e un coniugato gelatina-curcumina, è stato progettato per garantire il mantenimento di un ambiente umido e per fornire protezione dalla tossicità dei ROS agendo, allo stesso tempo, come supporto per la crescita cellulare. La porzione microparticellare, costituita da cheratina lipidizzata autoassemblante caricata con quercetina, ha lo scopo di promuovere la proliferazione cellulare e controllare il rilascio del polifenolo ad attività antimicrobica, preservando così il sito di guarigione dalle infezioni.

I risultati complessivi possono essere considerati un valido punto di partenza per rispondere alle esigenze chiave di un dispositivo funzionale in grado di promuovere il processo di guarigione delle ferite cutanee.

4) ***Nanoparticelle autoassemblanti***

È stato realizzato un sistema nanoparticellare a partire da un coniugato destrano-curcumina con proprietà autoassemblanti per la veicolazione del metotrexato all'interno di cellule di carcinoma mammario.

Il profilo di rilascio di MTX è risultato prolungato nel tempo come conseguenza dell'incapsulamento del farmaco; i saggi di vitalità cellulare *in vitro* hanno mostrato chiaramente il potenziamento dell'attività citotossica sia per la presenza dei residui di curcumina immobilizzati che per la rapida internalizzazione delle nanoparticelle nelle cellule tumorali.

5) ***Nanoibridi a base di nanotubi di carbonio***

Sistemi nanoparticellari a base di MWCNT rivestiti di chitosano sono stati proposti come dispositivi per il rilascio pH sensibile del metotrexato all'interno di cellule di carcinoma polmonare.

L'estesa caratterizzazione chimico-fisica del nanoibrido ha permesso di evidenziare il corretto assemblaggio delle controparti organiche e inorganiche, mentre quella biologica *in vitro* ha dimostrato che, il sistema nanoparticellare è in grado di agire in maniera sinergica con il metotrexato in cellule tumorali con caratteristiche di pH peculiari, riducendo la tossicità del farmaco rispetto alle cellule sane.

6) ***Nanoibridi a base di grafene ossido e nanoparticelle magnetiche di maghemite***

Sono stati realizzati materiali sensibili all'applicazione di un campo magnetico per la veicolazione sito specifica di cisplatino all'interno di cellule di glioblastoma combinando nanoparticelle  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  su foglietti di GO.

I risultati dimostrano la possibilità di ottenere un rilascio prolungato del CisPt e un efficace targeting magnetico nelle cellule tumorali con ridotta tossicità a carico delle cellule sane.

7) ***Nanoibridi funzionali a base di grafene ossido***

È stato progettato e realizzato un nanoibrido a base di ossido di grafene, nanoparticelle magnetiche di magnetite e un coniugato albumina serica umana – curcumina in grado di controllare la veicolazione sito-specifica di agenti citotossici come la doxorubicina.

La strategia sintetica si è articolata in due fasi: nella prima fase il coniugato polimerico e il sistema grafene-magnetite sono stati preparati rispettivamente tramite catalisi enzimatica e reazione di coniugazione covalente. Successivamente i due sistemi sono stati assemblati per

formare il nanoibrido finale. Il profilo di rilascio è risultato essere pH sensibile, come conseguenza della modulazione dell'affinità farmaco-carrier, mentre i risultati dei test di vitalità su cellule di neuroblastoma hanno dimostrato il potenziamento dell'attività citotossica della doxorubicina in presenza di curcumina nel rivestimento. La capacità di essere internalizzato dalle cellule, unita alla possibilità di ottenere una concentrazione locale del farmaco sotto l'applicazione di un campo magnetico esterno, rende il nanosistema proposto un vettore promettente per il trattamento del neuroblastoma.

La tesi ha affrontato i diversi aspetti dei sistemi proposti per la veicolazione sito-specifica e il rilascio controllato di farmaci. Analizzando le proprietà dei diversi componenti utilizzati, è stato possibile evidenziare le peculiarità di ogni sistema (idrogel e nanoparticelle) e materiale (coniugati polimerici e nanostrutture al carbonio) che ne permettono la combinazione in materiali multifunzionali che ben si adattano alle specifiche esigenze applicative.

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Idrogel

### 1.1.1 Idrogel per il rilascio controllato di farmaci

Gli idrogel sono network polimerici tridimensionali costituiti da una vasta gamma di polimeri idrofilici con differenti caratteristiche chimico-fisiche. Sono caratterizzati da proprietà fondamentali per applicazioni in campo biomedico, quali biocompatibilità, biodegradabilità e atossicità; sono in grado di assorbire elevati quantitativi di acqua rigonfiando e mantenendo inalterata la loro struttura tridimensionale. Ancora, il basso valore di tensione superficiale registrato all'interfaccia idrogel/tessuti determina un basso grado di adsorbimento proteico e di adesione cellulare, con una significativa riduzione dei potenziali effetti collaterali tossici o immunogenici <sup>[1]</sup>.

Gli idrogel sono ampiamente utilizzati per la veicolazione di farmaci in diversi distretti dell'organismo <sup>[2]</sup>. I farmaci possono essere caricati negli idrogel mediante *incorporazione* durante la formazione dell'idrogel o per *impregnazione* in una fase successiva. Nel primo caso il farmaco viene disciolto o disperso nella miscela di monomeri e/o polimeri prima della reazione di reticolazione; nel secondo caso la matrice viene messa a rigonfiare in una soluzione concentrata del farmaco. Le due metodiche differiscono notevolmente tra di loro: con l'incorporazione si ottengono maggiori quantità di farmaco caricato e profili di rilascio più lenti e gradualmente nel tempo; è possibile tuttavia che il farmaco interferisca con la reazione di polimerizzazione o che venga allontanato durante le fasi di purificazione dell'idrogel. L'impregnazione invece necessita dell'impiego di un solvente che riesca a solubilizzare il principio attivo in concentrazioni elevate e che permetta il rigonfiamento ottimale del reticolo polimerico, garantendo la stabilità chimica del principio attivo. Tuttavia, poiché il caricamento avviene prevalentemente in superficie, si assiste a quello che viene definito rilascio *burst*, ovvero un rilascio immediato di una quantità significativa di principio attivo quando l'idrogel viene posto in soluzione <sup>[3]</sup>.

---

<sup>[1]</sup> Drury, J.L.; Mooney, D.J. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **2003**; 24: 4337-4351.

<sup>[2]</sup> Caló, E.; Khutoryanskiy, V.V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur. Polym. J.* **2015**; 65: 252-267.

<sup>[3]</sup> Buwalda, S.J.; Boere, K.W.M.; Dijkstra, P.J.; Feijen, J.; Vermonden, T.; Hennink, W.E. Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *J. Control. Release* **2014**; 190: 254-273.

Le caratteristiche strutturali del reticolo polimerico, principalmente la porosità e la dimensione delle maglie, influenzano le proprietà degli idrogel [4]. Le caratteristiche strutturali dipendono prevalentemente da due fattori:

- *Rapporto tra monomero funzionale e reticolante.* Determina il grado di reticolazione. Maggiore è la densità di reticolazione, minore risulterà il rigonfiamento del reticolo polimerico. La reticolazione ostacola la mobilità delle catene, riducendo l'entità del rigonfiamento.
- *Struttura chimica dei monomeri che compongono l'idrogel.* Idrogel contenenti gruppi funzionali idrofili, in grado di stabilire legami idrogeno con le molecole di acqua, sono in grado di rigonfiare di più rispetto a quelli contenenti catene idrofobiche, che tendono a minimizzare le interazioni con il solvente.

Il rilascio del principio attivo dalla matrice è regolato prevalentemente dalla sua diffusione, attraverso i pori del reticolo polimerico, verso il mezzo esterno. I diversi meccanismi di rilascio del principio attivo dalla matrice, possono essere classificati come [5]:

- *Rilascio a diffusione controllata:* il farmaco omogeneamente disperso nella matrice polimerica, diffonde attraverso essa in maniera lenta e costante nell'ambiente circostante.
- *Rilascio a swelling controllato (desorbimento):* la matrice polimerica a contatto con un ambiente acquoso va incontro a swelling assorbendo acqua e il rilascio del farmaco avviene mediante un lento processo di desorbimento attraverso la matrice rigonfiata.

Grazie alla grande varietà di monomeri e polimeri utilizzabili, è possibile ottenere un controllo sulla velocità ed intensità di rigonfiamento della matrice polimerica variando parametri ambientali quali pH, temperature e forza ionica, o mediante l'applicazione di stimoli esterni quali radiazioni luminose e/o campi elettrici e magnetici. Il controllo del grado di rigonfiamento si traduce, in definitiva, in una variazione della velocità di rilascio del farmaco, con notevoli implicazioni terapeutiche [6].

In letteratura sono riportati numerosi esempi di idrogel sensibili a stimoli esterni (detti anche *smart hydrogel*); tra questi l'attenzione del presente lavoro si è soffermata prevalentemente sui seguenti:

- *Idrogel pH sensibili* [7]: costituiti da sistemi polimerici contenenti gruppi acidi (carbossilici o solfonici) o basici (sali di ammonio) in catena laterale, che si ionizzano in funzione del pH della

---

[4] Li, J.; Mooney, D.J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Rev. Mater.* **2016**; 1: 16071.

[5] Lin, C.-C.; Metters, A.T. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**; 58: 1379-1408.

[6] Fleige, E.; Quadir, M.A.; Haag, R. Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: Concepts and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**; 64: 866-884.

[7] Schmaljohann, D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**; 58: 1655-1670.

soluzione. La ionizzazione dei gruppi pendenti provoca la repulsione tra le cariche delle catene polimeriche solvate, con rigonfiamento della matrice e rilascio del farmaco. Poiché alcuni distretti dell'organismo vanno incontro a variazioni fisiologiche o patologiche dei valori di pH, l'utilizzo di idrogel sensibili alle variazioni di pH rende possibile la modulazione del rilascio dell'agente bioattivo in funzione delle specifiche esigenze terapeutiche.

- *Idrogel termo-sensibili* <sup>[8]</sup>: materiali contenenti gruppi pendenti idrofobici e idrofilici in diverso rapporto. In funzione della variazione di temperatura del mezzo circostante, vanno incontro a contrazione o rigonfiamento a seconda del prevalere delle interazioni dei gruppi idrofilici con l'acqua (rigonfiamento) o delle catene idrofobe tra loro (contrazione). Il parametro che caratterizza tali sistemi è la temperatura di soluzione critica, la temperatura cui il polimero modifica la propria affinità per il mezzo acquoso esterno.
- *Idrogel elettro-sensibili* <sup>[9]</sup>: materiali formati da polielettroliti in grado di deformarsi in seguito all'applicazione di un campo elettrico.

### 1.1.2 Valutazione del rilascio di un farmaco da un idrogel

I parametri più importanti per definire la struttura e le proprietà degli idrogel sono la quantità di acqua assorbita, la frazione di volume del polimero nello stato gonfio,  $v_{2,s}$ , il peso molecolare effettivo tra due legami crociati  $M_c$  e la dimensione delle maglie della rete  $\zeta$ .

La quantità di acqua assorbita può essere definita in rapporto al peso dell'idrogel allo stato secco (Equazione 1.1) o allo stato rigonfio (Equazione 1.2):

$$WR = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \quad (1.1)$$

$$WR = \frac{W_s - W_d}{W_s} \times 100 \quad (1.2)$$

Dove  $W_s$  e  $W_d$  rappresentano rispettivamente il peso dell'idrogel swellato e secco.

Gli altri parametri sono descritti nella teoria dell'elasticità di Rubber e nella teoria dell'equilibrio di *swelling* <sup>[10]</sup>. La frazione di volume del polimero nello stato gonfio ( $v_{2,s}$ ) indica la quantità di liquido che può essere assorbita negli idrogel ed è definita come il rapporto tra il volume del polimero secco ( $V_p$ ) e il volume del gel gonfio ( $V_g$ ). È definita anche come il rapporto di rigonfiamento volumetrico

<sup>[8]</sup> Klouda, L.; Mikos, A.G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**; 68: 34-45.

<sup>[9]</sup> Qiu, Y.; Park, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**; 53: 321-339.

<sup>[10]</sup> Quesada-Pérez, M.; Maroto-Centeno, J.A.; Forcada, J.; Hidalgo-Alvarez, R. Gel swelling theories: The classical formalism and recent approaches. *Soft Matter* **2011**; 7: 10536-10547.

( $Q$ ) che può essere correlato alle densità del solvente ( $\rho_1$ ) e del polimero ( $\rho_2$ ) e al rapporto della massa di idrogel rigonfio ( $Q_m$ ), come riportato nell'Equazione 1.3:

$$v_{2,s} = \frac{V_p}{V_g} = Q^{-1} = \frac{\frac{1}{\rho_2}}{\frac{Q_m + 1}{\rho_1 + \rho_2}} \quad (1.3)$$

Il peso molecolare effettivo della catena polimerica tra i punti di reticolazione è correlato al grado di reticolazione dell'idrogel ( $X$ ) in accordo all'Equazione 1.4:

$$X = \frac{M_0}{2M_c} \quad (1.4)$$

dove  $M_0$  indica una stima del peso molecolare delle unità ripetute.

$\zeta$  è la distanza tra punti di reticolazione consecutivi e indica lo spazio libero presente tra le catene macromolecolari, tale da permettere la diffusione del farmaco;  $\zeta$  può essere calcolato mediante la seguente equazione 1.5:

$$\zeta = v_{2,s}^{-\frac{1}{3}} \cdot l \cdot (C_n \cdot \frac{2M_c}{M_r})^{\frac{1}{2}} \quad (1.5)$$

$C_n$  è il rapporto caratteristico di Flory, ed è una costante per un dato sistema polimero-solvente;  $l$  indica la lunghezza del legame C-C, mentre  $M_r$  è il peso delle unità ripetitive che compongono la catena polimerica.

Un'altra versione dell'equazione di Flory-Rehmer, per calcolare il parametro  $M_c$  degli idrogel, è stata proposta da Kulkarni <sup>[11]</sup> (Equazione 1.6):

$$M_c = -d_p V_{m,1} \varphi^{1/3} [\ln(1 - \varphi) + \varphi + X \varphi^2]^{-1} \quad (1.6)$$

Dove  $V_{m,1}$  è il volume molare della media di *swelling*,  $X$  è il parametro di interazione di Flory-Huggins e  $\varphi$  è il volume della frazione di polimero nello stato di *swelling* che è una misura della quantità di liquido trattenuto dall'idrogel.

$\varphi$  viene calcolato tramite tale equazione 1.7:

$$\varphi = \left[ \left( \frac{d_p}{d_s} \right) \left( \frac{w_\infty - w_0}{w_0} \right) + 1 \right]^{-1} \quad (1.7)$$

$W_0$  e  $W_\infty$  indicano il volume del polimero prima e dopo le 24 ore di *swelling*,  $d_p$  e  $d_s$  la densità del polimero e del solvente.

$X$  si calcola sperimentalmente tramite la seguente equazione 1.8:

<sup>[11]</sup> Kulkarni, A.R.; Soppimath, K.S.; Aminabhavi, T.M.; Dave, A.M. Mehta M.H. Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate beads containing liquid pesticide for soil application. *J. Control. Release* **2000**; *63*: 97-105.

$$X = [\varphi(1 - \varphi)^{-1} + N \ln(1 - \varphi) + N\varphi][2\varphi - \varphi^2 N - \varphi^2 T^{-1} (\frac{d\varphi}{dT})^{-1}]^{-1} \quad (1.8)$$

$d\varphi/dT$  indica la pendenza ottenuta riportando i dati della frazione di volume in funzione della temperatura.

$N$  viene calcolato, invece, con l'equazione 1.9 che segue:

$$N = \left( \frac{\varphi^{\frac{2}{3}}}{3} - \frac{2}{3} \right) (\varphi^{\frac{1}{3}} - \frac{2}{3} \varphi)^{-1} \quad (1.9)$$

In questo caso, la dimensione delle maglie della rete polimerica ( $\xi$ ) può essere definita in accordo all'Equazione 1.10:

$$\xi = 0.071 \varphi^{-1/3} \sqrt{\overline{M}_c} \quad (1.10)$$

Per descrivere i profili di rilascio di un principio attivo da un idrogel, in letteratura sono stati proposti diversi modelli matematici, che permettono di valutare la quantità di farmaco rilasciata in funzione del tempo.

Uno dei modelli più semplici è quello proposto da Avrami (Equazione 1.11) [12]:

$$\frac{M_t}{M_0} = 1 - e^{-kt^n} \quad (1.11)$$

dove  $M_t/M_0$  rappresenta la frazione di farmaco rilasciata al tempo  $t$ ,  $n$  è il parametro di Avrami e  $k$  la costante cinetica. Gli ultimi due parametri possono essere determinati scrivendo l'equazione 1.11 in forma logaritmica (equazione 1.12) e plottando  $\ln(-\ln(1 - X))$  in funzione di  $\ln t$ :

$$\ln \left( -\ln \left( 1 - \frac{M_t}{M_0} \right) \right) = \ln k + n \ln t \quad (1.12)$$

Il modello fornisce informazioni sulla cinetica di rilascio in funzione del valore del parametro  $n$ , e nello specifico indica una cinetica del primo ordine per  $n = 1$  o diffusiva per  $n = 0.54$ .

In questo modello, il tempo di dimezzamento ( $t_{1/2}$ ) può essere calcolato dall'equazione 1.13:

$$t_{1/2}^A = e^{\left( \frac{-\ln k - 0.367}{n} \right)} \quad (1.13)$$

Un altro modello è quello proposto da Peppas e Sahlin (Equazione 1.14), applicabile per  $M_t/M_0 \leq 0.95$  [13]:

$$\frac{M_t}{M_0} = K_1 t^{1/2} + K_2 t \quad (1.14)$$

[12] Shamaeli, E.; Alizadeh, N. Kinetic studies of electrochemically controlled release of salicylate from nanostructure conducting molecularly imprinted polymer. *Electrochim. Acta* **2013**; 114: 409-415.

[13] Singh, V.K.; Pandey, P.M.; Agarwal, T.; Kumar, D.; Banerjee, I.; Anis, A.; Pal, K. Development of soy lecithin based novel self-assembled emulsion hydrogels. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2015**; 55: 250-263.

$K_1$  e  $K_2$  rappresentano rispettivamente il peso dei contributi diffusionali e anomali sulla cinetica complessiva del rilascio. Valori di  $K_1$  maggiori di  $K_2$  di almeno due ordini di grandezza indicano che il rilascio segue un andamento prevalentemente diffusivo. Variazioni significative di  $K_2$  indicano che il rilascio si discosta da un profilo puramente diffusivo e diventano più rilevanti i contributi definiti anomali che sono correlati alla solubilità del soluto nel mezzo e alle variazioni di fase volumetrica del *carrier*. Generalmente, in idrogel sensibili a stimoli esterni si assiste ad un rilascio di tipo prevalentemente diffusivo in assenza di stimolo, mentre l'applicazione dello stimolo esterno, andando a modificare in maniera significativa il grado di rigonfiamento della matrice, comporta un incremento della componente anomala.

Nel modello proposto da Peppas e Sahlin, il tempo di dimezzamento può essere calcolato applicando l'equazione 1.15:

$$K_2x^2 + K_1x - 0.5 = 0 \quad (1.15)$$

dove  $x = \sqrt{t_{1/2}^p}$

Un altro modello proposto da Reis (valido per  $M_t/M_0 \leq 1.0$ ) caratterizza il rilascio di un farmaco come una sua partizione tra la fase solvente e il veicolo <sup>[14]</sup>. Una rappresentazione matematica di tale fenomeno è data dal parametro ( $\alpha$ ), che esprime l'affinità chimico fisica del soluto per le due fasi ed è definita come il rapporto delle concentrazioni del soluto tra la fase solvente e il carrier (Equazione 1.16):

$$\alpha = \frac{M_{max}}{1 - M_{max}} \quad (1.16)$$

$M_{max}$  è il valore massimo di rilascio  $M_t/M_0$ . Condizione perché il soluto diffonda dal carrier al mezzo di rilascio è un valore  $\alpha > 0$ .

Possono essere considerate due variazioni del modello in base alla tipologia della cinetica di rilascio: un rilascio reversibile di primo ordine e uno reversibile di secondo ordine, espresse rispettivamente dalle equazioni 1.17 e 1.18:

$$\frac{M_t}{M_0} = M_{max} \left( 1 - e^{-\left(\frac{kr}{M_{max}}\right)t} \right) \quad (1.17)$$

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{M_{max} \left( e^{2\left(\frac{kr}{\alpha}\right)t} - 1 \right)}{1 - 2 M_{max} + e^{2\left(\frac{kr}{\alpha}\right)t}} \quad (1.18)$$

---

<sup>[14]</sup> Reis, A.V.; Guilherme, M.R.; Rubira, A.F.; Muniz, E.C. Mathematical model for the prediction of the overall profile of in vitro solute release from polymer networks. *J. Colloid Interf. Sci.* **2007**; 310: 128-135.

In questo modello  $t_{1/2}$  indica il tempo necessario affinché la concentrazione di farmaco rilasciata raggiunga il 50% di  $M_{max}$  ed è calcolato mediante le equazioni 1.19 e 1.20, rispettivamente per una cinetica di rilascio di primo o di secondo ordine:

$$t_{1/2} = \ln\left(\frac{1}{2}\right) \cdot \frac{M_{max}}{K_R} \quad (1.19)$$

$$t_{1/2} = \frac{\alpha}{2K_R} \times \ln(3 - 2M_{max}) \quad (1.20)$$

Appare evidente come il parametro più significativo sia  $M_{max}$ , poiché è da esso che dipendono gli altri due. Confrontando diverse cinetiche di rilascio, le variazioni di  $M_{max}$  sono correlabili alla maggiore o minore facilità con cui il farmaco viene rilasciato nel mezzo esterno, con un conseguente aumento o diminuzione del parametro di affinità  $\alpha$ . L'applicazione di uno stimolo esterno modifica le condizioni ambientali in cui si trova la matrice polimerica e ha un effetto diretto sul profilo di rilascio, determinando una variazione di  $M_{max}$  rispetto alle condizioni standard in assenza di stimolo esterno. Uno stimolo che determina un maggiore rigonfiamento della matrice determinerà un valore di  $\alpha$  più elevato a causa della maggiore quantità di farmaco ritrovata nel mezzo.

### 1.1.3 Idrogel per il trattamento delle ferite cutanee

Tra i diversi campi di applicazione dei sistemi di natura idrorigonfiabile, l'attenzione è stata rivolta prevalentemente al loro utilizzo per un efficace trattamento delle ferite cutanee <sup>[15]</sup>.

La pelle presenta delle eccellenti proprietà rigenerative e, benché nella maggior parte dei casi la guarigione delle ferite avvenga con successo, vi sono delle condizioni in cui tale processo risulta essere alterato, causando la formazione di una lesione cronica.

Le lesioni acute sono il risultato di eventi traumatici ed interventi chirurgici e generalmente la guarigione si osserva entro 8-12 settimane. Il microambiente all'interno di una normale ferita è caratterizzato dalla presenza di numerosi fattori di crescita, da una matrice extracellulare ben organizzata e da popolazioni cellulari reattive; la sintesi della matrice supera la sua degradazione, l'angiogenesi e la neovascolarizzazione procedono in modo tempestivo, la carica microbica è piuttosto bassa.

Una lesione viene invece considerata cronica quando la guarigione non avviene entro i 90 giorni successivi al danno. Tra queste sono comprese le ulcere vascolari (arteriose e venose), le ulcere diabetiche e le ulcere da pressione. Ad oggi, non sembra essere del tutto compresa la fisiopatologia delle lesioni croniche, ma è noto che esse subiscono una situazione di stallo nella fase infiammatoria

---

<sup>[15]</sup> Boateng, J.S.; Matthews, K.H.; Stevens, H.N.E.; Eccleston, G.M. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *J. Pharm. Sci.* **2008**: 97; 2892-2923.

e che sono accompagnate dalla presenza di un'eccessiva quantità di essudato, gravi infezioni e necrosi tissutale. L'alterata vascolarizzazione che caratterizza queste ferite prolunga ed accentua l'infiammazione, e la sostenuta ipossia che ne risulta crea ampie regioni di tessuto privo di vasi sanguigni, terreno ideale per la crescita batterica e per la formazione di biofilm <sup>[16]</sup>.

Gli idrogel, per via dell'elevato contenuto di acqua e della loro capacità di assorbire l'essudato, permettono la formazione di un ambiente umido che favorisce la crescita del tessuto di granulazione e quindi la guarigione della ferita. Sono strutturalmente simili alle matrici extracellulari e possono fornire strutture tridimensionali che favoriscono l'adesione cellulare, la proliferazione, il trasporto di citochine o di sostanze nutritive. Gli idrogel soddisfano, in definitiva, tutti i criteri richiesti ai materiali usati per la medicazione: aderiscono bene alla ferita; sono flessibili e quindi adattabili alla forma della superficie su cui vengono applicati; sono permeabili al vapore acqueo; proteggono dall'infezione agendo come una barriera; sono in grado di assorbire l'essudato; sono di facile applicazione; non provocano traumi e dolore durante la rimozione per la loro natura visco-elastica <sup>[17]</sup>.

Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi sistemi a base di idrogel che hanno quasi del tutto sostituito le medicazioni di garza tradizionali, ampiamente utilizzate in passato come medicazioni chirurgiche e che oggi occupano ancora una posizione predominante per il trattamento delle ferite post operatorie e traumatiche. Queste medicazioni presentano il vantaggio di essere biocompatibili ed ecosostenibili, ma svolgono un ruolo esclusivamente passivo e protettivo nel processo di guarigione delle ferite. Proteggono le ferite da stress meccanici, ma necessitano di frequenti sostituzioni a causa della rapida saturazione in presenza di essudati. L'eccessivo assorbimento di liquidi da parte della garza fino all'essiccamento della ferita, ritarda e impedisce il processo di guarigione, può favorire la proliferazione batterica e crea emorragie e traumi nella fase di rimozione della medicazione <sup>[18]</sup>.

Gli idrogel presentano inoltre il vantaggio di poter rilasciare agenti bioattivi con proprietà antimicrobiche, analgesiche e/o antiinfiammatorie nel sito di lesione <sup>[19]</sup>. Va comunque evidenziato che gli idrogel convenzionali mostrano scarse proprietà meccaniche; pertanto sono riportati sempre

---

<sup>[16]</sup> Demidova-Rice, T.N.; Hamblin, M.R.; Herman, I.M. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes and approaches to care. *Adv. Skin Wound Care* **2012**; 25: 304-314.

<sup>[17]</sup> Koehler, J.; Brandl, P.F.; Goepferich, A.M. Hydrogel wound dressing for bioactive treatment of acute and chronic wounds. *Eur. Polym. J.* **2018**; 100: 1-11.

<sup>[18]</sup> Newsom, E.C.; Connolly, K.L.; Nehal, K.S. Facilitating Healing of Granulating Wounds: Dressings, Dermal Substitutes, and Other Methods. *Curr. Dermatol. Rep.* **2015**; 4: 125-133.

<sup>[19]</sup> Boateng, J.; Catanzano, O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing - A Review. *J. Pharm. Sci.* **2015**; 104: 3653-3680.

più esempi di sistemi ottenuti per incorporazione di materiali funzionali di diversa natura al loro interno, quali ad esempio fibre idrofile di cotone <sup>[20]</sup>.

Gli idrogel per le medicazioni cutanee possono essere costituiti da polimeri naturali e sintetici. Sebbene i polimeri naturali abbiano il vantaggio di essere simili o identici alle macromolecole del nostro organismo, subiscono una rapida degradazione in vivo da parte di alcuni enzimi presenti nel tessuto cutaneo. A confronto, le medicazioni a base di polimeri sintetici, a causa delle loro proprietà chimiche di superficie, non promuovono pienamente l'adesione al letto della ferita e la proliferazione cellulare, con possibile sviluppo di infezioni batteriche secondarie. Questi limiti possono essere superati mediante lo sviluppo di medicazioni a doppio strato ibride, in grado di combinare le proprietà dei polimeri naturali nello strato inferiore e quelle dei polimeri sintetici in quello superiore <sup>[21]</sup>.

In tali sistemi, lo strato superiore dell'idrogel è progettato per controllare l'umidità della ferita, prevenire la penetrazione batterica, permettere la protezione meccanica sul sito della lesione e modulare la cinetica di rilascio dei farmaci caricati. Lo strato inferiore è deputato al riassorbimento degli essudati in eccesso presenti sulla ferita, cui aderisce perfettamente, fungendo da supporto per il tessuto neofornato. In questo modo la medicazione può essere considerata come un vero e proprio sostituto dermico che favorisce l'instaurarsi di un ambiente ottimale per la guarigione.

### ***1.1.3.1 Idrogel polisaccaridici per il trattamento delle ferite cutanee***

Diversi sistemi polisaccaridici sono stati proposti per la realizzazione di idrogel adatti al trattamento delle ferite cutanee <sup>[22]</sup>.

Tra di essi riveste particolare importanza il chitosano, un polisaccaride ottenuto per parziale deacetilazione della chitina, in virtù della sua attività antibatterica intrinseca (Figura 1.1.1) <sup>[23]</sup>.

Le proprietà chimico-fisiche del chitosano dipendono dal suo peso molecolare (generalmente compreso tra 10.000 e 1.000.000 Da), dal grado di deacetilazione (50-95%) e dalla sequenza dei gruppi amminici e acetammidici. Le principali caratteristiche chimiche sono da ricondurre alla capacità di formare sali con acidi organici e inorganici e legami a idrogeno intermolecolari, all'elevata viscosità, alla presenza di gruppi suscettibili di derivatizzazione chimica e alla capacità filmogena.

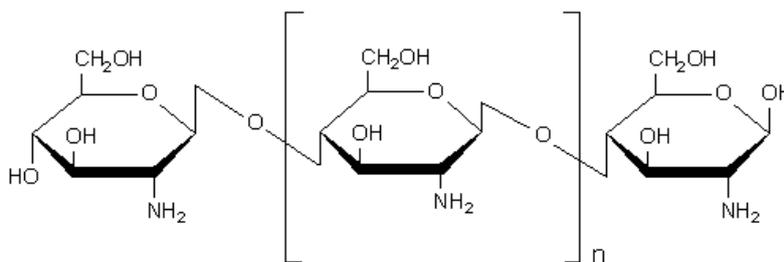
---

<sup>[20]</sup> Cirillo, G.; Spizzirri, U.G.; Curcio, M.; Spataro, T.; Picci, N.; Nicoletta, F.P.; Iemma, F. Cotton gauze-hydrogel composites: Valuable tools for electrically modulated drug delivery. *Int. J. Polym. Mater. Polymer. Biomater.* **2016**; 65: 442-450.

<sup>[21]</sup> Bacakova, M.; Pajorova, J.; Broz, A.; Hadraba, D.; Lopot, F.; Zavadakova, A.; Vistejnova, L.; Beno, M.; Kostic, I.; Jencova, V.; Bacakova, L. A two-layer skin construct consisting of a collagen hydrogel reinforced by a fibrin-coated polylactide nanofibrous membrane. *Int. J. Nanomed.* **2019**; 14: 5033-5050.

<sup>[22]</sup> Zhu, T.; Mao, J.; Cheng, Y.; Liu, H.; Lv, L.; Ge, M.; Li, S.; Huang, J.; Chen, Z.; Li, H.; Yang, L.; Lai, Y. Recent Progress of Polysaccharide-Based Hydrogel Interfaces for Wound Healing and Tissue Engineering. *Adv. Mater. Interfaces* **2019**; 6: 1900761.

<sup>[23]</sup> Bhattarai, N.; Gunn, J.; Zhang, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**; 62: 83-99.



**Figura 1.1.1** Struttura chimica del chitosano

Le proprietà bioadesive del chitosano, associate alla sua azione battericida e alla sua capacità di permeabilità all'ossigeno, lo rendono un biomateriale particolarmente adatto per il trattamento di ferite e ustioni. L'impiego del chitosano consente una significativa accelerazione dei tempi di guarigione con una concomitante effetto analgesico [24].

L'attività antimicrobica del chitosano, che si registra nei confronti sia di batteri che di funghi e lieviti, è da ricondurre a due principali meccanismi di azione. Il primo si basa sulla sua natura policationica che porta alla formazione di interazioni elettrostatiche con la superficie microbica carica negativamente, con conseguente interferenza sul metabolismo cellulare. Il secondo meccanismo prevede l'inserimento del chitosano tra le molecole di DNA e l'inibizione della trascrizione di RNA. In quest'ultimo caso è necessario che il chitosano abbia un peso molecolare inferiore al valore critico di 5000 Da [25].

### 1.1.3.2 Idrogel proteici per il trattamento delle ferite cutanee

Peptidi e proteine possono rappresentare degli elementi strutturali importanti nella progettazione di un idrogel, per l'elevata biocompatibilità e perché facilmente degradati all'interno del corpo umano [26]. Sia le proteine che i peptidi possono essere incorporati all'interno di un network polimerico sfruttando diverse reazioni chimiche, come polimerizzazioni radicaliche, reazioni innescate dai raggi UV, addizioni di Michael mediate da residui di cisteina, reazioni di condensazione che interessano i gruppi amminici e carbossilici presenti in catena laterale [27].

Tra le diverse proteine, la gelatina, grazie alle sue proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità, bassa immunogenicità, ridotto costo e facilità di lavorazione, ricopre senza dubbio un ruolo

[24] Aranaz, I.; Mengibar, M.; Harris, R.; Paños, I.; Miralles, B.; Acosta, N.; Galed, G.; Heras, Á. Functional characterization of chitin and chitosan. *Curr. Chem. Biol.* **2009**; 3: 203-230.

[25] Dai, T.; Tanaka, M.; Huang, Y.-Y.; Hamblin, M.R. Chitosan preparations for wounds and burns: Antimicrobial and wound-healing effects. *Exp. Rev. Anti Infect. Ther.* **2011**; 9: 857-879.

[26] Huang, S.; Fu, X. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. *J. Control. Release* **2010**; 142: 149-159.

[27] Spizzirri, U.G. (Ed); Cirillo, G (Ed). Functional Hydrogels in Drug Delivery. Key Features and Future Perspectives. **2017**. CRC Press. Boca Raton, FL, USA.

importante nell'ingegneria tissutale e nella medicina rigenerativa. La gelatina è considerata sicura dalla Food and Drug Administration (FDA), al punto da essere proposta clinicamente per la preparazione di “plasma expanders” e come stabilizzante in diverse formulazioni tra cui quelle vaccinali [28].

La gelatina è una proteina solubile in acqua, derivante dall'idrolisi del collagene in ambiente acido (Gelatina di tipo A) o basico (Gelatina di tipo B), che possiede la capacità di formare gel trasparenti. La gelatina secca risulta essere inodore, insapore, trasparente, fragile; presenta un colore che va dal giallo all'ambrato ed un peso molecolare compreso tra i 40 ed i 90 kDa [29].

Materiali a base di gelatina trovano notevole applicazione come sistemi per la veicolazione di agenti citotossici in terapie antineoplastiche o come scaffolds per l'ingegneria tissutale [30]. Nel trattamento delle ferite cutanee, l'importanza della gelatina risiede nella sua capacità di ostacolare la proteolisi del fattore di crescita dell'epidermide (EGF) ad opera delle proteasi presenti nel sito di lesione [31]. Questo effetto è di notevole importanza poiché l'EGF facilita la rimarginazione delle ferite stimolando la proliferazione e la migrazione dei cheratinociti.

Oltre alla gelatina, anche enzimi proteolitici sono stati proposti come elementi funzionali per la realizzazione di idrogel adatti al trattamento delle ferite cutanee. La degradazione del tessuto necrotico di una ferita è infatti un aspetto fondamentale del processo di guarigione, in quanto tale tessuto rappresenta una fonte di possibili infezioni, prolunga la fase di infiammazione e costituisce un ostacolo per la fase di ri-epitelizzazione e per la rimarginazione della ferita. A tal proposito, la degradazione assistita da proteasi costituisce un'ottima strategia per accelerare il processo di guarigione delle ferite; è stato dimostrato, infatti, che le proteasi sono in grado di rimuovere il tessuto necrotico dalle ferite e dalle ustioni senza danneggiare i tessuti sani. Generalmente gli enzimi testati per tale scopo (papaina, collagenasi, tripsina, termolisina) sono inseriti in formulazioni come unguenti o assorbiti in garze umide, idrocolloidi o idrogel [32]. La collagenasi è un enzima proteolitico che causa la degradazione specifica del collagene senza interferire con le cellule presenti nel sito di lesione [33]. La papaina, invece, attacca i residui di cisteina delle proteine in maniera non selettiva,

---

[28] Bello, A.B.; Kim, D.; Kim, D.; Park, H.; Lee, S.-H. Engineering and functionalization of gelatin biomaterials: From cell culture to medical applications. *Tissue Eng. B Rev.* **2020**; 26: 164-180.

[29] Khadka, D.B.; Haynie, D.T. Protein- and peptide-based electrospun nanofibers in medical biomaterials. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2012**; 8: 1242-1262.

[30] Su, K.; Wang, C. Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnol. Lett.* **2015**; 37: 2139-2145.

[31] Tanaka, A.; Nagate, T.; Matsuda, H. Acceleration of wound healing by gelatin film dressings with epidermal growth factor. *J. Vet. Med. Sci.* **2005**; 67: 909-913.

[32] Vernikovskii, B.V.; Stepanova, E.F. Immobilized proteases for wound cleaning. *Russ. J. Gen. Chem.* **2012**; 82: 572-578.

[33] McCallon, S.K.; Weir, D.; Lantis, J.C. Optimizing wound bed preparation with collagenase enzymatic debridement. *J. Am. College Clin. Wound Specialists* **2014**; 6: 14-23.

interferendo quindi con i tessuti sani e causando di conseguenza un'intensa risposta infiammatoria associata a dolore <sup>[34]</sup>. La tripsina, appartenente alla famiglia delle serin proteasi, operante a valori di pH compresi tra 7 e 9, catalizza il processo proteolitico all'estremità C-terminale con specificità per la lisina e l'arginina <sup>[35]</sup>.

### **1.1.3.3 Idrogel elettrosensibili per il trattamento delle ferite cutanee**

Gli idrogel elettro-responsivi in grado di modulare il rilascio di un agente bioattivo in risposta all'applicazione di un campo elettrico esterno sono generalmente costituiti da polielettroliti <sup>[36]</sup>. Il loro utilizzo trae vantaggio dalla possibilità di controllare l'intensità della corrente, la durata dell'impulso e la durata degli eventuali intervalli tra più impulsi successivi. Il campo elettrico può essere infatti applicato o rimosso dall'esterno in qualunque momento. Ciò dà la possibilità di creare dispositivi di tipo *ON-OFF*, in cui il sistema torna nelle condizioni di riposo in seguito a rimozione dello stimolo elettrico.

La stimolazione elettrica, oltre a permettere di modulare il rilascio di principi attivi è in grado essa stessa di promuovere il processo di guarigione, con effetti benefici sia nel caso di ferite acute che croniche, poiché è in grado di prevenire l'insorgenza di infezioni, migliorare la risposta immunitaria e aumentare la perfusione sanguigna. La pelle umana non danneggiata ha un potenziale elettrico endogeno e un potenziale di corrente transcutanea generato dal movimento degli ioni sodio attraverso le pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasi nell'epidermide. A seguito di una lesione, il flusso di corrente attraverso il percorso della ferita genera un campo elettrico laterale chiamato corrente di lesione che gioca un ruolo significativo nell'avviare la riparazione. Un campo elettrico esterno non fa altro che potenziare questa corrente favorendo la rimarginazione tissutale <sup>[37]</sup>.

La natura della risposta di un idrogel ad una differenza di potenziale dipende da diversi fattori, tra cui la forma e la posizione dell'idrogel rispetto agli elettrodi, con la possibilità di avere fenomeni di rigonfiamento (swelling), contrazione (shrinking), o piegamento (bending) del materiale polimerico. I fenomeni di swelling e shrinking si verificano quando l'idrogel si trova in posizione perpendicolare

---

<sup>[34]</sup> Dutra, J.A.P.; Carvalho, S.G.; Zampiroli, A.C.D.; Daltoé, R.D.; Teixeira, R.M.; Careta, F.P.; Cotrim, M.A.P.; Oréface, R.L.; Villanova, J.C.O. Papain wound dressings obtained from poly(vinyl alcohol)/calcium alginate blends as new pharmaceutical dosage form: Preparation and preliminary evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**; 113: 11-23.

<sup>[35]</sup> Moreira, B.R.; Batista, K.A.; Castro, E.G.; Lima, E.M.; Fernandes, K.F. A bioactive film based on cashew gum polysaccharide for wound dressing applications. *Carbohydr. Polym.* **2015**; 122: 69-76.

<sup>[36]</sup> Guiseppi-Elie, A. Electroconductive hydrogels: Synthesis, characterization and biomedical applications. *Biomaterials* **2010**; 31: 2701-2716

<sup>[37]</sup> Kloth, L.C. Electrical stimulation for wound healing: A review of evidence from in vitro studies, animal experiments, and clinical trials. *Int. J. Low. Extrem. Wounds* **2005**; 4: 23-44

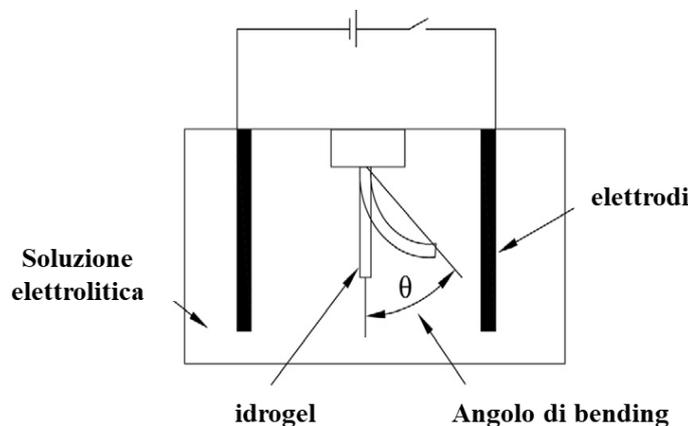
rispetto agli elettrodi. Il bending si ha invece quando il materiale polimerico, disposto in parallelo rispetto agli elettrodi carichi, va incontro a rigonfiamento da un'estremità e contrazione dell'altra <sup>[38]</sup>.

Il comportamento di swelling e la deformazione possono essere spiegati tramite la teoria della pressione osmotica ( $\pi$ ) proposta da Flory, che si basa sulla differenza di concentrazione di ioni che viene a crearsi all'interno e all'esterno dell'idrogel in seguito all'applicazione di un campo elettrico <sup>[39]</sup>. Quando una striscia di idrogel carica negativamente è posta parallelamente rispetto a una coppia di elettrodi e viene applicata una corrente costante, gli ioni liberi in soluzione migrano verso l'elettrodo di segno opposto. I contro-ioni presenti all'interno dell'idrogel invece non migrano per garantire l'elettroneutralità. Di conseguenza, la concentrazione degli ioni mobili è maggiore sul lato dell'idrogel rivolto verso l'elettrodo carico negativamente e minore sul lato rivolto verso l'elettrodo positivo. Questa differenza di concentrazione si traduce in una differenza di pressione osmotica (descritta dall'equazione di Donnan (Equazione 1.21)) tra il gel e la soluzione all'equilibrio:

$$\pi_{ion} = RT \sum_{j=1}^N (c_j gel - c_j sol) \quad (1.21)$$

$c_j gel$  e  $c_j sol$  rappresentano la concentrazione di ioni nel gel e nella soluzione all'equilibrio, mentre  $N$  è il numero di ioni mobili nel sistema.

Si assiste quindi ad un bending dell'idrogel a causa di un rigonfiamento dal lato anodico e contrazione dal lato catodico. Il piegamento dell'idrogel è espresso in termini di grado di piegamento ( $\theta$ ) dell'angolo di deviazione dalla posizione verticale (Figura 1.1.2).



**Figura 1.1.2** Bending di un idrogel elettrosensibile sotto effetto di un campo elettrico

In linea generale, un polielettrolita anionico curva verso l'elettrodo negativo e un polielettrolita cationico curva verso l'elettrodo positivo.

<sup>[38]</sup> Jin, S.; Gu, J.; Shi, Y.; Shao, K.; Yu, X.; Yue, G. Preparation and electrical sensitive behavior of poly (N-vinylpyrrolidone-co-acrylic acid) hydrogel with flexible chain nature. *Eur. Polym. J.* **2013**; 49: 1871-1880.

<sup>[39]</sup> Ganji, F.; Vasheghani-Farahani, S.; Vasheghani-Farahani E. Theoretical description of hydrogel swelling: a review. *Iranian Polym. J.* **2010**; 19: 375-398

Alcuni esempi chiave di polimeri naturali elettro-sensibili, o che possono essere resi tali mediante modificazioni chimiche, sono gli idrogel a base di polisaccaridi (chitosano, alginato, acido ialuronico, cellulosa, destrano, gomma xantano, agarosio), di proteine (collagene, gelatina, fibrina, elastina), di polipeptidi e polimeri sintetici (alcol polivinilico, polivinilpirrolidone, polietilenglicole, acido poli(lattico-co-glicolico), acido poli(lattico) e di polimeri metacrilati. Tutti questi polimeri raramente sono utilizzati come tali, in quanto hanno bassa sensibilità allo stimolo elettrico. A tal proposito si preferisce o usare i loro sali, come nel caso dell'acido acrilico, metacrilico e stirene sulfonato, o modificarli covalentemente, come nel caso dell'alcol vinilico e della poliacrilammide. Spesso, inoltre, per ridurre la resistività elettrica di un sistema polimerico si ricorre all'inserimento di elementi conduttivi contenenti legame  $\pi$  coniugati, con la realizzazione di sistemi ibridi <sup>[40]</sup>.

---

<sup>[40]</sup> Balint, R.; Cassidy, N.J.; Cartmell, S.H. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomater.* **2014**; 10: 2341-2353.

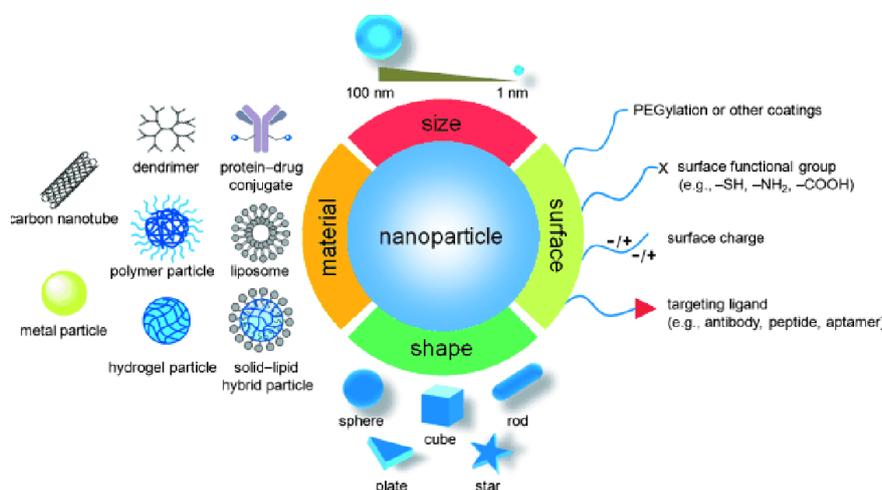
## 1.2 Sistemi polimerici micro- e nano- particellari

### 1.2.1 Le nanotecnologie in campo biomedico e farmaceutico

La nanotecnologia si occupa della progettazione e dell'utilizzo di materiali in scala nanometrica in diversi campi di applicazione, dall'elettronica, all'industria chimica, alla medicina.

In campo medico, i nanomateriali trovano spazio nella prognosi, nella diagnosi e nel trattamento di patologie infettive, genetiche e cancerose <sup>[1]</sup>. La possibilità di indirizzare un farmaco a uno specifico organo o a un tipo di cellula rappresenta un'importante sfida soprattutto in ambito oncologico, laddove la terapia chemioterapica tradizionale non discrimina tra cellula sana e cellula malata. Le dimensioni, la biocompatibilità e la stabilità in vivo hanno reso le nanoparticelle (NP) uno strumento ottimale per la veicolazione di farmaci antitumorali, in quanto ne modificano le proprietà farmacocinetiche, ne aumentano l'efficacia e ne riducono gli effetti collaterali consentendo di usare dosaggi più bassi <sup>[2]</sup>.

I sistemi nanoparticellari sono classificati in base a dimensioni, forma, materiali di cui sono costituiti, struttura della superficie, così come rappresentato in Figura 1.2.1 <sup>[3]</sup>.



**Figura 1.2.1** Rappresentazione delle proprietà delle nanoparticelle in campo biomedico

<sup>[1]</sup> Zhang, L.; Gu, F.X.; Chan, J.M.; Wang, A.Z.; Langer, R.S.; Farokhzad, O.C. Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**; 83: 761-769.

<sup>[2]</sup> Davis, M.E.; Chen, Z.; Shin, D.M. Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. *Nature Rev. Drug Discov.* **2008**; 7: 771-782.

<sup>[3]</sup> Heinz, H.; Pramanik, C.; Heinz, O.; Ding, Y.; Mishra, R.K.; Marchon, D.; Flatt, R.J.; Estrela-Lopis, I.; Llop, J.; Moya, S.; Ziolo, R.F. Nanoparticle decoration with surfactants: Molecular interactions, assembly, and applications. *Surf. Sci. Rep.* **2017**; 72: 1-58.

A seconda del diametro, esse sono in grado di superare barriere e penetrare strutture biologiche diverse: le nanoparticelle di dimensioni inferiori a 40 nm riescono ad entrare nel nucleo mentre quelle che presentano un diametro minore di 35 nm possono penetrare anche la barriera emato-encefalica. In base alle caratteristiche morfologiche si distinguono in nanosfere, nanotubi, nanocapsule e nanofibre. A seconda del tipo di materiale, si parla di nanoparticelle inorganiche quando il *core* del sistema è costituito da nanostrutture al carbonio, metalliche o ceramiche, mentre sono definite nanoparticelle organiche quelle di natura polimerica (idrogel, dendrimeri, micelle e polimersomi) o lipidica (liposomi, nanoparticelle solide lipidiche).

Da sottolineare che la superficie dei nanocarrier gioca un ruolo fondamentale nel permettere l'accumulo dei farmaci nei siti specifici del tumore e spesso viene modificata per migliorare il profilo farmacocinetico dei farmaci, con l'ottenimento di sistemi *core-shell*. Per esempio, il rivestimento con polimeri mucoadesivi, come il chitosano, è utile per migliorare l'affinità per i tessuti; quello con polimeri idrofili, come il polietilenglicole (PEG), limita l'opsonizzazione da parte delle cellule del reticolo endoteliale (RES) <sup>[4]</sup>.

Diversi tipi di materiali nanostrutturati sono stati proposti e testati per applicazioni nella diagnosi e nel trattamento di diverse patologie tumorali: le nanoparticelle organiche sono clinicamente approvate per trattamenti terapeutici, mentre quelle inorganiche (ad es. nanoparticelle metalliche o nanocristalli) sono principalmente usate come agenti di contrasto nel campo della diagnostica per immagini <sup>[5]</sup>. Ad oggi più di 50 nanofarmaci sono stati approvati per diversi usi clinici e più di 70 sono attualmente in fase clinica <sup>[6]</sup>. La maggior parte delle nanoformulazioni antitumorali si basa su farmaci precedentemente approvati di cui migliorano i profili farmacocinetici e farmacodinamici, come Doxil®, che è una doxorubicina liposomiale, il primo nano-farmaco approvato per uso clinico nel 1995; DanoXome® che è daunorubicina liposomiale; Oncaspar® che è asparaginasi PEGilata; le nanoparticelle polimeriche Eligard® costituite da Leuprolide acetato coniugato ad un sistema macromolecolare <sup>[7]</sup>.

Il processo di preparazione delle nanoparticelle polimeriche si basa generalmente sul bilanciamento tra forze attrattive e repulsive all'interno del polimero: è generalmente accettato che la

---

<sup>[4]</sup> Petros, R.A.; DeSimone, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Rev. Drug Discov.* **2010**; 9: 615-627.

<sup>[5]</sup> Kumari, P.; Ghosh, B.; Biswas, S. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *J. Drug Target.* **2016**; 24: 179-191.

<sup>[6]</sup> Bobo, D.; Robinson, K.J.; Islam, J.; Thurecht, K.J.; Corrie, S.R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* **2016**; 33: 2373-2387.

<sup>[7]</sup> Ventola, C.L. Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs. *P T* **2017**; 42: 742-755.

diminuzione delle interazioni idrofobiche intramolecolari è cruciale per la formazione delle nanoparticelle <sup>[8]</sup>. I metodi più comunemente utilizzati per la preparazione delle nanoparticelle sono:

- La *gelazione ionica* che prevede la precipitazione di polimeri di natura polielettrolitica mediante interazione elettrostatica con ioni di carica opposta <sup>[9]</sup>.
- La *coacervazione per complessazione*, un'evoluzione della tecnica precedente, che prevede il miscelamento di due sistemi polimerici di carica opposta, la cui complessazione porta a precipitazione delle nanoparticelle <sup>[10]</sup>.
- La *coacervazione/desolvatazione* che si basa sulla differente solubilità dei polimeri in solventi acquosi e organici <sup>[11]</sup>. L'aggiunta di agenti di desolvatazione (quali ad esempio etanolo o acetone) porta a cambiamenti di conformazione nella struttura del polimero, con conseguente coacervazione o precipitazione. Le nanoparticelle vengono successivamente stabilizzate mediante l'aggiunta di opportuni agenti reticolanti.
- L'*emulsione*, attraverso la quale una soluzione acquosa del polimero è emulsionata in olio in presenza di tensioattivi utilizzando omogenizzatori ad alta velocità <sup>[12]</sup>. Le nanoparticelle si formano all'interfaccia a/o; la fase oleosa è poi rimossa mediante lavaggi successivi in solvente organico.
- L'*elettrospray*, una metodica che permette di ottenere sistemi praticamente monodispersi. Questa tecnica prevede la preparazione della soluzione del biopolimero in esame e l'evaporazione del solvente mediante elettrospray di gocce colloidali della soluzione con formazione delle NP allo stato secco <sup>[13]</sup>.
- L'*autoassemblaggio* di sistemi di natura anfifilica, in seguito al raggiungimento di una determinata concentrazione ad una data temperatura <sup>[14]</sup>. Il processo è favorito dalla diminuzione di energia libera del sistema in seguito a sottrazione dall'ambiente acquoso dei segmenti idrofobici che

---

<sup>[8]</sup> Yang, J.; Han, S.; Zheng, H.; Dong, H.; Liu, J. Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* **2015**, 123: 53-66.

<sup>[9]</sup> Dong, Y.; Ng, W.K.; Shen, S.; Kim, S.; Tan, R.B.H. Scalable ionic gelation synthesis of chitosan nanoparticles for drug delivery in static mixers. *Carbohydr. Polym.* **2013**; 94: 940-945.

<sup>[10]</sup> Klemmer, K.J.; Waldner, L.; Stone, A.; Low, N.H.; Nickerson, M.T. Complex coacervation of pea protein isolate and alginate polysaccharides. *Food Chem.* **2012**; 130: 710-715.

<sup>[11]</sup> Song, Y.B.; Zhang, L.Z.; Gan, W.P.; Zhou, J.P.; Zhang, L.N. Self-assembled micelles based on hydrophobically modified quaternized cellulose for drug delivery. *Colloids Surf. B Biointerf.* **2011**; 83: 313-320.

<sup>[12]</sup> Paques, J.P.; van der Linden, E.; van Rijn, C.J.M.; Sagis, L.M.C. Alginate submicron beads prepared through w/o emulsification and gelation with CaCl<sub>2</sub> nanoparticles. *Food Hydrocolloids* **2013**; 31: 428-434.

<sup>[13]</sup> Zhang, L.; Huang, J.; Si, T.; Xu, R.X. Coaxial electrospray of microparticles and nanoparticles for biomedical applications. *Exp. Rev. Med. Dev.* **2012**; 9: 595-612.

<sup>[14]</sup> Kazunori, K.; Atsushi, H.; Yukio, N. Block copolymer micelles for drug delivery: Design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**; 64: 37-48.

interagiscono tra loro nel core della struttura nanoparticellare; i segmenti idrofilici disposti all'esterno permettono la formazione di un sistema colloidale stabile.

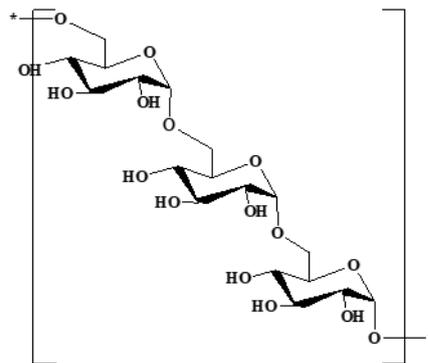
Nella produzione delle NP polimeriche possono essere utilizzati polimeri di origine sintetica e naturale quali proteine, polipeptidi e polisaccaridi. Questi ultimi presentano alcuni vantaggi: i) possono essere metabolizzati dagli enzimi endogeni; ii) presentano funzionalità suscettibili di derivatizzazione chimica (gruppi ossidrilici, carbossilici e amminici), con conseguente modulazione della carica superficiale del sistema e delle proprietà di bioadesione <sup>[15]</sup>.

I polisaccaridi usati per la preparazione delle nanoparticelle vengono classificati in cationici (chitosano), anionici (alginato, eparina, acido ialuronico) e non ionici (pullulano, destrano); nel caso delle proteine invece trovano prevalentemente impiego la gelatina, l'albumina, la caseina e la cheratina.

L'attività di ricerca si è incentrata sulla sintesi e caratterizzazione di sistemi nanoparticellari a base di destrano e cheratina.

### 1.2.2 Nanoparticelle a base di destrano

Il destrano (DEX) è un polisaccaride ramificato complesso costituito da molecole di D-glucopiranosio legate tra loro mediante un legame glicosidico  $\alpha$  1-6 con ramificazioni nelle posizioni  $\alpha$  1-2, 1-3 e 1-4 (Figura 1.2.2).



**Figura 1.2.2** Struttura chimica del destrano

Il destrano può essere ottenuto da fonti diverse che ne determinano peso molecolare, grado di ramificazione, rapporto tra i diversi legami glicosidici, attività ottica e azione biologica. Destrani con diverse proprietà sono sintetizzati da un gran numero di batteri appartenenti alla famiglia dei

<sup>[15]</sup> Yoo, J.-W.; Irvine, D.J.; Discher, D.E.; Mitragotri, S. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nature Rev. Drug Discov.* **2011**; 10: 521-535.

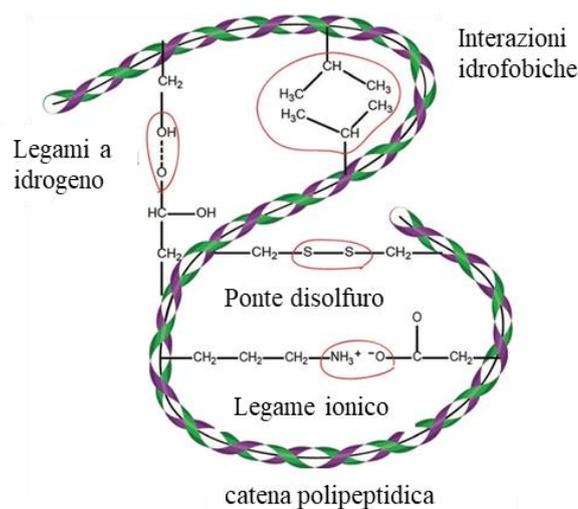
lattobacilli; quelli utilizzati in campo farmaceutico sono ottenuti da destrani ad alto peso molecolare dopo parziale depolimerizzazione mediante idrolisi acida.

Il destrano è solubile in acqua, formammide e dimetilsolfossido e insolubile in alcool e acetone. I profili farmacocinetici sono influenzati dal peso molecolare, dalla flessibilità, dalla carica superficiale e dal bilancio lipofilia/idrofilia. I destrani con peso molecolare inferiore a 70.000 hanno tassi di eliminazione rapidi dopo un'ora, seguiti da una clearance più lenta; i destrani con peso molecolare nell'intervallo 70.000-250.000 mostrano, invece, un'emivita prolungata nel sistema circolatorio che ne preclude il passaggio transcellulare e quindi l'assorbimento per via gastrointestinale <sup>[16]</sup>.

Il destrano risulta essere un buon vettore di farmaci di diversa natura e con diverse proprietà <sup>[17]</sup>.

### 1.2.3 Nanoparticelle a base di cheratina

Le cheratine sono le tipiche proteine dei filamenti del citoscheletro delle cellule e sono importanti per la stabilità meccanica e l'integrità delle cellule epiteliali e dei tessuti <sup>[18]</sup> (Figura 1.2.3).



**Figura 1.2.3** Rappresentazione delle interazioni inter- ed intra-molecolari nella cheratina

La peculiarità della cheratina è l'elevato contenuto di residui di cisteina, presenti in quantità del 7-13%, che formano ponti disolfuro intramolecolari responsabili, insieme ai legami ad idrogeno, alle interazioni idrofobiche e ai legami ionici, dell'elevata stabilità della proteina

<sup>[16]</sup> Saravanakumar, G.; Jo, D.-G.; Park, J.H. Polysaccharide-based nanoparticles: A versatile platform for drug delivery and biomedical imaging. *Curr. Med. Chem.* **2012**; 19: 3212-3219.

<sup>[17]</sup> Nitta, S.; Numata, K. Biopolymer-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery and Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**; 14: 1629-1654.

<sup>[18]</sup> Moll, R.; Divo, M.; Langbein, L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem. Cell Biol.* **2008**; 129: 705-733.

Durante l'ultimo decennio, sono state valutate varie tecniche per l'estrazione della cheratina da tessuti di origine animale, quali lana, piume o corna, che hanno permesso di isolare diverse frazioni utilizzabili per la realizzazione di film, idrogel e compositi con applicazioni nel campo della rigenerazione tissutale, della guarigione delle ferite, della rigenerazione dei nervi e per il rilascio controllato di farmaci. Biomateriali a base di cheratina favoriscono l'adesione cellulare, la proliferazione e la rigenerazione tissutale e sono in grado di incorporare e rilasciare sostanze idrofile o idrofobe <sup>[19,20]</sup>.

---

<sup>[19]</sup> Lee, H.; Noh, K.; Lee, S.C.; Kwon, I.; Han, D.; Lee, I.; Hwang, Y. Human Hair Keratin and Its-Based Biomaterials for Biomedical Applications. *Tissue Eng, Regenerat. Med.* 2014; 11: 255-265.

<sup>[20]</sup> Shavandi, A.; Silva, T.H.; Bekhit, A.A.; Bekhit, A.E.A. Keratin: dissolution, extraction and biomedical application. *Biomater. Sci.* 2017; 5: 1699-1735.

## 1.3 Coniugati polimerici

### 1.3.1 Coniugati polimerici in campo biomedico e farmaceutico

Con il termine coniugato polimerico si definisce un sistema di veicolazione macromolecolare solubile cui è legato covalentemente un principio attivo <sup>[1]</sup>. Tali sistemi sono stati proposti per la prima volta negli anni '70 del secolo scorso da Ringsdorf, e dopo una fase di sperimentazione preclinica, sono entrati nella pratica clinica alla fine degli anni '90 <sup>[2]</sup>. Sono proposti prevalentemente per il trattamento di patologie oncologiche, giacché migliorano i profili farmacocinetici e quindi l'efficacia terapeutica degli agenti citotossici a basso peso molecolare <sup>[3]</sup>.

Da un punto di vista chimico, il modello di coniugato polimerico, o profarmaco polimerico, prevede il legame di un principio attivo ad una catena polimerica lineare mediante l'utilizzo di un opportuno spaziatore. La presenza inoltre di una unità target ne consente la veicolazione sito-specifica nell'opportuno sito di azione (Figura 1.3.1).

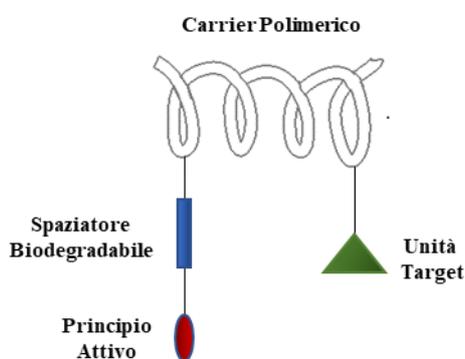


Figura 1.3.1 Rappresentazione del modello di profarmaco secondo Ringsdorf

Secondo il modello di Ringsdorf, un profarmaco polimerico deve rispondere ad alcuni requisiti fondamentali sia da un punto di vista chimico-fisico che funzionale.

Da un punto di vista produttivo e formulativo, deve avere un basso indice di polidispersività ed essere facilmente reperibile e/o sintetizzabile su larga scala con costi contenuti; deve inoltre esserne

<sup>[1]</sup> Greco, F.; Vicent, M.J. Combination therapy: Opportunities and challenges for polymer–drug conjugates as anticancer nanomedicines *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**; 61: 1203-1213.

<sup>[2]</sup> Ringsdorf, H. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *J. Polym. Sci., Polym. Symp.* **1975**; 51: 135-153

<sup>[3]</sup> Haag, R.; Kratz, F. Polymer therapeutics: concepts and applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**; 45:1198-1215.

possibile un'accurata caratterizzazione analitica. La formulazione deve garantire adeguati livelli di stabilità ed una semplicità di somministrazione.

Per quanto riguarda le proprietà farmacocinetiche, la componente polimerica deve essere solubile nei fluidi biologici, biocompatibile e non presentare livelli significativi di tossicità o immunogenicità; deve garantire il raggiungimento del tessuto bersaglio (avere quindi peso molecolare adeguato); deve essere biodegradabile in seguito ad idrolisi chimica o enzimatica per poter essere escreta per via epatica o renale senza accumulo significativo.

Da un punto di vista chimico, il polimero deve presentare gruppi funzionali adatti alla bioconiugazione con principi attivi mediante reazioni semplici che non determinino insorgenza di tossicità o immunogenicità. Il legame farmaco-*carrier* (in genere un estere, un'ammide, un'immina o un tioestere) deve essere sufficientemente stabile nel circolo ematico per garantire un direzionamento efficace; tuttavia deve poter essere scisso per via chimica o enzimatica nel sito bersaglio per poter espletare l'azione farmacologica.

Diverse pubblicazioni scientifiche hanno riportato la sintesi di polimeri funzionali mediante reazioni di bioconiugazione con principi attivi di diversa natura, sottolineando la necessità di sviluppare approcci sintetici eco- e bio-compatibili per migliorarne le potenzialità applicative <sup>[4]</sup>.

### **1.3.2 Coniugati polimero-polifenolo**

Negli ultimi anni, il nostro gruppo di ricerca si è interessato allo sviluppo di strategie sintetiche innovative per la coniugazione di sistemi macromolecolari con agenti bioattivi di natura polifenolica <sup>[5]</sup>. Tale interesse è nato dalla notevole importanza che i polifenoli naturali, sostanze ad azione antiossidante, hanno acquisito come coadiuvanti nella profilassi e nel trattamento di diverse malattie <sup>[6]</sup>. Tuttavia, se da un lato gli studi *in vitro* hanno dimostrato l'efficacia di molecole ad attività antiossidante in vari stati patologici quali cancro e diabete e in disturbi cardiovascolari, autoimmuni, neurodegenerativi e dell'invecchiamento, dall'altro diverse evidenze cliniche hanno evidenziato come tali risultati non si siano poi trasformati in benefici significativi *in vivo* <sup>[7]</sup>.

Tra i diversi polifenoli disponibili in natura, l'attività di ricerca è stata rivolta prevalentemente alla curcumina e alla quercetina.

---

<sup>[4]</sup> Duncar, R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Rev. Drug Discov.* **2003**; 2: 347-360.

<sup>[5]</sup> Spizzirri, U.G.; Cirillo, G.; Picci, N.; Iemma, F. Recent development in the synthesis of eco-friendly polymeric antioxidants. *Curr. Org. Chem.* **2014**; 18: 2912—2927.

<sup>[6]</sup> Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrit.* **2005**; 45: 287-306.

<sup>[7]</sup> Williamson, G.; Manach, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutrit.* **2005**; 81: 243S-255S.

La curcumina, 1,7-bis-(4-idrossi-3-metossifenil)-1,6-eptadiene-3,5-dione (Figura 1.3.2) è il principale composto attivo della *Curcuma longa*, una pianta appartenente alla famiglia delle *Zingiberaceae* di cui costituisce il 2-5% [8].

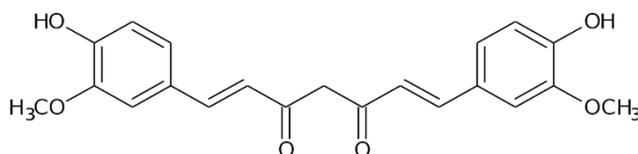


Figura 1.3.2 Struttura chimica della curcumina

La quercetina, 2-(3,4-diidrossifenil)-3,5,7-triidrossi-4H-1-benzopirano-4-one (Figura 1.3.3) è un composto appartenente alla classe dei flavonoli estratto da diverse specie vegetali quali ad esempio l'iperico e il Ginkgo biloba [9].

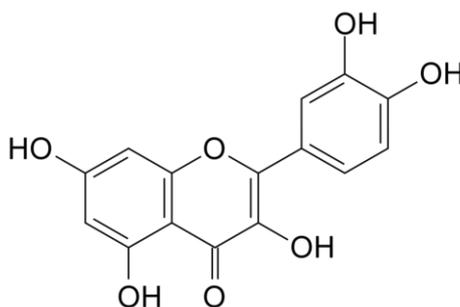


Figura 1.3.3 Struttura chimica della quercetina

Vari studi hanno messo in evidenza le numerose attività biologiche dei due composti, quali quella antibatterica, antivirale, antifungina, antitumorale, antiossidante ed antiinfiammatoria [10,11].

Per quanto riguarda la **Curcumina**, studi scientifici effettuati negli ultimi due decenni hanno dimostrato che le proprietà antiossidanti sono correlabili alla sua capacità di quenziare direttamente i ROS ( $O_2^{\circ-}$ ;  $HO^{\circ}$ ;  $NO^{\circ}$  e  $ONOO^{\circ-}$ ). La curcumina presenta attività antiinfiammatoria per

[8] Hatcher, H.; Planalp, R.; Cho, J.; Torti, F.M.; Torti, S.V. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008; 65: 1631-1652.

[9] Boots, A.W.; Haenen, G.R.M.M.; Bast, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.* 2008; 585: 325-337.

[10] Aggarwal, B.B.; Harikumar, K.B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009; 41: 40-59.

[11] Bischoff, S.C. Quercetin: Potentials in the prevention and therapy of disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metabol. Care* 2008; 11: 733-740.

downregolazione delle citochine proinfiammatorie e di fattori di trascrizione quale l'NF-(k)B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). È inoltre in grado di modulare l'attivazione di cellule T, cellule B, macrofagi, neutrofili, e cellule *natural killer* (NK) [12].

Nel trattamento delle ferite cutanee, è efficace nel migliorare la deposizione di collagene, nel promuovere la proliferazione dei fibroblasti e nell'aumentare la densità vascolare, contribuendo al rimodellamento tissutale ed alla formazione del tessuto di granulazione, sia nelle ferite acute che in quelle croniche [13].

L'attività antitumorale è dovuta, oltre alle citate proprietà antiossidanti e antiinfiammatorie, alla capacità di downregolare fattori di crescita indispensabili per la proliferazione e infiltrazione tumorale e inibire enzimi chiave del metabolismo delle cellule neoplastiche [14].

L'interesse verso la *Quercetina* è dovuto prevalentemente alle sue proprietà antibatteriche [15]. Sono stati proposti tre diversi meccanismi per giustificare l'attività antibatterica della quercetina e dei flavonoidi in generale:

- *inibizione della sintesi degli acidi nucleici*: i flavonoidi hanno la capacità di intercalarsi e formare dei legami a idrogeno con le basi azotate;
- *inibizione della funzione della membrana citoplasmatica*: i flavonoidi riducono prevalentemente la fluidità della membrana;
- *inibizione del metabolismo energetico*.

La curcumina e la quercetina hanno una bassa solubilità in ambiente acquoso; presentano un accentuato effetto di primo passaggio, una bassa biodisponibilità ed un'elevata sensibilità alla luce. Pertanto il loro utilizzo necessita di un sistema di veicolazione in grado di aumentarne la stabilità chimica e migliorarne i profili farmacocinetici [16,17].

La maggiore stabilità chimica e i profili farmacocinetici più vantaggiosi di polifenoli ad alto peso molecolare rappresentano il punto di partenza per lo sviluppo di coniugati polimero-polifenolo, che possono essere effettivamente presi in considerazione come coadiuvanti terapeutici. Se infatti il

---

[12] Gupta, S.C.; Patchva, S.; Aggarwal, B.B. Therapeutic roles of curcumin: Lessons learned from clinical trials. *AAPS J.* **2013**; *15*: 195-218.

[13] Akbik, D.; Ghadiri, M.; Chrzanowski, W.; Rohanzadeh, R. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sci.* **2014**; *116*: 1-7.

[14] Basnet, P.; Skalko-Basnet, N. Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* **2003**; *23*: 363-398.

[15] Daglia, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**; *23*: 174-181.

[16] Anand, P.; Kunnumakkara, A.B.; Newman, R.A.; Aggarwal, B.B. Bioavailability of curcumin: Problems and promises. *Mol. Pharm.* **2007**; *4*: 807-818

[17] Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J.P.E.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antiox. Redox Signal.* **2013**; *18*: 1818-1892.

trattamento di neoplasie ed infezioni batteriche è demandato all'utilizzo di specifici agenti terapeutici, la possibilità di ridurre le dosi mediante co-somministrazione di un coniugato polimero-polifenolo rappresenta sicuramente un vantaggio in termini di insorgenza di effetti collaterali tossici <sup>[18]</sup>.

I coniugati polimero-polifenolo possono essere sintetizzati mediante polimerizzazione di polifenoli monomerici o per coniugazione dei polifenoli con macromolecole di origine naturale o sintetica, beneficiando delle proprietà di entrambe le controparti. Da un lato la macromolecola stabilizza il polifenolo, dall'altra il polifenolo conferisce proprietà biologiche ad un polimero altrimenti biologicamente inerte.

Le tecniche principalmente utilizzate per la sintesi di coniugati polimero-polifenolo mediante polimerizzazione sono prevalentemente basate su reazioni di condensazione aldolica e di apertura di anelli epossidici <sup>[19]</sup>. Un esempio di polimerizzazione mediante condensazione aldolica è rappresentato dalla polimerizzazione della catechina in presenza di acetaldeide. Il meccanismo di reazione prevede in questo caso l'iniziale formazione di un carbocatione in seguito a protonazione dell'aldeide, cui segue l'attacco nucleofilo da parte del flavonoide. A questo punto si ha fuoriuscita dell'ossidrile sul residuo di acetaldeide legato, con formazione di un secondo carbocatione a sua volta attaccato da un'altra molecola di catechina. Il meccanismo di polimerizzazione mediante utilizzo di composti epossidici prevede invece l'apertura degli anelli epossidici presenti sull'agente condensante (es. glicerol diglicidil etere) da parte di due molecole di polifenolo (es. quercetina).

Reazioni di condensazione, grafting radicalico e catalisi enzimatica consentono altresì la formazione di coniugati mediante derivatizzazione di un polimero preformato con un residuo polifenolico. Queste metodiche presentano il vantaggio di una maggiore versatilità, e sono quelle maggiormente indagate in letteratura per la realizzazione di materiali innovativi per applicazioni in campo biomedico, farmaceutico e alimentare.

### ***1.3.2.1 Sintesi di coniugati polimero-polifenolo mediante reazione di condensazione***

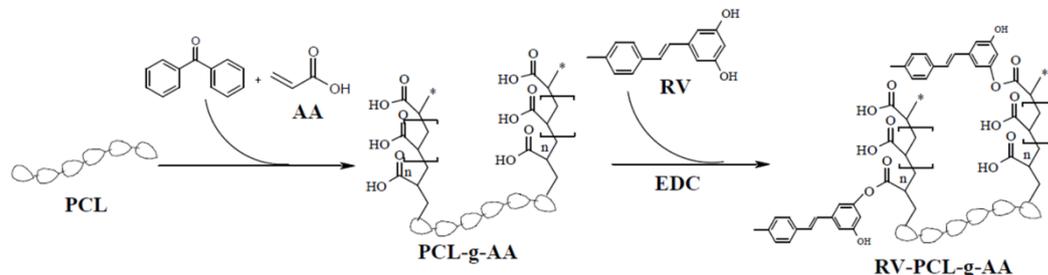
Un primo approccio per la preparazione di coniugati coinvolge le reazioni di condensazione (acilazione, eterificazione, ecc) fra le funzionalità chimiche presenti sulle molecole antiossidanti e quelle sulle catene laterali del sistema macromolecolare. I vantaggi di tale approccio consistono nell'elevata versatilità delle condizioni di reazione e nella possibilità di controllare con precisione le proprietà chimico-fisiche e meccaniche dei coniugati ottenuti.

---

<sup>[18]</sup> Cirillo, G.; Curcio, M.; Vittorio, O.; Iemma, F.; Restuccia, D.; Spizzirri, U.G.; Puoci, F.; Picci, N. Polyphenol Conjugates and Human Health: A Perspective Review. *Cirt. Rev Food Sci. Nutrit.* **2016**; 56: 326-337.

<sup>[19]</sup> Oliver, S.; Vittorio, O.; Cirillo, G.; Boyer, C. Enhancing the therapeutic effects of polyphenols with macromolecules. *Polym. Chem.* **2016**; 7: 1529-1544.

Un esempio riportato in letteratura è la modifica della superficie di un copolimero poli-ε-caprolattone-acido acrilico (PCL-g-AA) con resveratrolo (RV) mediante la formazione di un legame estereo (Figura 1.3.4) [20].



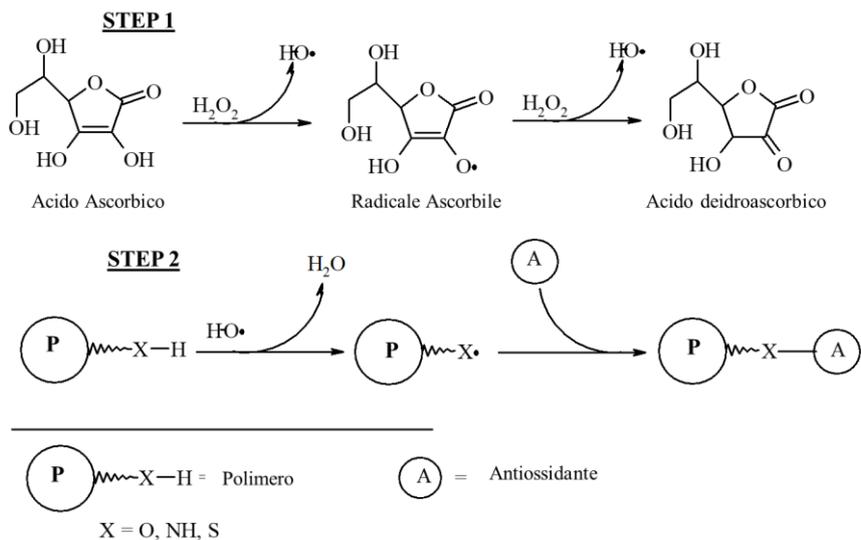
**Figura 1.3.4** Reazione di condensazione tra PLC-g-AA e Resveratrolo

### 1.3.2.2 Sintesi di coniugati polimero-polifenolo mediante grafting radicalico

Un secondo approccio per la sintesi di un coniugato polimero polifenolo è rappresentato dalla reazione di grafting radicalico, una metodica sintetica totalmente eco- e bio- compatibile che non comporta l'utilizzo di reagenti o solventi organici potenzialmente tossici e non prevede la formazione di sottoprodotti di reazione. È possibile in questo modo mantenere inalterate le proprietà biologiche del bioattivo che va incontro al processo di coniugazione. Si tratta di una metodica versatile che ben si presta alla coniugazione di diversi polimeri di origine sia naturale che sintetica. Negli ultimi anni, mediante questo approccio sintetico, diversi polimeri di origine naturale quali gelatina, chitosano, amido, inulina, alginato, e destrano sono stati coniugati a polifenoli quali acido gallico, catechina e quercetina, ottenendo sistemi con proprietà antiossidanti, antiinfiammatorie e di inibizione della proliferazione tumorale e microbica [21,22,23,24,25].

Il meccanismo di reazione è rappresentato in Figura 1.3.5 [26].

- [20] Li, Y.; Dänmark, S.; Edlund U.; Finne-Wistrand, A.; He, X.; Norgård, M.; Blomén, E.; Hultenby, K.; Andersson, G.; Lindgren, U. Resveratrol conjugated poly-ε-caprolactone facilitates in vitro mineralization and in vivo bone regeneration. *Acta Biomater.* **2011**; 7: 751-758.
- [21] Curcio, M.; Puoci, F.; Iemma, F.; Parisi, O.I.; Cirillo, G.; Spizzirri, U.G.; Picci, N. Covalent insertion of antioxidant molecules on chitosan by free radicals grafting procedure. *J. Agric. Food Chem.* **2009**; 57, 5933-5938.
- [22] Cirillo, G.; Kraemer, K.; Fuessel, S.; Puoci, F.; Curcio, M.; Spizzirri, U.G.; Altamari, I.; Iemma F. Biological activity of a gallic acid-gelatin conjugate. *Biomacromolecules* **2010**; 11: 3309-3315.
- [23] Cirillo, G.; Puoci, F.; Curcio, M.; Iemma, F.; Parisi, O.I.; Spizzirri, U.G.; Altamari, I.; Picci N. Starch-quercetin conjugate by radical grafting: Synthesis and evaluation of the antioxidant and enzymatic activities. *Pharm. Dev. Technol.* **2012**; 17: 466-476.
- [24] Vittorio, O.; Cirillo, G.; Iemma, F.; Di Turi, G.; Jacchetti, E.; Curcio, M.; Barbuti, S.; Funel, N.; Parisi, O.I.; Puoci, F.; Picci, N. Dextran-catechin conjugate: A potential treatment against the pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pharm. Res.* **2012**; 29: 2601-2614.
- [25] Spizzirri, U.G.; Altamari, I.; Puoci, F.; Parisi, O.I.; Iemma, F.; Picci N. Innovative antioxidant thermo-responsive hydrogels by radical grafting of catechin on inulin chain. *Carbohydr. Polym.* **2011**; 84: 517-523.
- [26] Spizzirri, U.G.; Iemma, F.; Puoci, F.; Cirillo, G.; Curcio, M.; Parisi, O.I.; Picci, N. Synthesis of antioxidant polymers by grafting of Gallic acid and Catechin on gelatine. *Biomacromolecules* **2009**; 10: 1923-1930.



**Figura 1.3.5** Schematizzazione di un processo di grafting radicalico

Si tratta di un processo radicalico in cui un sistema iniziatore, in genere costituito dalla coppia redox acqua ossigenata/acido ascorbico, genera radicali liberi ossidrilici che vanno ad interagire con gli eteroatomi presenti sulla catena laterale del sistema macromolecolare. Le specie radicaliche macromolecolari così formate reagiscono quindi con la molecola antiossidante con formazione di un legame covalente ed ottenimento del coniugato finale. L'utilizzo della coppia redox acido ascorbico/perossido d'idrogeno permette di effettuare la reazione in un ambiente completamente acquoso, di superare i problemi di tossicità propri di altri iniziatori radicalici, quali composti azotati o perossidi, oltre che di operare in condizioni di reazione (temperatura, pressione) relativamente blande, con notevoli vantaggi in termini di possibile scale-up industriale.

Una diretta evoluzione di questo approccio consiste nell'inserire il polifenolo all'interno di una miscela di polimerizzazione, ottenendo l'innesto della molecola antiossidante all'interno della catena polimerica in crescita. Esempi di questo tipo sono polimeri metacrilici (acido polimetacrilico e polimetilmetacrilato) coniugati con acido ferulico e quercetina per la realizzazione di sistemi antiinfiammatori, antitumorali e antifungini [27,28,29].

[27] Iemma, F.; Puoci, F.; Curcio, M.; Parisi, O.I.; Cirillo, G.; Spizzirri, U.G.; Picci, N. Ferulic acid as comonomer in the synthesis of a novel polymeric chain with biological properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**; 115: 784-789.

[28] Puoci, F.; Morelli, C.; Cirillo, G.; Curcio, M.; Parisi, O.I.; Maris, P.; Sisci, D.; Picci, N. Anticancer activity of a quercetin-based polymer towards HeLa cancer cells. *Anticancer Res.* **2012**; 32: 2843-2847.

[29] Curcio, M.; Cirillo, G.; Parisi, O.I.; Iemma, F.; Spizzirri, U.G.; Altamari, I.; Puoci, F. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-quercetin Conjugate as Biomaterial in Ophthalmology: An "ab initio" Study. *J. Funct. Biomater.* **2011**; 2: 1-17.

### **1.3.2.3 Sintesi di coniugati polimero-polifenolo mediante catalisi enzimatica**

L'applicazione di enzimi nell'industria chimica, e nella chimica dei polimeri in particolare, è una delle più promettenti tecnologie della “*green chemistry*” atte a soddisfare i requisiti di eco-compatibilità dell'industria moderna.

La catalisi enzimatica è una metodica totalmente eco-compatibile che consente un risparmio significativo in termini di risorse energetiche e ambientali. I biocatalizzatori enzimatici hanno la capacità di riconoscere e legare il substrato nella corretta disposizione spaziale (regio- e enantio-selettività), grazie all'elevata selettività per specifiche funzionalità chimiche (chemoselettività) <sup>[30]</sup>.

Nella coniugazione di polifenoli a sistemi macromolecolari, gli enzimi più studiati e applicati sono quelli della classe delle ossidoreduttasi (EC1), quali *laccasi* (EC 1.10.3.2), *perossidasi* (EC 1.11.1.7) e *tirosinasi* (EC 1.14.18.1) <sup>[31]</sup>.

L'attività di ricerca ha preso in esame l'utilizzo della laccasi (p-difenolo diossigeno ossidoreduttasi), un'ossidoreduttasi che catalizza l'ossidazione mono-elettronica di vari substrati (fenoli e ammine aromatiche o alifatiche) con ottenimento dei radicali corrispondenti e la contestuale riduzione dell'ossigeno molecolare ad acqua.

Le laccasi sono state isolate nelle piante, ma sono molto diffuse in natura, in quanto presenti anche in insetti, procarioti, batteri e funghi (Ascomyceti e Deuteromiceti). Nei processi biotecnologici, l'interesse è principalmente rivolto verso le laccasi di origine fungina, per la loro facile reperibilità e perché mostrano maggiore efficienza catalitica.

Le laccasi sono glicoproteine con peso molecolare medio compreso tra 50 e 80 kDa, caratterizzate da tre siti catalitici redox (denominati T1, T2 e T3) che contengono atomi di rame responsabili della tipica colorazione blu. I siti T1 e T2 contengono rame singolo, mentre quello T3 contiene rame dimerico per un totale di quattro atomi di rame per unità (Figura 1.3.6) <sup>[32]</sup>.

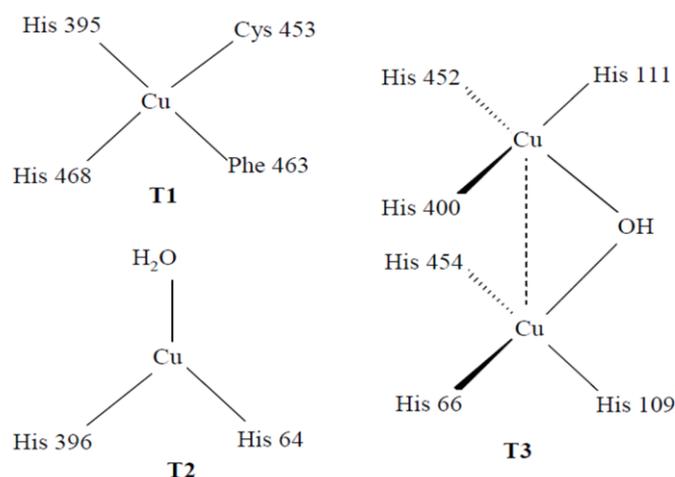
Il meccanismo di reazione prevede l'iniziale passaggio di un elettrone dal substrato ad un primo atomo di rame e poi da questo, mediante il tripeptide His-Cys-His, al cluster trinucleare che comprende gli altri atomi di rame, e infine all'O<sub>2</sub> con formazione di H<sub>2</sub>O.

---

<sup>[30]</sup> Wenda, S.; Illner, S.; Mell, A.; Kragl, U. Industrial biotechnology – The future of green chemistry? *Green Chem.* **2011**; 13: 3007-3047.

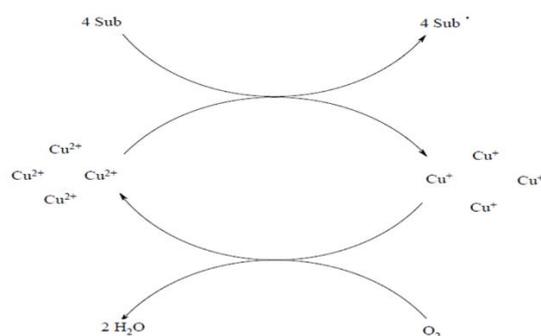
<sup>[31]</sup> Nyanhongo, G.S.; Nugroho Prasetyo, E.; Herrero Acero, E.; Guebitz, G.M. Engineering strategies for successful development of functional polymers using oxidative enzymes. *Chem. Eng. Technol.* **2012**; 35:1359-1372.

<sup>[32]</sup> Kim, S.Y.; Zille, A.; Murkovic, M.; Guebitz, G.; Cavaco-Paulo, A. Enzymatic polymerization on the surface of functionalized cellulose fibers. *Enzym. Microb. Technol.* **2007**; 40: 1782-1787.



**Figura 1.3.6** Rappresentazione del sito catalitico delle laccasi

L'enzima è in grado di ricavare un elettrone alla volta. Un intero ciclo catalitico della laccasi vede la riduzione di una molecola di ossigeno per due molecole di acqua e l'ossidazione di quattro molecole di substrato per produrre quattro radicali (Figura 1.3.7) [33].



**Figura 1.3.7** Ciclo catalitico della laccasi

Spesso i substrati di interesse non possono essere ossidati direttamente dalla laccasi, o perché sono troppo grandi per penetrare nel sito attivo dell'enzima o perché hanno un potenziale redox particolarmente elevato (il potenziale redox  $E^{\circ}$  della laccasi è tra +450 e +790 mV). Questa limitazione può essere superata utilizzando piccole molecole (mediatori redox) che formano specie altamente reattive in grado di attaccare e/o anche diffondere all'interno di molecole più complesse, anche di natura polimerica [34].

[33] Solomon, E.I.; Augustine, A.J.; Yoon, J. O<sub>2</sub> reduction to H<sub>2</sub>O by the multicopper oxidases. *Dalton Trans.* **2008**; 30: 3921-3932.

[34] Jain, S.; Rathish, I.G.; Sankaran, R. A review on current industrial trends for synthesis of medicinal compounds. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2013**; 5: 33-45.

Nel caso delle reazioni di formazione dei coniugati polimero-polifenolo catalizzate dalla laccasi, il meccanismo di reazione non è completamente noto. L'ipotesi più accreditata prevede l'iniziale ossidazione del gruppo OH fenolico a chinone<sup>[35]</sup> e il successivo attacco nucleofilo da parte dei gruppi presenti in catena laterale sul sistema macromolecolare, con formazione del coniugato<sup>[36]</sup>.

È da sottolineare tuttavia che l'utilizzo di enzimi nei processi industriali presenta alcuni svantaggi riconducibili alla mancanza di stabilità nell'ambiente di reazione e alle difficoltà registrate nel loro riutilizzo<sup>[37]</sup>. Per superare tali limitazioni si ricorre alla cosiddetta *immobilizzazione* dell'enzima all'interno di determinate regioni di una matrice insolubile. Ciò permette all'enzima di mantenere la sua attività catalitica, di avere maggiore stabilità in caso di variazioni di pH e temperatura, e nello stesso tempo di poter essere allontanato dalla miscela di reazione favorendo il recupero dei prodotti e il suo riutilizzo in continuo<sup>[38]</sup>.

Fondamentale è la scelta del supporto da utilizzare per l'immobilizzazione, che deve possedere caratteristiche di inerzia chimica, resistenza meccanica e microbica. Le caratteristiche morfologiche e fisiche del supporto influenzano il processo di immobilizzazione e l'attività catalitica, per cui la scelta dipende sia dal tipo di enzima utilizzato che dalle condizioni di reazione. Diversi sono i metodi di immobilizzazione, distinguibili in due classi generali, metodi fisici e metodi chimici. Nel primo caso si instaurano interazioni deboli tra l'enzima e il supporto, nel secondo si ha invece la formazione di legami covalenti<sup>[39]</sup>.

Le principali tecniche di immobilizzazione enzimatica sono l'adsorbimento, il cross-linking, il legame covalente e l'intrappolamento<sup>[40]</sup>.

L'*adsorbimento fisico* è una tecnica reversibile in cui l'enzima è fisicamente adsorbito o attaccato alla superficie del supporto tramite legami deboli come legami a idrogeno, interazioni idrofobiche o forze di van der Waals. La reversibilità permette la rimozione dell'enzima al cessare della sua attività catalitica e il caricamento del supporto con enzima fresco. La presenza di legami deboli rende tuttavia possibile un distacco dell'enzima dalla matrice durante la catalisi.

---

<sup>[35]</sup> Madhavi, V.; Lele, S.S. Laccase: Properties and Applications. *Bioresources* **2009**; 4: 1694-1717.

<sup>[36]</sup> Silva, C.; Matamá, T.; Kim, S.; Padrão, J.; Nugroho Prasetyo, E.; Kudanga, T.; Nyanhongo, G.S.; Guebitz, G.M.; Casal, M.; Cavaco-Paulo, A. Antimicrobial and antioxidant linen via laccase-assisted grafting. *React. Funct. Polym.* **2011**; 71: 713-720.

<sup>[37]</sup> Singh, R.K.; Tiwari, M.K.; Singh, R. From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**; 14: 1232-1277.

<sup>[38]</sup> Miletic, N.; Nastasovic, A.; Loos, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technol.* **2012**; 115: 126-135.

<sup>[39]</sup> Homaei, A.A.; Sariri, R.; Vianello, F.; Stevanato, R. Enzyme immobilization: an update. *J. Chem. Biol.* **2013**; 6: 185-205.

<sup>[40]</sup> Sheldon, R.A.; Van Pelt, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.* **2013**; 42: 6223-6235.

Il **cross-linking** è un metodo di immobilizzazione enzimatica irreversibile che non prevede l'utilizzo di alcun supporto e che si basa sull'instaurarsi di legami intermolecolari tra più molecole di enzima tramite l'uso di reagenti bi- o multifunzionali. Il reagente di reticolazione generalmente utilizzato è la gluteraldeide.

L'**intrappolamento** è una tecnica irreversibile in cui l'enzima è intrappolato all'interno di un supporto o nella struttura reticolata di un materiale polimerico dalla quale è consentito il passaggio del substrato e dei prodotti ma non quello dell'enzima.

L'immobilizzazione mediante **legame covalente** prevede la formazione di legami tra il supporto e i residui di lisina, cisteina, acido aspartico e glutammico in catena laterale dell'enzima. Il legame covalente può avvenire mediante reazioni di condensazione sfruttando la chimica dei gruppi carbonilici o carbossilici, oppure attraverso reazioni di tipo radicalico in cui, sotto azione di un opportuno iniziatore (quale ad esempio il persolfato di sodio), macroradicali formati sugli eteroatomi presenti in catena laterale della struttura enzimatica si innestano in reticoli polimerici in crescita con formazione di una membrana polimerica ad attività catalitica <sup>[41]</sup>.

---

<sup>[41]</sup> Cirillo, G.; Nicoletta, F.P.; Curcio, M., Spizzirri, U.G.; Picci, N.; Iemma, F. Enzyme immobilization on smart polymers: Catalysis on demand. *React. Funct. Polym.* **2014**; 83: 62-69.

## 1.4 Nanostrutture al carbonio

### 1.4.1 Nanostrutture al carbonio in campo tecnologico farmaceutico

Le nanostrutture di carbonio (CN) sono nanomateriali costituiti da atomi di carbonio  $sp^2$  con diverse disposizioni spaziali. Si distinguono principalmente in fullereni (F, 0D), nanotubi di carbonio (CNT, 1D) e grafene (G, 2D) <sup>[1]</sup>.

- Il grafene <sup>[2]</sup> è un reticolo piatto a nido d'ape composto da un singolo strato di atomi di carbonio con ibridazione  $sp^2$  organizzati in strutture esagonali.
- I fullereni <sup>[3]</sup> sono fogli di grafene disposti in strutture cave sferiche o ellissoidi, in cui gli atomi di carbonio formano anelli esagonali o pentagonali. Sono state trovate varie forme di fullereni, tra cui  $C_{60}$ ,  $C_{70}$ ,  $C_{76}$ ,  $C_{80}$ ,  $C_{84}$ , con dimensioni che vanno da 30 a 3000 atomi di carbonio. Il fullerene più stabile è il  $C_{60}$ , che è composto da 12 anelli di atomi di carbonio pentagonali e 20 esagonali.
- I nanotubi <sup>[4]</sup> possono essere immaginati come foglietti di grafite arrotolati su loro stessi a formare strutture cilindriche caratterizzate da un diametro  $<100$  nm, una lunghezza nell'ordine dei micrometri e con le estremità chiuse con delle strutture simili a semi-fullereni.
- Altre classi peculiari di CN includono strutture di grafene quasi sferiche (Quantum dots di grafene – GQD <sup>[5]</sup>), strisce allungate di grafene (nanoribbons <sup>[6]</sup>), fogli di grafene arrotolati con una punta chiusa a forma di corno (nanohorns <sup>[7]</sup>).

Le nanostrutture di carbonio hanno suscitato grande interesse nella comunità scientifica per una varietà di applicazioni in campo fisico, chimico, nella scienza dei materiali, in ingegneria, in elettronica, in biologia e in medicina, in virtù delle loro peculiari proprietà, quali l'elevata stabilità, la conducibilità elettrica, la possibilità di essere variamente funzionalizzate, l'assorbimento di

---

<sup>[1]</sup> Hong, G.; Diao, S.; Antaris, A.L.; Dai, H. Carbon Nanomaterials for Biological Imaging and Nanomedicinal Therapy. *Chem. Rev.* **2015**; 115: 10816-10906.

<sup>[2]</sup> Wang, Y.; Li, Z.H.; Wang, J.; Li, J.H.; Lin, Y.H. Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology. *Trends Biotechnol.* **2011**; 29: 205-212.

<sup>[3]</sup> Bakry, R.; Vallant, R.M.; Najam-Ul-Haq, M.; Rainer, M.; Szabo, Z.; Huck, C.W.; Bonn, G.K. Medicinal applications of fullerenes. *Int. J. Nanomed.* **2007**; 2: 639-649.

<sup>[4]</sup> Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M. Chemistry of carbon nanotubes. *Chem. Rev.* **2006**; 106: 1105-1136.

<sup>[5]</sup> Nasrollahi, F.; Koh, Y.R.; Chen, P.; Varshosaz, J.; Khodadadi, A.A.; Lim, S. Targeting graphene quantum dots to epidermal growth factor receptor for delivery of cisplatin and cellular imaging. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**; 94: 247-257.

<sup>[6]</sup> Mullick Chowdhury, S.; Lalwani, G.; Zhang, K.; Yang, J.Y.; Neville, K.; Sitharaman, B. Cell specific cytotoxicity and uptake of graphene nanoribbons. *Biomaterials* **2013**; 34: 283-293.

<sup>[7]</sup> Chechetka, S.A.; Zhang, M.; Yudasaka, M.; Miyako, E. Physicochemically functionalized carbon nanohorns for multi-dimensional cancer elimination. *Carbon* **2016**; 97: 45-53.

radiazioni nella regione dell'infrarosso (IR) o del vicino infrarosso (NIR), la capacità di penetrare facilmente nelle membrane cellulari [8].

In campo biomedico, le nanostrutture di carbonio, CNT e GO in particolare, rappresentano strumenti preziosi per la diagnostica per immagini, nonché per la progettazione di sistemi di trasporto di farmaci altamente specializzati [9]. La loro elevata affinità per le molecole organiche (indipendentemente dal peso molecolare) conferisce un'elevata capacità di caricamento, consentendo la stabilizzazione dei principi attivi e il miglioramento dei profili farmacocinetici, con un aumento dell'assorbimento a livello cellulare [10,11]. Inoltre, in combinazione con materiali appropriati, le nanostrutture al carbonio sono in grado di modulare il rilascio di un agente terapeutico in risposta all'applicazione di stimoli esterni come campi magnetici ed elettrici, o conseguentemente ad una variazione di parametri ambientali come pH e temperatura [12].

Nel caso del trattamento di patologie tumorali, derivati di CNT e GO permettono di aumentare l'efficienza dei convenzionali agenti citotossici. Tali derivati infatti presentano molteplici peculiarità, riassunte come segue [13]:

- Possiedono un'elevata capacità di caricamento
- Proteggono il farmaco caricato dalla degradazione enzimatica
- Raggiungono facilmente il tessuto tumorale grazie all'effetto EPR
- Possono essere modificati in superficie mediante l'aggiunta di unità target
- Rendono possibile la combinazione di chemioterapia e terapia fototermica in virtù della loro capacità di assorbimento delle radiazioni NIR (700–1400 nm)
- Rendono possibile la combinazione di chemio- e radio- terapia quando funzionalizzati con opportuni agenti radiosensibilizzanti come nanoparticelle metalliche
- Contribuiscono alla ri-sensibilizzazione delle cellule tumorali resistenti mediante inibizione diretta delle pompe di efflusso, aumento della concentrazione plasmatica degli agenti citotossici e danneggiamento delle membrane cellulari e degli organelli citoplasmatici.

---

[8] Singh, V.; Joung, D.; Zhai, L.; Das, S.; Khondaker, S.I.; Seal, S. Graphene based materials: Past, present and future. *Prog. Mater. Sci.* **2011**; 56: 1178-1271.

[9] Bartelmess, J.; Quinn, S.J.; Giordani, S. Carbon nanomaterials: multi-functional agents for biomedical fluorescence and Raman imaging. *Chem. Soc. Rev.* **2015**; 44: 4672-4698.

[10] Yang, K.; Feng, L.Z.; Hong, H.; Cai, W.B.; Liu, Z. Preparation and functionalization of graphene nanocomposites for biomedical applications. *Nat. Protoc.* **2013**; 8: 2392-2403.

[11] Lacerda, L.; Bianco, A.; Prato, M.; Kostarelos, K. Carbon nanotubes as nanomedicines: From toxicology to pharmacology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**; 58: 1460-1470.

[12] Goenka, S.; Sant, V.; Sant, S. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *J. Control. Release* **2014**; 173: 75-88.

[13] Bianco, A.; Kostarelos, K.; Prato, M. Opportunities and challenges of carbon-based nanomaterials for cancer therapy. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**; 5: 331-342.

CNT e GO sono anche utili strumenti per aumentare la conducibilità elettrica di idrogel utilizzati per il trattamento di lesioni cutanee [14].

Tuttavia l'utilizzo delle nanostrutture al carbonio in campo biomedico ha evidenziato la necessità di una loro preliminare funzionalizzazione, poiché nella loro forma nativa presentano gravi effetti tossici dovuti alla mancanza di solubilità in ambiente fisiologico. La tossicità delle CN deriva principalmente dall'interferenza con l'integrità e le funzionalità della membrana cellulare, dal danneggiamento di DNA e RNA, nonché dall'induzione di stress ossidativo, risposta infiammatoria, apoptosi, autofagia e necrosi. In dettaglio, le diverse CN mostrano specifici profili di tossicità, relativi alle loro peculiari caratteristiche morfologiche e di forma, che influenzano la risposta cellulare e che sono responsabili quindi dei potenziali effetti collaterali indesiderati [15].

Secondo l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS), i problemi di tossicità dei CNT sono da ricondursi alla loro struttura fibrosa e alla somiglianza che essi mostrano con le fibre di amianto [16]. Dati scientifici hanno dimostrato che l'iniezione intra-addominale di MWCNT di lunghezza elevata determina infiammazione cronica della parete addominale con formazione di mesotelioma [17]. Al contrario, non è stata rilevata alcuna infiammazione nel caso di MWCNT di lunghezza ridotta; essi vengono completamente fagocitati da parte dei macrofagi, sebbene i fagociti attivati possano provocare la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e quindi un danno tardivo al DNA [18].

Una minima genotossicità è stata registrata in seguito all'esposizione a basse dosi di fullereni come conseguenza dell'effetto fotosensibilizzante indotto dalla generazione di ROS, mentre ad alti dosaggi si verifica induzione della sintesi di ossido nitrico e flogosi [19].

---

[14] Cirillo, G.; Curcio, M.; Spizzirri, U.G.; Vittorio, O.; Tucci, P.; Picci, N.; Iemma, F.; Hampel, S.; Nicoletta, F.P. Carbon nanotubes hybrid hydrogels for electrically tunable release of Curcumin. *Eur. Polym. J.* **2017**; 90: 1-12.

[15] Samadian, H.; Salami, M.S.; Jaymand, M.; Azarnezhad, A.; Najafi, M.; Barabadi, H.; Ahmadi, A. Genotoxicity assessment of carbon-based nanomaterials; Have their unique physicochemical properties made them double-edged swords? *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **2020**; 783.

[16] Aschberger, K.; Johnston, H.J.; Stone, V.; Aitken, R.J.; Hankin, S.M.; Peters, S.A.; Tran, C.L.; Christensen, F.M. Review of carbon nanotubes toxicity and exposure-appraisal of human health risk assessment based on open literature. *Crit. Rev. Toxicol.* **2010**; 40:759-790.

[17] Poland, C.A.; Duffin, R.; Kinloch, I.; Maynard, A.; Wallace, W.A.H.; Seaton, A.; Stone, V.; Brown, S.; MacNee, W.; Donaldson, K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature Nanotechnol.* **2008**; 3: 423-428.

[18] Van Berlo, D.; Clift, M.; Albrecht, C.; Schins, R. Carbon nanotubes: An insight into the mechanisms of their potential genotoxicity. *Swiss Medical Weekly* **2012**: 142.

[19] Fiorito, S., Serafino, A., Andreola, F., Togna, A., Togna, G. Toxicity and biocompatibility of carbon nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**; 6: 591-599.

L'elevata rigidità del grafene non modificato può indurre una fagocitosi incompleta e quindi infiammazione e generazione di ROS, sebbene non sia del tutto chiarito se i ROS provengano dalla sua superficie o siano formati da reazioni cellulari che coinvolgono mitocondri e leucociti [20].

Sono stati proposti diversi approcci per migliorare l'affinità delle CN per il mezzo acquoso al fine di renderli biocompatibili attraverso la modifica delle loro proprietà superficiali. Le metodiche di funzionalizzazione possono essere suddivise in due categorie principali [21,22]:

- Il legame covalente con opportuni agenti derivatizzanti con modificazione nell'ibridazione degli atomi di carbonio nel sito di reazione da  $sp^2$  a  $sp^3$ .
- L'adsorbimento/avvolgimento non covalente di molecole funzionali tramite interazioni idrofobiche, elettrostatiche e di Van der Waals, senza alcun cambiamento chimico nei modelli elettronici della superficie.

Le diverse strategie per la funzionalizzazione covalente del CN, che coinvolgono la reattività tipica degli atomi di carbonio  $sp^2$  presenti sulla loro superficie, sono riassunte nella Tabella 1.4.1 [23].

**Tabella 1.4.1** Principali funzionalizzazioni covalenti delle nanostrutture al carbonio

N.	Tipo	Reazione	Agente derivatizzante
1	Alogenazione		$F_2$
2	Idrogenazione		$H_2$
3	Ossidazione		a) $HNO_3/H_2SO_4$
			b) $H_2O_2$
			c) $O_3$
4	Addizione Nucleofila		$Nu^-$
5	Coupling Radicalico		a) $R-Ar-N_2^+$
			b) $R-Ar-NH_2$
6	Addizione Elettrofila		$RCOX$
			a) $R_2C:$
			b) $N_3-COOR$
7	Cicloadizione		c) $R-NHCH_2COOH/(CH_2O)_n$
			d) $EtOOCCH_2COEt$
			e) $R-C=N-NH-Ar$
			f) $-C=CR-CR=C-$

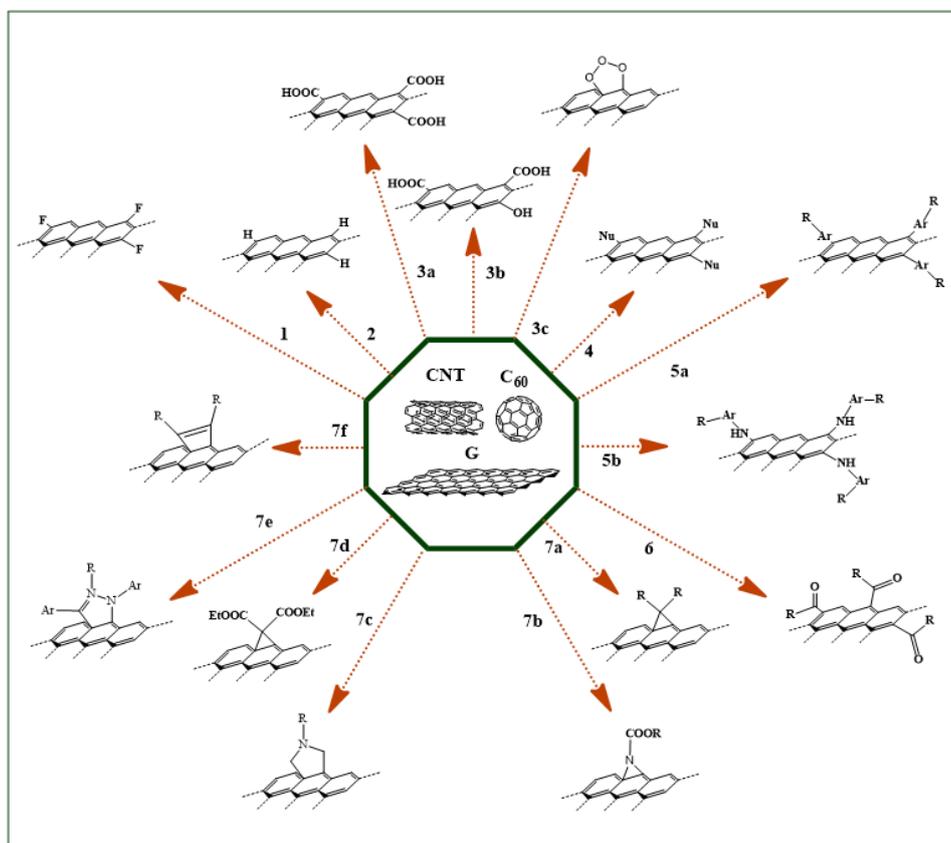
[20] Sasidharan, A.; Panchakarla, L.S.; Chandran, P.; Menon, D.; Nair, S.; Rao, C.N.R.; Koyakutty, M. Differential nano-bio interactions and toxicity effects of pristine versus functionalized graphene. *Nanoscale* **2011**; 3: 2461-2464.

[21] Wu, H.C.; Chang, X.L.; Liu, L.; Zhao, F.; Zhao, Y.L. Chemistry of carbon nanotubes in biomedical applications. *J. Mater. Chem.* **2010**; 20: 1036-1052.

[22] Wang, X.L.; Shi, G.Q. An introduction to the chemistry of graphene. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**; 17: 28484-28504.

[23] Curcio, M.; Farfalla, A.; Saletta, F.; Valli, E.; Pantuso, E.; Nicoletta, F.P.; Iemma, F.; Vittorio, O.; Cirillo, G. Functionalized carbon nanostructures versus drug resistance: Promising scenarios in cancer treatment *Molecules* **2020**; 25: 25092102

Ciascun approccio presenta caratteristiche peculiari in termini di compatibilità chimica, condizioni di reazione e grado di derivatizzazione, che possono essere finemente regolate in base alle specifiche esigenze applicative. In tutti i casi si ottengono specie intermedie con elevata versatilità chimica, che possono subire ulteriori processi di derivatizzazione per l'ottenimento di materiali multifunzionali (Figura 1.4.1).



**Figura 1.4.1** Rappresentazione schematica delle principali funzionalizzazioni covalenti delle nanostrutture al carbonio

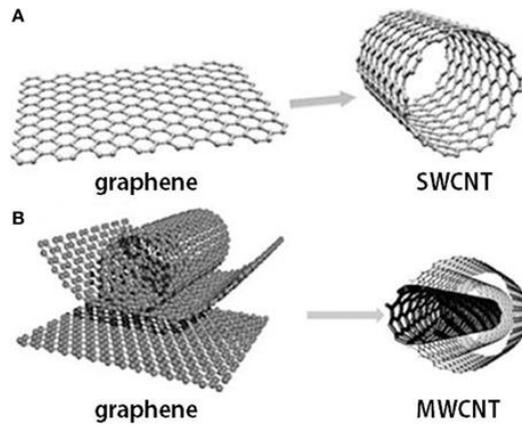
## 1.4.2 Nanotubi di Carbonio

I nanotubi di carbonio sono stati scoperti casualmente nel 1991 da Iijima, osservando la formazione di filamenti di dimensioni nanometriche in un residuo di fuliggine originato dalla vaporizzazione di grafite usata per la produzione di fullereni [24].

La maggior parte dei nanotubi consiste in diversi cilindri concentrici indicati come nanotubi a parete multipla (*multi walled nanotubes*, MWNT), ma esistono anche nanotubi formati da un singolo strato (*single walled nanotubes*, SWNT) (Figura 1.4.2) [25].

[24] Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**; 354: 56-58.

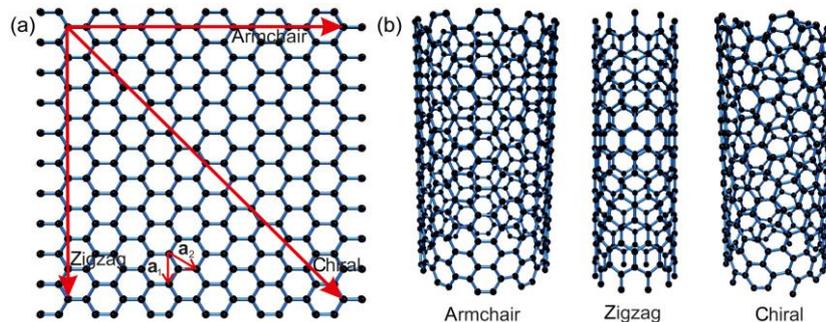
[25] Rao, C.N.R.; Satishkumar, B.C.; Govindaraj, A.; Nath, M. Nanotubes. *ChemPhysChem* 2001; 2: 78-105.



**Figura 1.4.2** Rappresentazione schematica della formazione di SWCNT e MWCNT

I SWCNT hanno diametri compresi tra 0.7 e 10 nm e lunghezze variabili da pochi nm ad alcuni  $\mu\text{m}$ , mentre i MWCNT hanno diametri maggiori dell'ordine di 2.5-100 nm con una separazione tra i diversi foglietti pari a circa 0.34 nm <sup>[26]</sup>.

A seconda del vettore chirale  $(n,m)$  e dall'angolo di arrotolamento  $\theta$ , cioè della direzione di arrotolamento del grafene in rapporto all'asse del tubo, si distinguono tre tipi di CNT, definiti a poltrona (*Armchair*), chirali (*Chiral*) e Zigzag (Figura 1.4.3) <sup>[27]</sup>.



**Figura 1.4.3** Rappresentazione della chiralità dei CNT

Si hanno CNT del tipo a poltrona quando  $n = m \neq 0$  e  $\theta = 30^\circ$ ; del tipo a zigzag quando  $n \neq 0, m = 0$  e  $\theta = 0^\circ$ ; del tipo chirale quando  $0 < \theta < 30^\circ$ .

La direzione di arrotolamento influenza notevolmente le proprietà dei CNT, e in particolar modo la loro conducibilità elettrica. Le proprietà principali dei CNT sono riassumibili con: elevata conducibilità elettrica ( $10^9 \text{ A} \times \text{cm}^2$ ), elevata stabilità termica (fino a 2800 °C nel vuoto), elevata

<sup>[26]</sup> Cirillo, G.; Hampel, S.; Klingeler, R.; Puoci, F.; Iemma, F.; Curcio, M.; Parisi, O.I.; Spizzirri, U.G.; Picci, N.; Leonhardt, A.; Ritschel, M.; Büchner, B. Antioxidant multi-walled carbon nanotubes by free radical grafting of gallic acid: New materials for biomedical applications. *J. Pharm. Pharmacol.* **2011**; 63: 179-188.

<sup>[27]</sup> Bocko, J.; Lengvarský, P.; Huňady, R.; Juraj Šarloš, J. The computation of bending eigenfrequencies of single-walled carbon nanotubes based on the nonlocal theory. *Mech. Sci.* **2018**; 9: 349-358.

conducibilità termica ( $6000 \text{ W} \times \text{m} \times \text{K}$ ), elevata resistenza meccanica ( $45 \cdot 10^9 \text{ Pa}$ ) e bassa densità ( $1.3 \text{ g cm}^{-3}$ ) [28].

#### **1.4.2.1 Sintesi dei nanotubi di carbonio**

I metodi di sintesi dei CNT possono essere riassunti in tre categorie: arco voltaico (*Arc Discharge*), vaporizzazione laser (*Laser Vaporization*) e deposizione di vapore chimico (*Chemical Vapour Deposition*) [29].

L'*Arc Discharge* [30] è il primo metodo con cui sono stati sintetizzati i CNT. Consiste nel porre in una camera stagna a bassa pressione (500 Torr) in atmosfera di elio, due pezzi di grafite contenenti nichel e ittrio in bassa percentuale, alla distanza di pochi millimetri uno dall'altro. Si fa quindi passare corrente (100 ampere) fra di essi. L'energia è sufficiente per vaporizzare l'anodo e il gas di carbonio che si forma si ricondensa formando nanotubi con una percentuale che può arrivare fino al 30% del peso del materiale. Con questo metodo si ottengono nanotubi di lunghezza ridotta (50  $\mu\text{m}$  o meno).

La *Laser Vaporization* [31] è la tecnica che permette di ottenere CNT con il maggiore grado di purezza. Il metodo prevede la vaporizzazione di un bersaglio di grafite tramite intensi impulsi laser. Usando opportuni accorgimenti è possibile ottenere materiale condensato, alla velocità di quasi mezzo grammo l'ora, contenente fino al 70% CNT, quasi tutti completamente identici tra loro.

La *Chemical Vapor Deposition* [32] è la tecnica più semplice e che ben si adatta ad una produzione su scala laboratoristica, anche se, tra le metodiche citate, è il processo che richiede tempi di reazione più lunghi. Il metodo prevede l'inserimento di una fonte di carbonio (in genere un idrocarburo) in una muffola ad elevata temperatura ( $> 600^\circ\text{C}$ ) in presenza di un catalizzatore che promuove la decomposizione del substrato con formazione dei CNT. La percentuale di resa varia in funzione del substrato, anche se adeguati accorgimenti sperimentali consentono di ottenere rese prossime al 100%. I CNT ottenuti presentano tuttavia impurezze, quali carbone amorfo e residui di catalizzatore, che vanno allontanate in una successiva fase di purificazione.

---

[28] Wang, Y.; Weng, G.J. Electrical conductivity of carbon nanotube and graphene-based nanocomposites. In: Meguid, S.; Weng G. (eds). *Micromechanics and Nanomechanics of Composite Solids*. **2018**; 123-156. Springer, Cham, Switzerland.

[29] Gupta, N.; Gupta, S.M.; Sharma, S.K. Carbon nanotubes: synthesis, properties and engineering applications. *Carbon Lett.* **2019**; 29: 419-447.

[30] Arora, N.; Sharma, N.N. Arc discharge synthesis of carbon nanotubes: Comprehensive review. *Diamond Rel. Mater.* **2014**; 50: 135-150.

[31] Kohno, M.; Kawahara, T.; Tomoda, M.; Takata, Y.; Inoue, S.; Suzuki, S.; Maruyama, S. Synthesis of single-walled carbon nanotubes using laser-vaporized metal nanoparticle catalyst. *J. Mech. Sci. Technol.* **2011**; 25: 11-15.

[32] Shah, K.A.; Tali, B.A. Synthesis of carbon nanotubes by catalytic chemical vapour deposition: A review on carbon sources, catalysts and substrates. *Mater. Sci. Semicond. Process.* **2016**; 41: 67-82.

#### **1.4.2.2 Funzionalizzazione dei CNT per applicazioni biomediche**

Come riportato in precedenza, la tossicità intrinseca dei CNT rende necessaria una loro preliminare funzionalizzazione di tipo covalente o non covalente.

La realizzazione di sistemi basati su CNT proposti per applicazioni biomediche, e per il trattamento delle cellule tumorali in particolare, si basa principalmente su reazioni di condensazione su CNT ossidato (oxCNT) mediante trattamento con acidi inorganici o ossigeno molecolare [33]. A seconda delle condizioni di reazione e del tempo di esposizione all'agente ossidante, si ha l'introduzione di funzionalità ricche di ossigeno (ad esempio gruppi idrossilici e carbossilici) sulla superficie dei CNT, con un aumento della solubilità in acqua fino a 2 mg mL<sup>-1</sup> [34]. Va comunque sottolineato che, sebbene le dispersioni acquose di CNT formino sospensioni colloidali piuttosto che vere soluzioni in senso molecolare, il termine soluzione è ampiamente accettato quando si descrivono tali dispersioni [35]. La reazione di ossidazione parte dai carboni presenti alle estremità dei CNT che mostrano una maggiore reattività a causa della maggiore tensione di anello, sebbene siti reattivi si trovino anche sulle pareti del tubo cilindrico per la presenza di cicli a 5 o 7 atomi invece dei canonici cicli a 6 [36].

L'ossidazione a carico delle pareti porta tuttavia alla formazione di pori con conseguente riduzione delle proprietà tipiche dei CNT. Per evitare la formazione di tali difetti, Prato e collaboratori hanno sviluppato una reazione di cicloadizione [1,3] di ilidi generate in situ dalla condensazione termica di aldeidi e  $\alpha$ -amminoacidi [37]. La possibilità di variare le funzionalità chimiche delle catene laterali degli anelli pirrolidinici formati sulla superficie dei CNT consente di modulare finemente le proprietà del prodotto finale. I vantaggi di questo approccio sono: il simultaneo miglioramento dell'affinità per l'acqua delle CNT, la rimozione delle nanoparticelle metalliche e delle impurità di carbonio amorfo, nonché la possibilità di rimuovere termicamente i gruppi funzionali introdotti ripristinando la struttura originale dei CNT [38].

Un'altra reazione chiave di funzionalizzazione del CNT è la fluorurazione, definita come la rottura degli strati  $\pi$  coniugati sulla superficie del CNT con la formazione di legami C-F. Le tecniche per la fluorurazione consistono principalmente nell'uso di miscele di gas fluoro in condizioni di temperatura

---

[33] Pastorin, G. Crucial Functionalizations of Carbon Nanotubes for Improved Drug Delivery: A Valuable Option? *Pharm. Res.* **2009**; 26, 746-769.

[34] Datsyuk, V.; Kalyva, M.; Papagelis, K.; Parthenios, J.; Tasis, D.; Siokou, A.; Kallitsis, I.; Galiotis, C. Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. *Carbon* **2008**; 46: 833-840.

[35] Jiang, L.Q.; Gao, L.; Sun, J. Production of aqueous colloidal dispersions of carbon nanotubes. *J. Colloid Interf. Sci.* **2003**; 260: 89-94.

[36] Rosca, I.D.; Watari, F.; Uo, M.; Akaska, T. Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid. *Carbon* **2005**; 43: 3124-3131

[37] Tagmatarchis, N.; Prato, M. Functionalization of carbon nanotubes via 1,3-dipolar cycloadditions. *J. Mater. Chem.* **2004**; 14: 437-439.

[38] Quintana, M.; Grzelczak, M.; Prato, M. Organic functionalization of carbon nanostructures via 1,3-dipolar cycloadditions. *Phys. Status Solidi B Basic Res.* **2010**; 247: 2645-2648.

e pressione adeguate o plasma di gas contenente fluoro sotto vuoto. I materiali ottenuti possiedono una maggiore solubilità in solventi polari (es. 1.0 mg mL<sup>-1</sup> in alcool) e sono adatti per ulteriori processi di derivatizzazione mediante reazioni di addizione nucleofila [39].

Tra le diverse strategie per le modifiche superficiali di CNT, la combinazione con materiali polimerici rappresenta l'approccio principale che ne consente il loro utilizzo in biomedicina [40]. La combinazione tra i due sistemi potenzia notevolmente le prestazioni dei nanoibridi di carbonio così ottenuti, che possiedono una maggiore biocompatibilità (propria dei sistemi polimerici) senza che ne venga compromessa la capacità di attraversare le membrane cellulari tipica dei CNT [41]. Anche la sintesi dei nanoibridi può avvenire mediante approcci covalenti o non covalenti. L'approccio non covalente, che coinvolge interazioni idrofobiche, elettrostatiche e Van der Waals tra le controparti polimeriche e CNT, presenta lo svantaggio dovuto al numero limitato di polimeri utilizzabili sebbene possieda il vantaggio di non alterare né la struttura né le proprietà del CNT [42].

Gli approcci covalenti, nonostante danneggino la struttura tubolare sp<sup>2</sup>, permettono una maggiore modulazione delle proprietà dei materiali ibridi risultanti in virtù dell'ampia gamma di materiali disponibili. L'approccio covalente si differenzia in “*grafting to*” e “*grafting from*” a seconda che la reazione preveda il legame di un polimero preformato o la formazione del materiale polimerico *in situ* [43]. La chimica alla base del *grafting to* consiste principalmente in una reazione preliminare di ossidazione o 1,3-cicloaddizione per l'inserimento di funzionalità –COOH, –NH<sub>2</sub>, –OH, –SH che agiscono come punti di ancoraggio per i materiali polimerici mediante reazioni di esterificazione, ammidazione, bromurazione o Diels-Alder [44]. Nel *grafting from*, il sistema π della superficie CNT è direttamente coinvolto nella reazione di polimerizzazione in quanto presenta l'iniziatore di polimerizzazione (radicalica, ionica o cationica) covalentemente legato su di essa [45].

Recentemente il nostro gruppo di ricerca ha sviluppato una metodica di funzionalizzazione della superficie dei CNT con un approccio *grafting from* parzialmente modificato che non prevede il

---

[39] Okotrub, A.V.; Maksimova, N.; Duda, T.A.; Kudashov, A.G.; Shubin, Y.V.; Su, D.S.; Pazhetnov, E.M.; Boronin, A.I.; Bulusheva, L.G. Fluorination of CN<sub>x</sub> nanotubes. *Fuller. Nanotub. Car. N* **2004**; 12: 99-104.

[40] Spitalsky, Z.; Tasis, D.; Papagelis, K.; Galiotis, C. Carbon nanotube-polymer composites: Chemistry, processing, mechanical and electrical properties. *Progr. Polym. Sci.* **2010**; 35: 357-401.

[41] Cirillo, G.; Vittorio, O.; Hampel, S.; Spizzirri, U.G.; Picci, N.; Iemma, F. Incorporation of carbon nanotubes into a gelatin-catechin conjugate: Innovative approach for the preparation of anticancer materials. *Int. J. Pharm.* **2013**; 446: 176-182.

[42] Spizzirri, U.G.; Curcio, M.; Cirillo, G.; Spataro, T.; Vittorio, O.; Picci, N.; Hampel, S.; Iemma, F.; Nicoletta, F.P. Recent advances in the synthesis and biomedical applications of nanocomposite hydrogels. *Pharmaceutics* **2015**; 7: 413-437.

[43] Qin, S.; Qin, D.; Ford, W.T.; Resasco, D.E.; Herrera, J.E. Functionalization of single-walled carbon nanotubes with polystyrene via grafting to and grafting from methods. *Macromolecules* **2004**; 37: 752-757.

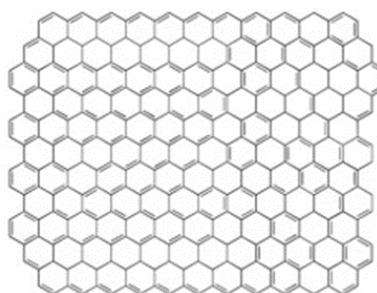
[44] Moniruzzaman, M.; Winey, K.I. Polymer nanocomposites containing carbon nanotubes. *Macromolecules* **2006**; 39: 5194-5205.

[45] Sahoo, N.G.; Rana, S.; Cho, J.W.; Li, L.; Chan, S.H. Polymer nanocomposites based on functionalized carbon nanotubes. *Progr. Polym. Sci.* **2010**; 35: 837-867.

preliminare ancoraggio dell'iniziatore di polimerizzazione sulla superficie dei CNT. In questo modo è possibile realizzare un processo a singolo stadio, in cui i CNT si innestano direttamente sulla catena polimerica in crescita <sup>[46]</sup>.

### 1.4.3 Grafene

Il grafene è uno strato monoatomico di atomi di carbonio ibridizzati  $sp^2$  organizzati secondo una struttura cristallina a celle esagonali (Figura 1.4.4) <sup>[47]</sup>.



**Figura 1.4.4** Rappresentazione della struttura di un singolo strato di grafene

Tale struttura può essere vista come una macromolecola aromatica planare che offre un'eccellente capacità di immobilizzare un gran numero di sostanze, inclusi metalli, farmaci, biomolecole, marker fluorescenti e cellule <sup>[48]</sup>.

L'intensa attività di ricerca sul grafene e suoi derivati per applicazioni in campo biomedico risiede nelle loro peculiari proprietà, come ad esempio l'elevata area superficiale, la conducibilità elettrica ( $200.000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), la conducibilità termica ( $500 \text{ W/m/K}$ ), e la resistenza meccanica (modulo di Young  $1100 \text{ GPa}$ ) <sup>[49]</sup>.

La preparazione del grafene può avvenire tramite molteplici tecniche, quali ad esempio la deposizione di vapori chimici, l'esfoliazione micromeccanica della grafite e la riduzione dell'ossido di grafite esfoliato <sup>[50]</sup>. Tra queste, la metodologia ritenuta più promettente risulta essere la riduzione

<sup>[46]</sup> Cirillo, G.; Caruso, T.; Hampel, S.; Haase, D.; Puoci, F.; Ritschel, M.; Leonhardt, A.; Curcio, M.; Iemma, F.; Khavrus, V.; Grobosch, M.; Picci, N. Novel carbon nanotube composites by grafting reaction with water-compatible redox initiator system. *Colloid Polym. Sci.* **2013**; 291: 699-708.

<sup>[47]</sup> Wang, Y.; Wang, C. Self-assembly of graphene sheets actuated by surface topological defects: Toward the fabrication of novel nanostructures and drug delivery devices. *Appl. Surf. Sci.* **2020**; 505: 144008

<sup>[48]</sup> Bekiari, V.; Karakassides, A.; Georgitsopoulou, S.; Kouloumpis, A.; Gournis, D.; Georgakilas, V. Self-assembly of one-side-functionalized graphene nanosheets in bilayered superstructures for drug delivery. *J. Mater. Sci.* **2018**; 53: 11167-11175

<sup>[49]</sup> Castro Neto, A.H.; Guinea, F.; Peres, N.M.R.; Novoselov, K.S.; Geim, A.K. The electronic properties of graphene. *Rev. Mod. Phys.* **2009**; 81: 109-162.

<sup>[50]</sup> Bhuyan, M.S.A.; Uddin, M.N.; Islam, M.M.; Bipasha, F.A.; Hossain, S.S. Synthesis of graphene. *Int. Nano Lett.* **2016**; 6: 65-83.

chimica dell'ossido di grafite esfoliato, soprattutto per il basso costo che ne rende possibile una produzione su larga scala. La tecnica prevede diverse fasi che consistono nell'ossidazione della grafite, nella sospensione/dispersione dei fogli di grafite ossidata e infine nella riduzione dell'ossido di grafite a grafene [51].

#### **1.4.3.1 Funzionalizzazione del grafene per applicazioni biomediche**

Analogamente a quanto avviene nel caso dei CNT, l'ossidazione del grafene (con ottenimento dell'ossido di grafene – GO) rappresenta la principale metodica di modificazione chimica del grafene [52].

Il GO è ottenuto per esfoliazione della grafite mediante diverse metodiche che prevedono l'utilizzo di forti agenti ossidanti. Il metodo Hummers, quello più utilizzato, è basato sul trattamento con una miscela di  $\text{KMnO}_4$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [53].

Da un punto di vista chimico il grafene ossido risulta essere simile all'ossido di grafite, mentre a livello strutturale presentano delle differenze significative: l'ossido di grafite è costituito da pile di strati; il grafene ossido è rappresentato solo da uno o pochi strati.

Diversi processi termici e meccanici sono utilizzati per esfoliare l'ossido di grafite e ottenere l'ossido di grafene, ma gli approcci più comuni sono rappresentati dalla sonicazione e/o agitazione dell'ossido di grafite in acqua [54].

L'esatta struttura di GO è difficile da determinare, ma le evidenze sperimentali suggeriscono che il reticolo G ibridato  $\text{sp}^2$  è interrotto dai gruppi idrossilici ( $-\text{OH}$ ), epossidici ( $-\text{O}-$ ) e carbonilici ( $-\text{C}=\text{O}$ ), mentre i gruppi carbossilici ( $-\text{COOH}$ ) si trovano ai margini (Figura 1.4.5) [55].

La presenza di una rete aromatica di carboni ibridati  $\text{sp}^2$  e gruppi  $-\text{COOH}$  legati ai carboni ibridati  $\text{sp}^3$  è responsabile di un buon equilibrio idrofobo-idrofilo dei derivati GO, consentendo un'elevata affinità per le molecole organiche, nonché un'elevata affinità con l'acqua e quindi biocompatibilità

---

[51] Guoxiu, W.; Juan, Y.; Jinsoo, P.; Kinglong, G.; Bei, W.; Hao, L.; Jane, Y. Facile synthesis and characterization of graphene nanosheets. *J. Phys. Chem. C* **2008**; 112: 8192-8195.

[52] Kuila, T.; Bose, S.; Mishra, A.K.; Khanra, P.; Kim, N.H.; Lee, J.H. Chemical functionalization of graphene and its applications. *Prog. Mater. Sci.* **2012**; 57: 1061-1105.

[53] Makharza, S.; Cirillo, G.; Bachmatiuk, A.; Vittorio, O.; Mendes, R.G.; Oswald, S.; Hampel, S.; Rummeli, M.H. Size-dependent nanographene oxide as a platform for efficient carboplatin release. *J. Mater. Chem. B* **2013**; 1: 6107-6114.

[54] Drewniak, S.; Muzyka, R.; Stolarczyk, A.; Pustelny, T.; Kotyczka-Morańska, M.; Setkiewicz, M. Studies of reduced graphene oxide and graphite oxide in the aspect of their possible application in gas sensors. *Sensors* **2016**; 16: 103.

[55] Marcano, D.C.; Kosynkin, D.V.; Berlin, J.M.; Sinitskii, A.; Sun, Z.Z.; Slesarev, A.; Alemany, L.B.; Lu, W.; Tour, J.M. Improved Synthesis of Graphene Oxide. *ACS Nano* **2010**; 4: 4806-4814.

[56]. Inoltre, le strutture ricche di ossigeno agiscono come siti reattivi per la funzionalizzazione chimica con molecole biocompatibili e/o bioattive [57].

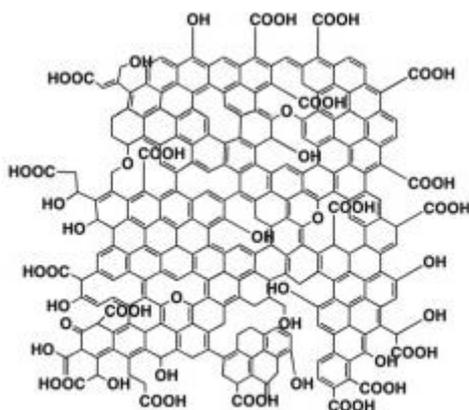


Figura 1.4.5 Rappresentazione della struttura del grafene ossido

rGO, una forma ridotta di GO con un contenuto di ossigeno inferiore [58], costituisce praticamente il sostituto del grafene in campo biomedico. Rispetto al GO, infatti, presenta una maggiore capacità di caricare specie lipofile attraverso interazioni  $\pi$ - $\pi$  (Figura 1.4.6).

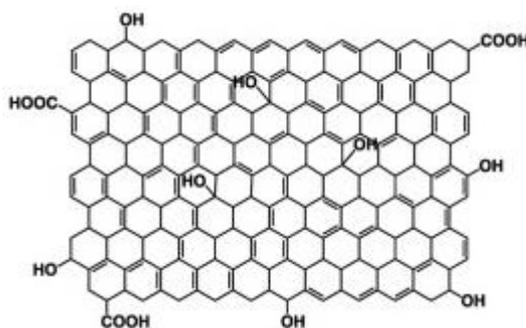


Figura 1.4.6 Rappresentazione della struttura del grafene ossido ridotto

La grande varietà di agenti riducenti e di condizioni di reazione possibili, consente di modulare finemente l'entità della riduzione del GO e quindi il bilancio idrofilia/idrofobia dei sistemi risultanti [59].

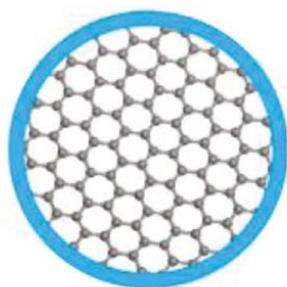
[56] Zhang, L.M.; Xia, J.G.; Zhao, Q.H.; Liu, L.W.; Zhang, Z.J. Functional Graphene Oxide as a Nanocarrier for Controlled Loading and Targeted Delivery of Mixed Anticancer Drugs. *Small* **2010**; 6: 537-544.

[57] Xu, Z.Y.; Wang, S.; Li, Y.J.; Wang, M.W.; Shi, P.; Huang, X.Y. Covalent Functionalization of Graphene Oxide with Biocompatible Poly(ethylene glycol) for Delivery of Paclitaxel. *Acs Appl. Mater. Inter.* **2014**; 6: 17268-17276.

[58] Cherian, R.S.; Anju, S.; Paul, W.; Sabareeswaran, A.; Mohanan, P.V. Organ distribution and biological compatibility of surface-functionalized reduced graphene oxide. *Nanotechnology* **2020**; 31.

[59] Zainuddin, M.F.; Raikhan, N.H.N.; Othman, N.H.; Abdullah, W.F.H. Synthesis of reduced Graphene Oxide (rGO) using different treatments of Graphene Oxide (GO). *Iop Conf. Ser. Mat. Sci.* **2018**, 358.

Altri derivati del grafene che stanno attirando un enorme interesse per la preparazione di sistemi di trasporto altamente ingegnerizzati sono i punti quantici di grafene (GQD). I GQD sono strutture sferiche definite a dimensione zero costituiti da pochi strati di fogli G con dimensione inferiore a 20 nm. Sono ottenuti da fogli G di grandi dimensioni mediante ossidazione chimica, trattamenti termici, ultrasuoni o plasma d'ossigeno (Figura 1.4.7) <sup>[60]</sup>.



**Figura 1.4.7** Rappresentazione dei punti quantici di grafene

---

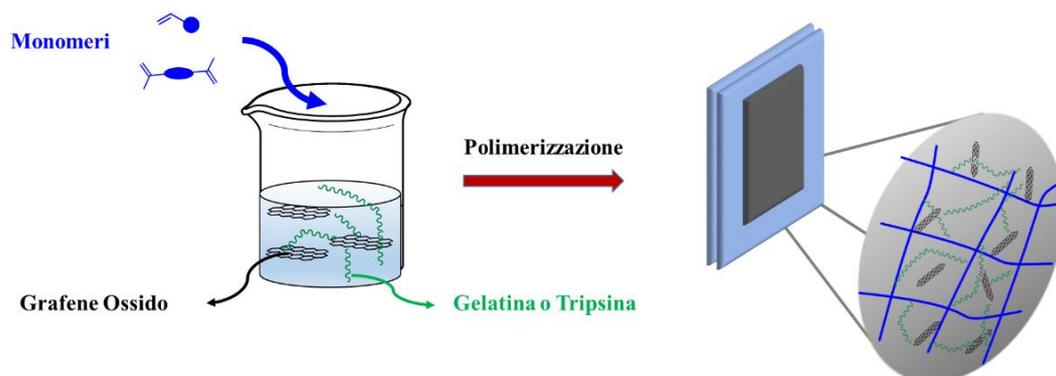
<sup>[60]</sup> Zhao, M.L. Direct Synthesis of Graphene Quantum Dots with Different Fluorescence Properties by Oxidation of Graphene Oxide Using Nitric Acid. *Appl. Sci.* **2018**, 8.

## 2 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 2.1 Idrogel ibridi elettrosensibili per la medicazione delle ferite cutanee <sup>1</sup>

#### 2.1.1 Premessa

Il lavoro si inserisce nel campo della sintesi di idrogel ibridi multifunzionali per il trattamento delle ferite e delle ustioni cutanee. Studi precedenti del nostro gruppo di ricerca hanno dimostrato le potenzialità applicative di idrogel elettrosensibili a base di CNT come sistemi di veicolazione per molecole con proprietà antiossidanti, antimicrobiche e antinfiammatorie <sup>[2]</sup>. In questo lavoro viene proposto un ulteriore sviluppo che consiste nel sostituire i nanotubi con il grafene ossido (GO), in virtù delle sue elevate proprietà elettriche e meccaniche e della sua maggiore biocompatibilità. Inoltre è stata esplorata la possibilità di inserire nel sistema una controparte di natura proteica, Gelatina (Gel) o Tripsina (Try), al fine di migliorare ulteriormente l'efficienza del dispositivo ibrido (Figura 2.1.1).



**Figura 2.1.1** Rappresentazione della preparazione degli idrogel ibridi oggetto del presente studio

La scelta della Gelatina è riconducibile alla sua capacità di unire proprietà di biocompatibilità e non immunogenicità con la possibilità di promuovere l'emostasi e di proteggere il fattore di crescita epidermico dalla proteolisi <sup>[3]</sup>.

<sup>[1]</sup> di Luca, M.; Vittorio, O.; Cirillo, G.; Curcio, M.; Czuban, M.; Voli, F.; Farfalla, A.; Hampel, S.; Nicoletta, F.P.; Iemma, F. Electro-responsive graphene oxide hydrogels for skin bandages: The outcome of gelatin and trypsin immobilization. *Int. J. Pharm.* **2018**; 546: 50-60.

<sup>[2]</sup> Cirillo, G.; Curcio, M.; Spizzirri, U.G.; Vittorio, O.; Tucci, P.; Picci, N.; Iemma, F.; Hampel, S.; Nicoletta, F.P. Carbon nanotubes hybrid hydrogels for electrically tunable release of Curcumin. *Eur. Polym. J.* **2017**; 90: 1-12.

<sup>[3]</sup> Wang, C.; Zhu, F.; Cui, Y.; Ren, H.; Xie, Y.; Li, A.; Ji, L.; Qu, X.; Qiu, D.; Yang, Z. An easy-to-use wound dressing gelatin-bioactive nanoparticle gel and its preliminary in vivo study. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2017**; 28: 10.

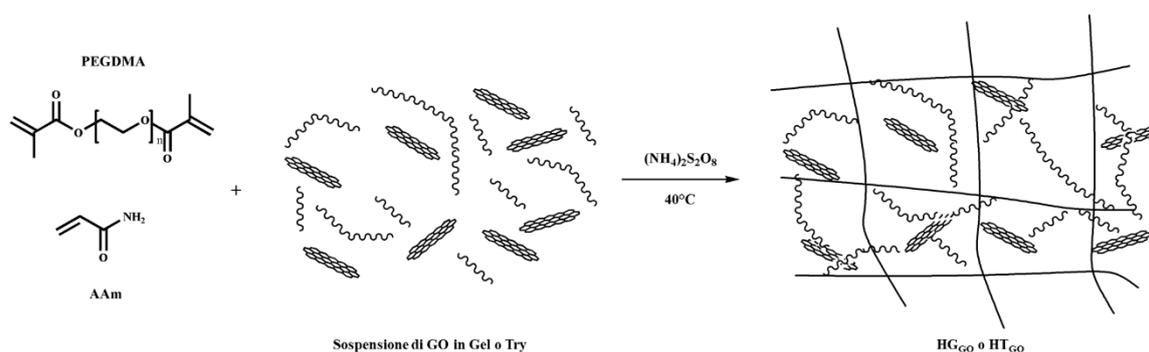
La Tripsina è stata selezionata in virtù della sua capacità di rimuovere i tessuti necrotici mediante proteolisi [4].

Gli idrogel ibridi sono stati sintetizzati mediante tecnica di polimerizzazione radicalica e ampiamente caratterizzati in termini di proprietà fisico-chimiche e meccaniche. Sono stati determinati i profili di rigonfiamento in ambiente acquoso e i profili di rilascio della Curcumina caricata in seguito all'applicazione di un campo elettrico a diverso voltaggio (da 0 a 48 V). L'applicazione di modelli matematici proposti in letteratura ha permesso la caratterizzazione cinetica del meccanismo di rilascio nelle diverse condizioni sperimentali. Infine, adeguati test antimicrobici, citotossici e proteolitici *in vitro* hanno confermato le potenzialità dei materiali proposti come dispositivi di medicazione delle ferite.

### 2.1.2 Sintesi e caratterizzazione chimico-fisica degli idrogel ibridi

Per la preparazione degli idrogel ibridi, sono state testate quattro differenti composizioni, impiegando nella polimerizzazione la proteina (gelatina o tripsina) da sola o in combinazione con il GO in presenza di Acrilamide (AAm) in qualità di plasticizzante e Polietilenglicole dimetacrilato (PEGDMA) come agente reticolante.

La strategia sintetica prevede la sospensione del GO nella soluzione proteica (alternativamente gelatina o tripsina) e il successivo innesco della polimerizzazione radicalica per via termica utilizzando il persolfato di ammonio come iniziatore. Il meccanismo di reazione prevede l'incorporazione covalente sia della proteina che del GO nel reticolo polimerico in crescita sfruttando della reattività degli eteroatomi nel caso della proteina [5] e dei gruppi contenenti ossigeno (idrossile, epossidico e carbossilico) nel caso del GO [6] (Figura 2.1.2).



**Figura 2.1.2** Rappresentazione della sintesi degli idrogel ibridi

[4] Moreira, B.R.; Batista, K.A.; Castro, E.G.; Lima, E.M.; Fernandes, K.F. A bioactive film based on cashew gum polysaccharide for wound dressing applications. *Carbohydr. Polym.* **2015**; 122: 69-76.

[5] Curcio, M.; Spizzirri, U.G.; Cirillo, G.; Vittorio, O.; Picci, N.; Nicoletta, F.P.; Iemma, F.; Hampel, S. On demand delivery of ionic drugs from electro-responsive CNT hybrid films. *RSC Adv.* **2015**; 5: 44902-44911.

[6] Sun, S.; Wu, P. A one-step strategy for thermal- and pH-responsive graphene oxide interpenetrating polymer hydrogel networks. *J. Mater. Chem.* **2011**; 21: 4095-4097.

La caratterizzazione chimico-fisica degli idrogel è riportata in Tabella 2.1.1.

**Tabella 2.1.1** Caratterizzazione degli idrogel ibridi elettrosensibili

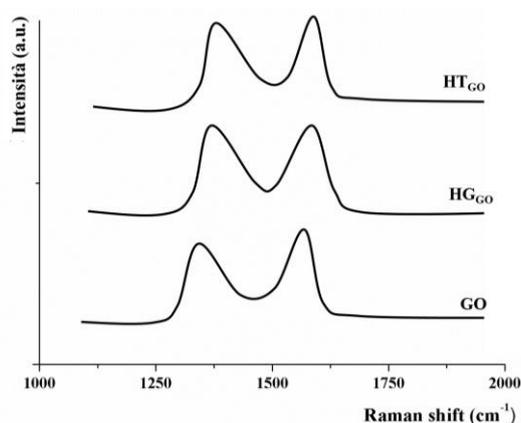
Idrogel	Contenuto Proteico (mg/g Idrogel)	Proprietà Meccaniche		TGA		MRC-5 Vitalità (%)	
		Forza Tensile (MPa)	Elongazione alla Rottura (%)	Perdita di Peso (%)			
				200°C	600°C		Td <sub>max</sub>
<b>HG</b>	63 ± 2	0.24 ± 0.01	31 ± 3	7	83	409	97 ± 2
<b>HG<sub>GO</sub></b>	75 ± 3	0.27 ± 0.03	29 ± 2	6	77	413	95 ± 4
<b>HT</b>	67 ± 4	0.26 ± 0.04	35 ± 2	6	82	410	93 ± 3
<b>HT<sub>GO</sub></b>	72 ± 2	0.30 ± 0.02	32 ± 4	5	81	414	96 ± 2

GO: Grafene ossido; Gel: Gelatina; Try: Tripsina; AAm: Acrilamide; PEGDMA: polietilenglicole dimetacrilato; Contenuto Proteico: mg di Gel o Try per g; Vitalità Cellulare: 24 h di incubazione con idrogel a concentrazione 1.00 mg mL<sup>-1</sup>.

Una prima caratterizzazione è stata volta alla determinazione del contenuto proteico espresso come milligrammi di Gel o Try per grammo di idrogel mediante test di Lowry. Tutti gli idrogel mostrano contenuti proteici paragonabili, ad evidenziare come la reattività delle due proteine sia simile e come l'introduzione di GO nella miscela di polimerizzazione non interferisca in maniera significativa.

Analisi Raman e TGA e determinazione delle proprietà meccaniche hanno permesso di valutare quale fosse l'effetto dell'incorporazione covalente di GO sulle caratteristiche fisico-chimiche degli idrogel ibridi.

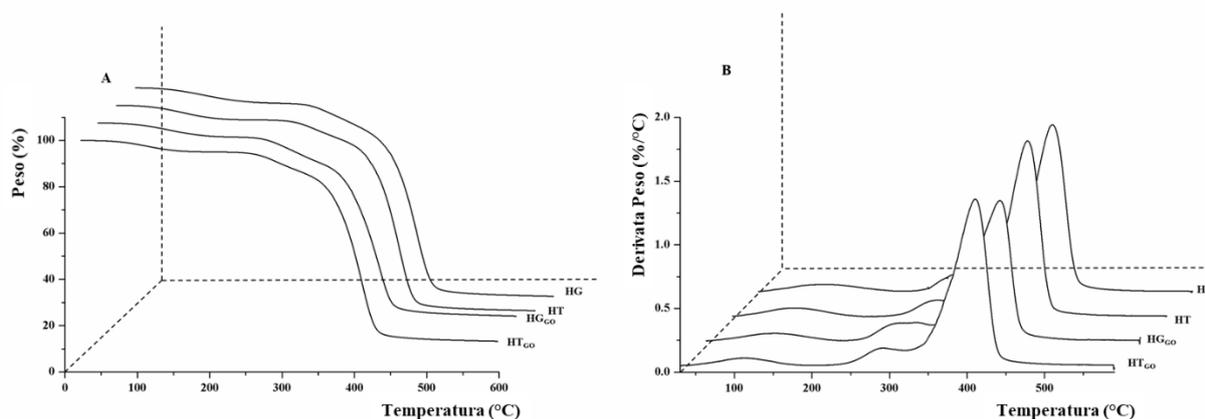
Più in dettaglio, la spettroscopia Raman è stata utilizzata per studiare le bande vibrazionali del GO di partenza e dei nanoibridi HG<sub>GO</sub> e HT<sub>GO</sub>. Gli spettri Raman di GO mostrano le caratteristiche bande D (disordine) e G (simmetria) a 1360 e 1578 cm<sup>-1</sup>, la prima corrispondente all'assorbimento dei carboni sp<sup>3</sup>, mentre la seconda è dovuta alla presenza di carboni sp<sup>2</sup> che formano la struttura ordinata del GO (Figura 2.1.3).



**Figura 2.1.3** Spettri Raman di GO e dei nanoibridi HG<sub>GO</sub> e HT<sub>GO</sub>

Nel GO di partenza, la presenza della banda D è imputabile ai fenomeni di ossidazione presenti negli step sintetici che comportano la formazione di carboni a struttura tetraedrica [7]. Gli idrogel ibridi mostrano un comportamento simile, con uno spostamento della posizione della banda G a  $1598\text{ cm}^{-1}$  nel caso di  $\text{HG}_{\text{GO}}$  e  $1595\text{ cm}^{-1}$  nel caso di  $\text{HT}_{\text{GO}}$ , ad indicare la formazione di un legame covalente tra reticolo polimerico e nanostruttura al carbonio [8].

Sono state quindi effettuate analisi TGA per ottenere informazioni sulle proprietà termiche dei sistemi polimerici e su come esse vengano modificate dall'inserimento di GO (Figura 2.1.4a).



**Figura 2.1.4** Termogrammi TGA (A) and DTG (B) degli idrogel contenenti Gelatina o Tripsina (HG e HT) e degli idrogel ibridi contenenti GO ( $\text{HG}_{\text{GO}}$  e  $\text{HT}_{\text{GO}}$ )

Le curve TGA di tutti i campioni hanno mostrato un processo di degradazione in due fasi. Una prima ridotta perdita di massa (6% circa) registrata a partire da  $50\text{ °C}$  è riconducibile alla rimozione delle molecole d'acqua intrappolate all'interno della struttura dell'idrogel (Tabella 2.1.1).

Una seconda fase di degradazione a partire da  $250\text{ °C}$  è invece attribuibile alla pirolisi dell'ossigeno labile allontanato sotto forma di  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$  e vapore acqueo [9]. La capacità di GO di migliorare le proprietà termiche degli idrogel ibridi è confermata dai valori inferiori di perdita di peso registrati a  $600\text{ °C}$  rispetto a quelli degli idrogel di controllo (Tabella 2.1.1). Come riportato in letteratura, una possibile spiegazione del comportamento termico degli idrogel ibridi in seguito all'incorporazione del GO, è la combinazione di due fenomeni: la ridotta mobilità delle catene polimeriche [10] e la

[7] Kudin, K.N.; Ozbas, B.; Schniepp, H.C.; Prud'homme, R.K.; Aksay, I.A.; Car, R. Raman spectra of graphite oxide and functionalized graphene sheets. *Nano Letters* **2008**; *8*; 36-41.

[8] Makharza, S.; Vittorio, O.; Cirillo, G.; Oswald, S.; Hinde, E.; Kavallaris, M.; Buechner, B.; Mertig, M.; Hampel, S. Graphene Oxide - Gelatin Nanohybrids as Functional Tools for Enhanced Carboplatin Activity in Neuroblastoma Cells. *Pharm. Res.* **2015**; *32*: 2132-2143.

[9] Abdellaoui-Arous, N.; Hadj-Hamou, A.S.; Djadoun, S. Thermal analysis and phase behavior of poly(styrene-co-4-vinylpyridine)/ poly(styrene-co-acrylic acid) mixtures. *Thermochim. Acta* **2012**; *547*: 22-30.

[10] Wu, G.; Ma, L.; Liu, L.; Chen, L.; Huang, Y. Preparation of  $\text{SiO}_2$ -GO hybrid nanoparticles and the thermal properties of methylphenylsilicone resins/ $\text{SiO}_2$ -GO nanocomposites. *Thermochim. Acta* **2015**; *613*: 77-86.

soppressione della reazione di trasferimento di catena <sup>[11]</sup>. Di conseguenza, il processo di degradazione è rallentato e le temperature di decomposizione ( $T_{d_{max}}$ ) si spostano verso valori più elevati (Tabella 2.1.1 e curve DTG in Figura 2.1.4b).

Dai dati sulle proprietà meccaniche riportati in Tabella 2.1.1, si può osservare come il GO agisca anche da elemento di rinforzo per gli idrogel in virtù della sua elevata resistenza meccanica <sup>[12]</sup>. Rispetto agli idrogel di controllo, i sistemi ibridi evidenziano un aumento della resistenza alla trazione di circa il 15%, mentre le percentuali di allungamento alla rottura si riducono di circa l'8%, ad indicare una maggiore rigidità strutturale. I risultati sono in accordo con i dati di letteratura che suggeriscono un aumento del 15% del modulo elastico di un idrogel nanocomposito contenente l'1% in peso di GO <sup>[13]</sup>.

Un'ulteriore caratterizzazione è stata eseguita determinando l'affinità degli idrogel nei confronti dell'acqua, espressa come WR% (Equazione 1.1, vedi introduzione), e come essa varia in seguito all'applicazione di campi elettrici a diversi voltaggi (da 0 a 48 V).

$$WR = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \quad (1.1)$$

Si può osservare come i campioni contenenti Try (HT e HT<sub>GO</sub>) mostrino una maggiore affinità per l'acqua rispetto ai corrispondenti materiali a base di Gel (HG e HG<sub>GO</sub>), come conseguenza delle diverse proprietà idrofile delle proteine native (Tabella 2.1.2).

**Tabella 2.1.2** Valori di rigonfiamento degli idrogel in funzione del campo elettrico applicato

Idrogel	Vtaggio							
	0		12		24		48	
	WR <sub>0</sub>	WR <sub>12</sub>	S <sub>12</sub>	WR <sub>24</sub>	S <sub>24</sub>	WR <sub>48</sub>	S <sub>48</sub>	
<b>HG</b>	250 ± 3	240 ± 5	0.1	250 ± 3	0	240 ± 5	0.1	
<b>HG<sub>GO</sub></b>	169 ± 2	229 ± 4	35.5	245 ± 2	44.9	205 ± 4	21.3	
<b>HT</b>	278 ± 1	279 ± 2	0.4	281 ± 3	1.1	276 ± 2	0.7	
<b>HT<sub>GO</sub></b>	259 ± 3	263 ± 4	1.5	275 ± 1	6.2	244 ± 3	5.8	

Uno strumento utile per quantificare la variazione dell'affinità per l'acqua in funzione dei valori di vtaggio applicati è il parametro  $S_v$ , definito secondo l'equazione (2.1).

<sup>[11]</sup> De La Fuente, J.L.; Wilhelm, M.; Spiess, H.W.; Madruga, E.L.; Fernández-García, M.; Cerrada, M.L. Thermal, morphological and rheological characterization of poly(acrylic acid-g-styrene) amphiphilic graft copolymers. *Polymer* **2005**; 46: 4544-4553.

<sup>[12]</sup> Wu, H., Liu, F., Gong, W., Ye, F., Hao, L., Jiang, J., Han, S., 2015b. Preparation of Ni-P-GO composite coatings and its mechanical properties. *Surface and Coatings Technology* 272, 25-32.

<sup>[13]</sup> Abdollahi, R.; Taghizadeh, M.T.; Savani, S. Thermal and mechanical properties of graphene oxide nanocomposite hydrogel based on poly (acrylic acid) grafted onto amylose. *Polym. Degr. Stabil.* **2018**; 147: 151-158.

$$S_v = \left| \frac{WR_V - WR_0}{WR_0} \right| \times 100 \quad (2.1)$$

in cui  $WR_0$  rappresenta il valore di WR a 0 V, mentre  $WR_V$  i valori di WR al voltaggio applicato (12, 24, o 48).

La variazione di WR in seguito all'applicazione della tensione esterna è correlata a due fenomeni, vale a dire la ionizzazione dei residui polarizzabili delle controparti polimeriche (Gel o Try) e nanostrutturali (GO) e l'instaurarsi di uno stress osmotico lungo il network polimerico<sup>[14]</sup>. L'assenza di elementi conduttori in HG e HT non determina una risposta significativa in seguito a stimolazione elettrica, e i valori di WR sono molto vicini tra loro a qualsiasi valore di voltaggio testato ( $S_v$  inferiore a 2.5 in tutti i casi), mentre un comportamento molto diverso si registra nel caso dei campioni contenenti GO, a causa dell'elevata elettroconduttività conferita dall'inserimento della nanostruttura nel reticolo polimerico.

Nel caso di  $HG_{GO}$ , a bassi voltaggi (12 e 24 V), gli idrogel si rigonfiano come conseguenza della ionizzazione dei gruppi COOH nella catena laterale della proteina che, possedendo un punto isoelettrico pari a 4.9, ha un comportamento tipico delle specie polianioniche<sup>[15]</sup>. L'entità del rigonfiamento è inoltre strettamente correlata alla tensione applicata (effetto maggiore a 24 V). A valori di voltaggio più elevati (48 V), l'effetto predominante è una contrazione del reticolo polimerico a causa della pressione osmotica generata dalla riorganizzazione degli ioni mobili all'interno e all'esterno degli idrogel che si spostano verso gli elettrodi di segno opposto. L'entità di questo effetto può essere quantificata analizzando il valore di  $WR_{48}$  (205%) che risulta essere intermedio tra  $WR_{12}$  e  $WR_{24}$  e quello di  $S_{48}$  (21.3).

Quando si considera il campione  $HT_{GO}$ , si osserva lo stesso andamento di rigonfiamento/contrazione, ma con intensità ridotta (valori  $S_v$  inferiori) dovuto al minor contenuto di residui di amminoacidi ionizzabili. In questo caso, il diverso punto isoelettrico della proteina (10.5) indica un comportamento policationico in seguito all'applicazione del campo elettrico<sup>[16]</sup>. Inoltre, i valori  $WR_{48}$  (%) sono inferiori a quelli di  $WR_0$ , indicando che l'idrogel ibrido possiede una maggiore capacità di contrazione.

L'elevata affinità per l'acqua degli idrogel di controllo (HT e HG) e ibridi ( $HG_{GO}$  e  $HT_{GO}$ ) è adeguata per la creazione dell'ambiente umido necessario per migliorare il processo di risoluzione

<sup>[14]</sup> Saikia, A.K.; Aggarwal, S.; Mandal, U.K. Electrically induced swelling and methylene blue release behaviour of poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylamido-2-methylpropyl sulphonic acid) hydrogels. *Colloid Polym. Sci.* **2015**; 293, 3533-3544.

<sup>[15]</sup> Hafidz, R.N.R.M.; Yaakob, C.M.; Amin, I.; Noorfaizan, A. Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin. *Int. Food Res. J.* **2011**; 18.

<sup>[16]</sup> Teow, S.Y.; Liew, K.; Ali, S.A.; Khoo, A.S.B.; Peh, S.C. Antibacterial Action of Curcumin against Staphylococcus aureus: A Brief Review. *J. Trop. Med.* **2016**; 2016.

delle ferite. In letteratura, infatti, è riportato che le medicazioni a base di idrogel in grado di assorbire fino a 1000 g di essudato per grammo di medicazione sono adatte per il trattamento di ferite sia secche che necrotiche <sup>[17]</sup>. I materiali proposti presentano poi l'ulteriore vantaggio di permettere la fine regolazione del contenuto di acqua mediante l'applicazione di uno stimolo elettrico, garantendo quindi livelli ben definiti di essudato *in situ*.

### 2.1.3 Determinazione dell'attività proteolitica

Al fine di ottenere un affetto sinergico sulle prestazioni della medicazione e quindi promuovere la guarigione, Try è stata inserita nella composizione degli idrogel ibridi con l'obiettivo di combinare la capacità di creare un ambiente umido idoneo alla rimarginazione, propria degli idrogel, con quelle di catalizzare la degradazione delle proteine, tipica di Try <sup>[18]</sup>. È stato infatti dimostrato come le proteasi favoriscano la pulizia della ferita e il successivo processo di riepitelizzazione, esibendo, allo stesso tempo, effetti antinfiammatori, fibrinolitici, antiedemigeni e preservando il sito di guarigione dalla contaminazione microbica <sup>[19]</sup>. La necessità di immobilizzare le proteasi su un supporto solido è correlata alla loro rapida disattivazione, con conseguente riduzione dell'efficacia terapeutica, quando applicate direttamente sulla ferita <sup>[20]</sup>.

La caratterizzazione dell'attività proteolitica degli idrogel HT e HT<sub>GO</sub> è stata effettuata valutando la cinetica di degradazione enzimatica del substrato Na-benzoil-L-arginina-p-nitroanilide (BApNA) e confrontandola con quella relativa alla forma libera dell'enzima <sup>[21]</sup>.

I parametri cinetici sono stati determinati in accordo all'equazione di Michaelis–Menten (Equazione 2.2) nella forma lineare proposta da Lineweaver–Burk (Equazione 2.3):

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (2.2)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.3)$$

Dove  $K_M$  rappresenta la costante di Michaelis e  $V_{max}$  la velocità massima di catalisi.

<sup>[17]</sup> Koehler, J.; Brandl, F.P.M Goepferich, A.M. Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds. *Eur. Polym. J.* **2018**; 100: 1-11.

<sup>[18]</sup> Vernikovskii, B.V.; Stepanova, E.F. Immobilized proteases for wound cleaning. *Russ. J. Gen. Chem.* **2012**; 82: 572-578.

<sup>[19]</sup> Krieger, Y.; Bogdanov-Berezovsky, A.; Gurfinkel, R.; Silberstein, E.; Sagi, A.; Rosenberg, L. Efficacy of enzymatic debridement of deeply burned hands. *Burns* **2012**; 38: 108-112.

<sup>[20]</sup> Monteiro, F.M.F.; de Medeiros e Silva, G.M.; da Silva, J.B.R.; Porto, C.S.; de Carvalho Jr, L.B.; de Lima Filho, J.L.; Carneiro-Leão, A.M.d.A.; Carneiro-da-Cunha, M.d.G.; Porto, A.L.F. Immobilization of trypsin on polysaccharide film from *Anacardium occidentale* L. and its application as cutaneous dressing. *Proc. Biochem.* **2007**; 42: 884-888

<sup>[21]</sup> Martínez, Y.N.; Cavello, I.; Hours, R.; Cavalitto, S.; Castro, G.R. Immobilized keratinase and enrofloxacin loaded on pectin PVA cryogel patches for antimicrobial treatment. *Biores. Technol.* **2013**; 145: 280-284.

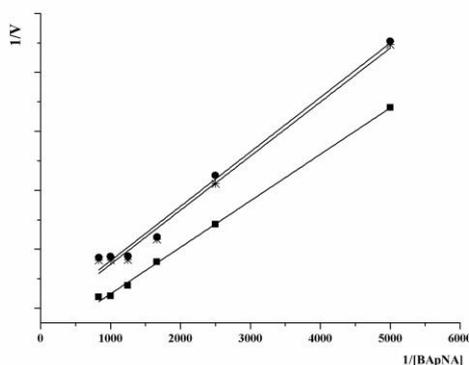
Per valutare l'efficienza del biocatalizzatore solido, sono stati introdotti due parametri quali l'efficienza di catalisi (CE) e il rapporto di efficienza ( $R_{CE}$ ) in accordo alle equazioni (2.4 e 2.5):

$$CE = \frac{V_{max}}{K_M} \quad (2.4)$$

$$R_{CE} = \frac{CE_I}{CE_F} \quad (2.5)$$

$CE_F$  e  $CE_I$  rappresentano rispettivamente i valori di CE per l'enzima libero e immobilizzato.

L'applicazione dell'equazione di Lineweaver – Burk (Figura 2.1.5) ha permesso di determinare  $K_M$  e  $V_{max}$  in HT e HT<sub>GO</sub>.



**Figura 2.1.5** Cinetica enzimatica di Try libera (■) e immobilizzata in HT (●) e HT<sub>GO</sub> (\*)

I risultati ottenuti utilizzando quantità fisse di idrogel, sono stati confrontati con quelli ottenuti impiegando la forma libera dell'enzima alla stessa concentrazione (Tabella 2.1.3) e l'effetto del processo di immobilizzazione è stato quantificato dal valore di  $R_{CE}$  ottenuto.

Rispetto alla forma libera dell'enzima, entrambi gli idrogel hanno mostrato una velocità di reazione inferiore ( $V_{max}$  inferiore) e una saturazione più rapida dei siti catalitici ( $K_M$  inferiore) come conseguenza dei cambiamenti nell'affinità per il substrato.

**Tabella 2.1.3** Attività proteolitica della tripsina libera e immobilizzata su HT e HT<sub>GO</sub>

Campione	$V_{max}$ (mmol L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mmol L <sup>-1</sup> )	CE	$R_{CE}$	$R_{DH}$
Try	21.96	1.73	12.69	---	---
HT	11.34	1.05	10.80	0.85	0.72
HT <sub>GO</sub>	12.10	1.11	10.90	0.86	0.79

Valori di  $R_{CE}$  pari a 0.85 e 0.86 rispettivamente per HT e HT<sub>GO</sub> permettono inoltre di evidenziare come né il processo di immobilizzazione, né l'incorporazione del GO interferiscano in modo significativo ( $p > 0,05$ ) con l'efficienza catalitica, a conferma dell'elevato potenziale applicativo dei materiali preparati.

Sono stati eseguiti ulteriori esperimenti di proteolisi utilizzando gelatina come substrato proteico modello, definendo il grado di idrolisi mediante l'equazione (2.6) [22]:

$$DH = \frac{(L_t - L_0)}{(L_{max} - L_0)} \quad (2.6)$$

$L_0$  e  $L_t$  sono rispettivamente le quantità di  $\alpha$ -amminoacido rilevate nella soluzione di gelatina originale e in seguito ad idrolisi enzimatica al tempo  $t$ , mentre  $L_{max}$  è la massima quantità di  $\alpha$ -amminoacidi rilevabile in seguito ad idrolisi acida. Per valutare l'efficienza catalitica dell'enzima in seguito all'immobilizzazione nel supporto polimerico, si va a determinare il rapporto dei gradi di idrolisi ottenuti per le forme immobilizzate e libere dell'enzima in accordo all'equazione (2.7):

$$R_{DH} = \frac{DH_I}{DH_F} = \frac{(L_t - L_0)_I}{(L_t - L_0)_F} \quad (2.7)$$

I risultati, riportati in Tabella 2.1.3, indicano chiaramente la conservazione dell'attività proteolitica di Try in seguito al processo di immobilizzazione, con valori di  $R_{DH}$  prossimi a 0.80 sia per HT che per HT<sub>GO</sub>.

#### 2.1.4 Determinazione dei profili di rilascio

Al fine di esplorare la capacità di modulare il rilascio dell'agente terapeutico dagli idrogel ibridi in seguito all'applicazione di un campo elettrico esterno, Cur è stata caricata all'7,5% in peso su tutti i campioni mediante una procedura di impregnazione/essiccamento, e i profili di rilascio sono stati registrati a 25 °C in assenza (0 V) e in presenza di una differenza di potenziale (12, 24 e 48 V).

La quantità di farmaco rilasciata al tempo  $t$  ( $M_t/M_0$ ) in ciascuna condizione sperimentale è rappresentata in Figura 2.1.6. Nel caso degli idrogel privi di graphene ossido (HT e HG), l'assenza di elettrosensibilità porta a profili di rilascio praticamente sovrapponibili a tutti i valori di voltaggio, con solo un leggero aumento rispetto alle condizioni di 0V come conseguenza di una modifica delle interazioni farmaco/vettore (Figura 2.1.6 a, c).

Si osserva invece un comportamento totalmente diverso per i materiali ibridi (Figura 2.1.6 b, d), i cui profili di rilascio vengono significativamente influenzati dai valori di voltaggio.

Una quantificazione di questi risultati, insieme alle informazioni chiave sui meccanismi di rilascio, può essere ottenuta mediante l'applicazione dei modelli matematici proposti da Avrami [23]

[22] Ketnawa, S.; Benjakul, S.; Martínez-Alvarez, O.; Rawdkuen, S. Fish skin gelatin hydrolysates produced by visceral peptidase and bovine trypsin: Bioactivity and stability. *Food Chem.* **2017**; 215: 383-385.

[23] Shamaeli, E.; Alizadeh, N. Kinetic studies of electrochemically controlled release of salicylate from nanostructure conducting molecularly imprinted polymer. *Electrochim. Acta* **2013**; 114: 409-415.

e Peppas-Sahlin [24] (equazioni 1.11 e 1.14, vedi introduzione), che ben si adattano ai dati sperimentali (valori  $R^2 > 0,95$ ) e i cui parametri sono riportati nella Tabella 2.1.4 e 2.1.5.

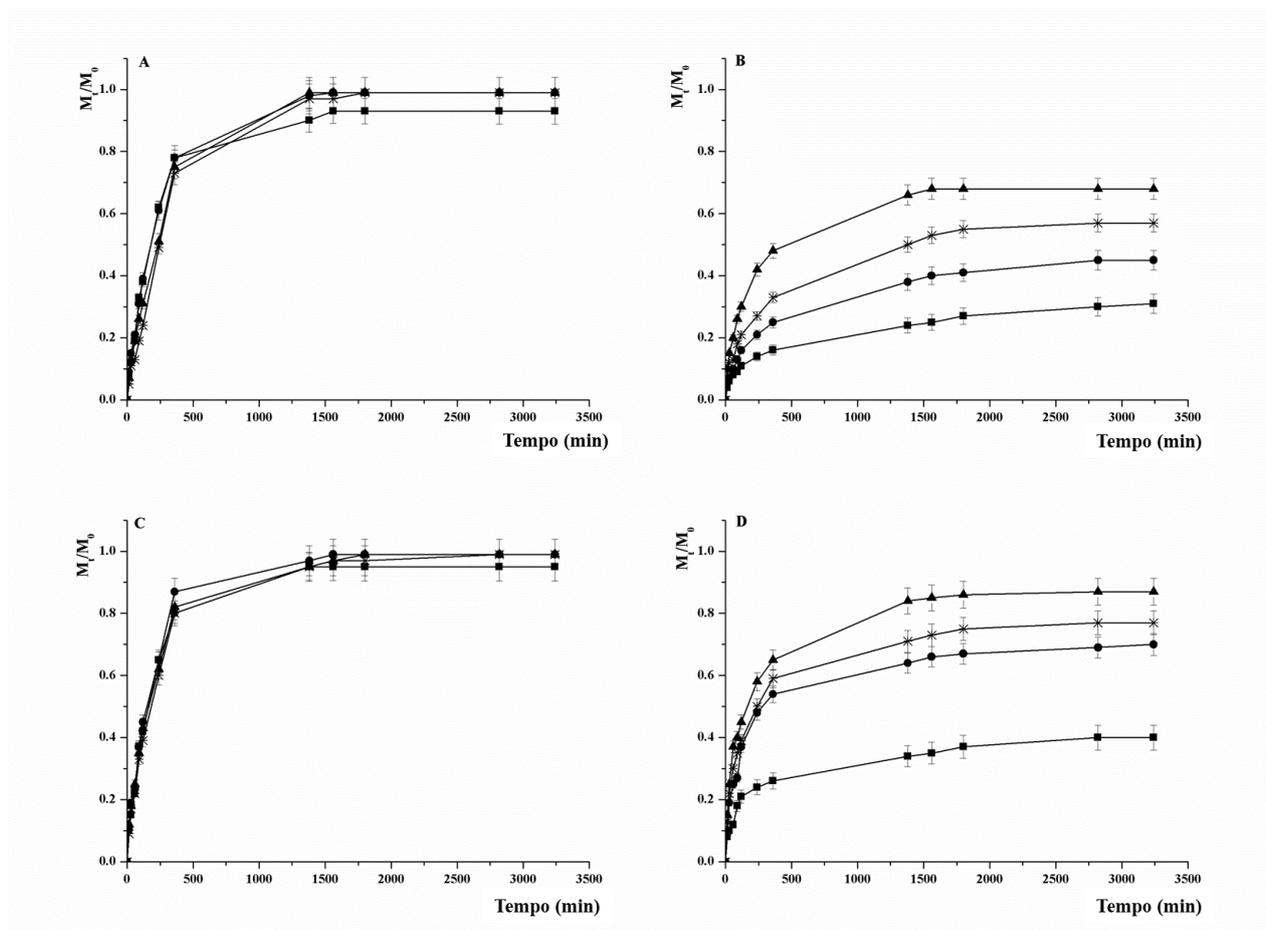


Figura 2.1.6 Profili di rilascio di Cur da HG (A); HG<sub>GO</sub> (B); HT (C); HT<sub>GO</sub> (D) a 0 (■); 12 (●); 24 (▲); e 48 (x) V

$$\frac{M_t}{M_0} = 1 - e^{-kt^n} \quad (1.11)$$

$$\frac{M_t}{M_0} = K_1 t^{1/2} + K_2 t \quad (1.14)$$

Nel caso del modello di Peppas-Sahlin, ulteriori informazioni possono essere ottenute mediante l'introduzione dei relativi parametri cinetici  $Q_{1-3}$  (Equazioni 2.8 a-c).

$$Q_1^{Vx} = \frac{K_1^{Vx} - K_1^{V0}}{K_1^{V0}} \quad (2.8a)$$

$$Q_2^{Vx} = \frac{K_2^{Vx} - K_2^{V0}}{K_2^{V0}} \quad (2.8b)$$

[24] Singh, V.K.; Pandey, P.M.; Agarwal, T.; Kumar, D.; Banerjee, I.; Anis, A.; Pal, K. Development of soy lecithin based novel self-assembled emulsion hydrogels. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2015**; 55: 250-263.

$$Q_3^{V_x} = \left| \frac{K_1^{V_x}}{K_2^{V_x}} \right| \quad (2.8c)$$

In cui  $V_x$  rappresenta il valore del Voltaggio applicato (0, 12, 24, o 48 V).

**Tabella 2.1.4** Valori  $R^2$  e parametri cinetici secondo il modello di Avrami per gli idrogel HG, HG<sub>GO</sub>, HT, HT<sub>GO</sub>

Idrogel	Eq. 1.11				
	Voltaggio	$R^2$	$k$	$n$	$t_{1/2}^A$
HG	0	0.9841	0.0164	0.69	227
	12	0.9821	0.0116	0.78	190
	24	0.9795	0.0075	0.84	218
	48	0.9796	0.0044	0.90	277
HG <sub>GO</sub>	0	0.9923	0.0159	0.40	#
	12	0.9872	0.0183	0.45	#
	24	0.9673	0.0393	0.46	512
	48	0.9848	0.0242	0.46	1470
HT	0	0.9554	0.0207	0.66	204
	12	0.9736	0.0178	0.73	151
	24	0.9851	0.0187	0.71	162
	48	0.9868	0.0146	0.74	184
HT <sub>GO</sub>	0	0.9574	0.0380	0.33	#
	12	0.9228	0.0493	0.44	406
	24	0.9717	0.0627	0.47	166
	48	0.9618	0.0614	0.42	320

# valori di  $t_{1/2}^A$  fuori dal range sperimentale

**Tabella 2.1.5** Valori  $R^2$  e parametri cinetici secondo il modello di Peppas-Sahlin per gli idrogel HG, HG<sub>GO</sub>, HT, HT<sub>GO</sub>

Hydrogel	Eq. 1.14							
	Voltage (V)	$R^2$	$K_1$	$Q_1$	$K_2 \times 10^{-4}$	$Q_2$	$Q_3$	$t_{1/2}^P$
HG	0	0.9947	0.0411	---	-4.45	---	92	216
	12	0.9828	0.0431	0.06	-4.57	0.03	94	184
	24	0.9799	0.0396	-0.04	-3.85	-0.14	103	217
	48	0.9547	0.0352	-0.14	-2.90	-0.35	121	270
HG <sub>GO</sub>	0	0.9928	0.0100	---	-0.80	---	125	#
	12	0.9984	0.0152	0.52	-1.28	0.60	119	#
	24	0.9963	0.0304	2.04	-3.30	3.12	92	460
	48	0.9982	0.0207	1.07	-1.86	1.32	111	1260
HT	0	0.9690	0.0448	---	-5.04	---	89	171
	12	0.9672	0.0469	0.05	-5.32	0.06	88	154
	24	0.9763	0.0449	0.01	-4.93	-0.02	91	169
	48	0.9739	0.0430	-0.04	-4.56	-0.10	94	185
HT <sub>GO</sub>	0	0.9573	0.0170	---	-1.83	---	93	#
	12	0.9677	0.0330	0.94	-3.80	1.08	87	382
	24	0.9765	0.0428	1.52	-5.01	1.74	85	195
	48	0.9713	0.0368	1.16	-4.25	1.32	87	285

# valori di  $t_{1/2}^P$  fuori dal range sperimentale

$Q_1$  e  $Q_2$  sono utili per valutare come l'applicazione del Voltaggio esterno influenzi le due componenti (diffusione Fickiana e anomala) della cinetica di rilascio, mentre  $Q_3$  è una misura di quale sia l'effetto predominante.

Nel caso di HG, la ripartizione della Cur tra la matrice e il mezzo di rilascio porta ad una cinetica di rilascio prevalentemente del primo ordine, come risulta evidente dai valori di  $n$  riportati in Tabella 2.1.4, con la diffusione Fickiana che rappresenta la componente principale del rilascio (valori di  $Q_3$  vicini a 100 in Tabella 2.1.5).

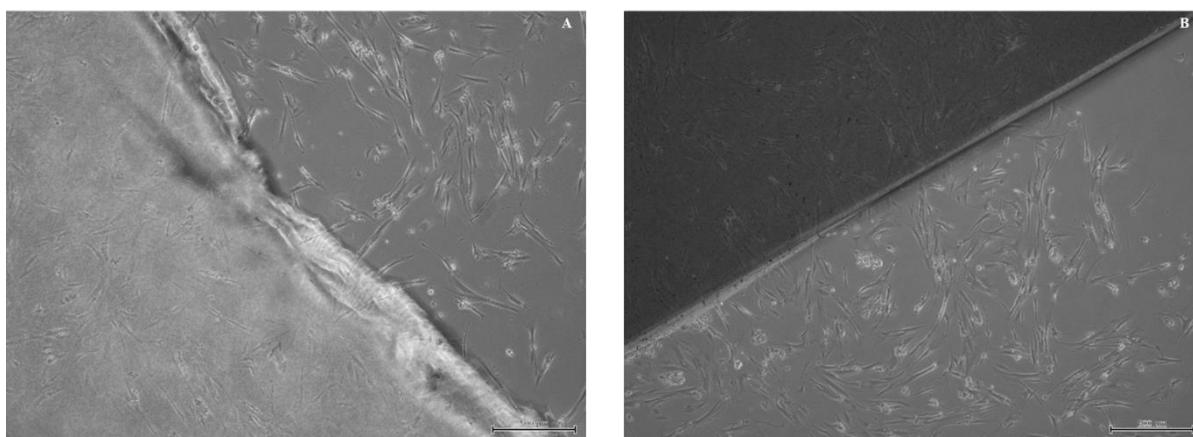
L'applicazione del campo elettrico esterno non modifica in modo significativo la cinetica di rilascio: i parametri più rilevanti di entrambi i modelli restano infatti praticamente invariati. Considerazioni simili possono essere fatte per spiegare il comportamento di HT, con un rilascio di Cur più veloce (valori di  $t_{1/2}$  inferiori nelle Tabelle 2.1.4 e 2.1.5) come conseguenza della ridotta affinità della Cur idrofoba per la componente proteica idrofila Try.

Il confronto dei campioni HG e HG<sub>GO</sub> a 0 V (Figura 2.1.6 a, b) mostra chiaramente che la maggiore idrofobicità degli idrogel ibridi determina una riduzione della quantità di Cur rilasciata, con  $M_{\max}$  che passa dal 93% per HG al 31% per HG<sub>GO</sub>. I foglietti di graphene ossido, infatti, sono in grado di stabilire forti interazioni con la Cur tramite legami  $\pi$ - $\pi$ , e determinano un rilascio di tipo prevalentemente diffusivo (valori  $n$  in Tabella 2.1.4). Inoltre, nel caso di HG<sub>GO</sub>, i profili di rilascio risultano modulabili in funzione dei valori di voltaggio, con parametri cinetici completamente diversi in ciascuna condizione sperimentale, in termini sia di quantità ( $M_{\max}$ ) che di velocità di rilascio ( $t_{1/2}$ ). Più in dettaglio, mediante l'applicazione dei modelli matematici, si ottengono valori  $t_{1/2}$  comparabili, con il contributo dovuto alla diffusione Fickiana che risulta prevalere sui contributi anomali (valori  $Q_3$  in Tabella 2.1.5). L'applicazione del voltaggio determina un aumento delle costanti cinetiche  $K_1$  e  $K_2$ , con i contributi anomali che diventano più rilevanti in tutti i casi ( $Q_2 > Q_1$ ). A 24 V si registra il rilascio più elevato sia per il maggiore grado di rigonfiamento registrato in queste condizioni che per l'instaurazione di forze repulsive elettrostatiche tra Cur e gli idrogel ibridi. A 48 V il rilascio si riduce con valori  $Q_3$  decrescenti nell'ordine  $Q_3^{24} > Q_3^{48} < Q_3^{12}$ , come conseguenza della combinazione di diversi fenomeni: la riduzione della quantità di acqua assorbita e la presenza di forze repulsive elettrostatiche tra le molecole di Cur e i componenti dell'idrogel, entrambi polarizzati.

HT<sub>GO</sub> (Figura 2.1.6 d) è caratterizzato da profili di rilascio che ricordano quelli ottenuti da HG<sub>GO</sub>, vale a dire un meccanismo di rilascio prevalentemente Fickiano (valori  $n$  in Tabella 2.1.4) e un contributo anomalo che cresce con l'applicazione di una differenza di potenziale (valori  $Q$  in Tabella 2.1.5). In questo caso si registra lo stesso andamento nei profili di rilascio visto per HG<sub>GO</sub>, con la presenza di Try che risulta determinare maggiori valori di  $M_{\max}$  e minori valori di  $t_{1/2}$ . Si registra inoltre una maggiore elettrosensibilità a 12 V (valori  $Q_1^{12}$  e  $Q_2^{12}$  maggiori per HT<sub>GO</sub> che per HG<sub>GO</sub>), ed una minore risposta agli altri valori di voltaggio testati.

### 2.1.5 Biocompatibilità e attività antimicrobica

La biocompatibilità degli idrogel sintetizzati è stata valutata in collaborazione con il Children's Cancer Institute, Lowy Cancer Research Centre, University of New South Wales (Australia) utilizzando cellule MRC-5 fetali umane come modello di cellule sane in virtù delle loro peculiari caratteristiche metaboliche e dell'elevata sensibilità a quasi tutti i tipi di sostanze chimiche [25]. Tutti i campioni sono stati testati a concentrazioni comprese tra 0.1 e 1.0 mg mL<sup>-1</sup>. I valori di vitalità cellulare ottenuti sono risultati in tutti i casi superiori al 94%, dimostrando l'assenza di significativi segni di tossicità. Inoltre, il risultato più interessante da un punto di vista applicativo è il mantenimento sia di una morfologia cellulare inalterata in seguito all'incubazione con i materiali polimerici di natura proteica (Figura 2.1.7 a) e ibrida (Figura 2.1.7 b), che della capacità replicativa.



**Figura 2.1.7** Morfologia delle cellule MRC-5 in seguito ad incubazione con HG (A) e HG<sub>GO</sub> (B)

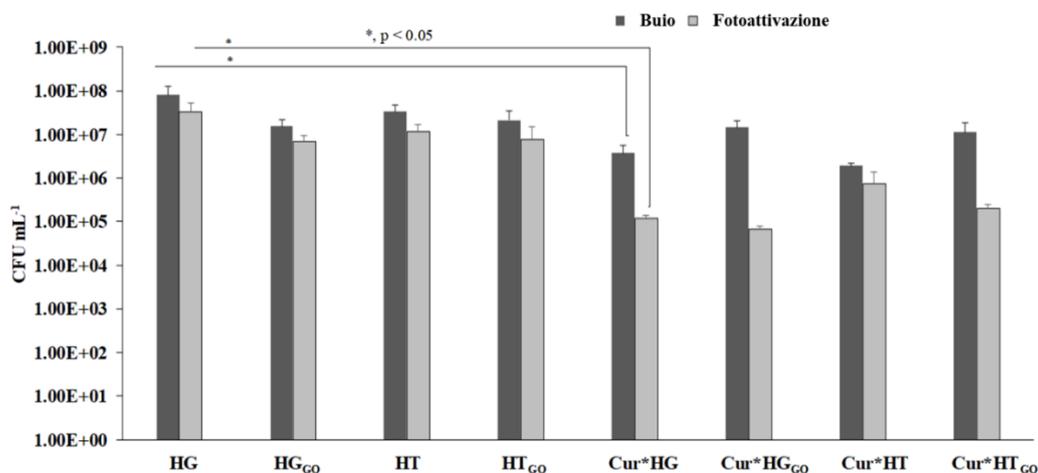
La selezione di un materiale idoneo alla medicazione delle ferite è essenziale non solo per accelerare il processo di guarigione, ma anche per ridurre al minimo il rischio di infezione e proteggere le ferite dai batteri patogeni e dalla proliferazione della flora cutanea.

Al fine di valutare la capacità degli idrogel di inibire l'adesione batterica, in collaborazione con la Charité Universitätsmedizin Berlin (Germania) è stata valutata la presenza di *Staphylococcus aureus* (MRSA) sui materiali, dopo un opportuno tempo di incubazione.

Come mostrato in Figura 2.1.8, MRSA è in grado di aderire e replicarsi su tutti i materiali testati, sia proteici che ibridi, dopo 24 ore di incubazione. L'aggiunta di GO non influenza l'adesione batterica; tuttavia la presenza di Cur determina la riduzione del valore di CFU mL<sup>-1</sup> di più di un'unità logaritmica nel caso dell'idrogel costituito da Try o Gel rispetto agli stessi materiali senza Cur. La

[25] Pasquier, E.; Street, J.; Pouchy, C.; Carre, M.; Gifford, A.J.; Murray, J.; Norris, M.D.; Trahair, T.; Andre, N.; Kavallaris, M. B-blockers increase response to chemotherapy via direct antitumour and anti-angiogenic mechanisms in neuroblastoma. *Brit. J. Cancer* **2013**; 108: 2485-2494.

presenza di batteri su tutti gli idrogel senza Cur suggerisce quindi che il caricamento di agenti antimicrobici efficaci sia un passaggio cruciale per prevenire la proliferazione batterica.



**Figura 2.1.8** Effetto della curcumina rilasciata sull'inibizione dell'adesione di *Staphylococcus aureus* sugli idrogel con e senza fotoattivazione

Cur è una molecola antimicrobica in grado di causare una riduzione del valore di CFU mL<sup>-1</sup> di 6 unità logaritmiche quando somministrata a concentrazioni molto elevate (200-500 µg mL<sup>-1</sup>); quindi il rilascio di questa molecola gioca un ruolo chiave nella diminuzione della carica batterica. Inoltre, essendo un fotosensibilizzatore, quando irradiata con luce a bassa energia in presenza di ossigeno, Cur dà luogo ad una serie di reazioni eventi che portano alla generazione di specie reattive all'ossigeno, come i radicali idrossilici, i superossidi e l'ossigeno singoletto, che sono citotossici per le cellule microbiche [26]. D'altra parte, la sua trascurabile tossicità su cellule e tessuti di mammifero ne dimostra la validità come fotosensibilizzante altamente biocompatibile [27].

La diversa attività di Cur su cellule epiteliali e batteriche è correlata al loro diverso metabolismo: le cellule con tassi di proliferazione più elevati come le cellule microbiche e cancerose, sono più sensibili a una maggiore produzione di ROS e manifestano evidenti segni di tossicità dopo l'incubazione con polifenoli [28].

Nelle nostre condizioni sperimentali, la fotoattivazione dei campioni caricati con Cur determina una riduzione di quasi 2 log CFU mL<sup>-1</sup> rispetto a quanto registrato nel caso degli analoghi materiali

[26] Neelakantan, P.; Cheng, C.Q.; Ravichandran, V.; Mao, T.; Sriraman, P.; Sridharan, S.; Subbarao, C.; Sharma, S.; Kishen, A. Photoactivation of curcumin and sodium hypochlorite to enhance antibiofilm efficacy in root canal dentin. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2015**;12: 108-114.

[27] George, S.; Kishen, A. Advanced Noninvasive Light-activated Disinfection: Assessment of Cytotoxicity on Fibroblast Versus Antimicrobial Activity Against *Enterococcus faecalis*. *J. Endodon.* **2007**; 33: 599-602.

[28] Castro Nava, A.; Cojoc, M.; Peitzsch, C.; Cirillo, G.; Kurth, I.; Fuessel, S.; Erdmann, K.; Kunhardt, D.; Vittorio, O.; Hampel, S.; Dubrovskaya, A. Development of novel radiochemotherapy approaches targeting prostate tumor progenitor cells using nanohybrids. *Int. J. Cancer* **2015**; 137: 2492-2503.

testati in assenza di fotoattivazione. Inoltre si registra un'adesione batterica significativamente inferiore (da 2 a 3 log CFU mL<sup>-1</sup>) rispetto a quanto avviene sugli stessi materiali fotoattivati ma non caricati con Cur.

### **2.1.6 Conclusioni**

Idrogel ibridi multifunzionali contenenti grafene ossido, gelatina o tripsina sono risultati materiali versatili per applicazioni come medicazioni intelligenti per le ferite cutanee.

Le molteplici funzionalità dei materiali proposti, ognuna rivolta ad una specifica esigenza del processo di guarigione, li rendono uno strumento promettente per il trattamento delle ferite cutanee.

GO conferisce stabilità termica e meccanica al reticolo polimerico, nonché un'elevata elettrosensibilità, consentendo la modulazione delle cinetiche di rilascio di una molecola bioattiva in funzione delle diverse esigenze terapeutiche. Rilasci prolungati sono registrati a 0 V, mentre l'applicazione di una differenza di potenziale pari a 24 V determina un considerevole aumento della cinetica di rilascio; a 12 e 48 V si registrano velocità intermedie.

La presenza di materiali proteici assicura elevati livelli di biocompatibilità, come confermato dall'assenza di qualsiasi traccia di modificazione nella morfologia cellulare di cellule MRC-5 incubate in presenza dei materiali di medicazione.

Il mantenimento dell'attività proteolitica della Tripsina permette di ampliare le potenzialità applicative dei dispositivi ibridi ai casi in cui è richiesta la degradazione delle proteine nel sito di guarigione.

Infine, il caricamento di Cur si è rivelata una strategia utile per realizzare un dispositivo funzionale in grado di preservare il sito di guarigione dalle infezioni microbiche, principalmente in seguito a fotoattivazione.

## 2.2 Idrogel antiossidanti sensibili a stimoli esterni <sup>1</sup>

### 2.2.1 Premessa

Il lavoro si inserisce nell'ambito della sintesi di idrogel sensibili a stimoli esterni per il rilascio controllato di molecole biologicamente attive che presentano, allo stesso tempo, proprietà funzionali dovute a molecole biologicamente attive immobilizzate all'interno del reticolo polimerico; tali peculiarità permettono di ipotizzare l'applicabilità dei sistemi proposti sia in campo biomedico-farmaceutico che in quello del *packaging* alimentare <sup>[2,3]</sup> (Figura 2.2.1).

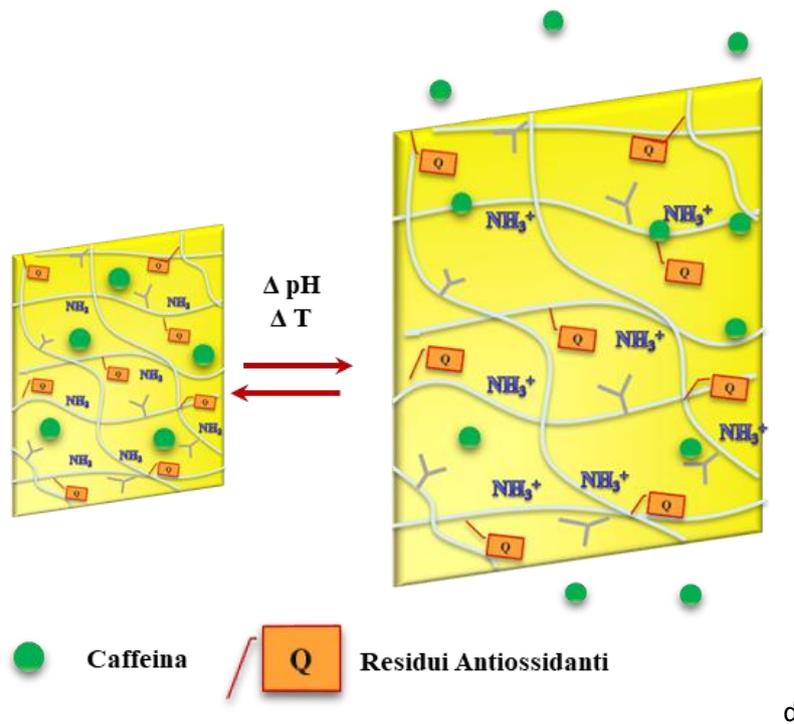


Figura 2.2.1 Rappresentazione degli idrogel funzionali oggetto del presente studio

La procedura sintetica prevede l'iniziale funzionalizzazione del Chitosano (CHIT) con il flavonoide Quercetina (Q) mediante reazione di *grafting* radicalico e successivo suo inserimento del coniugato CHITQ in un reticolo polimerico idrorigonfiabile di natura acrilica.

<sup>[1]</sup> Cirillo, G.; Curcio, M.; Spizzirri, U.G.; Vittorio, O.; Valli, E.; Farfalla, A.; Leggio, A.; Nicoletta, F.P.; Iemma, F. Chitosan–Quercetin Bioconjugate as Multi-Functional Component of Antioxidants and Dual-Responsive Hydrogel Networks. *Macromol. Mater. Eng.* **2019**; 304: 1800728

<sup>[2]</sup> Hamed, H.; Moradi, S.; Hudson, S.M.; Tonelli, A.E. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydr. Polym.* **2018**; 199: 445-460.

<sup>[3]</sup> Rafique, A.; Mahmood Zia, K.; Zuber, M.; Tabasum, S.; Rehman, S. Chitosan functionalized poly(vinyl alcohol) for prospects biomedical and industrial applications: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**; 87: 141-154.

L'idrogel così ottenuto (HQ) è stata caratterizzato in termini di affinità per l'acqua a diversi valori di pH e temperatura, e in seguito testato come sistema per il rilascio controllato di un farmaco modello quale la caffeina. I profili di rilascio sono stati analizzati mediante modelli matematici per definire i meccanismi di rilascio e determinarne i parametri cinetici. Infine, è stato valutato come la temperatura vada ad influenzare le proprietà antiossidanti dei sistemi polimerici reticolati.

### 2.2.2 Sintesi del coniugato chitosano-quercetina

La coniugazione di Q alla catena polimerica del CHIT è stata effettuata mediante una procedura di *grafting* radicalico opportunamente modificata, che prevede l'utilizzo di  $H_2O_2$  in ambiente alcalino come sistema iniziatore (Figura 2.2.2).

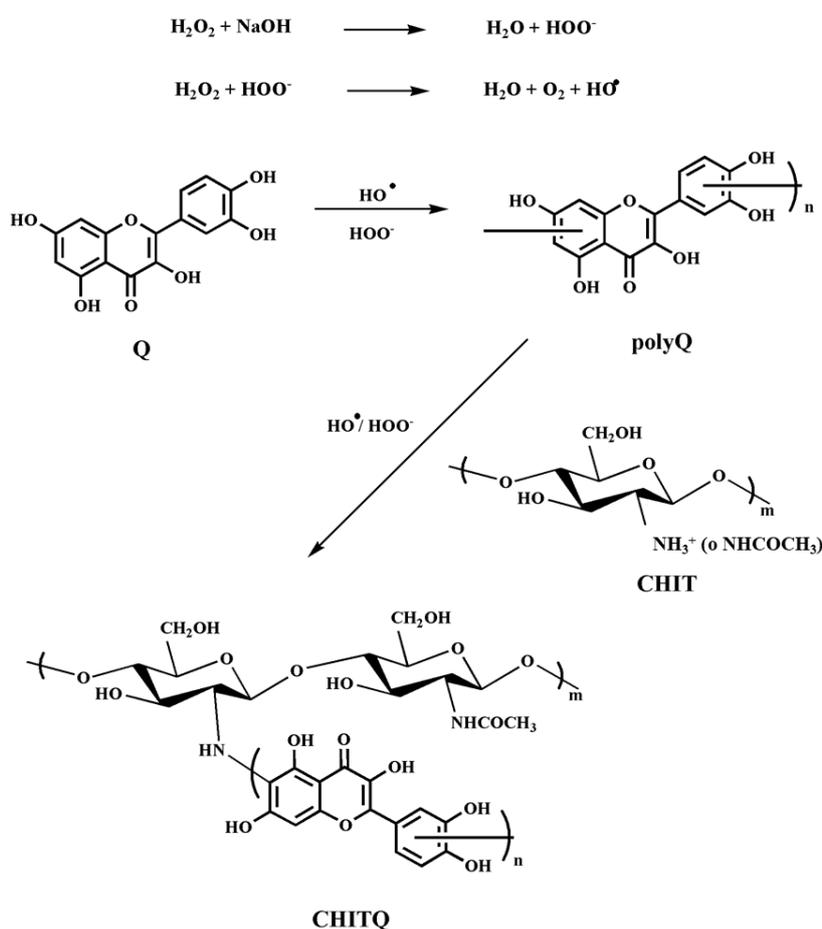


Figura 2.2.2 Rappresentazione della sintesi del coniugato CHITQ

Il meccanismo di reazione ipotizzato prevede la generazione di radicali idrossilici per reazione tra  $H_2O_2$  e  $NaOH$  <sup>[4]</sup>, con la successiva ossidazione di Q e formazione di radicali alcossilici che, a causa

<sup>[4]</sup> Gu, X.; Cheng, K.; He, M.; Shi, Y.; Li, Z. La-modified SBA-15/ $H_2O_2$  systems for the microwave assisted oxidation of organosolv beech wood lignin. *Maderas Ciencia y Tecnologia* **2012**; 14: 31-41.

dell'elevata reattività, vanno incontro a oligomerizzazione con formazione di polyQ [5]. L'aggiunta di CHIT nell'ambiente di reazione porta alla produzione di macro-radicali [6] che vanno incontro a reazione di *coupling* con Q o polyQ, portando alla formazione del coniugato CHITQ [7].

Nelle stesse condizioni di reazione, ma in assenza di Q, è stato anche preparato un polimero di controllo (CHITB).

### 2.2.3 Caratterizzazione del coniugato chitosano quercetina

Il coniugato CHITQ è stato caratterizzato mediante analisi <sup>1</sup>H-NMR al fine di dimostrare la coniugazione covalente di Q con CHIT e determinare il grado di funzionalizzazione espresso come mg di Q per grammo di coniugato (Figura 2.2.3).

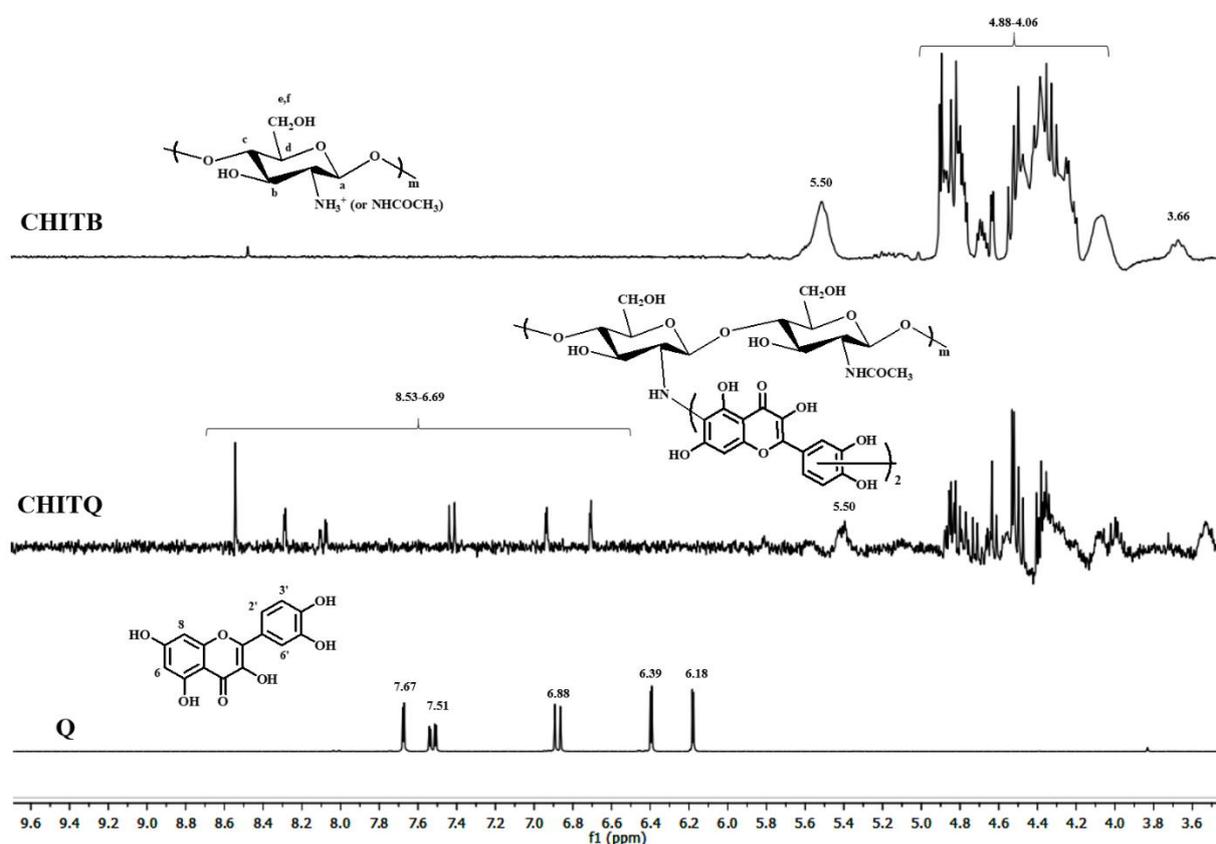


Figura 2.2.3 Spettro <sup>1</sup>H-NMR di CHITB, Q e CHITQ

[5] Bruno, F.F.; Trotta, A.; Fossey, S.; Nagarajan, S.; Nagarajan, R.; Samuelson, L.A.; Kumar, J. Enzymatic synthesis and characterization of polyquercetin. *J. Macromol. Sci. A Pure Appl. Chem.* **2010**; 47: 1191-1196.

[6] Zhang, X.; Liu, J.; Qian, C.; Kan, J.; Jin, C. Effect of grafting method on the physical property and antioxidant potential of chitosan film functionalized with gallic acid. *Food Hydrocoll.* **2019**; 89: 1-10.

[7] Jing, Y.; Huang, J.; Yu, X. Preparation, characterization, and functional evaluation of proanthocyanidin-chitosan conjugate. *Carbohydr. Polym.* **2018**; 194: 139-145.

In analogia a quanto riportato in letteratura <sup>[8]</sup>, lo spettro <sup>1</sup>H-NMR di CHITB mostra segnali a 3.66 (H<sub>b</sub>), 4.06-4.88 (H<sub>c-f</sub>) e 5.50 (H<sub>a</sub>) ppm, mentre i picchi relativi ai protoni aromatici (4H) sono registrati nello spettro della Q libera a 6.18 (H<sub>6</sub>), 6.39 (H<sub>8</sub>), 6.88 (H<sub>2</sub>), 7,51 (H<sub>3</sub>), 7,67 (H<sub>6</sub>) ppm <sup>[9]</sup>. L'effettiva coniugazione tra CHIT e Q è dimostrata dalla comparsa, nello spettro di CHIQ, del segnale H<sub>6</sub> che conferma il coinvolgimento di questa posizione nella reazione di coniugazione. Inoltre, la presenza di segnali nella regione 8.07 - 8.53 ppm assenti nello spettro Q, unitamente all'intensità relativa di tutti i protoni aromatici (6.69 - 8.53 ppm, 8H), consente di ipotizzare la presenza di dimeri Q legati al CHIT. Questa affermazione è supportata dai dati di letteratura, che correlano la presenza di protoni aromatici di Q a campi bassi con la formazione di polyQ <sup>[10]</sup>.

Applicando l'equazione (2.9), è possibile calcolare un grado di funzionalizzazione F pari a 275 mg di Q per grammo di CHITQ:

$$F = \frac{n \frac{1}{m} I_Q \cdot M_{w1}}{I_C \cdot M_{w2} + n \frac{1}{m} I_Q \cdot M_{w1}} \quad (2.9)$$

In cui,  $I_Q$  rappresenta l'intensità relativa di tutti i protoni aromatici dei residui di Q (6.69 – 8.53 ppm),  $I_C$  l'intensità del protone anomero CHIT (5.50 ppm),  $n$  il numero di unità ripetitive di Q presenti (2),  $m$  il numero di protoni aromatici (8), mentre  $M_{w1}$  (302.24 g mol<sup>-1</sup>) e  $M_{w2}$  (175.42 g mol<sup>-1</sup>) sono rispettivamente il peso molecolare di Q e delle unità ripetitive di glucosamina in CHIT (grado di deacetilazione del 75%).

La caratterizzazione termica di CHITQ è stata eseguita registrando i termogrammi DSC di CHITB, CHITQ e Q.

La curva DSC di Q mostra tre picchi di transizione di fase assegnati alla perdita d'acqua (118 °C, endotermico), al punto di fusione (305 °C, endotermico) e al processo di decomposizione iniziale (332 °C, esotermico) <sup>[11]</sup>. Nel caso di CHITB e CHITQ, si registrano ampi picchi esotermici (250-395 °C), che si riferiscono all'effetto esotermico complessivo della decomposizione <sup>[12]</sup>. I valori di  $\Delta H$  si spostano da 464.44 (CHITB) a 475.62 (CHITQ) J g<sup>-1</sup>, probabilmente come conseguenza del

<sup>[8]</sup> Tang, D.L.; Song, F.; Chen, C.; Wang, X.L.; Wang, Y.Z. A pH responsive chitosan-b-poly(p-dioxanone) nanocarrier: formation and efficient antitumor drug delivery. *Nanotechnology* **2013**; 24: 145101-145110.

<sup>[9]</sup> Kyriakou, E.; Primikyri, A.; Charisiadis, P.; Katsoura, M.; Gerothanassis, I.P.; Stamatidis, H.; Tzakos, A.G. Unexpected enzyme-catalyzed regioselective acylation of flavonoid aglycones and rapid product screening. *Org. Biomol. Chem.* **2012**; 10: 1739-1742.

<sup>[10]</sup> Khlupova, M.E.; Vasil'Eva, I.S.; Shumakovich, G.P.; Morozova, O.V.; Chertkov, V.A.; Shestakov, A.K.; Kisin, A.V.; Yaropolov, A.I. Enzymatic polymerization of dihydroquercetin using bilirubin oxidase. *Biochemistry* **2015**; 80: 233-241.

<sup>[11]</sup> Da Costa, E.M.; Barbosa Filho, J.M.; Do Nascimento, T.G.; Macêdo, R.O. Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. *Thermochim. Acta* **2002**; 392-393: 79-84.

<sup>[12]</sup> Yuan, Y.; Chesnutt, B.M.; Haggard, W.O.; Bumgardner, J.D. Deacetylation of chitosan: Material characterization and in vitro evaluation via albumin adsorption and pre-osteoblastic cell cultures. *Materials* **2011**; 4: 1399-1416.

legame covalente tra CHIT e Q che determina la formazione di una struttura polimerica più stabile (Figura 2.2.4).

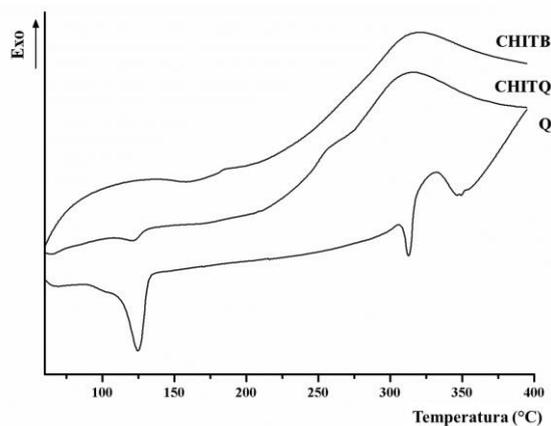


Figura 2.2.4 Termogrammi DSC di CHITB, Q e CHITQ

L'attività antiossidante di CHITQ è stata valutata mediante determinazione del potere redox e della capacità scavenger nei confronti dei radicali idrofobici DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile) e idrofilici ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico).

Poiché l'attività redox deriva dalla presenza dei gruppi fenolici, la loro determinazione è stata effettuata mediante il saggio di Folin-Ciocalteu, ottenendo un valore pari a 0.595 milliequivalenti di Q per grammo di CHITQ.

L'attività scavenger è invece espressa come concentrazione di coniugato necessaria a garantire un decadimento del 50% della concentrazione iniziale dei radicali utilizzati ( $IC_{50}$ ). Sono stati ottenuti valori pari a  $2.1 \cdot 10^{-2}$  e  $5.1 \cdot 10^{-3}$  mg mL<sup>-1</sup> rispettivamente per il radicale DPPH e ABTS, che corrispondono ad una concentrazione equivalente in Q pari a  $5.78 \cdot 10^{-3}$  e  $1.4 \cdot 10^{-3}$  mg mL<sup>-1</sup>. Il confronto di questi valori con quelli ottenuti utilizzando il flavonoide libero ( $0.92 \cdot 10^{-3}$  e  $1.1 \cdot 10^{-3}$  mg mL<sup>-1</sup>)<sup>[13]</sup>, indica chiaramente che l'attività scavenger di Q si è mantenuta maggiormente nei confronti dei radicali idrofilici. Questi dati indicano una maggiore efficienza antiossidante del coniugato polimerico in un ambiente acquoso piuttosto che in uno organico.

Il metodo dell'ABTS è anche utile come metodologia per valutare la quantità di radicali che possono essere bloccati da una determinata specie antiossidante, espressa come equivalenti di Trolox

<sup>[13]</sup> Zuo, A.; Yanying, Y.; Li, J.; Binbin, X.; Xiongying, Y.; Yan, Q.; Shuwen, C. Study on the relation of structure and antioxidant activity of isorhamnetin, quercetin, phloretin, silybin and phloretin isonicotinylnyl hydrazone. *Free Radicals Antioxid.* **2011**; 1(4): 39-47.

(TEAC) <sup>[14]</sup>. Nel nostro caso, considerando il grado di funzionalizzazione del coniugato, il valore di TEAC risulta essere pari a 2.83, che è 2.2 volte inferiore rispetto a quello della Q libera (6.24) <sup>[15]</sup>.

#### 2.2.4 Sintesi degli idrogel

Gli idrogel (HQ) sono stati sintetizzati mediante polimerizzazione radicalica del coniugato CHITQ in presenza di N-isopropil acrilamide (NIPAAm), acrilamide (AAm) e metilenbisacrilamide (MEBA) in qualità rispettivamente di monomero termosensibile, plasticizzante e reticolante (Figura 2.2.5).

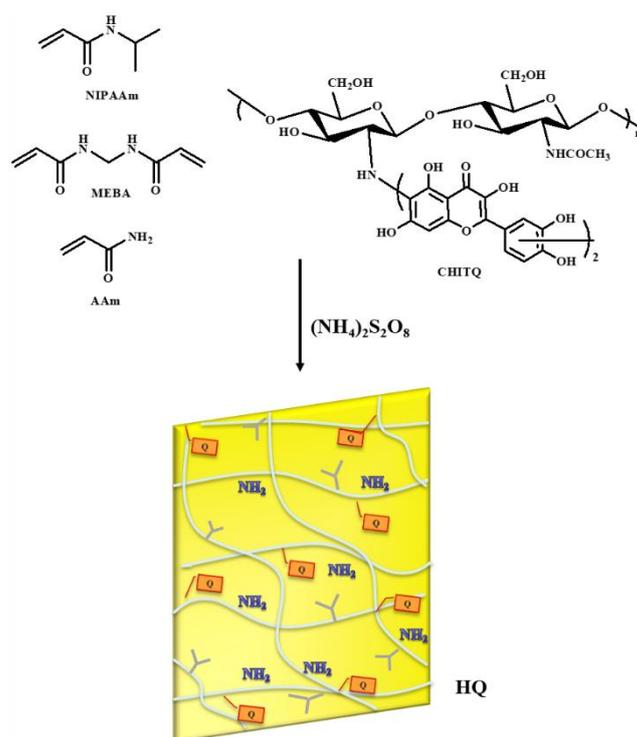


Figura 2.2.5 Rappresentazione della sintesi dell'idrogel HQ

Un idrogel di controllo (HB) è stato preparato inserendo CHITB al posto di CHITQ nella miscela di prepolimerizzazione. Nella struttura dell'idrogel HQ, i gruppi isopropilici del NIPAAm agiscono da elementi termosensibili, i gruppi amminici del chitosano come elementi pH sensibili e i residui di Q sono responsabili dell'attività antiossidante.

<sup>[14]</sup> Apak, R.; Güçlü, K.; Demirata, B.; Özyürek, M.; Çelik, S.E.; Bektaşoğlu, B.; Berker, K.I.; Özyurt, D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* **2007**; 12: 1496-1547.

<sup>[15]</sup> Arts, M.J.T.J.; Sebastiaan Dallinga, J.; Voss, H.-P.; Haenen, G.R.M.M.; Bast, A. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem.* **2004**; 88: 567-570.

### 2.2.5 Caratterizzazione degli idrogel

Gli spettri FTIR mostrano la presenza dei residui di Q nel campione HQ. Gli spettri HB e HQ mostrano le bande tipiche di stretching relative ai gruppi OH e NH<sub>2</sub> (~ 3400 cm<sup>-1</sup>), C=O (1650 cm<sup>-1</sup>), CN (~ 1450 cm<sup>-1</sup>) e CO (~ 1100 cm<sup>-1</sup>), correlate alla presenza di residui di CHIT, AAm, NIPAAm e MEBA. Inoltre, la presenza di Q in HQ è evidenziata dalla presenza di una banda più ampia di stretching C=O aril-chetonico a 1660 cm<sup>-1</sup>, e dalla comparsa di una nuova banda a 878 cm<sup>-1</sup> imputabile al bending fuori dal piano dei CH aromatici <sup>[16]</sup> (Figura 2.2.6).

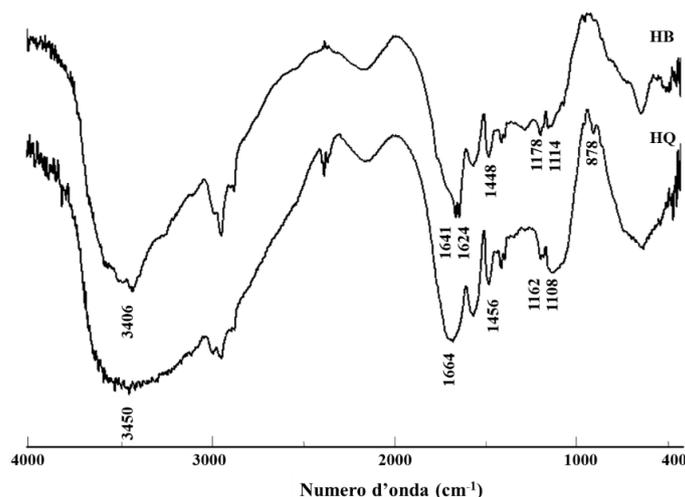


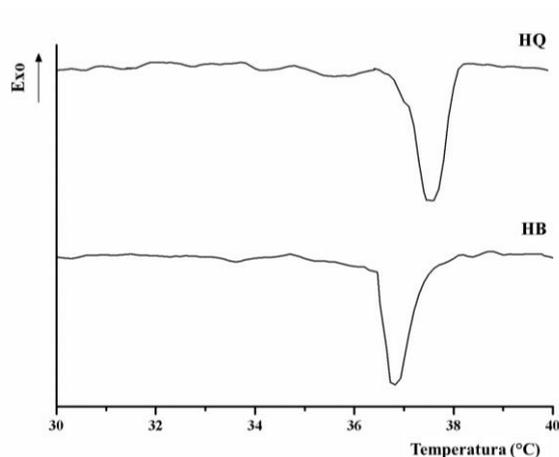
Figura 2.2.6 Spettri FTIR di HQ e HB

Analisi termiche DSC sugli idrogel allo stato rigonfiato hanno poi permesso di valutarne il comportamento termosensibile e di determinare i valori di LCST (temperatura di soluzione critica inferiore), che corrispondono al valore di temperatura in cui iniziano ad essere visibili i picchi endotermici corrispondenti alla rottura dei legami ad idrogeno tra acqua e gruppi amminici del NIPAAm <sup>[17]</sup>. I valori ottenuti (36.4 °C per HB e 37.1 °C per HQ) indicano un aumento significativo di LCST rispetto agli idrogel costituiti esclusivamente da NIPAAm (LCST di circa 31 °C) a causa della presenza di residui idrofilici (chitosano e Q) all'interno del network polimerico. La temperatura di transizione è infatti strettamente correlata al bilancio idrofilia/idrofobia: l'inserimento di frazioni idrofile determina un innalzamento della temperatura necessaria sia per la rottura delle interazioni polimero-acqua che per la formazione di interazioni idrofobiche tra i gruppi isopropilici che

<sup>[16]</sup> Catauro, M.; Papale, F.; Bollino, F.; Piccolella, S.; Marciano, S.; Nocera, P.; Pacifico, S. Silica/quercetin sol-gel hybrids as antioxidant dental implant materials. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2015**; 16: 035001.

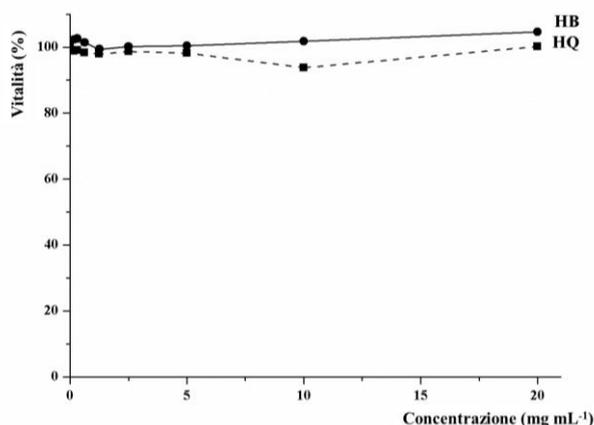
<sup>[17]</sup> Tsai, M.-C.; Shih, C.-M.; Lue, S.J. Drug permeation behavior through thermo- and pH-responsive polycarbonate-g-poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) composites. *Polym. Bull.* **2013**; 70: 1003-1017.

determinano la contrazione dell'idrogel <sup>[18]</sup>. I termogrammi DSC di HQ e HB sono riportati in Figura 2.2.7.



**Figura 2.2.7** Termogrammi DSC di HB e HQ

La biocompatibilità degli idrogel HB e HQ è stata valutata in collaborazione con il Children's Cancer Institute, Lowy Cancer Research Centre, University of New South Wales (Australia) su fibroblasti polmonari umani MRC-5, poiché queste cellule, come riportato precedentemente (vedi paragrafo 2.1.5), presentano un'elevata sensibilità al trattamento con specie chimiche di diversa natura. L'assenza di significativi segni di tossicità può essere quindi utilizzata come valutazione preliminare di biocompatibilità di un biomateriale <sup>[19]</sup>. Come evidente dai dati riportati in Figura 2.2.8, HB e HQ sono risultati altamente biocompatibili, con valori di vitalità superiori al 90% in tutto l'intervallo di concentrazioni testate (0-20 mg mL<sup>-1</sup>).



**Figura 2.2.8** Vitalità delle cellule MRC-5 in seguito ad incubazione con HB e HQ

<sup>[18]</sup> Fundueanu, G.; Constantin, M.; Bucatariu, S.; Ascenzi, P. pH/thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-maleic acid) hydrogel with a sensor and an actuator for biomedical applications. *Polymer* **2017**; 110: 177-186.

<sup>[19]</sup> Pasquier, E.; Street, J.; Pouchy, C.; Carre, M.; Gifford, A.J.; Murray, J.; Norris, M.D.; Trahair, T.; Andre, N.; Kavallaris, M. B-blockers increase response to chemotherapy via direct antitumour and anti-angiogenic mechanisms in neuroblastoma. *Brit. J. Cancer* **2013**; 108: 2485-2494

Il profilo di swelling di HQ è stato valutato a valori di temperatura al di sotto (25 °C) e al di sopra (40 °C) a quello della LCST, e a pH inferiori (2.0 e 5.0) e superiori (7.0) al pK<sub>b</sub> (6.5) dei gruppi amminici del CHIT (Tabella 2.2.1).

**Tabella 2.2.1** Grado di rigonfiamento e diametro medio dei pori per HQ e HB

Campione	WR [%]						Diametro Pori $\zeta$ [nm]					
			pH						pH			
			2.0	5.0	7.0				2.0	5.0	7.0	
	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C
<b>HQ</b>	429±4	325±5	311±3	283±2	303±5	242±4	33±2	22±1	23±2	20±2	21±2	18±1
<b>HB</b>	368±5	342±5	335±4	299±2	330±6	260±5	27±1	26±1	24±1	22±3	23±2	19±1

Il comportamento di swelling è influenzato sia dalla presenza dei residui di chitosano che di quelli di NIPAAm: il chitosano determina un maggiore assorbimento di acqua a pH 2.0 e 5.0 rispetto a 7.0, a causa della ionizzazione dei gruppi NH<sub>2</sub>, mentre i residui isopropilici del NIPAAm determinano rigonfiamento a 25 °C e contrazione a 40 °C. Inoltre, l'effetto del pH risulta essere maggiormente evidente a pH 2.0 che a pH 5.0, a causa del maggior grado di ionizzazione dei gruppi NH<sub>2</sub>. Le variazioni di pH influenzano maggiormente l'affinità per l'acqua rispetto a quanto faccia la temperatura; i due stimoli agiscono in maniera sinergica nelle condizioni pH 7.0/40 °C e pH 2.0/25 °C, che corrispondono rispettivamente al minimo e massimo grado di swelling. Le fasi di rigonfiamento/contrazione dell'idrogel sono associate a una variazione significativa del diametro medio dei pori ( $\zeta$ ), calcolato secondo il modello di Flory-Rehmer in accordo all'equazione 1.10 (Vedi introduzione) <sup>[20]</sup>:

$$\xi = 0.071\phi^{-1/3}\sqrt{M_c} \quad (1.10)$$

Il grado di rigonfiamento influenza anche le proprietà antiossidanti di HQ, mentre HB non mostra nessuna interferenza nei test effettuati. Infatti, nello stato rigonfio risultano massimizzate le interazioni tra i residui di Q e le specie ossidanti, e si registra una maggiore attività nei saggi Folin-Ciocalteu o DPPH / ABTS. Più in dettaglio, il potere redox (saggio di Folin-Ciocalteu) è quasi 4 volte superiore a 25 °C (5.50 mg Q per g) che a 40 °C (1.43 mg Q per g), mentre i valori di IC<sub>50</sub> per ABTS e DPPH risultano essere aumentati di 2.5 volte (2.61 contro 6.50 mg mL<sup>-1</sup>) e 4 volte (0.25 contro 1.01 mg mL<sup>-1</sup>) nello stato di contrazione del reticolo polimerico. La possibilità di modulare l'attività antiossidante è un valore aggiunto del sistema proposto sia per applicazioni biomediche che alimentari: la capacità di bloccare radicali liberi, infatti, può aiutare a preservare l'ambiente biologico

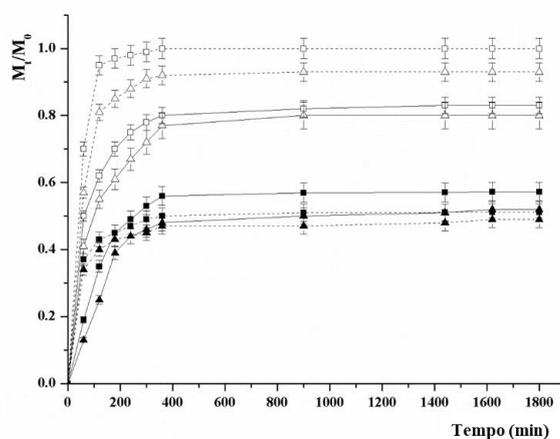
<sup>[20]</sup> Kulkarni, A.R.; Soppimath, K.S.; Aminabhavi, T.M.; Dave, A.M. Mehta M.H. Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate beads containing liquid pesticide for soil application. *J. Control. Release* **2000**; *63*: 97-105

dallo stress ossidativo <sup>[21]</sup>, ma anche contribuire a prolungare la durata di conservazione dei prodotti alimentari <sup>[22]</sup>.

### 2.2.6 Determinazione dei profili di rilascio

Per dimostrare l'applicabilità di HQ come sistema di veicolazione sensibile a stimoli esterni di doppia natura (pH e temperatura), la caffeina è stata scelta come agente bioattivo modello in virtù delle sue proprietà biologiche, quali ad esempio il miglioramento della microcircolazione sanguigna e l'attivazione della lipolisi <sup>[23]</sup>, nonché per le sue potenzialità applicative nel *packaging* alimentare <sup>[24]</sup>. La caffeina è stata caricata negli idrogel mediante impregnazione registrando un'efficienza di caricamento maggiore dell'85% per entrambi gli idrogel e una percentuale di caricamento (DL %), di 8.0 e 8.5 rispettivamente per HB e HQ. La leggera differenza nei valori DL può essere correlata alla capacità dei residui di Q di interagire con le molecole organiche attraverso interazioni aromatiche, con conseguente maggiore affinità per la caffeina.

I profili di rilascio sono stati determinati mediante analisi HPLC e la quantità di farmaco rilasciato è stata espressa come percentuale di farmaco rilasciato in relazione alla dose totale effettivamente caricata (Figura 2.2.9).



**Figura 2.2.9** Profili di rilascio di caffeina da HQ (quadrati) e HB (triangoli) a 25°C (linee continue) e 40°C (linee tratteggiate) a pH 2.0 (simboli vuoti) e pH 7.0 (simboli pieni)

<sup>[21]</sup> Yang, J.; Van Lith, R.; Baler, K.; Hoshi, R.A.; Ameer, G.A. A thermoresponsive biodegradable polymer with intrinsic antioxidant properties. *Biomacromolecules* **2014**; 15: 3942-3952.

<sup>[22]</sup> Panzella, L.; Cerruti, P.; Ambrogi, V.; Agustin-Salazar, S.; D'Errico, G.; Carfagna, C.; Goya, L.; Ramos, S.; Martín, M.A.; Napolitano, A.; D'Ischia, M. A Superior All-Natural Antioxidant Biomaterial from Spent Coffee Grounds for Polymer Stabilization, Cell Protection, and Food Lipid Preservation. *ACS Sust. Chem. Eng.* **2016**; 4: 1169-1179.

<sup>[23]</sup> Simsolo, E.E.; Eroglu, İ.; Tanrıverdi, S.T.; Özer, Ö. Formulation and Evaluation of Organogels Containing Hyaluronan Microparticles for Topical Delivery of Caffeine. *AAPS PharmSciTech* **2018**; 19: 1367-1376.

<sup>[24]</sup> Lavoine, N.; Guillard, V.; Desloges, I.; Gontard, N.; Bras, J. Active bio-based food-packaging: Diffusion and release of active substances through and from cellulose nanofiber coating toward food-packaging design. *Carbohydr. Polym.* **2016**; 149: 40-50.

Sulla base dei risultati dei test di swelling, gli esperimenti di rilascio sono stati eseguiti a 25 e 40 °C, e a pH 2.0 e 7.0, al fine di caratterizzare i profili di rilascio quando l'effetto dei due stimoli sull'equilibrio di rigonfiamento/contrazione degli idrogel è massimizzato.

Per una più approfondita caratterizzazione del meccanismo di rilascio, i profili di rilascio sono stati analizzati applicando il modello matematico proposto da Reis <sup>[25]</sup>, che considera il rilascio di un soluto da un dispositivo medico come un fenomeno di partizione tra il vettore e il mezzo di rilascio secondo cinetiche reversibili di primo o di secondo ordine (Equazioni 1.17 e 1.18, vedi introduzione):

$$\frac{M_t}{M_0} = M_{max} \left( 1 - e^{-\left(\frac{kr}{M_{max}}\right)t} \right) \quad (1.17)$$

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{M_{max} \left( e^{2\left(\frac{kr}{\alpha}\right)t} - 1 \right)}{1 - 2 M_{max} + e^{2\left(\frac{kr}{\alpha}\right)t}} \quad (1.18)$$

Nelle nostre condizioni sperimentali, i dati sono meglio interpolati da una cinetica di primo ordine, come evidenziato dai maggiori valori di R<sup>2</sup> ottenuti applicando l'equazione 1.17, ad eccezione dei dati registrati nelle condizioni di massimo rigonfiamento (pH = 2.0 e 25 °C), che seguono una cinetica di secondo ordine (Tabella 2.2.2).

Per meglio evidenziare l'effetto dell'applicazione degli stimoli esterni sui profili di rilascio, sono stati introdotti i rapporti tra i parametri cinetici,  $P_x^{\Delta T}$  e  $P_x^{\Delta pH}$ , ai diversi valori di pH e temperatura, calcolati in accordo all'Equazione 2.10 a, b:

$$P_x^{\Delta T} = \frac{KP_x(40^\circ C)}{KP_x(25^\circ C)} \quad (2.10a)$$

$$P_x^{\Delta pH} = \frac{KP_x(pH 7.0)}{KP_x(pH 2.0)} \quad (2.10b)$$

**Tabella 2.2.2** Valori R<sup>2</sup> e parametri cinetici secondo il modello di Reis per gli idrogel HQ e HB

Cinetica	Idrogel	T [°C]	R <sup>2</sup>		M <sub>max</sub>		α		kr		t <sub>1/2</sub> [min]	
			2.0	7.0	2.0	7.0	pH		2.0	7.0	2.0	7.0
							2.0	7.0				
Eq. 1.17	HQ	25	0.9870	0.9957	0.81	0.58	4.26	1.38	0.0107	0.0045	52.47	89.34
		40	0.9982	0.9828	0.99	0.50	99.00	1.00	0.0210	0.0099	32.68	35.00
	HB	25	0.9841	0.9824	0.79	0.52	3.77	1.08	0.0076	0.0034	72.05	106.01
		40	0.9976	0.9817	0.92	0.47	11.5	0.89	0.0149	0.0088	42.80	37.02
Eq. 1.18	HQ	25	0.9979	0.9937	0.83	0.58	4.88	1.38	0.0153	0.0049	46.70*	85.92*
		40	0.9744	0.9827	0.99	0.50	99.00	1.00	0.0633	0.0098	15.49*	35.36*
	HB	25	0.9955	0.9817	0.80	0.52	4.00	1.08	0.0104	0.0035	64.71*	104.15*
		40	0.9903	0.9809	0.94	0.47	15.67	0.89	0.0285	0.0086	31.15*	37.26*

t<sub>1/2</sub> = Eq 1.19; t<sub>1/2</sub>\* = Eq 1.20

<sup>[25]</sup> Reis, A.V.; Guilherme, M.R.; Rubira, A.F.; Muniz, E.C. Mathematical model for the prediction of the overall profile of in vitro solute release from polymer networks. *J. Colloid Interf. Sci.* **2007**; 310: 128-135.

Sono stati calcolati quattro diversi parametri P, in funzione dei due parametri cinetici considerati:  $M_{max}$  ( $x = 1$ ),  $\alpha$  ( $x = 2$ ),  $k_R$  ( $x = 3$ ) e  $t_{1/2}$  ( $x = 4$ ), come riportato nell'Equazione 2.11 a-h.

$$P_1^{\Delta T} = \frac{M_{max}(40^\circ C)}{M_{max}(25^\circ C)} \quad (2.11a)$$

$$P_1^{\Delta pH} = \frac{M_{max}(pH 7.0)}{M_{max}(pH 2.0)} \quad (2.11b)$$

$$P_2^{\Delta T} = \frac{\alpha(40^\circ C)}{\alpha(25^\circ C)} \quad (2.11c)$$

$$P_2^{\Delta pH} = \frac{\alpha(pH 7.0)}{\alpha(pH 2.0)} \quad (2.11d)$$

$$P_3^{\Delta T} = \frac{k_R(40^\circ C)}{k_R(25^\circ C)} \quad (2.11e)$$

$$P_3^{\Delta pH} = \frac{k_R(pH 7.0)}{k_R(pH 2.0)} \quad (2.11f)$$

$$P_4^{\Delta T} = \frac{t_{1/2}(40^\circ C)}{t_{1/2}(25^\circ C)} \quad (2.11g)$$

$$P_4^{\Delta pH} = \frac{t_{1/2}(pH 7.0)}{t_{1/2}(pH 2.0)} \quad (2.11h)$$

Questi parametri, riportati in Tabella 2.2.3, sono una misura quantitativa dell'effetto di uno stimolo (temperatura o pH) sui profili di rilascio quando l'altro è mantenuto costante.

L'analisi dei profili di rilascio ha evidenziato un comportamento simile dei due idrogel, senza differenze rilevanti nei valori di  $M_{max}$  registrati in ognuna delle condizioni di temperatura e pH.

Il rilascio maggiore si è registrato a pH 2.0 piuttosto che a pH 7.0, a causa del maggior grado di rigonfiamento dovuto alla repulsione elettrostatica tra le cariche positive dei gruppi amminici protonati del chitosano.

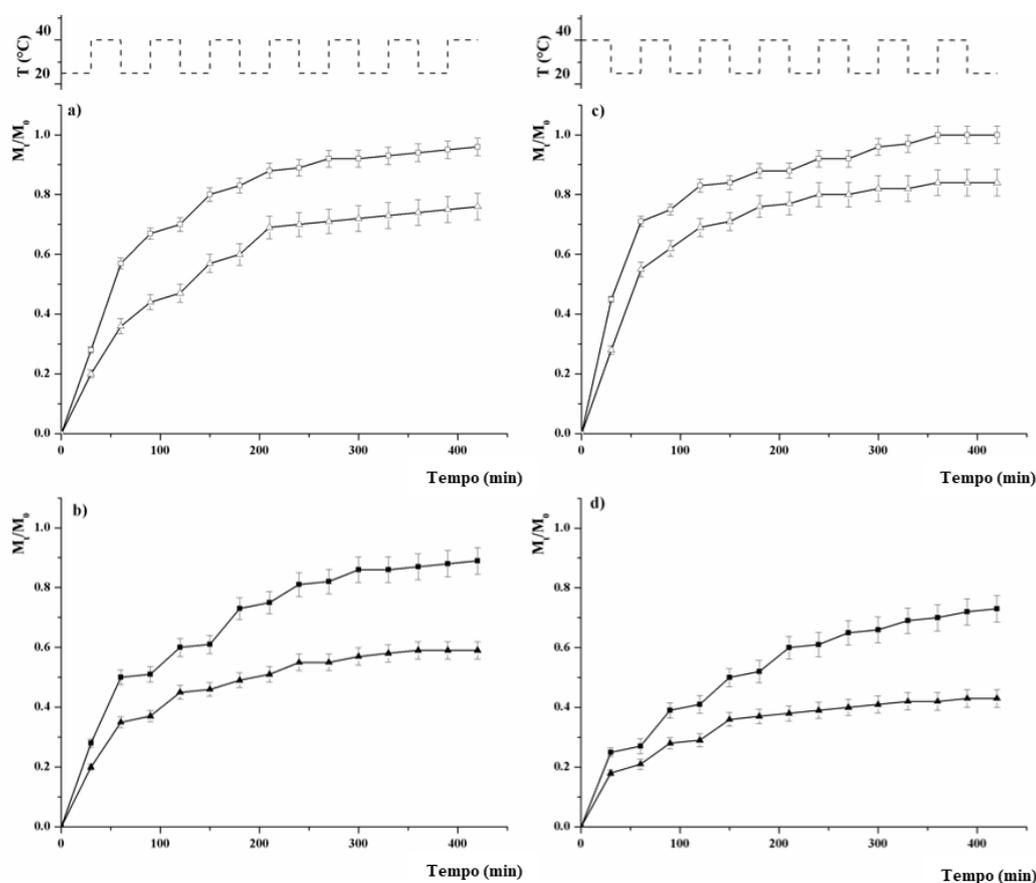
**Tabella 2.2.3** Rapporto tra i parametri cinetici ai diversi valori di pH e temperatura per gli idrogel HQ e HB

Idrogel	P <sub>1</sub>				P <sub>2</sub>				P <sub>3</sub>				P <sub>4</sub>			
	P <sub>1</sub> <sup>ΔT</sup>		P <sub>1</sub> <sup>ΔpH</sup>		P <sub>2</sub> <sup>ΔT</sup>		P <sub>2</sub> <sup>ΔpH</sup>		P <sub>3</sub> <sup>ΔT</sup>		P <sub>3</sub> <sup>ΔpH</sup>		P <sub>4</sub> <sup>ΔT</sup>		P <sub>4</sub> <sup>ΔpH</sup>	
	2.0	7.0	25°C	40°C												
<b>HQ</b>	1.19	0.86	0.70	0.51	20.29	0.72	0.28	0.01	1.37	2.20	0.29	0.47	0.70	0.39	1.91	1.07
<b>HB</b>	1.15	0.90	0.65	0.51	2.88	0.82	0.27	0.08	1.43	2.59	0.33	0.59	0.66	0.35	1.64	0.86

Le variazioni di temperatura sembrano avere invece una minore influenza sui profili di rilascio. Per entrambe le matrici, a pH 2.0, è evidente un maggiore rilascio a 40 °C rispetto a 25 °C, come conseguenza dell'effetto di contrazione ( $P_1^{\Delta T}$  rispettivamente di 1.19 e 0.86 a pH 2.0 e 7.0). Al

contrario, quando il pH è prossimo alla neutralità, la contrazione dell'idrogel dovuta al pH diventa dominante, indicando che l'affinità del farmaco per l'idrogel è principalmente influenzata dalle variazioni di pH. Questo fenomeno è evidenziato dai valori di  $P_2^{AT}$ , che sono maggiori dei corrispondenti valori di  $P_2^{\Delta pH}$ .

Successivamente è stata valutata la possibilità di utilizzare gli idrogel come dispositivi per un rilascio di tipo ON-OFF. Gli idrogel caricati sono stati ciclicamente riscaldati al di sopra della LCST e raffreddati al di sotto di tale valore mantenendo invariati i valori di pH (2.0 o 7.0). I profili di rilascio sono riportati in Figura 2.2.10.



**Figura 2.2.10** Profili di rilascio di caffeina da HQ (quadrati) e HB (triangoli). Gli idrogel sono posti inizialmente a 25°C (a-b) o 40°C (c-d), e la temperatura variata ciclicamente tra 25 e 40°C, a pH 2.0 (simboli vuoti) e pH 7.0 (simboli pieni)

Gli esperimenti sono stati avviati posizionando i campioni sia in uno stato di rigonfiamento (25 °C) che di contrazione (40 °C) e sono stati determinati i quantitativi di caffeina rilasciata nell'ambiente circostante dopo ogni variazione di temperatura. Si assiste ad un rallentamento del rilascio nelle condizioni di swelling al di sotto della LCST, ed un'accelerazione quando l'idrogel si contrae a 40°C. Nello specifico, quando i campioni sono posti ad una temperatura di 40 °C a pH 2.0,

si osserva un significativo effetto burst, con valori di rilascio approssimativamente pari al 50% dopo 30 min (Figura 2.2.10 a, c). Questa percentuale scende a valori compresi tra il 18 e il 25% quando gli idrogel sono posti a 25 °C o 40 °C, ma a pH neutro (Figura 2.2.10 b, d).

### **2.2.7 Conclusioni**

La coniugazione della quercetina al chitosano mediante reazione di *grafting* radicalico ha permesso la formazione di un bioconiugato antiossidante (CHITQ) in grado di essere inserito all'interno di un reticolo polimerico di natura acrilica. Sono stati così preparati idrogel multifunzionali che mostrano attività antiossidante modulabile così come sensibilità alle variazioni di pH e temperatura.

Il processo di bioconiugazione consente di preservare le proprietà antiossidanti di Q che, dopo inserimento nell'idrogel funzionale, possono essere modulate agendo sul profilo di rigonfiamento/contrazione tramite variazioni di temperatura intorno al valore LCST del sistema.

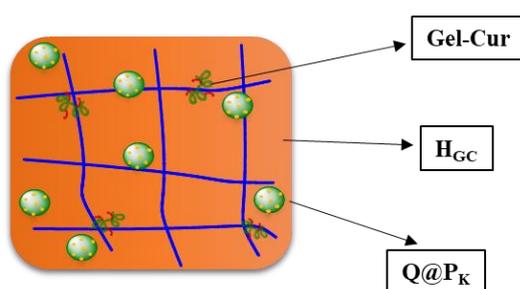
La capacità di rispondere ad un doppio stimolo, grazie ai residui di CHIT e NIPAAm, può essere sfruttata per controllare il rilascio di un farmaco modello (caffaina). Le variazioni di pH si sono dimostrate più efficaci nel modulare il rilascio: a pH 2.0, il maggior rilascio si è registrato a 40 °C, mentre a pH 7.0 la contrazione dell'idrogel diventa predominante, ostacolando quindi il rilascio. È interessante notare che si può ottenere un comportamento di tipo on/off quando la temperatura viene ciclicamente modificata tra 25 e 40 °C, sia a pH 2.0 che 7.0.

L'insieme di queste caratteristiche lascia ipotizzare un utilizzo degli idrogel multifunzionali proposti per applicazioni in campo biomedico, farmaceutico e nell'industria alimentare.

## 2.3 Sistemi multicomponente a base di idrogel antiossidanti e microparticelle autoassemblanti per il trattamento delle ferite cutanee <sup>1</sup>

### 2.3.1 Premessa

In questo lavoro viene proposto un sistema composito idrogel/microparticelle per il trattamento delle ferite e delle ustioni cutanee. L'obiettivo è quello di combinare le proprietà dei singoli componenti in un dispositivo multifunzionale. Come discusso nei paragrafi introduttivi, infatti, gli idrogel presentano i vantaggi di una elevata biocompatibilità e non antigenicità, flessibilità e capacità di mantenere un ambiente umido che favorisce il processo di guarigione <sup>[2]</sup>, mentre i sistemi microparticellari sono validi sistemi di veicolazione che garantiscono un rilascio prolungato nel tempo (Figura 2.3.1.) <sup>[3]</sup>.



**Figura 2.3.1** Rappresentazione schematica dell'idrogel composito multifunzionale oggetto del presente studio

Per la sintesi dell'idrogel e del sistema microparticellare, sono stati scelti materiali proteici quali la Gelatina (Gel) e la Cheratina (Ker), in virtù della loro elevata versatilità chimica e delle proprietà funzionali simili a quelle della naturale matrice extracellulare <sup>[4]</sup>. Nello specifico, l'idrogel (H<sub>GC</sub>) è stato sintetizzato mediante incorporazione covalente di un bioconiugato gelatina-curcumina (Gel-CUR) in un network acrilico, mentre la controparte microparticellare consiste in sistemi autoassemblanti (P<sub>K</sub>) a base di cheratina lipidizzata (l-Ker) caricati con Quercetina (Q).

<sup>[1]</sup> Di Luca, M.; Curcio, M.; Valli, E.; Cirillo, G.; Voli, F.; Butini, M.E.; Farfalla, A.; Pantuso, E.; Leggio, A.; Nicoletta, F.P.; Tavanti, A.; Iemma, F.; Vittorio, O. Combining antioxidant hydrogels with self-assembled microparticles for multifunctional wound dressings. *J. Mater. Chem. B* **2019**; 7: 4361-4370.

<sup>[2]</sup> Smithmyer, M.E.; Sawicki, L.A.; Kloxin, A.M. Hydrogel scaffolds as in vitro models to study fibroblast activation in wound healing and disease. *Biomater. Sci.* 2014; 2: 634-650.

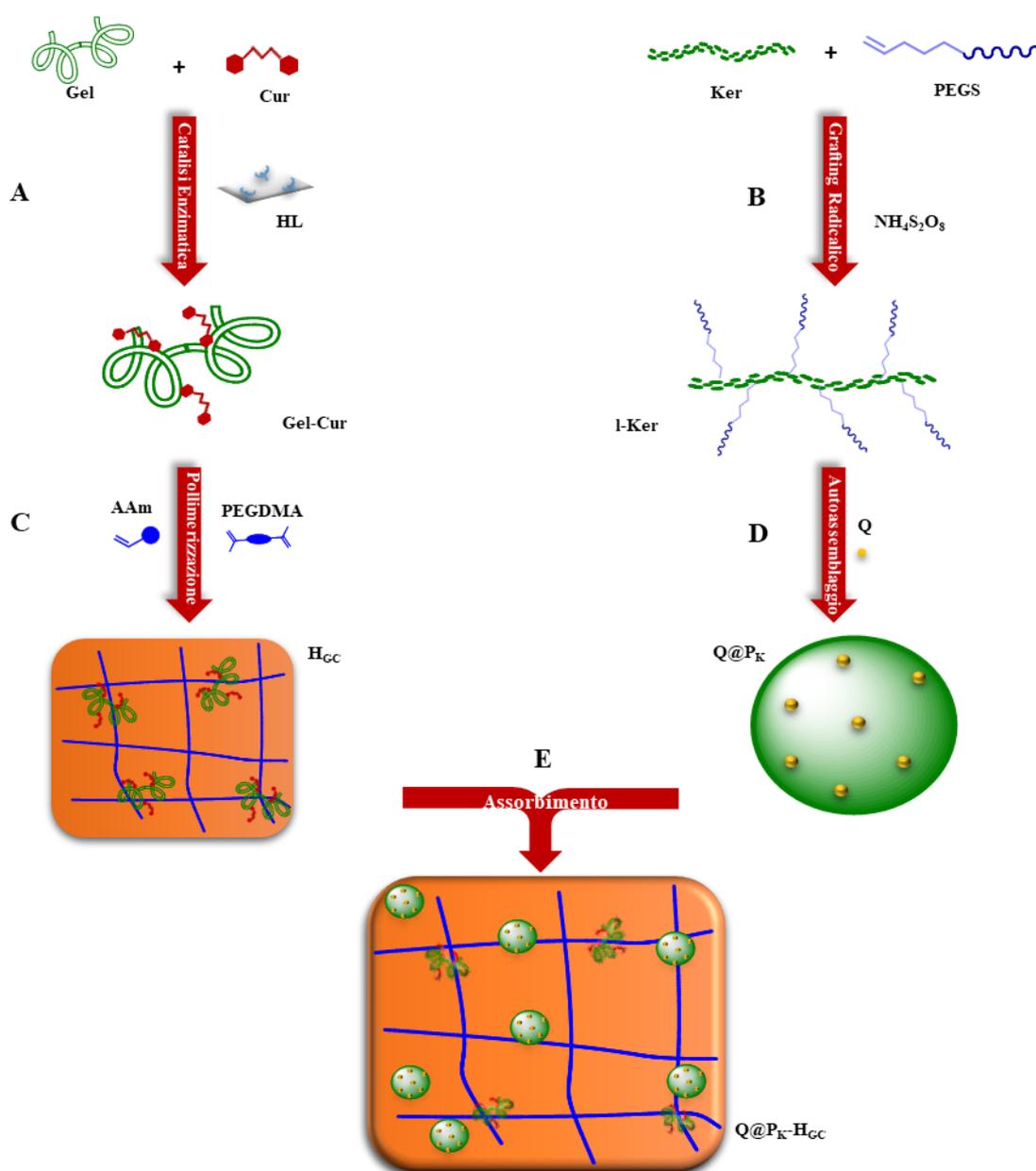
<sup>[3]</sup> Dannert, C.; Stokke, B.T.; Dias, R.S. Nanoparticle-hydrogel composites: From molecular interactions to macroscopic behavior. *Polymers* 2019; 11: 275.

<sup>[4]</sup> Thanikachalam, T.; Selvaraj, T.K.R.; Ayyappan, M.; Arumugam, G. Gap closure of different shape wounds: In vitro and in vivo experimental models in the presence of engineered protein adhesive hydrogel. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2019**; 13: 174-178.

Il materiale è progettato per ottenere due effetti principali: da una parte favorire il processo di rimarginazione di una lesione cutanea, dall'altra proteggere il sito dalla contaminazione microbica. Il primo obiettivo è raggiunto grazie alla presenza della curcumina immobilizzata nell'idrogel e al caricamento di sistemi microparticellari a base di cheratina; il secondo grazie al rilascio di una molecola con proprietà antimicrobiche quale Q.

La preparazione del sistema composito è schematizzata in Figura 2.3.2. e consiste in 3 fasi:

- i) la sintesi dei coniugati proteici, Gel-Cur (Figura 2.3.2 A) e l-Ker (Figura 2.3.2 B);
- ii) la preparazione dell'idrogel (H<sub>GC</sub>, Figura 2.3.2 C) e delle microparticelle caricate con quercetina (Q@P<sub>K</sub>, Figura 2.3.2. D);
- iii) la combinazione di H<sub>GC</sub> e P<sub>K</sub> nel dispositivo finale (Figura 2.3.2 E).



**Figura 2.3.2** Rappresentazione schematica della preparazione dell'idrogel composito multifunzionale

### 2.3.2 Sintesi e caratterizzazione del coniugato gelatina curcumina

Il coniugato Gel-Cur è stato sintetizzato tramite una reazione enzimatica in fase eterogenea che prevede l'utilizzo di un biocatalizzatore costituito da una laccasi immobilizzata (HL) su un supporto acrilico <sup>[5]</sup>. Tale approccio è stato precedentemente utilizzato per la derivatizzazione di materiali polisaccaridici e proteici con specie polifenoliche, con il vantaggio di garantire un ambiente eco- e bio-compatibile senza traccia di tossicità, e di rendere possibile l'ottenimento di coniugati con elevati gradi di funzionalizzazione e purezza <sup>[6,7]</sup>.

L'immobilizzazione della Laccasi avviene grazie alla reattività degli eteroatomi presenti nelle catene laterali dell'enzima (prevalentemente Lisine, Cisteine, Arginine, Tirosine e Serine) che partecipano ad una reazione di polimerizzazione radicalica in presenza di AAm e PEGDMA portando alla formazione della membrana polimerica. I parametri cinetici del biocatalizzatore, determinati mediante il saggio dell'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) (ABTS), sono i seguenti: velocità massima di reazione ( $V_{max}$ ) pari a  $13.42 \mu M \text{ min}^{-1}$ , costante di Michaelis-Menten ( $K_M$ ) pari a  $108.94 \mu M$ . Tali valori, comparabili a quelli registrati nel caso dell'enzima nella forma libera, ( $14.88 \mu M \text{ min}^{-1}$  e  $72.95 \mu M$ ) indicano un buon mantenimento dell'attività catalitica <sup>[8]</sup>.

Il meccanismo della reazione di coniugazione di Cur con Gel è quello tipico della laccasi in presenza di substrati fenolici e gruppi nucleofili. La Cur, ossidata dai residui di laccasi immobilizzati nella rete polimerica, reagisce con i gruppi amminici nella catena laterale di Gel portando alla formazione del coniugato (Figura 2.3.2 A).

L'effettiva coniugazione tra Cur e Gel è dimostrata mediante analisi <sup>1</sup>H-NMR e UV-Vis.

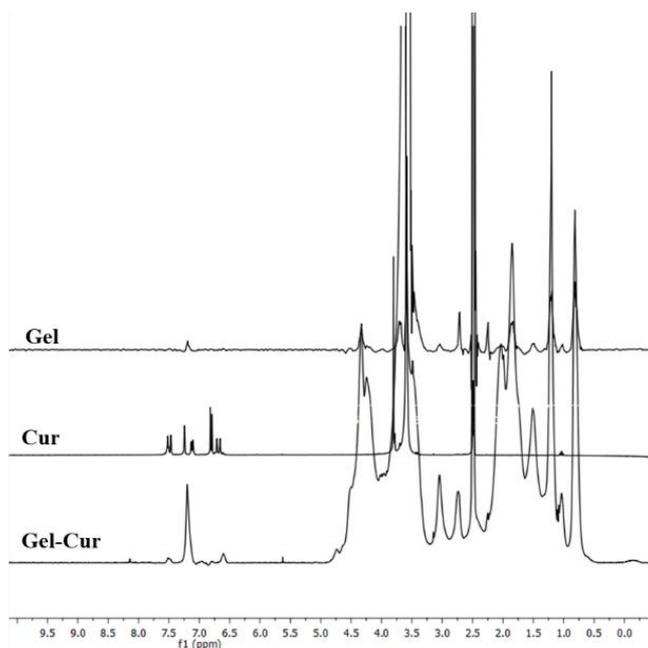
Nello spettro <sup>1</sup>H-NMR del coniugato Gel-Cur sono evidenti i caratteristici segnali dei protoni aromatici riconducibili alla presenza dei residui di Cur (Figura 2.3.3).

<sup>[5]</sup> Yee, E.M.H.; Brandl, M.; Pasquier, E.; Cirillo, G.; Kimpton, K.; Kavallaris, M.; Kumar, N.; Vittorio, O. Dextran-Catechin inhibits angiogenesis by disrupting copper homeostasis in endothelial cells. *Scientific Rep.* 2017; 7: 7638.

<sup>[6]</sup> Zheng, M.; Zhang, C.; Zhou, Y.; Lu, Z.; Zhao, H.; Bie, X.; Lu, F. Preparation of gallic acid-grafted chitosan using recombinant bacterial laccase and its application in chilled meat preservation. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 1729.

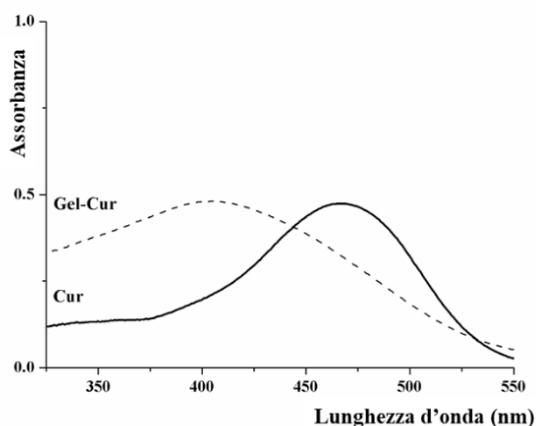
<sup>[7]</sup> Vittorio, O.; Le Grand, M.; Makharza, S.A.; Curcio, M.; Tucci, P.; Iemma, F.; Nicoletta, F.P.; Hampel, S.; Cirillo, G. Doxorubicin synergism and resistance reversal in human neuroblastoma BE(2)C cell lines: An in vitro study with dextran-catechin nanohybrids. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018; 122: 176-185.

<sup>[8]</sup> Vittorio, O.; Cojoc, M.; Curcio, M.; Spizzirri, U.G.; Hampel, S.; Nicoletta, F.P.; Iemma, F.; Dubrovska, A.; Kavallaris, M.; Cirillo, G. Polyphenol Conjugates by Immobilized Laccase: The Green Synthesis of Dextran-Catechin. *Macrom. Chem. Phys.* 2016; 217: 1488-1492.



**Figura 2.3.3** Spettri  $^1\text{H-NMR}$  di Gel, Cur e Gel-Cur

L'analisi degli spettri Uv-Vis mostra uno spostamento del picco di assorbimento di Cur da 466 nm (forma libera) a 404 nm (forma coniugata), ad indicare la formazione di un legame tra il polifenolo e la proteina (Figura 2.3.4).



**Figura 2.3.4** Spettri UV-Vis di Cur e Gel-Cur

Poiché la reazione di coniugazione coinvolge prevalentemente i gruppi amminici in catena laterale della proteina, una loro determinazione mediante il saggio del TNBS (acido 2,4,6-trinitrobenzenesulfonico),<sup>[9]</sup> prima e dopo reazione di coniugazione, consente di calcolare il grado di

<sup>[9]</sup> Arts, M.J.T.J.; Sebastiaan Dallinga, J.; Voss, H.-P.; Haenen, G.R.M.M.; Bast, A. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem.* **2004**; 88: 567-570.

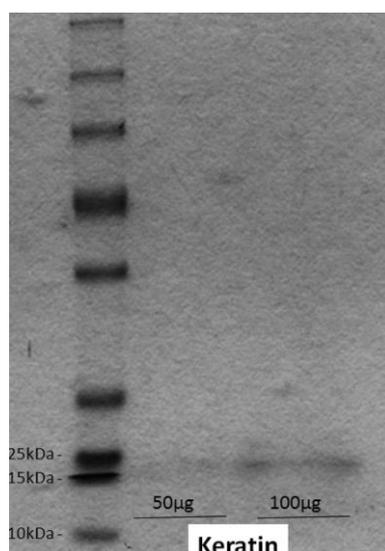
funzionalizzazione espresso come mg di Cur per grammo di coniugato. I risultati ottenuti indicano una funzionalizzazione pari a 79 mg di CUR per grammo di coniugato.

Infine, la determinazione della capacità antiossidante in termini di equivalenti trolox (TEAC), che risultano essere pari a  $2.43 \pm 0.49$  per la Cur libera e  $3.30 \pm 0.48$  per quella coniugata, dimostra chiaramente che la procedura di coniugazione non interferisce in maniera significativa ( $p > 0.05$ ) con le proprietà antiossidanti della molecola bioattiva.

### **2.3.3 Sintesi e caratterizzazione della cheratina lipidizzata**

Il coniugato l-Ker è stato preparato mediante funzionalizzazione della Ker idrolizzata con Polietilenglicole-40 stearato metacrilato (PEGS) tramite una reazione di grafting radicalico <sup>[10]</sup>.

Dopo estrazione dalla lana, la Ker è stata trattata con acido tioglicolico in qualità di agente riducente ed urea quale agente denaturante, ottenendo un derivato con un peso molecolare, stimato mediante un'analisi SDS-PAGE, compreso nel range tra 15 e 25 kDa (Figura 2.3.5).



**Figura 2.3.5** SDS-PAGE di Ker in seguito a processo di estrazione

La cheratina è stata successivamente modificata per aumentarne il grado di idrofobicità mediante reazione con PEGS (Figura 2.3.6), precedentemente preparato mediante esterificazione del gruppo ossidrilico del PEG<sub>40</sub>ST con anidride metacrilica (MA), utilizzando la piridina come catalizzatore.

<sup>[10]</sup> Curcio, M.; Blanco-Fernandez, B.; Diaz-Gomez, L.; Concheiro, A.; Alvarez-Lorenzo, C. Hydrophobically modified keratin vesicles for GSH-responsive intracellular drug release. *Bioconjugate Chem.* **2015**; 26: 1900-1907.

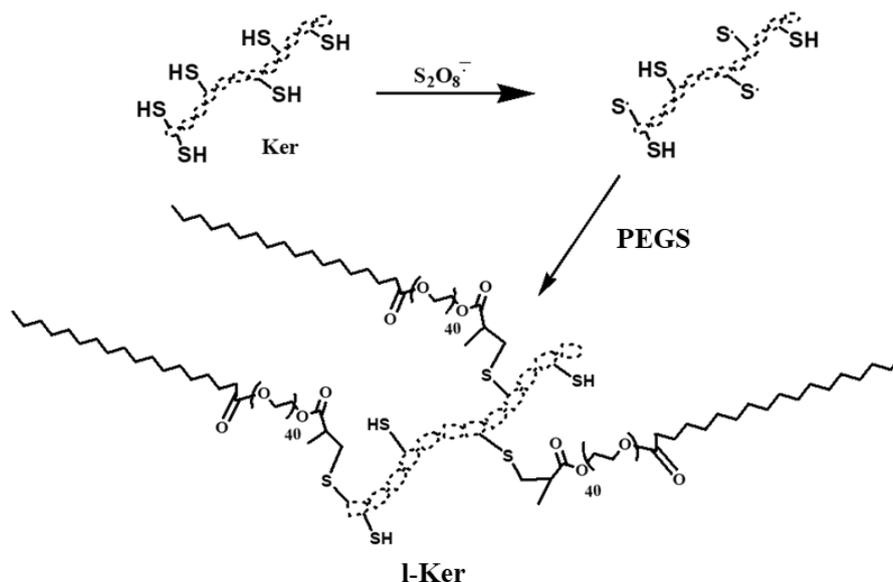


Figura 2.3.6 Schematizzazione della sintesi del coniugato l-Ker

L'effettiva metacrilazione del PEG<sub>40</sub>ST è confermata dall'analisi degli spettri FT-IR e <sup>1</sup>H-NMR (Figura 2.3.7).

In particolare, nello spettro FT-IR è stata registrata la comparsa di nuove bande di assorbimento a 1686 e 1626  $cm^{-1}$ , riconducibili alle vibrazioni di stretching dei legami C=O e C=C nel gruppo metacrilico, mentre lo spettro <sup>1</sup>H-NMR di PEGS mostra la comparsa dei segnali a 5.8 e 6.1 ppm, dovuti ai protoni dei gruppi metacrilici legati al PEG<sub>40</sub>ST.

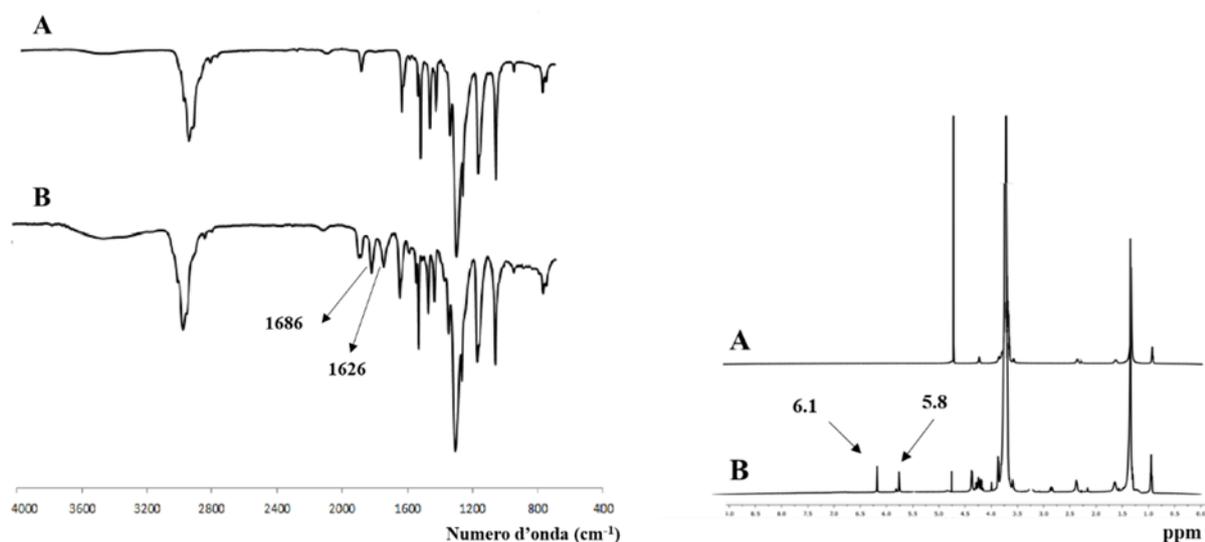


Figura 2.3.7 Spettri FT-IR e <sup>1</sup>H-NMR di PEG<sub>40</sub>ST (A); PEGS (B)

Nella fase successiva, i gruppi -SH in catena laterale della cheratina vengono attivati dall'iniziatore radicalico persolfato e fatti reagire con il PEGS a formare il coniugato l-Ker mediante *coupling* radicalico con i residui metacrilici (Figura 2.3.6).

Il legame tra le porzioni di PEG<sub>40</sub>ST e la cheratina è confermato da analisi FT-IR e <sup>1</sup>H-NMR (Figura 2.3.8).

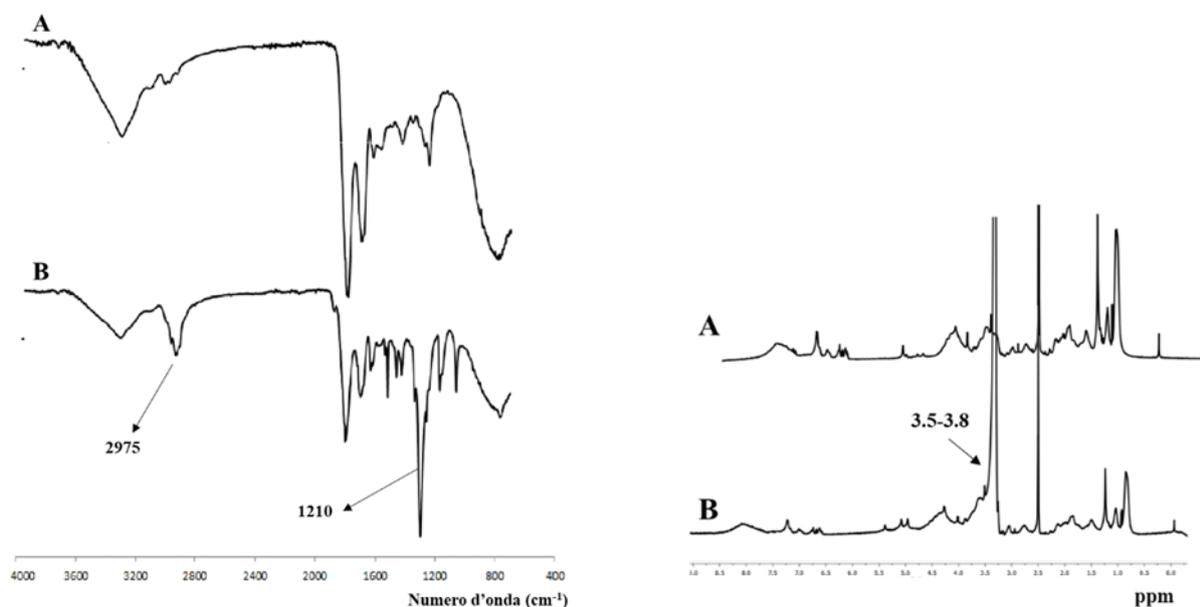


Figura 2.3.8 Spettri FT-IR e <sup>1</sup>H-NMR di Ker (A) e l-Ker (B)

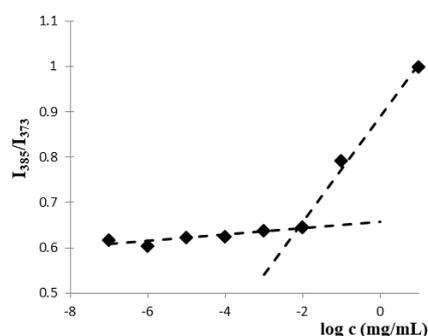
Nello spettro <sup>1</sup>H-NMR del coniugato si osserva la presenza dei segnali a  $\delta = 3.5-3.8$  ppm, attribuibili ai protoni del PEG, mentre nello spettro FT-IR si ha la comparsa di due nuove bande di assorbimento a  $2975$  e  $1210$   $\text{cm}^{-1}$ , dovute alle vibrazioni di stretching dei legami C-H e C-O-C del PEG<sub>40</sub>ST.

Il grado di sostituzione della Ker-ST è stato valutato in seguito alla determinazione delle moli dei gruppi -SH nella cheratina coniugata e non coniugata utilizzando il test di Ellman <sup>[11]</sup>, ottenendo un valore pari al 27%.

Le concentrazioni critiche di aggregazione (CAC) del coniugato l-Ker sono state determinate in soluzione acquosa utilizzando il pirene come indicatore fluorescente non polare <sup>[12]</sup>. I risultati, riportati in Figura 2.3.9, indicano un valore di CAC pari a  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

<sup>[11]</sup> Anitha, A.; Deepa, N.; Chennazhi, K.P.; Nair, S.V.; Tamura, H., Jayakumar, R. Development of mucoadhesive thiolated chitosan nanoparticles for biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* **2011**; 83: 66-73.

<sup>[12]</sup> Chiang, W.H.; Lan, Y.J.; Huang, Y.C.; Chen, Y.W.; Huang, Y.F.; Lin, S.C.; Chern, C.S.; Chiu, H.C. Multi-scaled polymersomes from self-assembly of octadecanol-modified dextrans. *Polymer* **2012**; 53, 2233-2244.

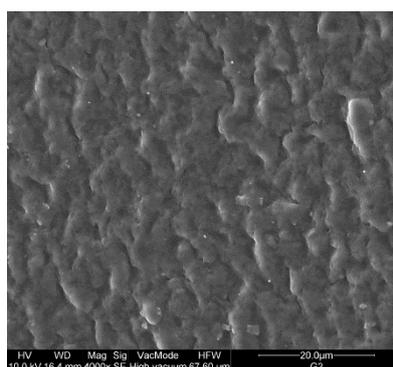


**Figura 2.3.9** Determinazione del valore di CAC del coniugato I-Ker mediante saggio del Pirene

### 2.3.4 Sintesi e caratterizzazione degli idrogel

Come riportato in letteratura, i gel di gelatina possiedono una bassa stabilità, ed è quindi necessario migliorarne le proprietà termiche e meccaniche mediante inserimento in reticoli polimerici semisintetici <sup>[13]</sup>. Studi precedenti hanno dimostrato la possibilità di incorporare covalentemente la gelatina in idrogel acrilici tramite polimerizzazione radicalica, utilizzando AAm come co-monomero plastificante e PEGDMA come agente reticolante, ottenendo materiali con elevata affinità per l'acqua (WR di circa 250%) idonei per applicazioni in campo biomedico <sup>[14]</sup>. Seguendo lo stesso approccio, Gel-Cur è stato impiegato per la preparazione dell'idrogel H<sub>GC</sub> (spessore 0.8 mm) (Figura 2.3.2 C). La composizione della miscela di reazione è stata ottimizzata al fine di massimizzare l'affinità per l'acqua ed evitare la rottura dell'idrogel durante le fasi di purificazione ed essiccamento. Come campione di controllo, è stato sintetizzato l'idrogel H<sub>G</sub> utilizzando Gel al posto di Gel-Cur.

La caratterizzazione delle proprietà superficiali di H<sub>GC</sub> evidenzia una superficie ruvida (Figura 2.3.10).



**Figura 2.3.10** Immagine SEM del campione H<sub>GC</sub>

<sup>[13]</sup> Schuurman, W.; Levett, P.A.; Pot, M.W.; van Weeren, P.R.; Dhert, W.J.A.; Hutmacher, D.W.; Melchels, F.P.W.; Klein, T.J.; Malda, J. Gelatin-methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of tissue-engineered cartilage constructs. *Macromol. Biosci.* **2013**; 13: 551-561.

<sup>[14]</sup> di Luca, M.; Vittorio, O.; Cirillo, G.; Curcio, M.; Czuban, M.; Voli, F.; Farfalla, A.; Hampel, S.; Nicoletta, F.P.; Iemma, F. Electro-responsive graphene oxide hydrogels for skin bandages: The outcome of gelatin and trypsin immobilization. *Int. J. Pharm.* **2018**; 546: 50-60.

La determinazione del profilo di rigonfiamento nel tempo evidenzia un WR massimo del 990% dopo 24 h (Figura 2.3.11).

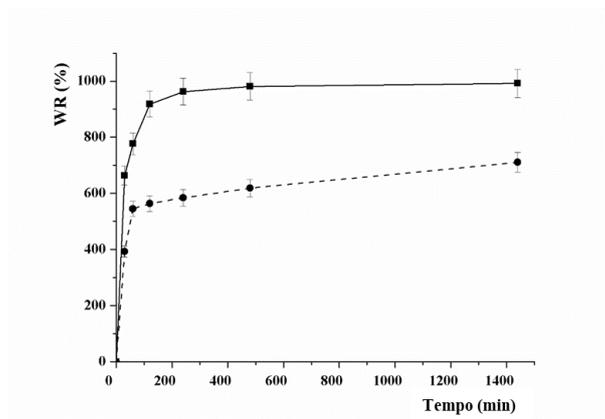


Figura 2.3.11 Profilo di rigonfiamento di H<sub>G</sub> (●) e H<sub>GC</sub> (■)

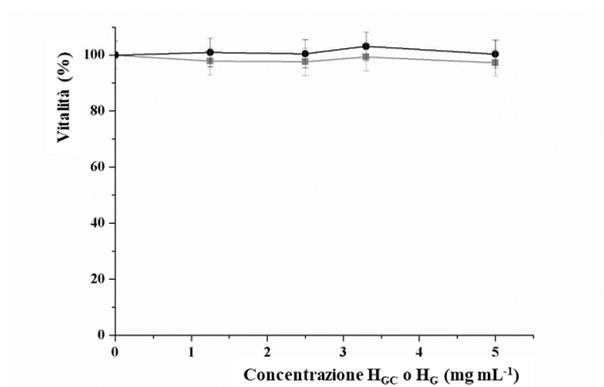
La maggiore affinità per l'acqua registrata nel caso di H<sub>GC</sub> rispetto alla matrice H<sub>G</sub> (WR massimo del 710%) può essere attribuita all'interferenza di Cur nel meccanismo di polimerizzazione: i residui di Cur, infatti, agiscono come terminatori di catena nella reazione di polimerizzazione, portando alla formazione di idrogel con un minor grado di reticolazione <sup>[15]</sup>. Questo risultato è stato ulteriormente supportato dalla determinazione della resistenza alla trazione, parametro che nel caso di H<sub>GC</sub> (22.5 MPa) risulta essere ridotto del 25% rispetto al campione preparato in assenza di Cur (30.0 MPa).

Il requisito chiave dell'assenza di citotossicità è stato valutato in collaborazione con il Children's Cancer Institute, Lowy Cancer Research Centre, University of New South Wales (Australia) verificando la vitalità dei fibroblasti polmonari umani MRC-5 <sup>[16]</sup>. Tali cellule, che soddisfano le normative UE sulla sostituzione di modelli animali (Direttiva UE 2010/63 / UE), rappresentano un equivalente della pelle umana nei saggi *in vitro*, necessari per la valutazione del rischio associato all'utilizzo di dispositivi biomedicali <sup>[17]</sup>. Le cellule sono state incubate per 72 h con H<sub>GC</sub> e H<sub>G</sub> in concentrazioni crescenti nel range da 1.25 a 5.0 mg mL<sup>-1</sup> (corrispondente alla quantità massima di campioni sospensibili nei terreni di coltura cellulare), ottenendo valori di vitalità superiori al 97% in tutte le condizioni, a conferma dell'elevata biocompatibilità dei sistemi proposti (Figura 2.3.12).

<sup>[15]</sup> Killi, N.; Paul, V.L.; Gundloori, R.V.N. Antibacterial non-woven nanofibers of curcumin acrylate oligomers. *New J. Chem.* **2015**; 39: 4464-4470.

<sup>[16]</sup> Pasquier, E.; Street, J.; Pouchy, C.; Carre, M.; Gifford, A.J.; Murray, J.; Norris, M.D.; Trahair, T.; Andre, N.; Kavallaris, M. B-blockers increase response to chemotherapy via direct antitumour and anti-angiogenic mechanisms in neuroblastoma. *Brit. J. Cancer* **2013**; 108: 2485-2494.

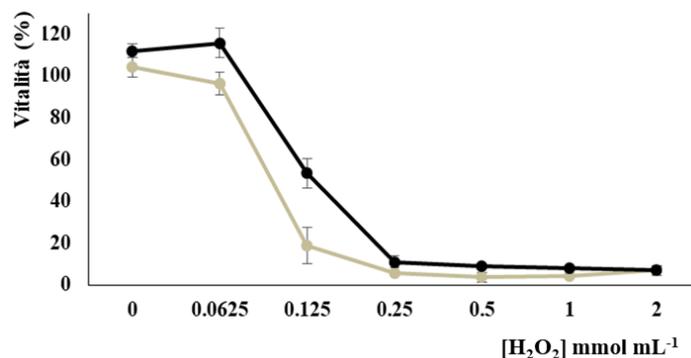
<sup>[17]</sup> Reijnders, C.M.A.; Van Lier, A.; Roffel, S.; Kramer, D.; Scheper, R.J.; Gibbs, S. Development of a Full-Thickness Human Skin Equivalent *In Vitro* Model Derived from TERT-Immortalized Keratinocytes and Fibroblasts. *Tissue Eng. A* **2015**; 21: 2448-2459.



**Figura 2.3.12** Vitalità di cellule MRC-5 dopo 72 h di incubazione con HGC (●) e HG (■)

In considerazione della presenza dei residui polifenolici nel coniugato Gel-Cur, è stata quindi testata la capacità delle formulazioni HGC di proteggere le ferite dallo stress ossidativo prodotto da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un agente ossidante che produce elevata mortalità nelle cellule MRC-5 [18].

Prima di tutto, è stato confermato il mantenimento delle proprietà antiossidanti di Gel-Cur nell'idrogel HGC determinando il valore TEAC che è risultato essere pari a  $1.48 \pm 0.48$  (HG non mostra interferenza nel bloccare i radicali ABTS); successivamente è stata valutata la vitalità delle cellule MRC-5 in seguito ad esposizione a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 2.3.13).



**Figura 2.3.13** Vitalità di cellule MRC-5 dopo 4 h di incubazione con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pretrattata con HG (●) e HGC (●)

Nello specifico, la vitalità cellulare è stata determinata dopo incubazione con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> precedentemente trattata con HGC o HG, ed è stato possibile dimostrare come HGC sia in grado di ridurre lo stress ossidativo del 30%. I valori dell'IC<sub>50</sub> di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentano da 186 μmol L<sup>-1</sup> per la

[18] Kong, B.; Peng, X.; Xiong, Y.L.; Zhao, X. Protection of lung fibroblast MRC-5 cells against hydrogen peroxide-induced oxidative damage by 0.1-2.8 kDa antioxidative peptides isolated from whey protein hydrolysate. *Food Chem.* **2012**; 135: 540-547.

forma libera, a  $246 \mu\text{mol L}^{-1}$  in seguito a trattamento con  $\text{H}_{\text{GC}}$ , mentre, come previsto, non è stato rilevato alcun effetto nel caso del campione  $\text{H}_{\text{G}}$ .

### 2.3.5 Sintesi e caratterizzazione delle microparticelle di cheratina

Il coniugato l-Ker è stato utilizzato per la preparazione del sistema microparticellare ( $\text{P}_{\text{K}}$ - Figura 2.3.2 D), in virtù della sua capacità di incapsulare e rilasciare molecole biologicamente attive in maniera controllata e di promuovere la proliferazione cellulare <sup>[19]</sup>. Avendo carattere anfifilico, l-Ker infatti si autoassembla in un mezzo acquoso con i blocchi idrofobici (principalmente residui stearilici) orientati verso il nucleo interno e le porzioni idrofile di Ker e PEG verso l'ambiente esterno.

L'analisi morfologica e la determinazione della distribuzione dimensionale, eseguite mediante SEM, mostrano la formazione di microparticelle sferiche con una superficie liscia e uniforme e un diametro medio di circa  $1.75 \mu\text{m}$  (Figura 2.3.14).

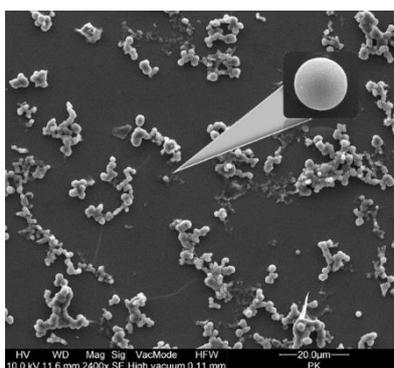


Figura 2.3.14 Immagine SEM del campione  $\text{P}_{\text{K}}$

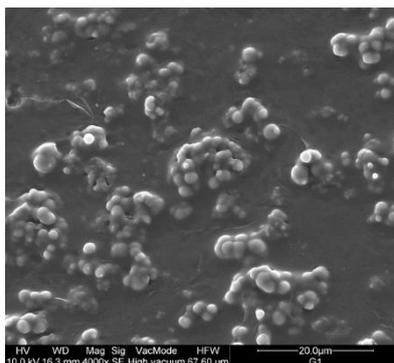
Il caricamento delle microparticelle con Q ( $\text{Q@P}_{\text{K}}$ ) è stato ottenuto eseguendo il processo di autoassemblaggio in presenza di una soluzione satura di Q in DMSO alla concentrazione di  $30 \text{ mg mL}^{-1}$ , una metodologia ampiamente riportata in letteratura per l'incapsulazione di diversi farmaci lipofili in proteine autoassemblanti <sup>[20]</sup>.

### 2.3.6 Sintesi e caratterizzazione del sistema composito

$\text{H}_{\text{GC}}$  e  $\text{P}_{\text{K}}$  sono stati combinati per formare il sistema composito  $\text{P}_{\text{K}}\text{H}_{\text{GC}}$  (Figura 2.3.2 E). L'analisi morfologica mostra la presenza delle microsfele  $\text{P}_{\text{K}}$  adsorbite nell'idrogel senza modifica dei parametri di forma e dimensione (Figura 2.3.15).

<sup>[19]</sup> Curcio, M.; Blanco-Fernandez, B.; Diaz-Gomez, L.; Concheiro, A.; Alvarez-Lorenzo, C. Hydrophobically modified keratin vesicles for GSH-responsive intracellular drug release. *Bioconjugate Chem.* **2015**; 26: 1900-1907.

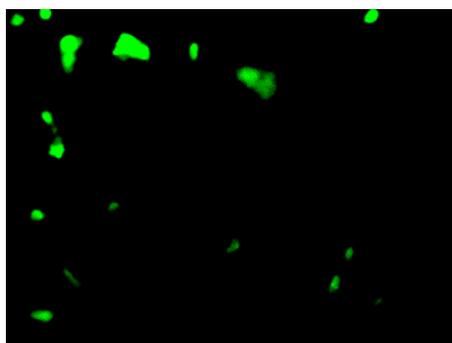
<sup>[20]</sup> Hu, X.; Wang, X.; Rnjak, J.; Weiss, A.S.; Kaplan, D.L. Biomaterials derived from silk-tropoelastin protein systems. *Biomaterials* **2010**; 31: 8121-8131.



**Figura 2.3.15** Immagine SEM del campione P<sub>K</sub>H<sub>GC</sub>

Come detto nei paragrafi introduttivi, la capacità di indurre la proliferazione cellulare gioca un ruolo chiave nel determinare le prestazioni di un dispositivo di medicazione <sup>[21]</sup>. Nei nostri esperimenti, è stato dimostrato come il sistema composito P<sub>K</sub>H<sub>GC</sub> sia in grado di promuovere la vitalità cellulare, con un aumento, dopo 72 h di incubazione, del numero di cellule MRC-5 pari a 3.5 volte rispetto al controllo. Si può affermare che P<sub>K</sub> agisca come elemento funzionale per la promozione della proliferazione cellulare, poiché H<sub>GC</sub> non ha alcun effetto sulla vitalità cellulare (Figura 2.3.12).

Inoltre, l'incubazione di P<sub>K</sub>H<sub>GC</sub> con cellule fluorescenti (GFP) ha permesso di valutare l'effettiva colonizzazione del dispositivo in un processo di guarigione. Nel nostro caso, abbiamo utilizzato cellule di Neuroblastoma KELLY-GFP in quanto semplici da trasfettare e in grado di migrare rapidamente in un saggio che simula la guarigione di una ferita <sup>[22]</sup>. Le analisi al microscopio a fluorescenza invertita rivelano chiaramente la presenza di cellule fluorescenti sul supporto composito (Figura 2.3.16).



**Figura 2.3.16** Immagine al microscopio a fluorescenza delle cellule KELLY-GFP coltivate sul composito P<sub>K</sub>H<sub>GC</sub>

<sup>[21]</sup> Kamalathevan, P.; Ooi, P.S.; Loo, Y.L. Silk-Based Biomaterials in Cutaneous Wound Healing: A Systematic Review. *Adv. Skin Wound Care* **2018**; 31: 565-573.

<sup>[22]</sup> Fraser, S.T.; Hadjantonakis, A.-K.; Sahr, K.E.; Willey, S.; Kelly, O.G.; Jones, E.A.V.; Dickinson, M.E.; Baron, M.H. Using a histone yellow fluorescent protein fusion for tagging and tracking endothelial cells in ES cells and mice. *Genesis* **2005**; 42: 162-171.

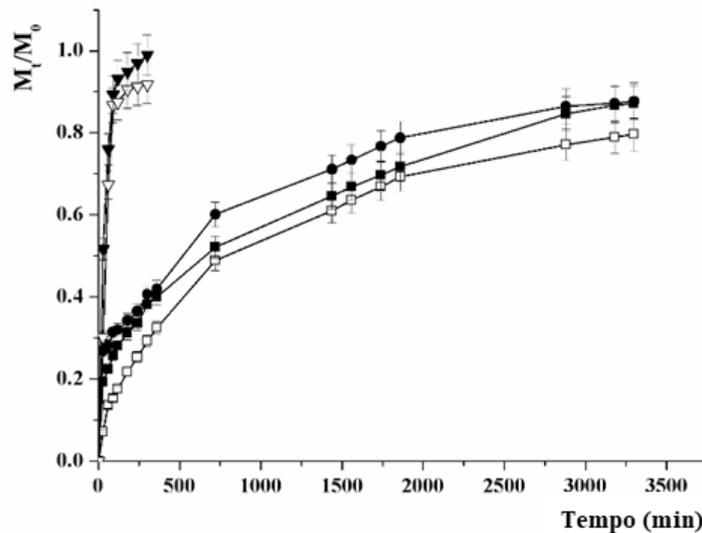
### 2.3.7 Valutazione dei profili di rilascio

Per valutare la possibilità di utilizzare il composito P<sub>K</sub>H<sub>GC</sub> come sistema di veicolazione per l'agente antimicrobico Q, i profili di rilascio sono stati analizzati in termini di affinità chimico-fisica per il vettore rispetto al mezzo circostante. È stato utilizzato il modello proposto da Reis e descritto dalle equazioni 1.17 e 1.18 (vedi introduzione) a seconda che si tratti di una cinetica del primo o del secondo ordine <sup>[23]</sup>:

$$\frac{M_t}{M_0} = M_{max} \left( 1 - e^{-\left(\frac{kr}{M_{max}}\right)t} \right) \quad (1.17)$$

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{M_{max} \left( e^{2\left(\frac{kr}{\alpha}\right)t} - 1 \right)}{1 - 2 M_{max} + e^{2\left(\frac{kr}{\alpha}\right)t}} \quad (1.18)$$

Per evidenziare al meglio l'effetto di ogni componente (idrogel, l-Ker, Cur) sulla cinetica di rilascio, Q è stata caricata anche su P<sub>K</sub>H<sub>G</sub>, P<sub>K</sub>, H<sub>GC</sub> e H<sub>G</sub>. I profili di rilascio sono mostrati in Figura 2.3.17, e i parametri cinetici riportati in Tabella 2.3.1.



**Figura 2.3.17** Profili di rilascio di Q da Q@P<sub>K</sub> (●); Q@P<sub>K</sub>H<sub>GC</sub> (◆); Q@P<sub>K</sub>H<sub>G</sub> (◇); Q@H<sub>GC</sub> (■); Q@H<sub>G</sub> (□)

Il modello proposto è adatto a descrivere il rilascio di Q da tutti i sistemi. In dettaglio, analizzando i valori di R<sup>2</sup> in Tabella 2.3.1, si nota come la presenza dei sistemi microparticellari nei campioni Q@P<sub>K</sub>H<sub>GC</sub>, Q@P<sub>K</sub>H<sub>G</sub> e Q@P<sub>K</sub>, dia luogo ad una cinetica di rilascio reversibile del secondo ordine,

<sup>23</sup> Reis, A.V.; Guilherme, M.R.; Rubira, A.F.; Muniz, E.C. Mathematical model for the prediction of the overall profile of in vitro solute release from polymer networks. *J. Colloid Interf. Sci.* **2007**; 310: 128-135.

mentre in assenza di microparticelle (campioni Q@H<sub>GC</sub> e Q@H<sub>G</sub>) si registra una cinetica reversibile del primo ordine.

**Tabella 2.3.1** Valori R<sup>2</sup> e parametri cinetici secondo il modello di Reis per i campioni H<sub>G</sub>, H<sub>GC</sub>, P<sub>k</sub>, P<sub>k</sub>H<sub>G</sub>; P<sub>k</sub>H<sub>GC</sub>

Cinetica	Parametro	Q@H <sub>G</sub>	Q@H <sub>GC</sub>	Q@P <sub>k</sub>	Q@P <sub>k</sub> H <sub>G</sub>	Q@P <sub>k</sub> H <sub>GC</sub>
Eq. 1.17	R <sup>2</sup>	0.9680	0.9989	0.8709	0.9774	0.8890
	M <sub>max</sub>	0.94	0.98	0.79	0.75	0.76
	α	15.7	49.0	4.00	3.00	3.17
	k <sub>R</sub> (10 <sup>-2</sup> )	1.80	2.50	0.23	0.12	0.19
	t <sub>1/2</sub> <sup>1</sup> (min)	36	27	241	433	277
Eq. 1.18	R <sup>2</sup>	0.9114	0.9574	0.9087	0.9898	0.9245
	M <sub>max</sub>	0.98	0.99	0.85	0.82	0.84
	α	49.0	99.0	5.67	4.56	5.25
	k <sub>R</sub> (10 <sup>-2</sup> )	3.0	4.5	0.28	0.14	0.21
	t <sub>1/2</sub> <sup>2</sup> (min)	32	22	265	500	347

Il confronto tra il comportamento di Q@H<sub>G</sub> e Q@H<sub>GC</sub> dimostra come la maggiore affinità per l'acqua di H<sub>GC</sub> si traduca in un più rapido rilascio di Q, come evidenziato dai valori di t<sub>1/2</sub> pari a 36 min per H<sub>G</sub> e 27 min per H<sub>GC</sub>. Inoltre, è chiaro come i sistemi microparticellari influenzino il rilascio di Q riducendo i valori M<sub>max</sub> registrati sia nel caso di Q@H<sub>G</sub> che in quello di Q@H<sub>GC</sub> (~ 95% in 300 min), a circa l'80% in 3500 min. Cosa più interessante, i profili di rilascio sono molto più prolungati nel tempo, con il valore di t<sub>1/2</sub> che diventa pari a 265 min nel caso di Q@P<sub>k</sub>. Un'ulteriore riduzione della velocità di rilascio si registra quando Q@P<sub>k</sub> sono adsorbiti sugli idrogel, con un effetto più evidente nel caso dei sistemi con un grado di rigonfiamento inferiore (H<sub>G</sub>). Questo fenomeno è evidenziato dai valori di t<sub>1/2</sub> che risultano essere pari a 500 min per Q@P<sub>k</sub>H<sub>G</sub> e 347 min per Q@P<sub>k</sub>H<sub>GC</sub>.

Nel complesso, i risultati ottenuti mostrano la capacità dei sistemi compositi idrogel/microparticelle di fungere da dispositivi per il rilascio di Q e permettono di ipotizzarne l'applicabilità nel trattamento delle ferite cutanee.

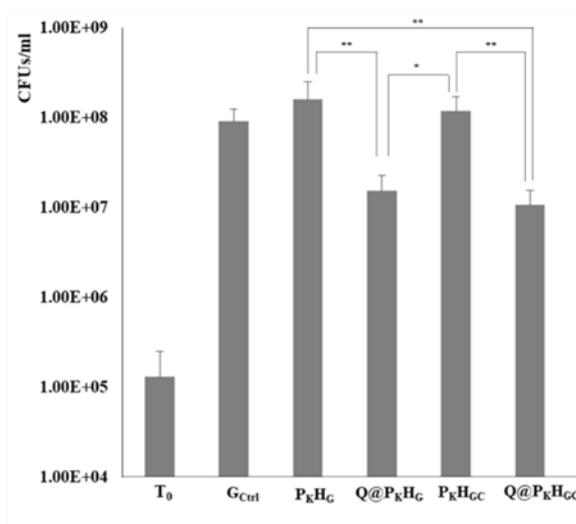
### 2.3.8 Valutazione dell'attività antimicrobica

Un valido materiale di medicazione dovrebbe essere in grado di ridurre al minimo il rischio di infezione, proteggendo le ferite dalla proliferazione di batteri patogeni [24]. In questo contesto, in collaborazione con la Charité – Universitätsmedizin Berlin (Germania) è stata valutata la capacità di

[24] Zhou, J.; Yao, D.; Qian, Z.; Li, L.; Jenkins, A.T.A.; Fan, Y. Bacteria-responsive intelligent wound dressing: Simultaneous In situ detection and inhibition of bacterial infection for accelerated wound healing. *Biomaterials* **2018**; 161: 11-23.

Q@P<sub>K</sub>H<sub>GC</sub> di inibire / ridurre la crescita di *Staphylococcus aureus* (MRSA), in virtù delle proprietà antimicrobiche del flavonoide e della sua ridotta tossicità [25].

Q in forma libera mostra una MIC di 64 µg mL<sup>-1</sup> nei confronti di MRSA, con un'attività battericida registrata per concentrazioni superiori a 128 µg mL<sup>-1</sup> (MBC). L'attività antimicrobica di Q@P<sub>K</sub>H<sub>GC</sub> è stata determinata mediante conteggio delle colonie dopo incubazione dei biomateriali in un inoculo batterico (Figura 2.3.18).



**Figura 2.3.18** Attività antibatterica di Q caricata su diversi supporti

Il valore di CFU mL<sup>-1</sup> di batteri non trattati aumenta di circa 3 unità logaritmiche rispetto all'inoculo iniziale dopo 24 ore di incubazione. Quando le cellule batteriche MRSA sono incubate con Q@P<sub>K</sub>H<sub>GC</sub> o Q@P<sub>K</sub>H<sub>G</sub>, è possibile osservare una riduzione di un'unità logaritmica del numero di CFU rispetto ai valori ottenuti in presenza di H<sub>G</sub> o H<sub>GC</sub>, a conferma dell'importanza del caricamento del flavonoide nelle microparticelle.

### 2.3.9 Conclusioni

Il presente lavoro si è posto l'obiettivo di realizzare un materiale composito multifunzionale da impiegare nella medicazione delle ferite cutanee combinando proprietà di idrogel funzionali e microparticelle sferiche.

[25] Vedakumari, W.S.; Ayaz, N.; Karthick, A.S.; Senthil, R.; Sastry, T.P. Quercetin impregnated chitosan–fibrin composite scaffolds as potential wound dressing materials — Fabrication, characterization and in vivo analysis. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**; 97: 106-112.

La controparte idrogel è progettata per garantire il mantenimento di un ambiente umido e per fornire protezione dalla tossicità dei ROS agendo, allo stesso tempo, come supporto per la crescita cellulare.

Il sistema microparticellere ha lo scopo di promuovere la proliferazione cellulare e controllare il rilascio di un agente antimicrobico, preservando così il sito di guarigione dalle infezioni microbiche.

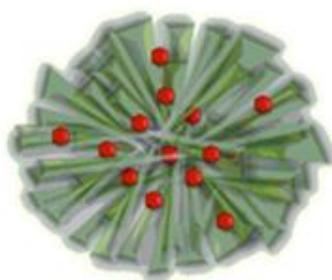
Nello specifico, un coniugato Gelatina-Curcumina è stato inserito all'interno di un idrogel acrilato ottenendo un materiale dalle elevate proprietà antiossidanti, mentre un coniugato di cheratina lipidizzata con proprietà autoassemblanti è stato utilizzato per la preparazione del sistema microparticellare in grado di incapsulare l'agente bioattivo Quercetina.

I risultati complessivi possono essere considerati un valido punto di partenza per rispondere alle esigenze chiave di un dispositivo funzionale in grado di promuovere il processo di guarigione delle ferite cutanee.

## 2.4 Nanoparticelle a base di Destrano-Curcumina per la veicolazione del metotrexato nel trattamento del cancro al seno <sup>1</sup>

### 2.4.1 Premessa

Nel presente lavoro è stato proposto un sistema nanoparticellare a base di un coniugato Destrano-Curcumina con l'obiettivo di migliorare l'efficacia terapeutica del metotrexato nel trattamento del tumore al seno (Figura 2.4.1).



**Figura 2.4.1** Schematizzazione delle nanoparticelle autoassemblanti a base di destrano-curcumina

In tale ambito, gli approcci di prima linea sono la chirurgia e la chemioterapia, spesso basata sulla combinazione di due o più agenti bioattivi <sup>[2]</sup>. La terapia combinatoriale, infatti, agendo contemporaneamente su differenti pathway cellulari <sup>[3]</sup>, permette di aumentare l'efficienza terapeutica dei farmaci citotossici evitando l'insorgenza di fenomeni di resistenza multipla <sup>[4]</sup>.

L'approccio qui presentato consiste nel formulare il polifenolo Curcumina in un sistema nanoparticellare in grado di ottimizzarne la stabilità chimica e i profili farmacocinetici <sup>[5,6]</sup>. Lo scopo

---

<sup>[1]</sup> Curcio, M.; Cirillo, G.; Tucci, P.; Farfalla, A.; Bevacqua, E.; Vittorio, O.; Iemma, F.; Nicoletta, F.P. Dextran-curcumin nanoparticles as a methotrexate delivery vehicle: A step forward in breast cancer combination therapy. *Pharmaceuticals* **2020**; 13: 2.

<sup>[2]</sup> Hong, Y.; Che, S.M.; Hui, B.N.; Yang, Y.Y.; Wang, X.L.; Zhang, X.Z.; Qiang, Y.Q.; Ma, H.L. Lung cancer therapy using doxorubicin and curcumin combination: Targeted prodrug based, pH sensitive nanomedicine. *Biomed. Pharmacother.* **2019**; 112.

<sup>[3]</sup> Li, M.Q.; Tang, Z.H.; Lin, J.; Zhang, Y.; Lv, S.X.; Song, W.T.; Huang, Y.B.; Chen, X.S. Synergistic Antitumor Effects of Doxorubicin-Loaded Carboxymethyl Cellulose Nanoparticle in Combination with Endostar for Effective Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Adv. Healthc. Mater.* **2014**; 3: 1877-1888.

<sup>[4]</sup> Yin, Q.; Shen, J.A.; Zhang, Z.W.; Yu, H.J.; Chen, L.L.; Gu, W.W.; Li, Y.P. Multifunctional Nanoparticles Improve Therapeutic Effect for Breast Cancer by Simultaneously Antagonizing Multiple Mechanisms of Multidrug Resistance. *Biomacromolecules* **2013**; 14: 2242-2252.

<sup>[5]</sup> Landis-Piwowar, K.R.; Huo, C.D.; Chen, D.; Milacic, V.; Shi, G.Q.; Chan, T.H.; Dou, Q.P. A novel prodrug of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate as a potential anticancer agent. *Cancer Res.* **2007**; 67: 4303-4310.

<sup>[6]</sup> Cirillo, G.; Curcio, M.; Vittorio, O.; Iemma, F.; Restuccia, D.; Spizzirri, U.G.; Puoci, F.; Picci, N. Polyphenol Conjugates and Human Health: A Perspective Review. *Cirt. Rev Food Sci. Nutrit.* **2016**; 56: 326-337

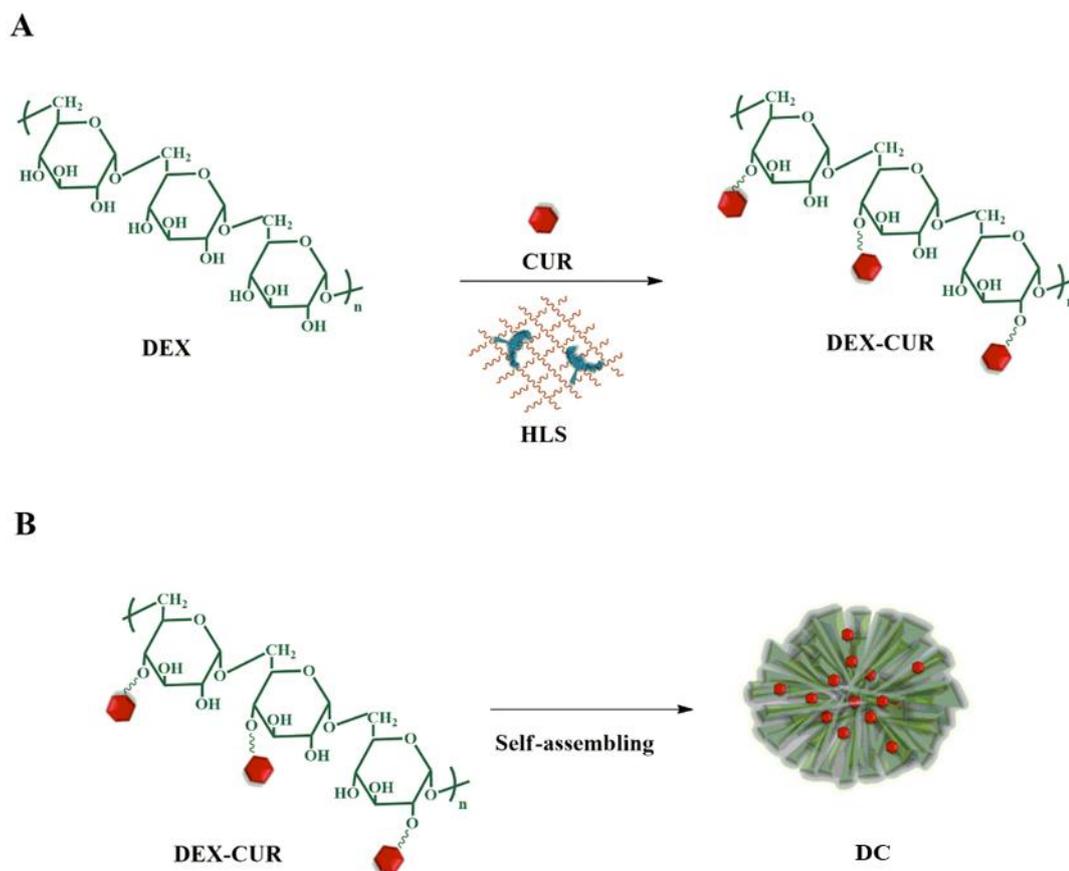
è quello di realizzare un sistema per la veicolazione del metotrexato che, oltre a possedere le tipiche proprietà dei sistemi nanoparticellari [7], presenti l'ulteriore vantaggio di essere esso stesso un componente funzionale. L'effetto biologico è quindi correlabile sia al farmaco caricato che al vettore stesso [8]. A tal proposito, la curcumina è stata coniugata al destrano ad elevato peso molecolare che, in virtù delle proprietà di biocompatibilità e capacità di autoassemblarsi in ambiente acquoso, è in grado di incapsulare e controllare il rilascio di principi attivi di diversa natura [9].

#### 2.4.2 Sintesi e caratterizzazione del sistema nanoparticellare

Le nanoparticelle (DC) sono state preparate mediante una procedura in due fasi (Figura 2.4.2):

i) la sintesi di DEX-CUR

ii) l'autoassemblaggio del coniugato in mezzo acquoso



**Figura 2.4.2** Shematizzazione della sintesi del sistema nanoparticellare

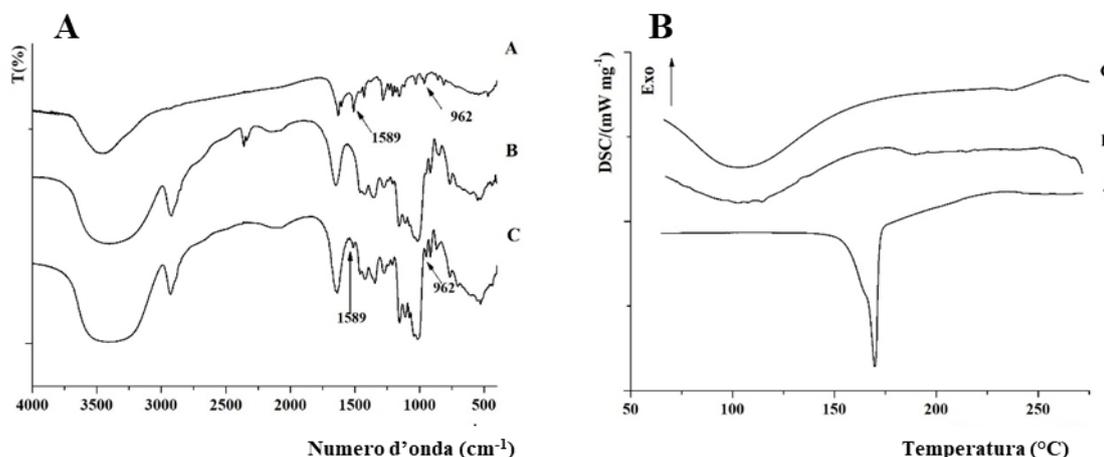
[7] Dou, X.Q.; Wang, H.; Zhang, J.; Wang, F.; Xu, G.L.; Xu, C.C.; Xu, H.H.; Xiang, S.S.; Fu, J.; Song, H.F. Aptamer-drug conjugate: targeted delivery of doxorubicin in a HER3 aptamer-functionalized liposomal delivery system reduces cardiotoxicity. *Int. J. Nanomed.* **2018**; 13: 763-776.

[8] Oliver, S.; Vittorio, O.; Cirillo, G.; Boyer, C. Enhancing the therapeutic effects of polyphenols with macromolecules. *Polym. Chem.* **2016**; 7: 1529-1544.

[9] Banerjee, A.; Bandopadhyay, R. Use of dextran nanoparticle: A paradigm shift in bacterial exopolysaccharide based biomedical applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**; 87: 295-301.

Per la sintesi del coniugato DEX-CUR è stato utilizzato un biocatalizzatore costituito dalla laccasi immobilizzata in un film acrilico (Figura 2.4.2. a) <sup>[10]</sup>.

Le analisi FT-IR e DSC hanno dimostrato l'avvenuta coniugazione del polifenolo alla catena polisaccaridica (Figura 2.4.3).



**Figura 2.4.3** (A) Spettro FT-IR e (B) termogrammi DSC di CUR (A), DEX (B) e DEX-CUR(C)

L'analisi FT-IR del coniugato DEX-CUR mostra la comparsa dei picchi tipici della CUR a 1589 (stretching C-C aromatico) e 968 (bending enolico) cm<sup>-1</sup> (Figura 2.4.3. a) <sup>[11]</sup>. Nessuna transizione correlata al punto di fusione del polifenolo (169 °C) è stata rilevata nel termogramma DSC (Figura 2.4.3. b), come conseguenza della perdita della struttura cristallina in seguito a coniugazione <sup>[12]</sup>.

Il grado di funzionalizzazione è stato calcolato mediante determinazione dei gruppi fenolici disponibili secondo il saggio di Folin-Ciocalteu <sup>[13]</sup>, ottenendo un valore di 23.9 mg di CUR per grammo di coniugato. Inoltre, l'assenza di differenze significative ( $p > 0.05$ ) tra la capacità antiossidante equivalente Trolox (TEAC) <sup>[14]</sup> della CUR libera (2.43) e coniugata (2.23), ha confermato che il processo non ha interferito con l'attività scavenger della CUR.

<sup>[10]</sup> Vittorio, O.; Cojoc, M.; Curcio, M.; Spizzirri, U.G.; Hampel, S.; Nicoletta, F.P.; Iemma, F.; Dubrovska, A.; Kavallaris, M.; Cirillo, G. Polyphenol Conjugates by Immobilized Laccase: The Green Synthesis of Dextran-Catechin. *Macrom. Chem. Phys.* **2016**; 217: 1488-1492.

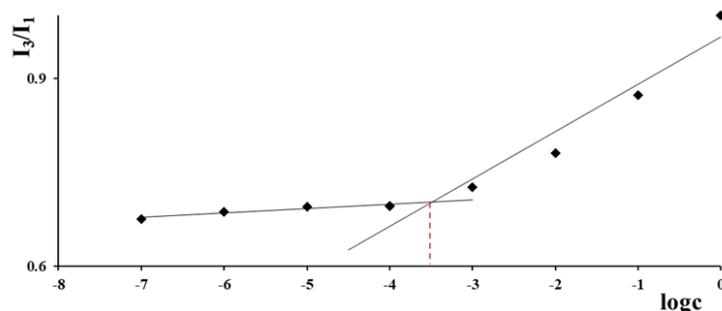
<sup>[11]</sup> Chen, X.; Zou, L.Q.; Niu, J.; Liu, W.; Peng, S.F.; Liu, C.M. The Stability, Sustained Release and Cellular Antioxidant Activity of Curcumin Nanoliposomes. *Molecules* **2015**; 20: 14293-14311.

<sup>[12]</sup> Zhao, Z.; Xie, M.B.; Li, Y.; Chen, A.Z.; Li, G.; Zhang, J.; Hu, H.W.; Wang, X.Y.; Li, S.P. Formation of curcumin nanoparticles via solution-enhanced dispersion by supercritical CO<sub>2</sub>. *Int. J. Nanomed.* **2015**; 10: 3171-3181.

<sup>[13]</sup> Cirillo, G.; Puoci, F.; Curcio, M.; Iemma, F.; Parisi, O.I.; Spizzirri, U.G.; Altamari, I.; Picci N. Starch-quercetin conjugate by radical grafting: Synthesis and evaluation of the antioxidant and enzymatic activities. *Pharm. Dev. Technol.* **2012**; 17: 466-476.

<sup>[14]</sup> Arts, M.J.T.J.; Sebastiaan Dallinga, J.; Voss, H.-P.; Haenen, G.R.M.M.; Bast, A. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem.* **2004**; 88: 567-570.

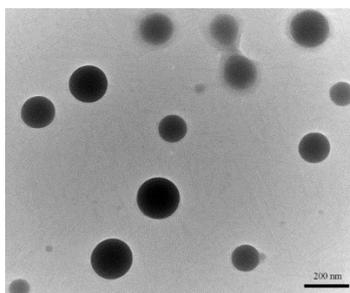
L'inserimento dei residui di CUR nella struttura del DEX modifica il bilancio idrofilia/idrofobia all'interno della struttura polimerica, conferendo proprietà autoassemblanti al coniugato <sup>[15]</sup>. Il valore di concentrazione critica di aggregazione (CAC), stimato dalla relazione tra il rapporto tra le intensità  $I_{384}/I_{373}$  negli spettri di fluorescenza del pirene in funzione del logaritmo della concentrazione del coniugato, è il parametro utilizzato per questo tipo di valutazione (Figura 2.4.4).



**Figura 2.4.4** Determinazione del valore di CAC per il coniugato DEX-CUR

Il rapporto  $I_{384}/I_{373}$  rimane pressoché invariato a basse concentrazioni, mentre si osserva un brusco cambiamento dell'intensità con una maggiore quantità di coniugato come conseguenza del processo di autoassemblaggio. È stato possibile calcolare un valore di CAC pari a  $0.31 \mu\text{g mL}^{-1}$ , compatibile con una stabilità del sistema in condizioni di elevata diluizione <sup>[16]</sup>.

Le nanoparticelle DC sono state quindi preparate mediante dispersione del coniugato DEX-CUR in PBS ( $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7.4) in una concentrazione finale pari a  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  e caratterizzate mediante analisi TEM e DLS per determinarne forma, dimensione e polidispersività. Sono state osservate nanoparticelle sferiche con diametro medio di 290 nm (Figura 2.4.5.) e un indice di polidispersività pari a 0.21.



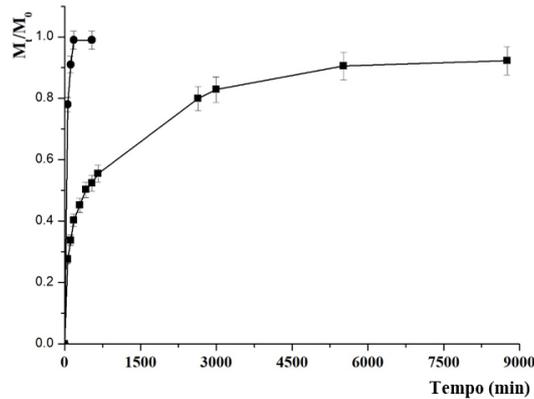
**Figura 2.4.5** Immagine TEM del sistema nanoparticellare DC

<sup>[15]</sup> Bai, F.; Diao, J.J.; Wang, Y.; Sun, S.X.; Zhang, H.M.; Liu, Y.Y.; Wang, Y.Q.; Cao, J. A New Water-Soluble Nanomicelle Formed through Self-Assembly of Pectin-Curcumin Conjugates: Preparation, Characterization, and Anticancer Activity Evaluation. *J. Agr. Food Chem.* **2017**; 65: 6840-6847.

<sup>[16]</sup> Curcio, M.; Blanco-Fernandez, B.; Diaz-Gomez, L.; Concheiro, A.; Alvarez-Lorenzo, C. Hydrophobically modified keratin vesicles for GSH-responsive intracellular drug release. *Bioconjugate Chem.* **2015**; 26: 1900-1907.

### 2.4.3 Determinazione dei profili di rilascio

Le nanoparticelle DC caricate con MTX (MTX@DC) sono state ottenute utilizzando una soluzione MTX in PBS come mezzo disperdente per il coniugato DC, e selezionando un rapporto farmaco/veicolo pari al 20% in peso. I profili di rilascio del MTX sono illustrati in Figura 2.4.6.



**Figura 2.4.6** Profili di rilascio di MTX (●) e MTX@DC (■)

MTX in forma libera mostra una rapida diffusione nel mezzo di rilascio ( $M_t/M_0$  del 90% dopo 2 ore), mentre un rilascio più prolungato ( $M_t/M_0$  del 34% allo stesso tempo) è stato registrato quando il farmaco viene caricato nel sistema nanoparticellare. Questo fenomeno è una conseguenza della ripartizione del farmaco tra le due fasi, il veicolo e il solvente. Per una più approfondita analisi dei profili di rilascio, è stato applicato il modello matematico che descrive tale fenomeno di partizione per come riportato nelle equazioni 1.17 e 1.18 (vedi introduzione) <sup>[17]</sup>:

$$\frac{M_t}{M_0} = M_{max} \left( 1 - e^{-\left(\frac{kr}{M_{max}}\right)t} \right) \quad (1.17)$$

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{M_{max} \left( e^{2\left(\frac{kr}{\alpha}\right)t} - 1 \right)}{1 - 2 M_{max} + e^{2\left(\frac{kr}{\alpha}\right)t}} \quad (1.18)$$

**Tabella 2.4.1** Valori  $R^2$  e parametri cinetici secondo il modello di Reis per nanoparticelle DC

Cinetica	$R^2$	$M_{max}$	$\alpha$	$k_R (10^{-2})$	$t_{1/2}^1 (\text{min})$
Eq. 1.17	0.8866	0.84	5.25	2.03	287
Eq. 1.18	0.9353	0.92	11.5	2.75	310

<sup>[17]</sup> Reis, A.V.; Guilherme, M.R.; Rubira, A.F.; Muniz, E.C. Mathematical model for the prediction of the overall profile of in vitro solute release from polymer networks. *J. Colloid Interf. Sci.* **2007**; 310: 128-135.

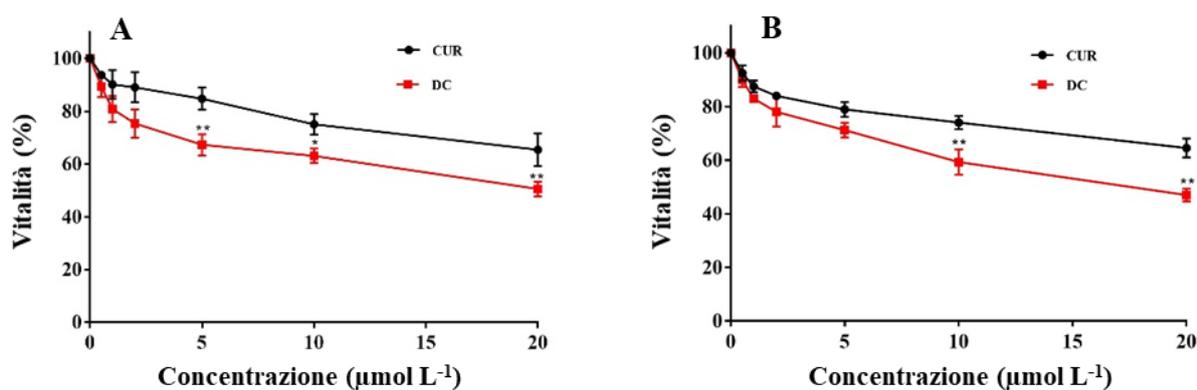
I parametri cinetici, riportati in Tabella 2.4.1., indicano chiaramente una cinetica reversibile del secondo ordine, con una costante cinetica pari a  $2.75 \cdot 10^{-2}$  e un  $t_{1/2}$  pari a 5 ore.

#### 2.4.4 Attività biologica

Le nanoparticelle DC sono progettate per migliorare l'efficacia terapeutica dell'agente citotossico in virtù del rilascio relativamente lento che consente di aumentare la selettività per il sito d'azione e dell'attività antitumorale sinergica tra CUR e MTX.

Per dimostrare questa teoria, sono stati eseguiti esperimenti di vitalità su cellule di cancro al seno MCF-7. In un primo momento, è stato dimostrato che il DEX non coniugato, in tutte le concentrazioni testate, non influisce in modo significativo ( $p > 0.05$ ) sulla vitalità cellulare, in accordo con i dati di letteratura che indicano assenza di tossicità dei sistemi di trasporto basati su questo polisaccaride [18].

Successivamente è stato valutato l'effetto della coniugazione sull'attività antitumorale della CUR confrontando la vitalità cellulare dopo 24 e 48 ore di trattamento con CUR e DC a concentrazioni CUR equivalenti nel range  $0-20 \mu\text{mol L}^{-1}$ . I risultati, rappresentati in Figura 2.4.7, dimostrano chiaramente che l'attività biologica di CUR non solo viene mantenuta dopo il processo di coniugazione, ma ne risulta significativamente aumentata.

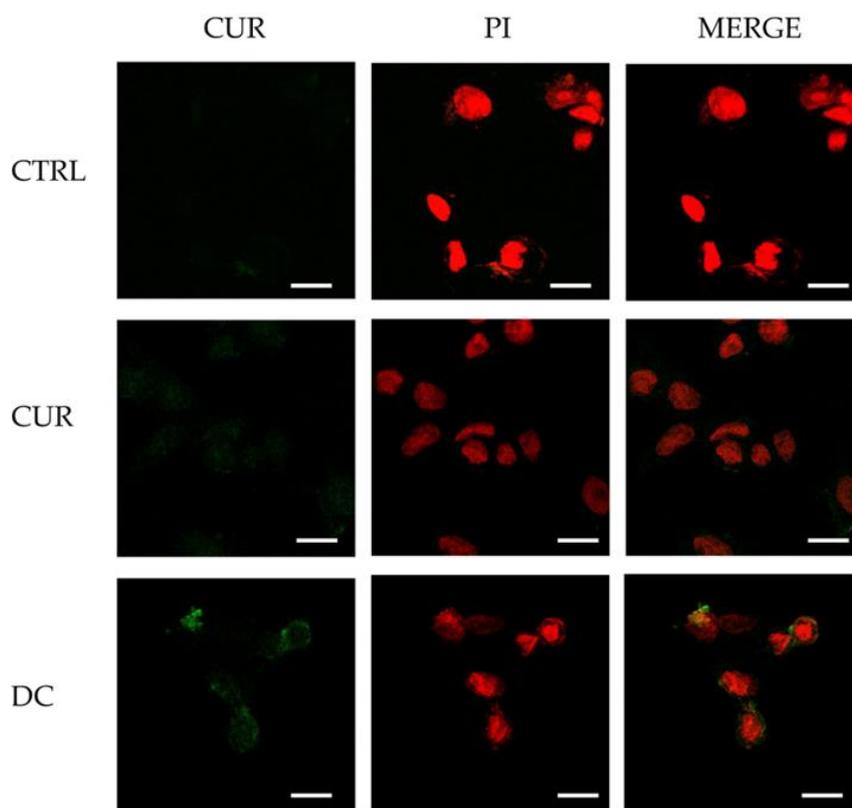


**Figura 2.4.7** Vitalità cellulare di cellule MCF-7 dopo (A) 24 e (B) 48 h di incubazione

Dopo 48 h di incubazione con DC  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ , infatti, la vitalità cellulare è ridotta fino al 47% contro il 65% registrato nel caso di CUR libera. I valori di  $\text{IC}_{50}$  (espressi come concentrazione equivalente in CUR) si riducono a circa la metà in seguito a coniugazione, passando, a 24 h, da 33 a  $18.8 \mu\text{mol L}^{-1}$  e da 31.7 a  $16.9 \mu\text{mol L}^{-1}$  a 48 h.

[18] Marquez, M.; Du, J.; Edgren, M.; Nilsson, S.; Lennartsson, L.; Hiltunen, J.; Westlin, J.E.; Tammela, T.; Raitanen, M.; Laato, M., et al. Development of dextran derivatives with cytotoxic effects in human urinary bladder cancer cell lines. *Anticancer Res.* **2002**; 22: 741-744.

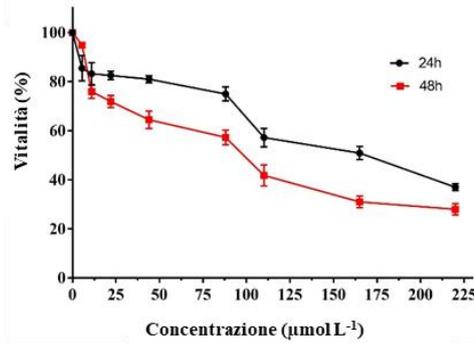
Il miglioramento dell'attività biologica di CUR può essere attribuito alla rapida internalizzazione del Destrano nelle cellule tumorali <sup>[19]</sup>. È stato dimostrato, infatti, che destrano marcato con fluoresceina isotiocianato è presente all'interno delle cellule già dopo 20 minuti di incubazione, suggerendo la sua capacità di promuovere l'internalizzazione di CUR da parte delle cellule MCF-7. La rapida internalizzazione della nanoformulazione DC è stata confermata da analisi a microscopia confocale (Figura 2.4.8), in cui è visibile la presenza del segnale di fluorescenza verde di CUR nel citoplasma. Inoltre, dalla quantificazione dell'intensità della fluorescenza, è stato dimostrato un aumento della quantità di CUR internalizzata nel caso dei trattamenti con DC ( $p < 0.05$ ).



**Figura 2.4.8** Immagini al microscopio confocale dopo trattamento con CUR a DC a  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  per 4h

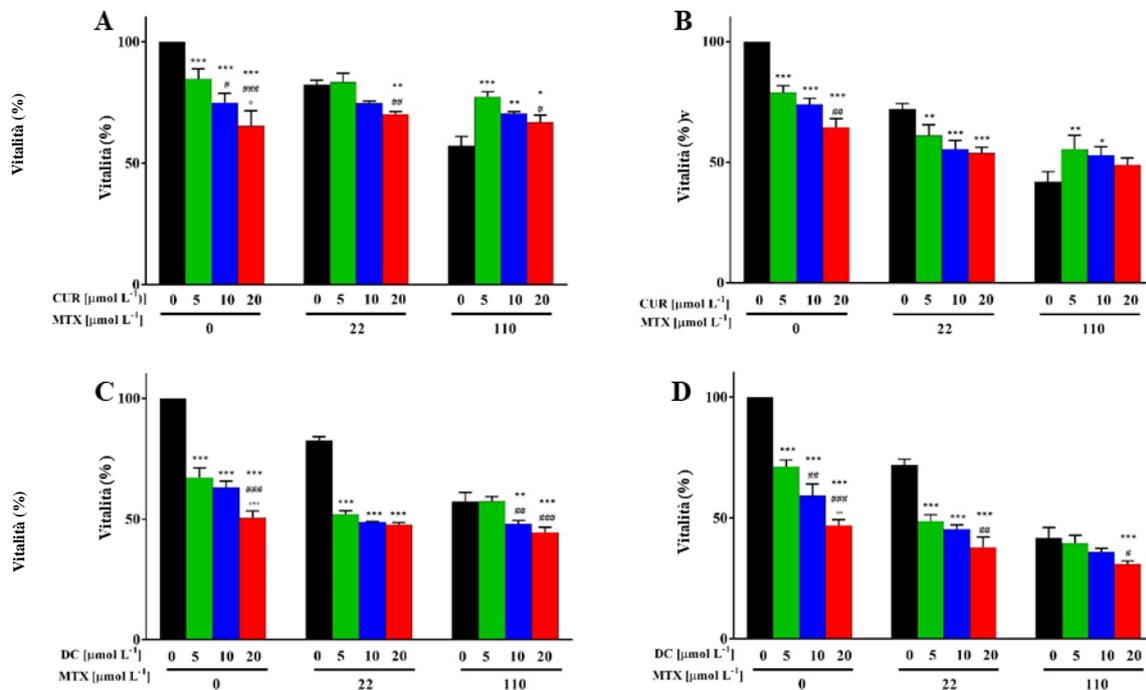
Successivamente, dopo aver valutato il tipico profilo di tossicità dose-dipendente di MTX libero (Figura 2.4.9), sono stati eseguiti esperimenti di vitalità utilizzando i sistemi MTX@DC (Figura 2.4.10. b).

<sup>[19]</sup> Vittorio, O.; Cirillo, G.; Iemma, F.; Di Turi, G.; Jacchetti, E.; Curcio, M.; Barbuti, S.; Funel, N.; Parisi, O.I.; Puoci, F.; Picci, N. Dextran-catechin conjugate: A potential treatment against the pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pharm. Res.* **2012**; 29: 2601-2614.



**Figura 2.4.9** Vitalità di cellule MCF-7 in seguito a trattamento con MTX libero

Negli esperimenti di controllo, sono stati registrati i dati di vitalità ottenuti utilizzando combinazioni CUR / MTX negli stessi rapporti (Figura 2.4.10 a).



**Figura 2.4.10** Vitalità di cellule MCF-7 dopo trattamento con diverse concentrazioni di (a, b) CUR e (c, d) DC in combinazione con MTX 22 e 110 μmol mL<sup>-1</sup> per (a, c) 24 o (b, d) 48 h. Per ogni concentrazione di MTX, \*P < 0.01, \*\*P < 0.001, \*\*\*P < 0.0001 vs [CUR/DC] 0 μmol mL<sup>-1</sup>; #P < 0.01, ##P < 0.001, ###P < 0.0001 vs [CUR/DC] 5 μmol mL<sup>-1</sup>; °P < 0.01, °°P < 0.001, °°°P < 0.0001 vs [CUR/DC] 10 μmol mL<sup>-1</sup>

I risultati mostrano che la vitalità cellulare viene ridotta fino al 47% dai trattamenti che prevedono una concentrazione di MTX pari a 22 μmol L<sup>-1</sup> e di DC pari a 5 μmol L<sup>-1</sup>, suggerendo la possibilità di ridurre significativamente la dose di MTX per un trattamento antitumorale efficace. Per analizzare meglio i dati dei trattamenti combinati rispetto a quelli dei composti singoli, gli indici di

combinazione (CI, Tabella 2.4.2) sono stati determinati utilizzando il metodo Chou-Talalay secondo la seguente equazione 2.12 <sup>[20]</sup>.

$$CI = \frac{D_1}{D_{x1}} + \frac{D_2}{D_{x2}} \quad (2.12)$$

$D_1$  e  $D_2$  sono le dosi del farmaco 1 (CUR o DC) e del farmaco 2 (MTX) all'interno della combinazione, mentre  $D_{x1}$  e  $D_{x2}$  sono le dosi del farmaco 1 e del farmaco 2 che, se utilizzati da soli, darebbero lo stesso effetto di quella avuto del trattamento combinatoriale ( $D_1$  e  $D_2$ ). Le dosi  $D_{x1}$  e  $D_{x2}$  sono state stimate dai dati dose-effetto dei trattamenti singoli. Secondo questo teorema,  $CI < 1$  indica sinergismo;  $CI = 1$  effetto additivo e  $CI > 1$  antagonismo. I dati ottenuti applicando l'equazione 2.12 ai campioni in esame sono riportati in Tabella 2.4.2.

**Tabella 2.4.2** Indici combinatoriali di MTX/CUR e MTX@DC

MTX ( $\mu\text{M}$ )	Concentrazione CUR equivalente ( $\mu\text{M}$ )											
	24h						48h					
	CUR			DC			CUR			DC		
	5	10	20	5	10	20	5	10	20	5	10	20
<b>22</b>	1.59	1.23	1.61	0.44	0.65	1.11	0.59	0.66	0.98	0.50	0.70	0.96
<b>110</b>	2.91	2.27	2.46	1.13	1.11	1.15	1.60	1.63	1.72	1.03	1.10	1.17

È evidente come, rispetto alle combinazioni MTX/CUR, i campioni MTX@DC risultino più efficaci nel ridurre la vitalità cellulare sia a 24 che a 48 h, esercitando effetti quasi additivi o sinergici a concentrazioni MTX pari a 110 e 22  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (valori CI da 0.44 a 1.1). D'altra parte, quando le cellule tumorali sono state trattate con farmaci liberi per 24 ore, sono stati osservati effetti antagonisti per tutte le concentrazioni testate ( $CI > 1.2$ ), che diventano sinergici solo dopo 48 ore di incubazione con 22  $\mu\text{mol L}^{-1}$  MTX. Ciò è in accordo con le nostre aspettative e con i dati di letteratura che dimostrano la capacità, sia dei polifenoli coniugati a materiali polimerici che dei sistemi nanoparticellari, di aumentare l'efficienza terapeutica dei farmaci antitumorali convenzionali <sup>[21]</sup>.

## 2.4.5 Conclusioni

In questo lavoro sono state fornite prove sperimentali su come un nuovo coniugato DEX-CUR con capacità autoassemblanti sia un veicolo idoneo per il rilascio controllato di agenti citotossici e su come sia in grado di determinare un effetto sinergico sulle cellule tumorali MCF-7.

<sup>[20]</sup> Ashton, J.C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method-Letter. *Cancer Res.* **2015**; 75: 2400-2400.

<sup>[21]</sup> Vittorio, O.; Curcio, M.; Cojoc, M.; Goya, G.F.; Hampel, S.; Iemma, F.; Dubrovskaya, A.; Cirillo, G. Polyphenols delivery by polymeric materials: challenges in cancer treatment. *Drug Deliv.* **2017**; 24: 162-180.

La strategia sintetica ha visto la preparazione di DEX-CUR mediante reazione di coupling ossidativo catalizzata da laccasi immobilizzata e il successivo autoassemblaggio del coniugato per formare i sistemi nanoparticellari.

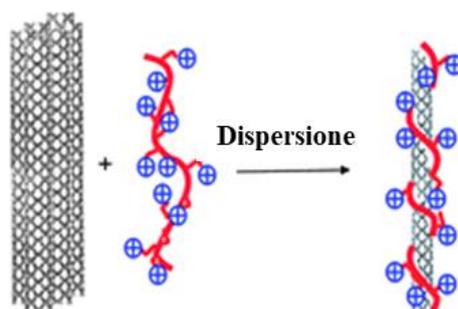
Il profilo di rilascio di MTX è risultato prolungato nel tempo come conseguenza dell'incapsulamento del farmaco; i saggi di vitalità cellulare *in vitro* hanno mostrato chiaramente il potenziamento dell'attività citotossica sia per la presenza dei residui di curcumina immobilizzati che per la rapida internalizzazione delle nanoparticelle nelle cellule tumorali.

## 2.5 Nanoibridi a base di Nanotubi di Carbonio e Chitosano per la veicolazione sito-specifica del Metotrexato in cellule di carcinoma polmonare <sup>1</sup>

### 2.5.1 Premessa

In questo lavoro è stata valutata la possibilità di sfruttare l'elevata affinità dei CNT per i tessuti polmonari per la veicolazione del metotrexato (MTX) a cellule di carcinoma polmonare sfruttando la capacità dei CNT di proteggere il farmaco da fenomeni degradativi.

In dettaglio, i nanotubi di carbonio a parete multipla (MWCNT) sono stati funzionalizzati con Chitosano (CS) per formare un sistema ibrido (CS\_MWCNT), sfruttando la specificità dei CNT nei confronti del sistema polmonare. Tale caratteristica evidenziata in una tossicità acuta per i CNT liberi, si trasferisce al sistema ibrido che risulta non tossico grazie alla presenza della componente polisaccaridica e diventa il punto di forza per rendere il veicolo sito-specifico. La scelta del chitosano per la funzionalizzazione non covalente dei CNT è dovuta alle sue proprietà quali elevata biocompatibilità, versatilità chimica e affinità per il tessuto tumorale. Sistemi a base di CS sono risultati idonei per diverse vie di somministrazione, soprattutto quella polmonare <sup>[2]</sup>. Il CS possiede comportamento idrofilico e cationico, e risulta adatto alla funzionalizzazione superficiale di CNT carbossilati con formazione di nanocarrier stabili in soluzione acquosa (Figura 2.5.1) <sup>[3]</sup>.



**Figura 2.5.1** Schematizzazione di un sistema ibrido costituito da CNT e un polimero cationico <sup>[4]</sup>

- 
- <sup>[1]</sup> Cirillo, G.; Vittorio, O.; Kunhardt, D.; Valli, E.; Voli, F.; Farfalla, A.; Curcio, M.; Spizzirri, U.G.; Hampel, S. Combining carbon nanotubes and chitosan for the vectorization of methotrexate to lung cancer cells. *Materials* **2019**; 12: 2889.
- <sup>[2]</sup> Ali, A.; Ahmed, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**; 109: 273-286.
- <sup>[3]</sup> Li, B.; Zhang, X.X.; Huang, H.Y.; Chen, L.Q.; Cui, J.H.; Liu, Y.; Jin, H.; Lee, B.J.; Cao, Q.R. Effective deactivation of A549 tumor cells in vitro and in vivo by RGD-decorated chitosan-functionalized single-walled carbon nanotube loading docetaxel. *Int. J. Pharm.* **2018**; 543: 8-20.
- <sup>[4]</sup> Sun, J.Z.; Qin, A.; Tang, B.Z. Functional polyacetylenes: Hybrids with carbon nanotubes. *Polym. Chem.* **2013**; 4: 211-223.

A causa della sua insolubilità a pH 7.4 (condizione fisiologica) e solubilità in condizioni di pH < 6.5 (microambiente tumorale), il CS permette di ottenere sistemi pH sensibili in grado di trattenere il farmaco fino al sito bersaglio <sup>[5]</sup>.

### 2.5.2 Sintesi e caratterizzazione dei nanoibridi

Le prestazioni biologiche di un nanoibrido dipendono dalle proprietà fisico-chimiche, a loro volta influenzate da quelle delle controparti di natura organica e inorganica <sup>[6]</sup>. La scelta di nanostrutture di carbonio con proprietà appropriate rappresenta lo stadio principale per la progettazione di sistemi di veicolazione <sup>[7]</sup>. Variando le condizioni sperimentali sia delle procedure sintetiche che di quelle di purificazione è possibile modulare la morfologia (es. dimensione e numero di foglietti di grafene), l'entità delle risposte elettriche e magnetiche, il numero di siti reattivi, così come le proprietà chimiche superficiali dei CNT <sup>[8]</sup>.

I CNT sono stati sintetizzati in collaborazione con il Leibniz Institute for Solid State and Materials Research (IFW) di Dresda (Germania) mediante un processo di deposizione di vapore chimico a letto fisso, che consente di produrre MWCNT con distribuzione dimensionale più ristretta rispetto a quelli ottenuti con altre metodiche di deposizione di vapore chimico come quella assistita da aerosol. Nel primo caso è possibile ottenere MWCNT con lunghezza in un intervallo di 110-980 nm, diametro interno medio di 0.7-1.5 nm e diametro esterno di 5-8 nm corrispondenti a 4-7 foglietti di grafene (Figura 2.5.2 a) <sup>[9]</sup>, mentre nel secondo caso si ottengono MWCNT con lunghezza nell'intervallo 10-30 µm e diametro esterno medio di 5-25 nm, corrispondente a 20-30 foglietti di grafene <sup>[10]</sup>. Un range dimensionale inferiore permette di ipotizzare una più efficace interazione con l'ambiente cellulare polmonare <sup>[11]</sup>.

<sup>[5]</sup> Luesakul, U.; Puthong, S.; Neamati, N.; Muangsin, N. pH-responsive selenium nanoparticles stabilized by folate-chitosan delivering doxorubicin for overcoming drug-resistant cancer cells. *Carbohydr. Polym.* **2018**; 181: 841-850.

<sup>[6]</sup> Adeli, M.; Soleyman, R.; Beiranvand, Z.; Madani, F. Carbon nanotubes in cancer therapy: A more precise look at the role of carbon nanotube-polymer interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2013**; 42: 5231-5256.

<sup>[7]</sup> Augustine, S.; Singh, J.; Srivastava, M.; Sharma, M.; Das, A.; Malhotra, B.D. Recent advances in carbon based nanosystems for cancer theranostics. *Biomater. Sci.* **2017**; 5: 901-952.

<sup>[8]</sup> Tavakolifard, S.; Biazar, E. Modification of carbon nanotubes as an effective solution for cancer therapy. *Nano Biomed. Eng.* **2016**; 8: 144-160.

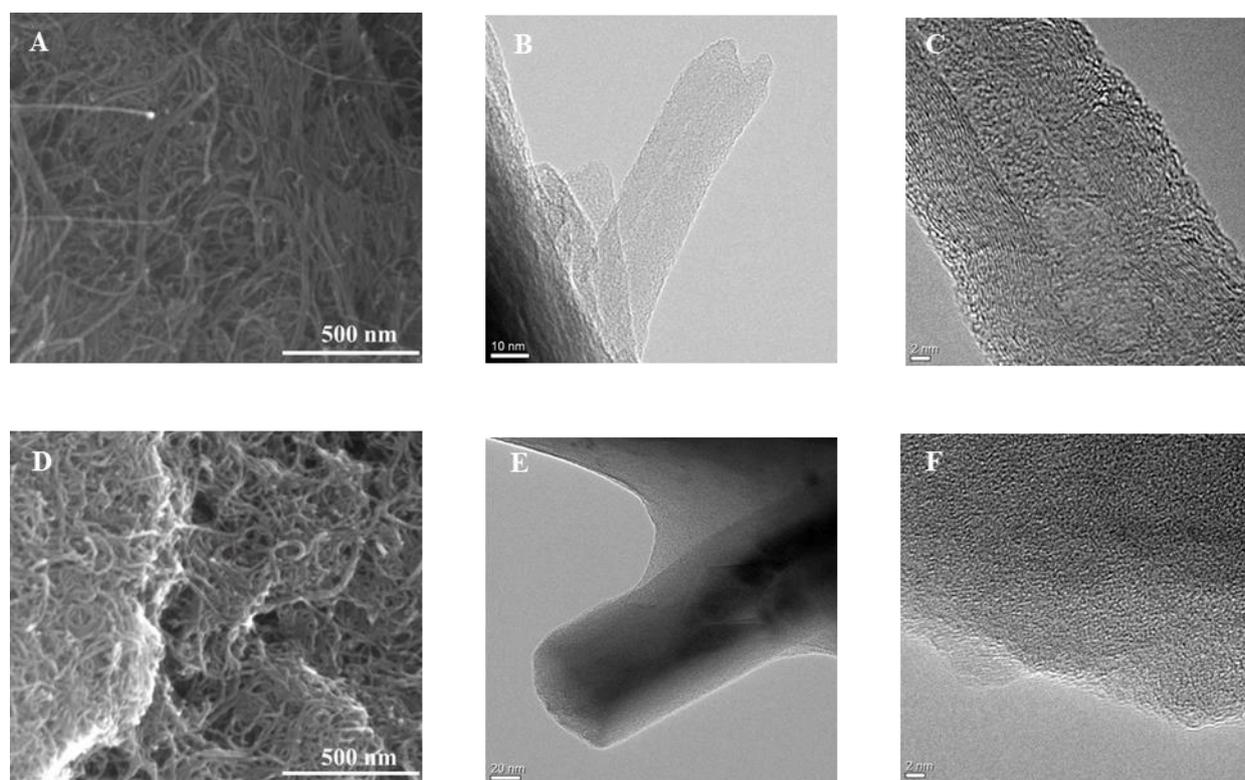
<sup>[9]</sup> Kaufmann, A.; Hampel, S.; Rieger, C.; Kunhardt, D.; Schendel, D.; Füssel, S.; Schwenzer, B.; Erdmann, K. Systematic evaluation of oligodeoxynucleotide binding and hybridization to modified multi-walled carbon nanotubes. *J. Nanobiotechnol.* **2017**; 15: 53.

<sup>[10]</sup> Cirillo, G.; Caruso, T.; Hampel, S.; Haase, D.; Puoci, F.; Ritschel, M.; Leonhardt, A.; Curcio, M.; Iemma, F.; Khavrus, V.; Grobosch, M.; Picci, N. Novel carbon nanotube composites by grafting reaction with water-compatible redox initiator system. *Colloid Polym. Sci.* **2013**; 291: 699-708.

<sup>[11]</sup> Bhattacharya, K.; Mukherjee, S.P.; Gallud, A.; Burkert, S.C.; Bistarelli, S.; Bellucci, S.; Bottini, M.; Star, A.; Fadeel, B. Biological interactions of carbon-based nanomaterials: From coronation to degradation. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2016**; 12: 333-351.

Il protocollo sintetico per la preparazione dei nanoibridi CS\_MWCNT prevede l'ossidazione preliminare dei MWCNT mediante una miscela di  $H_2SO_4/HNO_3$  al fine di rimuovere il catalizzatore residuo e formare gruppi COOH idonei alla successiva funzionalizzazione con il CS mediante interazioni di tipo sia idrofobico che idrofilico. Nel primo caso, lo scheletro carbonioso delle unità ripetitive del polisaccaride interagisce con lo strato di carboni  $sp^2$  sulla superficie dei MWCNT, mentre le funzionalità amminiche e idrossiliche del CS sono coinvolte nella formazione di interazioni elettrostatiche e legami idrogeno con i gruppi COOH di ox-MWCNT <sup>[12]</sup>.

L'efficacia di ogni step sintetico è stata valutata mediante diverse tecniche analitiche, che comprendono la caratterizzazione morfologica (analisi combinata SEM/TEM), l'analisi chimica tramite spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), la determinazione delle caratteristiche vibrazionali e delle proprietà strutturali (spettroscopia Raman) e la determinazione delle caratteristiche termiche (Analisi termogravimetrica - TGA).

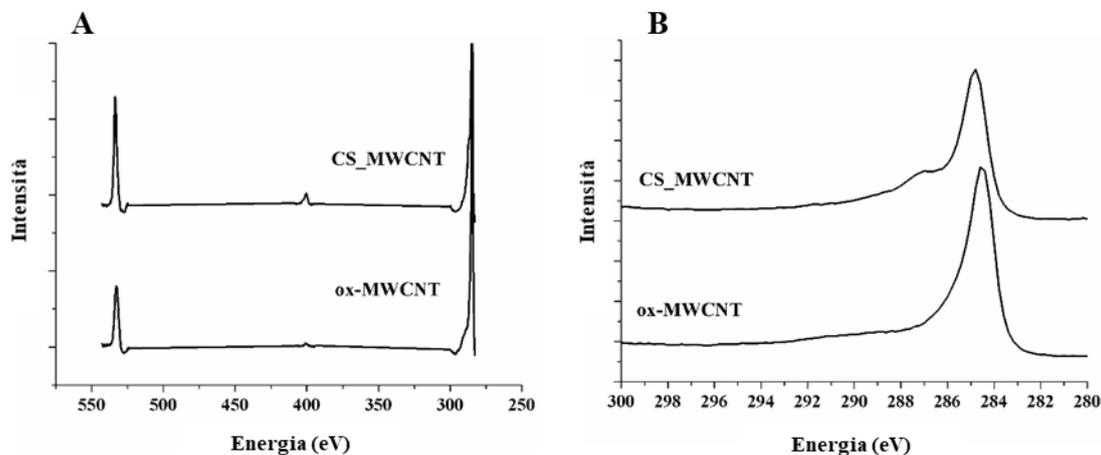


**Figura 2.5.2** Immagini SEM di (a) MWCNT; (d) CS\_MWCNT e immagini TEM di (b,c MWCNT) e (e,f) CS-MWCNT

<sup>[12]</sup> Ke, G.; Guan, W.; Tang, C.; Zeng, D.; Deng, F. Covalent functionalization of multiwalled carbon nanotubes with a low molecular weight chitosan. *Biomacromolecules* **2007**; 8: 322-326.

I MWCNT di partenza mostrano la tipica morfologia con la presenza di alcuni difetti dovuti all'ossidazione (Figura 2.5.2. a, b, c), mentre l'osservazione della struttura del CS\_MWCNT permette di evidenziare la presenza del rivestimento polimerico (Figura 2.5.2. d, e, f).

L'analisi chimica dei campioni è stata eseguita mediante XPS (Figura 2.5.3. a).



**Figura 2.5.3** (a) spettro XPS di ox-MWCNT e CS\_MWCNT; (b) spettro XPS C1s di ox-MWCNT e CS\_MWCNT

I MWCNT di partenza mostrano esclusivamente il segnale del carbonio (C1s), mentre nell'ibrido CS\_MWCNT vengono registrati anche i segnali dell'ossigeno (O1s) e dell'azoto (N1s), a conferma della presenza del rivestimento a base di CS. Inoltre, lo spettro C1s (Figura 2.5.3. b) mostra due picchi principali, situati rispettivamente a 284.5 e 285-290 eV. Il primo picco corrisponde alla componente C-C e C-H sia dei MWCNT che del CS <sup>[13]</sup>, mentre la seconda banda larga è assegnata ai legami C (ad esempio C-O, C-N) all'interno del polisaccaride CS <sup>[14]</sup>.

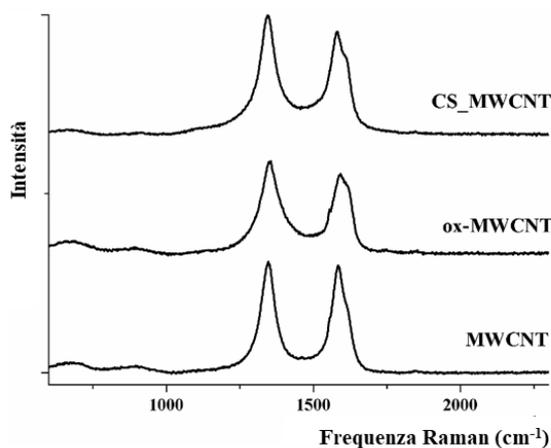
La presenza del rivestimento a base di CS è stata confermata anche mediante spettroscopia Raman, con gli spettri Raman di MWCNT che mostrano i segnali tipici a 1346 e 1584  $\text{cm}^{-1}$ , corrispondenti rispettivamente alle bande D e G (Figura 2.5.4). Le bande G sono dovute alla rete di atomi di carbonio  $\text{sp}^2$  sulla superficie dei CNT, mentre quelle D sono dovute a difetti dovuti ai carboni  $\text{sp}^3$  <sup>[15]</sup>. Gli spettri ox-MWCNT e CS\_MWCNT mostrano un comportamento simile, sebbene le bande D e G siano in rapporti relativi diversi: il rapporto  $I_G/I_D$  risulta essere pari a 0.96 per MWCNT di partenza, e 0.86 per ox-MWCNT come conseguenza dell'aumento dei siti di difetto (principalmente gruppi COOH) dovuti all'ossidazione. Nessun ulteriore cambiamento nel rapporto  $I_G/I_D$  è stato registrato dopo il

<sup>[13]</sup> Rasheed, A.; Howe, J.Y.; Dadmun, M.D.; Britt, P.F. The efficiency of the oxidation of carbon nanofibers with various oxidizing agents. *Carbon* **2007**; 45:1072-1080.

<sup>[14]</sup> Li, P.C.; Liao, G.M.; Kumar, S.R.; Shih, C.M.; Yang, C.C.; Wang, D.M.; Lue, S.J. Fabrication and Characterization of Chitosan Nanoparticle-Incorporated Quaternized Poly(Vinyl Alcohol) Composite Membranes as Solid Electrolytes for Direct Methanol Alkaline Fuel Cells. *Electrochim. Acta* **2016**; 187: 616-628.

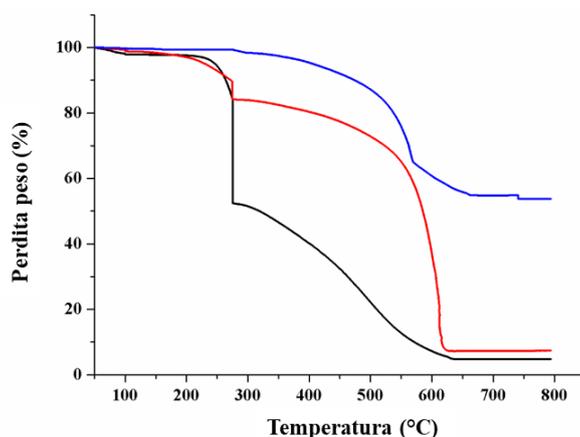
<sup>[15]</sup> Cirillo, G.; Vittorio, O.; Hampel, S.; Iemma, F.; Parchi, P.; Cecchini, M.; Puoci, F.; Picci, N. Quercetin nanocomposite as novel anticancer therapeutic: Improved efficiency and reduced toxicity. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**; 49: 359-365.

rivestimento con CS, poiché il rivestimento non covalente non comporta la formazione di nuovi difetti sulla superficie degli ox-MWCNT.



**Figura 2.5.4** Spettri Raman di MWCNT, ox-MWCNT e CS\_MWCNT

La presenza del rivestimento di CS è evidente anche dalle misurazioni TGA, a causa del diverso comportamento termico di CNT e della controparte polimerica (Figura 2.5.6).



**Figura 2.5.5** Curve TGA di ox-MWCNT (linea blu), CS (linea nera) e CS\_MWCNT (linea rossa)

La perdita di peso nel caso dei MWCNT di partenza è inferiore al 5% a 800 °C, ad indicare l'assenza di significativi difetti negli strati di grafene. Il processo di ossidazione mediante trattamento acido ha portato alla creazione di un numero maggiore di difetti, con una perdita di peso totale di circa il 45% a 800 °C dovuta alla perdita di CO<sub>2</sub> <sup>[16]</sup>. CS mostra una degradazione termica in due fasi, corrispondenti rispettivamente ai gruppi NH<sub>2</sub> o NHCOCH<sub>3</sub> terminali (275-290 °C) e alla

<sup>[16]</sup> Dong, X.; Liu, L.; Zhu, D.; Zhang, H.; Leng, X. Transactivator of transcription (TAT) peptide–chitosan functionalized multiwalled carbon nanotubes as a potential drug delivery vehicle for cancer therapy. *Int. J. Nanomed.* **2015**; 10: 3829-3841.

degradazione ossidativa del legame glicosidico (600-800 °C). La curva TGA di CS\_MWCNT risulta simile a quella del CS puro, con una perdita di peso di entità inferiore a causa della maggiore stabilità termica dovuta alla presenza dei MWCNT. Dalla differenza nelle perdite di peso, è stata calcolata la quantità di CS nei nanoibridi che risulta essere pari al 20% [17].

### 2.5.3 Valutazione dei profili di rilascio

La necessità di realizzare un sistema di veicolazione per il MTX nasce dal fatto che tale farmaco, pur possedendo un'elevata efficacia nel trattamento dei carcinomi polmonari *in vitro*, presenta delle significative limitazioni dovute all'insirgenza di farmaco-resistenza e di gravi effetti collaterali su tessuti e cellule sane [18].

Nel presente lavoro, MTX è stato caricato impiegando un rapporto farmaco/veicolo del 10% in peso e i profili di rilascio sono stati registrati a pH 5.5 e 7.4, a simulare rispettivamente il pH endosomiale delle cellule tumorali e il pH fisiologico normale.

L'applicazione del modello matematico di Reis permette di evidenziare meglio l'effetto del pH sulla variazione dell'affinità fisico-chimica del MTX per il veicolo *vs* il carrier in accordo alle equazioni 1.17 e 1.18 (vedi introduzione) [19]:

$$\frac{M_t}{M_0} = M_{max} \left( 1 - e^{-\left(\frac{kr}{M_{max}}\right)t} \right) \quad (1.17)$$

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{M_{max} \left( e^{2\left(\frac{kr}{\alpha}\right)t} - 1 \right)}{1 - 2 M_{max} + e^{2\left(\frac{kr}{\alpha}\right)t}} \quad (1.18)$$

Nelle nostre condizioni sperimentali, i valori di  $R^2$  più elevati si ottengono in seguito all'applicazione dell'equazione 1.19, suggerendo profili di rilascio con una cinetica prevalentemente del primo ordine (Tabella 2.5.1).

I profili di rilascio indicano un andamento pH sensibile, con una maggiore quantità di rilascio di MTX a pH acido ( $M_{max} \sim 1.0$ ) piuttosto che a pH fisiologico ( $M_{max} = 0.65$ ) (Figura 2.5.6).

Ulteriori informazioni possono essere ottenute confrontando le costanti cinetiche e il tempo necessario per raggiungere il 50% di  $M_{max}$  (valore  $t_{1/2}$ ) nelle due condizioni di pH.

[17] Carson, L.; Kelly-Brown, C.; Stewart, M.; Oki, A.; Regisford, G.; Luo, Z.; Bakhmutov, V.I. Synthesis and characterization of chitosan-carbon nanotube composites. *Mater. Lett.* **2009**; 63: 617-620.

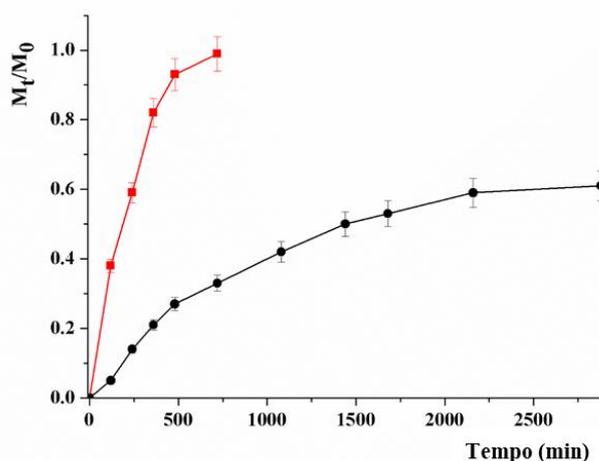
[18] Kim, N.H.; Kim, S.K.; Kim, D.S.; Zhang, D.; Park, J.A.; Yi, H.; Kim, J.S.; Shin, H.C. Anti-proliferative action of IL-6r-targeted antibody tocilizumab for non-small cell lung cancer cells. *Oncol. Lett.* **2015**; 9: 2283-2288.

[19] Reis, A.V.; Guilherme, M.R.; Rubira, A.F.; Muniz, E.C. Mathematical model for the prediction of the overall profile of in vitro solute release from polymer networks. *J. Colloid Interf. Sci.* **2007**; 310: 128-135.

**Tabella 2.5.1** Valori  $R^2$  e parametri cinetici secondo il modello di Reis per CS\_MWCNT

Modello	Parametro	MTX	
		pH 5.0	pH 7.4
Eq. 1.17	$R^2$	0.9906	0.9964
	$K_R (10^{-3})$	4.31	0.66
	$M_{max}$	0.99	0.65
	$\alpha$	99	1.86
	$t_{1/2}$	159	681
Eq. 1.18	$R^2$	0.9149	0.6959
	$K_R (10^{-3})$	11.12	0.72
	$M_{max}$	0.99	0.70
	$\alpha$	99	0.33
	$t_{1/2}$	88	760

Si può infatti evidenziare un significativo aumento della velocità di rilascio a pH 5.5 con conseguente riduzione di 4 volte del valore di  $t_{1/2}$ ; è quindi possibile ipotizzare un rilascio sito-specifico nell'ambiente tumorale.

**Figura 2.5.6** Profili di rilascio di MTX da CS\_MWCNT a pH 5.5 (linea rossa) e 7.4 (linea nera)

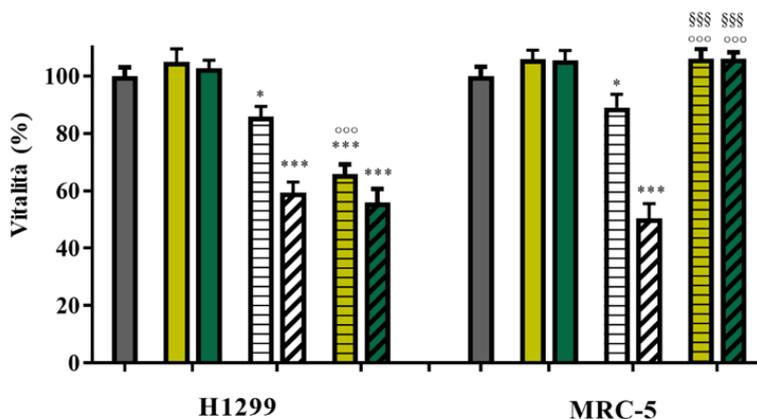
#### 2.5.4 Determinazione dell'attività antitumorale

Gli studi di vitalità sono stati effettuati su cellule H1299 derivate da linfonodi e cellule MRC-5 derivanti dal tessuto polmonare sano in collaborazione con il Children's Cancer Institute, Lowy Cancer Research Centre, University of New South Wales (Australia).

In tutti gli esperimenti, sono state impiegate concentrazioni di MTX pari a  $7.72 \cdot 10^{-5}$  e  $1.51 \cdot 10^{-3}$  mg mL<sup>-1</sup> e un rapporto fisso farmaco/carrier del 10% in peso, consentendo così di avere concentrazioni di CS\_MWCNT pari rispettivamente a  $7.72 \cdot 10^{-4}$  e  $1.51 \cdot 10^{-2}$  mg mL<sup>-1</sup>.

CS\_MWCNT non caricato non influisce sulla vitalità di entrambe le linee cellulari, dimostrando buone proprietà di biocompatibilità.

Il farmaco libero mostra una citotossicità dose-dipendente, con la più alta concentrazione testata che determina una riduzione della vitalità cellulare al 59 e al 50% rispettivamente nel caso di H1299 e MRC-5 (Figura 2.5.7).



**Figura 2.5.7** Vitalità di cellule H1299 e MRC-5 dopo trattamento con CS\_MWCNT (barra piena), MTX libero (barra con strisce vuote) e MTX@CS-MWCNT (barra con strisce piene). Le concentrazioni di MTX sono  $7.72 \cdot 10^{-5}$  (barra a righe) e  $1.51 \cdot 10^{-3}$  (barra diagonale)  $10^{-3}$  mg mL<sup>-1</sup>. Le concentrazioni di CS\_MWCNT sono  $7.72 \cdot 10^{-4}$  (barra verde chiaro) e  $1.51 \cdot 10^{-2}$  (barra verde scuro) mg mL<sup>-1</sup>. \*p < 0.01, \*\*\*p < 0.0001, vs controllo corrispondente; °°°p < 0.0001 vs MTX a concentrazioni equivalenti; §§§p < 0.0001 vs stesso trattamento sulle cellule H1299

Il fatto che MTX mostri un effetto paragonabile su entrambe le linee cellulari è correlato alle caratteristiche metaboliche specifiche delle cellule e all'elevata sensibilità ai contaminanti chimici delle cellule MRC-5 [20].

È interessante notare che MTX@CS\_MWCNT risulta altamente selettivo nel ridurre la vitalità delle cellule tumorali, mentre non intacca in maniera significativa quella delle cellule MRC-5 ( $p > 0.01$ ). Inoltre, MTX@CS\_MWCNT possiede un'attività uguale o addirittura maggiore del farmaco libero sulle cellule tumorali. A  $7.72 \text{ mg mL}^{-1}$ , infatti, la vitalità di H1299 è ridotta del 15% nel caso del trattamento con MTX libero, mentre il farmaco caricato induce un aumento significativo della citotossicità fino al 44% ( $p < 0.0001$ ).

Questi risultati, correlabili al diverso metabolismo delle cellule tumorali rispetto a quelle sane, nonché ai diversi valori di pH dei due ambienti che influenzano il rilascio di MTX, dimostrano chiaramente l'efficienza del nanoibrido CS\_MWCNT *in vitro*.

I risultati sono in accordo con i dati di letteratura, che mostrano come un lento rilascio di farmaci citotossici dai sistemi carrier sia associato ad una riduzione della tossicità del farmaco caricato

[20] Mathes, S.H.; Ruffner, H.; Graf-Hausner, U. The use of skin models in drug development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**; 69-70: 81-102.

rispetto a quello libero <sup>[21]</sup>. MTX in forma libera, infatti, penetra nella membrana cellulare attraverso diffusione passiva, mentre è richiesto un tempo relativamente più lungo per l'internalizzazione di MTX@CS\_MWCNT mediata da endocitosi <sup>[22]</sup>.

Come prova di questa affermazione, e con l'obiettivo di estendere l'applicabilità del nanocarrier proposto a diverse linee cellulari tumorali, è stata dimostrata la capacità di CS\_MWCNT di attraversare la membrana cellulare ed essere localizzato all'interno del citoplasma delle cellule EJ28 BCa (Figura 2.5.8).



**Figura 2.5.8** Immagine TEM di cellule EJ28 BCa incubate con  $1.51 \cdot 10^{-2} \text{ mg mL}^{-1}$  CS\_MWCNT

### **2.5.5 Conclusioni**

È stato dimostrato che un nanoibrido CS\_MWCNT risulta essere efficace come carrier per la veicolazione sito-specifica di MTX nelle cellule di carcinoma polmonare H1299, con tossicità trascurabile nei confronti delle cellule sane MRC-5.

La performance del sistema è correlata alle proprietà specifiche del nanoibrido, che possiede un'elevata biocompatibilità e affinità per il farmaco, determinando così un profilo di rilascio prolungato e pH sensibile. L'estesa caratterizzazione chimico-fisica e chimica di CS\_MWCNT ha permesso di evidenziare il corretto assemblaggio delle controparti organiche e inorganiche, mentre quella biologica *in vitro* ha dimostrato che, sfruttando le caratteristiche peculiari delle cellule polmonari, il sistema nanoparticellare è in grado di agire in maniera sinergica con il MTX nelle cellule tumorali, riducendone la tossicità su quelle sane.

---

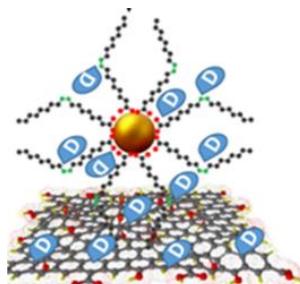
<sup>[21]</sup> Ma, N.; Zhang, B.; Liu, J.; Zhang, P.; Li, Z.; Luan, Y. Green fabricated reduced graphene oxide: Evaluation of its application as nano-carrier for pH-sensitive drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2015**; 496: 984-992.

<sup>[22]</sup> Barua, S.; Mitragotri, S. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. *Nano Today* **2014**; 9: 223-243.

## 2.6 Nanocarrier magnetici a base di grafene ossido per la veicolazione sito-specifica del Cisplatino nel trattamento del Glioblastoma <sup>1</sup>

### 2.6.1 Premessa

Nel presente studio è stata esplorata la possibilità di impiegare nanoibridi a base di ossido di ferro e grafene ossido ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$ ) come carrier per il Cisplatino (CisPt) nel trattamento del glioblastoma (Figura 2.6.1.).



**Figura 2.6.1** Rappresentazione schematica dei nanoibridi a base di maghemite oggetto di studio

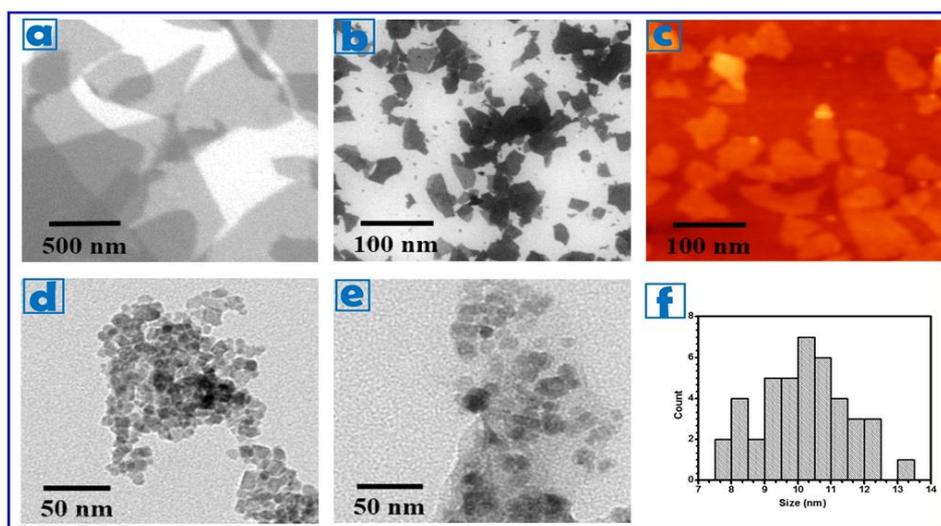
Come ampiamente discusso nei paragrafi introduttivi, il GO è un materiale promettente per la realizzazione di sistemi di rilascio grazie alla sua ampia superficie, che è quattro volte superiore a quella di qualsiasi altro nanomateriale e all'elevata idrofilia dovuta alla presenza di gruppi funzionali contenenti ossigeno, quali carbossili, epossidi e idrossili <sup>[2]</sup>. Il GO è in grado di interagire con farmaci di diversa natura mediante interazioni  $\pi\text{-}\pi$  mediate dai carboni  $\text{sp}^2$  e legami ad idrogeno dovuti ai gruppi funzionali presenti ai bordi dei foglietti <sup>[3]</sup>. Sistemi a base di GO sono in grado di accumularsi in modelli di diversi tumori solidi e rilasciare selettivamente i farmaci citotossici caricati <sup>[4]</sup>. L'efficienza di tali sistemi può essere migliorata mediante incorporazione di materiali magnetici che conferiscono un effetto targeting <sup>[5]</sup>. Le nanoparticelle magnetiche a base di ossido di ferro

- 
- <sup>[1]</sup> Makharza, S.A.; Cirillo, G.; Vittorio, O.; Valli, E.; Voli, F.; Farfalla, A.; Curcio, M.; Iemma, F.; Nicoletta, F.P.; El-Gendy, A.A.; Goya, G.F.; Hampel, S. Magnetic graphene oxide nanocarrier for targeted delivery of cisplatin: A perspective for glioblastoma treatment. *Pharmaceuticals* **2019**; 12: 76.
- <sup>[2]</sup> Rahmanian, N.; Eskandani, M.; Barar, J.; Omid, Y. Recent trends in targeted therapy of cancer using graphene oxide-modified multifunctional nanomedicines. *J. Drug Target.* **2017**; 25: 202-215.
- <sup>[3]</sup> Orecchioni, M.; Cabizza, R.; Bianco, A.; Delogu, L.G. Graphene as cancer theranostic tool: Progress and future challenges. *Theranostics* **2015**; 5: 710-723.
- <sup>[4]</sup> Moore, T.L.; Podilakrishna, R.; Rao, A.; Alexis, F. Systemic administration of polymer-coated nano-graphene to deliver drugs to glioblastoma. *Part. Part. Syst. Charact.* **2014**; 31: 886-894.
- <sup>[5]</sup> Richard, S.; Saric, A.; Boucher, M.; Slomianny, C.; Geffroy, F.; Mériaux, S.; Lalatonne, Y.; Petit, P.X.; Motte, L. Antioxidative Theranostic Iron Oxide Nanoparticles toward Brain Tumors Imaging and ROS Production. *ACS Chem. Biol.* **2016**; 11: 2812-2819.

(maghemite  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  o magnetite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) sono ampiamente utilizzate per questo scopo per le loro proprietà superparamagnetiche [6]. La diversa stabilità chimica di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  influenza i profili di tossicità: la minore stabilità di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  porta al rilascio di ioni  $\text{Fe}^{2+}$ , con possibile formazione di specie ROS che danneggiano la membrana cellulare e gli organelli citoplasmatici [7], mentre  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  mostra una migliore stabilità [8].

### 2.6.2 Sintesi e caratterizzazione dei nanoibridi

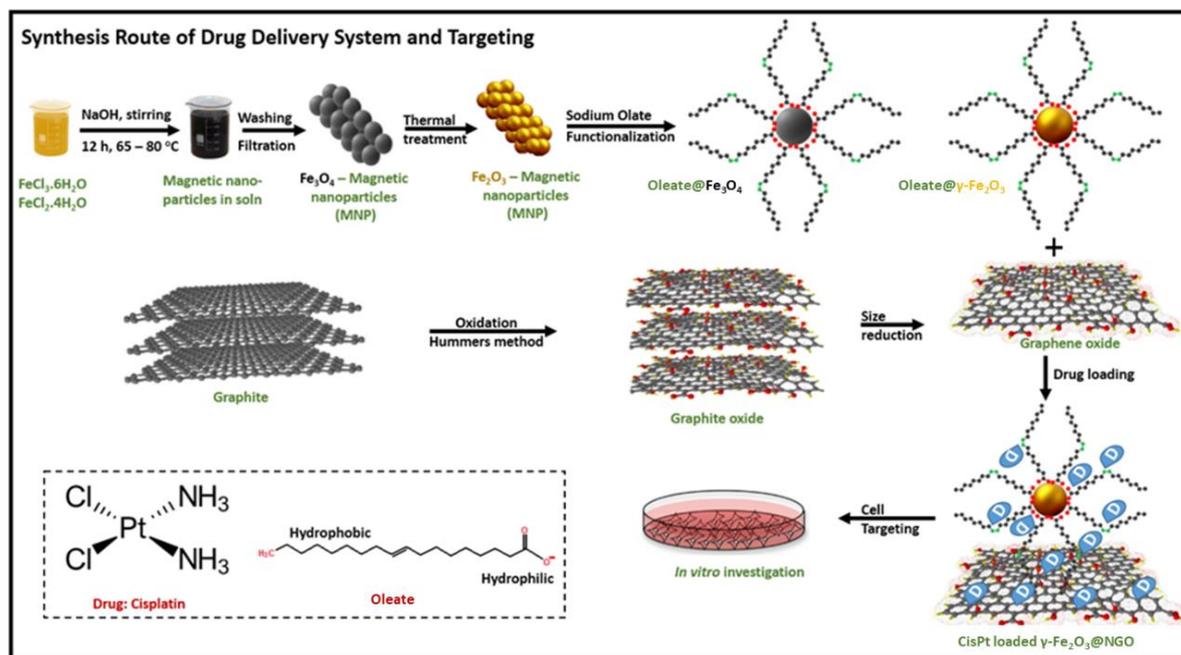
La dimensione media delle particelle di GO di partenza, sintetizzate in collaborazione con il Leibniz Institute for Solid State and Materials Research (IFW) di Dresda (Germania) è stata valutata mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) ed è risultata essere dell'ordine 350-400 nm in larghezza; si è quindi proceduto a ridurne le dimensioni mediante sonicazione fino al raggiungimento delle dimensioni ottimali di 80-100 nm in larghezza e uno spessore di 6.3 nm (NGO) corrispondente a circa 10 foglietti se si assume una distanza tra gli strati pari a 0.7 nm (Figura 2.6.2 a, b, c) [9].



**Figura 2.6.2** Immagini SEM di (a) GO; (b) NGO. (c) Immagine AFM di NGO. Immagini TEM di (d)  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ; (e)  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ @NGO. (f) Distribuzione dimensionale delle nanoparticelle  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (circa 10 nm)

- [6] Lee, N.; Yoo, D.; Ling, D.; Cho, M.H.; Hyeon, T.; Cheon, J. Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magneto-responsive Therapy. *Chem. Rev.* **2015**; 115: 10637-10689.
- [7] Roca, A.G.; Gutiérrez, L.; Gavilán, H.; Fortes Brollo, M.E.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Morales, M.D.P. Design strategies for shape-controlled magnetic iron oxide nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**; 138: 68-104.
- [8] Pham, B.T.T.; Colvin, E.K.; Pham, N.T.H.; Kim, B.J.; Fuller, E.S.; Moon, E.A.; Barbey, R.; Yuen, S.; Rickman, B.H.; Bryce, N.S.; Bickley, S.; Tanudji, M.; Jones, S.K.; Howell, V.M.; Hawke, B.S. Biodistribution and clearance of stable superparamagnetic maghemite iron oxide nanoparticles in mice following intraperitoneal administration. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**; 19: 205.
- [9] Makharza, S.; Vittorio, O.; Cirillo, G.; Oswald, S.; Hinde, E.; Kavallaris, M.; Buechner, B.; Mertig, M.; Hampel, S. Graphene Oxide - Gelatin Nanohybrids as Functional Tools for Enhanced Carboplatin Activity in Neuroblastoma Cells. *Pharm. Res.* **2015**; 32: 2132-2143.

Le particelle di NGO così ottenute sono state impiegate per la preparazione del sistema magnetico ibrido ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@NGO) come illustrato nella Figura 2.6.3.



**Figura 2.6.3** Rappresentazione schematica della sintesi del sistema ibrido  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@NGO

La scelta delle nanoparticelle di maghemite  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> è stata effettuata per conferire proprietà superparamagnetiche ai nanoibridi <sup>[10]</sup>. Il superparamagnetismo è cruciale per applicazioni in campo biomedico; l'assenza di proprietà magnetiche residue, in seguito alla rimozione del campo esterno, garantisce che non avvengano fenomeni di aggregazione in ambiente biologico <sup>[11]</sup>.

Le nanoparticelle  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (dimensione media di 10 nm) sono state sintetizzate mediante trattamento termico della magnetite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e successivamente rivestite con acido oleico/oleato di sodio per aumentarne la dispersività in mezzi acquosi e quindi la biocompatibilità <sup>[12]</sup>. Proprio questo rivestimento lascia ipotizzarne l'impiego per la realizzazione di sistemi di veicolazione al cervello grazie alla presenza di sistemi di trasporto per gli acidi grassi sulla barriera emato-encefalica <sup>[13]</sup>.

<sup>[10]</sup> Lee, N.; Yoo, D.; Ling, D.; Cho, M.H.; Hyeon, T.; Cheon, J. Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magnetoresponse Therapy. *Chem. Rev.* **2015**; 115: 10637-10689.

<sup>[11]</sup> Arruebo, M.; Fernández-Pacheco, R.; Ibarra, M.R.; Santamaría, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today* **2007**, 2: 22-32.

<sup>[12]</sup> Mei, Z.; Dhanale, A.; Gangaharan, A.; Sardar, D.K.; Tang, L. Water dispersion of magnetic nanoparticles with selective Biofunctional for enhanced plasmonic biosensing. *Talanta* **2016**; 151: 23-29.

<sup>[13]</sup> Mitchell, R.W.; Edmundson, C.L.; Miller, D.W.; Hatch, G.M. On the mechanism of oleate transport across human brain microvessel endothelial cells. *J. Neurochem.* **2009**; 110: 1049-1057.

La magnetite è stata preventivamente sintetizzata mediante una tecnica di co-precipitazione di soluzioni  $\text{FeCl}_3$  e  $\text{FeCl}_2$  [14].

L'ossidazione di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  determina una variazione di colore da nero a bruno-rossastro. Gli spettri di diffrazione ai raggi X (XRD), riportati in Figura 2.6.4. e analizzati utilizzando il database JCPDS 19-629 (per  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e 39-1346 (per  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) mostrano l'avvenuta reazione.

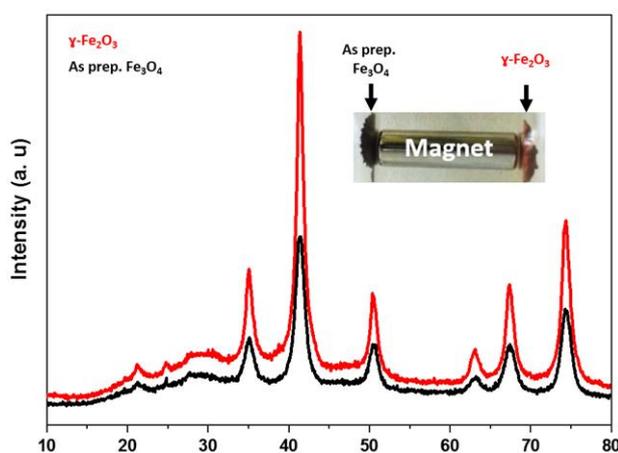


Figura 2.6.4 Spettri XRD di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

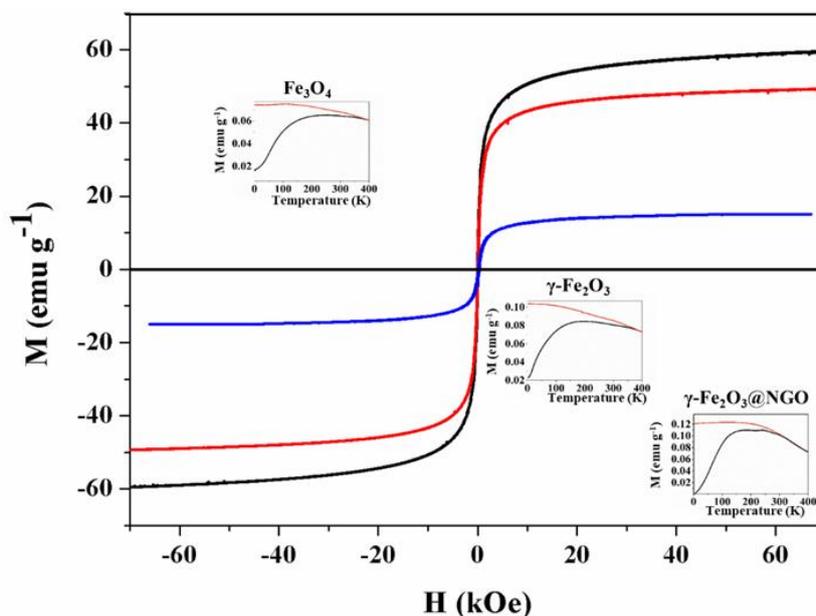
Le strutture cristalline della magnetite e della maghemite sono evidenziate dagli indici di Miller (hkl) (220), (311), (400), (422), (511) e (440) e dagli angoli di diffrazione  $2\theta = 35.1^\circ$ ;  $41.6^\circ$ ;  $50.4^\circ$ ,  $63.1^\circ$ ,  $67.4^\circ$  e  $74.3^\circ$  [15].

Le curve di magnetizzazione in funzione della temperatura e del campo magnetico sono rappresentate in Figura 2.6.5. Il valore di magnetizzazione di saturazione (MS) risulta pari a 59.36 emu/g nel caso di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e 49.25 emu/g nel caso di  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . In seguito ad intercalazione nei foglietti di NGO, il valore MS diventa pari a 15.02 emu/g, ad indicare che la quantità di  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  dispersa nel sistema ibrido è pari a circa il 30 % in peso. I valori di coercività a temperatura ambiente HC (valore del campo che deve essere applicato per portare la magnetizzazione dal valore residuo a zero) sono praticamente pari a zero per tutti i campioni.

Successivamente sono state determinate le curve di magnetizzazione in funzione della temperatura attraverso le procedure ZFC-FC.

[14] Szalai, A.J.; Manivannan, N.; Kaptay, G. Super-paramagnetic magnetite nanoparticles obtained by different synthesis and separation methods stabilized by biocompatible coatings. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2019**, 568:113-122.

[15] Múzquiz-Ramos, E.M.; Guerrero-Chávez, V.; Macías-Martínez, B.I.; López-Badillo, C.M.; García-Cerda, L.A. Synthesis and characterization of maghemite nanoparticles for hyperthermia applications. *Ceram. Int.* **2014**: 41: 397-402.



**Figura 2.6.5** Curve di magnetizzazione per  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (linee nere),  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (linee rosse) e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$  (linee blu). Gli inserti mostrano le curve di magnetizzazione in funzione della temperatura in assenza (ZFC, linee nere) e in presenza (FC, linee arancioni) di campo magnetico.

Nel processo ZFC, il campione è stato portato, in assenza di campo applicato, dalla temperatura ambiente alla temperatura  $T_{\min}$  di 4 K, raggiunta la quale è stato applicato un campo  $H$  pari a 100 Oe. A questo punto, il campione è stato scaldato fino a 400 K, quindi riportato a  $T_{\min}$  in presenza del campo applicato e nuovamente a 400 K (modalità FC). Il valore di temperatura alla quale si ha il picco nella misura ZFC viene usualmente considerato come il valore medio al di sopra del quale il sistema entra nel regime superparamagnetico e al di sotto del quale si mantiene nel suo stato bloccato. Le curve ottenute per  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$  mostrano caratteristiche simili, ovvero un ampio massimo nelle curve ZFC dovuto al fatto che non si hanno particelle monodisperse. I massimi sono centrati intorno a  $T \approx 194$  K, 245 K e 242 K rispettivamente per  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$ , tutti al di sotto della temperatura ambiente.

Le curve TGA di NGO e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$  sono illustrate nella Figura 2.6.6. Nel caso del campione NGO (Figura 2.6.6. a), la perdita di peso nell'intervallo 150-250 °C con il massimo a 215°C (freccia 1) è attribuita alla decomposizione delle funzionalità ricche di ossigeno nella struttura basale del grafene. Tra 400 e 525 °C (massimo a 490 °C, vedi freccia 2), si verifica un'elevata perdita di peso dovuta alla decomposizione dei gruppi termicamente più stabili. Nel caso di  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$  (Figura 2.6.6. b), le temperature di decomposizione si spostano a valori più bassi (con massimi rispettivamente a 170 e 305°C), come conseguenza della formazione di un legame tra le nanoparticelle di maghemite e gli strati di grafene.

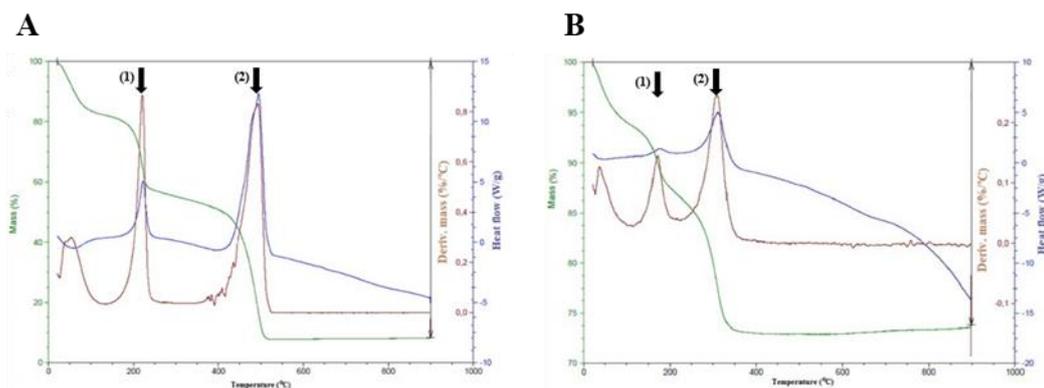


Figura 2.6.6 Curve TGA di (a) NGO e (b)  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$

### 2.6.3 Determinazione dei profili di rilascio

Il sistema ibrido  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$  possiede un'efficienza di caricamento (DLE) pari  $0.35 \text{ mg mg}^{-1}$ , e nei nostri esperimenti è stato caricato mediante impregnazione utilizzando un rapporto farmaco/carrier pari al 10% in peso. I profili di rilascio sono mostrati in Figura 2.6.7.

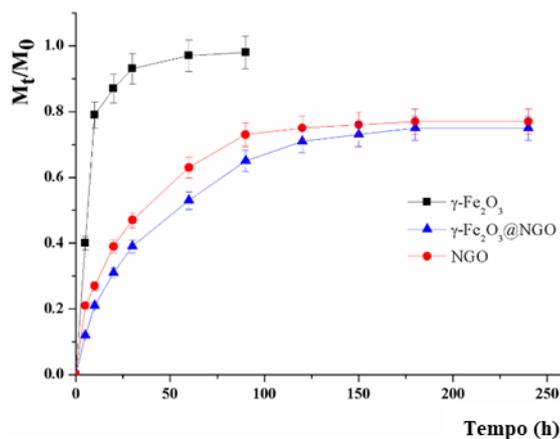


Figura 2.6.7 Profili di rilascio di CisPt da NGO (linea rossa),  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (linea nera) e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$  (linea blu)

Per un'analisi approfondita dei profili di rilascio, è stato applicato il modello matematico di Reis che considera la partizione tra il carrier ed il mezzo di rilascio in accordo alle equazioni 1.17 e 1.18 (vedi introduzione) <sup>[16]</sup>:

$$\frac{M_t}{M_0} = M_{max} \left( 1 - e^{-\left(\frac{kr}{M_{max}}\right)t} \right) \quad (1.17)$$

<sup>[16]</sup> Reis, A.V.; Guilherme, M.R.; Rubira, A.F.; Muniz, E.C. Mathematical model for the prediction of the overall profile of in vitro solute release from polymer networks. *J. Colloid Interf. Sci.* **2007**; 310: 128-135.

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{M_{max} \left( e^{2\left(\frac{kr}{\alpha}\right)t} - 1 \right)}{1 - 2 M_{max} + e^{2\left(\frac{kr}{\alpha}\right)t}} \quad (1.18)$$

Nelle nostre condizioni sperimentali (Tabella 2.6.1), i valori di  $R^2$  indicano che la presenza di NGO rende la cinetica di rilascio prevalentemente del secondo ordine reversibile.

**Tabella 2.6.1** Valori  $R^2$  e parametri cinetici secondo il modello di Reis per  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, NGO e  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@NGO

Cinetica	Parametro	$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	NGO	$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @NGO
Eq. 1.17	$R^2$	0.9818	0.9822	0.9909
	$M_{max}$	0.98	0.76	0.74
	$\alpha$	49	3.17	2.85
	$k_R (10^{-2})$	12.71	2.76	1.85
	$t_{1/2}^1$ (h)	5.35	18.81	27.00
Eq. 1.18	$R^2$	0.9340	0.9908	0.9960
	$M_{max}$	0.97	0.78	0.78
	$\alpha$	32.33	3.54	3.54
	$k_R (10^{-2})$	18.28	3.42	2.25
	$t_{1/2}^2$ (h)	5.15	19.01	29.38

In assenza di NGO, è stato registrato un rapido rilascio di CisPt ( $M_t/M_0$  di 0.90 dopo 20 h), con un alto valore di  $\alpha$  che indica una bassa affinità del farmaco per il veicolo  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Al contrario, la forte interazione tra CisPt e NGO <sup>[17]</sup> determina un rilascio più prolungato nel tempo ( $M_{max} < 0.8$  anche dopo 250 h), con un valore di affinità pari a 3.54 sia nel caso di NGO che di  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@NGO. È evidente come la presenza di  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@NGO rallenti il rilascio, con riduzione dei valori di costante cinetica  $k_R$  e valori di  $t_{1/2}$  che si spostano da 19.01 h nel caso di NGO a 29.38 h nel caso  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@NGO. Ciò potrebbe essere attribuito alla presenza del rivestimento di acido oleico/oleato sulla superficie delle particelle di maghemite che in qualche modo ostacola la diffusione del farmaco.

#### 2.6.4 Valutazione della citotossicità *in vitro*

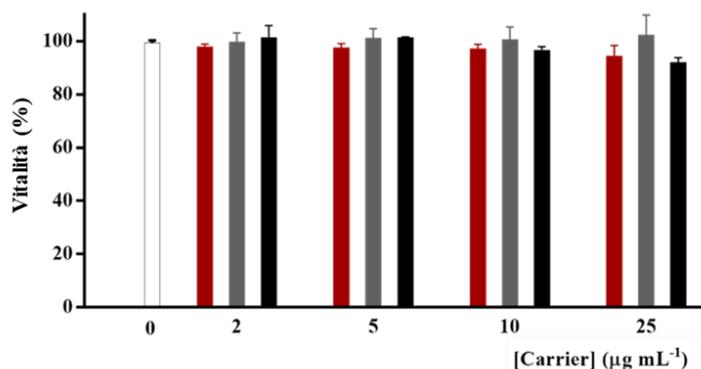
Gli esperimenti di tossicità sono stati effettuati in collaborazione con il Children's Cancer Institute, Lowy Cancer Research Centre, University of New South Wales (Australia).

Prima di testare l'efficienza di  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@NGO come veicolo per il CisPt, è stata valutata la tossicità delle nanoparticelle vuote (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>,  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@NGO) su linee cellulari di glioblastoma umano U87 in un intervallo di concentrazione pari a 0 - 25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. In questo intervallo è garantita la

<sup>[17]</sup> Liu, P.; Wang, S.; Liu, X.; Ding, J.; Zhou, W. Platinated graphene oxide: A nanoplatform for efficient gene-chemo combination cancer therapy. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**; 121: 319-329.

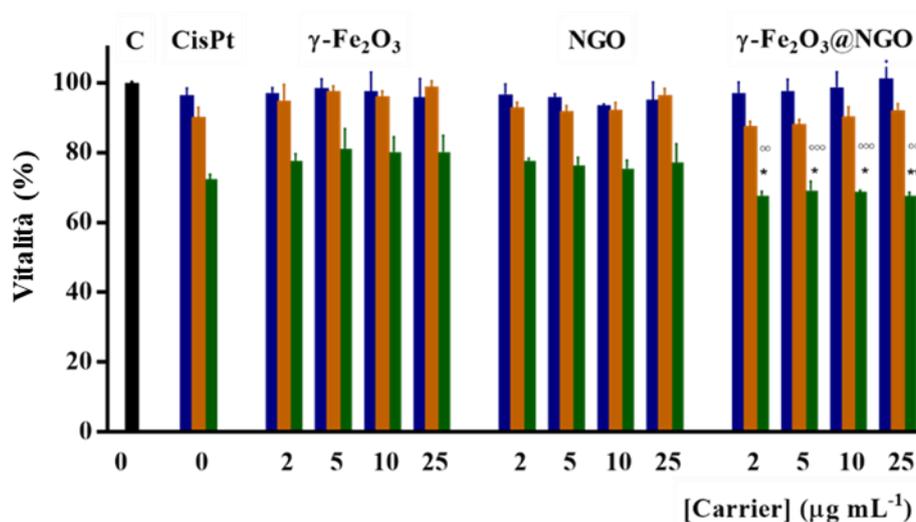
dispersione stabile delle nanoparticelle senza alcun segno di aggregazione, come evidenziato da misure di Light Scattering (DLS).

Tutti i campioni mostrano valori di vitalità superiori al 96% a tutte le concentrazioni testate, dimostrando l'elevata biocompatibilità di tutti i sistemi nanoparticellari (Figura 2.6.8.) [18].



**Figura 2.6.8** Vitalità di cellule U87 dopo incubazione con NGO (grigio),  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (rosso) e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$  (nero)

Studi successivi sono stati effettuati utilizzando l'ibrido  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$  caricato con CisPt in diversi rapporti farmaco/veicolo con intervalli di concentrazione pari a 0-25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  per il carrier e 0-10  $\mu\text{M}$  per il farmaco (Figura 2.6.9.).



**Figura 2.6.9** Vitalità di cellule U87 dopo incubazione con concentrazioni di CisPt 2.5 (blu); 5.0 (arancione); 10.0 (verde)  $\mu\text{M}$  in forma libera e dopo caricamento su  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ; NGO;  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$ . Le concentrazioni di carrier sono 2.0; 5.0; 10.0; 25.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Per  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$  (10  $\mu\text{M}$  CisPt), \*p < 0.05 vs NGO; \*\*\*p < 0.001 vs NGO; °°°p < 0.001 vs  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ; °°°°p < 0.0001 i  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

[18] Ryan, S.M.; Brayden, D.J. Progress in the delivery of nanoparticle constructs: Towards clinical translation. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2014**; 18: 120-128.

Dai dati riportati in Figura 2.6.9, è chiaro che l'efficacia del CisPt 10  $\mu\text{M}$  non varia in seguito a caricamento sui diversi veicoli, con  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$  che nel complesso risulta essere il carrier più efficace.

Per valutare la possibilità di ottenere una veicolazione sito-specifica del farmaco, è stato progettato un esperimento che prevede l'incubazione delle U87 con  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$  caricato con CisPt 10  $\mu\text{M}$  per 24 ore sotto l'effetto di un campo magnetico generato da un magnete permanente Nd-Fe-B. Il risultato indica un effetto citotossico selettivo in prossimità del magnete, senza alcuna tossicità rilevante nella regione in cui le forze magnetiche sono trascurabili (Figura 2.6.10).



**Figura 2.6.10** Immagine al microscopio ottico di cellule U87 dopo incubazione con CisPt 2.5  $\mu\text{M}$  caricato su  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$

### **2.6.5 Conclusioni**

La possibilità di ottenere una veicolazione sito-specifica del CisPt è stata realizzata combinando nanoparticelle magnetiche  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  su foglietti di NGO.

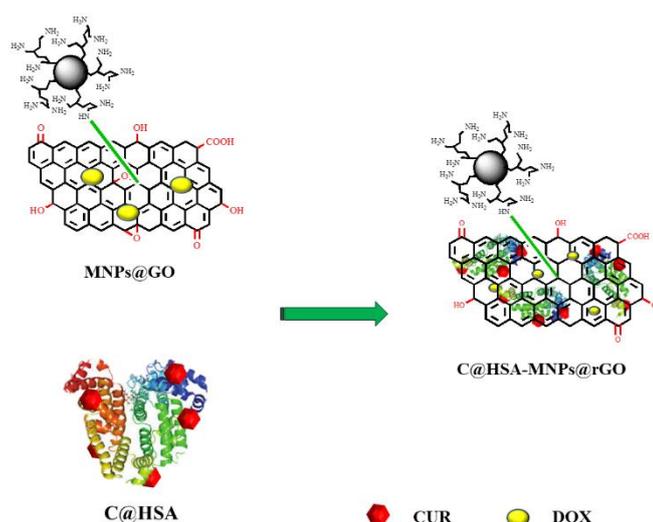
I risultati ottenuti sono di grande interesse per applicazioni in chemioterapia: i) si ha un ridotto rilascio di CisPt nei primi tempi sperimentali (20 h); ii) si può raggiungere un efficace targeting magnetico del CisPt nelle cellule tumorali con ridotta tossicità a carico delle cellule sane; iii) il CisPt caricato in  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$  è attivo nel ridurre la vitalità delle cellule tumorali con un'efficienza paragonabile a quella del farmaco libero.

## 2.7 Nanoibridi funzionali a base di ossido di grafene per la veicolazione sito-specifica della Doxorubicina in cellule di Neuroblastoma <sup>1</sup>

### 2.7.1 Premessa

In questo lavoro è stata proposta la realizzazione di un sistema nanoibrido multifunzionale (C@HSA-MNPs@rGO) in grado di veicolare selettivamente la Doxorubicina in cellule di Neuroblastoma.

Il sistema è costituito da una porzione inorganica, contenente grafene ossido (GO), sulla cui superficie sono legate particelle di ferro superparamagnetiche (MNP), e da un rivestimento organico esterno costituito da un bioconiugato (C@HSA) di Curcumina (CUR) e Albumina Serica Umana (HSA, Figura 2.7.1).



**Figura 2.7.1** Rappresentazione schematica del sistema ibrido multifunzionale oggetto del presente studio

Il sistema proposto trae beneficio da due effetti principali: il potenziamento dell'attività di agenti citotossici convenzionali da parte dei polifenoli <sup>[2]</sup> e la possibilità di modulare il rilascio del principio attivo da parte del sistema carrier <sup>[3]</sup>.

<sup>[1]</sup> Lerra, L.; Farfalla, A.; Sanz, B.; Cirillo, G.; Vittorio, O.; Voli, F.; Grand, M.L.; Curcio, M.; Nicoletta, F.P.; Dubrovska, A.; Hampel, S.; Iemma, F.; Goya, G.F. Graphene oxide functional nanohybrids with magnetic nanoparticles for improved vectorization of doxorubicin to neuroblastoma cells. *Pharmaceutics* **2019**; 11: 3

<sup>[2]</sup> Alshatwi, A.A.; Periasamy, V.S.; Athinarayanan, J.; Elango, R. Synergistic anticancer activity of dietary tea polyphenols and bleomycin hydrochloride in human cervical cancer cell: Caspase-dependent and independent apoptotic pathways. *Chem. Biol. Interact.* **2016**; 247: 1-10.

<sup>[3]</sup> Biju, V. Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2014**; 43: 744-764.

Ogni componente fornisce al sistema proprietà peculiari: i) le MNP sono le unità target <sup>[4]</sup>; ii) il GO aumenta la capacità di caricamento del farmaco e rende il profilo di rilascio prolungato nel tempo <sup>[5]</sup>; iii) la curcumina immobilizzata nel rivestimento funzionale ha azione sinergica con la DOX <sup>[6]</sup>.

### 2.7.2 Sintesi e caratterizzazione del sistema idrido

La procedura sintetica prevede inizialmente la sintesi delle controparti inorganiche (MNPs@GO) e organiche (C@HSA), e successivamente il loro assemblaggio per l'ottenimento del nanoibrido C@HSA-MNPs@rGO (Figura 2.7.2).

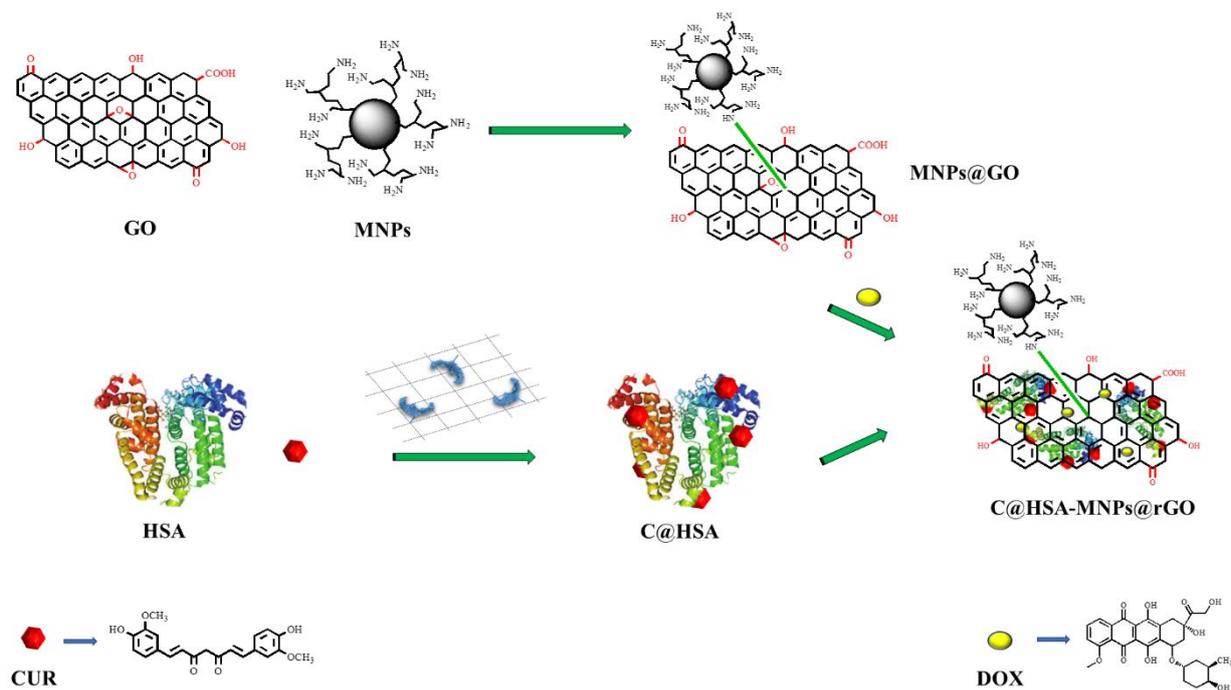


Figura 2.7.2 Schematizzazione della sintesi del nanoibrido C@HSA-MNPs@rGO

#### 2.7.2.1 Sintesi e caratterizzazione della componente inorganica

La componente inorganica, costituita dal sistema MNPs@GO, è stata ottenuta mediante funzionalizzazione del GO con nanoparticelle magnetiche rivestite di polietilenimina (PEI-MNP). I gruppi amminici del PEI sono infatti in grado di reagire con i foglietti di GO tramite un processo di “grafting to” <sup>[7]</sup>.

<sup>[4]</sup> Xu, H.L.; Mao, K.L.; Huang, Y.P.; Yang, J.J.; Xu, J.; Chen, P.P.; Fan, Z.L.; Zou, S.; Gao, Z.Z.; Yin, J.Y., et al. Glioma-targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles as drug-carrying vehicles for theranostic effects. *Nanoscale* **2016**; 8: 14222-14236.

<sup>[5]</sup> Feng, L.; Liu, Z. Graphene in biomedicine: Opportunities and challenges. *Nanomedicine* **2011**; 6: 317-324.

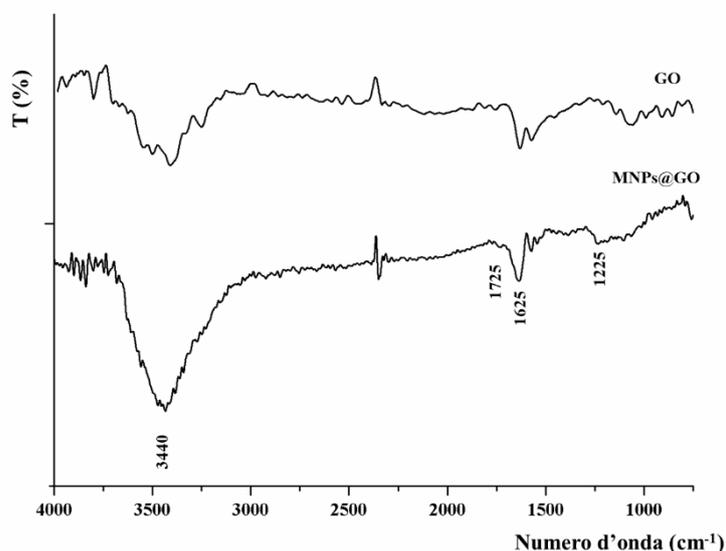
<sup>[6]</sup> Picone, P.; Nuzzo, D.; Caruana, L.; Messina, E.; Scafidi, V.; Di Carlo, M. Curcumin induces apoptosis in human neuroblastoma cells via inhibition of AKT and Foxo3a nuclear translocation. *Free Rad. Res.* **2014**; 48: 1397-1408.

<sup>[7]</sup> Liu, C.; Liu, H.; Lu, C.; Tang, K.; Zhang, Y. Polyethyleneimine-modified graphene oxide/PNIPAm thermoresponsive hydrogels with rapid swelling/deswelling and improved mechanical properties. *J. Mater. Sci.* **2017**; 52: 11715-11724.

Le MNPs sono state sintetizzate in collaborazione con l'Institute of Nanoscience of Aragon (INA), Department of Condensed Matter Physics, University of Zaragoza (Spagna), mediante una procedura riportata in letteratura <sup>[8]</sup> basata sull'ossidazione di Fe(OH)<sub>2</sub> ad opera del nitrato in ambiente basico in presenza di PEI ramificato (25 kDa). Utilizzando questo approccio, sono state ottenute PEI-MNPs con dimensioni medie di 25 ± 5 nm, costituite da uno strato sottile (7-9 Å) di rivestimento a base di PEI attorno al nucleo di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Le particelle mostrano un'elevata stabilità in soluzione acquosa e una superficie ricca in gruppi funzionali adatti per ulteriori processi di funzionalizzazione <sup>[9]</sup>.

Successivamente, il sistema MNPs@GO è stato ottenuto miscelando GO (dimensione media di 100 nm), sintetizzato mediante un metodo Hummer modificato in collaborazione con il Leibniz Institute for Solid State and Materials Research (IFW) di Dresda (Germania) <sup>[10]</sup>, con PEI-MNPs sotto vigorosa agitazione a temperatura ambiente.

Lo spettro FT-IR di MNP@GO (Figura 2.7.3) mostra i picchi tipici del GO a 3440 (stretching OH), 1725 (stretching COOH) e 1625 (stretching C=C) cm<sup>-1</sup>, e picchi relativi allo stretching dei gruppi C-O epossidici a 1225 cm<sup>-1</sup> che confermano la formazione del sistema MNPs@GO per reazione con i gruppi amminici di PEI. La presenza di MNP sulla superficie GO è stata ulteriormente confermata dall'incremento dell'intensità della banda posta a circa 3400 cm<sup>-1</sup>, ascrivibile allo stretching dei gruppi N-H del PEI e di quelli O-H delle molecole d'acqua legate alle MNP.



**Figura 2.7.3** Spettri FT-IR di GO e MNP@GO

<sup>[8]</sup> Calatayud, M.P.; Sanz, B.; Raffa, V.; Riggio, C.; Ibarra, M.R.; Goya, G.F. The effect of surface charge of functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles on protein adsorption and cell uptake. *Biomaterials* **2014**; 35: 6389-6399.

<sup>[9]</sup> Calatayud, M.P.; Riggio, C.; Raffa, V.; Sanz, B.; Torres, T.E.; Ibarra, M.R.; Hoskins, C.; Cuschieri, A.; Wang, L.; Pinkernelle, J.; Keilhoff, G.; Goya, G.F. Neuronal cells loaded with PEI-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for magnetically guided nerve regeneration. *J. Mater. Chem. B* **2013**; 1: 3607-3616.

<sup>[10]</sup> Makharza, S.; Cirillo, G.; Bachmatiuk, A.; Vittorio, O.; Mendes, R.G.; Oswald, S.; Hampel, S.; Rummeli, M.H. Size-dependent nanographene oxide as a platform for efficient carboplatin release. *J. Mater. Chem. B* **2013**; 1: 6107-6114.

### 2.7.2.2 Sintesi e caratterizzazione del rivestimento organico

Diversi tipi di materiali polimerici sono stati proposti come elementi di rivestimento per il GO al fine di evitarne l'aggregazione in ambiente fisiologico <sup>[11,12]</sup>.

In questo lavoro, MNPs@GO è rivestito con un coniugato C@HSA sfruttando da un lato l'elevata biocompatibilità e la non immunogenicità dell'HSA <sup>[13]</sup>, dall'altro l'attività biologica della curcumina <sup>[14]</sup>, con formazione di un nanoibrido funzionale (C@HSA-MNPs@rGO), in cui l'attività antitumorale sia correlata non solo al rilascio controllato del farmaco caricato ma anche al veicolo stesso <sup>[15]</sup>. Inoltre, come ampiamente discusso nei paragrafi introduttivi, il legame covalente di CUR ad HSA migliora la stabilità in ambiente fisiologico del polifenolo <sup>[16]</sup>.

Il coniugato C@HSA è stato sintetizzato mediante un processo eco- e bio-compatibile che prevede l'utilizzo della laccasi immobilizzata su un supporto acrilico come biocatalizzatore. Il coniugato è caratterizzato da un grado di funzionalizzazione pari a 91 mg di CUR per grammo di coniugato, calcolato mediante analisi combinata UV e determinazione dei gruppi amminici liberi. Lo spostamento ipsocromico registrato confrontando gli spettri UV-Vis di C@HSA e CUR da 420 a 347 nm è un'ulteriore conferma della coniugazione covalente del polifenolo alla proteina <sup>[17]</sup>.

### 2.7.2.3 Sintesi e caratterizzazione del sistema C@HSA-MNPs@rGO

La formazione del sistema ibrido C@HSA-MNPs@rGO consiste in una reazione redox tra le controparti organiche e inorganiche. Le frazioni polifenoliche vengono convertite nelle corrispondenti forme chinoniche ossidate che hanno un potenziale redox adatto a ridurre le funzionalità ricche di ossigeno di GO, ottenendo un nanoibrido a base di grafene ossido ridotto (rGO) <sup>[18]</sup>.

<sup>[11]</sup> Deb, A.; Vimala, R. Natural and synthetic polymer for graphene oxide mediated anticancer drug delivery—A comparative study. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**; 107: 2320-2333.

<sup>[12]</sup> de Melo-Diogo, D.; Lima-Sousa, R.; Alves, C.G.; Costa, E.C.; Louro, R.O.; Correia, I.J. Functionalization of graphene family nanomaterials for application in cancer therapy. *Colloid Surf. B Biointerf.* **2018**; 171: 260-275.

<sup>[13]</sup> Jokar, S.; Pourjavadi, A.; Adeli, M. Albumin-graphene oxide conjugates; Carriers for anticancer drugs. *RSC Advances* **2014**; 4: 33001-33006.

<sup>[14]</sup> Yallapu, M.M.; Ebeling, M.C.; Khan, S.; Sundram, V.; Chauhan, N.; Gupta, B.K.; Puumala, S.E.; Jaggi, M.; Chauhan, S.C. Novel curcumin-loaded magnetic nanoparticles for pancreatic cancer treatment. *Mol. Cancer Ther.* **2013**; 12: 1471-1480.

<sup>[15]</sup> Vittorio, O.; Brandl, M.; Cirillo, G.; Spizzirri, U.G.; Picci, N.; Kavallaris, M.; Iemma, F.; Hampel, S. Novel functional cisplatin carrier based on carbon nanotubes-quercetin nano hybrid induces synergistic anticancer activity against neuroblastoma in vitro. *Rsc Adv.* **2014**; 4: 31378-31384.

<sup>[16]</sup> Spizzirri, U.G.; Cirillo, G.; Picci, N.; Iemma, F. Recent development in the synthesis of eco-friendly polymeric antioxidants. *Curr. Org. Chem.* **2014**; 18: 2912-2927.

<sup>[17]</sup> Iemma, F.; Puoci, F.; Curcio, M.; Parisi, O.I.; Cirillo, G.; Spizzirri, U.G.; Picci, N. Ferulic Acid as a Comonomer in the Synthesis of a Novel Polymeric Chain with Biological Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**; 115: 784-789.

<sup>[18]</sup> Wang, Y.; Shi, Z.; Yin, J. Facile synthesis of soluble graphene via a green reduction of graphene oxide in tea solution and its biocomposites. *ACS Appl. Mater. Interf.* **2011**; 3: 1127-1133.

L'effettiva formazione del nanoibrido è verificata mediante analisi SEM che mostrano chiaramente un rivestimento omogeneo sui foglietti di rGO (Figura 2.7.4. a, b).

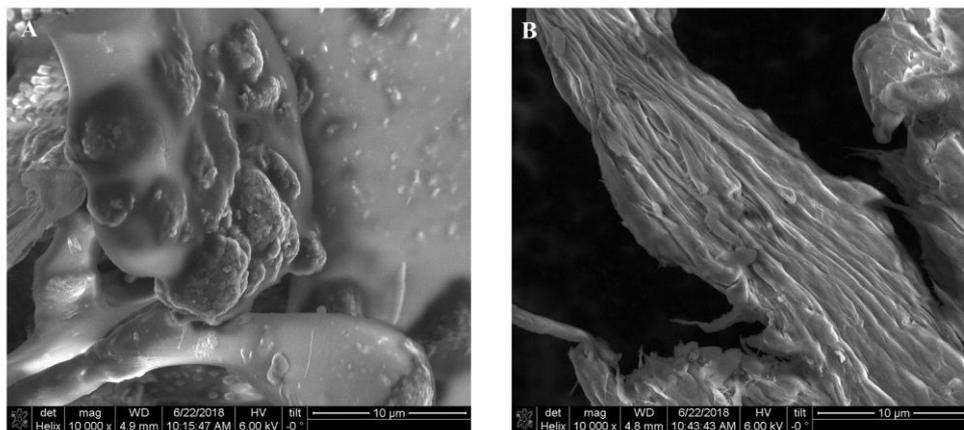


Figura 2.7.4 Immagine SEM del nanoibrido C@HSA-MNPs@rGO

Le curve di magnetizzazione in funzione della temperatura e del valore di campo magnetico sono illustrate in Figura 2.7.5.

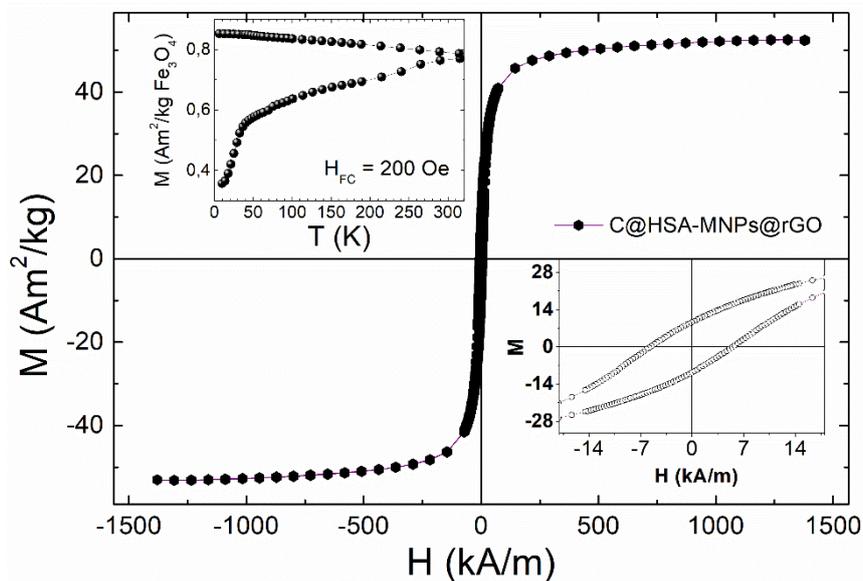
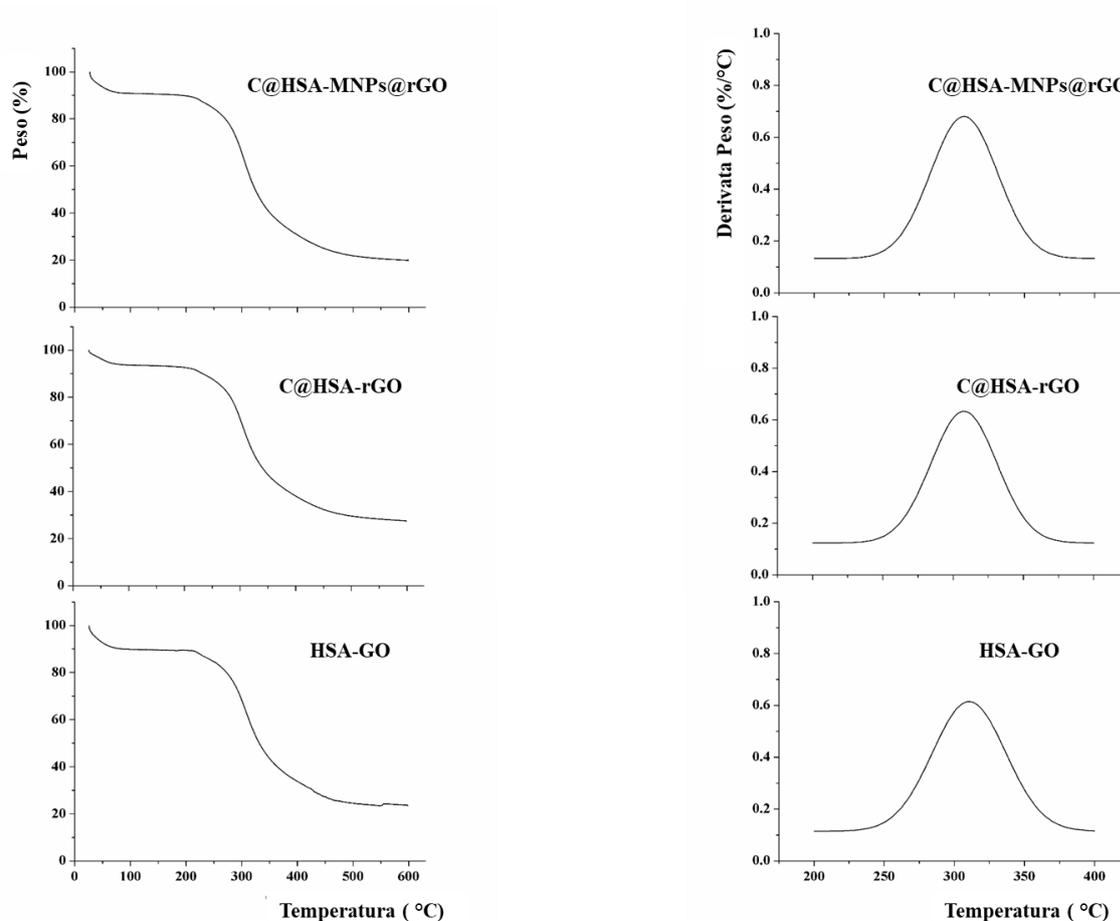


Figura 2.7.5 Curve di magnetizzazione di C@HSA-MNPs@rGO

La dipendenza della magnetizzazione dalla temperatura  $M(T)$ , determinata utilizzando i protocolli ZFC e FC, non mostra alcun massimo delle curve ZFC corrispondenti a una temperatura di blocco, come previsto per nuclei magnetici a dominio singolo di magnetite. I cicli di isteresi a temperatura ambiente mostrano valori di magnetizzazione di saturazione  $M_S = 48-52 \text{ A m}^2/\text{kg}$ , inferiori a quelli

di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  puro che sono pari a 80-85 A m<sup>2</sup>/kg. Questa riduzione è correlata ad una bassa cristallinità delle MNPs all'interno del sistema ibrido [19]. L'esistenza di un campo coercitivo  $\text{HC} = 5.82$  kA/ m a temperatura ambiente supporta l'ipotesi che i nuclei magnetici siano magneticamente bloccati.

Sono state successivamente eseguite analisi TGA per verificare la stabilità termica. HSA-GO è stato utilizzato come campione di controllo e l'effetto di ciascun componente è stato evidenziato misurando C@HSA-rGO e C@HSA-MNPs@rGO (Figura 2.7.6).



**Figura 2.7.6** Curve TGA e DTG dei campioni HSA-GO, C@HSA-rGO e C@HSA-MNPs@rGO

La presenza di residui di CUR migliora la stabilità termica di C@HSA-rGO rispetto a HSA-GO [20], con una degradazione che si riduce dal 77 al 73 % a 600 °C.

[19] Sanz, B.; Calatayud, M.P.; De Biasi, E.; Lima, E.; Mansilla, M.V.; Zysler, R.D.; Ibarra, M.R.; Goya, G.F. In silico before in vivo: How to predict the heating efficiency of magnetic nanoparticles within the intracellular space. *Sci. Rep.* **2016**; 6: 38733.

[20] Jafari, Y.; Sabahi, H.; Rahaie, M. Stability and loading properties of curcumin encapsulated in *Chlorella vulgaris*. *Food Chemistry* **2016**; 211: 700-706.

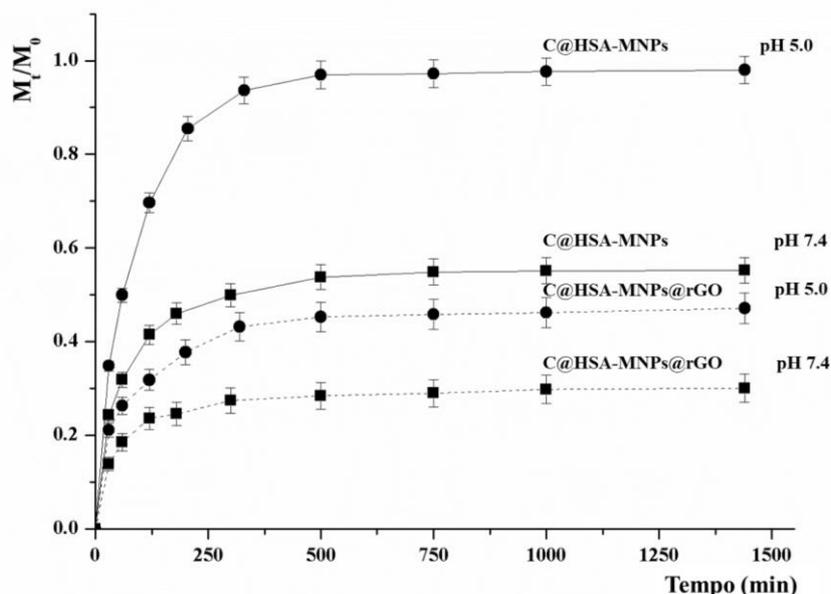
La maggiore quantità di porzione organica presente in C@HSA-MNP@rGO (rivestimento PEI di PEI-MNP) determina una minore stabilità termica e una degradazione dell'80%.

Lo stesso andamento è stato registrato considerando la perdita di peso alla temperatura di degradazione, situata a circa 310 °C per tutti i campioni (curve DTG, Figura 2.7.6. b), con valori di degradazione che risultano essere pari a 38% per HSA-GO, 33% per C@HSA-rGO, e 40% per C@HSA-MNPs@rGO.

### 2.7.3 Determinazione dei profili di rilascio

Il nanoibrido C@HSA-MNPs@rGO è stato progettato per la veicolazione della DOX, utilizzando un rapporto farmaco/rGO pari al 25% in peso.

Esperimenti di rilascio sono stati eseguiti a pH 5.5 e 7.4, per simulare rispettivamente il pH endosomiale delle cellule tumorali e il pH fisiologico [21]. Per evidenziare l'effetto del rGO all'interno del nanocarrier, i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti utilizzando come carrier C@HSA-MNPs non contenente rGO (Figura 2.7.7.).



**Figura 2.7.7** Profili di rilascio di DOX da C@HSA-MNPs@rGO e C@HSA-MNPs a pH 5.5 e 7.4

Supponendo che la quantità di DOX rilasciata sia il risultato della partizione del farmaco tra veicolo e mezzo di rilascio, è stato applicato il modello cinetico di Reis in accordo alle equazioni 1.17 e 1.18 (vedi introduzione) [22]:

[21] Gonçalves, G.; Vila, M.; Portolés, M.T.; Vallet-Regi, M.; Gracio, J.; Marques, P.A.A.P. Nano-graphene oxide: A potential multifunctional platform for cancer therapy. *Adv. Healthc. Mat.* **2014**; 3: 956-956.

[22] Reis, A.V.; Guilherme, M.R.; Rubira, A.F.; Muniz, E.C. Mathematical model for the prediction of the overall profile of in vitro solute release from polymer networks. *J. Colloid Interf. Sci.* **2007**; 310: 128-135.

$$\frac{M_t}{M_0} = M_{max} \left( 1 - e^{-\left(\frac{kr}{M_{max}}\right)t} \right) \quad (1.17)$$

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{M_{max} \left( e^{2\left(\frac{kr}{\alpha}\right)t} - 1 \right)}{1 - 2 M_{max} + e^{2\left(\frac{kr}{\alpha}\right)t}} \quad (1.18)$$

I dati sperimentali sono riportati in Tabella 2.7.1.

**Tabella 2.7.1** Valori  $R^2$  e parametri cinetici secondo i modelli di Reis e Avrami per C@HSA-MNPs e C@HSA-MNPs@rGO

Cinetica	Parametro	C@HSA-MNPs		C@HSA-MNPs@rGO	
		pH			
		2.0	7.0	2.0	7.0
Eq. 1.17	$R^2$	0.9935	0.9747	0.9563	0.9731
	$M_{max}$	0.97	0.53	0.45	0.28
	$\alpha$	32.33	1.13	0.82	0.39
	$k_R (10^{-2})$	1.13	0.79	0.60	0.50
	$t_{1/2}^{R1} (\text{min})$	60	47	52	39
Eq. 1.18	$R^2$	0.9717	0.9765	0.9527	0.9639
	$F_{max}$	0.98	0.53	0.45	0.28
	$\alpha$	49.00	1.13	0.82	0.39
	$k_R (10^{-2})$	1.87	0.81	0.58	0.44
	$t_{1/2}^{R2} (\text{min})$	52	46	52	39
Eq. 1.11	$R^2$	0.9946	0.9933	0.9888	0.9248
	$K (10^{-2})$	2.90	8.46	7.28	6.14
	$n$	0.78	0.37	0.35	0.29
	$t_{1/2}^A (\text{min})$	58	294	#	#

# fuori dal range sperimentale

È chiaramente evidente un comportamento pH sensibile, con una maggiore quantità di farmaco rilasciata a pH acido ( $M_{max}$  del 45% e 28% rispettivamente a pH 5.5 e 7.4). A tali valori di pH, infatti, si verifica protonazione della DOX e riduzione delle interazioni idrofobiche tra farmaco e carrier ( $\alpha$  varia da 0.39 a 0.82) con la costante cinetica  $k_R$  che aumenta da 0.50 a 0.60 e  $t_{1/2}$  che diminuisce da 52 a 39 min. Tuttavia, ad entrambi i valori di pH, la quantità di DOX rilasciata è sempre inferiore al 50%, evidenziando la forte capacità di rGO di interagire con il farmaco con elevata affinità [23]. Il basso quantitativo di DOX rilasciato a pH fisiologico lascia supporre una riduzione degli effetti collaterali del farmaco e un aumento dell'indice terapeutico. L'importanza di rGO è evidenziata dal fatto che C@HSA-MNP mostra una minore affinità per la DOX (valori  $\alpha$  più alti a entrambi i pH), con il 53% di DOX rilasciata a pH 7.4 ed il 97% a pH acido.

[23] Mao, H.Y.; Laurent, S.; Chen, W.; Akhavan, O.; Imani, M.; Ashkarran, A.A.; Mahmoudi, M. Graphene: Promises, facts, opportunities, and challenges in nanomedicine. *Chem. Rev.* **2013**; 113: 3407-3424.

Informazioni più dettagliate sui meccanismi di rilascio possono essere ottenute applicando il modello matematico proposto da Avrami (Equazione 1.11, vedi introduzione) [24]:

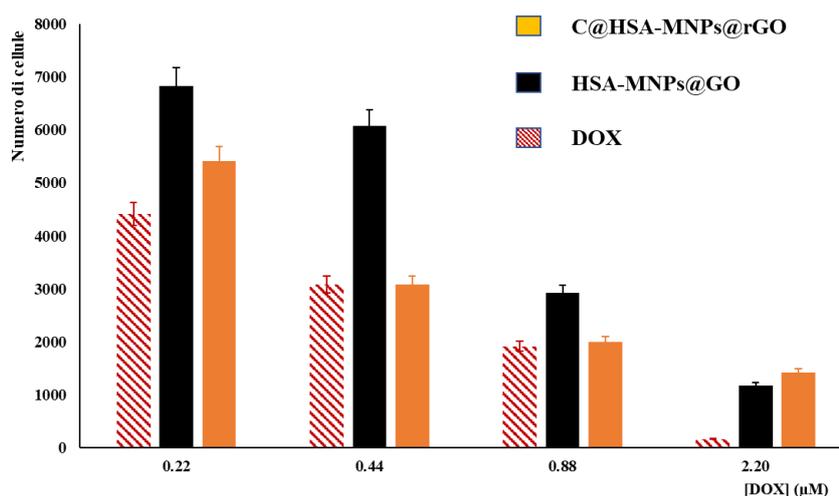
$$\frac{M_t}{M_0} = 1 - e^{-kt^n} \quad (1.11)$$

I valori  $n$  registrati per C@HSA-MNPs@rGO permettono di ipotizzare cinetiche di rilascio principalmente diffusive ( $n$  vicino a 0.54). È interessante notare che il carrier preparato in assenza di rGO (C@HSA-MNP) mostra un comportamento simile al sistema ibrido C@HSA-MNPs@rGO a pH 7.4, mentre in condizioni acide segue una cinetica di primo ordine.

L'effetto di rGO e pH sulla velocità di rilascio è meglio evidenziato dalla valutazione del tempo di dimezzamento  $t_{1/2}$ . In assenza di rGO, è stato rilevato un rilascio più rapido in condizioni acide ( $t_{1/2}$  di circa 60 min) rispetto a quelle neutre ( $t_{1/2}$  di circa 290 min), mentre la presenza di GO rallenta in maniera significativa il rilascio, al punto che non si raggiungono i valori di  $t_{1/2}$ . Infine, per entrambi i modelli, va sottolineato che la presenza di CUR non interferisce in modo significativo con la cinetica di rilascio ( $p > 0.05$ ): i profili di rilascio di HSA-MNP e HSA-MNP@GO risultano infatti praticamente sovrapponibili a quelli di C@HSA-MNPs e C@HSA-MNPs@rGO.

#### 2.7.4 Valutazione della citotossicità *in vitro*

L'attività citotossica di DOX dopo il caricamento nei nanoibridi C@HSA-MNPs@rGO (rapporto DOX / carrier del 12.5% in peso) è stata testata su cellule di neuroblastoma SH-SY5Y (Figura 2.7.8). Come campione di controllo è stato utilizzato HSA-MNP@GO.



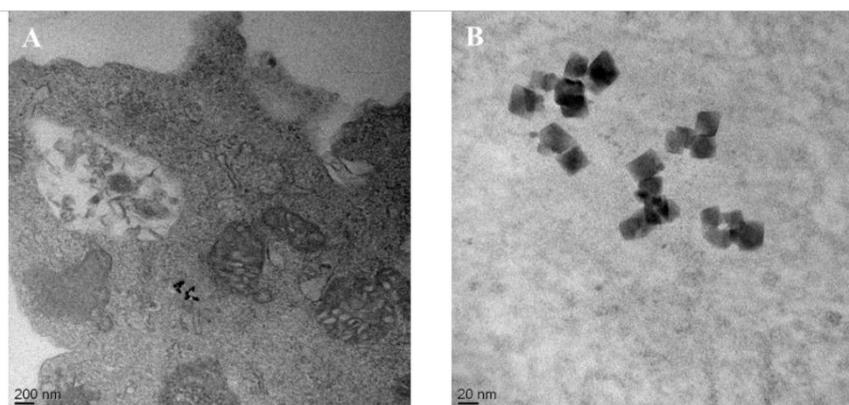
**Figura 2.7.8** Vitalità di cellule SH-SY5Y in seguito a trattamento con DOX in forma libera e caricata su C@HSA-MNPs@rGO o HSA-MNPs@rGO

[24] Shamaeli, E.; Alizadeh, N. Kinetic studies of electrochemically controlled release of salicylate from nanostructure conducting molecularly imprinted polymer. *Electrochim. Acta* **2013**; 114: 409-415.

Inizialmente, il farmaco libero è stato testato nell'intervallo di concentrazione 0.22 – 2.20  $\mu\text{M}$ , ottenendo una classica risposta dose-dipendente. Quindi, sono stati testati i carrier vuoti che non mostrano tossicità nelle concentrazioni utilizzate (da 10.2 a 102  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

L'effetto del sistema ibrido è evidente quando si eseguono i saggi di vitalità con i sistemi caricati. L'elevata affinità di GO per la DOX determina una significativa riduzione dell'effetto citotossico nel caso di HSA-MNPs@GO. Questo risultato è in accordo con i dati di letteratura che dimostrano come un rilascio lento di DOX sia generalmente associato ad una riduzione della tossicità su diverse linee tumorali <sup>[25]</sup>. Mentre la DOX libera penetra nella membrana cellulare attraverso diffusione passiva, il sistema nanoparticellare necessita di processi di endocitosi che sono più lenti <sup>[26]</sup>.

Nelle nostre condizioni sperimentali, la capacità del nanoibrido di attraversare la membrana cellulare è dimostrata dall'analisi TEM (Figura 2.7.9.).



**Figura 2.7.9** Immagine TEM di cellule SH-SY5Y trattate con C@HSA-MNPs@rGO

Per migliorare ulteriormente il risultato terapeutico, sono stati effettuati ulteriori esperimenti utilizzando il nanoibrido funzionalizzato con CUR (C@HSA-MNPs@rGO). In questo caso, la nota attività sinergica tra CUR e DOX <sup>[27]</sup> ha potenziato l'attività antitumorale del farmaco caricato: la citotossicità diventa simile a quella della DOX libera a 0.44 e 0.88  $\mu\text{M}$ .

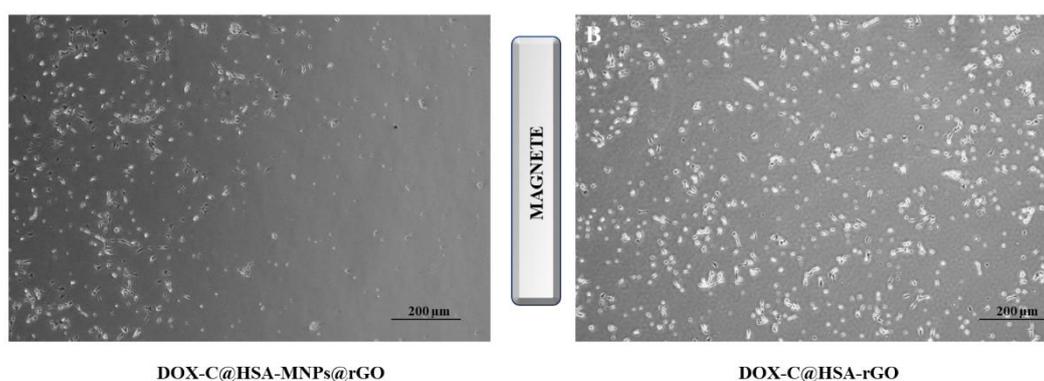
Il mantenimento dell'efficienza antitumorale della DOX, combinato con le proprietà magnetiche e la capacità di rilascio selettivo in condizioni acide, rende il nanoibrido C@HSA-MNPs@rGO molto promettente dal punto di vista applicativo. Si può ipotizzare, infatti, che il vettore sia in grado di

<sup>[25]</sup> Kim, H.; Lee, D.; Kim, J.; Kim, T.I.; Kim, W.J. Photothermally triggered cytosolic drug delivery via endosome disruption using a functionalized reduced graphene oxide. *ACS Nano* **2013**, 7: 6735-6746.

<sup>[26]</sup> Song, M.M.; Xu, H.L.; Liang, J.X.; Xiang, H.H.; Liu, R.; Shen, Y.X. Lactoferrin modified graphene oxide iron oxide nanocomposite for glioma-targeted drug delivery. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, 77: 904-911.

<sup>[27]</sup> Sharma, G.; Tyagi, A.K.; Singh, R.P.; Chan, D.C.F.; Agarwal, R. Synergistic anti-cancer effects of grape seed extract and conventional cytotoxic agent doxorubicin against human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Research and Treatment* **2004**, 85, 1-12.

controllare spazialmente l'attività antitumorale DOX sotto l'effetto di un campo magnetico applicato. Per confermare questa teoria, cellule tumorali sono state incubate con DOX caricata su C@HSA-MNPs@rGO o C@HSA-rGO per 72 h sotto l'effetto di un campo magnetico generato da un magnete permanente Nd-Fe-B. Nel caso di DOX-C@HSA-MNPs@rGO, i risultati mostrano chiaramente che l'effetto citotossico è limitato alla regione vicina al magnete, come conseguenza dell'aumentata concentrazione locale del farmaco ad opera della combinazione MNPs/magnete. Allo stesso tempo, nessuna tossicità rilevante è stata osservata sulla regione opposta della capsula di Petri, dove le forze magnetiche erano trascurabili (Figura 2.7.10 a). Lo stesso esperimento è stato eseguito con DOX-C@HSA-rGO, ottenendo un effetto citotossico sull'intera piastra, a confermare l'assenza di ogni effetto target (Figura 2.7.10 b).



**Figura 2.7.10** Immagine al microscopio ottico di cellule SH-Sy5Y incubate con (a) DOX-C@HSA-MNPs@rGO e (b) DOX-C@HSA@rGO per 72 h

### 2.7.5 Conclusioni

Sono state presentate evidenze sperimentali che un ibrido C@HSA-MNPs@rGO costituisce un sistema carrier in grado di controllare la veicolazione sito-specifica di agenti citotossici come la DOX.

La strategia sintetica si è svolta in due fasi: i sistemi C@HSA e MNPs@GO sono stati preparati rispettivamente tramite catalisi enzimatica e reazione di coniugazione covalente, e successivamente assemblati per formare il nanoibrido finale C@HSA-MNPs@rGO. Il profilo di rilascio è risultato essere pH sensibile, come conseguenza della modulazione dell'affinità farmaco-carrier, mentre i risultati dei test di vitalità su cellule SH-SY5Y hanno dimostrato il potenziamento dell'attività citotossica in presenza di CUR nel rivestimento. La capacità di essere internalizzato dalle cellule, unita alla possibilità di ottenere una concentrazione locale del farmaco sotto l'applicazione di un campo magnetico esterno, rende il nanosistema proposto un vettore promettente per il trattamento del neuroblastoma.

## 3 PARTE SPERIMENTALE

### 3.1 Strumentazione

Gli *spettri FT-IR* sono stati registrati come pellet in KBr utilizzando uno spettrofotometro Jasco FT-IR 4200 (risoluzione 1 cm<sup>-1</sup>).

Gli *spettri di assorbimento UV* sono stati misurati con uno spettrofotometro UV-Vis Jasco V-530 operante con celle di quarzo da 1.0 cm (Jasco Europe, Milano, Italia).

Gli *spettri di emissione* sono stati registrati su uno spettrometro Hitachi F-2500.

Le determinazioni spettrofotometriche nei *saggi biologici* sono state effettuate su un lettore di micropiastre Versamax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) utilizzando una lunghezza d'onda pari a 405 nm (WST-8); 570 (MTT); eccitazione a 530 nm ed emissione a 590 nm (Alamar Blue).

Gli *spettri Raman* (risoluzione 2 cm<sup>-1</sup>) sono stati registrati su uno spettrometro Raman-Fourier-Transform-IFS 100 (Bruker Corporation, Ettlingen, Germania), operante ad una lunghezza d'onda di 633 nm con una potenza laser di 8 mW. I campioni sono stati preparati mediante deposizione su un foglio di alluminio.

Gli *spettri XPS* (risoluzione 0.8 eV) dei depositati su un foglio di alluminio sono stati registrati utilizzando la radiazione Al K $\alpha$  su un XPS / PHI 5600-CI (Physical Electronics, Chanhassen, MN, USA).

Gli esperimenti di *diffrazione dei raggi X* sono stati eseguiti utilizzando il diffrattometro a raggi X Pert Pro MPD PW3040/60 con radiazione Co K $\alpha$  ( $\lambda = 0.179278$  nm) a temperatura ambiente.

Gli *spettri <sup>1</sup>H-NMR* (300 MHz) sono stati registrati utilizzando un Bruker Avance 300. Q, CHITB e CHITQ sono stati disciolti in DMSO-d<sub>6</sub> / acetone-d<sub>6</sub> 2/1 v/v; Cur, Gel, Gel-Cur, PEG<sub>40</sub>ST e PEGS in DMSO-d<sub>6</sub>.

Le *analisi HPLC* sono state effettuate su un sistema HPLC Jasco PU-2089 Plus dotato di un iniettore Rheodyne 7725i (loop da 20  $\mu$ L), un rivelatore HPLC Jasco UV-2075 e un integratore Jasco-Borwin; Fase stazionaria: colonna Hibar C18 a fase inversa di 250 mm x 4  $\mu$ m, dimensione delle particelle = 5  $\mu$ m, dimensione dei pori = 120 Å (Merck, Darmstadt, Germania).

Le condizioni HPLC utilizzate sono riportate in Tabella 3.1.1

Tabella 3.1.1 Condizioni HPLC

Analita	Fase Mobile		Flusso (mL min <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (nm)	Cit
	Composizione	(v/v)			
Quercetina	acido formico (1%)/acetonitrile/2-propanolo	70/22/8	0.2	370	[1]
Curcumina	metanolo	- - -	1.0	428	[2]
Caffeina	Acetonitrile/acqua	60/40	0.5	280	[3]
Metotrexato	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (0.05%)/metanolo	77/23	1.0	307	[4]

Le *analisi termogravimetriche* sono state effettuate con un analizzatore un analizzatore Perkin-Elmer TGA-7 (Rodgau, Germania). Le analisi sono state condotte in atmosfera di azoto (flusso 10 mL min<sup>-1</sup>) utilizzando le condizioni riportate in Tabella 3.1.2.

Tabella 3.1.2 Condizioni TGA

Campione	Peso iniziale (mg)	Range di Temperatura (°C)	Velocità di riscaldamento (°C min <sup>-1</sup> )
HG; HG <sub>GO</sub> HT; HT <sub>GO</sub>	10.0	25-600	10
oxMWCNT CS CS_MWCNT	5.0	50-800	a) da 50 a 100 °C: 10 min b) isoterma a 100 °C: 30 min c) da 100 a 275 °C: 10 min d) isoterma 275 °C: 30 min e) da 275 a 800 °C: 10 min
NGO $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @NGO	10.0	50-900	10
HSA-GO C@HSA-rGO C@HSA-MNPs@rGO	10.0	25-600	10

L'*analisi calorimetrica* è stata eseguita utilizzando un calorimetro a scansione differenziale Netzsch DSC200 ponendo il campione in un crogiolo di alluminio ermeticamente sigillato, L'analisi è stata effettuata in atmosfera di azoto con una velocità di flusso pari a 25 mL min<sup>-1</sup>.

Le condizioni sperimentali sono riportate in Tabella 3.1.3.

- [1] Careri, M.; Corradini, C.; Elviri, L.; Nicoletti, I.; Zagnoni, I. Direct HPLC analysis of quercetin and trans-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. *J. Agric. Food Chem.* **2003**; 51: 5226-5231.
- [2] Hadi, S.; Artanti, A.N.; Rinanto, Y.; Wahyuni, D.S.C. Curcuminoid content of Curcuma longa L. and Curcuma xanthorrhiza rhizome based on drying method with NMR and HPLC-UV. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2018**; 349: 012058.
- [3] Iemma, F.; Spizzirri, U.G.; Puoci, F.; Cirillo, G.; Curcio, M.; Parisi, O.I.; Picci, N. Synthesis and release profile analysis of thermo-sensitive albumin hydrogels. *Colloid Polym. Sci.* **2009**; 287: 779-787.
- [4] Karami, F.; Ranjbar, S.; Ghasemi, Y.; Negahdaripour, M. Analytical methodologies for determination of methotrexate and its metabolites in pharmaceutical, biological and environmental samples. *J. Pharm. Anal.* **2019**; 9: 373-391.

Tabella 3.1.3 Condizioni DSC

Campione	Peso iniziale (mg)	Stato	Range di Temperatura (°C)	Velocità di riscaldamento (°C min <sup>-1</sup> )
Q CHIQ CHITB	10.0	secco	60-400	5
HB HQ	10.0	rigonfio	25-55	3
CUR DEX DEX-CUR	10.0	secco	60-300	10

Le *immagini SEM* sono state acquisite su uno strumento NOVA NanoSEM 200 (ThermoFisher Scientific, Hillsboro, OR, USA) con una tensione di accelerazione pari a 10 kV dopo aver depositato i campioni su nastro di carbonio conduttivo autoadesivo (Plano GmbH, Wetzlar, Germania) e rivestito con oro fino a uno spessore di circa 300 Å.

Le *immagini TEM* sono state acquisite su uno strumento TEM (Tecnai F30 FEI, Hillsboro, OR, USA). Una goccia della dispersione del campione è stata posta su una griglia di Cu TEM (200 mesh, Plano GmbH, Wetzlar, Germania), e il campione in eccesso è stato rimosso utilizzando un pezzo di carta da filtro. Una goccia di soluzione di acido fosforico al 2% (p/v) è stata quindi depositata sulla griglia e lasciata riposare per 2 min. I campioni sono stati quindi essiccati all'aria e osservati.

Le *immagini AFM* sono state acquisite utilizzando Digital Instruments Veeco, NanoScope IIIaed un software WSxM progettato da Nanotech Electronica (Madrid, Spagna).

Le immagini al *microscopio a fluorescenza* sono state acquisite su un microscopio confocale a scansione laser Fluoview FV300 (Olympus Corporation, Tokyo, Giappone).

Le *distribuzioni delle dimensioni* delle particelle sono state determinate utilizzando un'apparecchiatura Dynamic Light Scattering (DLS) 90 Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, New York, USA) a 25 °C. La funzione di autocorrelazione è stata misurata a 90 °e il raggio laser ha operato a 658 nm. L'indice di polidispersione (PDI) è stato ottenuto analizzando i dati sperimentali con il metodo Contin. Valori di  $PDI \leq 0.3$  indicano popolazioni omogenee e mono-disperse <sup>[5]</sup>

Le *proprietà meccaniche* sono state determinate con un Zwick/Roell Universal Testing machine (colonna singola, modello Zwick Z2.5, Ulm, Germany).

Le *curve di magnetizzazione* sono state misurate in funzione della temperatura M(T) con un magnetometro SQUID (MPMS 5000 di Quantum Design). Le curve ZFC e FC sono state misurate

<sup>[5]</sup> Danaei, M.; Dehghankhold, M.; Ataei, S.; Davarani, F.H.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, M.R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* **2018**; 10: 57.

con un campo di raffreddamento HFC = 100 Oe. I cicli di isteresi M(H) sono stati registrati a 4 K e 300 K nell'intervallo di campo  $-70 \text{ kOe} \leq H \leq +70 \text{ kOe}$ . Per tutte queste misurazioni, i sistemi sono stati condizionati in portacampioni cilindrici.

Il *liofilizzatore* utilizzato è un Micro Modulyo, Edwards.

L'*omogeneizzatore ad ultrasuoni* consiste di un sonicatore Sonopuls con una punta cilindrica operante con un'ampiezza de 70%.

La centrifuga utilizzata è Centrifuga Allegra 64R, Beckman Coulter.

## 3.2 Sintesi delle nanoparticelle inorganiche

### 3.2.1 Sintesi dei nanotubi di carbonio ossidati

MWCNT sono stati sintetizzati secondo il metodo di deposizione chimica da vapore a letto fisso come riportato in letteratura <sup>[6]</sup>.

Per la procedura di ossidazione, 200 mg di CNT sono stati ultrasoniciati in una miscela di HNO<sub>3</sub> (65%) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%) il rapporto 1/3 v/v per 3 ore <sup>[7]</sup>. Successivamente, gli ox-MWCNT sono stati separati per filtrazione, lavati con acqua deionizzata fino a neutralità ed essiccati a 108 °C per una notte <sup>[8]</sup>.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania

### 3.2.2 Sintesi del Grafene Ossido

Le nanoparticelle di GO sono state sintetizzate secondo un metodo Hummers modificato <sup>[9]</sup>. In una procedura standard, 1.0 g di grafite (99.99%, 200 mesh) e 50.0 g di NaCl sono stati macinati per pochi minuti in un mortaio. La grafite macinata è stata quindi sospesa in acqua distillata per garantire la dissoluzione di NaCl e quindi rimossa mediante filtrazione. La grafite raccolta è stata miscelata con 23 mL di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96% p/p) per una notte per consentire l'intercalazione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tra gli strati di grafite. La sospensione risultante di grafite intercalata è stata posta in un bagno di ghiaccio per mantenere la temperatura di reazione al di sotto dei 5 °C e sono stati quindi aggiunti 3.0 g di KMnO<sub>4</sub> sotto agitazione magnetica per ottenere la formazione di GO. Dopo sonicazione per 3 ore, il prodotto risultante è posto in agitazione per 30 minuti a 35 °C e successivamente per 45 minuti a 50 °C. Quindi sono stati aggiunti 46 mL di acqua distillata e la miscela risultante è stata posta in agitazione per 45

<sup>[6]</sup> Ritschel, M.; Leonhardt, A.; Elefant, D.; Oswald, S.; Büchner, B. Rhenium-catalyzed growth carbon nanotubes. *J. Phys. Chem. C* **2007**; 111: 8414-8417.

<sup>[7]</sup> Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M. Chemistry of carbon nanotubes. *Chem. Rev.* **2006**; 106: 1105-1136.

<sup>[8]</sup> Castro Nava, A.; Cojoc, M.; Peitzsch, C.; Cirillo, G.; Kurth, I.; Fuessel, S.; Erdmann, K.; Kunhardt, D.; Vittorio, O.; Hampel, S.; Dubrovskaya, A. Development of novel radiochemotherapy approaches targeting prostate tumor progenitor cells using nanohybrids. *Int. J. Cancer* **2015**; 137: 2492-2503.

<sup>[9]</sup> Makharza, S.; Cirillo, G.; Bachmatiuk, A.; Ibrahim, I.; Ioannides, N.; Trzebicka, B.; Hampel, S.; Ruemmel, M.H. Graphene oxide-based drug delivery vehicles: functionalization, characterization, and cytotoxicity evaluation. *J. Nanopart. Res.* **2013**; 15.

min a 98-105 °C. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 40 mL di acqua distillata e 10 mL di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) per ridurre il permanganato residuo e il biossido di manganese a solfato di manganese solubile. La sospensione è stata quindi filtrata e lavata tre volte con HCl (5% p/p) e acqua distillata calda a 40 °C per rimuovere le impurezze. Il materiale risultante è stato ultrasonificato per 2h al fine di ridurre le dimensioni (larghezza laterale e spessore) dei fogli GO esfoliati.

La sospensione GO è stata separata in diverse dimensioni tramite centrifugazione in gradiente di densità di saccarosio. In dettaglio, le soluzioni di saccarosio a gradiente crescente (20-60% p/v) sono state poste delicatamente sul fondo di una provetta da centrifuga. In cima allo strato di saccarosio al 20% sono stati aggiunti 335 mL di sospensione di nanoparticelle GO, la provetta è stata centrifugata direttamente a 5880 g per 5 minuti. Lungo la provetta, sono state prodotte tre zone di separazione che sono state risciacquate accuratamente con acqua distillata per rimuovere il saccarosio e separate.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania

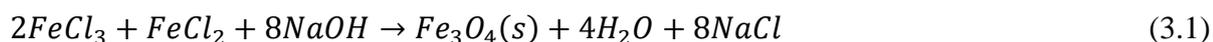
### 3.2.3 Sintesi delle nanoparticelle di magnetite

Le nanoparticelle magnetiche rivestite di PEI (MNPs) sono state sintetizzate seguendo il metodo dell'idrolisi ossidativa <sup>[10]</sup>. Le fasi principali di questo protocollo sono le seguenti: una soluzione contenente FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O e poli (etileneimina) (PEI, Mw = 25 kDa) viene aggiunta goccia a goccia su una soluzione basica con un lieve ossidante sotto continua agitazione meccanica. Entrambe le soluzioni vengono miscelate in un pallone a tre colli dove è stato gorgogliato N<sub>2</sub>. La temperatura di sintesi viene mantenuta a 90 °C per 24 ore, dopodiché le particelle PEI-MNP vengono raccolte utilizzando un magnete e lavate più volte con acqua deionizzata per mantenere il pH fisiologico.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

### 3.2.4 Sintesi delle nanoparticelle di maghemite

Le nanoparticelle di maghemite γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sono state sintetizzate in una procedura in tre fasi come segue: inizialmente, nanoparticelle di magnetite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sono state preparate con il metodo della co-precipitazione in ambiente basico secondo la seguente equazione 3.1 <sup>[11]</sup>:



<sup>[10]</sup> Calatayud, M.P.; Riggio, C.; Raffa, V.; Sanz, B.; Torres, T.E.; Ibarra, M.R.; Hoskins, C.; Cuschieri, A.; Wang, L.; Pinkernelle, J.; Keilhoff, G.; Goya, G.F. Neuronal cells loaded with PEI-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for magnetically guided nerve regeneration. *J. Mater. Chem. B* **2013**, 1: 3607-3616.

<sup>[11]</sup> Szalai, A.J.; Manivannan, N.; Kaptay, G. Super-paramagnetic magnetite nanoparticles obtained by different synthesis and separation methods stabilized by biocompatible coatings. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2019**, 568:113-122.

In dettaglio, 2.25 g di  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 0.825 g di  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  sono stati miscelati in una soluzione alcalina ( $\text{NaOH}$ , 1.7 g). La miscela è stata agitata a 65 - 80 °C per 12 h. Il materiale risultante è stato filtrato e lavato con acqua distillata ed etanolo.

Successivamente, le nanoparticelle di magnetite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sono state impiegate come materiale di partenza per la sintesi della maghemite  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . 1. g di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  è stata trattata a 450 °C in presenza di Argon e  $\text{H}_2$  (g) per 12 h e quindi raffreddata fino a temperatura ambiente <sup>[12]</sup>. Il materiale risultante è stato raccolto, lavato in acqua deionizzata ed etanolo, ed essiccato in stufa a 65 °C per 3 h. Un secondo trattamento termico è stato effettuato alle stesse condizioni al fine di identificare se la struttura di  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  ottenuta fosse in forma di maghemite  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  o ematite  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .

Nella fase finale, 0.5 g di  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  sono stati riscaldati a 60 °C per 15 min separatamente e quindi addizionati di sodio oleato (20% p/v) sotto vigorosa agitazione per 15 minuti. Le nanoparticelle funzionalizzate sono state raccolte mediante decantazione magnetica per rimuovere i materiali non magnetici. Il prodotto è stato lavato con acqua e acetone, filtrato ed essiccato in stufa a 40 °C per 2 h.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania

### 3.3 Sintesi dei coniugati polimerici

#### 3.3.1 Sintesi mediante grafting radicalico

##### 3.3.1.1 Sintesi del coniugato chitosano-quercetina

La sintesi di CHITQ è stata eseguita secondo quanto riportato in letteratura con alcune modifiche <sup>[13]</sup>. In un pallone di vetro da 50 mL, 150 mg Q sono stati sciolti in 15 mL di soluzione  $\text{NaOH}$  0.33 mol  $\text{L}^{-1}$  e quindi sono stati aggiunti 1.0 mL di  $\text{H}_2\text{O}_2$  3.5% (p/p) e la miscela è stata posta sotto agitazione al buio per 2 ore a temperatura ambiente. Quindi sono stati aggiunti 20 mL di una soluzione di CHIT (peso molecolare medio, grado di deacetilazione 75-85%) a concentrazione 25 mg  $\text{mL}^{-1}$  in  $\text{CH}_3\text{COOH}$  all'1% (v/v). Dopo 24 ore, la soluzione è stata inserita in membrane da dialisi (MWCO: 6-8 kDa) e dializzata contro acqua a 25 °C per 48 ore effettuando otto cambi d'acqua. La soluzione risultante è stata congelata e liofilizzata per fornire un solido vaporoso. L'effettiva purificazione di CHITQ da residui di Q non coniugata e da qualsiasi altro composto è stata valutata mediante analisi HPLC delle acque di dialisi. Il chitosano bianco (CHITB), che funge da controllo, è stato preparato nelle stesse condizioni ma in assenza di Q.

<sup>[12]</sup> Cuenca, J.A.; Bugler, K.; Taylor, S.; Morgan, D.; Williams, P.; Bauer, J.; Porch, A. Study of the magnetite to maghemite transition using microwave permittivity and permeability measurements. *J. Phys. Cond. Matter* **2016**; 28: 106002.

<sup>[13]</sup> Gu, X.; Cheng, K.; He, M.; Shi, Y.; Li, Z. La-modified SBA-15/ $\text{H}_2\text{O}_2$  systems for the microwave assisted oxidation of organosolv beech wood lignin. *Maderas Ciencia y Tecnologia* **2012**; 14: 31-41.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

### 3.3.1.2 Sintesi del coniugato di cheratina lipidizzata

#### 3.3.1.2.1 Estrazione della cheratina

La Ker è stata estratta da lana di pecora di razza Comisana; la lana è stata preventivamente lavata con un blando detergente e sottoposta ad estrazione Soxhlet in etere di petrolio per rimuovere i grassi, quindi lavata a fondo con acqua distillata, seccata e tagliata in piccoli pezzi. La lana così trattata (3.0 g) è stata miscelata con 100 mL di una soluzione acquosa di urea 8.0 M ed acido tioglicolico 0.2 M e portata a pH 11.0 mediante l'aggiunta di NaOH 2.0 M. La miscela è stata quindi riscaldata a 50 °C per 6 h, centrifugata a 12000 rpm per 5 minuti per eliminare residui insolubili e successivamente filtrata. Il filtrato è stato poi sottoposto a dialisi (MWCO: 6-8 kDa) per 72 h contro acqua deionizzata, sostituendo il mezzo di dialisi ogni 12 h.

Il peso molecolare della Ker estratta dalla lana è stato stimato mediante un'analisi SDS-PAGE utilizzando gel di poliacrilammide al 12% in grado di separare proteine con peso molecolare compreso tra 188000 e 3000 Da.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

#### 3.3.1.2.2 Sintesi del PEGS

Il PEG40Stearato (PEG40ST) è stato sottoposto a reazione di metacrilazione utilizzando la procedura riportata di seguito: il PEG40ST (2.04 g, 1 mmol) è stato disciolto in 1,4-diossano anidro. Successivamente sono stati aggiunti a temperatura ambiente e sotto agitazione magnetica 2 mmol di anidride metacrilica (MA) e 2 mmol di 4-dimetilaminopiridina (DMAP). La miscela è stata lasciata a reagire per 24 h, precipitata in una miscela costituita da dietil etere/n-esano (1/1, v/v) ed il prodotto ottenuto (PEGS, 1.82 g) essiccato sottovuoto per 24 h.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

#### 3.3.1.2.3 Sintesi del coniugato I-Ker

La Ker è stata sottoposta ad una reazione di grafting radicalico in presenza del PEGS, ottenendo il coniugato I-Ker. Per la sintesi, è stato applicato un protocollo sintetico riportato in letteratura <sup>[14]</sup>. Nel primo step, i gruppi tiolici della Ker sono stati attivati aggiungendo 0.05 g di persolfato di potassio ad una soluzione della proteina (0.2 g) in 4 mL di urea 8.0 M. La miscela è stata mantenuta a 40°C sotto agitazione magnetica e, dopo 1 h, sono stati addizionati 0.1 g di PEGS. Dopo 24 ore, la soluzione

---

<sup>[14]</sup> Li, Q.; Zhu, L.; Liu, R.; Huang, D.; Jin, X.; Che, N.; Li, Z.; Qu, X.; Kang, H.; Huang, Y. Biological stimuli responsive drug carriers based on keratin for triggerable drug delivery. *J. Mater. Chem.* **2012**; 22, 19964-19973.

è stata inserita in membrane da dialisi (MWCO 6-8 kDa) e purificata contro acqua distillata per 48 h a temperatura ambiente, effettuando 8 cambi dell'acqua di lavaggio. La soluzione dializzata è stata quindi congelata e liofilizzata ottenendo un solido poroso di colore bianco, con una resa del 74%.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

### 3.3.2 Sintesi dei coniugati polimerici mediante catalisi enzimatica

#### 3.3.2.1 Sintesi del biocatalizzatore

La sintesi della membrana polimerica contenente laccasi immobilizzata è stata effettuata come segue <sup>[15]</sup>: 25 mg di laccasi sono stati disciolti in 3.0 mL di una soluzione tampone citrato di sodio ( $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, pH 5.0) contenenti 534 mg di AAm e 466 mg di PEGDMA. La reazione di polimerizzazione è stata effettuata tra due lastre di vetro (10 x 10 cm) assemblate tramite clips metalliche, interponendo tra esse un distanziatore in teflon di spessore pari a 1.6 mm. La polimerizzazione è stata avviata irradiando il campione per 10 minuti a 275 nm con una lampada al mercurio ad alta pressione (HPK 125, Philips, Amsterdam, Olanda, 10 mWcm<sup>-2</sup>). Infine, gli idrogel ottenuti sono stati abbondantemente lavati per 12 h con acqua distillata ed essiccati per 12 h a 40 °C.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

#### 3.3.2.2 Reazioni di bioconiugazione laccasi-catalizzate

La curcumina è stata coniugata a gelatina, destrano e albumina mediante reazioni in fase eterogenea utilizzando come catalizzatore la membrana polimerica contenente l'enzima Laccasi immobilizzato. In dettaglio, il polimero e la curcumina sono stati sciolti in 20 mL di una soluzione di tampone fosfato (PBS  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, pH 8.0) in presenza del 2.5% di DMSO. Successivamente è stato aggiunto il biocatalizzatore (0.12 U) e la miscela fatta reagire a 37 °C sotto agitazione a 70 rpm. Al termine del tempo di reazione (12 h), la miscela è stata purificata dalla Cur non reagita mediante dialisi (membrane Spectra/Por, MW cut-off 12,000-14,000 Da, Spectrum, Canada) contro mezzo di reazione e successivamente acqua distillata a temperatura ambiente. L'effettiva purificazione dei coniugati da residui di Cur non coniugata è stata valutata mediante analisi HPLC delle acque di dialisi.

Le soluzioni dializzate sono state quindi congelate e sottoposte a liofilizzazione ottenendo solidi porosi di colore arancio.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

---

<sup>[15]</sup> Vittorio, O.; Cojoc, M.; Curcio, M.; Spizzirri, U.G.; Hampel, S.; Nicoletta, F.P.; Iemma, F.; Dubrovska, A.; Kavallaris, M.; Cirillo, G. Polyphenol Conjugates by Immobilized Laccase: The Green Synthesis of Dextran-Catechin. *Macrom. Chem. Phys.* **2016**; 217: 1488-1492.

Le quantità di polimero e curcumina utilizzate per la preparazione dei diversi coniugati sono riportate in Tabella 3.3.1.

**Tabella 3.3.1** Composizione delle miscele di reazione utilizzate per la sintesi dei coniugati polimerici

Coniugato	Polimero		Curcumina (mg)
	Polimero base	Quantità (mg)	
Gel-Cur	Gelatina	300	36
DEX-CUR	Destrano	300	36
C@HSA	Albumina serica umana	500	60

### 3.4 Sintesi degli idrogel

Gli idrogel sono stati sintetizzati come film polimerici inserendo la miscela polimerizzazione all'interno di un reattore costituito da due lastre di vetro da  $5.0 \times 5.0$  cm, separate con un distanziatore di teflon da 0.6 mm e tenute insieme da clip metalliche. Dopo l'aggiunta dell'iniziatore radicalico persolfato di ammonio, la miscela è lasciata reagire per 24 h a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  [16]. Gli idrogel risultanti sono abbondantemente lavati con acqua ed etanolo per rimuovere le specie non reagite e, quindi, essiccati per 12 h a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Nel caso degli idrogel ibridi HG<sub>GO</sub> e HT<sub>GO</sub>, quantità prefissata di GO è stata preventivamente dispersa in una soluzione acquosa di Gel o Try mediante un omogeneizzatore ad ultrasuoni per 30 min [17].

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

La composizione degli idrogel è riportata in Tabella 3.4.1.

**Tabella 3.4.1** Composizione degli Idrogel

Idrogel	Composizione										
	GO	Gel	Try	Gel-Cur	CHIT	CHITQ	AAM	NIPAAm	MEBA	PEGDMA	H <sub>2</sub> O (mL)
HG	---	100	---	---	---	---	434	---	---	466	3.5
HG <sub>GO</sub>	5.0	100	---	---	---	---	434	---	---	466	3.5
HT	---	---	100	---	---	---	434	---	---	466	3.5
HT <sub>GO</sub>	5.0	---	100	---	---	---	434	---	---	466	3.5
HB	---	---	---	---	120	---	125	200	75	---	3.5*
HQ	---	---	---	---	---	120	125	200	75	---	3.5*
H <sub>G</sub>	---	300	---	---	---	---	356	---	---	310	4.0
H <sub>GC</sub>	---	---	---	300	---	---	356	---	---	310	4.0

\* contenente acido acetico allo 0.1% v/v

[16] Cirillo, G.; Spataro, T.; Curcio, M.; Spizzirri, U.G.; Nicoletta, F.P.; Picci, N.; Iemma, F. Tunable thermo-responsive hydrogels: Synthesis, structural analysis and drug release studies. *Mater. Sci. Eng. C* **g**; 48: 499-510.

[17] Curcio, M.; Spizzirri, U.G.; Cirillo, G.; Vittorio, O.; Picci, N.; Nicoletta, F.P.; Iemma, F.; Hampel, S. On demand delivery of ionic drugs from electro-responsive CNT hybrid films. *RSC Adv.* **2015**; 5: 44902-44911.

### 3.5 Sintesi dei sistemi micro- e nano-particellari

#### 3.5.1 Sintesi del sistema microparticellare PK

Il sistema di microparticelle ( $P_K$ ) è stato preparato con il metodo precedentemente descritto per la preparazione di micelle di  $\beta$ -caseina<sup>[18]</sup>. Brevemente, l-Ker (5.0 mg) è stato disciolto in 2.45 mL di soluzione PBS soluzione ( $10^{-3}$  M, pH 7.4), e successivamente sono stati aggiunti 50  $\mu$ l di DMSO sotto agitazione a temperatura ambiente per 3 ore. Le microparticelle sono state impiegate senza ulteriore purificazione perché la quantità di DMSO (2.0% v/v) non è dannosa per le cellule.

#### 3.5.2 Sintesi del sistema nanoparticellare DC

Il sistema nanoparticellare DC è stato preparato sciogliendo 2.5 mg di coniugato DEX-CUR in 5.0 mL di soluzione di PBS ( $10^{-3}$  M, pH 7.4) e lasciando la miscela sotto agitazione a temperatura ambiente per 3 ore.

#### 3.5.3 Sintesi del sistema composito $P_KH_{GC}/P_KH_G$

I sistemi compositi  $P_KH_{GC}$  e  $P_KH_G$  sono stati preparati ponendo  $H_{GC}$  e  $H_G$  (5.0 mg) in 0.25 mL di una sospensione di  $P_K$ .

### 3.6 Sintesi dei sistemi ibridi

#### 3.6.1 Sintesi del sistema ibrido CS\_MWCNT

Per la realizzazione del nanoibrido CS\_MWCNT, 10 mg di ox-MWCNT in 5 mL di acido acetico (5%) sono stati trattati per 30 secondi con un omogeneizzatore ad ultrasuoni. Quindi sono stati aggiunti 25 mg CS (Mw 50.000-190.000 Da) e la miscela è stata agitata per una notte a temperatura ambiente. Successivamente la miscela è stata filtrata e lavata prima con acido acetico al 5% e poi con acqua deionizzata fino a neutralità della soluzione. Infine, il nanoibrido è stato essiccato a 40 °C per una notte.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

#### 3.6.2 Sintesi del sistema ibrido $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@NGO

0.5 g di particelle NGO -100 nm sono state sonicata per 15 min in acqua distillata. La soluzione è stata riscaldata fino a 60 °C per 15 min e addizionata di un eccesso di  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sotto agitazione per 15

---

[18] Parker, R.N.; Roth, K.L.; Kim, C.; McCord, J.P.; Van Dyke, M.E.; Grove, T.Z. Homo- and heteropolymer self-assembly of recombinant trichocytic keratins. *Biopolymers* **2017**; 107: e23037.

min. Il materiale finale è stato separato per decantazione magnetica, lavato con acqua e acetone, filtrato ed essiccato in stufa a 40 °C per 2 h.

### 3.6.3 Sintesi del sistema ibrido C@HSA-MNP@rGO

Per la sintesi dei nanoibridi C@HSA-MNP@rGO, 45 mg di C@HSA sono stati aggiunti a 2.5 mL di una sospensione di MNPs@GO preparata miscelando 0.2 mL di MNPs e 5.0 mg di GO <sup>[19]</sup>. La soluzione risultante è stata agitata a 37 °C per 12 h e i nanoibridi sono stati recuperati come polvere scura dopo il processo di liofilizzazione.

Sono stati preparati nanoconiugati e nanocarrier di controllo nelle stesse condizioni impiegando HSA invece di C@HSA (HSA-MNPs@GO) o C@HSA e HSA in assenza di MNPs (C@HSA-rGO e HSA-GO).

## 3.7 Determinazione del grado di funzionalizzazione

### 3.7.1 Determinazione dei gruppi amminici liberi

La determinazione dei gruppi amminici liberi nei coniugati proteici Gel-Cur e C@HSA è stata eseguita come segue <sup>[20]</sup>: una soluzione di acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico (0.5 mL, 0.01% p/v) è stata aggiunta a NaHCO<sub>3</sub> (1.0 mL, 0.1 mol L<sup>-1</sup>, pH 8.5) contenente coniugato o proteina nativa (2.0 mg mL<sup>-1</sup>). Dopo miscelazione, la soluzione è stata lasciata al buio riposare a 37 °C per 4 ore sotto agitazione. Infine, la reazione è stata terminata aggiungendo HCl (25 µL, 1.0 mol L<sup>-1</sup>) e SDS (50 µL, 0,35 mol L<sup>-1</sup>) e l'assorbanza misurata a 335 nm.

La quantità (mg) di CUR nel coniugato è stata calcolata secondo la seguente equazione (3.2):

$$mg_{CUR} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times n_{NH_2}^0 \times MW_{CUR} \quad (3.2)$$

Dove A<sub>0</sub> e A<sub>1</sub> sono le assorbanze di proteina nativa e coniugata;  $n_{NH_2}^0$  e  $MW_{CUR}$  quantità di gruppi NH<sub>2</sub> nella proteina e il peso molecolare di CUR.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

<sup>[19]</sup> Liu, C.; Liu, H.; Lu, C.; Tang, K.; Zhang, Y. Polyethyleneimine-modified graphene oxide/PNIPAm thermoresponsive hydrogels with rapid swelling/deswelling and improved mechanical properties. *Journal of Materials Science* **2017**, *52*, 11715-11724

<sup>[20]</sup> Garcia, D.R.; Lavignac, N. Poly(amidoamine)-BSA conjugates synthesised by Michael addition reaction retained enzymatic activity. *Polym. Chem.* **2016**; *7*: 7223-7229.

### 3.7.2 Determinazione dei gruppi tiolici liberi

La percentuale di funzionalizzazione del coniugato I-Ker è stata calcolata per via indiretta mediante il saggio di Ellman, che consente la determinazione dei gruppi tiolici liberi <sup>[21]</sup>. Per effettuare questo saggio, un'aliquota (250 µL) della soluzione acquosa contenente il coniugato I-Ker (5.0 mg mL<sup>-1</sup>) è stata trattata con tampone fosfato NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 M a pH 8.0 (250 µL) e con il reagente di Ellman (500 µL; 0.3 mg mL<sup>-1</sup> di acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico - DTNB in tampone fosfato NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05 M a pH 8.0). La reazione è stata condotta a temperatura ambiente per 2 h e l'assorbanza è stata misurata a 420 nm.

La Ker è stata utilizzata come controllo e trattata allo stesso modo del bioconiugato.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

### 3.7.3 Determinazione del contenuto proteico

La determinazione del contenuto proteico negli idrogel HG, HG<sub>GO</sub>, HT, HT<sub>GO</sub> è stata effettuata secondo il metodo Lowry <sup>[22]</sup>. Le curve di calibrazione di Try and Gel sono state registrate mediante appropriate diluizioni di una soluzione madre (10 mg mL<sup>-1</sup>) a concentrazioni finali pari a 0.25; 0.50; 0.75; 1.00 e 1.50 mg mL<sup>-1</sup>. Aliquote di 800 µL di ogni standard sono state trasferite in provette e sono stati aggiunti 4 mL di reagente C (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% (w/v) / NaOH 0.1 M + KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> · 4H<sub>2</sub>O 2% (w/v) / CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 1% (p/v)). Dopo 10 min di incubazione, sono stati aggiunti 400 µL di reagente Folin – Ciocalteu e la soluzione è stata miscelata. Dopo 30 min, l'assorbanza è stata misurata a 750 nm. La stessa procedura è stata eseguita quando è stata utilizzata una quantità fissa di idrogel (5.0 mg). I risultati sono stati espressi come mg di Try o Gel immobilizzata per grammo di idrogel.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

### 3.7.4 Determinazione dell'attività proteolitica

Il saggio del BApNA e la determinazione del grado di idrolisi sono stati utilizzati per confrontare l'attività proteolitica della Try libera e immobilizzata in HT e HT<sub>GO</sub>.

<sup>[21]</sup> Anitha, A.; Deepa, N.; Chennazhi, K.P.; Nair, S.V.; Tamura, H., Jayakumar, R. Development of mucoadhesive thiolated chitosan nanoparticles for biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* **2011**; 83: 66-73.

<sup>[22]</sup> De Lourdes Mendes Finete, V.; Gouvêa, M.M.; De Carvalho Marques, F.F.; Netto, A.D.P. Is it possible to screen for milk or whey protein adulteration with melamine, urea and ammonium sulphate, combining Kjeldahl and classical spectrophotometric methods? *Food Chem.* **2013**; 141: 3649-3655.

### 3.7.4.1 Saggio del PApNA

L'attività proteolitica di HT e HT<sub>GO</sub> è stata misurata in accordo con la procedura riportata in letteratura <sup>[23]</sup>, utilizzando una soluzione di Na-benzoil-L-arginina-p-nitroanilide (BApNA) in dimetilsolfossido come substrato specifico per la tripsina. In breve, Try libera (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) e immobilizzata su HT e HT<sub>GO</sub> (concentrazione equivalente Try pari a 1.0 mg mL<sup>-1</sup> per come ottenuto dal test Lowry) sono stati incubati con 1.0 mL di soluzioni di BApNA con concentrazioni finali pari a 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1.0 e 1.2 mmol L<sup>-1</sup>) per 60 min. La velocità di reazione è stata monitorata misurando la formazione di p-nitroanilina a 405 nm.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

### 3.7.4.2 Determinazione del grado di idrolisi

Per la determinazione del grado di idrolisi (DH) <sup>[24]</sup> è stata utilizzata come substrato la gelatina (1.0 g, Ph Eur, 160 Bllom) che è stata miscelata con 100 mL di tampone Tris-HCl (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8.0,) e pre-incubata per 5 min a 55 ° C con Try libera (1.0 mg mL<sup>-1</sup>) e HT e HT<sub>GO</sub> a concentrazione di Try equivalente per come ottenuto dal saggio Lowry. Dopo 12 ore di idrolisi, gli enzimi sono stati disattivati a 100 °C in un bagno d'acqua e la miscela è stata centrifugata a 8000 rpm a temperatura ambiente. Ai campioni sono stati aggiunti 2.0 mL di tampone fosfato (0,2 mol L<sup>-1</sup>, pH 8,2) e 1.0 mL di soluzione di acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico (TNBS, 0,01%) e la soluzione, dopo miscelazione al buio, posta in bagno ad acqua a 50 ° C per 30 min. Successivamente, è stato aggiunto solfito di sodio (0.1 M) per terminare la reazione, la miscela raffreddata per 15 min a temperatura ambiente e l'assorbanza misurata a 420 nm. Il contenuto di α-amminoacidi è stato espresso in termini di L-leucina.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

## 3.8 Determinazione delle proprietà antiossidanti

### 3.8.1 Determinazione dei gruppi fenolici disponibili

La quantità di equivalenti fenolici totali è stata determinata nel caso dei coniugati CHITQ e DEX-CUR e dell'idrogel HQ utilizzando il reagente Folin-Ciocalteu, in accordo al protocollo riportato in

<sup>[23]</sup> Silva, J.F.; Espósito, T.S.; Marcuschi, M.; Ribeiro, K.; Cavalli, R.O.; Oliveira, V.; Bezerra, R.S. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). *Food Chem.* **2011**; 129: 777-782.

<sup>[24]</sup> Ketnawa, S.; Benjakul, S.; Martínez-Alvarez, O.; Rawdkuen, S. Fish skin gelatin hydrolysates produced by visceral peptidase and bovine trypsin: Bioactivity and stability. *Food Chem.* **2017**; 215: 383-385

letteratura <sup>[25]</sup>. I gruppi fenolici sono espressi come equivalenti di polifenolo (Q o CUR) per grammo di coniugato utilizzando l'equazione ottenuta dalla curva di calibrazione dell'antiossidante libero.

In dettaglio, 20 mg di coniugato sono stati sciolti in acqua distillata (6.0 mL) in un matraccio, è stato aggiunto il reagente Folin-Ciocalteu (1.0 mL) e il tutto è stato miscelato accuratamente. Dopo 3 minuti, sono stati aggiunti 3 mL di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2%), quindi la miscela è stata lasciata sotto agitazione per 2 ore. L'assorbanza dei campioni è stata quindi misurata a 760 nm contro un controllo preparato utilizzando il polimero bianco nelle stesse condizioni di reazione. La curva di calibrazione dell'antiossidante in forma libera è stata costruita con la stessa procedura utilizzando 0.5 mL di soluzioni standard di Quercetina per raggiungere le concentrazioni finali pari a 8.0; 16.0; 24.0; 32.0 e 40.0 µM.

Per la determinazione degli equivalenti fenolici totali nell'idrogel HB, la stessa procedura è stata effettuata utilizzando quantità note di HQ o HB preventivamente incubate a 25 o 40 °C per 48 ore.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

### 3.8.2 Determinazione dell'attività scavenger

Le proprietà scavenger di CHITQ sono state valutate misurando la reattività verso radicali liberi stabili, il DPPH e il catione radicale idrofilo ABTS. L'attività è stata espressa come inibizione percentuale dei radicali DPPH / ABTS calcolata secondo la seguente equazione (3.3):

$$\text{inibizione (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (3.3)$$

dove  $A_0$  è l'assorbanza di uno standard preparato nelle stesse condizioni senza l'aggiunta delle molecole antiossidanti e  $A_1$  l'assorbanza dei campioni trattati.

#### 3.8.2.1 Saggio del DPPH

Per il saggio DPPH <sup>[26]</sup>, quantità note del coniugato a concentrazione crescente sono disciolte in 1.0 mL di acqua distillata in un matraccio da 25 mL, e si aggiungono 4 mL di etanolo e 5 mL di una soluzione etanolica di DPPH (200 µM), ottenendo una soluzione di DPPH con una concentrazione finale di 100 µM e concentrazioni di coniugato pari a 5.0 10<sup>-3</sup>; 1.0 10<sup>-2</sup>; 2.0 10<sup>-2</sup>; 3.0 10<sup>-2</sup>; 5.0 10<sup>-2</sup>; 7.5.0 10<sup>-2</sup> mg mL<sup>-1</sup>. Il campione è stato incubato a 25 °C per 30 min, e l'assorbanza del DPPH rimanente è stata determinata mediante analisi spettrofotometrica UV a 517 nm.

<sup>[25]</sup> Iemma, F.; Puoci, F.; Curcio, M.; Parisi, O.I.; Cirillo, G.; Spizzirri, U.G.; Picci, N. Ferulic acid as a comonomer in the synthesis of a novel polymeric chain with biological properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**; 115: 784-789.

<sup>[26]</sup> Cirillo, G.; Vittorio, O.; Hampel, S.; Iemma, F.; Parchi, P.; Cecchini, M.; Puoci, F.; Picci, N. Quercetin nanocomposite as novel anticancer therapeutic: Improved efficiency and reduced toxicity. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**; 49: 359-365.

Le stesse condizioni di reazione sono state applicate utilizzando CHIB per valutare l'interferenza del materiale polimerico sul saggio.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

### 3.8.2.2 Saggio dell'ABTS

Il saggio ABTS è stato eseguito come segue <sup>[27]</sup>: il catione radicale ABTS è stato generato mediante incubazione di ABTS ( $7.0 \cdot 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) e potassio persolfato ( $2.45 \cdot 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) a temperatura ambiente per 16 ore al buio. La soluzione è stata ulteriormente diluita con etanolo fino ad un'assorbanza di  $0.70 \pm 0,02$  ad una lunghezza d'onda di 734 nm. Quantità note del coniugato a concentrazione crescente sono state aggiunte a 2.0 mL di soluzione di ABTS ottenendo concentrazioni finali di coniugato pari a  $1.0 \cdot 10^{-3}$ ;  $2.5 \cdot 10^{-3}$ ;  $5.0 \cdot 10^{-3}$ ;  $1.0 \cdot 10^{-2}$ ;  $1.5 \cdot 10^{-2}$ ;  $2.0 \cdot 10^{-2}$  mg mL<sup>-1</sup>. Dopo 6 min di incubazione, l'assorbanza è stata misurata a 734 nm.

Le stesse condizioni di reazione sono state applicate utilizzando CHIB per valutare l'interferenza del materiale polimerico sul saggio.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

### 3.8.2.3 Determinazione dell'attività antiossidante Trolox-equivalente

La capacità antiossidante espressa come equivalenti trolox (TEAC) dei coniugati CHITQ, Gel-Cur e DEX-CUR, così come quella dell'idrogel H<sub>GC</sub> stata determinata secondo una metodologia riportata in letteratura <sup>[28]</sup>.

Nel caso dei coniugati polimerici, in esperimenti separati CHITQ ( $2.0 \cdot 10^{-3}$  mg mL<sup>-1</sup>), Gel-Cur ( $7.0 \cdot 10^{-4}$  mg mL<sup>-1</sup>) o DEX-CUR ( $7.6 \cdot 10^{-2}$  mg mL<sup>-1</sup>) è stato aggiunto a soluzioni di ABTS nell'intervallo di concentrazione  $0 - 1.23 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e l'assorbanza è stata determinata a 734 nm dopo 6 min di incubazione a 37 °C al buio. Il TEAC è stato determinato secondo la seguente equazione (3.4):

$$TEAC = \frac{C}{1.9 \cdot [Antiox]} \quad (3.4)$$

1.9 è il numero di molecole di ABTS quenciate da una molecola di trolox e [Antiox] è la concentrazione equivalente in antiossidante (Q o CUR) nel campione. C, che rappresenta la quantità massima di ABTS quenciate dalla concentrazione testata dell'antiossidante, è stata calcolata dalla

<sup>[27]</sup> Spizzirri, U.G.; Altimari, I.; Puoci, F.; Parisi, O.I.; Iemma, F.; Picci, N. Innovative antioxidant thermo-responsive hydrogels by radical grafting of catechin on inulin chain. *Carbohydr. Polym.* **2011**; 84: 517-52

<sup>[28]</sup> Arts, M.J.T.J.; Sebastiaan Dallinga, J.; Voss, H.-P.; Haenen, G.R.M.M.; Bast, A. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem.* **2004**; 88: 567-570.

relazione tra la riduzione della concentrazione di ABTS rispetto alla sua concentrazione iniziale secondo la seguente equazione (3.5):

$$y = C(1 - e^{-bx}) \quad (3.5)$$

$y$  è la riduzione della concentrazione di ABTS,  $x$  è la concentrazione di ABTS iniziale.

Nel caso dell'idrogel H<sub>GC</sub>, il valore TEAC è stato determinato utilizzando la stessa procedura utilizzando campioni di H<sub>G</sub> o H<sub>GC</sub> di 3.0 mg.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

### 3.9 Determinazione della concentrazione di aggregazione critica

Le concentrazioni di aggregazione critica (CAC) di coniugati l-Ker e DEX-CUR in fase acquosa sono state determinate mediante fluorescenza, impiegando il pirene come indicatore non polare [29].

I campioni sono stati disciolti in acqua distillata a diverse concentrazioni sotto agitazione magnetica. Aliquote pari a 20.0 µL di una soluzione di pirene (3.0 10<sup>-5</sup> M) in acetone sono state inserite in eppendorf e fatte evaporare sotto cappa; dopo completa evaporazione, è stato aggiunto 1.0 mL della soluzione polimerica acquosa a concentrazioni comprese tra 1.0 10<sup>-7</sup> e 1.0 mg mL<sup>-1</sup> (concentrazione finale di pirene 6.0 10<sup>-7</sup> M). I campioni sono quindi stati posti sotto agitazione magnetica per 12 h ed analizzati mediante fluorescenza a 25 °C. La CAC è stata determinata ponendo in grafico il rapporto tra le intensità di fluorescenza della terza banda vibronica a 385 nm e la prima a 373 nm (I<sub>3</sub>/I<sub>1</sub>) in funzione della concentrazione del polimero. Il rapporto tra le intensità rappresenta una misura quantitativa della natura non polare del microambiente in cui il pirene risiede: più alto è questo rapporto, più il microambiente risulta idrofobico. L'eccitazione è stata effettuata a 336 nm e l'emissione è stata registrata nel range 350-500 nm.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

### 3.10 Determinazione del grado di rigonfiamento degli idrogel

Per la determinazione del grado di rigonfiamento, campioni di 1.0 cm<sup>2</sup> di ciascun idrogel sono stati posti in un filtro di vetro sinterizzato da 5.0 mL, pesati e immersi nel mezzo di rigonfiamento. L'acqua in eccesso è stata rimossa dopo 24 ore, i campioni sono stati asciugati con un tessuto per rimuovere l'umidità superficiale e pesati.

Le condizioni sperimentali sono riportate in Tabella 3.10.1.

---

[29] Besheer, A.; Hause, G.; Kressler, J.; Mäder, K. Hydrophobically modified hydroxyethyl starch: synthesis, characterization, and aqueous self-assembly into nano-sized polymeric micelles and vesicles. *Biomacromolecules* **2007**; *8*: 359-367.

Tabella 3.10.1 Condizioni degli esperimenti di rigonfiamento

Idrogel	Mezzo di rigonfiamento	Temperatura	Voltaggio
HG; HG <sub>GO</sub> HT; HT <sub>GO</sub>	PBS 10 <sup>-4</sup> M, pH 7.4	37 °C	0, 12, 24 e 48 V
HQ HB	- PBS 0.1 mol L <sup>-1</sup> , pH 7.0; - tampone CH <sub>3</sub> COOH/CH <sub>3</sub> COONa 10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup> , pH 5.0; - HCl pH 2.0	25 °C 40 °C	---
H <sub>GC</sub> H <sub>G</sub>	PBS 10 <sup>-4</sup> M, pH 7.4	37 °C	---

### 3.11 Caricamento dei farmaci

#### 3.11.1 Caricamento di idrogel e nanoibridi

Il caricamento dei farmaci sugli idrogel e sui sistemi ibridi è stato effettuato mediante impregnazione. Quantità definite di carrier sono state poste in soluzioni concentrate di farmaco e incubate per 3 giorni a temperatura ambiente. Successivamente i campioni sono stati essiccati a peso costante a pressione ridotta.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

Le condizioni utilizzate sono riportate in Tabella 3.11.1.

#### 3.11.2 Caricamento di sistemi micro- e nano-particellari

Il caricamento dei farmaci nelle micro- e nano-particelle è stato effettuato facendo avvenire il processo di formazione dei sistemi microparticellari in una soluzione concentrata del farmaco <sup>[30]</sup> sotto agitazione per 3 ore.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

Le condizioni utilizzate sono riportate in Tabella 3.11.1.

#### 3.11.3 Determinazione dell'efficienza di caricamento

La percentuale di efficienza di caricamento di caffeina su HB e HQ, LE (%), è stata calcolata mediante analisi HPLC del filtrato secondo l'equazione (3.6):

$$LE(\%) = \frac{C_i - C_0}{C_i} \times 100 \quad (3.6)$$

dove  $C_i$  è la concentrazione iniziale della soluzione di farmaco e  $C_0$  la concentrazione finale dopo il processo di caricamento.

La percentuale di farmaco caricato, LD (%), è stata valutata secondo l'equazione (3.7).

<sup>[30]</sup> Edelman, R.; Assaraf, Y.G.; Levitzky, I.; Shahar, T.; Livney, Y.D. Hyaluronic acid-serum albumin conjugate-based nanoparticles for targeted cancer therapy. *Oncotarget* **2017**; 8: 24337-24353.

$$LD(\%) = \frac{\text{Massa Farmaco nell'idrogel}}{\text{Massa dell'idrogel}} \times 100 \quad (3.7)$$

L'efficienza di caricamento (DLE) di CisPT su  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$  è stata determinata miscelando farmaco e veicolo in un rapporto 1/1 in peso e determinando la quantità di CisPt caricato mediante spettrometria UV-Vis a 301 nm in accordo alla seguente equazione 3.8 [31]:

$$DLE (mg\ mg^{-1}) = \frac{W_D}{W_C} \quad (3.8)$$

$W_D$  e  $W_C$  sono rispettivamente le quantità di farmaco caricato e veicolo.

**Tabella 3.11.1** Condizioni utilizzate per il caricamento dei farmaci

Veicolo	Quantità (mg)	Farmaco	Condizioni	Rapporto (p/p)	Tempo
HG HG <sub>GO</sub> HT HT <sub>GO</sub>	20	Cur	0.5 mg mL <sup>-1</sup> in EtOH (3 mL)	7.5 %	3 gg
HQ HB	50	Caff	1.0 mg mL <sup>-1</sup> in H <sub>2</sub> O (2.5 mL)	5.0 %	3 gg
H <sub>GC</sub> H <sub>G</sub>	75	Q	30 mg mL <sup>-1</sup> in DMSO (0.5 mL)	20 %	3 gg
P <sub>K</sub> P <sub>K</sub> H <sub>G</sub> P <sub>K</sub> H <sub>GC</sub>	5	Q	0.4 mg mL <sup>-1</sup> in DMSO (2.5 mL)	20 %	3 h
DC	2.5	MTX	0.05 mg mL <sup>-1</sup> in PBS 10 <sup>-3</sup> M, pH 7.4 (5.0 mL)	10	3 h
CS_MWCNT	10	MTX	0.1 mg mL <sup>-1</sup> in H <sub>2</sub> O (10.0 mL)	10	24 h
NGO $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@NGO}$	5.0	CisPt	0.2 mg mL <sup>-1</sup> in H <sub>2</sub> O (2.5 mL)	10	24 h
C@HSA- MNPs@rGO C@HSA-MNPs HSA-MNPs@rGO HSA-MNPs@rGO	5.0	DOX	0.125 mg mL <sup>-1</sup> in H <sub>2</sub> O (5.0 mL)	12.5	24 h

Cur: Curcumina; Caff: Caffeina; Q: Quercetin; MTX: Metotrexato; CisPt: Cisplatino; DOX: Doxorubicina

## 3.12 Determinazione dei profili di rilascio

### 3.12.1 Studi di rilascio in vitro

Gli studi di rilascio studiati con il metodo di dissoluzione come descritto nella Farmacopea XXIV degli Stati Uniti (Apparatus 2) [32].

[31] Czarnobaj, K.; Łukasiak, J. In vitro release of cisplatin from sol-gel processed porous silica xerogels. *Drug Del. J. Deliv. Target. Ther. Agent* **2004**; 11: 341-344.

[32] McCarthy, L.G.; Kosiol, C.; Healy, A.M.; Bradley, G.; Sexton, J.C.; Corrigan, O.I. Simulating the hydrodynamic conditions in the United States pharmacopeia paddle dissolution apparatus. *AAPS PharmSciTech* **2003**; 4.

Quantità note di veicolo caricato sono state poste nel mezzo di rilascio nelle condizioni riportate in Tabella 3.12.1.

**Tabella 3.12.1** Condizioni utilizzate per gli studi di rilascio

Veicolo	Farmaco	Mezzo di rilascio (mol L <sup>-1</sup> )	pH	Temp (°C)	Differenza potenziale (V)	Det	MWCO
<b>HG</b> <b>HG<sub>GO</sub></b> <b>HT</b> <b>HT<sub>GO</sub></b>	Cur	PBS 10 <sup>-4</sup>	7.4	37	0, 12, 24, 48	UV	---
<b>HQ</b> <b>HB</b>	Caff	a) PBS 10 <sup>-3</sup> b) HCl 10 <sup>-2</sup>	a) 7.0 b) 2.0	25 40	---	HPLC	---
<b>H<sub>GC</sub></b> <b>H<sub>G</sub></b> <b>P<sub>K</sub></b> <b>P<sub>K</sub>H<sub>G</sub></b> <b>P<sub>K</sub>H<sub>GC</sub></b>	Q	DMSO / PBS 10 <sup>-3</sup> (10%)	7.4	37	---	UV	12-14 MDa
<b>DC</b>	MTX	PBS 10 <sup>-3</sup>	7.4	37	---	HPLC	12-14 MDa
<b>CS_MWCNT</b>	MTX	a) PBS 10 <sup>-2</sup> b) CH <sub>3</sub> COOH / CH <sub>3</sub> COONa 10 <sup>-1</sup>	7.4 5.5	37	---	HPLC	12-14 MDa
<b>NGO</b> <b>γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b> <b>γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@NGO</b>	CisPt	PBS 10 <sup>-3</sup>	7.4	37	---	UV	12-14 MDa
<b>C@HSA-</b> <b>MNPs@rGO</b> <b>C@HSA-MNPs</b> <b>HSA-MNPs@rGO</b> <b>HSA-MNPs@rGO</b>	DOX	a) PBS 10 <sup>-2</sup> b) CH <sub>3</sub> COOH / CH <sub>3</sub> COONa 10 <sup>-1</sup>	7.4 5.5	37	---	UV	12-14 MDa

Cur: Curcumina; Caff: Caffaina; Q: Quercetin; MWCO: Molecular weight Cut-off; MTX: Metotrexato; CisPt: Cisplatino; DOX: Doxorubicina

Ad intervalli di tempo regolari, 1.0 mL del mezzo di rilascio è stato prelevato e sostituito con mezzo fresco per garantire le condizioni *sink* durante tutta la durata dell'esperimento. La quantità di farmaco in soluzione è stata determinata mediante l'opportuna tecnica analitica e la quantità di farmaco riasciata è stata espressa in accordo all'equazione 3.9:

$$F = \frac{M_t}{N_0} \quad (3.9)$$

M<sub>0</sub> e M<sub>t</sub> sono rispettivamente le quantità di farmaco iniziale e quella in soluzione al tempo t.

Nei casi richiesti (Tabella 3.12.1), 1.5 mL soluzione/dispersione del veicolo caricato nel mezzo di rilascio sono stati in una membrana da dialisi (MWCO: 12.000-14.000 Da, VWR) ed il tutto è stato dializzato contro 13.5 mL del mezzo di rilascio.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

### 3.12.2 Studi di rilascio pulsati

Il profilo di rilascio di tipo ON-OFF dagli idrogel HB e HQ è stato valutato immergendo idrogel caricati con farmaco in PBS o HCl e alternando la temperatura tra 25 e 40 °C ad opportuni intervalli di tempo. Gli esperimenti sono stati eseguiti stabilizzando gli idrogel a due diverse temperature iniziali (25 e 40 °C) in assenza del mezzo di rilascio.

## 3.13 Saggi biologici

### 3.13.1 Colture cellulari

Le cellule sono state coltivate come monostrato in un'atmosfera umidificata a 37 °C e al 5% di CO<sub>2</sub>. Le condizioni utilizzate sono riportate in Tabella 3.13.1.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

**Tabella 3.13.1** Condizioni utilizzate per le colture cellulari

Linea cellulare	Origine	Mezzo di Coltura	
MRC-5	ATCC, In Vitro Technologies Pty.Ltd., Australia	DMEM	FBS 10% L-glutammato 1%
MCF-7	ATCC, In Vitro Technologies Pty.Ltd., Australia	DMEM	FBS 10% L-glutammato 1% Penicillina/streptomicina 1%
KELLY GFP	ATCC, In Vitro Technologies Pty.Ltd., Australia	DMEM	FBS 10% L-glutammato 1%
H1299	ATCC, In Vitro Technologies Pty.Ltd., Australia	RPMI	FBS 10%
EJ28B Ca	Università di Francoforte, Francoforte, Germania	DMEM	FBS 10%
U87	ATCC, In Vitro Technologies Pty.Ltd., Australia	DMEM	FBS 10% L-glutammato 1% Penicillina/streptomicina 1%
SH-SY5Y	ATCC, In Vitro Technologies Pty.Ltd., Australia	DMEM	FBS 10% L-glutammato 1%

DMEM: Dulbecco's modified eagle's medium; RMI: Roswell Park Memorial Institute medium; FBS: siero bovino fetale.

### 3.13.2 Studi di citotossicità in vitro

Gli effetti citotossici sono stati determinati piastrando  $2 \cdot 10^4$  cellule in una piastra a 96 pozzetti e incubate con il mezzo di coltura per 24 h per garantire l'adesione. Dopo rimozione del mezzo, le cellule sono state trattate con i materiali in oggetto solubilizzati/dispersi nel mezzo di coltura e incubate per il tempo selezionato.

Al termine del periodo di incubazione, la vitalità è stata misurata in accordo con le condizioni riportate in Tabella 3.13.2.

Nel caso degli idrogel, i campioni sono stati preventivamente frantumati, macinati in polvere e setacciati attraverso un setaccio in acciaio inossidabile da 63 µm.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

Tabella 3.13.2 Condizioni utilizzate nei test di citotossicità

Campione	Linea cellulare	Saggio	Concentrazione		Tempo di incubazione
			Carrier	Farmaco	
<b>HG</b> <b>HG<sub>GO</sub></b> <b>HT</b> <b>HT<sub>GO</sub></b>	MRC-5	WST-8	0.10-1.00 mg mL <sup>-1</sup>	---	24 h
<b>HQ</b> <b>HB</b>	MRC-5	AlamarBlue	0.10-20.0 mg mL <sup>-1</sup>	---	72 h
<b>H<sub>GC</sub></b> <b>H<sub>G</sub></b>	MRC-5	AlamarBlue	1.25-5.0 mg mL <sup>-1</sup>	---	72 h
<b>P<sub>K</sub>H<sub>G</sub></b> <b>P<sub>K</sub>H<sub>GC</sub></b>	MRC-5	Trypan Blue	5.0 mg mL <sup>-1</sup>	---	72 h
<b>DC</b>	MCF-7	MTT	0.5-20 μmol L <sup>-1*</sup>	22 μmol L <sup>-1</sup>	24 h
				110 μmol L <sup>-1</sup>	48 h
<b>MWCNT</b>	H1299	AlamarBlue	7.72 10 <sup>-3</sup> μg mL <sup>-1</sup>	7.72 10 <sup>-2</sup> μg mL <sup>-1</sup>	24 h
	MRC-5		15.1 μg mL <sup>-1</sup>	1.51 μg mL <sup>-1</sup>	
<b>NGO</b> <b>γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b> <b>γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@NGO</b>	U87	AlamarBlue	2.0-25.0 μg mL <sup>-1</sup>	2.5-10.0 μM	72 h
<b>C@HSA-MNPs@rGO</b> <b>C@HSA-MNPs</b> <b>HSA-MNPs@rGO</b> <b>HSA-MNPs@rGO</b>	SH-SY5Y	Trypan Blue	1-10 μg mL <sup>-1</sup>	0.22-2.20 μM	72 h

\* Concentrazione equivalente in curcumina; WST-8: 2- (2-metossi-4-nitrofenil) -3- (4 -nitrofenil) -5- (2,4-disolfenil) -2H-tetrazolio, sale monosodico; MTT: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfenil)-2H-tetrazolio)

### 3.13.3 Studi di citotossicità in condizioni ossidative

Nel caso dei test in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>GC</sub> e H<sub>G</sub> polverizzati (20 mg mL<sup>-1</sup>) sono stati incubati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS (2.0 mL, 20 mmol L<sup>-1</sup>) per 1,5 ore al buio a temperatura ambiente. Quindi, le provette sono state centrifugate a 1500 rpm per 5 minuti e il surnatante utilizzato per i trattamenti cellulari con un tempo di incubazione pari a 4 h.

### 3.13.4 Studi di internalizzazione cellulare

Test di internalizzazione cellulare sono stati effettuati sui campioni DC, CS\_MWCNT e C@HSA-MNPs@rGO come segue:

#### 3.13.4.1 Studi di internalizzazione del sistema DC

Le cellule MCF-7 sono state coltivate durante la notte su un vetrino coprioggetto, lavate in PBS e incubate con il solo veicolo o con 20 μM di CUR o DC per 4 ore a 37 °C. Dopo tre lavaggi in PBS, le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4% per 15 minuti a temperatura ambiente e Triton X-100 allo 0.5% in PBS integrato con albumina sierica bovina al 3% per 10 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state incubate con RNasi 100 μg mL<sup>-1</sup> per 20 min a 37 °C e successivamente

500 nM di propidio ioduro (PI) per 5 min a temperatura ambiente per marcare selettivamente il DNA. Infine, le cellule sono state lavate tre volte con PBS e osservate al microscopio confocale. Tutti i reagenti sono stati acquistati da Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

#### **3.13.4.2 Internalizzazione degli ibridi CS\_MWCNT e C@HSA-MNPs@rGO**

Cellule EJ28B sono stata piastrate e incubate con  $15.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  CS\_MWCNT per 24 ore. Cellule SH-SY5Y sono stata piastrate e incubate con  $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  C@HSA-MNPs@rGO per 6 e 24 h.

Dopo incubazione, il terreno è stato rimosso e le cellule sono state fissate con una soluzione di glutaraldeide al 2% a 4 °C. Dopo lavaggio, le cellule sono state disidratate con concentrazioni crescenti di acetone e incorporate in una soluzione (50:50) di resina EPOXI. Quindi la resina EPOXI è stata tagliata in fette sottili da 70 nm analizzate mediante TEM.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

### **3.14 Saggi microbiologici**

#### **3.14.1 Inoculo batterico**

Lo stock batterico di *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA) ATCC 43300 è stato coltivato su piastre di agar soia trypticase (TSA) (VWR Chemicals, Leuven, Belgio) per 18 ore a 37 ° C. La dimensione dell'inoculo è stata preparata secondo una torbidità standard di 0.5 ( $\lambda = 565 \pm 15 \text{ nm}$ ) e determinata mediante conteggio delle unità di formazione delle colonie (CFU). Una soluzione stock di  $1.5 \text{ mg mL}^{-1}$  Q in DMSO al 50% è stata preparata al momento prima di ogni esperimento.

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

#### **3.14.2 Attività antibatterica della quercetina**

La concentrazione minima inibente (MIC) di Q contro MRSA è stata valutata utilizzando la microdiluzione seguendo le linee guida CLSI. In breve, un inoculo standard di  $1-5 \times 10^5 \text{ CFU mL}^{-1}$  è stato preparato in terreno di Mueller Hinton modificato (Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, Francia) e trattato con diluizioni seriali doppie di Q. Successivamente, le provette di microdiluzione sono state incubate a 37 °C per 18 h. La MIC è stata definita come la concentrazione più bassa di antimicrobico che ha completamente inibito la crescita del ceppo MRSA. Per valutare l'attività battericida di Q, i campioni che non mostravano torbidità dall'esperimento precedente sono stati piastrati per il conteggio delle colonie dopo 18 h di incubazione a 37 °C (limite di rilevamento =  $50 \text{ CFU mL}^{-1}$ ). La concentrazione battericida minima (MBC) è stata definita come

la concentrazione antimicrobica più bassa che ha determinato una riduzione  $\geq 3 \log_{10}$  del valore di CFU mL<sup>-1</sup> rispetto all'inoculo iniziale (T0), secondo le linee guida CLSI [33].

### 3.14.3 Attività antibatterica degli idrogel compositi

L'attività antibatterica di Q@P<sub>K</sub>H<sub>GC</sub> e Q@P<sub>K</sub>H<sub>G</sub> è stata valutata mediante il metodo delle diluizioni al fine di valutare il numero di batteri vitali rimanenti dopo l'esposizione ai biomateriali. In breve, un inoculo standard di  $1-5 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> è stato preparato in CAMHB / DMSO (10% v/v) in provette (volume finale 1.0 mL). Successivamente, 5.0 mg di ciascun campione (P<sub>K</sub>H<sub>GC</sub>, P<sub>K</sub>H<sub>G</sub>, Q@P<sub>K</sub>H<sub>GC</sub> e Q@P<sub>K</sub>H<sub>G</sub>) sono stati aggiunti a ciascuna provetta contenente batteri e quindi incubati a 37 °C per 24 ore. Un controllo positivo costituito da batteri non trattati (senza idrogel) è stato incluso come controllo della crescita, nonché CAMHB sterile e campioni incubati in CAMHB sterile come controlli negativi. Dopo 24 h di incubazione a 37 °C, aliquote di ciascun campione sono state diluite in serie e piastrate per il conteggio delle colonie (limite di rilevamento 50 CFU mL<sup>-1</sup>).

Tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck / Sigma Aldrich, Germania.

### 3.14.4 Attività antibatterica degli idrogel ibridi

Per il test antimicrobico è stato utilizzato *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 resistente alla meticillina. MRSA è stato coltivato per 24 ore a 37 °C su piastre di agar soia trypticase (TSA). Un inoculo finale standard  $1 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> di MRSA è stato preparato in terreno di Mueller Hinton modificato in presenza dei diversi campioni di idrogel (5.0 mg) e incubato a 37 °C. Dopo 24 ore di incubazione, il materiale è stato rimosso dalla coltura e lavato tre volte con PBS. Tutti i campioni sono stati posti nella piastra a 24 pozzetti con 1 mL di tampone PBS fresco per il trattamento di fotoinduzione. Le piastre sono state illuminate utilizzando la luce blu per 60 min (18 J cm<sup>-2</sup>). Un gruppo degli stessi campioni è stato incubato al buio a temperatura ambiente e utilizzato come controllo. Tutti i campioni di materiale sono stati quindi lavati una volta con NaCl allo 0.9%, sonicati e piastrati su TSA.

## 3.15 Analisi statistica

Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e i risultati espressi come media  $\pm$  deviazione standard. Per i test enzimatici e biologici, è stata eseguita un'analisi one-way anova per valutare la significatività delle differenze tra i dati e il Tukey-Kramer test è stato utilizzato per confrontare i dati di diversi trattamenti ( $P < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo).

---

[33] CLSI Document M07-A9. 2012.

## 4 CONCLUSIONI

Il lavoro di dottorato ha evidenziato la possibilità di realizzare sistemi multicomponente per il rilascio controllato di farmaci, caratterizzati da elevata efficacia come coadiuvanti nel trattamento di ferite cutanee e tumori solidi *in vitro*.

Mettendo in evidenza le peculiarità dei materiali di partenza e dei sistemi carrier, l'attività di ricerca ha permesso di individuare le proprietà intrinseche da trasferire al carrier finale per massimizzarne l'efficacia terapeutica. Il lavoro inoltre, beneficiando di un approccio multidisciplinare, ha permesso di evidenziare la correlazione tra le proprietà chimico-fisiche dei materiali proposti con quelle biologiche e funzionali necessarie per l'ottimizzazione della formulazione finale.

Sebbene siano necessari ulteriori studi atti a valutare l'efficacia dei sistemi proposti in adeguati modelli *in vivo*, il presente lavoro ha evidenziato la possibilità di combinare materiali di natura diversa per la progettazione e realizzazione di materiali innovativi da utilizzare in campo tecnologico-farmaceutico.