

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

**Sintesi di nanoparticelle di chitosano per
veicolare dsRNA**



Relatore

prof. Davide Fissore
prof. Francesca Bosco

Candidato

Celeste Nobbio

Ottobre 2021

Indice

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | Introduzione | 5 |
| 1.1 | <i>Nanocarriers</i> per il trasporto di sostanze attive..... | 5 |
| 1.2 | Nanoparticelle polimeriche..... | 6 |
| 1.2.1 | Il chitosano | 7 |
| 1.2.2 | Nanoparticelle di chitosano..... | 10 |
| 1.3 | dsRNA e meccanismo RNA interference..... | 11 |
| 1.4 | Nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA | 12 |
| 1.4.1 | Parametri di sintesi per le nanoparticelle di chitosano-dsRNA..... | 13 |
| 1.5 | Metodologie di sintesi per nanoparticelle veicolanti dsRNA..... | 14 |
| 1.6 | Modalità di assorbimento delle nanoparticelle e di rilascio del principio attivo in sistemi vegetali..... | 16 |
| 1.7 | Scopo della Tesi..... | 17 |
| 2 | Materiali e metodologie sperimentali | 19 |
| 2.1 | Materiali impiegati | 19 |
| 2.2 | Obiettivo della sperimentazione | 21 |
| 2.3 | Apparato sperimentale per la sintesi delle nanoparticelle di solo chitosano | 21 |
| 2.3.1 | Preparazione delle soluzioni..... | 22 |
| 2.3.2 | Apparato sperimentale e metodologia di sintesi | 23 |
| 2.4 | Caratterizzazione della sospensione di nanoparticelle di chitosano | 23 |
| 2.4.1 | Valutazione della dimensione media e della distribuzione di dimensione delle particelle..... | 24 |
| 2.4.2 | Valutazione del potenziale zeta..... | 26 |
| 2.5 | Separazione delle nanoparticelle per centrifugazione e re-dispersione del campione | 27 |
| 2.6 | Apparato sperimentale per la sintesi delle nanoparticelle di chitosano-dsRNA | 28 |
| 2.7 | Spettrofotometria | 29 |
| 2.8 | Costruzione della retta di taratura e studio dell'efficacia di incapsulamento del dsRNA..... | 30 |
| 2.9 | Modalità di conservazione delle nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA | 31 |
| 3 | Analisi dei risultati | 33 |
| 3.1 | Sintesi delle nanoparticelle di chitosano | 33 |
| 3.1.1 | Effetto del <i>quench ratio</i> | 33 |
| 3.1.2 | Effetto del tempo di <i>mixing</i> | 35 |
| 3.1.3 | Effetto del tempo di riscaldamento | 36 |
| 3.1.4 | Effetto del volume in miscela..... | 37 |
| 3.1.5 | Effetto della concentrazione di chitosano | 39 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.1.6 | Effetto della centrifugazione | 41 |
| 3.2 | Sintesi delle nanoparticelle di chitosano-dsRNA | 46 |
| 3.2.1 | Prima fase di studio e risultati conseguiti..... | 46 |
| 3.2.2 | Seconda fase di studio | 50 |
| 3.2.3 | Effetto del Poloxamer..... | 53 |
| 4 | Stabilità nel tempo delle nanoparticelle di chitosano-dsRNA | 59 |
| 4.1 | Nanoparticelle di chitosano e chitosano-ploxamer..... | 59 |
| 4.1.1 | Conservazione a temperatura ambiente..... | 59 |
| 4.1.2 | Conservazione in frigorifero | 61 |
| 4.1.3 | Conservazione in congelatore | 62 |
| 4.2 | Nanoparticelle di chitosano e chitosano-ploxamer veicolanti dsRNA | 64 |
| 4.2.1 | Conservazione a temperatura ambiente..... | 64 |
| 4.2.2 | Conservazione in frigorifero | 66 |
| 4.2.3 | Conservazione in congelatore | 67 |
| 5 | Conclusioni..... | 69 |
| | Lista dei simboli..... | 71 |
| | Abbreviazioni..... | 72 |
| | Bibliografia | 73 |
| | Ringraziamenti | 77 |

1 Introduzione

1.1 *Nanocarriers* per il trasporto di sostanze attive

Negli ultimi decenni lo sviluppo di nanostrutture applicate al trasporto e al rilascio controllato di sostanze attive verso un sito specifico ha subito un rapido sviluppo. I *nanocarriers* utilizzati a tale scopo sono considerati una nuova e promettente tecnologia in grado di superare i limiti delle convenzionali modalità di somministrazione di farmaci e molecole bioattive.

Il termine *nanocarriers* è utilizzato per indicare una struttura, tubolare, sferica o particellare, con dimensione nanometrica, dell'ordine di 10^{-9} m, in grado di veicolare una sostanza, adesa, incapsulata o disciolta, verso uno specifico sito attivo e di garantirne un rilascio controllato nel tempo (Jain & Thareja, 2019; Chamundeeswari, et al., 2019).

La tecnologia dei *nanocarriers* è applicata specialmente in ambito biomedico e agrario.

Nel primo l'utilizzo di queste nanostrutture consente di veicolare e rilasciare in modo controllato diverse tipologie di farmaci, tra cui vaccini, farmaci chemioterapici, immunosoppressivi e antidolorifici. L'utilizzo di nanoparticelle consente di veicolare il principio attivo sul punto di interesse, garantendo un rilascio controllato e graduale nel tempo. Queste caratteristiche, in particolare, permettono di limitare i dosaggi di molecole tossiche, come gli agenti chemioterapici, che vengono indirizzati in questo modo sulla sola cellula o gruppo di cellule malate (Chamundeeswari, et al., 2019; Miele, et al., 2012).

In ambito agricolo l'utilizzo massivo di sostanze dannose come pesticidi e fitofarmaci, di cui l'industria agroalimentare si serve da tempo per proteggere le piante da parassiti e malattie, ha oggi gravi ripercussioni su ambiente e animali. L'utilizzo di *nanocarriers* consente di limitare i dosaggi di tali molecole garantendo un lento rilascio del principio attivo e limitandone la perdita per evaporazione (Kumar, et al., 2019). Le loro caratteristiche protettive, inoltre, le rendono adatte a trasportare molecole fragili, come gli acidi nucleici, i cui effetti terapeutici sono oggetto di numerosi studi (Kesharwani, et al., 2012).

I *nanocarriers* possono essere classificati come organici o inorganici in funzione del materiale di cui il *bulk* è costituito, oppure in funzione della loro forma, dimensione e delle loro proprietà chimiche. Sulla base del materiale di cui sono costituiti è possibile distinguere tra *carrier* organici come le nanoparticelle polimeriche, i liposomi, i dendrimeri e le nanoparticelle solide lipidiche, oppure inorganici come i nanotubi di carbonio, le nanoparticelle d'oro o le silici mesoporose (Figura 1.1).

Nel complesso, ciò che è particolarmente importante di queste nanostrutture, al di là della loro forma e composizione, è il loro rapporto superficie su volume. Le nanoparticelle, con il loro ridotto volume, forniscono un'elevata area superficiale che le rende in grado di interagire con altri sistemi biologici per mezzo di reazioni chimiche o interazioni di altra natura. L'elevata superficie esposta consente infatti alle nanoparticelle di penetrare facilmente attraverso le barriere biologiche rendendole un potente strumento non solo per la progettazione di nuovi strumenti diagnostici o dispositivi terapeutici, ma anche potenziali candidate per numerose applicazioni, tra cui catalisi, *bioimaging* e applicazioni a livello ambientale (Miele, et al., 2012; Khan, et al., 2019; Mishra, et al., 2010).

Un particolare rilievo, in questa trattazione, è riservato ai *nanocarriers* polimerici, in particolare ai *nanocarriers* di chitosano e alla loro abilità come agenti veicolanti molecole di dsRNA.

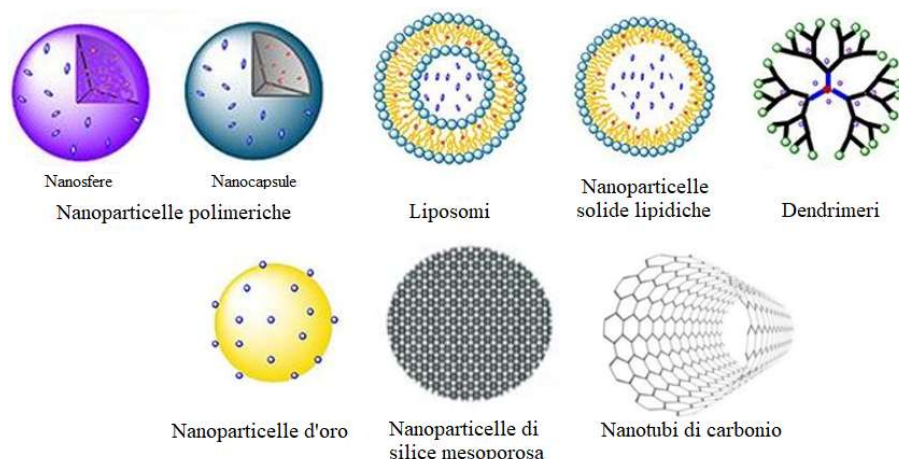


Figura 0.1: Rappresentazione delle diverse tipologie di *nanocarriers* (Figura tratta da (Dhande, et al., 2015) con modifiche).

1.2 Nanoparticelle polimeriche

Le nanoparticelle polimeriche sono prodotte a partire da polimeri sintetici o naturali. Quelle sintetizzate a partire da polimeri biodegradabili e biocompatibili possiedono numerose caratteristiche: oltre alla loro biocompatibilità e biodegradabilità, la loro superficie può essere facilmente modificata e funzionalizzata. Per merito di tali proprietà rispetto agli altri *nanocarriers* sono caratterizzate da un'elevata stabilità, un'elevata efficacia di incapsulamento e dalla possibilità di ottenere un maggiore controllo sul comportamento farmacocinetico del principio attivo incapsulato. La funzionalizzazione della superficie e la ridotta dimensione consentono infatti di controllare la modalità e la velocità di rilascio della sostanza attiva in modo tale che avvenga gradualmente. A confronto con liposomi e micelle, per esempio, le nanoparticelle polimeriche sono più semplici da produrre e garantiscono una migliore stabilità e un miglior controllo sul rilascio della sostanza attiva incapsulata (Rawat, et al., 2006; Natarajan, et al., 2014).

Dipendentemente dal metodo di produzione possono essere classificate come nanosfere o nanocapsule a seconda che il principio attivo sia disperso, incapsulato o adsorbito sulla superficie della matrice polimerica (Rawat, et al., 2006). Le nanocapsule sono sistemi vescicolari in cui la molecola attiva si trova protetta all'interno di una cavità da una membrana polimerica esterna, le nanosfere sono invece costituite da una matrice polimerica all'interno della quale il principio attivo è uniformemente disperso. In entrambi i casi è comunque possibile che la molecola trasportata venga adsorbita o si leghi chimicamente alla superficie della nanoparticella. La scelta di una o dell'altra forma influenza non solo la capacità protettiva della molecola, ma anche il profilo di rilascio dell'eccezionale contenuto (Chamundeewari, et al., 2019; Mishra, et al., 2010; Kumar, et al., 2019).

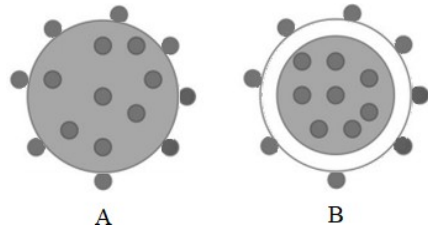


Figura 0.2: rappresentazione schematica di una nanosfera (a) e di una nanocapsula (b) contenenti una sostanza attiva (Figura tratta da (Mishra , et al., 2010) con modifiche).

I materiali polimerici utilizzati per la sintesi dei nanovettori devono essere non tossici, non antigenici, biodegradabili e biocompatibili (Nagavarma, et al., 2012). Alcuni dei polimeri più utilizzati che possiedono tali caratteristiche sono classificati come segue:

- Polimeri naturali, come il chitosano, la gelatina, l'albumina e l'alginato di sodio (Campos, et al., 2015);
- Polimeri di sintesi, come l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA), il Poly(lattico co-glicolico) (PLGA), il poly(methyl-metacrilate) (PMMA) (Rawat, et al., 2006)

I polimeri naturali indicati consentono di evitare i problemi di tossicità che sono solitamente associati all'uso di polimeri sintetici come i poliesteri (Rawat, et al., 2006; Mishra , et al., 2010). Altri vantaggi che questi materiali offrono sono legati alla loro biodisponibilità e al loro basso costo: tali composti possono essere infatti reperiti facilmente in natura, in alghe (alginato), piante (cellulosa, pectina, ciclodestrine e amido), funghi, crostacei ed insetti (chitina e chitosano) (Campos, et al., 2015).

Tra questi materiali, il chitosano si è dimostrato un ottimo *carrier* per il trasporto di molecole come dsRNA (*double stranded RNA*), siRNA (*short interfering RNA*), DNA plasmidico, oligonucleotidi, peptidi e proteine, a causa delle sue proprietà chimiche (gruppi amminici reattivi, gruppi idrossilici e carica superficiale positiva), biologiche (non tossico, biodegradabile e biocompatibile) e del suo basso costo (Yan, et al., 2021; Hassan O., et al., 2017)

1.2.1 Il chitosano

Il chitosano è un polisaccaride derivato dalla parziale deacetilazione della chitina. Quest'ultima è un polimero naturalmente presente nell'esoscheletro di crostacei ed insetti e nelle pareti cellulari di funghi e di alcuni vegetali. Il processo di deacetilazione può avvenire per via enzimatica (in presenza di chitina deacetilasi) o mediante reagenti chimici: solo quando il grado di deacetilazione (*degree of deacetylation*, DD) della molecola iniziale supera il 50% è possibile considerare il prodotto chitosano (Hassan & Chang, 2017).

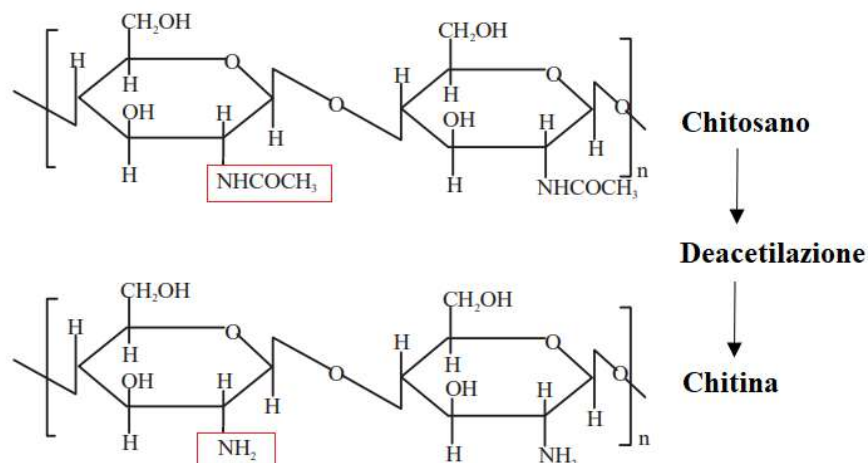


Figura 0.3: processo di deacetilazione della chitina in chitosano; si evidenzia in particolare la trasformazione dei gruppi acetilenici in gruppi amminici (figura tratta da (Hassan O., et al., 2017) con modifiche).

L'unità base della molecola di chitosano, in seguito alla reazione di deacetilazione, espone verso l'esterno due gruppi ossidrilici e un gruppo amminico: i gruppi amminici liberi, in particolare, rendono il polisaccaride un polielettrolita solubile in soluzioni acide diluite. La capacità del chitosano di sciogliersi in una soluzione acida è legata al valore di pKa del gruppo amminico. Il pKa del residuo amminico sulla molecola di chitosano è pari a 6.3: se la soluzione in cui il chitosano è immerso possiede un valore di pH inferiore, allora il gruppo amminico si protona, acquista una carica positiva e rende il chitosano un polielettrolita cationico solubile in acqua. Viceversa, per pH superiori a 6.3, il gruppo amminico si deprotona e il chitosano diviene insolubile nel mezzo acquoso. La solubilità della molecola, oltre che dal pH, è influenzata anche dalla forza ionica della soluzione e dal grado di deacetilazione: la presenza dei gruppi N-acetilici rimanenti della chitina conferisce infatti al chitosano una caratteristica idrofobica. A causa dei legami idrogeno che si creano tra il gruppo amminico e i due gruppi ossidrilici il chitosano assume una struttura cristallina (Divya & Jisha, 2018; Naskar, et al., 2019; Hembram, et al., 2014).

Per merito delle proprietà illustrate, la chitina possiede diversi campi di applicazione, tra cui l'ambito medico, cosmetico, alimentare, chimico e agricolo:

- In ambito medico è usata specialmente come matrice per la formazione di *nanocarriers* e studiata come potenziale farmaco antitumorale e antinfiammatorio;
- In ambito cosmetico per la preparazione di lozioni e creme, ma anche come additivo a saponi e smalti;
- In ambito alimentare come conservante, come molecola protettiva per i frutti e come additivo base per i coloranti alimentari;
- In ambito chimico la chitina viene applicata come mezzo chelante per l'immobilizzazione di enzimi e come fase stazionaria all'interno delle colonne cromatografiche.

Per quanto riguarda le applicazioni in ambito agricolo il chitosano venne inizialmente conosciuto come agente antimicrobico, ma in breve tempo iniziò ad essere utilizzato come regolatore della crescita delle piante, fertilizzante per il suolo, come molecola in grado di

preservare frutta e verdura ostacolando la perdita di acqua dai vegetali e come rivestimento per la protezione di semi. Il chitosano, inoltre, si è dimostrato in grado di incrementare le difese di piante come pomodoro, cetriolo, fragole e peperoncini (Kashyap, et al., 2015; Hassan & Chang, 2017): esso agisce attivando l'immunità innata della pianta, stimolando la produzione di molecole in grado di proteggerla. Oltre alle proprietà che la molecola stessa possiede, il chitosano applicato con altre molecole, come biopesticidi o biofitofarmaci, è in grado di aumentarne l'effetto. Il chitosano si assorbe facilmente sulla superficie delle piante e questo consente di prolungare il tempo di contatto tra la nanoparticella e il punto in cui si è posata, permettendo al principio attivo di essere rilasciato. Le nanoparticelle, inoltre, con la loro estesa superficie esposta incrementano ulteriormente l'efficacia di assorbimento della sostanza incapsulata (Kashyap, et al., 2015). Ad oggi il chitosano è utilizzato in numerosi studi come *carrier* per veicolare molecole di dsRNA o siRNA in grado di attivare all'interno della pianta un particolare meccanismo di difesa contro parassiti e virus noto come *RNA interference*.

1.2.2 Nanoparticelle di chitosano

In merito a quest'ultima applicazione, le proprietà chimiche del chitosano, come la sua carica positiva e la sua solubilità in mezzi acquosi, sono state determinanti nel successo di tale biopolimero come *carrier* in grado di veicolare sostanze attive e materiale genetico (Grenha, 2012). Le nanoparticelle di chitosano possiedono le caratteristiche del biopolimero abbinate alle proprietà delle nanoparticelle come l'ampia superficie esposta e la piccola dimensione (Divya & Jisha, 2018). Il chitosano è in grado di legarsi a diversi composti sia organici che inorganici migliorandone la stabilità, la solubilità e l'attività biochimica (Kashyap, et al., 2015).

Le nanoparticelle di chitosano possono essere sintetizzate con varie tecniche: la scelta della strategia più adatta dipende dalle caratteristiche che le nanoparticelle devono assumere al termine della loro produzione, come forma e dimensione, e dal tipo di principio attivo che deve essere incapsulato (Nagavarma, et al., 2012).

Le sostanze attive possono essere incorporate alle nanoparticelle durante la procedura di sintesi, in tal caso si parla di incorporazione dell'ingrediente attivo, oppure possono essere fatte adsorbire sulla superficie delle nanoparticelle al termine del processo di sintesi. In quest'ultimo caso si parla di incubazione e le nanoparticelle sono immerse in una soluzione concentrata del principio attivo e lasciate incubare fin che questo non si lega sulla loro superficie (Naskar, et al., 2019). Molte tecniche sono state sviluppate per incrementare l'efficacia con cui il principio attivo viene caricato, ma ciò dipende molto dal metodo di preparazione, dagli additivi stabilizzanti aggiunti e dalle proprietà chimico fisiche della sostanza aggiunta: la massima efficacia la si raggiunge comunque quanto il principio attivo è inserito durante la fase di produzione (Nagavarma, et al., 2012).

Il chitosano è in grado di incapsulare sia molecole idrofiliche che idrofobiche. I composti solubili in acqua sono miscelati direttamente con la soluzione di chitosano che è utilizzata per la sintesi delle nanoparticelle. I composti idrofobici possono essere incorporati al termine della sintesi con il processo di incubazione. Per ottenere rese di incapsulamento migliori anche con solventi organici, è possibile sintetizzare le nanoparticelle con una tecnica ad emulsione e miscelare il principio attivo idrofobico alla soluzione oleosa (Kashyap, et al., 2015).

Le nanoparticelle prodotte sono caratterizzate in base a parametri di forma, dimensione, carica superficiale, stabilità e capacità di incorporare il principio attivo.

- *Dimensione*: la dimensione delle nanoparticelle influenza la capacità di quest'ultime di entrare all'interno delle cellule e dei tessuti sia animali che vegetali; pertanto, più piccola è la dimensione più facile risulta essere la veicolazione del principio attivo. Informazioni sulla dimensione delle nanoparticelle possono essere ricavate utilizzando tre diverse tecniche di analisi: *Microscopia a Forza Atomica* (AFM), *Microscopia a Trasmissione Elettronica* (TEM) e *Dynamic Light Scattering* (DLS) (Hembram, et al., 2014).
- *Forma*: oltre che dalla dimensione, le interazioni delle nanoparticelle con la cellula bersaglio dipendono anche dalla loro forma e dalla morfologia della loro superficie. Queste caratteristiche possono essere indagate con tecniche TEM, AFM o con un *Microscopio Elettronico a Scansione* (SEM) (Hembram, et al., 2014).
- *Carica superficiale e stabilità*: La carica superficiale posseduta dalle nanoparticelle è misurata in termini di *Potenziale Zeta* (ZP) e rappresenta l'intensità delle repulsioni o attrazioni tra le particelle. Il valore del potenziale zeta è dunque direttamente collegato

alla stabilità della sospensione: se le nanoparticelle possiedono un alto valore, positivo o negativo, di potenziale zeta allora tenderanno a repellersi tra loro e la sospensione risulterà dunque stabile. Viceversa, se il valore di potenziale zeta è basso, tendente allo zero, le forze di repulsione non sono sufficientemente intense per garantire la stabilità della sospensione (Hembram, et al., 2014). In generale è possibile definire instabili sospensioni con valori di potenziale zeta compresi tra 0 e 10 mV, stabili con valori compresi tra 10 e 30 mV e molto stabili per valori superiori. L'agglomerazione, la coagulazione e la flocculazione sono i fenomeni che maggiormente conducono all'instabilità delle nanoparticelle (Naskar, et al., 2019; Bhattacharjee, 2016).

1.3 dsRNA e meccanismo RNA interference

RNA interference, *RNAi*, è un meccanismo genico regolatorio e di difesa contro i virus posseduto naturalmente da alcune specie di piante e nematodi. È un processo endogeno che avviene a livello cellulare ed utilizza molecole di RNA a doppia elica (*double strand RNA*, *dsRNA*) come stampo per la degradazione di molecole di mRNA omologhe (Lichtenberg , et al., 2019).

Le molecole di dsRNA (*double strand RNA*) che sono complementari ad un particolare mRNA sono in grado di indurre il meccanismo di silenziamento, o di *RNA interference* (*RNAi*). Tale meccanismo è un processo specifico che induce la degradazione di una specifica molecola di mRNA inibendone la traduzione in proteina (Adeyinka, et al., 2020). Il meccanismo di silenziamento avviene all'interno del citoplasma della cellula e si divide in due fasi. Durante la prima, la molecola di dsRNA viene rotta per mezzo del complesso enzimatico Dicer e sono generate molecole di siRNA (*small interfering RNA*) costituite da 21-23 coppie di nucleotidi. Nella seconda fase la doppia elica della molecola è srotolata e uno dei due filamenti, detto filamento guida, con l'aiuto del gruppo proteico AGO, si unisce al complesso enzimatico RISC (*RNA-induced silencing complex*) attivandolo. Il filamento guida si unisce al filamento di mRNA complementare e l'azione enzimatica del RISC degrada il tratto genico che così non è più in grado di codificare per la proteina (Kesharwani, et al., 2012; Konakalla, et al., 2016).

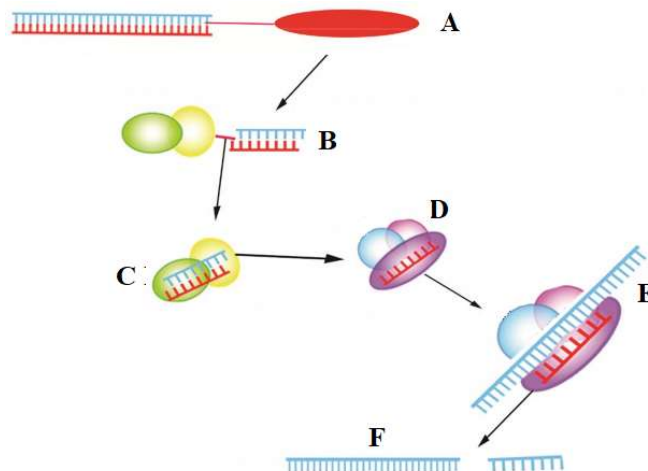


Figura 0.4: Meccanismo di *RNA interference*; (A) la molecola di dsRNA si lega al complesso Dicer per essere rotta in piccoli frammenti di siRNA lunghi 21-23 nucleotidi. (B) La molecola di siRNA si lega ai complessi AGO e RISC attivandoli (C). (D) Il complesso enzimatico attivato trasporta il singolo filamento di siRNA, filamento guida, e si lega alla molecola di mRNA target (E). (F) La molecola di mRNA è degradata e la sintesi proteica non può avvenire (Figura tratta da (Adeyinka, et al., 2020) con modifiche).

Negli ultimi decenni gli studi svolti sulla molecola di dsRNA hanno svelato un vasto campo di possibili applicazioni sia in ambito medico che in ambito agricolo (Lichtenberg, et al., 2020).

In ambito medico le molecole di dsRNA sono studiate per lo sviluppo di potenziali terapie antivirali, anticancro, come antinfiammatori, per applicazioni terapeutiche a livello del sistema nervoso centrale e per terapie cardiovascolari (Kesharwani, et al., 2012; Reischl & Zimmer, 2009). È utilizzato anche come strumento di silenziamento genico per lo studio della funzione di particolari geni (Adeyinka, et al., 2020).

In ambito agricolo l'utilizzo di terapie che coinvolgono dsRNA è volto soprattutto a trovare nuovi ed efficaci metodi per la protezione delle piante da virus e insetti limitando in questo modo l'uso di prodotti di sintesi come pesticidi e fitofarmaci. È utilizzato anche come potenziale strumento di manipolazione genica per la produzione di piante OGM (Adeyinka, et al., 2020). Il suo utilizzo come biopesticida prevede che le piante di interesse vengano trattate con una specifica molecola di dsRNA che può essere o nebulizzata sulle foglie oppure inoculata a livello delle radici. Tale molecola è scelta in modo tale da essere complementare ad un filamento di mRNA codificante per una proteina necessaria alla sopravvivenza dell'insetto (come la miosina) (Lichtenberg, et al., 2020). L'insetto, cibandosi della pianta, assume il dsRNA e non è più in grado di sintetizzare la proteina (Lichtenberg, et al., 2020). L'applicazione di RNA a doppio filamento per indurre la resistenza ai virus nelle piante è un processo noto come vaccinazione ad RNAi e rappresenta un'alternativa promettente, già dimostrata efficace contro diversi virus a RNA e viroidi. Il meccanismo di funzionamento è analogo a quanto presentato per i biopesticidi e induce il silenziamento di alcuni tratti del genoma virale (Tabein, et al., 2020).

1.4 Nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA

La molecola di dsRNA, nonostante risulti più stabile di una molecola di RNA a singolo filamento, risulta comunque sensibile all'effetto degli enzimi e dei fattori chimico-fisici caratteristici dell'ambiente in cui è immersa. Per ottenere un silenziamento genico ottimale è necessario che i dsRNA raggiungano il citoplasma delle cellule bersaglio, ma per farlo devono essere protette dai fenomeni degradativi che avvengono prevalentemente ad opera di enzimi come le RNAsi (Rudzinski & Aminabhavi, 2010).

Per incrementare la loro stabilità e per facilitare la loro assimilazione, tali molecole devono essere legate con un *carrier* che può essere virale o non virale come le nanoparticelle di chitosano. I *carrier* virali, differenti a seconda della specie in cui il principio attivo deve essere veicolato, sono utilizzati preferenzialmente per studi *in vitro* in quanto la loro applicazione *in vivo* ha dimostrato l'insorgenza di risposte immunitarie e infiammatorie indesiderate (Liu, et al., 2007; Yuan, et al., 2009). I *carrier* non virali, come le nanoparticelle di chitosano, si sono dimostrati efficaci non solo nella protezione del principio attivo, ma anche nel migliorare l'efficacia di trasferimento della molecola trasportata; la loro superficie può essere infatti funzionalizzata al fine di migliorare e rendere specifiche le interazioni con la cellula bersaglio.

Uno dei più grandi limiti che segna l'utilizzo di molecole di dsRNA è la loro incapacità di diffondere da sole attraverso la membrana cellulare. A causa della carica negativa data dallo scheletro zucchero-fosfato, la molecola di dsRNA viene respinta dalla superficie della cellula carica anch'essa negativamente. L'utilizzo di *carriers* come le nanoparticelle di chitosano consentono di superare questo limite (Reischl & Zimmer, 2009). Il gruppo amminico protonato del chitosano neutralizza la carica negativa del dsRNA e facilita il suo trasporto attraverso la membrana cellulare. La nanoparticella di chitosano veicolante dsRNA possiede ancora carica positiva (seppur inferiore a quella di puro chitosano) e questo le consente di interagire con la

carica negativa presente sulla parete esterna di cellule come quelle vegetali. Grazie a questa proprietà la nanoparticella ha quindi non solo un ruolo protettivo, ma anche coadiuvante nell'efficacia di transfezione (Rudzinski & Aminabhavi, 2010). Infine, le caratteristiche di biocompatibilità e biodegradabilità tipiche del polimero sono mantenute dalle nanoparticelle.

1.4.1 Parametri di sintesi per le nanoparticelle di chitosano-dsRNA

La carica positiva esposta dai gruppi amminici protonati delle molecole di chitosano le rende in grado di legarsi con il dsRNA caricato negativamente; in particolare, il rapporto N/P, numero di gruppi amminici per numero di gruppi fosfato, è un parametro fondamentale per determinare l'efficacia con cui le due molecole interagiscono tra loro. Altre proprietà quali il grado di deacetilazione, il peso molecolare e il pH, influenzano le caratteristiche morfologiche delle nanoparticelle e la loro capacità di trasferire il materiale genetico (Rudzinski & Aminabhavi, 2010).

N/P ratio. Il rapporto tra la quantità di chitosano e acido nucleico influenza la dimensione e la capacità di carico delle nanoparticelle. Un alto valore del rapporto chitosano su dsRNA comporta tendenzialmente un aumento di dimensione, e una maggiore capacità di incapsulamento in quanto i gruppi amminici protonati in grado di legare la molecola di dsRNA sono in numero maggiore. Incrementare tale rapporto porta inoltre ad un aumento della carica positiva sulla superficie della particella e ad una miglior efficienza di transfezione del materiale genetico.

Grado di deacetilazione. Il grado di deacetilazione determina la quantità di gruppi amminici primari che sono esposti dalla molecola di chitosano. A valori di pH inferiori a 6.2-6.5, a cui i gruppi amminici della molecola di chitosano risultano completamente deprotonati, maggiore è il grado di deacetilazione maggiore è la densità di carica che circonda la particella, misurabile in termini di potenziale zeta. La densità di carica che circonda la particella è responsabile delle interazioni elettrostatiche che il chitosano ha con la molecola di dsRNA; pertanto, un elevato grado di deacetilazione incrementa la quantità di gruppi amminici esposti e quindi la capacità di legarsi con il dsRNA (Liu, et al., 2007; Rudzinski & Aminabhavi, 2010).

Il peso molecolare. Il peso molecolare influenza la lunghezza delle catene di chitosano. Catene più lunghe, corrispondenti ad un MW superiore, risultano più mobili e raccolgono più facilmente le molecole di dsRNA, tuttavia, portano alla sintesi di nanoparticelle con dimensione maggiore. Viceversa, un peso molecolare inferiore, corrispondente ad un polimero con catene più corte e rigide, permette di ottenere particelle più piccole ma, a pari quantità di chitosano, una minore capacità di incapsulamento (Liu, et al., 2007; Rudzinski & Aminabhavi, 2010).

Il pH. Il pH dell'ambiente in cui avviene la sintesi ha effetto sulla dimensione delle nanoparticelle, in particolare una diminuzione del pH comporta una diminuzione della grandezza delle nanoparticelle: il numero di gruppi amminici protonati aumenta e quindi le interazioni elettrostatiche con la molecola di dsRNA carica negativamente aumentano. Il pH svolge inoltre un ruolo importante nel mantenimento della stabilità delle particelle (Rudzinski & Aminabhavi, 2010).

1.5 Metodologie di sintesi per nanoparticelle veicolanti dsRNA

Oltre alle proprietà appena elencate, anche la metodologia di sintesi utilizzata influenza la morfologia, la capacità di carico e le caratteristiche superficiali delle nanoparticelle.

Esistono in letteratura numerose tecniche utilizzate per la sintesi di nanoparticelle di chitosano; tuttavia, alcune tra esse si sono dimostrate più efficaci per incapsulare in particolare molecole di dsRNA, siRNA e altri acidi nucleici (Gan & Wang, 2007).

- *Simple complexation*: il chitosano viene disciolto in una soluzione tampone composta da acetato di sodio e acido acetico a pH 4.5. Le nanoparticelle di chitosano dsRNA sono prodotte aggiungendo la soluzione di chitosano, goccia dopo goccia, ad una soluzione, contenente dsRNA e acqua *Nuclease free*, che viene mantenuta sotto costante agitazione. Le nanoparticelle prodotte sono lasciate incubare a temperatura ambiente in modo che il complesso chitosano dsRNA si stabilizzi. La concentrazione di chitosano utilizzata e il suo peso molecolare sono, in particolare, i principali responsabili delle variazioni dimensionali delle particelle in questo metodo di sintesi. All'aumentare della concentrazione e del peso molecolare del chitosano le nanoparticelle sono più grandi; viceversa, sono più piccole al diminuire del peso e della concentrazione. È ovviamente necessario tenere sempre presente che un certo rapporto N/P deve essere rispettato per garantire una sufficiente capacità di incapsulamento (Katas & Alpar, 2006).
- *Ionic gelation*: la preparazione delle nanoparticelle di chitosano-dsRNA con il metodo di *ionic gelation* prevede l'utilizzo di agenti reticolanti che consentono alle nanoparticelle di assumere una particolare stabilità. Tra gli agenti reticolanti più comunemente utilizzati vi sono la glutaraldeide, la genipina l'acido citrico e il tripolifosfato (TPP). Quest'ultimo in particolare risulta molto efficace per la sintesi delle nanoparticelle ed è utilizzato al posto della glutaraldeide per evitare possibili problemi tossicologici (Katas & Alpar, 2006; Naskar, et al., 2019). Le nanoparticelle prodotte con questo metodo sono stabili, non tossiche e prive di solventi organici. In questa procedura il chitosano è disciolto in una soluzione acida che può contenere o meno agenti stabilizzanti come il *Poloxamer*; alla soluzione ottenuta, che è mantenuta sotto costante agitazione, è aggiunta goccia dopo goccia una soluzione contenete TPP e il dsRNA (Katas & Alpar, 2006). In seguito alla formazione delle interazioni elettrostatiche tra le specie di carica opposta il chitosano gelifica e le nanoparticelle precipitano. In questo caso il rapporto chitosano su TPP regola non solo la dimensione finale delle nanoparticelle, ma anche la loro carica e dunque la capacità di caricare il dsRNA e rilasciarlo (Kashyap, et al., 2015). L'agente reticolante ha infatti anch'esso carica negativa e sarà quindi necessario utilizzare una quantità di chitosano superiore per garantire un'alta efficacia di incapsulamento e un aumento di carica positiva sulla superficie delle nanoparticelle (Rudzinski & Aminabhavi, 2010; Dhandapani, et al., 2019). Nel processo di gelificazione ionica il pH ricopre anche un ruolo fondamentale in quanto una sua diminuzione comporta una riduzione nel numero di gruppi TPP carichi negativamente e un aumento del numero di gruppi amminici protonati. È dunque necessario in questo caso incrementare la concentrazione di tripolifosfato.
- *Solvent evaporation*: Sono preparate due soluzioni distinte: nella prima il chitosano, disciolto in una soluzione di acido acetico, è miscelato con etanolo, nella seconda un agente condensante, come la poly-L-lisina (PLL), è miscelato con etanolo. Le due soluzioni sono dunque unite e alla soluzione risultante è incorporata delicatamente la soluzione contenete il dsRNA disciolto in uno specifico tampone. Le particelle sono

formate a questo punto aggiungendo una quantità di etanolo circa doppia rispetto al volume della soluzione ottenuta e miscelando rapidamente. La sospensione così formata è diluita con acqua e il solvente etanolo è rimosso per evaporazione riducendo la pressione (Bozkir & Saka, 2004).

- *Nanoprecipitation/complex coacervation*: La procedura di sintesi per nanoprecipitazione, nota anche come *solvent displacement o complex coacervation*, possiede alcuni vantaggi rispetto altre tecniche presentate. Essa è infatti una tecnica di preparazione molto veloce e semplice da eseguire in cui la formazione delle nanoparticelle è istantanea (Luque-Alcaraz, et al., 2016). Sono preparate due soluzioni: la prima, che è nota come soluzione solvente, è costituita da un tampone di acido acetico e acetato di sodio in cui il chitosano è facilmente solubile. La seconda, detta antisolvente, contiene la molecola di dsRNA e deve essere una soluzione in cui il chitosano è scarsamente solubile. A tal proposito è possibile reperire in letteratura indicazioni su diverse tipologie di soluzioni antisolvente tra cui: acqua, metanolo, soluzioni saline contenenti cloruro di sodio o solfato di sodio (Luque-Alcaraz, et al., 2016; Bilati, et al., 2005; Grenha, 2012; Zhao, et al., 2011). Ciò che è importante è che la soluzione antisolvente e solvente siano completamente miscibili tra loro per consentire la formazione delle nanoparticelle. La sintesi di nanoparticelle con la tecnica di nanoprecipitazione può essere eseguita con due diversi sistemi di miscelazione: un reattore Vortex o un reattore a getti collidenti. In questa trattazione si pone maggiore attenzione sulla metodologia di sintesi che coinvolge il reattore di tipo Vortex.



Figura 0.5: Reattore Vortex e supporti per provette. Il motore elettrico del reattore, tramite l'albero di trasmissione montato verticalmente, trasmette un movimento oscillatorio circolare al supporto che ospita le provette. Tale movimento può essere regolato nell'intensità da un'apposita manopola.

La sintesi prevede che le due soluzioni, solvente e antisolvente, vengano unite in uguali quantità e riscaldate alla temperatura di 55° C prima di essere miscelate all'interno del reattore. La formazione delle nanoparticelle è immediata e per garantire una maggiore stabilità delle stesse è possibile aggiungere alla soluzione antisolvente un tensioattivo come Poloxamer o Tween 80.

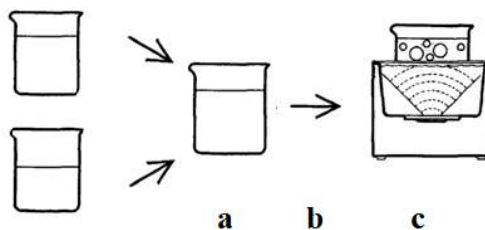


Figura 0.6: Procedura di sintesi delle nanoparticelle con la tecnica di nanoprecipitazione. Le soluzioni solvente e antisolvente sono miscelate assieme in uguali quantità (a). La soluzione risultante è riscaldata a 55°C all'interno di un bagno termostato (b) e subito dopo miscelata all'interno di un reattore Vortex alla massima potenza (c) (Figura tratta da (Quintanar-Guerrero, et al., 1998) con modifiche).

La formazione delle nanoparticelle dipende dalla combinazione delle condizioni operative scelte, dalla composizione della soluzione antisolvente e della sua interazione con la soluzione di chitosano. La nanoprecipitazione deriva dalla rapida desolvatazione del polimero al momento dell'unione delle due soluzioni. Nel momento in cui il solvente in cui è disciolto il polimero diffonde all'interno della soluzione antisolvente, il polimero precipita legandosi con la molecola di dsRNA presente in soluzione. La formazione delle nanoparticelle è governata da un effetto noto come *effetto di Marangoni* che è dovuto alla turbolenza che si crea all'interfaccia tra solvente e antisolvente, agli effetti diffusivi e di variazione di tensione superficiale che ne derivano (Bilati, et al., 2005; Beck-Broichsitter, et al., 2010). La dimensione raggiunta dalle nanoparticelle dipende oltre che dalle caratteristiche del polimero usato e dalla quantità di dsRNA aggiunto anche dal tipo di soluzione antisolvente utilizzata.

1.6 Modalità di assorbimento delle nanoparticelle e di rilascio del principio attivo in sistemi vegetali

La capacità di assorbimento delle nanoparticelle in un sistema vegetale è difficilmente predicibile in quanto dipende da molti fattori. Tali fattori sono legati alla natura delle nanoparticelle stesse e quindi, alla loro dimensione, alla composizione chimica, alla loro carica superficiale, alla funzionalizzazione della loro superficie, nonché alla presenza di additivi stabilizzanti o reticolanti usati al momento della sintesi (Kashyap, et al., 2015; Kumar, et al., 2019). Sono legati anche alla modalità con cui le nanoparticelle sono applicate e alle interazioni con l'ambiente esterno come il tipo di terreno, la disponibilità di acqua e la presenza di un particolare microbiota. Infine, l'assorbimento delle nanoparticelle è ostacolato dalla presenza di una parete cellulare e dipende dalle caratteristiche fisiologiche e anatomiche della singola pianta (Sanzari, et al., 2019).

I nanovettori possono essere applicati sia alle radici, sia sulla parte vegetativa della pianta, preferenzialmente sulle foglie. Le nanoparticelle applicate possono entrare passivamente all'interno del sistema vegetativo attraverso le naturali aperture presenti sulla superficie delle foglie: tramite stomi e idatodi, oppure attraverso il tessuto corticale. In tal caso però le dimensioni della nanoparticella risultano fondamentali e solo un diametro medio inferiore a 100 nm garantisce l'accesso (Katas & Alpar, 2006; Sanzari, et al., 2019; Palocci, et al., 2017). In caso di dimensione maggiore il rilascio è facilitato dalla presenza di piccoli tagli o abrasioni sulla superficie fogliare ed è legato soprattutto a due meccanismi:

- Un meccanismo di diffusione;
- Un meccanismo di erosione e degradazione del polimero.

Il meccanismo di diffusione segue più *step* successivi: inizialmente, l'acqua presente nell'ambiente esterno penetra all'interno della nanoparticella rigonfiandola, il rigonfiamento indebolisce la struttura del *carrier* permettendo al principio attivo di diffondere più facilmente verso l'ambiente esterno. L'erosione delle nanoparticelle è dovuta alla concomitanza di diversi fattori ambientali, tra cui la presenza di acqua, enzimi idrolitici e di un microambiente che presenta bassi valori di pH e una temperatura di almeno 37 °C (Kashyap, et al., 2015). L'abilità delle nanoparticelle di superare le barriere protettive che la pianta offre, come la corteccia, o che le cellule della pianta offrono, come la parete cellulare, dipende non solo dalle caratteristiche della nanoparticella, ma anche dalla tipologia di vegetale. Dopo aver oltrepassato tali barriere le nanoparticelle entrano all'interno della cellula tramite un meccanismo di endocitosi e successivamente il principio attivo trasportato deve abbandonare il *carrier*. Questo processo è sfavorito dalle stesse interazioni elettrostatiche che tengono assieme la

nanoparticella e per consentire il rilascio devono intervenire molecole, presenti nell'ambiente cellulare, in grado di sostituirsi al dsRNA nel legame con il chitosano. Siccome questo processo di sostituzione può essere piuttosto lento è possibile modificare le proprietà fisico chimiche della nanoparticella di chitosano in modo tale da renderla più facilmente alterabile dagli stimoli intracellulari (Yan, et al., 2021; Adeyinka, et al., 2020).

1.7 Scopo della Tesi

Lo scopo di questo lavoro di Tesi è quello di studiare il processo di sintesi delle nanoparticelle di chitosano e di valutare la loro capacità di incapsulare e veicolare molecole di dsRNA. Tale studio è stato svolto in collaborazione con l'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP), CNR, di Torino il cui obiettivo è quello di studiare l'efficienza dei *nanocarriers* di chitosano-dsRNA nel contrastare la virosi dell'avvizzimento maculato (TSWV) che colpisce in particolare le piante di peperone. In quest'ottica, al fine di fornire a IPSP dei campioni da testare *in vivo* che soddisfacessero le loro richieste, le attività sperimentali sono state svolte in due fasi: durante la prima è stata studiata la sintesi di nanoparticelle di solo chitosano mentre nella seconda è stata indagata l'efficacia di incapsulamento.

La sintesi delle nanoparticelle è stata condotta utilizzando la tecnica di nanoprecipitazione impiegando un reattore *Vortex*. Sono stati studiati gli effetti che la variazione di alcuni parametri di sintesi comporta sulle caratteristiche chimico-fisiche delle nanoparticelle; in particolare in funzione dei valori di potenziale zeta, dimensione media e distribuzione granulometrica è stato possibile studiare le differenze tra le diverse condizioni di sintesi adottate.

A partire dai risultati ricavati durante lo studio della procedura di sintesi, l'efficacia di incapsulamento è stata modulata variando il rapporto chitosano su dsRNA (*N/P ratio*) ed è stata determinata per ogni campione separando le nanoparticelle dal loro mezzo di sintesi ed analizzando quest'ultimo per mezzo di uno spettrofotometro UV-Visibile. Infine, è stato condotto un breve studio sulle modalità di conservazione delle nanoparticelle polimeriche. In particolare, è stata studiata la capacità di rilascio del principio attivo da parte di nanoparticelle conservate in ambiente refrigerato, 4°C, oppure congelate a -20°C in una soluzione di saccarosio.

2 Materiali e metodologie sperimentali

2.1 Materiali impiegati

Chitosano

Il chitosano è un biopolimero costituito da unità monomeriche di D-glucosamina e N-acetil-Dglucosamina legate tra loro da un legame $\beta(1 - 4)$. Si ottiene dalla parziale deacetilazione della chitina che è una delle principali componenti dell'esoscheletro di insetti, crostacei o della parete cellulare dei funghi. È solubile in ambiente acido a valori di pH inferiori a 6.3 fino ad una concentrazione di $10 \frac{g}{L}$. Si distinguono diverse tipologie di chitosano in funzione del peso molecolare e del grado di deacetilazione.

In funzione del peso molecolare (MW), è possibile distinguere tra chitosano a basso MW (da 10 ad 80 kDa), medio MW (da 80 a 300 kDa) ed alto MW (>300 kDa). Il peso molecolare è strettamente legato alla lunghezza delle catene del biopolimero e per questo influenza sia le caratteristiche morfologiche delle nanoparticelle, sia la capacità di incapsulamento e le caratteristiche di stabilità delle nanoparticelle prodotte.

Il grado di deacetilazione rappresenta la percentuale di gruppi acetilici ($-COCH_3$) rimossi dalla chitina (figura 2.1) ed è un indice della densità di carica del chitosano in condizioni acide, per questo è un parametro fondamentale da tenere in considerazione per garantire una buona efficacia di incapsulamento (Ragelle *et al.*, 2013, Divya e Jisha, 2018).

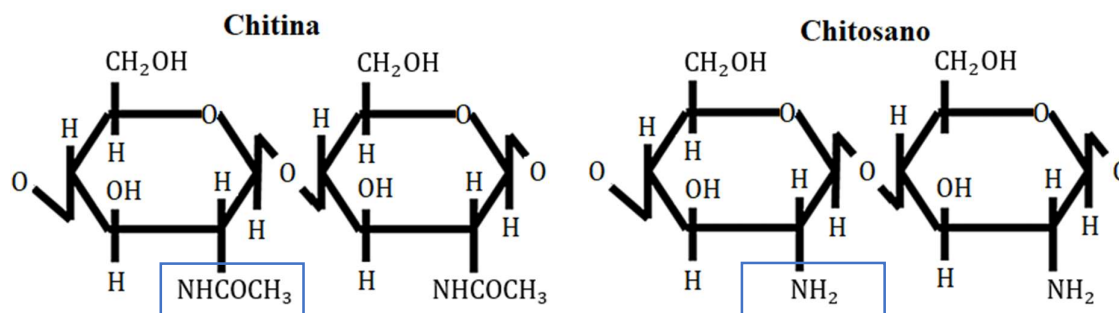


Figura 2.1: Formula di struttura della chitina e del chitosano rispettivamente. Si evidenzia il gruppo $NHCOCH_3$ della chitina che in seguito al processo di deacetilazione diventa un gruppo NH_2 per il chitosano. (Figura tratta da Divya e Jisha, 2017, con modifiche).

Per questo lavoro di Tesi è stato utilizzato del chitosano a basso peso molecolare con un grado di deacetilazione $\geq 75\%$.

Sodium Acetate buffer

Il buffer è ottenuto unendo tra loro una soluzione di acido acetico 0.1M e una di acetato di sodio 0.1M in proporzioni tali da ottenere una soluzione con pH 4.5. Il buffer è utilizzato come solvente per il chitosano nel processo di formazione dei *nanocarriers* per nanoprecipitazione.

Solfato di Sodio

Il solfato di sodio è aggiunto all'acqua per formare una soluzione 0.05 M con la funzione di antisolvente nel processo di nanoprecipitazione per la formazione dei *nanocarriers*. In particolare, la soluzione di solfato di sodio agisce incrementando il pH e la forza ionica dell'ambiente di reazione provocando una diminuzione della solubilità del chitosano nella soluzione solvente.

Acqua *nuclease free*

L'acqua *nuclease free* viene utilizzata in esperimenti e saggi che coinvolgono acidi nucleici. Essa è infatti un'acqua che ha subito trattamenti volti a inattivare enzimi come le nucleasi; queste includono le RNasi, specifiche per la degradazione dell'RNA, e le DNasi, specifiche per la degradazione del DNA. Il suo utilizzo, dunque, è di fondamentale importanza per evitare che il dsRNA all'interno dei campioni venga degradato prima di essere incluso nelle nanoparticelle.

dsRNA

Il dsRNA è una particolare molecola di RNA costituita, anziché da un singolo filamento, da due corti filamenti antiparalleli. Essa prende parte ad un meccanismo noto come *interference RNA* (iRNA) durante il quale il filamento antiparallelo della molecola si appaia ad un particolare mRNA codificante per una specifica proteina. Il legame tra i due filamenti viene riconosciuto dalle RNasi della cellula stessa che degradano la molecola.

Il dsRNA utilizzato per questa trattazione è stato prodotto da IPSP-CNR e contiene una sequenza omologa al gene N del *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) codificante per la proteina nucleocapsidica. Viene fornito in aliquote da 100 μL ciascuna, con una concentrazione di $10 \frac{\text{g}}{\text{L}}$ e conservato a temperatura di $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Al momento dell'utilizzo viene diluito con acqua *nuclease free* fino alla concentrazione di $1 \frac{\text{g}}{\text{L}}$.

Poloxamer

I poloxameri sono copolimeri non ionici biodegradabili i cui monomeri sono costituiti da una catena idrofobica centrale di polioisopropilene affiancata da due catene idrofiliche di polioisietilene (figura 2.2). I poloxameri sono anche noti con il loro nome commerciale come Pluronic (Braun, et al., 2017). Sono impiegati nel processo di formazione dei *nanocarriers* per stabilizzare la grandezza delle nanoparticelle riducendone la tendenza all'aggregazione e per regolare il rilascio dei principi attivi incapsulati (Ponnuraj, et al., 2015).

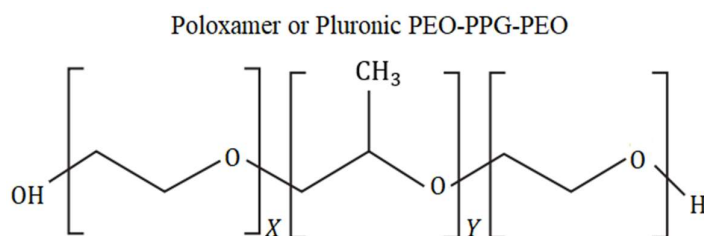


Figura 2.2: Formula di struttura del Poloxamer o, commercialmente, Pluronic. (Figura tratta da Braun, 2017, con modifiche).

Tutti i reagenti nominati, ad eccezione del dsRNA, sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania).

2.2 Obiettivo della sperimentazione

L'attività sperimentale svolta per questo lavoro di Tesi si colloca nell'ambito di una collaborazione tra l'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP), dipendente dal Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), e il Politecnico di Torino. Dopo aver sperimentato con successo l'attività terapeutica *in vivo* della molecola di dsRNA contro il TSWV virus, l'IPSP si propone di indagare l'efficacia dello stesso principio attivo associato a nanoparticelle di chitosano. In particolare, sono state condotte prove *in vivo* su tre diversi sistemi di nanoparticelle:

- Effetto di particelle di solo chitosano;
- Effetto di particelle di chitosano veicolanti dsRNA;
- Effetto di particelle di chitosano veicolanti dsRNA con aggiunta di dsRNA liberi.

Per ciascuna tesi sperimentale sono richiesti cinque campioni di nanoparticelle che devono soddisfare alcune caratteristiche specifiche:

- Ogni campione deve essere sintetizzato sotto cappa biologica al fine di garantire requisiti ottimali di sterilità;
- Le nanoparticelle contenute all'interno di ciascun campione vengono re-disperse in un volume di 200 μ L di acqua *nuclease free*.
- All'interno di ciascun campione di nanoparticelle veicolanti dsRNA devono essere contenuti, incapsulati, 300 μ g di principio attivo;
- All'interno di ciascun campione di nanoparticelle veicolanti dsRNA con aggiunta di dsRNA liberi devono essere contenuti 300 μ g di principio attivo di cui 250 μ g incapsulati e 50 μ g liberi.

Per esaudire le richieste dell'Istituto, l'attività di sperimentazione condotta è stata suddivisa in due fasi: durante la prima fase è stato messo a punto un protocollo di produzione per le nanoparticelle di solo chitosano, mentre nella seconda fase, a partire dalle conoscenze acquisite è stato incapsulato il principio attivo.

2.3 Apparato sperimentale per la sintesi delle nanoparticelle di solo chitosano

Durante la prima fase della ricerca sono state prodotte nanoparticelle di solo chitosano, prive quindi di dsRNA. Il chitosano, per merito delle sue molte proprietà antibatteriche e protettive (Hassan O., et al., 2017), è infatti anch'esso oggetto di studio da parte del IPSP-CNR di Torino che richiede per effettuare le prove *in vivo*, tra gli altri, un campione di nanoparticelle di chitosano. Per questo motivo e per studiare quali siano le migliori condizioni operative da cui partire per incapsulare il dsRNA, sono state condotte una serie di prove volte a indagare l'effetto di determinate condizioni operative sulla formazione e sulla morfologia delle nanoparticelle. A partire dalle informazioni raccolte in diversi articoli di letteratura (Sarathi, et al., 2008), (Kumar, et al., 2016), (Wang, et al., 2020), relativi alla produzione di nanoparticelle con la tecnica di nanoprecipitazione, si descrivono dunque la preparazione delle soluzioni e la metodologia di sintesi delle nanoparticelle mediante agitatore *Vortex*.

2.3.1 Preparazione delle soluzioni

Per la produzione delle nanoparticelle di chitosano sono necessarie due soluzioni: una soluzione tampone a pH 4.5 costituita da acido acetico e acetato di sodio all'interno della quale il chitosano è solubile (soluzione solvente) e una soluzione acquosa di solfato di sodio a pH 6.5 nella quale il biopolimero è scarsamente solubile (soluzione antisolvente). Per la loro preparazione viene usata acqua distillata.

Per ottenere la soluzione solvente vengono preliminarmente preparate una soluzione 0.1 M di acido acetico (densità $1.049 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$) e una soluzione 0.1 M di acetato di sodio come indicato in Tabella 2.1.

Tabella 2.1: composizione della soluzione di acetato di Sodio 0.1 M e della soluzione di acido acetico 0.1 M

| Reagente | Quantità per 100 ml di soluzione |
|---------------------|----------------------------------|
| Acido acetico, ml | 0.572 |
| Acetato di Sodio, g | 0.820 |

Per ottenere una soluzione tampone a pH 4.5, fissata o la quantità di soluzione di acetato di sodio o la quantità di soluzione di acido acetico, note le moli contenute nella soluzione selezionata e nota la costante di dissociazione acida dell'acido acetico ($1.8 \cdot 10^{-5}$), mediante l'equazione (2.1) è possibile calcolare la quantità esatta in moli del soluto contenuto nella soluzione mancante. Noto il numero di moli si può risalire facilmente al quantitativo di soluzione necessaria.

$$[H^+] = K_a \frac{n_{\text{Acido acetico}}}{n_{\text{Acetato di Sodio}}} \quad (2.1)$$

I risultati per 50 ml di soluzione di acetato di sodio sono riportati in Tabella 2.2.

Tabella 2.2: Composizione del *sodium acetate buffer* per 50 ml di soluzione di acetato di sodio.

| Soluzione | Quantità, ml |
|------------------|--------------|
| Acetato di sodio | 50 |
| Acido Acetico | 87.8 |

All'interno della soluzione tampone preparata deve essere disciolto il chitosano. Nonostante le basse concentrazioni impiegate, il chitosano non risulta però immediatamente solubile. Un metodo che è risultato efficace per ottenere una buona solubilizzazione è il seguente: il chitosano unito alla soluzione tampone è mantenuto in agitazione per qualche minuto, per agevolare la dissoluzione è possibile scaldare la soluzione ad una temperatura non superiore ai 55°C all'interno di un bagno termostato e poi riprendere l'agitazione. Dopo aver mantenuto la soluzione di chitosano in agitazione per un tempo complessivo di dieci minuti la si lascia riposare per altri quindici-trenta minuti al termine dei quali la si può utilizzare. È preferibile non scaldare la miscela su una piastra riscaldante per evitare un riscaldamento eccessivo e non omogeneo sul fondo del becher ed è altresì preferibile non superare i 55°C, temperatura alla quale la soluzione di chitosano viene scaldata durante la fase di sintesi delle nanoparticelle. Il raggiungimento di una temperatura superiore potrebbe infatti portare alla denaturazione del

biopolimero e ad una modifica delle sue proprietà chimiche. È possibile prima dell'utilizzo filtrare la soluzione con filtri (porosità 0.22 μm) che consentono così di eliminare eventuali particelle non disciolte e di ottenere una soluzione idonea per la produzione di nanoparticelle.

Per la preparazione della soluzione di solfato di sodio è sufficiente unire all'acqua distillata la giusta quantità di solfato di sodio per ottenere una concentrazione 0.05 M. Per facilitare la preparazione di tale soluzione, si è osservato che la dissoluzione del soluto risulta più veloce se l'acqua distillata viene aggiunta sul sale in un contenitore perfettamente asciutto.

2.3.2 Apparato sperimentale e metodologia di sintesi

Le nanoparticelle di chitosano sono state prodotte per nanoprecipitazione utilizzando un agitatore *Vortex* e applicando le indicazioni suggerite dagli articoli di letteratura (Zhang, et al., 2010). La soluzione solvente e la soluzione antisolvente sono unite all'interno di una provetta in uguali quantità; successivamente, la provetta viene riscaldata in un bagno termostatico alla temperatura di 55°C ed infine viene inserita all'interno di un alloggiamento del reattore *Vortex* che viene dunque azionato alla massima velocità (2500 rpm). La rapida miscelazione tra la soluzione in cui il chitosano è solubile e quella in cui il chitosano è scarsamente solubile, consente l'aggregazione del biopolimero disciolto in nanoparticelle, la cui dimensione può essere stabilizzata operando una procedura di *quench* subito dopo la sintesi. L'operazione di *quench* consiste nell'aggiunta di un determinato volume di acqua alla sospensione di nanoparticelle appena formate. La quantità di acqua aggiunta rispetto al volume di sospensione prodotta è nota come *quench volumetric ratio* e consente di bloccare i fenomeni di crescita e aggregazione delle nanoparticelle.

A partire dalla procedura generale appena descritta sono stati indagati gli effetti che alcune variabili di processo hanno sulla morfologia della popolazione di nanoparticelle prodotta. In particolare, sono state condotte le seguenti prove:

- Preparazione di nanoparticelle in un volume di miscela complessivo di 0.5, 1, 2 e 3 mL;
- Preparazione di nanoparticelle con tempo di miscelazione di 30 secondi, 1 minuto o 2 minuti;
- Preparazione di nanoparticelle con tempo di riscaldamento di 30 secondi o 1 minuto;
- Operazione di *quench* post sintesi con *volumetric quench ratio* pari a 1:1, 1:2, 1:3 o 1:4;
- Preparazione di nanoparticelle con concentrazione di chitosano variabile tra 0.2 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ e 5 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$.

A seguito delle prove condotte e dei risultati ottenuti, cercando altresì di incontrare le richieste di IPSP-CNR, è stato deciso di condurre la sintesi in una provetta *Eppendorf* da 1.5 ml utilizzando 0.5 ml di soluzione solvente, con concentrazione di chitosano pari a 5 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$, e 0.5 ml di soluzione antisolvente. La provetta è poi riscaldata per 30 secondi all'interno di un bagno termostatico a 55°C e collocata opportunamente nel reattore *Vortex* per ulteriori 30 secondi. All'interno di ciascuna provetta sono dunque contenuti 2.5 mg di chitosano in forma di nanoparticelle.

2.4 Caratterizzazione della sospensione di nanoparticelle di chitosano

Per valutare le caratteristiche delle nanoparticelle prodotte, al termine di ciascuna prova, sono state misurate la distribuzione della dimensione delle particelle e il valore del potenziale zeta. Le misurazioni sono condotte per mezzo del *Nano Zetasizer ZS90* (Nanoseries ZS90 DLS Zetasizer, Malvern Instrument, UK), utilizzando in particolare le tecniche di *Dynamic Light Scattering* e di *Laser Doppler Micro-electrophoresis*.

2.4.1 Valutazione della dimensione media e della distribuzione di dimensione delle particelle

In funzione delle condizioni operative adottate e della concentrazione di chitosano utilizzata, è possibile ottenere una popolazione di particelle con dimensioni eterogenee. In tal caso, per caratterizzare dimensionalmente la sospensione, è più corretto parlare di distribuzione delle dimensioni, viceversa è possibile associare alle particelle un unico valore di diametro medio nel caso in cui la popolazione possieda dimensioni omogenee.

La tecnica del *Dynamic Light Scattering* (DLS) è una tecnica di misurazione non invasiva che consente di valutare la distribuzione della dimensione delle popolazioni di nanoparticelle contenute nella sospensione campione. Per effettuare tale valutazione lo strumento di misura sfrutta le caratteristiche del moto Browniano a cui sono soggette le nanoparticelle. In particolare, il moto Browniano è un moto caotico causato dal continuo scontro delle particelle con le molecole di solvente che le circonda: le particelle più piccole si muovono e diffondono nella sospensione più velocemente in quanto più leggere, viceversa le particelle più grandi e pesanti diffondono lentamente.

In questo tipo di misura una cuvetta in quarzo o polistirene, riempita per circa 1 ml con il campione da analizzare, viene attraversata da un raggio luminoso che diffonde all'interno della stessa. La luce che colpisce le particelle viene diffusa in tutte le direzioni e le onde luminose deflesse interferiscono tra loro in modo costruttivo (onde in fase) o distruttivo (onde in opposizione di fase). Se le particelle all'interno della sospensione fossero ferme l'intensità luminosa risultante dai fenomeni di interferenza sarebbe costante, tuttavia, a causa del moto Browniano, il movimento delle particelle porta ad una variazione continua dell'intensità luminosa che viene monitorata da un *detector* posto a 90° rispetto alla fonte luminosa. Le misure di intensità catturate dal detector sono inviate ad un processore digitale detto correlatore. Il correlatore confronta istante per istante i segnali luminosi che raggiungono il *detector* con una misura d'intensità iniziale producendo una funzione di autocorrelazione.

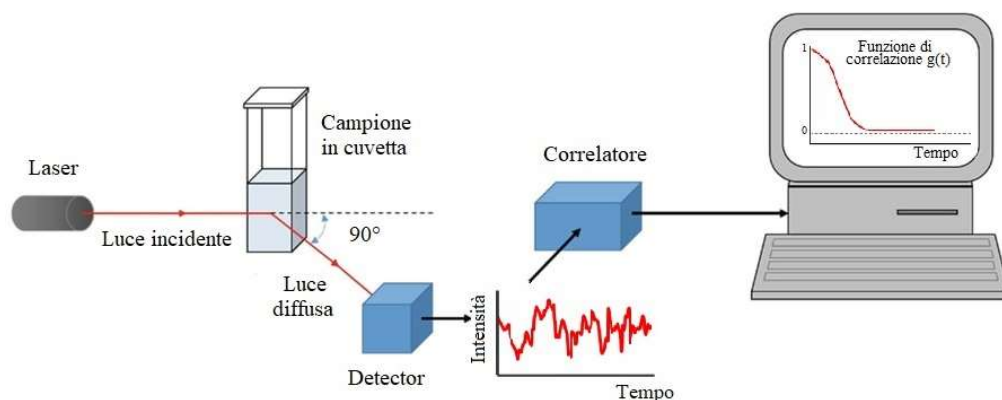


Figura 2.3: Rappresentazione schematica del funzionamento del Nano Zetasiser ZS90 per l'applicazione della tecnica del Dynamic Light Scattering.

Al tempo zero la funzione di autocorrelazione tende ad un valore unitario in quanto la misura del segnale luminoso coincide con la misura d'intensità iniziale (segnali correlati). Istante dopo

istante, a causa del movimento delle particelle, l'intensità del segnale luminoso che raggiunge il detector si discosterà sempre di più da quella iniziale e dopo pochi secondi la funzione di autocorrelazione assumerà valore nullo (segnali non correlati). La velocità con cui il valore della funzione di autocorrelazione diminuisce dipende quindi dalla dimensione delle particelle. Le particelle più piccole, che si muovono velocemente, causano fluttuazioni dell'intensità luminosa molto frequenti e questo porta ad avere una rapida diminuzione del valore della funzione di autocorrelazione. Più le particelle sono grandi invece, più l'intensità del segnale cambia lentamente e quindi più tempo sarà necessario per perdere la correlazione, la funzione di autocorrelazione decade più lentamente.

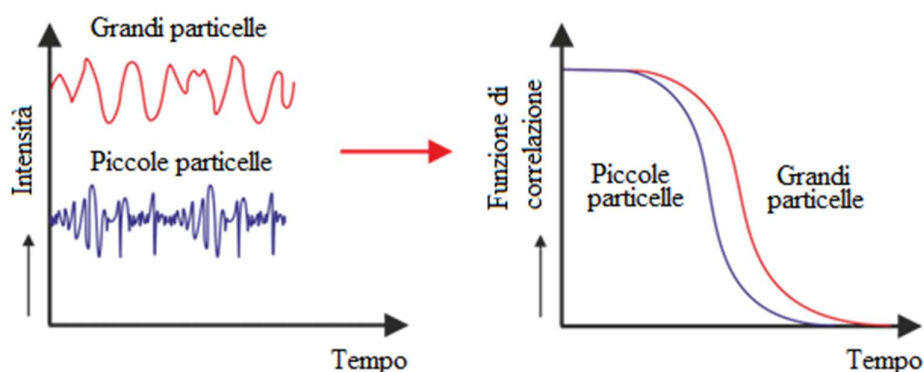


Figura 2.4: Rappresentazione delle fluttuazioni dell'intensità luminosa e della funzione di correlazione corrispondente. Grandi particelle, a causa della loro minore velocità, producono fluttuazioni di intensità luminosa meno intense e quindi la funzione di correlazione corrispondente decade più lentamente nel tempo. Viceversa, a piccole particelle corrispondono fluttuazioni di intensità luminosa più frequenti e una funzione di correlazione più rapida.

Nota la funzione di autocorrelazione è possibile calcolare il coefficiente di diffusione Browniana (D) e tramite la relazione di Stokes-Einstein (equazione 2.2), è possibile calcolare il valore del diametro idrodinamico delle particelle:

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta} \quad (2.2)$$

In tale equazione, k è la costante di Boltzmann pari a $1.380 \cdot 10^{-23} \frac{J}{K}$, T la temperatura in gradi Kelvin, η la viscosità del solvente misurata in $\frac{kg}{m \cdot s}$ e il D coefficiente di diffusione Browniana valutato in $\frac{m^2}{s}$. Per applicare correttamente l'equazione (2.2) è necessario fornire al software, e.g. *Zetasizer*, usato dallo strumento, i valori della viscosità e della temperatura del campione in quanto tali grandezze influenzano la velocità del moto Browniano e quindi il coefficiente di diffusione calcolato a partire dalla funzione di autocorrelazione.

Il diametro idrodinamico ricavato è definito come il diametro di una sfera che possiede la stessa velocità media di diffusione della particella o della molecola che è misurata. La dimensione calcolata tiene conto non solo del *bulk* solido della particella, ma anche dell'ingombro offerto dalle molecole o dagli ioni che rimangono adesi per mezzo di interazioni elettrostatiche sulla sua superficie esterna.

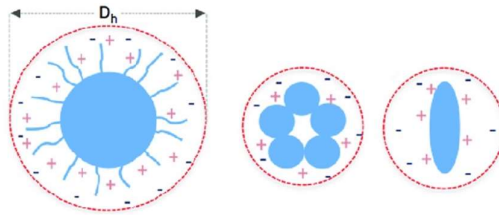


Figura 2.5: Rappresentazione schematica del diametro idrodinamico D_H di una particella. In particolare, si sottolinea il fatto che la dimensione è comprensiva di tutte le entità che circondano il *bulk* della particella.

2.4.2 Valutazione del potenziale zeta

La tecnica di *Laser Doppler Micro-electrophoresis* consente di valutare il potenziale zeta delle nanoparticelle. Il valore del potenziale zeta è un importante indicatore della stabilità delle dispersioni colloidali e fornisce una misura del grado di attrazione o repulsione elettrostatica tra due particelle adiacenti. Lo studio del potenziale zeta fornisce inoltre una prima indicazione sulla capacità delle nanoparticelle di incapsulare dsRNA. Il potenziale zeta positivo delle nanoparticelle di chitosano diminuisce nel momento in cui esse incapsulano la molecola di dsRNA caricata negativamente. Una diminuzione più o meno marcata del potenziale è dunque indice di una migliore o peggiore resa di incapsulamento.

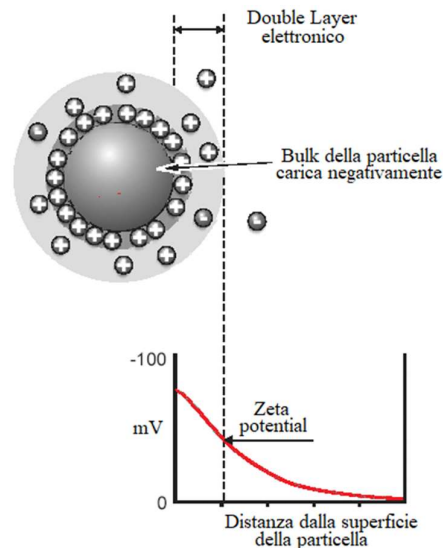


Figura 2.6: Ingrandimento schematico delle interazioni elettrostatiche che circondano la particella. Si evidenziano graficamente il valore del potenziale zeta e il *double layer* di cariche che circondano il *bulk* della particella.

Per effettuare la misura, il campione è caricato all'interno di una cella capillare dotata di elettrodi ai capi dei quali viene applicata una differenza di potenziale. Le particelle, per effetto del campo elettrico generato, si muovono verso l'elettrodo di carica opposta con una velocità, nota come mobilità elettroforetica, proporzionale al valore del loro potenziale zeta.

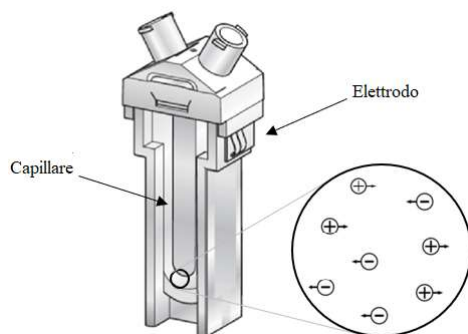


Figura 2.7: Rappresentazione di una cella capillare utilizzata per le analisi del potenziale zeta. Dopo l'applicazione del potenziale elettrico ai capi degli elettrodi si genera un campo elettrico che consente la migrazione delle particelle cariche verso l'elettrodo di carica opposta. Il movimento di cariche è noto come mobilità elettroforetica.

La mobilità elettroforetica è misurata utilizzando una tecnica interferometrica laser nota come M3-PALS (*Phase Analysis Light Scattering*). Un raggio laser colpisce il campione ad una determinata frequenza e le particelle colpite dal raggio luminoso lo diffondono in tutte le direzioni. Siccome le particelle si muovono la luce deflessa possiede una frequenza diversa rispetto a quella iniziale incidente e lo scostamento delle frequenze è proporzionale alla velocità delle particelle (effetto Doppler). Analizzando lo scostamento delle frequenze si risale alla mobilità elettroforetica e mediante l'equazione di Smoluchowsky si ricava il potenziale zeta.

Lo strumento, sia per il calcolo del potenziale zeta che per il calcolo della distribuzione dimensionale, esegue sempre tre misure per poi restituire il loro valore mediato. Per permettere allo strumento di funzionare al meglio e per ottenere quindi risultati corretti, è molto importante che il campione caricato non possieda una concentrazione di nanoparticelle in sospensione né troppo elevata né troppo bassa. In un campione troppo concentrato le particelle potrebbero sedimentare e riflettere l'una la luce riflessa dall'altra generando il fenomeno del *multiple scattering*. Viceversa, in un campione troppo diluito l'intensità della luce diffusa potrebbe essere troppo bassa e non venir rilevata dal *detector*. I campioni preparati sono quindi stati diluiti generalmente in proporzione 1:10.

2.5 Separazione delle nanoparticelle per centrifugazione e re-dispersione del campione

Al termine del processo di sintesi le nanoparticelle si trovano immerse in un ambiente a pH ancora acido. La combinazione delle soluzioni solvente e antisolvente, infatti porta il pH ad un valore di 5-5.3 sufficientemente basso per portare nel breve periodo ad una dissoluzione delle nanoparticelle di chitosano. A causa di questo il processo di centrifugazione si rende indispensabile: mediante la centrifugazione è infatti possibile separare il surnatante acido dalle nanoparticelle sedimentate che possono essere successivamente re-disperse in un piccolo volume di acqua a pH neutro. Inoltre, oltre che per aumentare il tempo di conservazione, l'operazione di centrifugazione è necessaria in quanto le particelle utilizzate per effettuare gli esperimenti in vivo devono essere re-disperse in un volume massimo di 200 μL di acqua. A partire dalle indicazioni di letteratura, che suggerivano di adottare una velocità di centrifugazione pari a 13000 RPM per un tempo di 15 minuti, sono state svolte numerose prove per verificare l'efficacia del processo. Sin dai primi esperimenti sono infatti emerse evidenti difficoltà nella sedimentazione delle nanoparticelle.

Si è scelto di operare con una centrifuga refrigerata in modo tale da mantenere la temperatura dei campioni costante a 20°C durante il processo. Con questa scelta, oltre ad evitare che il calore sviluppato durante l'operazione porti alla dissoluzione del chitosano e al conseguente danneggiamento del campione, si garantiscono delle condizioni di lavoro costanti che contribuiscono a standardizzare il processo. A causa della bassa concentrazione di chitosano la precipitazione delle particelle alle velocità proposte dagli articoli di letteratura risulta impossibile e per questo dopo alcuni tentativi si è deciso di incrementare la velocità di rotazione fino a 16000 RPM mantenendo però eguale la durata dell'operazione.

In seguito all'operazione di centrifugazione è possibile separare, mediante l'ausilio di una *micropipetta*, il surnatante dal *pellet* sedimentato. Prima di re-disperdere il campione in acqua, dopo aver allontanato il mezzo di sintesi, come suggerito dagli articoli di riferimento (Zhang, et al., 2010; Sarathi, et al., 2008), le nanoparticelle vengono lasciate asciugare all'aria per circa dieci minuti in modo da favorire l'evaporazione delle tracce di acido acetico che rimangono sul fondo della provetta e a contatto con le nanoparticelle prodotte. L'operazione di centrifugazione opera, infatti, una separazione delle componenti per differenza di densità ed essendo l'acido acetico più denso dell'acqua e meno denso delle nanoparticelle si colloca proprio all'interfaccia del sedimentato. Dopo essere rimaste all'aria viene aggiunto sulle particelle asciutte un determinato volume di acqua pari a 200 µl e sempre utilizzando una *micropipetta* le particelle vengono re-disperse.

2.6 Apparato sperimentale per la sintesi delle nanoparticelle di chitosano-dsRNA

Durante la seconda fase di ricerca sono state studiate le modalità con cui il dsRNA viene incapsulato all'interno delle nanoparticelle di chitosano e l'efficacia di tale procedimento. A partire dai risultati già ottenuti nella precedente fase operativa, per la sintesi è stata impiegata una provetta *Eppendorf* della capacità di 1.5 ml. Svolgere in una singola provetta l'intera procedura di sintesi, compresa anche l'operazione di centrifugazione, risulta vantaggioso sotto diversi punti di vista:

- È minimizzata la possibilità di contaminare il campione e di perdere principio attivo, in quanto dopo aver inserito tutti i reagenti in provetta essa viene chiusa e riaperta solo al termine dell'operazione di centrifugazione per eliminare il surnatante.
- È possibile produrre singoli campioni più velocemente e con maggiore precisione; evitare di trasferire il contenuto dalla provetta di sintesi ad una più piccola garantisce l'ottenimento di campioni uguali tra loro contenenti sempre lo stesso dosaggio di principio attivo.

La preparazione dei campioni è sintetizzata in Figura (2.8).

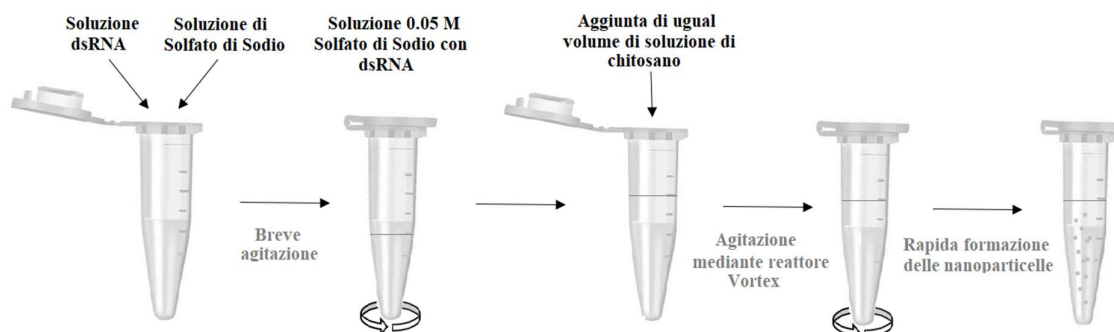


Figura 2.8: Metodologia per la sintesi di nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA.

All'interno della provetta vengono inserite per prime la soluzione di dsRNA, precedentemente ottenuta diluendo il dsRNA fornito da IPSP-CNR con acqua *nuclease free* ottenendo una soluzione in concentrazione $1 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$, e la soluzione di solfato di sodio, ad una concentrazione tale per cui la miscela delle due abbia concentrazione 0.05 M. Dopo aver agitato manualmente la provetta per facilitare la miscelazione delle due soluzioni, viene aggiunta la soluzione di chitosano in volume pari a quello delle due soluzioni in provetta. La provetta viene dunque chiusa e incubata all'interno di un bagno termostatico a 55°C per 30 secondi e successivamente miscelata per 30 secondi con l'agitatore *Vortex* alla massima velocità (2500 rpm).

Entrambe le soluzioni sono preparate a partire da acqua *nuclease free* per garantire la conservazione del dsRNA. Alla soluzione di solfato di sodio può essere aggiunta una piccola concentrazione di un agente stabilizzante come il Poloxamer per incrementare la stabilità della sospensione finale.

Nota la procedura di sintesi, sono state svolte diverse prove per determinare, fissata la quantità di dsRNA da inserire nella singola provetta, la concentrazione di chitosano da utilizzare nella soluzione solvente al fine di ottenere una buona efficacia di incapsulamento. Le condizioni operative finali, in termini di concentrazioni, per due diverse quantità di dsRNA richieste da IPSP-CNR sono definite all'interno della Tabella (2.3).

Tabella 2.3: concentrazioni utilizzate per la produzione delle nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA

| | 10 μg dsRNA | 150 μg dsRNA |
|-------------------------|--|---|
| Chitosano | $0.5 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$ | $5 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$ |
| Solfato di sodio | 0.05 M | 0.07 M |
| Poloxamer | / | $1.25 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$ |

2.7 Spettrofotometria

Per valutare l'efficacia con cui il dsRNA viene incapsulato all'interno dei *nanocarriers* di chitosano è utilizzata la tecnica di spettrofotometria UV-visibile. Tale tecnica sfrutta la capacità di una molecola di assorbire radiazioni elettromagnetiche ad una specifica lunghezza d'onda compresa nello spettro dell'UV-visibile (200-780 nm). All'interno dello spettrofotometro un raggio di luce bianca proveniente da una sorgente luminosa viene scomposto per mezzo del

monocromatore. Il monocromatore seleziona e lascia passare solamente il raggio luminoso che corrisponde ad una specifica lunghezza d'onda, impostata dall'operatore nello strumento, a cui la molecola di interesse assorbe. A questo punto il raggio selezionato colpisce la cuvetta contenente la sostanza da analizzare e la attraversa diminuendo la sua intensità luminosa in modo proporzionale alla concentrazione della molecola di interesse presente all'interno. Un rivelatore, posto a valle della cuvetta, è in grado di misurare la quantità di luce assorbita dal campione, ovvero il valore di assorbanza (Figura 2.8). La misura di assorbanza della sostanza viene sempre sottratta con quella di un campione noto come bianco che è il mezzo in cui è sospesa o disciolta la molecola che si vuole analizzare.

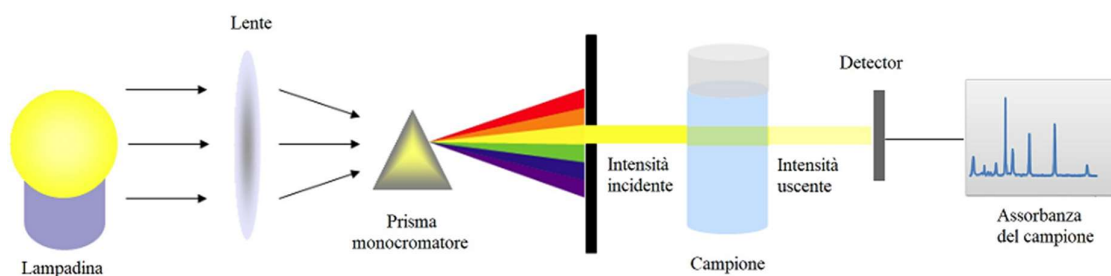


Figura 2.8: Rappresentazione schematica del funzionamento di uno spettrofotometro.

Noto il valore di assorbanza effettiva A (sottratta dell'assorbanza del bianco), tramite la legge di Lambert-Beer (equazione 2.4), è possibile risalire al valore di concentrazione C della molecola di interesse.

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot C \quad (2.4)$$

I valori di ε_{λ} (coefficiente di assorbimento molare) e l (cammino ottico) sono due valori costanti che dipendono rispettivamente dalla molecola di interesse e dalla cuvetta utilizzata per effettuare l'analisi. È possibile quindi riscrivere l'equazione di Lambert-Beer come:

$$A = m \cdot C \quad (2.5)$$

L'equazione ricavata rappresenta una retta con pendenza paria a $m = \varepsilon_{\lambda} \cdot l$ passante per l'origine. Costruendo per via sperimentale una curva di calibrazione è possibile ricavare il valore della pendenza m e quindi calcolare la concentrazione della molecola nel campione a partire dall'assorbanza misurata.

2.8 Costruzione della retta di taratura e studio dell'efficacia di incapsulamento del dsRNA

Per valutare l'efficienza con cui il dsRNA viene incapsulato nei *nanocarriers* di chitosano è necessario costruire la retta di calibrazione. Per ricavare tale retta sono preparate diverse soluzioni a concentrazioni note di dsRNA diluendo progressivamente una soluzione madre a concentrazione $0.04 \frac{\text{g}}{\text{l}}$. Ciascuna soluzione è poi analizzata allo spettrofotometro per conoscere il valore di assorbanza corrispondente. I valori ricavati sono diagrammati e mediante un foglio di calcolo è ricavata l'equazione della retta di calibrazione. Il solvente in cui il dsRNA è disciolto in ogni campione è detto bianco della retta di taratura e corrisponde al mezzo all'interno del quale le nanoparticelle di chitosano-dsRNA sono sospese durante la loro sintesi.

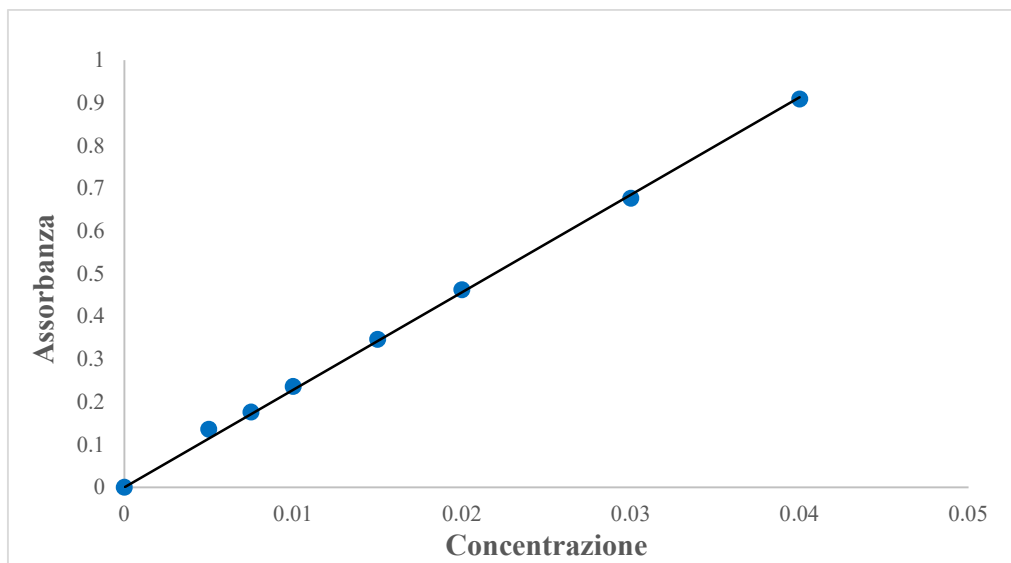


Figura 2.9: Curva di calibrazione ottenuta sperimentalmente per il dsRNA nel suo mezzo di sintesi.

L'equazione (2.5) rappresenta la retta che relaziona il valore di assorbanza (A) a quello di concentrazione in $\frac{g}{l}$ di dsRNA nel campione (C):

$$A = 22.830 \cdot C \quad (2.6)$$

È molto importante ricordare che la retta viene ricavata per una specifica molecola e utilizzando una cuvetta con uno specifico cammino ottico; pertanto, sarà possibile utilizzare tale relazione solo se le analisi vengono condotte nella medesima tipologia di cuvetta e solo se la soluzione solvente in cui è dispersa la molecola di dsRNA è la stessa con cui è stata ricavata la retta.

Per determinare la percentuale di dsRNA incapsulato all'interno delle nanoparticelle e, quindi, l'efficienza del processo si procede centrifugando la sospensione in modo tale che le nanoparticelle sedimentino al fondo della provetta e che il surnatante, contenente il dsRNA che non è stato incapsulato, possa venire separato. Nota la concentrazione di dsRNA nel surnatante recuperato, conoscendo il volume di campione all'interno della cuvetta analizzata, si ricava la quantità di molecola presente nel surnatante recuperato (Q_R). La quantità totale di dsRNA contenuta all'interno della provetta al momento della sintesi (Q_S) è anch'essa nota pertanto si ricava facilmente il quantitativo di dsRNA incapsulato (Q_I):

$$Q_I = \frac{Q_S - Q_R}{Q_S} \cdot 100 \quad (2.7)$$

2.9 Modalità di conservazione delle nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA

Dopo essere state separate dal mezzo di sintesi le nanoparticelle possono essere utilizzate immediatamente oppure possono essere conservate a temperatura di frigorifero o congelate in una soluzione di saccarosio.

A temperatura di refrigerazione (4°C) le nanoparticelle sono preservate dai fenomeni di aggregazione e la dissoluzione del chitosano risulta rallentata. In questo modo è possibile

conservare le nanoparticelle intatte per un breve periodo senza che la molecola di dsRNA venga denaturata.

Il processo di congelamento consente certamente di incrementare i tempi di conservazione delle nanoparticelle; il dsRNA congelato ad una temperatura di -20°C può infatti conservarsi molto più a lungo rispetto a quello disperso in soluzione acquosa. Tuttavia, durante quest'operazione, la formazione dei cristalli di ghiaccio porta inevitabilmente ad una graduale diminuzione della quantità di acqua libera presente nel campione e quindi la sospensione di nanoparticelle diventa sempre più concentrata. Con l'aumento della concentrazione le nanoparticelle tendono ad aggregare e la formazione dei cristalli di ghiaccio contribuisce alla loro rottura. Per ovviare a questi problemi, o comunque diminuirne l'effetto, l'operazione di congelamento è condotta in una soluzione di crioprotettori. Il saccarosio è un eccipiente crioprotettivo comunemente utilizzato per proteggere molecole di principio attivo dagli effetti del congelamento. In particolare, questo disaccaride è in grado di agire come stabilizzante anche aumentando la viscosità della sospensione di nanoparticelle riducendone quindi la mobilità.

Le nanoparticelle sono state congelate in un flacone riempito per 2 ml di una soluzione di saccarosio al 10% e per 1 ml della sospensione di nanoparticelle.

3 Analisi dei risultati

3.1 Sintesi delle nanoparticelle di chitosano

Come indicato nel precedente capitolo, la prima fase dello studio sperimentale si è incentrata sulla sintesi, per nanoprecipitazione, di nanoparticelle di solo chitosano impiegando un reattore *Vortex*. L'obiettivo di tale studio è quello di individuare le migliori condizioni di sintesi che consentano di ottenere nanoparticelle in grado di incapsulare la quantità di dsRNA richiesta dal caso di studio in esame. Per farlo è stato necessario effettuare uno studio preliminare che consentisse di comprendere gli effetti che una modifica delle diverse variabili operative apporta sulle caratteristiche delle nanoparticelle, in particolare il diametro medio e il potenziale superficiale. A partire dalle indicazioni di letteratura (Zhang, et al., 2010), per produrre le nanoparticelle, è stata utilizzata la seguente procedura:

- Le soluzioni solvente e antisolvente, precedentemente preparate, sono filtrate usando un filtro con maglia di 0.22 μm ;
- Il *sodium acetate buffer*, contenente il chitosano disciolto in concentrazione $0.2 \frac{\text{g}}{\text{l}}$, è unito in ugual quantità con la soluzione di solfato di sodio 0.05 M;
- La provetta è riscaldata all'interno di un bagno termostatico a 55°C per 60 secondi;
- Per mezzo del *Vortex mixer*, la provetta è miscelata per 30 secondi.

Dovendo studiare la distribuzione dimensionale delle particelle, l'operazione di filtrazione risulta necessaria per eliminare impurezze o particelle di soluto non disciolti che interferiscono inevitabilmente con le misure effettuate al DLS. Seguendo queste indicazioni, sono stati studiati gli effetti prodotti dalle seguenti variabili:

- *Quench ratio*;
- Tempo di miscelazione;
- Tempo di riscaldamento della miscela;
- Volume totale in reazione;
- Concentrazione di chitosano.

3.1.1 Effetto del *quench ratio*

Per studiare l'effetto del *quench* le nanoparticelle sono state sintetizzate unendo in provetta 1 ml di soluzione di solfato di sodio con 1 ml di soluzione di chitosano a concentrazione $0.2 \frac{\text{g}}{\text{l}}$. L'operazione di *quench*, effettuata subito dopo la sintesi delle nanoparticelle, consiste nell'aggiunta di una piccola aliquota di acqua direttamente all'interno del volume di sospensione: il rapporto tra il volume di sospensione contenuto in provetta e il volume di acqua aggiunta è detto *quench volumetric ratio*. Quest'operazione non viene esplicitamente indicata nelle metodiche di produzione descritte in letteratura che utilizzano un miscelatore *Vortex*, tuttavia, è comunemente citata in lavori di carattere più generale che descrivono tecniche di incapsulamento per nanoprecipitazione mediante sistemi reattoristici differenti.

È stato dunque studiato l'effetto di diversi *quench volumetric ratio*, in particolare 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4 (Figura 3.1).

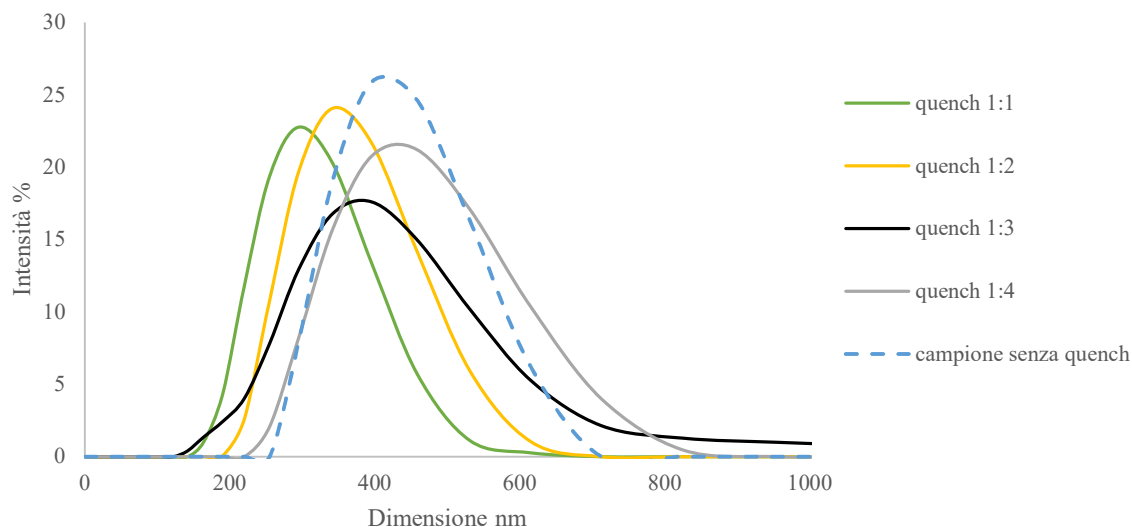


Figura 3.1: Curve PSD di nanoparticelle di chitosano prodotte al variare della *quenched volumetric ratio*.

Da Figura 3.1 si può osservare che, rispetto al campione su cui non è stata effettuata alcuna operazione di *quenched*, gli altri campioni, ad eccezione di quello prodotto con un rapporto di *quenched* 1:4, possiedono dimensioni inferiori. In particolare, a valori di *quenched ratio* minori corrispondono dimensioni minori delle nanoparticelle sintetizzate; viceversa, l'aggiunta di una quantità di acqua che è di molto superiore al volume della sospensione pare non apportare alcun vantaggio alla dimensione delle nanoparticelle.

Tabella 3.1: Dimensione media e potenziale zeta delle nanoparticelle di chitosano al variare del volume di *quenched* confrontate con la dimensione e il potenziale zeta del campione non sottoposto alla procedura di *quenched*.

| Quenched ratio | Dimensione media, nm | Potenziale zeta, mV |
|----------------|----------------------|---------------------|
| No quenched | 413 | 6.62 |
| 1:1 | 293 | 4.23 |
| 1:2 | 345 | 4.30 |
| 1:3 | 363 | 3.70 |
| 1:4 | 424 | 3.51 |

Al termine del processo di sintesi, la sospensione formata è instabile e le nanoparticelle contenute aggregano facilmente tra loro generando *clusters* di dimensioni maggiori. L'operazione di *quenched*, come mostrato in Figura 3.1 e in Tabella 3.1, consente di ottenere una sospensione di nanoparticelle con dimensioni inferiori. Essa agisce modificando principalmente la temperatura, il pH e la concentrazione delle nanoparticelle presenti in sospensione. La diminuzione della temperatura è legata al fatto che l'operazione di *quenched* è eseguita con acqua a temperatura ambiente, che viene aggiunta al sistema di nanoparticelle al termine della sintesi quando ancora la temperatura della sospensione è circa di 55°C. La diminuzione della temperatura e la diluizione della sospensione portano ad una diminuzione della frequenza delle collisioni e di conseguenza si riduce la possibilità di formare aggregati di grandi dimensioni. La diminuzione del pH, ottenuta dall'aggiunta di acqua, influenza anch'essa la dimensione delle nanoparticelle, ma influenza maggiormente la solubilità del chitosano, che diminuisce aumentando la stabilità nel tempo dei *nanocarriers* in sospensione. Analizzando i valori di

potenziale zeta è possibile notare che alle nanoparticelle sottoposte alla procedura di *quench* corrisponde una carica superficiale inferiore rispetto alle stesse nanoparticelle non sottoposte a tale procedura. In particolare, per valori di *quench ratio* 1:1 e 1:2 il potenziale zeta è poco superiore a quello delle particelle sottoposte a *quench* 1:3 e 1:4; questi ultimi campioni sono infatti maggiormente diluiti e il pH della sospensione si avvicina alla neutralità. Valori così bassi di potenziale zeta sono anche indici di un campione instabile, con nanoparticelle che tendono più facilmente ad aggregare.

Nonostante ciò, è possibile notare dai risultati in presentati Tabella 3.1 che per un *quench volumetric ratio* pari ad 1:1 si ottengono i migliori risultati in termini di dimensioni. Per tale motivo, nelle prove successive, l'operazione di *quench* è stata aggiunta al protocollo di sintesi.

3.1.2 Effetto del tempo di *mixing*

Mantenendo costante la concentrazione di chitosano, $0.2 \frac{g}{l}$, e il volume totale delle soluzioni in provetta (2 ml), è stato valutato l'effetto di una variazione del tempo di miscelazione sulla dimensione media e il potenziale zeta delle nanoparticelle. Dopo aver riscaldato la provetta all'interno del bagno termostatico a $55^{\circ}C$ per 60 secondi, è stata inserita all'interno di un apposito alloggiamento nel reattore *Vortex* e miscelata per 30 secondi, un minuto o due minuti ottenendo i risultati presentati in Figura 3.2.

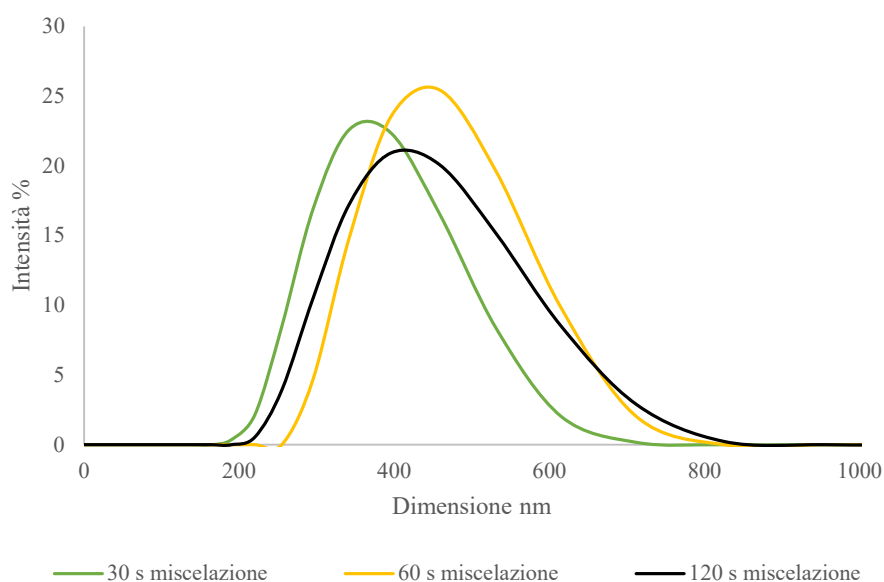


Figura 3.2: Curve PSD di nanoparticelle di chitosano prodotte al variare del tempo di miscelazione.

Dall'osservazione della Figura 3.2 è possibile notare che un aumento del tempo di miscelazione porta all'ottenimento di nanoparticelle di dimensioni leggermente maggiori. In particolare, i picchi associati alle curve riportate indicano che la maggiore differenza di dimensione media la

si ha nel passaggio da 30 a 60 secondi, mentre nel passaggio da 60 a 120 secondi la differenza risulta meno marcata. Tali differenze sono riassunte in Tabella 3.2.

Tabella 3.2: Effetto del tempo di miscelazione sulla dimensione media e sul potenziale zeta delle nanoparticelle

| Tempo di miscelazione, s | Diametro medio, nm | Zeta potential, mV |
|--------------------------|--------------------|--------------------|
| 30 | 358 | 12.3 |
| 60 | 436 | 9.0 |
| 120 | 412 | 9.5 |

Dai risultati ottenuti e presentati in Dall'osservazione della Figura 3.2 è possibile notare che un aumento del tempo di miscelazione porta all'ottenimento di nanoparticelle di dimensioni leggermente maggiori. In particolare, i picchi associati alle curve riportate indicano che la maggiore differenza di dimensione media la si ha nel passaggio da 30 a 60 secondi, mentre nel passaggio da 60 a 120 secondi la differenza risulta meno marcata. Tali differenze sono riassunte in Tabella 3.2.

Tabella 3.2, è possibile affermare che un aumento del tempo di miscelazione porta ad un lieve aumento della dimensione media delle nanoparticelle. Mantenere il sistema in agitazione per un tempo troppo lungo favorisce il fenomeno di aggregazione portando le particelle formate a scontrarsi tra loro. Inoltre, ad un minor tempo di miscelazione corrisponde un maggior valore del potenziale zeta indice di una maggiore stabilità della sospensione. Per questi motivi si è deciso di mantenere, come da indicazione di letteratura, il tempo di miscelazione pari a 30 secondi.

3.1.3 Effetto del tempo di riscaldamento

Anche in questo caso, come per lo studio del tempo di miscelazione, sono state utilizzate le condizioni operative indicate in letteratura (concentrazione di chitosano $0.2 \frac{g}{l}$, soluzione di solfato di sodio 0.05 M e volume complessivo di 2 ml), mantenendo costante il tempo di miscelazione pari a 30 secondi e la temperatura di riscaldamento pari a $55^{\circ}C$, ed è stato studiato l'effetto di un tempo di riscaldamento pari a 0, 30 o 60 secondi (Figura 3.3).

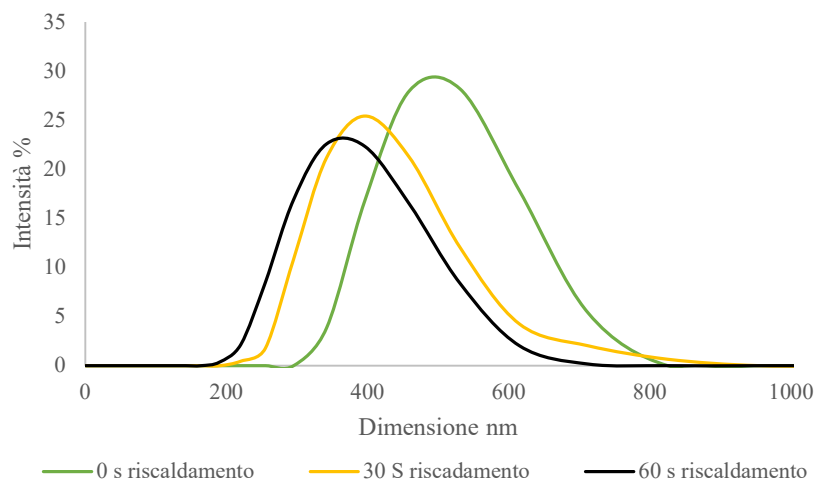


Figura 3.3: Curve PSD di nanoparticelle di chitosano prodotte al variare del tempo di miscelazione

L'effetto del tempo di riscaldamento sulla dimensione delle nanoparticelle risulta essere più marcato rispetto a quello portato da una variazione del tempo di miscelazione. In particolare, l'assenza di riscaldamento, dopo l'unione delle due soluzioni reagenti in provetta, produce nanoparticelle di dimensioni decisamente maggiori rispetto a quelle prodotte da un riscaldamento di 30 o 60 secondi. L'operazione di riscaldamento è dunque necessaria per garantire una migliore miscelazione delle componenti in soluzione; la diminuzione della viscosità, della soluzione complessiva all'interno della provetta, legata all'aumento di temperatura, contribuisce certamente ad ottenere un risultato finale migliore in termini di dimensione delle nanoparticelle.

Tabella 3.3: Effetto del tempo di riscaldamento sulla dimensione e sul potenziale zeta delle nanoparticelle

| Tempo di riscaldamento, s | Diametro medio, nm | Zeta potential, mV |
|---------------------------|--------------------|--------------------|
| 0 | 507 | 9.1 |
| 30 | 404 | 9.3 |
| 60 | 380 | 12.3 |

Come è possibile osservare dai risultati presentati in L'effetto del tempo di riscaldamento sulla dimensione delle nanoparticelle risulta essere più marcato rispetto a quello portato da una variazione del tempo di miscelazione. In particolare, l'assenza di riscaldamento, dopo l'unione delle due soluzioni reagenti in provetta, produce nanoparticelle di dimensioni decisamente maggiori rispetto a quelle prodotte da un riscaldamento di 30 o 60 secondi. L'operazione di riscaldamento è dunque necessaria per garantire una migliore miscelazione delle componenti in soluzione; la diminuzione della viscosità, della soluzione complessiva all'interno della provetta, legata all'aumento di temperatura, contribuisce certamente ad ottenere un risultato finale migliore in termini di dimensione delle nanoparticelle.

Tabella 3.3, e come già anticipato dall'osservazione delle curve PSD, una diminuzione del tempo di riscaldamento porta ad un notevole aumento della dimensione media delle nanoparticelle. Nuovamente, a valori di riscaldamento maggiori (60 secondi) corrisponde un potenziale zeta maggiore, indice di una sospensione maggiormente stabile. A causa di tali motivazioni, si è deciso di mantenere, in linea con le indicazioni presenti in letteratura, un tempo di riscaldamento pari a 60 secondi.

3.1.4 Effetto del volume in miscela

A partire dai risultati ottenuti sino ad ora (tempo di riscaldamento di 60 secondi, tempo di miscelazione 30 secondi e *quench volumetric ratio* 1:1) e usando sempre la medesima strategia di sintesi, si è indagato quale potesse essere l'effetto di una variazione del volume di miscelazione sulle caratteristiche delle particelle ottenute (Figura 3.4).

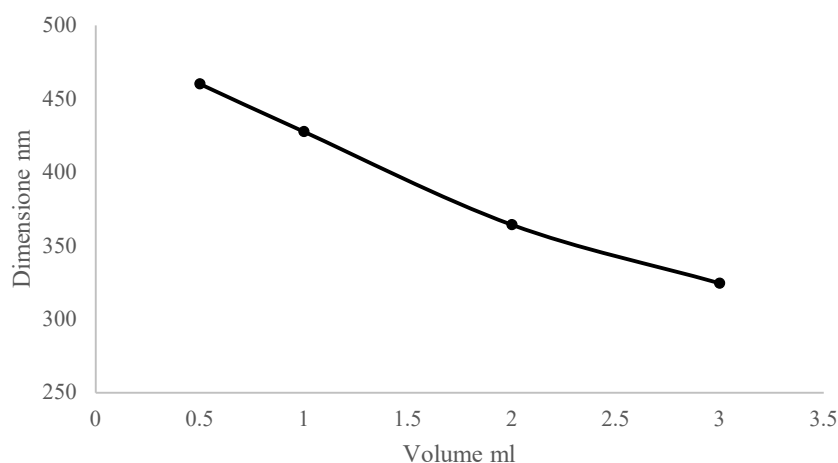


Figura 3.4: Dimensione media delle nanoparticelle di chitosano al variare del volume in reazione.

Dai risultati ottenuti, rappresentati graficamente in Figura 3.4, è possibile notare che operare con volumi di sintesi maggiori porta ad ottenere nanoparticelle di dimensione media minore. A pari concentrazione di chitosano e tempo di miscelazione quindi, in un volume minore le nanoparticelle tendono a crescere più velocemente. In Tabella 3.4 sono riportati i valori dei diametri medi e del potenziale zeta riferito alle nanoparticelle preparate a partire da diversi volumi di sintesi.

Tabella 3.4: Diametro medio e potenziale zeta delle nanoparticelle di chitosano al variare del volume in reazione.

| Volume, ml | Diametro medio, nm | Potenziale zeta, mV |
|------------|--------------------|---------------------|
| 0.5 | 460 | 6.88 |
| 1 | 427 | 7.12 |
| 2 | 364 | 6.55 |
| 3 | 324 | 5.33 |

Dai risultati riportati si nota una leggera diminuzione del valore del potenziale zeta, che tende a diminuire all'aumentare del volume in reazione.

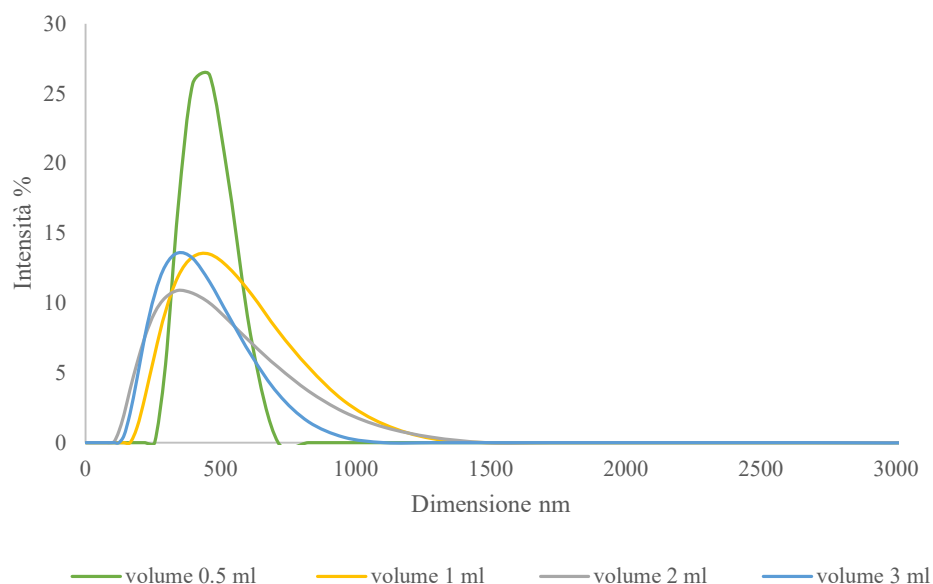


Figura 3.5: rappresentazione curve PSD al variare del volume in reazione.

In Figura 3.5 sono riportate le curve di distribuzione granulometrica dei campioni prodotti. Dal grafico è possibile notare un leggero spostamento dei picchi verso dimensioni minori per i campioni sintetizzati in un volume di 2 e 3 ml.

Per svolgere le successive prove si è deciso di mantenere il volume fino ad ora utilizzato, pari a 2 ml complessivi.

3.1.5 Effetto della concentrazione di chitosano

Per testare l'effetto di una variazione della concentrazione di chitosano sulla dimensione delle nanoparticelle, da una soluzione di partenza, con concentrazione $5 \frac{g}{l}$, tramite diluizioni successive sono state ottenute soluzioni a concentrazioni inferiori pari a: 4, 3, 2.5, 0.5, 0.4, 0.3 o $0.2 \frac{g}{l}$. Seguendo la procedura indicata in precedenza e le condizioni operative identificate sulla base dei risultati precedentemente ottenuti, sono stati prodotti diversi campioni di nanoparticelle. Si riportano, per comodità di lettura, i grafici, rappresentanti le curve di distribuzione granulometrica per diverse concentrazioni di chitosano, separati in Figura 3. 6 e Figura 3. 7.

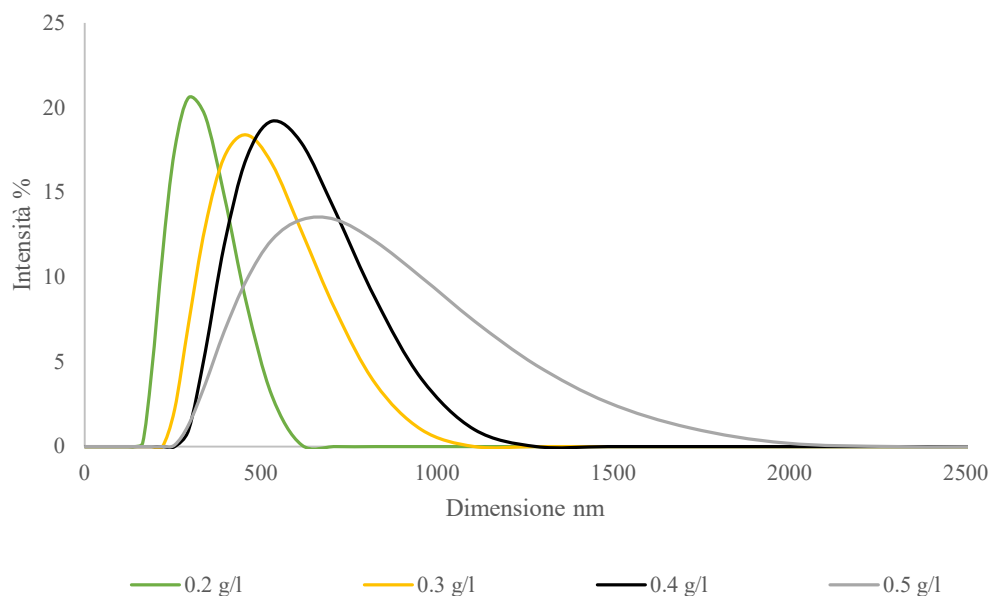


Figura 3. 6: Curve PSD corrispondenti a nanoparticelle prodotte con concentrazioni di chitosano pari a 0.2, 0.3, 0.4 e 0.5 $\frac{g}{l}$.

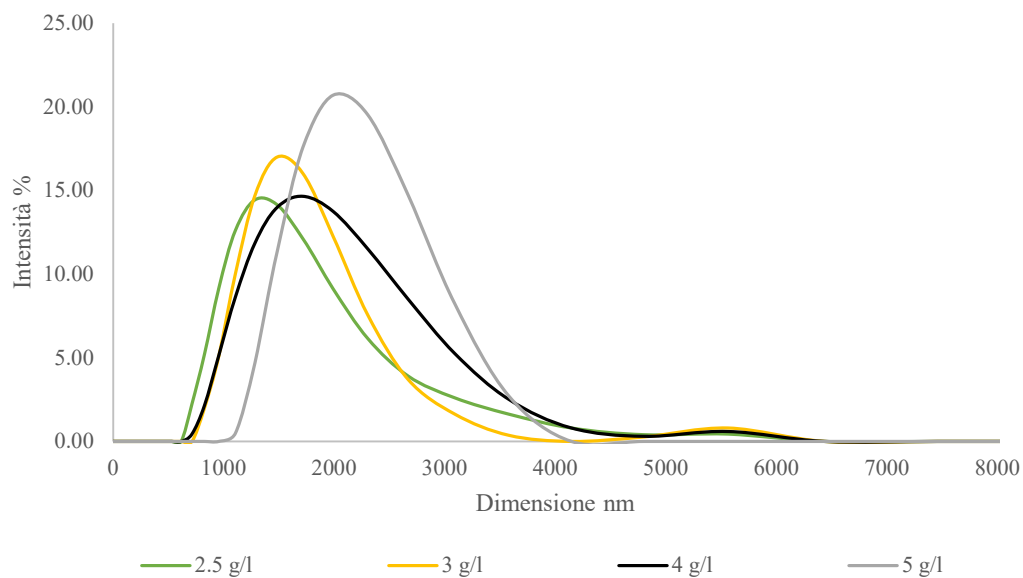


Figura 3. 7: Curve PSD corrispondenti a nanoparticelle prodotte con concentrazioni di chitosano pari a 2.5, 3, 4 e 5 $\frac{g}{l}$.

Osservando le curve prodotte è possibile notare che i picchi rappresentati in Figura 3. 6 sono spostati verso dimensioni minori rispetto a quelli presentati in Figura 3. 7. Una minore concentrazione di chitosano porta dunque alla formazione di nanoparticelle dimensionalmente più piccole. Al crescere della concentrazione è possibile notare che alcune curve PSD presentano più picchi; nel caso in cui, come in Figura 3. 7, i picchi fossero due, il secondo è interpretato come un aggregato di particelle. In riferimento al grafico in esame, quindi, i

campioni sintetizzati con concentrazioni di 2.5, 3 o 4 $\frac{g}{l}$ sono caratterizzati dall'esistenza di particelle con dimensione compresa tra 1000 e 2000 nm che tuttavia tendono ad unirsi formando aggregati di dimensione di circa 5500 nm. Tale fenomeno è spiegabile considerando che, a pari volume di sintesi, più la soluzione di chitosano risulta concentrata più, di conseguenza, la sospensione di nanoparticelle sintetizzate sarà concentrata. Una maggiore densità di nanoparticelle nel volume di sintesi aumenta notevolmente la possibilità che le nanoparticelle stesse, appena formate, urtino tra loro aggregando e diventando più grandi.

In Tabella 3.5, sono riportati i valori della dimensione media per le diverse concentrazioni di chitosano.

Tabella 3.5: Dimensione delle nanoparticelle prodotte al variare della concentrazione di chitosano.

| Concentrazione, $\frac{g}{l}$ | Diametro medio, nm |
|-------------------------------|--------------------|
| 0.2 | 299 |
| 0.3 | 474 |
| 0.4 | 563 |
| 0.5 | 653 |
| 2.5 | 1370 |
| 3 | 1387 |
| 4 | 1556 |
| 5 | 1726 |

I valori riportati in Tabella 3.5 sono rappresentativi delle dimensioni medie delle nanoparticelle presenti in sospensione. È possibile notare che i diametri medi corrispondenti alle nanoparticelle sintetizzate da concentrazioni di 2.5, 3 o 5 $\frac{g}{l}$, a cui corrispondevano curve PSD multimodali, indicano effettivamente la dimensione corrispondente al primo picco.

3.1.6 Effetto della centrifugazione

Al termine della fase di sintesi, eseguita con le condizioni illustrate nei paragrafi precedenti, le nanoparticelle in sospensione devono essere separate dal loro mezzo di sintesi. Tale procedura si rende necessaria non solo per migliorare la stabilità del campione nel tempo, ma anche per aver la possibilità di re-disperdere le nanoparticelle all'interno di un volume desiderato di liquido. Per effettuare l'operazione di centrifugazione devono essere utilizzate delle provette *Eppendorf* dalla capacità massima di 1.5 ml, in grado di alloggiare all'interno del rotore della centrifuga. Operando con le condizioni descritte nei paragrafi precedenti, la sospensione ottenuta al termine della fase di *mixing* nel reattore *Vortex* ha un volume di 2 ml a cui si deve aggiungere un'uguale quantità di acqua per la procedura di *quench*. Il volume di 4 ml ottenuto dunque deve essere suddiviso all'interno di più provette da inserire in centrifuga. A partire dalle indicazioni di letteratura, ciascuna provetta da centrifuga ottenuta è stata centrifugata per 10 minuti alla velocità di 13000 RPM senza però ottenere un'effettiva separazione del solido disperso come corpo di fondo. Tale risultato è attribuibile sia alla bassa concentrazione di chitosano utilizzata nelle condizioni operative sino ad ora adottate, sia alla procedura di *quench* che, diluendo il campione, porta ad un'ulteriore diminuzione della quantità di materia contenuta in ciascun provino da centrifuga.

Per ovviare a tale problema, sono stati aumentati il tempo e la velocità di centrifugazione a quindici minuti e 16000 RPM, non riuscendo tuttavia ad ottenere ancora i risultati desiderati si

è deciso di incrementare gradualmente la concentrazione della soluzione di chitosano usata per produrre le nanoparticelle, mantenendo comunque invariata la procedura di *quench*. In questo modo, le nanoparticelle prodotte a partire da concentrazioni maggiori e con le nuove condizioni di centrifugazione possono essere separate dal mezzo di sintesi. Sono state testate in particolare soluzioni di chitosano a concentrazione di $5 \frac{\text{g}}{\text{l}}$, $2.5 \frac{\text{g}}{\text{l}}$, $1.25 \frac{\text{g}}{\text{l}}$, $0.5 \frac{\text{g}}{\text{l}}$ e $0.3 \frac{\text{g}}{\text{l}}$, ottenute per diluizione successiva della soluzione a concentrazione maggiore.

Mantenendo l'operazione di *quench* tuttavia è possibile, pur assumendo che all'interno della provetta di sintesi la sospensione sia perfettamente miscelata, che all'interno delle singole *Eppendorf*, in cui le nanoparticelle vengono suddivise, non venga equamente distribuita la stessa quantità di materia, producendo così dei campioni eterogenei. Quest'ultimo problema diviene particolarmente importante soprattutto al momento dell'incapsulamento del dsRNA che deve essere contenuto in uguali quantità all'interno dei singoli campioni prodotti.

A causa di ciò, è stato necessario modificare il processo di sintesi descritto in precedenza. Si è scelto di operare la sintesi all'interno della stessa provetta *Eppendorf* da inserire in centrifuga, limitando quindi il volume massimo in reazione ad 1 ml. La procedura di *quench* allo stesso modo, nonostante gli evidenti vantaggi che apporta, non può essere adottata all'interno del protocollo di produzione, sia per evitare ulteriori diluizioni del campione sia per mancanza di un volume utile per eseguirla. Definito il volume di sintesi complessivo ed eliminata la procedura di *quench*, seguendo la procedura indicata in letteratura è possibile studiare l'effetto della centrifugazione sulla dimensione delle nanoparticelle al variare della concentrazione di chitosano (Figura 3.8 e In Figura 3.8 è possibile notare la differenza tra diverse coppie di curve corrispondenti ciascuna a nanoparticelle sintetizzate, a partire dalla medesima concentrazione di chitosano, prima e dopo centrifugazione. In generale, le nanoparticelle in seguito all'operazione di centrifugazione acquisiscono una dimensione maggiore rispetto a quelle appena sintetizzate; tale fenomeno è attribuibile al fatto che durante la separazione in centrifuga i solidi sospesi si compattano formando un corpo di fondo che deve essere successivamente re-disperso. Il corpo di fondo, mostrato Figura 3.9 non è facilmente disgregabile e l'operazione di re-dispersione, effettuata con una micropipetta e con l'ausilio di una piccola spatola da laboratorio non è in grado di restituire nanoparticelle con la stessa dimensione media di quelle pre-centrifuga. In generale, al termine dell'operazione di re-dispersione in provetta è possibile notare la presenza di grandi aggregati particellari che risultano dalle curve PSD come un secondo picco di intensità. In altri casi, solitamente con concentrazioni di chitosano più basse, il risultato della re-dispersione risulta visivamente più omogeneo.

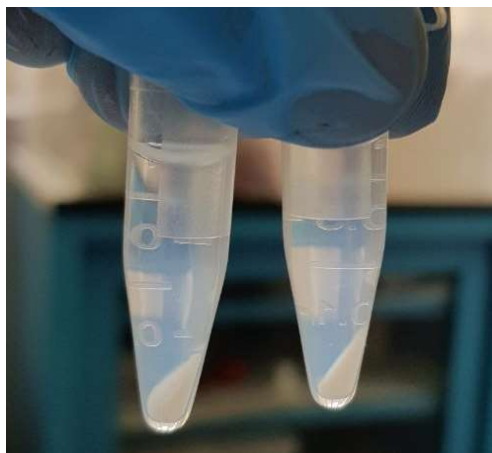


Figura 3.9: Corpo di fondo, ottenuto centrifugando nanoparticelle di chitosano ottenute a partire da una concentrazione di $5 \frac{g}{l}$.

Dai risultati ottenuti e riportati in Figura 3.8 è dunque possibile affermare che l'operazione di centrifugazione, indipendentemente dalla concentrazione di chitosano di partenza, portando inevitabilmente le nanoparticelle a scontrarsi tra loro ad elevata velocità, contribuisce alla formazione di *nanocarriers* di dimensione maggiore.

Tabella 3.6: Valori dei diametri medi e dell'indice di polidispersità, riferiti a nanoparticelle sintetizzate al variare della concentrazione di chitosano, prima e dopo l'operazione di centrifugazione. In Figura 3.8 è possibile notare la differenza tra diverse coppie di curve corrispondenti ciascuna a nanoparticelle sintetizzate, a partire dalla medesima concentrazione di chitosano, prima e dopo centrifugazione. In generale, le nanoparticelle in seguito all'operazione di centrifugazione acquisiscono una dimensione maggiore rispetto a quelle appena sintetizzate; tale fenomeno è attribuibile al fatto che durante la separazione in centrifuga i solidi sospesi si compattano formando un corpo di fondo che deve essere successivamente re-disperso. Il corpo di fondo, mostrato Figura 3.9 non è facilmente disgregabile e l'operazione di re-dispersione, effettuata con una micropipetta e con l'ausilio di una piccola spatola da laboratorio non è in grado di restituire nanoparticelle con la stessa dimensione media di quelle pre-centrifuga. In generale, al termine dell'operazione di re-dispersione in provetta è possibile notare la presenza di grandi aggregati particellari che risultano dalle curve PSD come un secondo picco di intensità. In altri casi, solitamente con concentrazioni di chitosano più basse, il risultato della re-dispersione risulta visivamente più omogeneo.

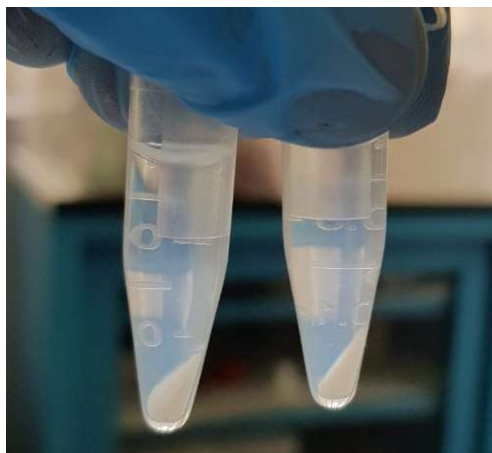


Figura 3.9: Corpo di fondo, ottenuto centrifugando nanoparticelle di chitosano ottenute a partire da una concentrazione di $5 \frac{g}{l}$.

Dai risultati ottenuti e riportati in Figura 3.8 è dunque possibile affermare che l'operazione di centrifugazione, indipendentemente dalla concentrazione di chitosano di partenza, portando inevitabilmente le nanoparticelle a scontrarsi tra loro ad elevata velocità, contribuisce alla formazione di *nanocarriers* di dimensione maggiore.

Tabella 3.6). La scelta della concentrazione più opportuna di chitosano da applicare, è stata successivamente fatta sulla base della quantità di dsRNA richiesta da incapsulare.

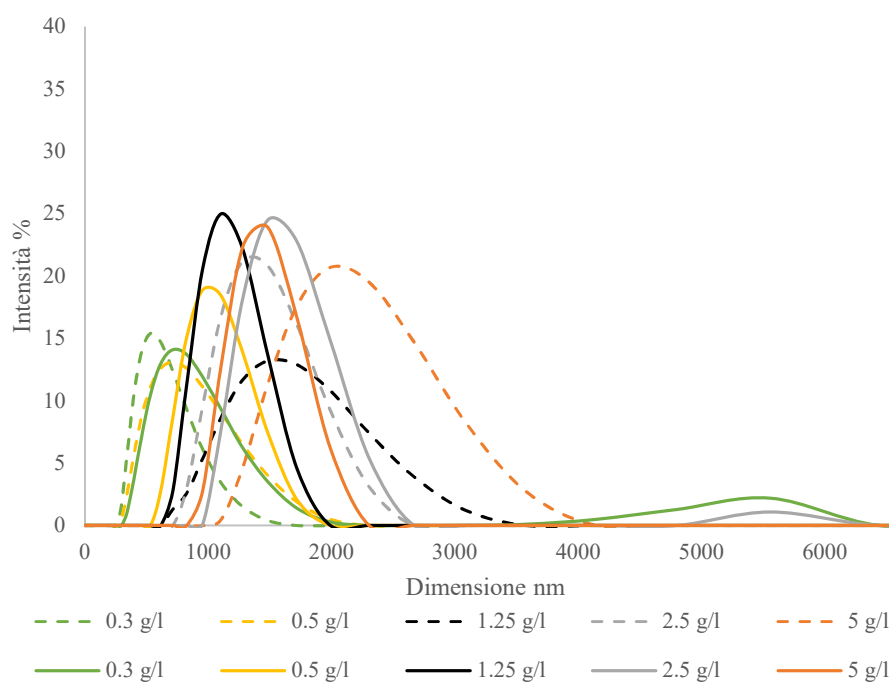


Figura 3.8: Curve PSD riferite a nanoparticelle di chitosano prima dell'operazione di centrifugazione (linea tratteggiata) e dopo l'operazione di centrifugazione (linea continua).

In Figura 3.8 è possibile notare la differenza tra diverse coppie di curve corrispondenti ciascuna a nanoparticelle sintetizzate, a partire dalla medesima concentrazione di chitosano, prima e dopo centrifugazione. In generale, le nanoparticelle in seguito all'operazione di centrifugazione acquisiscono una dimensione maggiore rispetto a quelle appena sintetizzate; tale fenomeno è

attribuibile al fatto che durante la separazione in centrifuga i solidi sospesi si compattano formando un corpo di fondo che deve essere successivamente re-disperso. Il corpo di fondo, mostrato Figura 3. 9 non è facilmente disgregabile e l'operazione di re-dispersione, effettuata con una micropipetta e con l'ausilio di una piccola spatola da laboratorio non è in grado di restituire nanoparticelle con la stessa dimensione media di quelle pre-centrifuga. In generale, al termine dell'operazione di re-dispersione in provetta è possibile notare la presenza di grandi aggregati particellari che risultano dalle curve PSD come un secondo picco di intensità. In altri casi, solitamente con concentrazioni di chitosano più basse, il risultato della re-dispersione risulta visivamente più omogeneo.

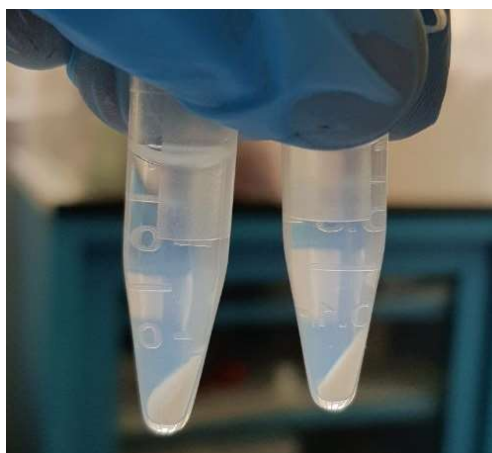


Figura 3. 9: Corpo di fondo, ottenuto centrifugando nanoparticelle di chitosano ottenute a partire da una concentrazione di $5 \frac{g}{l}$.

Dai risultati ottenuti e riportati in Figura 3.8 è dunque possibile affermare che l'operazione di centrifugazione, indipendentemente dalla concentrazione di chitosano di partenza, portando inevitabilmente le nanoparticelle a scontrarsi tra loro ad elevata velocità, contribuisce alla formazione di *nanocarriers* di dimensione maggiore.

Tabella 3.6: Valori dei diametri medi e dell'indice di polidispersità, riferiti a nanoparticelle sintetizzate al variare della concentrazione di chitosano, prima e dopo l'operazione di centrifugazione.

| Concentrazione, $\frac{g}{l}$ | Diametro medio pre-centrifuga, nm | PDI pre-centrifuga | Diametro medio post-centrifuga, nm | PDI post-centrifuga |
|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------|------------------------------------|---------------------|
| 0.3 | 591.7 | 0.137 | 743.3 | 0.281 |
| 0.5 | 691.7 | 0.094 | 952.5 | 0.51 |
| 1.25 | 997.5 | 0.27 | 1192 | 0.286 |
| 2.5 | 1457 | 0.255 | 2122 | 0.464 |
| 5 | 1726 | 0.290 | 2500 | 0.522 |

L'indice di polidispersità, PDI, indicato in Tabella 3.6 è una misura dell'eterogeneità del campione basata sulla dimensione delle nanoparticelle. Valori di polidispersità inferiori a 0.05 indicano che la sospensione contiene piccole particelle monodisperse mentre invece valori al di sopra di 0.5 sono comuni ad aggregati particellari di grandi dimensioni. In generale i campioni analizzati al termine dell'operazione di centrifugazione presentano un indice di polidispersità sempre maggiore di quello riferito ai campioni non centrifugati.

3.2 Sintesi delle nanoparticelle di chitosano-dsRNA

Dopo aver determinato le condizioni generali di sintesi, riassunte in Tabella 3. 7, sulla base della quantità di dsRNA che IPSP-CNR intende utilizzare per effettuare i test *in vivo*, è stato condotto uno studio volto a trovare la concentrazione di chitosano che garantisca la migliore efficacia di incapsulamento. Avendo condotto esperimenti sulla base di due diverse quantità di dsRNA da incapsulare, è possibile dividere lo studio sull'efficacia di incapsulamento in due diverse fasi, corrispondenti ciascuna ad una concentrazione di dsRNA di riferimento.

Tabella 3. 7: Condizioni operative determinate dal precedente studio e utilizzate per la sintesi delle nanoparticelle di chitosano-dsRNA

| | |
|---|----|
| Volume complessivo in reazione, ml | 1 |
| <i>Quench ratio</i> | NO |
| Tempo di miscelazione, s | 30 |
| Tempo di riscaldamento, s | 60 |

3.2.1 Prima fase di studio e risultati conseguiti

IPSP-CNR ha condotto due test: per il primo, ciascuno dei campioni prodotti doveva contenere 10 µg di dsRNA incapsulato all'interno delle nanoparticelle di chitosano. Per determinare il miglior rapporto tra la quantità di chitosano e dsRNA contenuta in ciascun campione, in grado garantire un buon compromesso tra un'elevata efficacia di incapsulamento e una piccola dimensione delle nanoparticelle, sono state condotte numerose prove. A partire dalle informazioni reperite in letteratura (Lichtenberg, et al., 2020), che suggeriscono di utilizzare un rapporto chitosano/dsRNA pari a 5, sono state testate le concentrazioni illustrate in Tabella 3.8.

Tabella 3. 8: Prove di incapsulamento condotte al variare della concentrazione di chitosano.

| Concentrazione di chitosano, $\frac{g}{l}$ | dsRNA, µg | $\frac{chitosano}{dsRNA}$ |
|--|------------------|---|
| 0.2 | 10 | 5 |
| 0.3 | 10 | 7.5 |
| 0.4 | 10 | 10 |
| 0.5 | 10 | 12.5 |

Ciò che è emerso a valle delle prove compiute è che le concentrazioni di 0.2 e 0.3 $\frac{g}{l}$ risultano essere adatte alla produzione di piccole nanoparticelle (Figura 3.10), ma non possono essere utilizzate per gli scopi che questo lavoro di Tesi si propone di ottenere. Esse, infatti, come mostrato in Tabella 3. 9, oltre a non essere in grado di incapsulare nessuna delle quantità di dsRNA che IPSP-CNR ha richiesto, producono nanoparticelle che risultano impossibili da centrifugare nelle condizioni operative in cui si svolgono le prove.

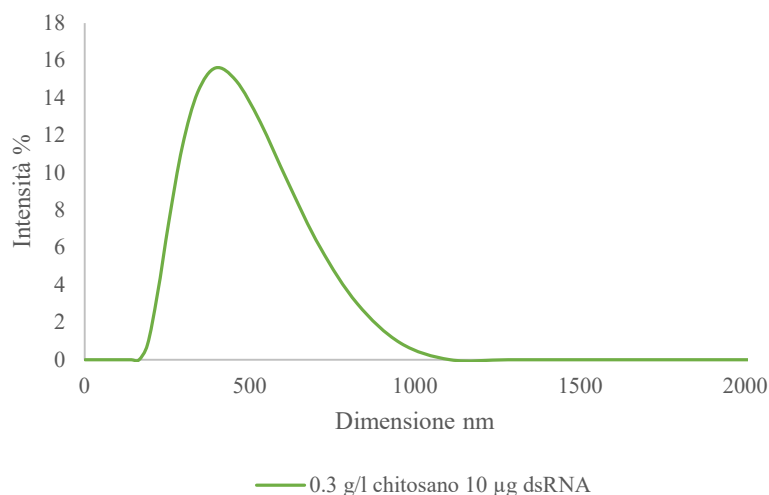


Figura 3.10: Curva PSD riferita a nanoparticelle di chitosano dsRNA sintetizzate a partire da una concentrazione di $0.3 \frac{g}{l}$ di chitosano e $10 \mu g$ di dsRNA.

Come è possibile osservare in Figura 3.10 le nanoparticelle di chitosano e dsRNA prodotte a partire da una concentrazione di $0.3 \frac{g}{l}$ possiedono una piccola dimensione.

Tabella 3. 9: Dimensione media ed efficacia di incapsulamento delle nanoparticelle di chitosano dsRNA sintetizzate a partire da $0.3 \frac{g}{l}$ di chitosano e $10 \mu g$ di dsRNA.

| Dimensione media, nm | Potenziale zeta, mV | Assorbanza a (260 nm) | Concentrazione, $\frac{g}{l}$ | Efficacia di incapsulamento % |
|----------------------|---------------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 395 | 13.2 | 0.1475 | 0.0065 | 48.31% |

In Tabella 3. 9 sono riportate la dimensione media delle nanoparticelle di chitosano dsRNA, il potenziale zeta e l'efficacia di incapsulamento da esse raggiunta. Come è possibile notare il valore della resa di incapsulamento risulta piuttosto inferiore rispetto a quanto ottenuto con concentrazioni di chitosano maggiori.

Concentrazioni di chitosano pari a 0.4 e $0.5 \frac{g}{l}$ consentono di produrre nanoparticelle di dimensioni molto simili e la concentrazione più alta tra le due è stata utilizzata per produrre la prima serie di campioni consegnata a IPSP-CNR (Figura 3.11).

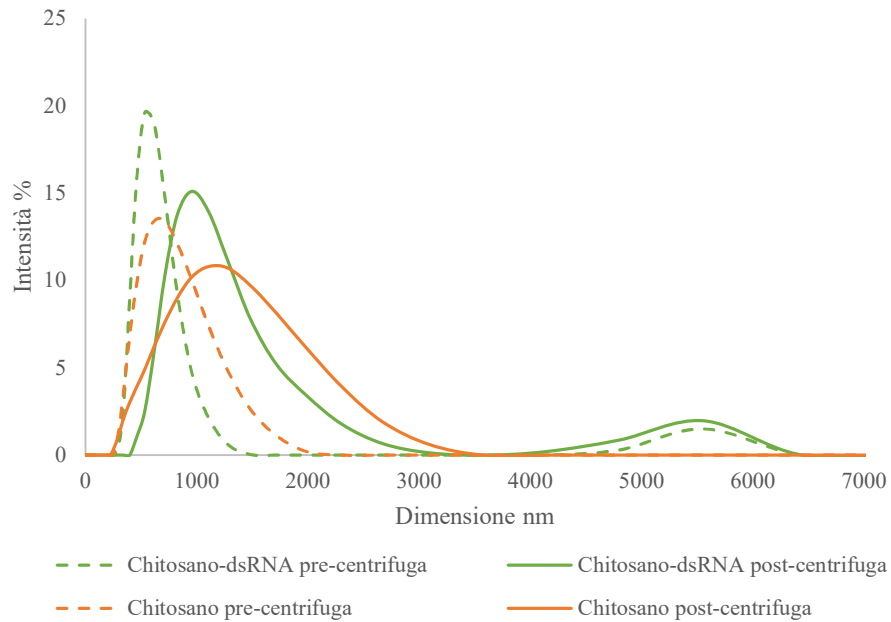


Figura 3.11: Curve PSD riferite a nanoparticelle di solo chitosano e di chitosano-dsRNA prima dell'operazione di centrifugazione (linea tratteggiata) e dopo (linea continua). Le nanoparticelle sono prodotte a partire da una soluzione di chitosano in concentrazione $0.5 \frac{g}{l}$ e incapsulano $10 \mu g$ di dsRNA.

Da una prima analisi di Figura 3.11 è possibile notare che le curve PSD riferite alle nanoparticelle di chitosano-dsRNA presentano più picchi, indici della presenza di aggregati particellari. La molecola di dsRNA, infatti, oltre a rimanere inglobata all'interno del *nanocarrier*, è possibile che si leghi sulla superficie delle nanoparticelle e per effetto di interazioni elettrostatiche tra particelle con una carica superficiale più o meno positiva è possibile che si formino aggregati particellari di dimensioni maggiori. L'aggiunta della molecola di dsRNA, inoltre, porta inevitabilmente alla formazione di nanoparticelle di dimensione media e polidispersità maggiore (Tabella 3. 10). A causa dell'aumento della concentrazione di chitosano e della presenza del dsRNA, al termine dell'operazione di centrifugazione, le nanoparticelle in sospensione precipitano formando un corpo di fondo come mostrato in Figura 3.12.



Figura 3.12: Nanoparticelle di chitosano dsRNA prodotte a partire da $0.5 \frac{g}{l}$ di chitosano e $10 \mu g$ di dsRNA sedimentate al seguito di una centrifugazione condotta a 16000 RPM per la durata di 15 minuti.

Tabella 3. 10: Tabella comparativa delle dimensioni medie, dell'indice di polidispersità e del potenziale zeta delle nanoparticelle prodotte con solo chitosano (Vettore) e di chitosano-dsRNA (Vettore e dsRNA).

| | Dimensione Pre-centrifuga, nm | PDI pre-centrifuga | Potenziale zeta pre-centrifuga, mV | Dimensione post-centrifuga, nm | PDI post-centrifuga | Potenziale zeta post-centrifuga, mV |
|------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---|---------------------------------------|----------------------------|--|
| Solo Vettore | 653 | 0.121 | 10.0 | 952 | 0.450 | 28.5 |
| Vettore e dsRNA | 736 | 0.340 | 8.2 | 1102 | 0.351 | 17.4 |

La presenza della molecola di dsRNA, introducendo cariche negative all'interno dell'ambiente di reazione, porta inevitabilmente ad una diminuzione del potenziale zeta, che rimane comunque positivo. Il principio attivo introdotto si distribuisce infatti in parte all'interno delle nanoparticelle ed in parte si lega sulla loro superficie esterna; ciò che rimane adeso sulla superficie esterna contribuisce alla diminuzione del potenziale zeta delle nanoparticelle. L'operazione di centrifugazione, assieme al mezzo di sintesi, allontana dalle nanoparticelle anche ioni disciolti e molecole di dsRNA per questo il potenziale zeta delle specie re-disperse risulta maggiore.

È stata infine valutata la capacità di incapsulamento della molecola di dsRNA. Dopo aver sintetizzato il campione e averlo centrifugato, il surnatante è stato allontanato dalle nanoparticelle e analizzato per mezzo di uno spettrofotometro. Per mezzo di tale strumento è possibile ottenere il valore di assorbanza corrispondente alla lunghezza d'onda di 260 nm e mediante la (2.6) è possibile valutare la concentrazione del dsRNA nel campione. A partire dal valore di concentrazione, noto il volume di surnatante analizzato, è stata determinata la quantità di dsRNA non incapsulata e mediante la (2.7) è stata determinata l'efficacia di incapsulamento.

Tabella 3. 11: Risultati delle analisi di efficacia di incapsulamento per cinque campioni di nanoparticelle di chitosano-dsRNA. Le nanoparticelle sono prodotte a partire da una soluzione di chitosano in concentrazione $0.5 \frac{g}{l}$ e incapsulano $10 \mu g$ di dsRNA.

| Campioni | Assorbanza (260 nm) | Concentrazione $\frac{g}{l}$ | Efficacia di incapsulamento % |
|-----------------|----------------------------|--|--------------------------------------|
| 1 | 0,0172 | 7,63E-04 | 93,89% |
| 2 | 0,0155 | 6,88E-04 | 94,50% |
| 3 | 0,0151 | 6,70E-04 | 94,64% |
| 4 | 0,0150 | 6,66E-04 | 94,68% |
| 5 | 0,0181 | 8,03E-04 | 93,58% |

Dai risultati ottenuti e mostrati in Tabella 3. 11 è possibile confermare che con il rapporto chitosano su dsRNA scelto si ottiene un'elevata efficacia di incapsulamento. Noto che in media il 94% del dsRNA utilizzato viene efficacemente intrappolato, per ottenere l'esatta quantità richiesta all'interno delle nanoparticelle, si è scelto di inserire nell'ambiente di reazione non $10 \mu g$ di dsRNA, ma $12 \mu g$.

Determinate le migliori condizioni di sintesi, sono stati prodotti e consegnati a IPSP-CNR i seguenti campioni:

- Cinque campioni di nanoparticelle di solo chitosano;
- Cinque campioni di nanoparticelle di chitosano-dsRNA contenenti ciascuno 10 µg di dsRNA.

I campioni sono dunque stati testati su piante di *Nicotiana benthamiana* e i loro effetti sono stati confrontati con quelli di cinque campioni contenenti dsRNA libero. Dai risultati ottenuti, 10 µg di dsRNA non si sono dimostrati sufficienti per garantire una buona protezione contro l'infezione da TSWV, né somministrati come liberi, né tantomeno incapsulati nel *carrier* di chitosano. Le nanoparticelle di chitosano proteggono le molecole di dsRNA e garantiscono il rilascio del principio attivo che tuttavia, nelle condizioni di sintesi adottate, risulta non sufficiente a garantire una risposta della pianta contro il TSWV.

3.2.2 Seconda fase di studio

A causa dei risultati ottenuti dal precedente studio *in vivo*, per effettuare le prove successive IPSP-CNR ha richiesto di produrre dei nuovi campioni che rispondessero alle seguenti caratteristiche:

- Cinque campioni contenenti ciascuno 300 µg di dsRNA incapsulato in nanoparticelle;
- Cinque campioni contenenti ciascuno complessivamente 300 µg di dsRNA, ma di cui 250 µg incapsulati in nanoparticelle di chitosano e 50 µg liberi;
- Cinque campioni di nanoparticelle di solo chitosano.

Somministrando le molecole di dsRNA libere è possibile testare l'efficacia della maggiore quantità di dsRNA utilizzata, mentre le rimanenti due prove permettono di testare l'effetto che due diverse cinetiche di rilascio hanno sulla protezione delle piante.

I primi tentativi svolti per incapsulare l'intera quantità di dsRNA richiesta non sono risultati soddisfacenti. Per utilizzare lo stesso valore di rapporto chitosano/dsRNA delle prove precedenti, è stata utilizzata una concentrazione di chitosano molto elevata e, come è possibile osservare in **Figura 3.13**: Formazione di un aggregato di chitosano in seguito all'unione delle due soluzioni reagenti. Figura 3.13, si ha formazione di aggregati di dimensione molto grande visibili ad occhio nudo.

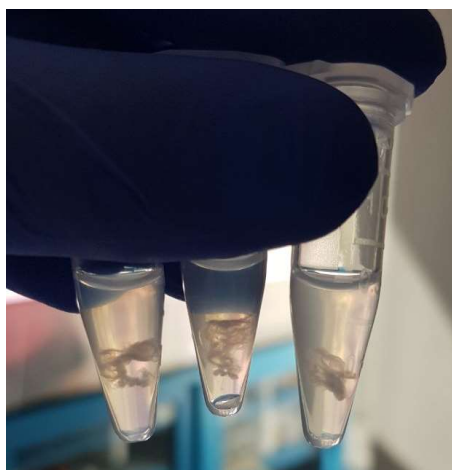


Figura 3.13: Formazione di un aggregato di chitosano in seguito all'unione delle due soluzioni reagenti.

In seguito a questo risultato, al fine di mantenere sempre un rapporto di chitosano su dsRNA elevato, si è deciso di dimezzare la quantità di dsRNA da incapsulare per singola provetta. Con questa modifica sono state condotte due prove, utilizzando due diverse concentrazioni di chitosano, le cui condizioni operative sono riassunte in Tabella 3. 12:

Tabella 3. 12: Prove di incapsulamento condotte al variare della concentrazione di chitosano.

| concentrazione $\frac{g}{l}$ | dsRNA μg | $\frac{\text{chitosano}}{\text{dsRNA}}$ |
|------------------------------|---------------|---|
| 1.25 | 150 | 4.1 |
| 5 | 150 | 16.7 |

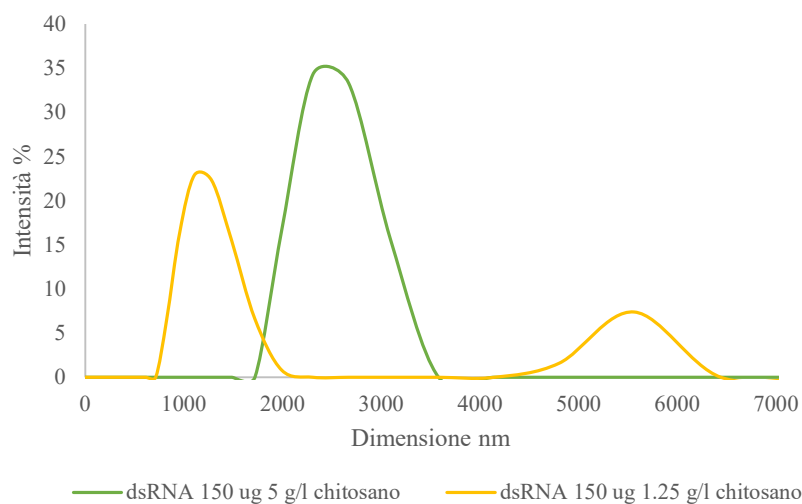


Figura 3.14: Curve PSD riferite ai campioni di chitosano dsRNA prodotti a partire da due diverse concentrazioni di chitosano pari a $1.25 \frac{g}{l}$ e $5 \frac{g}{l}$ e $150 \mu g$ di dsRNA.

In Figura 3.14 è possibile osservare la dimensione delle nanoparticelle di chitosano dsRNA e in particolare ad una concentrazione inferiore di chitosano si nota che corrispondono nanoparticelle più piccole ma con una maggiore tendenza ad aggregare tra loro come mostrato dal secondo picco in figura. In Tabella 3. 13 sono riportate le misure del potenziale zeta per gli stessi campioni dalle quali non si evincono particolari differenze.

Tabella 3. 13: valori del potenziale zeta, mV, riferiti a nanoparticelle di chitosano dsRNA prodotte a partire da due diverse concentrazioni di chitosano pari a $1.25 \frac{g}{l}$ e $5 \frac{g}{l}$ e da $150 \mu g$ di dsRNA.

| | potenziale zeta, mV |
|--|----------------------------|
| $1.25 \frac{g}{l}$ chitosano | 15.6 |
| $5 \frac{g}{l}$ chitosano | 15.4 |

I risultati di efficienza di incapsulamento riferiti alle prove di incapsulamento condotte sono riportati rispettivamente in Tabella 3. 14 e Tabella 3. 15.

Tabella 3. 14: Risultati delle analisi di efficacia di incapsulamento per cinque campioni di nanoparticelle sintetizzati a partire da una concentrazione di $1.25 \frac{g}{l}$ di chitosano.

| Campioni | Assorbanza (260 nm) | Concentrazione $\frac{g}{l}$ | Efficacia di incapsulamento % |
|-----------------|----------------------------|--|--------------------------------------|
| 1 | 0.832 | 0.037 | 75.38% |
| 2 | 0.946 | 0.042 | 72.02% |
| 3 | 0.778 | 0.034 | 77.00% |
| 4 | 0.782 | 0.035 | 76.86% |
| 5 | 0.940 | 0.042 | 72.19% |

Tabella 3. 15: Risultati delle analisi di efficacia di incapsulamento per cinque campioni di nanoparticelle sintetizzati a partire da una concentrazione di $5 \frac{g}{l}$ di chitosano.

| Campioni | Assorbanza (260 nm) | Concentrazione $\frac{g}{l}$ | Efficacia di incapsulamento % |
|-----------------|----------------------------|--|--------------------------------------|
| 1 | 0.210 | 0.009 | 93.78% |
| 2 | 0.300 | 0.013 | 91.11% |
| 3 | 0.337 | 0.015 | 90.02% |
| 4 | 0.264 | 0.012 | 92.18% |
| 5 | 0.309 | 0.014 | 90.87% |

Alla luce dei risultati riportati è stato scelto di mantenere per la sintesi dei campioni la concentrazione di chitosano pari a $5 \frac{g}{l}$, non solo per la maggiore efficacia di incapsulamento che essa comporta, ma anche per la facilità con cui le nanoparticelle si re-disperdono al termine dell'operazione di centrifugazione.

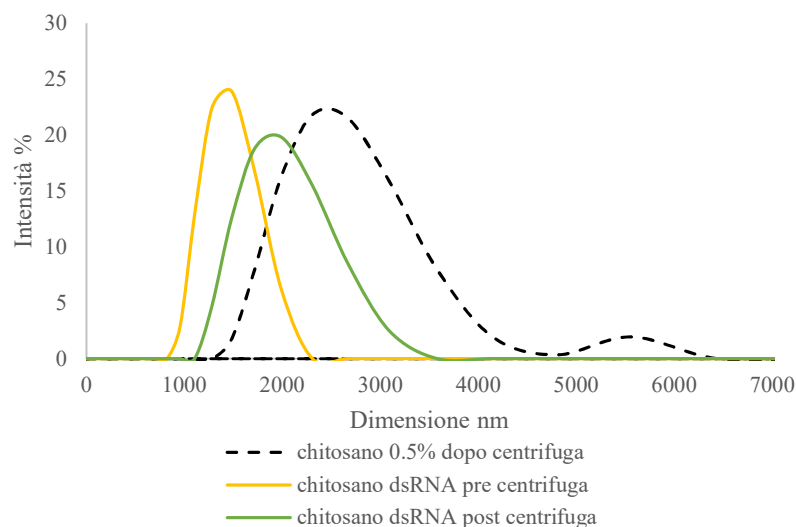


Figura 3.15: Curve PSD riferite a nanoparticelle di chitosano-dsRNA prima e dopo l’operazione di centrifugazione (linee continue). Per confronto si riporta la curva PSD riferita alle nanoparticelle di solo chitosano dopo centrifuga (linea tratteggiata). Le nanoparticelle sono prodotte a partire da una soluzione di chitosano in concentrazione 0.5 % e incapsulano 150 μg di dsRNA.

Tabella 3.16: Dimensione, potenziale zeta e PDI delle nanoparticelle di chitosano e di chitosano-dsRNA prima e dopo l’operazione di centrifugazione. Le nanoparticelle sono prodotte a partire da una soluzione di chitosano in concentrazione 5 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ e incapsulano 150 μg di dsRNA.

| | Dimensione Pre-centrifuga, nm | PDI pre-centrifuga | Potenziale zeta pre-centrifuga, mV | Dimensione post-centrifuga, nm | PDI post-centrifuga | Potenziale zeta post-centrifuga, mV |
|------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---|---------------------------------------|----------------------------|--|
| Solo Vettore | 1013 | 0.127 | 12.5 | 2924 | 0.228 | 20.2 |
| Vettore e dsRNA | 1726 | 0.230 | 13.1 | 2500 | 0.588 | 15.6 |

Dai risultati presentati in Tabella 3.16, nonostante la presenza della molecola di dsRNA incapsulata e l’elevata concentrazione di chitosano, è possibile notare che le dimensioni delle nanoparticelle rimangono comunque contenute. A causa della maggiore quantità di dsRNA che è stata incapsulata in queste prove, le interazioni elettrostatiche tra chitosano e principio attivo diventano più intense e portano ad una riduzione della dimensione delle nanoparticelle. I valori del potenziale zeta al momento della sintesi risultano essere molto simili, viceversa in seguito alla procedura di centrifugazione è possibile notare un maggiore divario tra le due misure. L’indice di polidispersità incrementa leggermente nel caso di incapsulamento del dsRNA e dopo il l’operazione di separazione.

3.2.3 Effetto del Poloxamer

A partire dai risultati precedentemente ottenuti, al fine di diminuire la dimensione delle nanoparticelle e ulteriormente migliorare l’efficacia di incapsulamento della molecola di dsRNA,

si è pensato di aggiungere una piccola quantità di poloxamer all'ambiente di reazione. In particolare, con l'obiettivo di incapsulare sempre 150 µg di dsRNA e utilizzando una concentrazione di chitosano pari a $5 \frac{g}{l}$, a partire dalle indicazioni di letteratura (Ponnuraj, et al., 2015) sono state condotte tre prove con tre diverse concentrazioni di poloxamer, $1.25 \frac{g}{l}$, $2.5 \frac{g}{l}$ e $5 \frac{g}{l}$, per valutare l'effetto che tale tensioattivo ha sulla formazione delle nanoparticelle.

Le prove sopracitate sono state condotte prima sul solo vettore di chitosano e solo successivamente è stato studiato l'effetto sull'incapsulamento del dsRNA. Si riportano dunque in Figura 3.16 le curve PSD riferite alle nanoparticelle sintetizzate e analizzate prima dell'operazione di centrifugazione e in Figura 3.17 le curve PSD riferite alle nanoparticelle dopo l'operazione di centrifugazione.

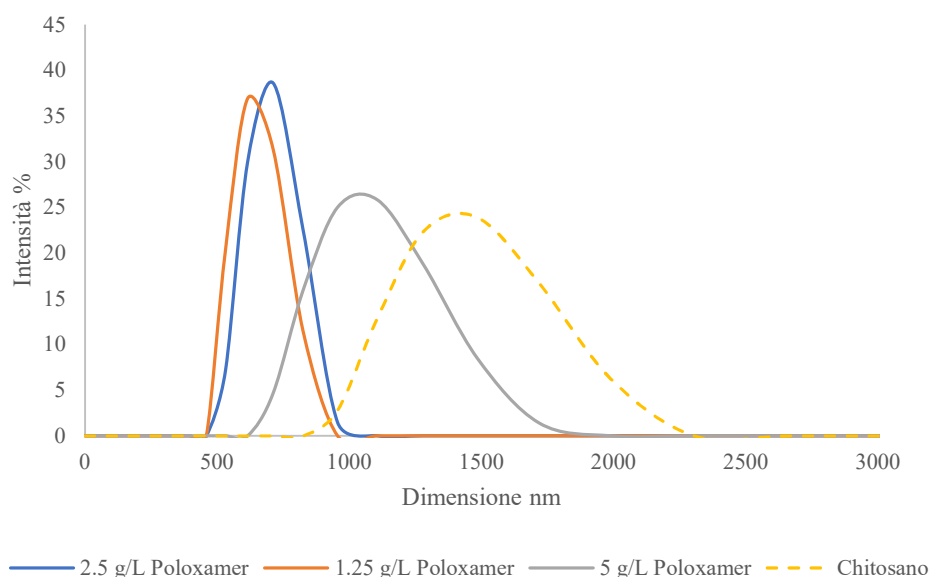


Figura 3.16: Curve PSD pre-centrifuga riferite a nanoparticelle di chitosano sintetizzate a partire da una concentrazione di chitosano di $5 \frac{g}{l}$ con l'aggiunta di 1.25 , 2.5 e $5 \frac{g}{l}$ di Poloxamer.

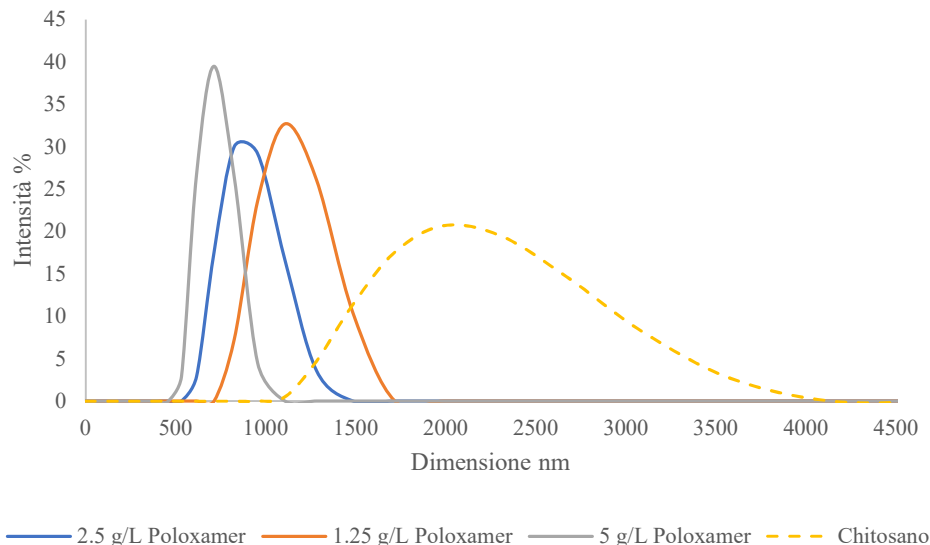


Figura 3.17: Curve PSD post-centrifuga riferite a nanoparticelle sintetizzate a partire da una concentrazione di chitosano di $5 \frac{g}{l}$ con l'aggiunta di 1.25, 2.5 e $5 \frac{g}{l}$ di Poloxamer.

Osservando le curve, è possibile notare come le nanoparticelle di solo chitosano, sintetizzate senza poloxamer, possiedano picchi di intensità spostati verso dimensioni maggiori. Inoltre, dai risultati riportati in Tabella 3.17, si evince che l'aggiunta di una piccola quantità di poloxamer consente di ottenere nanoparticelle molto più piccole sia prima del processo di centrifugazione che dopo. In particolare, tra le prove effettuate, la concentrazione di poloxamer pari a $1.25 \frac{g}{l}$ consente di andare a sintetizzare nanoparticelle di dimensione inferiore.

Tabella 3.17: Dimensione e potenziale zeta delle nanoparticelle di chitosano al variare della concentrazione di Poloxamer.

| Concentrazione Poloxamer | Dimensione media pre-centrifuga, nm | Potenziale zeta pre-centrifuga, mV | Dimensione media post-centrifuga, nm |
|--------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 1726 | 12.5 | 2500 |
| 1.25 | 771 | 17.8 | 1115 |
| 2.5 | 810 | 16.1 | 990.7 |
| 5 | 967 | 15.3 | 1103 |

I valori del potenziale zeta, indicati in Tabella 3.17, mostrano un incremento della carica positiva delle nanoparticelle sintetizzate con aggiunta di poloxamer. In particolare, a concentrazioni minori di poloxamer corrisponde un maggiore aumento del potenziale zeta, indice di una minore tendenza delle nanoparticelle ad aggregare tra loro. Alla luce di questi risultati è stato scelto di aggiungere alla soluzione di chitosano una concentrazione pari a $1.25 \frac{g}{l}$ di poloxamer.

Determinata dunque la concentrazione di tensioattivo più adatta alla produzione delle nanoparticelle è stato studiato l'effetto che quest'aggiunta apporta sul processo di sintesi e sull'efficacia di incapsulamento del dsRNA. Utilizzando quindi una concentrazione di chitosano pari a $5 \frac{g}{l}$ e una concentrazione di poloxamer pari a $1.25 \frac{g}{l}$ sono stati incapsulati 150

μg di dsRNA. Il risultato è stato confrontato con la sintesi dettagliata nel precedente capitolo come mostra la Figura 3.18:.

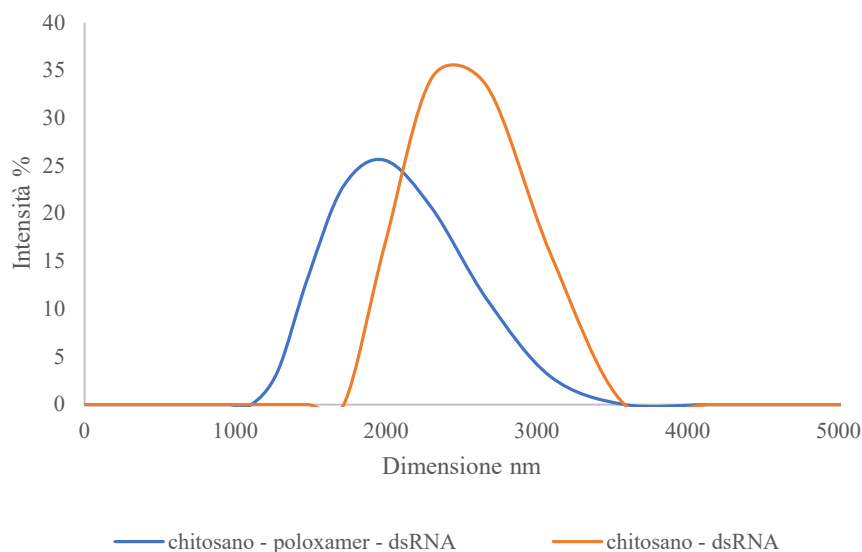


Figura 3.18: Confronto tra le curve PSD post-centrifuga delle nanoparticelle di chitosano-dsRNA prodotte con e senza l'aggiunta di poloxamer. Le nanoparticelle sono prodotte a partire da una soluzione di chitosano in concentrazione $5 \frac{\text{g}}{\text{l}}$ con aggiunta di $1.25 \frac{\text{g}}{\text{l}}$ di poloxamer e $150 \mu\text{g}$ di dsRNA.

Osservando le curve PSD riportate in Figura 3.18 è possibile notare come presenza del poloxamer, anche dopo l'operazione di centrifugazione, consenta di ottenere nanoparticelle di dimensioni decisamente inferiori rispetto a quelle sintetizzate a partire dal solo chitosano. La presenza del tensioattivo, inoltre, facilita l'operazione di re-dispersione consentendo di ottenere una sospensione più omogenea. Tale risultato è visivamente mostrato in Figura 3.19 e in Figura 3.20.



Figura 3.19: Sospensione di nanoparticelle di chitosano-dsRNA con aggiunta di $1.25 \frac{g}{l}$ di poloxamer dopo centrifugazione e re-dispersione.



Figura 3.20: Sospensione di nanoparticelle di chitosano-dsRNA senza poloxamer dopo centrifugazione e re-dispersione.

Da Figura 3.19 e Figura 3.20 è possibile notare come la sospensione di nanoparticelle prodotte con aggiunta di poloxamer risulti visivamente più omogenea, a differenza della sospensione prodotta con solo chitosano all'interno della quale sono visivamente osservabili aggregati particellari di grandi dimensioni.

Per quanto riguarda la capacità di incapsulamento, essa è stata studiata, a partire da una soluzione di chitosano $5 \frac{g}{l}$, al variare della concentrazione di poloxamer e i risultati ottenuti sono riportati in Tabella 3.18.

Tabella 3.18: Risultati delle analisi di efficacia di incapsulamento per tre campioni di nanoparticelle sintetizzati a partire da una concentrazione di $5 \frac{g}{l}$ di chitosano, $150 \mu g$ di dsRNA e al variare della concentrazione di poloxamer. Si riporta per confronto anche i risultati ottenuti per un campione sintetizzato senza aggiunta di tensioattivo.

| Campioni | Assorbanza (260 nm) | Concentrazione $\frac{g}{l}$ | Efficacia di incapsulamento % |
|------------------------------------|---------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Chitosano dsRNA | 0.208 | 0.009 | 93.84% |
| Poloxamer $1.25 \frac{g}{l}$ dsRNA | 0.101 | 0.004 | 97.01% |
| Poloxamer $2.5 \frac{g}{l}$ dsRNA | 1.881 | 0.083 | 44.37% |
| Poloxamer $5 \frac{g}{l}$ dsRNA | 2.161 | 0.096 | 36.08% |

Dai risultati ottenuti è possibile osservare che l'aggiunta di poloxamer in concentrazione $1.25 \frac{\text{g}}{\text{l}}$ porta ad un notevole incremento della capacità di incapsulamento, viceversa si assiste ad un notevole peggioramento nel caso in cui la concentrazione di tensioattivo aumenti a 2.5 o $5 \frac{\text{g}}{\text{l}}$.

L'aggiunta del poloxamer, dunque, non solo migliora la dimensione delle nanoparticelle rendendole più piccole e quindi consentendo di esporre una maggiore superficie, ma migliora anche l'efficacia di incapsulamento portandola dal 93 al 97%, a meno di non incrementare troppo la concentrazione di tensioattivo.

4 Stabilità nel tempo delle nanoparticelle di chitosano-dsRNA

A partire dalle ultime condizioni di sintesi determinate, riassunte in **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**, sono state condotte alcune prove per valutare la stabilità nel tempo delle seguenti tipologie di nanoparticelle:

- Nanoparticelle di chitosano;
- Nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA
- Nanoparticelle di chitosano-poloxamer
- Nanoparticelle di chitosano-poloxamer veicolanti dsRNA

In particolare, per ciascuna tipologia di prodotto sono stati sintetizzati tre campioni, ciascuno dei quali è stato conservato in una diversa condizione ambientale: a temperatura ambiente, in frigorifero (4°C) e in congelatore (-20°C). Per ciascun campione sintetizzato, sono dunque state valutate le seguenti caratteristiche:

- Ad intervalli di 24 ore per 3 giorni, è stata valutata la modifica della dimensione media delle nanoparticelle re-disperse dopo centrifugazione;
- Per i campioni contenenti dsRNA, è stata valutata la quantità di dsRNA rilasciata a distanza di 24 ore dalla sintesi del campione.

Tabella 4.1: Condizioni di sintesi determinate per la produzione di nanoparticelle di chitosano e chitosano veicolanti dsRNA.

| Volume di sintesi, ml | Tempo di mixing, s | Tempo di riscaldamento, s | Concentrazione di chitosano, $\frac{g}{l}$ | Concentrazione di poloxamer, $\frac{g}{l}$ | dsRNA, μg |
|-----------------------|--------------------|---------------------------|--|--|----------------|
| 1 | 30 | 60 | 5 | 1.25 | 150 |

4.1 Nanoparticelle di chitosano e chitosano-poloxamer

4.1.1 Conservazione a temperatura ambiente

Dopo aver prodotto e centrifugato le nanoparticelle di chitosano seguendo le indicazioni riassunte in **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**, il corpo di fondo ottenuto è stato re-disperso in 1 ml di acqua e sono state analizzate le dimensioni delle particelle ottenute mediante DLS.

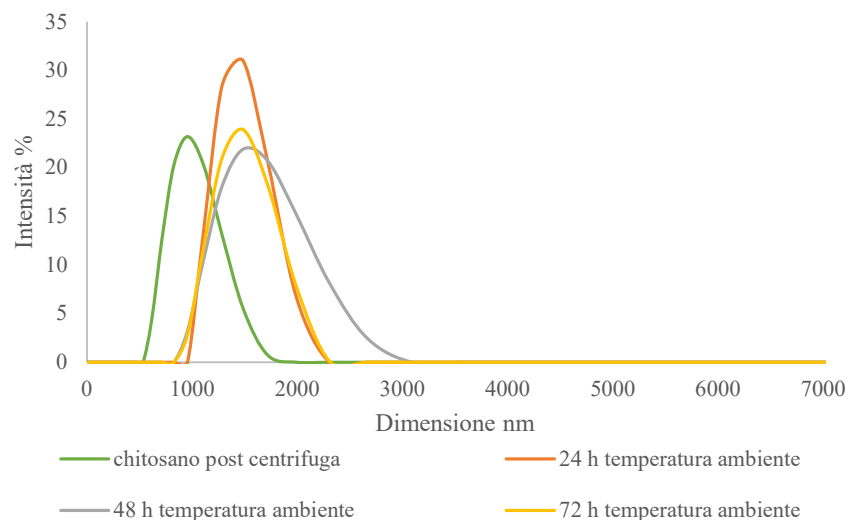


Figura 4.1: Curve PSD acquisite ad intervalli di 24 ore e riferite a nanoparticelle di chitosano conservate a temperatura ambiente.

Le misurazioni sono state ripetute a distanza di 24 ore per tre giorni e i risultati ottenuti sono presentati in Figura 4.1. Le curve PSD raccolte mostrano l'evoluzione della dimensione media del campione di nanoparticelle di chitosano conservato a temperatura ambiente. Ciò che è possibile notare, già dopo 72 ore di osservazione, è che la dimensione dei *nanocarriers* in sospensione tende a stabilizzarsi.

Per confronto le stesse misurazioni sono state fatte su un secondo campione sintetizzato però a partire da una soluzione di chitosano-poloxamer ottenendo in questo caso i risultati presentati in Figura 4.2.

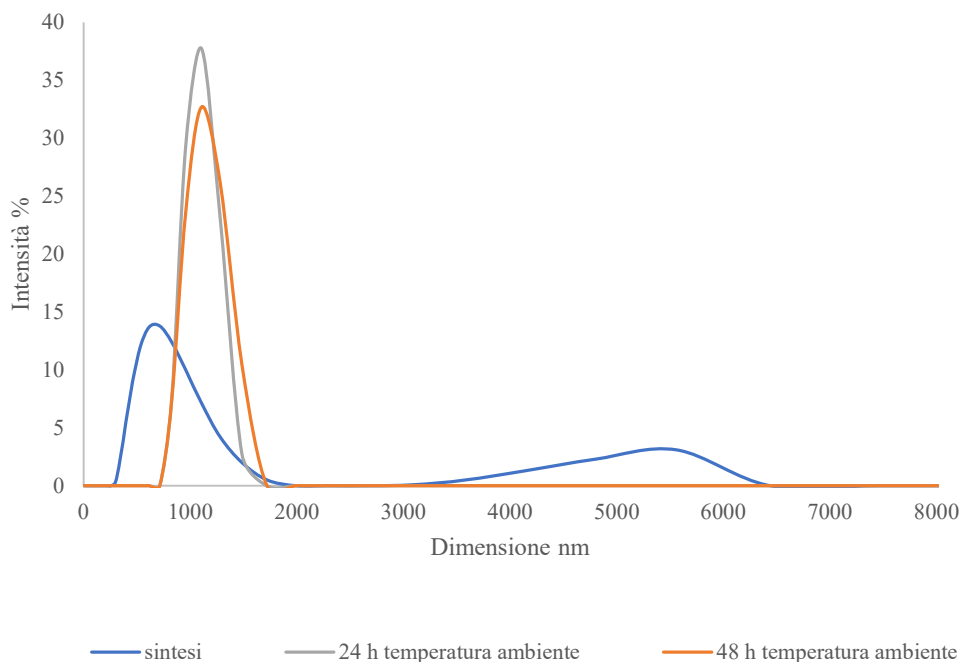


Figura 4.2: Curve PSD acquisite ad intervalli di 24 ore e riferite a nanoparticelle di chitosano-poloxamer conservate a temperatura ambiente.

Anche in questo caso le curve PSD forniscono una misura della variazione delle dimensioni delle nanoparticelle. Ciò che è possibile notare in questo secondo caso è che già dopo 48 ore le dimensioni paiono essersi stabilizzate.

Dall'osservazione dei risultati presentati pare, dunque, che la presenza del poloxamer influenzi la stabilità nel tempo delle nanoparticelle contribuendo a contenere in maniera maggiore l'aumento della loro dimensione.

4.1.2 Conservazione in frigorifero

Due campioni di nanoparticelle, con e senza poloxamer, sono stati prodotti come indicato nel paragrafo precedente e conservati in frigorifero alla temperatura di 4°C. I risultati ottenuti in tal caso sono mostrati in Figura 4.3 e in Figura 4.4.

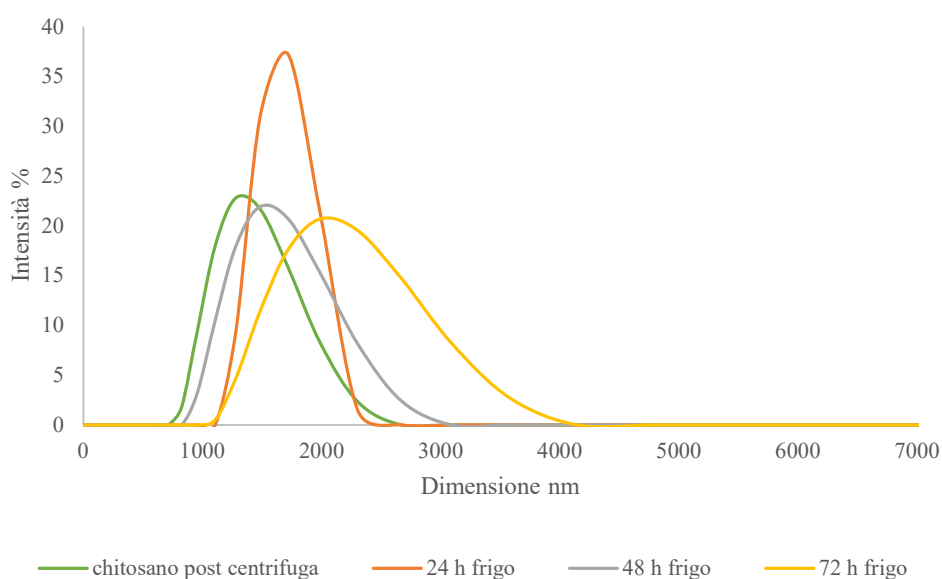


Figura 4.3: Curve PSD acquisite ad intervalli di 24 ore e riferite a nanoparticelle di chitosano conservate in frigorifero alla temperatura di 4°C.

Dall'osservazione delle curve PSD riportate per le nanoparticelle di solo chitosano è possibile notare che i picchi di intensità oscillano attorno ad una dimensione media senza mai scostarsi troppo da essa. Tale effetto è legato alla temperatura dell'ambiente di conservazione: la bassa temperatura, infatti, rallenta il movimento delle nanoparticelle in sospensione ostacolando la loro aggregazione. Lo stesso effetto è riscontrabile, in modo ancor più marcato, per le nanoparticelle di chitosano-poloxamer come si può vedere da Figura 4.4.

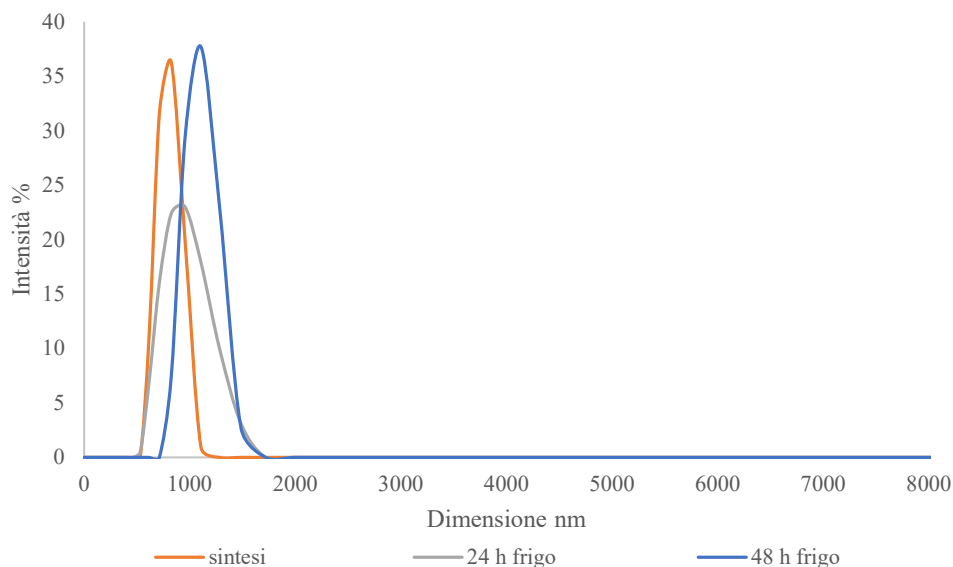


Figura 4.4: Curve PSD acquisite ad intervalli di 24 ore e riferite a nanoparticelle di chitosano-poloxamer conservate in frigorifero alla temperatura di 4°C.

4.1.3 Conservazione in congelatore

Le nanoparticelle prodotte, centrifugate e re-disperse in acqua, prima di essere congelate sono state diluite in una soluzione di saccarosio al 10% (w/v). Tale passaggio risulta fondamentale per consentire la corretta conservazione delle nanoparticelle; durante il processo di congelamento, infatti, la formazione di cristalli di ghiaccio riduce gradualmente la quantità di acqua libera presente nel flacone portando alla concentrazione della sospensione di nanoparticelle che tendono dunque ad aggregare e a rompersi. Il saccarosio è un eccipiente, crioprotettivo, comunemente utilizzato per proteggere molecole di principio attivo dagli effetti del congelamento e viene applicato anche in questo caso per la protezione dei *nanocarriers*. In Tabella 4.2 sono riportati i valori del diametro medio delle nanoparticelle di chitosano prima e dopo l'operazione di scongelamento.

Tabella 4.2: Dimensione media delle nanoparticelle di chitosano prima e dopo il congelamento e lo scongelamento.

| | Pre-congelamento | Post-scongelamento |
|-----------------------|------------------|--------------------|
| Dimensione, nm | 1169 | 2032 |

Come è possibile notare, nonostante l'utilizzo del saccarosio, le nanoparticelle tendono comunque ad aggregare e ad assumere una dimensione maggiore dopo lo scongelamento. Tale variazione è osservabile anche in Figura 4.5 dalle curve di distribuzione granulometrica.

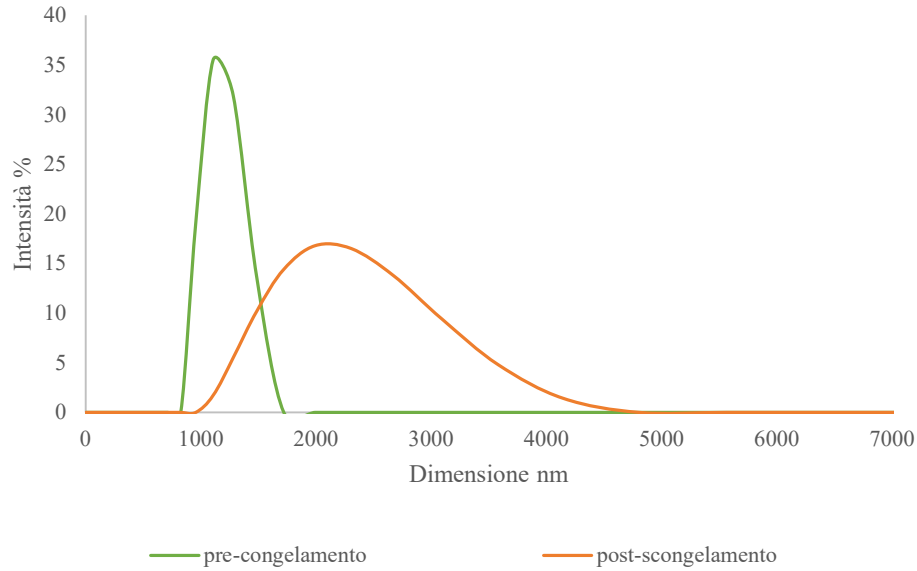


Figura 4.5: Curve PSD riferite a nanoparticelle di chitosano prima e dopo l’operazione di congelamento, scongelamento.

Per confronto, la stessa prova è stata effettuata anche su nanoparticelle di chitosano sintetizzate con l’aggiunta di $1.25 \frac{g}{l}$ di poloxamer. L’effetto prodotto dall’aggiunta del tensioattivo è mostrato dai risultati raccolti in Tabella 4.3 e in Figura 4.6.

Tabella 4.3: Dimensione media delle nanoparticelle di chitosano-poloxamer prima e dopo il congelamento e lo scongelamento.

| | Pre-congelamento | Post scongelamento |
|-----------------------|-------------------------|---------------------------|
| Dimensione, nm | 1668 | 1800 |

Dai risultati presentati in Tabella 4.3 è possibile notare che il poloxamer ha influenzato la stabilità delle nanoparticelle anche durante il processo di congelamento. Si osserva infatti un aumento della dimensione delle nanoparticelle che risulta tuttavia molto più contenuto rispetto a quello riscontrato nel caso precedente. Tale effetto risulta ancor più evidente in Figura 4.6.

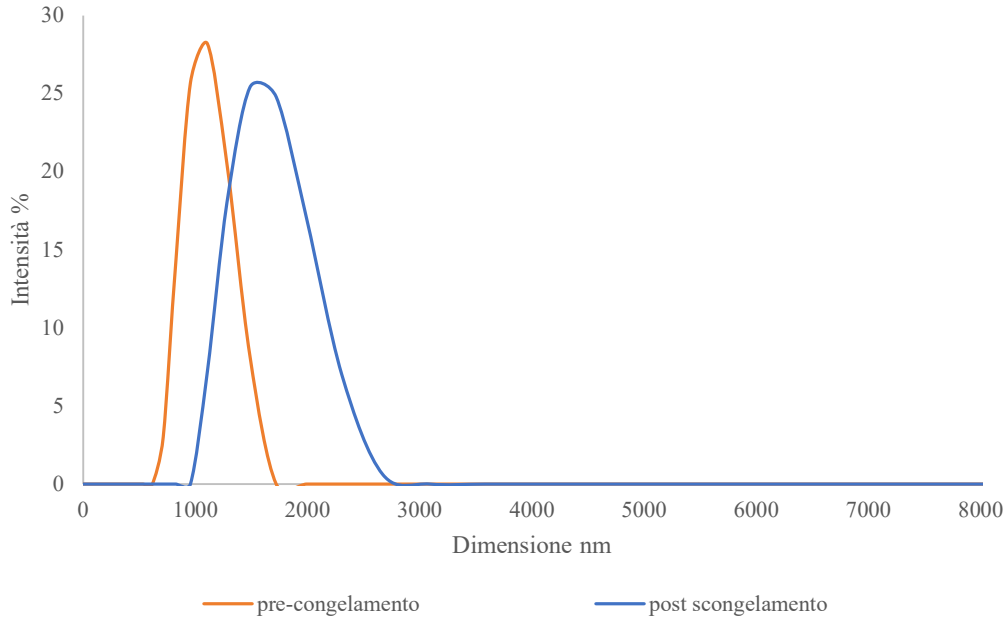


Figura 4.6: Curve PSD riferite a nanoparticelle di chitosano poloxamer prima e dopo l’operazione di congelamento, scongelamento.

Osservando i picchi delle curve PSD riferite alle nanoparticelle prodotte con l’aggiunta del tensioattivo, in confronto con Figura 4.6, è immediatamente riscontrabile l’effetto del poloxamer sul mantenimento della dimensione delle nanoparticelle al termine del processo di scongelamento.

4.2 Nanoparticelle di chitosano e chitosano-poloxamer veicolanti dsRNA

4.2.1 Conservazione a temperatura ambiente

Nella seguente sezione si intende indagare sulla stabilità delle nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA conservate a temperatura ambiente. Sono riportate in Figura 4.7 le curve PSD raffiguranti la variazione dimensionale di tali nanoparticelle durante il corso di 72 ore di osservazione.

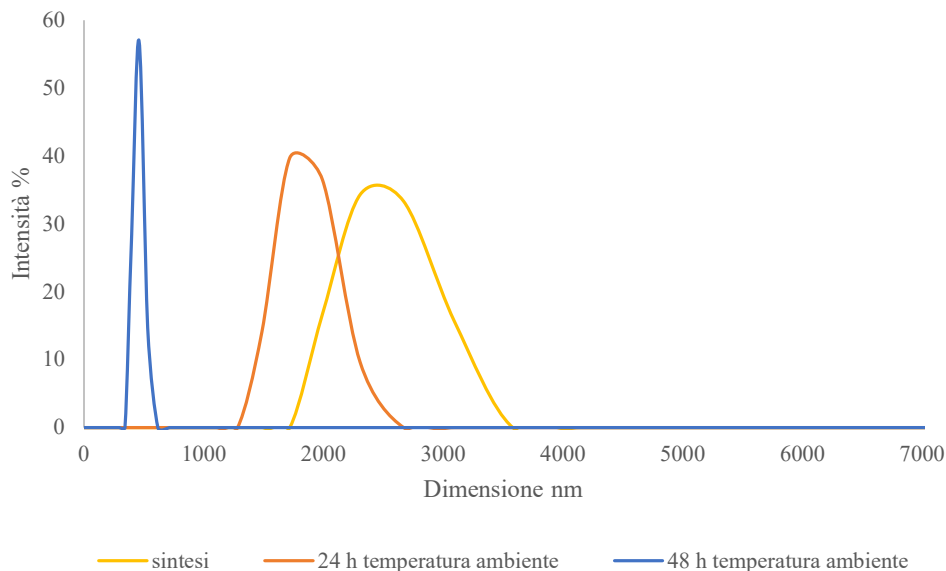


Figura 4.7: Curve PSD acquisite ad intervalli di 24 ore e riferite a nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA conservate a temperatura ambiente.

A differenza delle curve prodotte con i *nanocarriers* di solo chitosano, in questo caso, non si nota nel corso dei giorni un incremento delle dimensioni delle nanoparticelle, bensì una diminuzione. Tale fatto è attribuibile alla presenza della molecola di dsRNA incapsulata che, con il suo carattere acido, porta alla disgregazione delle nanoparticelle di chitosano fino alla loro completa dissoluzione.

Come per lo studio dei *nanocarriers* di chitosano, anche in questo caso, i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli di un sistema di nanoparticelle veicolanti dsRNA contenente poloxamer. Dal confronto è emerso che, nonostante la presenza del tensioattivo, le nanoparticelle diventano presto instabili il sistema tende comunque a dissolversi per effetto del dsRNA.

Noto che per effetto del dsRNA le nanoparticelle tendono a solvatarsi velocemente, si è studiato quanto dsRNA viene liberato da questo processo durante le prime 24 ore di riposo a temperatura ambiente. I risultati sono riportati in Tabella 4.4.

Tabella 4.4: Efficacia di incapsulamento post sintesi e perdita di dsRNA dopo 24 ore di riposo a temperatura ambiente, per il sistema di nanoparticelle di chitosano-dsRNA e di chitosano-poloxamer dsRNA.

| | Sintesi | | Post 24 h | |
|----------------------------------|---------------------|--------|---------------------|----------------------------|
| | Assorbanza (260 nm) | Resa % | Assorbanza (260 nm) | dsRNA perso, μg |
| Chitosano-dsRNA | 0.2942 | 91.41% | 0.6559 | 28.73 |
| Chitosano-dsRNA poloxamer | 0.1400 | 95.91% | 0.3113 | 13.64 |

Per effettuare tale studio, le nanoparticelle prodotte, centrifugate e re-disperse dopo 24 ore sono nuovamente centrifugate e il surnatante recuperato e analizzato. Osservando i risultati riportati è possibile confermare ulteriormente la tendenza alla solvatazione delle nanoparticelle veicolanti dsRNA. In accordo con le aspettative le nanoparticelle di chitosano poloxamer offrono una maggiore stabilità nel tempo e la quantità di dsRNA liberata risulta essere minore rispetto a quella rilasciata dalle nanoparticelle sintetizzate senza l'utilizzo del tensioattivo.

4.2.2 Conservazione in frigorifero

Le stesse nanoparticelle, prodotte e conservate a temperatura ambiente, sono state conservate in ambiente refrigerato a 4°C e, come fatto in precedenza, è stata studiata la loro stabilità nel tempo, sia in termini dimensionali, come mostrato in Figura 4.8, che in termini di rilascio di dsRNA durante le 24 ore successive alla sintesi. I risultati di quest'ultimo studio sono riportati in Tabella 4.5.

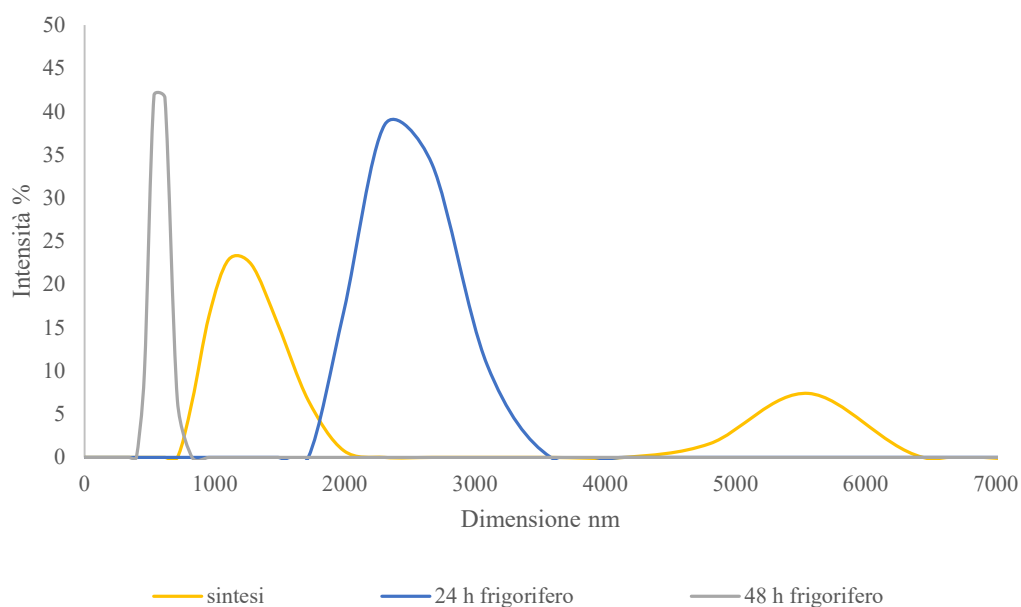


Figura 4.8: Curve PSD acquisite ad intervalli di 24 ore e riferite a nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA conservate in frigorifero a 4°C.

Le curve PSD riportate, riferite ad una conservazione in ambiente refrigerato, mostrano un primo aumento delle dimensioni delle nanoparticelle, a cui segue però una rapida diminuzione che conferma, anche per la conservazione in ambiente refrigerato la tendenza delle nanoparticelle a solvatarsi per effetto della molecola di dsRNA. La bassa temperatura rallenta questo processo e l'aggiunta del poloxamer apporta ulteriori effetti stabilizzanti. Tuttavia, anche in questo caso, l'utilizzo del tensioattivo non impedisce comunque il rilascio del principio attivo come mostrano i risultati riportati Tabella 4.5.

Tabella 4.5: Efficacia di incapsulamento post sintesi e perdita di dsRNA dopo 24 ore di riposo in ambiente refrigerato (4°C), per il sistema di nanoparticelle di chitosano-dsRNA e di chitosano-poloxamer dsRNA.

| | Sintesi | | Post 24 h | |
|----------------------------------|---------------------|--------|---------------------|----------------------------|
| | Assorbanza (260 nm) | Resa % | Assorbanza (260 nm) | dsRNA perso, μg |
| Chitosano-dsRNA | 0.2777 | 91.89% | 0.4825 | 21.13 |
| Chitosano-dsRNA poloxamer | 0.0885 | 97.42% | 0.1362 | 5.97 |

In analogia con i risultati ottenuti conservando le nanoparticelle a temperatura ambiente, anche in questo caso risulta evidente che la presenza del poloxamer incrementa la stabilità delle nanoparticelle. La bassa temperatura, inoltre, contribuisce a rallentare la dissoluzione delle nanoparticelle; il quantitativo di dsRNA rilasciato dopo 24 ore è infatti inferiore, sia in presenza che in assenza del tensioattivo, a quello rilasciato dalle nanoparticelle conservate a temperatura ambiente

4.2.3 Conservazione in congelatore

Le nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA, come fatto per i *nanocarrier* di solo chitosano, prima di essere congelate sono state diluite in una soluzione di saccarosio al 10% e anche in questo caso, gli effetti prodotti dal congelamento sulla dimensione delle nanoparticelle sono stati confrontati per il sistema di solo chitosano e per il sistema di chitosano-poloxamer. È stata valutata infine la capacità delle particelle di chitosano dsRNA di trattenere il principio attivo durante il congelamento.

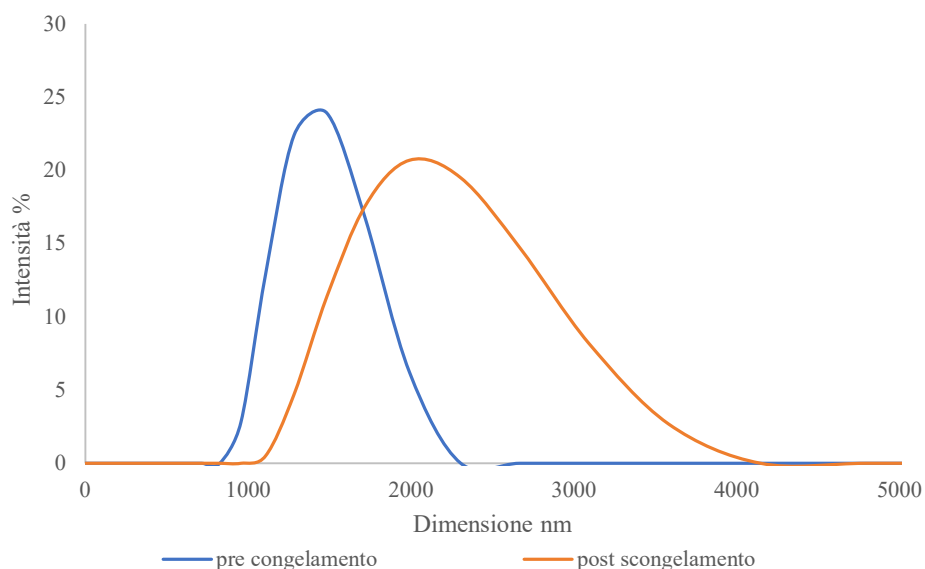


Figura 4 9: Curve PSD riferite a nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA prima e dopo l'operazione di congelamento, scongelamento.

In Figura 4 9 sono riportate le curve di distribuzione granulometrica riferite alle nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA prima e dopo l'operazione di congelamento, scongelamento. In

analogia con i risultati ottenuti dalla stessa operazione svolta sui *nanocarriers* di solo chitosano, la dimensione finale delle nanoparticelle scongelate risulta maggiore rispetto a quella delle particelle re-disperse dopo centrifugazione. Sono riportate in Figura 4.10 per confronto anche le curve PSD ottenute per il sistema di nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA con aggiunta di poloxamer. Anche in tal caso la dimensione finale, dopo scongelamento, è maggiore rispetto a quella di partenza, ma la presenza del poloxamer tende comunque a minimizzare tale differenza.

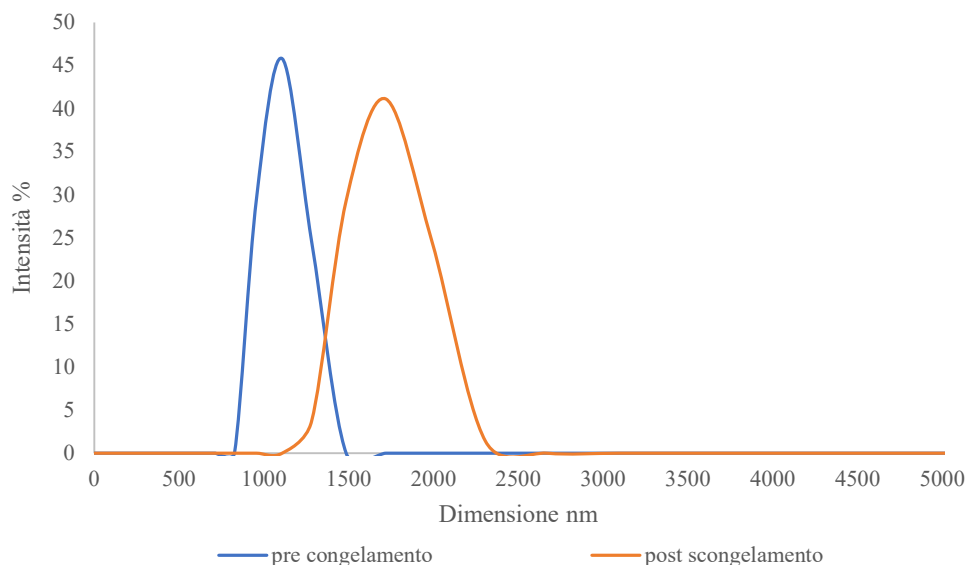


Figura 4.10: Curve PSD riferite a nanoparticelle di chitosano-poloxamer veicolanti dsRNA prima e dopo l'operazione di congelamento, scongelamento.

Si riporta infine in Tabella 4.6 lo studio sul rilascio del dsRNA dopo scongelamento.

Tabella 4.6: Efficacia di incapsulamento post sintesi e perdita di dsRNA dopo congelamento in soluzione di saccarosio 10%, per il sistema di nanoparticelle di chitosano-dsRNA e di chitosano-poloxamer dsRNA.

| | Sintesi | | Post 24 h | |
|----------------------------------|---------------------|--------|---------------------|----------------------------|
| | Assorbanza (260 nm) | Resa % | Assorbanza (260 nm) | dsRNA perso, μg |
| Chitosano-dsRNA | 0.2975 | 91.31% | 0.0585 | 2.56 |
| Chitosano-dsRNA poloxamer | 0.1200 | 96.50% | 0.0483 | 2.12 |

Come è possibile osservare dai risultati indicati, la quantità di dsRNA persa durante il processo di congelamento e scongelamento è minima e ciò è legato certamente alla presenza del saccarosio, eccipiente crioprotettivo. In questo caso non sono state riscontrate particolari differenze legate alla presenza del tensioattivo.

5 Conclusioni

In questo lavoro di Tesi, in collaborazione con IPSP-CNR di Torino, è stata studiata la procedura di sintesi utilizzata per la produzione di nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA. Tale molecola prende parte ad un meccanismo naturale di protezione di alcune piante e insetti noto come *RNA interference (RNAi)*; nello specifico il dsRNA utilizzato è stato fornito da IPSP stesso, che si è anche occupato di testare in vivo l'efficacia dei *nanocarriers* di chitosano, veicolanti il principio attivo, nella protezione delle piante di peperone contro la virosi dell'avvizzimento maculato (TSWV).

Il metodo di preparazione scelto per la sintesi delle nanoparticelle di chitosano è la nanoprecipitazione, condotta mediante l'utilizzo di un reattore *Vortex Mixer*. I reagenti impiegati per la produzione dei *nanocarriers* sono i seguenti: il chitosano, derivato dalla parziale deacetilazione della chitina, un biopolimero biocompatibile e biodegradabile presente nell'esoscheletro di funghi e crostacei, ed il dsRNA attivo per la protezione delle piante di peperone contro il TSWV. A partire dalle procedure indicate in letteratura, per sintetizzare i nanovettori di chitosano mediante la tecnica di nanoprecipitazione sono state preparate due soluzioni: una soluzione solvente, il *sodium acetate buffer*, in cui il chitosano, in concentrazione $0.2 \frac{g}{l}$, è solubilizzato e una soluzione acquosa di solfato di sodio in cui il biopolimero risulta insolubile. La procedura di sintesi prevede che un ugual volume delle due soluzioni venga unito in una provetta, la quale viene successivamente riscaldata in un bagno termostatico alla temperatura di 55°C e infine posizionata all'interno di un alloggiamento del *Vortex Mixer* che è azionato alla massima potenza.

Il lavoro di Tesi svolto è stato suddiviso in due fasi operative.

Durante la prima è stato condotto uno studio volto a valutare gli effetti di una variazione delle condizioni operative di sintesi sulla dimensione e sul potenziale zeta delle nanoparticelle di solo chitosano. In particolare, è stata valutata la risposta del sistema di nanoparticelle ad una variazione del tempo di miscelazione, del tempo di riscaldamento, del volume in reazione e del *quench ratio*. Sulla base di questo primo studio è stata studiata, al variare della concentrazione di chitosano, l'efficacia di incapsulamento del dsRNA ed infine, sono stati condotti alcuni esperimenti per studiare l'effetto di diverse condizioni di conservazione sulle nanoparticelle di chitosano.

Dai risultati ottenuti durante la prima fase di studio è emerso che le nanoparticelle con le caratteristiche migliori al fine di incapsulare il principio attivo, sono ottenute utilizzando un tempo di riscaldamento di 60 secondi e un tempo di agitazione nel reattore *Vortex* di 30 secondi. Per quanto riguarda il volume in reazione e il rapporto di *quench* applicato è stato necessario effettuare uno studio più accurato. Nonostante l'utilizzo di un volume in reazione maggiore porti alla produzione di nanoparticelle di dimensione inferiore e nonostante l'utilizzo di un rapporto di *quench 1:1* diminuisca ulteriormente la dimensione dei *nanocarriers*, i campioni utilizzati da IPSP per effettuare i test in vivo devono rispondere ad una serie di requisiti di qualità che non rendono possibile effettuare una sintesi nelle migliori condizioni possibili. In particolare, è richiesto che le nanoparticelle siano contenute in un volume massimo di 200 µl e che il dsRNA sia contenuto in una precisa quantità all'interno del singolo campione. Per ottenere dunque un volume di liquido massimo di 200 µl è necessario effettuare un'operazione di centrifugazione, la quale permette di separare il mezzo di sintesi dalle nanoparticelle e quindi di re-disperdere successivamente i solidi sedimentati nel quantitativo massimo di liquido richiesto. Per agevolare tale operazione è stata eliminata la procedura di *quench* ed è stata

incrementata la concentrazione di chitosano utilizzata a $0.5 \frac{g}{l}$, mentre per ottenere un preciso quantitativo di dsRNA per singola provetta è necessario effettuare l'intera sintesi all'interno della provetta da centrifuga e questo limita il volume massimo di sintesi ad 1 ml. Le dimensioni delle nanoparticelle di solo chitosano ottenute in questa fase sono comprese tra 450 e 550 nm con un potenziale zeta di circa 10-12 mV

Durante la seconda fase di studio, su richiesta di IPSP-CNR, è stata studiata la capacità di incapsulamento di due specifiche quantità di dsRNA (10 µg e 300 µg) al variare della concentrazione di chitosano.

A partire dalle indicazioni riportate in letteratura, che suggeriscono un rapporto chitosano/dsRNA pari a 5, con un quantitativo di dsRNA pari a 10 µg e una soluzione di chitosano in concentrazione $0.5 \frac{g}{l}$, sono state ottenute nanoparticelle di dimensione circa 800 nm e potenziale zeta pari a 8-9 mV. L'efficacia di incapsulamento ottenuta risulta elevata 95% ed in linea con i risultati presentati in letteratura.

I risultati dei test in vivo effettuati con tali campioni, tuttavia, non sono risultati soddisfacenti e per questo la quantità di dsRNA è stata incrementata a 300 µg per campione. A causa di tale richiesta, volendo mantenere le stesse condizioni operative adottate per la sintesi dei campioni precedenti, per ottenere nanoparticelle in grado di incapsulare efficacemente il principio attivo è stato necessario incrementare la concentrazione della soluzione di chitosano a $5 \frac{g}{l}$. Le nanoparticelle ottenute in tal caso risultano di dimensione molto maggiore superiore ai 2 µm con un potenziale zeta di circa 9-10 mV. L'aggiunta di un tensioattivo come il poloxamer ha consentito di diminuire di circa la metà la dimensione delle nanoparticelle e di incrementarne la stabilità.

Infine, sono state svolte alcune prove di stabilità nel tempo su nanoparticelle di chitosano e su nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA. Per confronto gli stessi sistemi sono stati studiati anche in caso di aggiunta di tensioattivo e ciascuno di essi è stato studiato in tre diverse condizioni di conservazione: a temperatura ambiente, a temperatura di frigorifero (4°C) e dopo congelamento a -20°C in soluzione di saccarosio al 10% w/v.

In generale, in ciascuna condizione di conservazione considerata, le nanoparticelle di solo chitosano tendono ad aumentare la loro dimensione nel tempo per poi raggiungere un valore stabile. Il raggiungimento di tale stabilità avviene ovviamente prima per le nanoparticelle conservate in ambiente refrigerato e, nel caso di utilizzo di poloxamer, tale tempo si riduce ulteriormente. Per le nanoparticelle congelate l'utilizzo del tensioattivo risulta determinante per ottenere un contenuto aumento delle dimensioni.

Per quanto riguarda le nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA, a causa della naturale acidità della molecola di principio attivo incapsulata, tendono a diminuire di dimensione al passare delle ore. Tale fenomeno risulta accentuato in caso di conservazione a temperatura ambiente, mentre rallenta in presenza di poloxamer e ad una minore temperatura di conservazione. Le nanoparticelle congelate invece, come nel caso dei soli *nanocarriers*, risultano più grandi dopo scongelamento. Per il sistema di nanoparticelle di chitosano veicolanti dsRNA è stata inoltre valutata la quantità di principio attivo rilasciata dopo 24 ore di conservazione. Dai risultati è emerso che il sistema conservato a temperatura ambiente rilascia circa il 21% del dsRNA incapsulato contro il 15% del sistema conservato in ambiente refrigerato e il 0.04% delle nanoparticelle congelate. La presenza del poloxamer, aumentando la stabilità delle nanoparticelle, diminuisce ulteriormente la quantità di dsRNA persa dopo 24 ore.

Lista dei simboli

| | |
|-------------------------|--|
| A | Assorbanza |
| C | Concentrazione, $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ |
| ε_{λ} | Coefficiente di assorbimento molare, $\frac{\text{m}^2}{\text{mol}}$ |
| l | Cammino ottico, m |
| m | Coefficiente angolare della retta di calibrazione |
| Q_S | Quantità di dsRNA usata al momento della sintesi |
| Q_I | Quantità di dsRNA incapsulata |
| Q_R | Quantità di dsRNA recuperata nel surnatante |

Abbreviazioni

| | |
|----------|---|
| MW | Molecular Weight |
| TSWV | Tomato Spotted Wilt Virus |
| dsRNA | Double Stranded RNA |
| PSD | Particle Size Distribution |
| IPSP-CNR | Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante-CNR |
| siRNA | Short Interfering RNA |
| SEM | Microscopio a Scansione Elettronica |
| TEM | Microscopio a Trasmissione Elettronica |
| PLA | Acido Polilattico |
| PGA | Acido Poliglicolico |
| PLGA | Acido Poli(lattico-co-glicolico) |
| PMMA | Poly(Methyl-Metacrilate) |
| PLL | Poly-L-Lisina |
| DLS | Dynamic Light Scattering |
| ZP | Potenziale Zeta |
| RNAi | RNA interference |
| OGM | Organismo Geneticamente Modificato |
| AFM | Microscopio a Forza Atomica |
| TPP | Tripolifosfato |
| DD | Grado di Deacetilazione |

Bibliografia

Adeyinka, O. S.; Riaz, S.; Toufic, N.; Yousaf, I.; Bhatti, M. U.; Batcho, A.; Olajide, A. A.; Nasir, I. A.; Tabassum, B., 2020. Advances in exogenous RNA delivery techniques for RNAi-mediated pest control. *Molecular Biology Reports*, Volume 47, pp. 6309-6319.

Beck-Broichsitter, M.; Rytting, E.; Lebbardt, T.; Wang, X.; Kissel, T., 2010. Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the “ouzo region” upon drug loading. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 41, pp. 244-253.

Bhattacharjee, S., 2016. DLS and zeta potential - What they are what they are not. *Journal of Controlled Release*, Volume 235, pp. 337-351.

Bilati, U., Allémann, E. & Doelker, E., 2005. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Science*, Volume 24, pp. 67-75.

Bozkir, A. & Saka, O. M., 2004. Chitosan Nanoparticles for Plasmid DNA Delivery: Effect of Chitosan Molecular Structure on Formulation and Release Characteristics. *Drug Delivery*, Volume 11, pp. 107-112.

Braun, S., Bhattacharyya, S. & Ducheyne, P., 2017. Encapsulation of Cells (Cellular Delivery) Using Sol–Gel Systems. In: *Comprehensive Biomaterials II*. s.l.:Elsevier, pp. 529-543.

Campos, E. V. R., Luiz de Oliveira, J., Fraceto, L. F. & Singh, B., 2015. Polysaccharides as safer release systems for agrochemicals. *Agronomy for Sustainable Development*, Volume 35, pp. 47-66.

Chamundeeswari, M., Jeslin, J. & Lal Verma, M., 2019. Nanocarriers for drug delivery applications. *Environmental Chemistry Letters*, Volume 47(4), pp. 849-865.

Dhandapani, R. K., Dhandapani, G., Howell, J. L. & Palli, S. R., 2019. Development of CS-TPP-dsRNA nanoparticles to enhance RNAi efficiency in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*, Volume 9(8775), pp. 1-11.

Dhande, R. D., Patel, A. A. & Thakkar, H. P., 2015. *Nanopharmaceuticals: A Boon or Bane*. Vadodara, India, Pharmacy Department, Faculty of Technology and Engineering, The M.S. University of Baroda.

Divya, K. & Jisha, M. S., 2018. Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental Chemistry Letters*, Issue 16, pp. 101-112.

Gan, Q. & Wang, T., 2007. Chitosan nanoparticles as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids and Surfaces*, Volume 59, pp. 24-34.

Grenha, A., 2012. Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods. *Journal of Drug Targeting*, Volume 20(4), pp. 291-300.

Hassan O., C. T., Hassan, O. & Chang, T., 2017. Chitosan for Eco-friendly Control of Plant Disease. *Asian Journal of Plant Pathology*, Volume 11(2), pp. 54-70.

Hassan, O. & Chang, T., 2017. Chitosan for Eco-friendly Control of Plant Disease. *Asian Journal of Plant Pathology*, Volume 11(2), pp. 53-70.

Hembram, K. C.; Prabha, S.; Chandra, R.; Ahmed, B.; Nimesh, S., 2014. Advances in preparation and characterization of chitosan nanoparticles for therapeutics. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, Volume 44(1), pp. 315-314.

Jain, A. K. & Thareja, S., 2019. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *An international Journal Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, Volume 47(1), pp. 524-539.

Kashyap, P. L., Xiang, X. & Heiden, P., 2015. Chitosan nanoparticles based delivery systems for sustainable agriculture. *Internation Journal of Biological Macromolecules*, Volume 77, pp. 36-51.

Katas, H. & Alpar, H. O., 2006. Developement and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of controlled release*, Volume 115, pp. 216-225.

Kesharwani, P., Gajbhiye, V. & Jain, N. K., 2012. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA. *Biomaterials*, Volume 33, pp. 7138-7150.

Khan, I., Saeed, K. & Khan, I., 2019. Nanoparticles: properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, Volume 12, pp. 908-931.

Konakalla, N. C.; Kaldis, A.; Berbati, M.; Masarapu, H.; Voloudakis, A. E., 2016. Exogenous application of double-stranded RNA molecules from TMV p126 and CP genes confers resistance against TMV in tobacco. *Planta*, Volume 244, pp. 961-969.

Kumar, D. R.; Kumar, P. S.; Gandhi, M. R.; Al-Dhabi, N. A.; Paulraj, M. G.; Ignacimuthu, S., 2019. Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. *Journal of Controlled Release*, Volume 294, pp. 131-153.

Kumar, S.; Nehra, M.; Dilbaghi, N.; Marazza, G.; Hassan, A. A.; Kim, K., 2016. Delivery of chitosan/dsRNA nanoparticles for silencing of wing development vestigial (vg) gene in *Aedes aegypti* mosquitoes. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 86, pp. 89-95.

Lichtenberg, S. S., Tsyusko, O. V., Palli, S. R. & Unrine, J. M., 2019. Uptake and Bioactivity of Chitosan/Double-Stranded RNA Poliprex Nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Enviromental Science & Technology*, Volume 53(7), pp. 3832-3840.

Lichtenberg, S. S.; Nuti, K.; DeRouchey, J.; Tsyusko, O. V.; Unrine, J. M., 2020. Efficacy of chitosan/double-stranded RNA polyplex nanoparticles for gene silencing under variable enviromental conditions. *Enviromental Scienze Nano*, Volume 7(5), pp. 1582-1592.

Liu, X.; Howard, K. A.; Dong, M.; Andersen, M. Ø.; Rahbek, L. U.; Johnsen, M. G.; Hansen, O. C.; Besenbacher, F.; Kjems, J., 2007. The influence of polymeric properties on

- chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials*, Volume 28, pp. 1280-1288
- Luque-Alcaraz, A. G.; Lizardi-Mendoza, J.; Goycoolea, F. M.; Higuera-Ciapara, I.; Arguelles-Monal, W., 2016. Preparation of chitosan nanoparticles by nanoprecipitation and their ability as a drug nanocarrier. *RSC Advances*, Volume 6, pp. 59250-59256.
- Miele, E.; Spinelli, G. P.; Miele, E.; Di Fabrizio, E.; Ferretti, E.; Tomao, S.; Gulino, A., 2012. Nanoparticles-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 7, pp. 3637-3657.
- Mishra, B., Bhavesh, B. P. & Tiwari, S., 2010. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, Volume 6, pp. 9-24.
- Nagavarma, B. V. N.; Hemant, K.S. Y.; Ayaz, A.; Vasudha, L. S.; Shivakumar, H. G., 2012. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles a Review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, Volume 5(3), pp. 16-23.
- Naskar, S., Kuotsu, K. & Sharma, S., 2019. Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems: a review on two decades of research. *Journal of drug targeting*, Volume 27(4), pp. 379-393.
- Naskar, S., Kuotsu, K. & Sharma, S., 2019. Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems: a review on two decades of research. *Journal of Drug Targeting*, Volume 27(4), pp. 379-393.
- Natarajan, J. V., Nugraha, C., Ng, X. W. & Venkatraman, S., 2014. Sustained-release from nanocarriers: a review. *Journal of Controlled Release*, Volume 193, pp. 122-138.
- Palocci, C.; Valletta, A.; Chronopoulou, L.; Donati, L.; Bramosanti, M.; Brasili, E.; Baldan, B.; Pasqua, G., 2017. Endocytic pathways involved in PLGA nanoparticle uptake by grapevine cells and role of cell wall and membrane in size selection. *Plant Cell Reports*, Volume 36, pp. 1917-1928.
- Ponnuraj, R.; Janakiraman, K.; Gopalakrishnan, S.; Senthilnathan, K.; Meganathan, V.; Saravanan, P., 2015. Formulation and Characterization of Epigallocatechin Gallate Nanoparticles. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, Volume 5(1), pp. 387-399.
- Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H. & Doelker, E., 1998. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, Volume 24(12), pp. 1113-1128.
- Ragelle, H., Vandermeulen, G. & Préat, V., 2013. Chitosan-based siRNA delivery systems. *Journal of Controlled Release*, Volume 172(1), pp. 207-218.
- Rawat, M., Singh, D., Saraf, S. & Saraf, S., 2006. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Volume 29(9), pp. 1790-1798.

- Reischl, D. & Zimmer, A., 2009. Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, Volume 5, pp. 8-20.
- Rudzinski, W. E. & Aminabhavi, T. M., 2010. Chitosan as a carrier for targeted delivery of small interfering RNA. *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 399, pp. 1-11.
- Sanzari, I., Leone, A. & Ambrosone, A., 2019. Nanotechnology in Plant Science: To Make a Long Story Short. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Volume 7(120), pp. 1-12.
- Sarathi, M., Martin, C. S., Venkatesan, C. & Sahul Hammed, A. S., 2008. Oral Administration of Bacterially Expressed VP28dsRNA to Protect *Panaeus monodon* from White Spot Syndrome Virus. *Marine Biotechnology*, Volume 10, pp. 242-249.
- Sarathi, M., Simon, M. C., Venkatesan, C. & Sahul Hameed, A. S., 2008. Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Panaeus monodon* from white spot syndrome virus. *Marine Biotechnology*, Volume 10, pp. 242-249.
- Tabein, S.; Jansen, M.; Noris, E.; Vaira, A. M.; Marian, D.; Behjatnia, S. A.; Accotto, G. P.; Miozzi, L., 2020. The Induction of an Effective dsRNA-Mediated Resistance Against Tomato Spotted Wilt Virus by Exogenous Application of Double-Stranded RNA Largely Depends on the Selection of the Viral RNA Target Region. *Frontiers in Plant Science*, Volume 11, pp. 1-13.
- Wang, K.; Peng, Y.; Chen, J.; Peng, Y.; Wang, X.; Shen, Z.; Han, Z., 2020. Comparison of efficiency of RNAi mediated by various nanoparticles in the rice striped stem borer (*chilo suppressalis*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Volume 165(104467).
- Yan, S., Ren, B. & Shen, J., 2021. Nanoparticles-mediated double-stranded RNA delivery system: A promising approach for sustainable pest management. *Insect Science*, Volume 28, pp. 21-34.
- Yuan, Y.; Tan, J.; Wang, Y.; Qian, C.; Zhang, M., 2009. Chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery vehicles based on atomic force microscopy study. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, Volume 41(6), pp. 515-526.
- Zhang, X., Zhang, J. & Zhu, K. Y., 2010. Chitosan/double stranded RNA nanoparticles-mediated RNA interference to silence chitin syntase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Molecular Biology*, Volume 19(5), pp. 683-693.
- Zhao, K.; Shi, X.; Zhao, Y.; Wei, H.; Sun, Q.; Huang, T.; Zhang, X.; Wang, Y., 2011. Preparation and immunological effectiveness of a swine influenza DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. *Vaccine*, Volume 29, pp. 8549-8556.

Ringraziamenti

È con questo capitolo che segno la fine del mio lavoro di tesi e con cui concludo un lungo e importante percorso di studi. Vorrei, dunque, utilizzare queste ultime pagine per ringraziare chi, da più vicino o da più lontano, mi ha supportata e mi ha incoraggiata a credere sempre nelle mie possibilità.

Ringrazio in primis il Professor Davide Fissore, per la sua professionalità, per la sua attenzione, per i tanti consigli, per l'infinita pazienza e la passione trasmessa per il suo lavoro. Ringrazio anche la Professoressa Francesca Bosco e la Dottoressa Chiara Mollea, per i loro consigli e insegnamenti.

Ringrazio anche, a distanza di qualche anno, la Professoressa Marika Navone per avermi insegnato l'importanza di osservare "*da un'altra prospettiva*" e per avermi influenzata con la sua passione per la scienza.

Un grazie speciale agli amici di sempre, quelli di casa, che nonostante abbiano intrapreso strade diverse rimangono pronti ad ascoltarti anche da lontano. Grazie a Matty, il mio *Minion* da sempre, per esserci stato e avermi ascoltata, per aver condiviso con me le tue idee e per aver riposto in me la tua fiducia.

Grazie a Lorenzo, a Fabietto, a Samu, a Paolino e a Paolone per avermi conosciuta per caso e per essere sempre rimasti. Un grazie speciale va a voi, pasticceri del martedì e pure del giovedì, per le lezioni fino alle sette, per le sessioni di studio straordinarie, per aver condiviso con me la vostra energia e per avermi insegnato che "*si fa tutto*" anche quando sembra impossibile. Grazie a Laura per la sua energia e per la sua spontaneità, per avermi ascoltata e incoraggiata, grazie a Ila per la sua dolcezza e a Noe per la sua determinazione. Ad Alice, per essere stata la mia coinquilina, e per i momenti più belli e più brutti passati assieme.

Grazie anche a chi c'è stato di meno o è arrivato all'ultimo, ma che ha comunque contribuito a regalarmi ricordi bellissimi e con cui spero di crearne molti altri.

Grazie Erich, per aver condiviso tutto. Per avermi dato il coraggio di andare oltre quelli che pensavo fossero i miei limiti, credendo in me più di quanto non facessi io. Grazie per la tua gentilezza, per la sicurezza che mi hai dato quando più ne avevo bisogno e grazie per essere l'Ingegnere "degli aeroplanini" che si è interessato alla chimica solo per capirmi meglio quando raccontavo tutto d'un fiato dei miei esperimenti in laboratorio. Sei speciale.

Infine, grazie ai miei genitori, a mamma Marisa e a papà Paolo per avermi trasmesso la curiosità di imparare e la volontà di capire. Grazie mamma, per aver condiviso e fatto tue le mie paure e le mie ansie, per ascoltarmi, capirmi e consigliarmi, per essere sempre la prima a chiamarmi dopo un esame (o la prima ad aspettarmi fuori dalla porta della mia camera nel caso di questi ultimi due anni). Grazie papà, per la tua dolcezza, per esserci sempre anche da lontano, per ascoltarmi ed essere il mio fan numero uno. Grazie per avermi insegnato sin da piccola la bellezza del viaggio e il piacere della scoperta. Senza il vostro sostegno tutto questo lavoro non sarebbe stato possibile, vi voglio infinitamente bene.

A tutti voi, con affetto,

Celeste