

Politecnico di Torino

Tesi magistrale di Ingegneria Biomedica



**Politecnico
di Torino**

**Nanoparticelle di silice mesoporosa funzionalizzate
come vettori di farmaci per la rigenerazione
funzionale del tessuto miocardico**

Relatrice

Prof.ssa Chiara Vitale Brovarone

Co-relatrice

Prof.ssa Sonia Fiorilli

Candidata

Silvia Dessi

Anno Accademico 2023 /2024

INDICE

INDICE.....	I
LISTA DELLE FIGURE	IIV
LISTA DELLE TABELLE	VI
ABSTRACT	1
1. INTRODUZIONE	3
1.1 Tessuto cardiaco	3
1.1.1 Le malattie cardiovascolari e l'infarto del miocardio.....	4
1.1.2 Scarsa capacità rigenerativa del miocardio infartuato	8
1.2 Sistemi per il rilascio di farmaci	11
1.2.1 Nanoparticelle organiche.....	12
1.2.1.1 Liposomi.....	13
1.2.1.2 Nanoparticelle polimeriche.....	14
1.2.1.3 Micelle.....	14
1.2.1.4 Dendrimeri.....	15
1.2.2 Nanoparticelle inorganiche.....	16
1.3 Nanoparticelle di Silice Mesoporosa (MSN)	17
1.3.1 Caratteristiche e proprietà delle MSN	18
1.3.1.1 Area superficiale	18
1.3.1.2 Porosità.....	19
1.3.1.3 Funzionalizzazione superficiale	19
1.3.1.4 Rilascio di farmaco.....	20
1.3.1.5 Biocompatibilità e biodistribuzione.....	20
1.3.2 Diverse tipologie di MSN	20
1.3.3 Metodi di sintesi delle nanoparticelle di silice mesoporosa (MSN)	22
1.3.3.1 Metodo sol-gel.....	23
1.3.3.2 Metodi alternativi al sol-gel.....	28
1.3.4 Caricamento del Farmaco.....	29
1.3.4.1 Metodi che utilizzano il solvente (wet methods).....	31
1.3.4.2 Metodi che non utilizzano il solvente	33
1.3.5 Rilascio Controllato.....	33
1.3.5.1 Stimoli interni.....	34
1.3.5.2 Stimoli esterni.....	35

1.4 MSN nel lavoro di Tesi	36
2. MATERIALI E METODI	38
2.1 Sintesi dei nanovettori.....	38
2.1.1 Sintesi delle MSN-NH ₂	38
2.1.1.1 Sintesi delle MSN(P)-NH ₂ per post-funzionalizzazione.....	38
2.1.1.2 Sintesi delle MSN(C)-NH ₂ per co-condensazione.....	42
2.1.2 Caricamento del farmaco (Ibuprofene)	43
2.1.3 Rivestimento con Alginato di Sodio (SA)	44
2.1.4 Reticolazione con CaCl ₂	45
2.2 Caratterizzazione.....	46
2.2.1 Microscopia a scansione elettronica ad emissione di campo (FE-SEM).....	46
2.2.2 Dynamic Light Scattering (DLS)	47
2.2.3 Diffrazione a raggi X (XRD).....	49
2.2.4 Analisi di adsorbimento-desorbimento di azoto (N ₂)	50
2.2.5 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)	52
2.2.6 Analisi termogravimetrica (TGA)	54
2.2.7 Tecnica cromatografica liquida ad alta prestazione (HPLC)	56
2.2.8 Prove di rilascio di farmaco	58
2.2.9 Prove di rilascio di farmaco da parte dei nanovettori stimolati con Ultrasuoni ad alta frequenza (HF) e a bassa frequenza (LF)	59
2.2.10 Test di stabilità delle nanoparticelle nei solventi impiegati per l'elettrofilatura di fibre contenenti i nanovettori	66
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	67
3.1 Microscopia a scansione elettronica ad emissione di campo (FE-SEM).....	67
3.2 Dynamic Light Scattering (DLS).....	72
3.3 Diffrazione a raggi X (XRD)	73
3.4 Isoterma di adsorbimento-desorbimento di azoto (N ₂).....	74
3.5 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR).....	75
3.6 Analisi termogravimetrica (TGA).....	79
3.7 Test di rilascio di farmaco con e senza stimolazione US	86
3.8 Test di stabilità delle nanoparticelle nei solventi impiegati per l'elettrofilatura di fibre contenenti i nanovettori.....	88

4. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI	90
BIBLIOGRAFIA.....	93

LISTA DELLE FIGURE

<i>Figura 1: Schematizzazione dei principali strati del cuore: epicardio, miocardio ed endocardio [2].....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 2: Rappresentazione schematica della progressiva occlusione di un'arteria in presenza di una placca aterosclerotica [4]</i>	<i>5</i>
<i>Figura 3: Fasi del processo patologico dell'aterosclerosi.....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 4: Rappresentazione della morfologia del cuore in seguito a infarto del miocardio [6]</i>	<i>7</i>
<i>Figura 5: Rappresentazione schematica dei diversi tipi di DDS [27].....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 6: Rappresentazione schematica di un liposoma [29].....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 7: Rappresentazione schematica dei due tipi di nanoparticelle polimeriche in base al metodo di preparazione utilizzato [33]</i>	<i>14</i>
<i>Figura 8: Rappresentazione della struttura di una micella [35].....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 9: Rappresentazione schematica dei dendrimeri [38].....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 10: Rappresentazione di alcuni tipi di nanoparticelle inorganiche.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 11: Grafico che mette in evidenza i diversi campi di applicazione delle MSN [39].....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 12: Le MSN utilizzate come vettori di farmaci, geni terapeutici, proteine e peptidi terapeutici [41]</i>	<i>18</i>
<i>Figura 13: Rappresentazione schematica dei diversi tipi di materiali porosi per il trasporto di farmaci [43]</i>	<i>18</i>
<i>Figura 14: Differenti materiali appartenenti alla famiglia M41S [54].....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 15: Rappresentazione di alcuni tipi di MSN [42]</i>	<i>22</i>
<i>Figura 16: Rappresentazione schematica processo sol-gel [58].....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 17: Schema reazioni sol-gel [60].....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 18: Impatto della concentrazione nel cambiamento di fase del tensioattivo [54].....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 19: Rappresentazione delle diverse strutture che si ottengono in base al tipo di catalisi scelta: acida (sinistra) e basica (destra) [54].....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 20: Schematizzazione del processo sol-gel.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 21: Rappresentazione schematica dei diversi metodi di caricamento di farmaco [70].....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 22: Differenti tipi di stimoli esterni che possono essere applicati alle MSN [24]</i>	<i>34</i>
<i>Figura 23: Rappresentazione schematica del processo di sintesi delle MSN.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 24: Cambiamento del colore della soluzione in seguito all'aggiunta del TEOS</i>	<i>39</i>
<i>Figura 25: Rappresentazione schematica della rampa di temperatura seguita durante il processo di calcinazione</i>	<i>40</i>
<i>Figura 26: Rappresentazione schematica della campana a vuoto dove viene inserito il pallone a tre colli (a sinistra) e della linea Schlenk (a destra).</i>	<i>41</i>
<i>Figura 27: Funzionalizzazione MSN con la linea Schlenk.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 28: Rappresentazione schematica del processo di sintesi delle MSN(C)-NH₂.</i>	<i>42</i>
<i>Figura 29: Rappresentazione schematica del processo di estrazione tramite solvente.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 30: Struttura chimica dell'Ibuprofene [84]</i>	<i>44</i>

<i>Figura 31: Macchinario utilizzato per l'analisi al FE-SEM (a sinistra) e rappresentazione schematica del.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 32: Strumenti utilizzati per l'analisi DLS.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 33: Rappresentazione schematica del meccanismo di funzionamento dell'analisi XRD [94].....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 34: Isotherme di adsorbimento.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 35: Meccanismo di adsorbimento di gas su una superficie porosa [97].....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 36: Rappresentazione schematica delle due differenti zone che si possono individuare in uno spettro IR [99].....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 37: Strumentazione utilizzata per effettuare l'analisi FT-IR.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 38: Rappresentazione schematica dello strumento utilizzato per effettuare la TGA.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 39: Strumentazione utilizzata per effettuare un'analisi cromatografica liquida [105].....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 40: Retta di calibrazione di concentrazione di ibuprofene in Tris HCl da a 0,25 mg/ml a 0 mg/ml.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 41: Retta di calibrazione di concentrazione di ibuprofene in Tris HCl da a 7,5 mg/ml a 0,25 mg/ml.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 42: Rappresentazione schematica del sistema ad alta frequenza (HF).....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 43: Sistema ad alta frequenza (HF).....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 44: Rappresentazione schematica che mette in evidenza i macchinari utilizzati per la stimolazione ultrasonica on-off.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 45: Rappresentazione schematica del sistema a bassa frequenza (LF).....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 46: Sistema a bassa frequenza (LF).....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 47: Rappresentazione schematica che mette in evidenza i macchinari utilizzati per la stimolazione ultrasonica on-off.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 48: Immagini al FE-SEM delle MSN.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 49: Immagini al FE-SEM delle MSN(P)-NH₂.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 50: Immagini al FE-SEM delle MSN(C)-NH₂.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 51: Immagini al FE-SEM delle MSN(P)-SA.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 52: Immagini al FE-SEM delle MSN(C)-SA.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 53: Immagini al FE-SEM delle Ibu@MSN(P)-SA-Ca²⁺.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 54: Immagini al FE-SEM delle Ibu@MSN(C)-SA-Ca²⁺.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 55: Analisi XRD delle Ibu@MSN(P)-NH₂ (sinistra) e delle Ibu@MSN(C)-NH₂ (destra).....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 56: Analisi FTIR dei nanovettori pre e post funzionalizzazione con gruppi amminici.....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 57: Analisi FT-IR che mette a confronto le nanoparticelle prodotte per post-funzionalizzazione e per co-condensazione.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 58: Analisi FTIR dei campioni preparati per post-funzionalizzazione (a sinistra) e per co-condensazione (a destra) in seguito al rivestimento con catene di SA.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 59: Analisi FTIR dei campioni preparate post-funzionalizzazione (a sinistra) e per co-condensazione (a destra) in seguito al rivestimento con catene di SA e alla reticolazione con CaCl₂.....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 60: Grafico che mette a confronto la perdita in peso percentuale delle nanoparticelle prima e dopo la funzionalizzazione (a sinistra) delle nanoparticelle preparate per co-condensazione (a destra).....</i>	<i>80</i>

<i>Figura 61: Grafico che mette a confronto le TGA delle MSN ottenute per post-funzionalizzazione (a sinistra) e per co-condensazione (a destra).....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 62: Grafico TGA delle nanoparticelle ottenute per post-funzionalizzazione (a sinistra) e per co-condensazione (a destra) in seguito al rivestimento con catene di SA.</i>	<i>82</i>
<i>Figura 63: Perdita in peso percentuale delle nanoparticelle (preparate per post-funzionalizzazione a sinistra e preparate co-condensazione a destra) in seguito al rivestimento con SA e alla reticolazione con CaCl₂.</i>	<i>83</i>
<i>Figura 64: Curva TGA delle nanoparticelle preparate per post-funzionalizzazione (a sinistra) e di quelle realizzate per co-condensazione (a destra) in seguito al rivestimento con SA e alla reticolazione con CaCl₂.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 65: Curva TGA delle nanoparticelle preparate per post-funzionalizzazione (a sinistra) e per co-condensazione (a destra) rivestite con alginato di sodio, reticolate con CaCl₂ e caricate con l'ibuprofene.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 66: Test di rilascio di ibuprofene senza stimolazione US.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 67: Test di rilascio di ibuprofene con e senza stimolazione US.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 68: Immagini al FE-SEM delle nanoparticelle prodotte per post-funzionalizzazione al termine della stimolazione US ad alta frequenza (5h).....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 69: Analisi al FE-SEM delle Ibu@MSN(P)-SA-Ca²⁺ dopo il test di stabilità (3h).....</i>	<i>89</i>

LISTA DELLE TABELLE

<i>Tabella 1: Parametri utilizzati per l'analisi HPLC.....</i>	<i>58</i>
<i>Tabella 2: Parametri utilizzati per la stimolazione ad alta frequenza.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabella 3: Parametri utilizzati per la stimolazione ad alta frequenza.....</i>	<i>63</i>
<i>Tabella 4: Parametri utilizzati per la stimolazione a bassa frequenza.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabella 5: Valori ottenuti dall'analisi al DLS.....</i>	<i>72</i>
<i>Tabella 6: Valori ottenuti dall'analisi al DLS.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabella 7: Valori ricavati dall'Analisi di adsorbimento-desorbimento di azoto.....</i>	<i>75</i>

ABSTRACT

L'infarto del miocardio è attualmente tra le principali cause di morte a livello globale. A causa della scarsa capacità rigenerativa del cuore, in seguito ad infarto del miocardio i cardiomiociti ischemici vengono sostituiti definitivamente da tessuto fibroso con proprietà funzionali e strutturali diverse dal tessuto sano, compromettendo significativamente l'attività cardiaca. Le terapie attualmente utilizzate sono di tipo farmacologico o chirurgico, con scarso recupero funzionale.

A questo scopo, il progetto REBORN si propone di sviluppare un patch impiantabile a livello del miocardio, caratterizzato da una struttura fibrosa elettrofilata caricata con nanoparticelle in grado di rilasciare agenti terapeutici quando stimulate con ultrasuoni (US). In questo contesto, il presente lavoro di tesi ha previsto lo sviluppo di nanoparticelle di silice mesoporosa (MSN) funzionalizzate con catene di alginato di sodio (SA), reticolato mediante l'aggiunta di una soluzione di CaCl_2 . L'approccio proposto prevede l'impiego di un'opportuna stimolazione US in grado di indebolire in modo reversibile l'interazione tra i gruppi COO^- dell'alginato e gli ioni Ca^{2+} introdotti con il processo di reticolazione, al fine di consentire il rilascio controllato del farmaco incorporato nella struttura porosa.

Poiché per consentire l'ancoraggio del SA è necessaria la presenza di gruppi amminici sulla superficie delle MSN, sono state seguite due diverse strategie per la preparazione di particelle amminofunzionalizzate (MSN-NH₂). La prima procedura consiste nella sintesi di MSN seguita dalla post-funzionalizzazione con APST (3-aminopropil trietossisilano) in atmosfera di azoto mentre la seconda prevede la sintesi di MSN-NH₂ per co-condensazione di tetraetilortosilicato (TEOS) e APST. Le MSN-NH₂ così ottenute sono state caricate con ibuprofene mediante impregnazione con una soluzione del farmaco. Si è quindi proceduto al rivestimento con alginato di sodio ed alla reticolazione con CaCl_2 .

Ogni fase del processo è stata seguita dall'analisi delle nanoparticelle in termini di proprietà fisico-chimiche, strutturali, superficiali e morfologiche. In particolare, per quest'ultima è stato utilizzato un microscopio elettronico a scansione ad emissione di campo (FE-SEM), mentre per valutarne le dimensioni ed il potenziale zeta si è utilizzato il Dynamic Light Scattering (DLS). L'analisi di adsorbimento-desorbimento di azoto ha permesso di valutare l'area superficiale, la taglia e il volume dei pori. La spettroscopia infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR) ha confermato la corretta funzionalizzazione della superficie delle nanoparticelle in ogni step del processo di preparazione. Attraverso l'analisi termogravimetrica (TGA) si è valutato il quantitativo di farmaco caricato nella struttura mesoporosa.

Nella fase finale sono stati realizzati dei test di rilascio in assenza di stimolazione US, per valutare quale delle due tipologie di nanoparticelle rilasciasse il farmaco con una cinetica sostenuta nel tempo.

I test hanno evidenziato che le nanoparticelle ottenute per post-funzionalizzazione sono più performanti rispetto a quelle ottenute per co-condensazione e su di esse sono stati effettuati test di rilascio con stimolazione US. Nello studio preliminare sono stati impiegati diversi parametri di stimolazione al fine di individuare i range operativi in grado di controllare in modo efficace e sicuro il rilascio del farmaco, senza alterare le nanoparticelle funzionalizzate e senza comportare rischi per la salute dei pazienti.

1. INTRODUZIONE

1.1 Tessuto cardiaco

Negli ultimi anni, gli sforzi della ricerca si sono concentrati sullo studio e sul trattamento di patologie difficilmente risanabili con le tecniche convenzionali. Vi sono infatti organi e tessuti che in seguito a danneggiamento dovuto a specifiche patologie o a lesioni traumatiche sono difficili da trattare poiché presentano scarsa capacità rigenerativa. Tra gli organi in questione vi è il cuore, soggetto a sensibile perdita di funzionalità quando interessato da infarto del miocardio, che spesso presenta conseguenze come l'arresto cardiaco e la morte del paziente.

Il cuore è l'organo centrale dell'apparato circolatorio e ha la funzione di distribuire sangue, ossigeno e nutrienti al resto del corpo, rimuovendo i prodotti di scarto metabolico. Il cuore umano è un organo complesso composto da vari tipi di cellule, come cardiomiociti (CM), fibroblasti, cellule endoteliali, cellule interstiziali della valvola e cellule staminali cardiache. Le cellule del cuore sono molto attive dal punto di vista metabolico, in quanto richiedono fisiologicamente adenosina trifosfato (ATP) per il loro funzionamento. La proporzione di ciascuna popolazione cellulare nel cuore è ancora oggetto di discussione, ma è dimostrato che i CM occupano la maggior parte del volume cardiaco (circa il 75%) e rappresentano il 30-40% di tutte le cellule [1]. Il cuore è composto da tre strati principali: l'epicardio, il miocardio e l'endocardio, come riportato in Figura 1. L'epicardio è il sottile strato più esterno del cuore ed è costituito da tessuto connettivo, protegge il cuore e lo mantiene in posizione all'interno del torace. Il miocardio, invece, costituisce lo strato medio ed è composto principalmente da tessuto muscolare cardiaco. È responsabile della contrazione del cuore e pompa il sangue attraverso i vasi sanguigni. Questo strato spesso e robusto è composto principalmente da cellule muscolari cardiache, i cardiomiociti, che sono altamente specializzati nel contrarsi e rilassarsi in modo coordinato. Il miocardio è sottoposto a un costante apporto di sangue attraverso le arterie coronarie, che gli forniscono ossigeno e sostanze nutritive necessarie per il suo corretto funzionamento. Qualsiasi danno al miocardio può compromettere la sua capacità di contrarsi adeguatamente, portando a problemi cardiaci come l'infarto miocardico o l'insufficienza cardiaca. Infine, vi è l'endocardio, lo strato più interno del cuore costituito da un rivestimento sottile di cellule endoteliali. Esso riveste le cavità cardiache interne, inclusi gli atri (atrio destro e atrio sinistro) e i ventricoli (ventricolo destro e ventricolo sinistro), nonché le valvole cardiache. L'endocardio facilita il flusso del sangue all'interno del cuore e previene l'adesione dei globuli rossi alle pareti del cuore. Questi tre strati lavorano sinergicamente per garantire il corretto funzionamento del cuore e il flusso sanguigno in tutto il corpo.

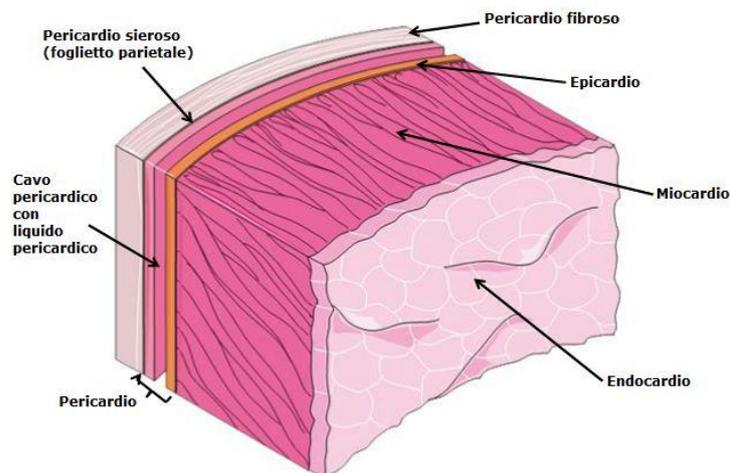


Figura 1: Schematizzazione dei principali strati del cuore: epicardio, miocardio ed endocardio [2]

1.1.1 Le malattie cardiovascolari e l'infarto del miocardio

Le malattie cardiovascolari (CVD) sono una delle principali cause di morte nel mondo secondo i più recenti dati del World Health Organization: circa 17 milioni di decessi sono dovuti a questo tipo di malattie che coinvolgono il cuore e i vasi sanguigni. Una percentuale significativa è dovuta all'infarto del miocardio (MI) e all'ictus [3]. La maggior parte di queste malattie può essere prevenuta in quanto legata a fattori di rischio quali ipertensione, diabete e iperlipidemia. Il cuore non ha un potenziale endogeno di riparazione o rigenerazione. Difetti nelle dimensioni o nel numero di cardiomiociti portano a complicazioni cardiovascolari correlate all'infarto del miocardio, potenzialmente letali. Attualmente, l'attenuazione delle CVD mediante farmaci e altre pratiche cliniche ha aumentato i tassi di sopravvivenza e migliorato la qualità di vita dei pazienti reduci da un danno tissutale. Tuttavia, questa risulta essere un rimedio di durata temporanea; una soluzione a lungo termine sarebbe invece il trapianto di cuore. La grave carenza di organi da donare, le complicazioni post-trapianto e l'efficacia limitata degli interventi farmacologici hanno tuttavia posto l'accento sulla necessità di studiare nuovi approcci terapeutici.

La causa principale di queste malattie cardiovascolari è l'aterosclerosi, ossia un processo di infiammazione acuta in cui si osserva un progressivo ispessimento e indurimento delle pareti di arterie di grandi e medie dimensioni dovuto alla formazione di placche composte da lipidi nel rivestimento più interno (Figura 2).

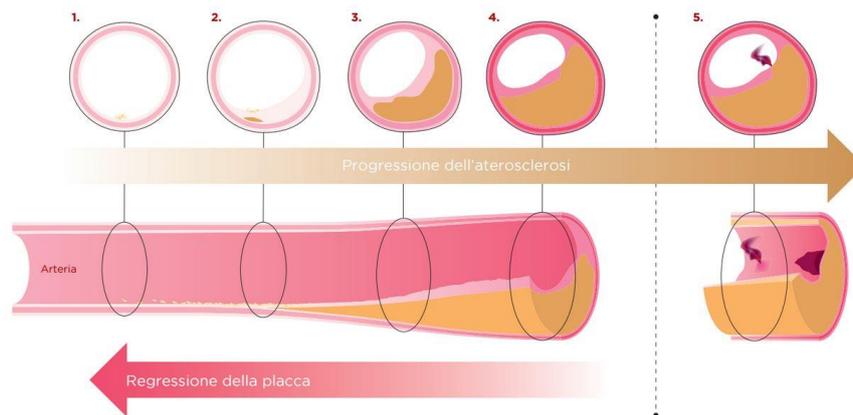


Figura 2: Rappresentazione schematica della progressiva occlusione di un'arteria in presenza di una placca aterosclerotica [4]

Le fasi del processo patologico dell'aterosclerosi sono: disfunzioni endoteliali, formazione di *fatty-streak*, formazione della capsula fibrotica e la sua instabilità (Figura 3). In seguito a cambiamenti a livello dell'endotelio come l'aumento della permeabilità, l'adesione di leucociti alle cellule endoteliali o la migrazione dei leucociti nelle arterie si verificano delle disfunzioni endoteliali. La modifica della permeabilità dell'endotelio conduce alla formazione delle *foam cells*, ossia lipoproteine a bassa densità responsabili del trasporto di colesterolo nel sangue presenti nell'arteria. Si formano in questo modo dei centri di accumulo di lipidi, componenti del sangue e altre sostanze del processo infiammatorio. Si verificano l'infiltrazione delle cellule T, l'aggregazione piastrinica e la migrazione delle cellule muscolari lisce. L'organismo risponde in difesa della lesione tramite la formazione di una capsula fibrotica: i lipidi, i leucociti e le altre cellule vengono ricoperti dalla capsula e si ha la formazione di un core necrotico. La capsula si presenta però instabile, vi è un'elevata attività proteolitica e una grande attività di degradazione della matrice extracellulare (ECM). La capsula può arrivare a rompersi e questo evento emorragico è associato alla formazione di trombi: si verifica quindi una parziale o totale occlusione del vaso.

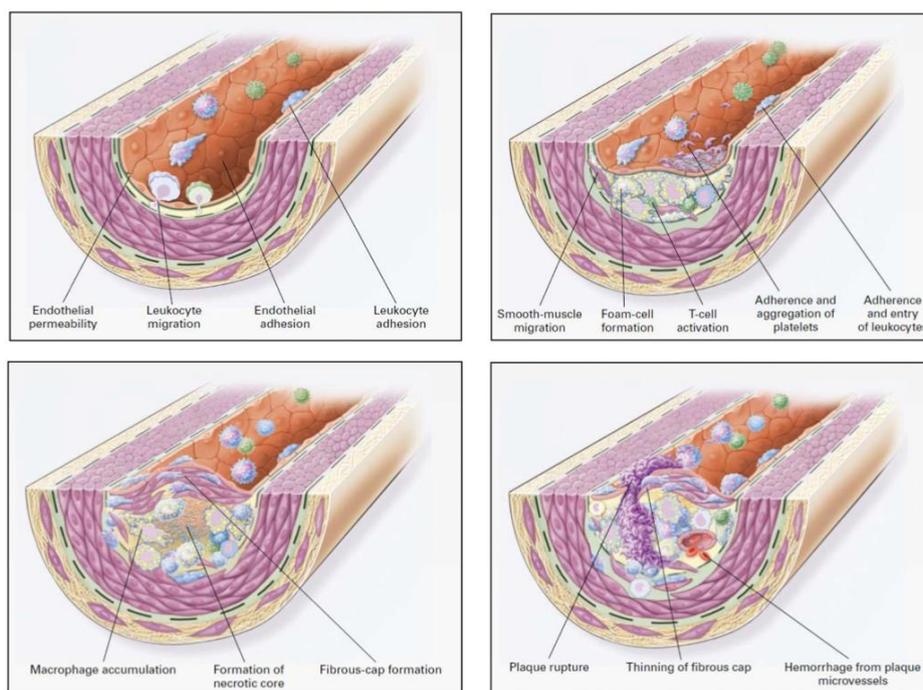


Figura 3: Fasi del processo patologico dell'aterosclerosi

Le cardiomiopatie si differenziano in cardiomiopatie ischemiche e non ischemiche sulla base della causa e le caratteristiche cliniche. Le cardiomiopatie ischemiche sono causate da un ridotto afflusso di sangue al muscolo cardiaco a causa di un'ostruzione delle arterie coronarie. L'ostruzione può essere dovuta a placche aterosclerotiche che restringono i vasi sanguigni o a un coagulo di sangue che blocca completamente il flusso. La mancanza di ossigeno e sostanze nutritive nel muscolo cardiaco può portare a danni permanenti alle cellule muscolari e a una ridotta capacità di contrazione del cuore. La cardiomiopatia ischemica è spesso associata all'infarto miocardico e può causare insufficienza cardiaca. Le cardiomiopatie non ischemiche non sono direttamente correlate a problemi di afflusso sanguigno al cuore. Le cause della cardiomiopatia non ischemica possono essere genetiche, acquisite o di natura sconosciuta.

Vi sono diverse tipologie di cardiomiopatia ischemica: malattia coronarica, malattie cerebrovascolari, arteriopatia periferica, trombosi venosa profonda ed embolia polmonare, cardiopatia reumatica e cardiopatia congenita. Tra le cardiomiopatie non ischemiche invece vi sono: cardiomiopatia dilatativa (DCM), ipertrofica (HCM), restrittiva (RC), aritmogena del ventricolo destro (ARVC).

Se le malattie cardiovascolari non vengono trattate tempestivamente si può arrivare al cosiddetto infarto del miocardio, ossia alla necrosi di una zona di tessuto muscolare cardiaco dovuto all'occlusione totale di un grosso ramo coronarico e quindi alla mancanza di afflusso sanguigno in quella zona. Al momento della rottura, la placca rilascia il suo contenuto trombogenerico causando

l'attivazione delle piastrine, l'avvio della cascata coagulativa, la formazione di un trombo murale e l'embolizzazione dei detriti aterosclerotici a valle, con conseguente necrosi dei miociti (Figura 4) [5].

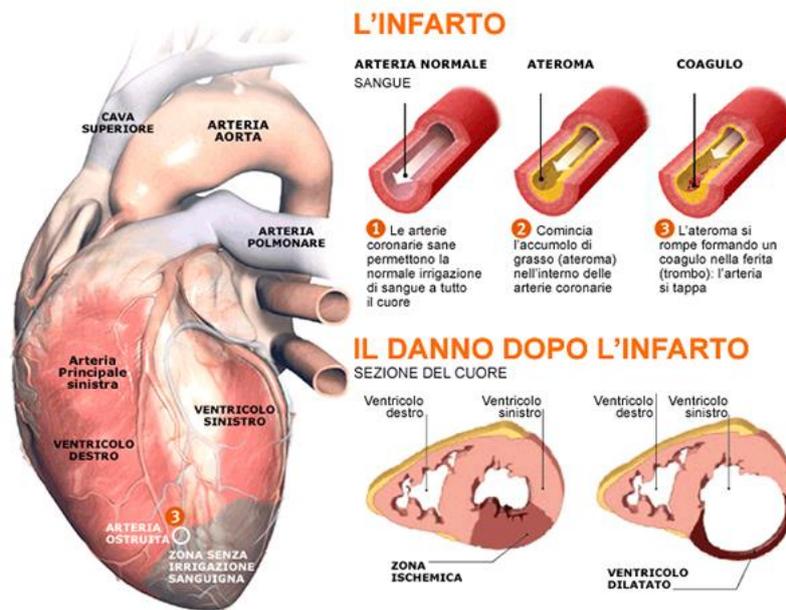


Figura 4: Rappresentazione della morfologia del cuore in seguito a infarto del miocardio [6]

In questa zona a causa della diminuzione dell'apporto di sangue si verifica la morte dei cardiomiociti. Queste cellule muscolari specializzate, sono necessarie per pompare in modo efficiente il sangue dal cuore al resto del corpo attraverso cicli di contrazione-rilassamento. In seguito, alla necrosi dei cardiomiociti, i miofibroblasti e i macrofagi migrano verso quest'area per la riparazione cardiaca. Queste cellule creano quindi un tessuto cicatriziale che ha l'obiettivo di mantenere l'integrità dell'organo ed evitare ulteriori danni, ma riduce notevolmente la capacità contrattile del cuore, portando infine all'insufficienza cardiaca. Nel momento in cui si verifica l'infarto, l'area del cuore interessata risulta essere gravemente infiammata e ricca di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Nel momento in cui si verifica l'infarto del miocardio è necessario intervenire tempestivamente in modo da ripristinare il flusso di sangue al cuore il più rapidamente possibile. Esso può avere conseguenze gravi sulla salute a lungo termine: può causare danni permanenti al muscolo cardiaco, riducendo la sua capacità di pompare il sangue e aumentando il rischio di insufficienza cardiaca. In alcuni casi, possono verificarsi aritmie cardiache o arresto cardiaco, che richiedono cure mediche immediate. Dopo l'inizio dell'ischemia miocardica la morte cellulare non è immediata, ma per svilupparsi richiede un periodo di appena 20 minuti o meno in alcuni modelli animali. Ci vogliono diverse ore prima che la necrosi miocardica possa essere identificata da un esame macroscopico o microscopico post mortem. La necrosi completa di tutte le cellule miocardiche a rischio richiede almeno 2-4 ore o più a

seconda della presenza di circolazione collaterale nella zona ischemica, dell'occlusione arteriosa coronarica persistente o intermittente, della sensibilità dei miociti all'ischemia, della precondizione e della domanda individuale di ossigeno e nutrienti del miocardio. Gli infarti miocardici possono essere classificati temporalmente in base alle caratteristiche cliniche e di altro tipo, nonché in base all'aspetto patologico, come in evoluzione (6 h), acuti (6 h-7 giorni), in guarigione (7-28 giorni) e guarito (29 giorni e oltre) [7].

All'esordio della malattia, il primo obiettivo del trattamento dell'infarto miocardico è quello di promuovere la riapertura della coronaria che si è occlusa. La tempestività dell'intervento in questa fase è di primaria importanza, per limitare il danneggiamento irreversibile del muscolo cardiaco. La disostruzione del lume della coronaria avviene mediante l'introduzione di un catetere dotato di palloncino gonfiabile all'apice, capace di passare attraverso il coagulo presente nel punto di massimo restringimento della coronaria stessa e di schiacciarne le componenti sulle pareti (angioplastica coronarica), seguito dal posizionamento di una protesi a rete all'interno del vaso (stent) che contribuisce a mantenerlo aperto dopo la disostruzione. In mancanza di angioplastica o della possibilità di raggiungere le coronarie con il catetere possono essere utilizzati i farmaci trombolitici, anche se non si possono utilizzare in tutti i pazienti, in quanto associati alla possibilità di produrre emorragie anche gravi. Vi sono inoltre altri tipi di farmaci che possono essere utilizzati per il trattamento dell'infarto miocardico come gli anticoagulanti, gli antiaggreganti, i betabloccanti, gli ACE inibitori e le statine. In tutti i casi in cui si sia rilevata una malattia coronarica grave o estesa non trattabile con l'angioplastica coronarica e lo stent si può ricorrere all'intervento di bypass coronarico che consiste nel creare chirurgicamente un canale di comunicazione fra l'aorta e la coronaria ristretta o ostruita a valle della lesione, mediante l'utilizzo di altre arterie (arteria mammaria interna) o vene (safena rimossa dagli arti inferiori). Normalmente, questo tipo di approccio non viene utilizzato in emergenza a meno che non vi sia assoluta necessità. In caso di mancata risoluzione del problema si ricorre al trapianto del cuore, che presenta tuttavia inconvenienti legati alla scarsità di donatori e al rischio di rigetto dell'organo donato.

1.1.2 Scarsa capacità rigenerativa del miocardio infartuato

Negli ultimi decenni, cardiologi e ricercatori del settore hanno considerato la possibilità di trattare le cardiomiopatie inducendo i cardiomiociti adulti (CM) a proliferare e generare nuova forza contrattile. Il processo rigenerativo del cuore dei mammiferi è un processo dipendente dall'età ed è già limitato nei neonati. La capacità dei CM di rigenerare il cuore umano risulta limitata con l'avanzare dell'età e in seguito a un danno [8]. Quando si verifica un danno, invece di produrre nuova massa muscolare

funzionale, il cuore umano è incline a proteggere la sua integrità depositando una cicatrice non conforme, mentre induce ipertrofia dei cardiomiociti. La risposta riparativa porta a gravi alterazioni strutturali e funzionali del cuore che spesso conducono all'insufficienza cardiaca e alla morte del paziente. Un importante fattore che contribuisce alla transizione verso l'insufficienza cardiaca è la formazione di un'eccessiva fibrosi che aumenta la rigidità ventricolare, facilita le aritmie e contribuisce alla disfunzione dell'organo. Negli ultimi anni, sono stati realizzati dei tentativi di migliorare la capacità di rigenerazione del miocardio infartuato [9]. Alcuni approcci terapeutici promettenti includono:

- Terapia cellulare: si vanno a trapiantare direttamente le cellule staminali o cellule progenitrici cardiache nell'ambiente lesionato in modo da cercare di riparare o sostituire le cellule muscolari danneggiate nel miocardio.
- Terapia genica: l'introduzione di geni specifici nel cuore può favorire la crescita di nuove cellule muscolari o la riduzione del tessuto cicatriziale.
- Ingegneria tissutale: sono state sviluppate tecniche per la creazione di tessuti cardiaci artificiali utilizzando una combinazione di biomateriali, cellule cardiache e fattori di crescita.
- Farmaci stimolanti la rigenerazione: sono in corso studi per identificare farmaci o molecole in grado di stimolare la capacità di rigenerazione delle cellule muscolari cardiache.

La terapia cellulare, nel campo della rigenerazione del tessuto cardiaco infartuato, ha come obiettivo quello di utilizzare cellule per riparare il tessuto cardiaco danneggiato e migliorarne la funzionalità. Alcuni approcci terapeutici studiati includono l'utilizzo di mioblasti scheletrici e cellule staminali come le cellule progenitrici endoteliali (EPC), le cellule staminali ematopoietiche (HSC) e le cellule staminali mesenchimali (MSC) [10]. Tra i vantaggi associati all'utilizzo di questo tipo di terapia vi sono il potenziale rigenerativo ed il fatto di utilizzare un approccio terapeutico minimamente invasivo (l'iniezione di cellule avviene tipicamente tramite l'utilizzo di un catetere riducendo al minimo il rischio di complicanze chirurgiche). Altro vantaggio è sicuramente la possibilità di implementare un trattamento personalizzato, in quanto le cellule possono derivare dal paziente stesso (autologhe) evitando il rischio di rigetto, o da donatori (allogeniche). Gli svantaggi legati a questo genere di terapia sono invece dovuti all'efficacia limitata, dal momento che l'ambiente infiammatorio e cicatriziale del cuore infartuato può compromettere la sopravvivenza e la funzionalità delle cellule trapiantate, oltre alla difficoltà nell'identificazione delle cellule adeguate. Inoltre, è emersa la limitata capacità delle cellule trapiantate di stabilire delle connessioni funzionali con i cardiomiociti [11] [12]. Un'altra possibile tecnica si basa sull'utilizzo di agenti in grado di stimolare la rigenerazione delle cellule muscolari cardiache. Un gruppo di ricercatori ha scoperto un farmaco genetico, chiamato microRNA-199, in grado di stimolare la rigenerazione del cuore nel maiale, portando

al recupero quasi completo della funzionalità cardiaca a un mese dopo l'infarto [13]. L'opzione più promettente degli ultimi decenni sembra però essere la riprogrammazione genetica delle cellule tramite vettori virali, al fine di stimolare la differenziazione di nuovi cardiomiociti; tuttavia, questa soluzione può portare a eventi genotossici e presenta problemi di sicurezza.

Alcuni ricercatori si sono concentrati sulla cardiomiogenesi, in particolare sui metodi per modificare il comportamento dei CM attraverso la terapia genica. In letteratura sono presenti lavori sulla riprogrammazione diretta dei fibroblasti della cicatrice cardiaca in CM utilizzando microRNA, al fine di indurre la differenziazione e la proliferazione [14]. In alcuni studi, i miRNA sono veicolati attraverso un vettore virale adeno-associato; tuttavia, ciò può portare a una proliferazione incontrollata delle cellule, con conseguenti mutazioni dannose [15] [16] [17].

Nell'ambito dell'ingegneria tissutale sono state utilizzate diverse strutture biomimetiche nanometriche, come gli scaffold elettrofilati, i peptidi auto-assemblati, i peptidi anfifilici e i complessi layer-by-layer (LbL). La preparazione degli scaffold è finalizzata alla riproduzione delle proprietà meccaniche, geometriche e superficiali della matrice extracellulare. Per quanto riguarda le proprietà meccaniche, lo scaffold deve presentare un modulo di Young che varia dalle decine di kPa a pochi MPa e deve essere in grado di sopportare le sollecitazioni associate ad ogni ciclo cardiaco. La struttura dello scaffold deve ricreare la struttura anisotropa del cuore e presentare pori interconnessi (di dimensione da decine a centinaia di μm) per indurre le cellule a migrare. La superficie dello scaffold è il primo elemento che si interfaccia con le cellule e ne influenza la risposta cellulare e la rigenerazione del tessuto. La bagnabilità gioca un ruolo molto importante nell'adesione e nello spreading cellulare; questi processi sono favoriti su superfici con moderata idrofobicità [18]. Uno dei principali problemi è la biodegradazione in quanto questi materiali, una volta impiantati, possono scatenare una reazione infiammatoria che può portare al danneggiamento del tessuto ingegnerizzato. Oltre a queste tecniche, ultimamente, vengono utilizzati anche altri componenti nanostrutturati, come i nanomateriali a base di carbonio (nanotubi di carbonio (CNT) e ossido di grafene (GO)), le nanoparticelle d'oro (GNP), le nanoparticelle di ossido di ferro (IONP), le nanoparticelle di silice meso-porosa (MSN) e i nanovettori polimerici (PC), che sono di particolare interesse per garantire la conduttività elettrica o per la somministrazione di farmaci cardioprotettivi. Negli ultimi decenni, le nanoparticelle (NPs) sono state ampiamente studiate per diverse applicazioni in medicina e nell'ingegneria tissutale e rappresentano il campo più promettente della ricerca attuale per veicolare farmaci, fattori di crescita e altre molecole terapeutiche direttamente nelle cellule. In particolare, l'uso di NPs per il trattamento della MI è già stato esplorato e potrebbe essere la soluzione migliore per superare le principali sfide dei trattamenti standard [19] [20]. L'incapsulamento di nanomateriali all'interno del costrutto tissutale biomimetico può favorire la regolazione delle proprietà biochimiche

e meccaniche nel microambiente cardiaco. Nonostante gli sforzi di ricerca, la rigenerazione completa del miocardio infartuato rimane una sfida complessa.

1.2 Sistemi per il rilascio di farmaci

I sistemi per il rilascio di farmaci (DDS) sono dei vettori che consentono di introdurre e rilasciare farmaci nell'organismo, controllando la velocità, i tempi, il sito di rilascio e le dosi di agente terapeutico da somministrare (Figura 5). Al giorno d'oggi vi è sempre più la necessità di trovare delle soluzioni alternative rispetto alle convenzionali tecniche di somministrazione dei farmaci per il trattamento di alcune patologie. I farmaci possono essere introdotti all'interno del corpo umano attraverso diverse vie anatomiche (parenterale, orale, cutanea o topica); la scelta della via di somministrazione dipende dal tipo di patologia che si sta andando a trattare, dall'effetto desiderato e dalla quantità di farmaco da somministrare. I farmaci possono essere rilasciati direttamente nel sito di interesse, quindi nell'organo che si vuole trattare, oppure per via sistemica e indirizzati all'organo patologico [21]. I sistemi convenzionali di somministrazione presentano diverse limitazioni rispetto ai sistemi a rilascio controllato. Idealmente si vorrebbe avere, con un'unica somministrazione, una concentrazione ematica di farmaco all'interno del range terapeutico di interesse. Questo comportamento risulta difficilmente raggiungibile con i sistemi convenzionali di somministrazione; infatti, risultano necessarie delle somministrazioni ripetute al fine di raggiungere la concentrazione di farmaco utile ai fini terapeutici. L'utilizzo di dosi elevate di farmaco è costoso e a volte mal tollerato dal paziente, correlato alla comparsa di effetti tossici indesiderati o alla perdita di efficacia del trattamento [22]. I sistemi per il rilascio di farmaci devono essere in grado di incapsulare la massima quantità di agente terapeutico senza disattivarlo, devono essere sito-specifici e selettivi (per consentire il rilascio del farmaco solo nel sito di interesse) e devono avere un'elevata stabilità, per garantire un tempo di circolazione sufficientemente lungo dopo la somministrazione [23]. Per controllare il rilascio dell'agente terapeutico è possibile preparare dei sistemi in grado di rispondere a stimoli interni o esterni modificando la loro struttura, sfruttando variazioni di pH, temperatura, enzimi, reazioni redox, oppure tramite l'applicazione di campi elettromagnetici, elettrici e ultrasuoni [24]. Con la nascita della nanomedicina, ossia la scienza che si occupa di applicare le nanotecnologie in campo medico, sono stati sviluppati un gran numero di dispositivi nanostrutturati in grado di soddisfare i requisiti necessari per essere definiti sistemi per il rilascio di farmaco o DDS. Nello specifico, le nanoparticelle trovano vasto impiego in questo campo. Le nanoparticelle sono oggetti con un diametro compreso tra 1 e 100 nm (definizione IUPAC) [25], che si comportano come un'unità intera in termini delle loro proprietà di trasporto. Esse possono essere costituite da lipidi, polimeri o materiale inorganico, in base all'applicazione e alle proprietà fisico-chimiche desiderate

per il sistema di rilascio di farmaco [26]. Vi sono diversi tipi di nano-trasportatori, tra i più importanti abbiamo: liposomi, micelle, nanoparticelle metalliche o polimeriche, dendrimeri e nanotubi di carbonio. Questi sistemi hanno la notevole capacità di transitare all'interno dei piccoli capillari, attraversare le barriere biologiche e penetrare nelle cellule, favorendo l'accumulo dei farmaci a livello dei siti bersaglio e in distretti altrimenti inaccessibili come il sistema nervoso centrale ed il tratto gastrointestinale [27]. Negli ultimi anni le nanotecnologie si sono dimostrate essere uno strumento molto innovativo e promettente per ripristinare la funzionalità cardiaca compromessa, consentendo il trasporto di farmaci cardioprotettivi e il rilascio prolungato di fattori di crescita. Nel trattamento delle cardiomiopatie, per ottenere una somministrazione ottimale di queste nanotecnologie sono state studiate diverse vie di somministrazione in base alle proprietà fisico-chimiche del farmaco/nanoparticella, all'effetto previsto e all'obiettivo desiderato. Le vie di somministrazione più comunemente utilizzate sono quella intravascolare, che comprende l'iniezione intra-cardiaca e intravenosa, e quella extravascolare, come l'inalazione. Alle diverse vie di somministrazione sono correlati vantaggi e svantaggi come la compromissione della vascolarizzazione, la fibrosi e l'infiammazione. Tuttavia, l'uso di sistemi basati sulle nanoparticelle per la riparazione cardiaca diretta è in ritardo nella fase preclinica [28].

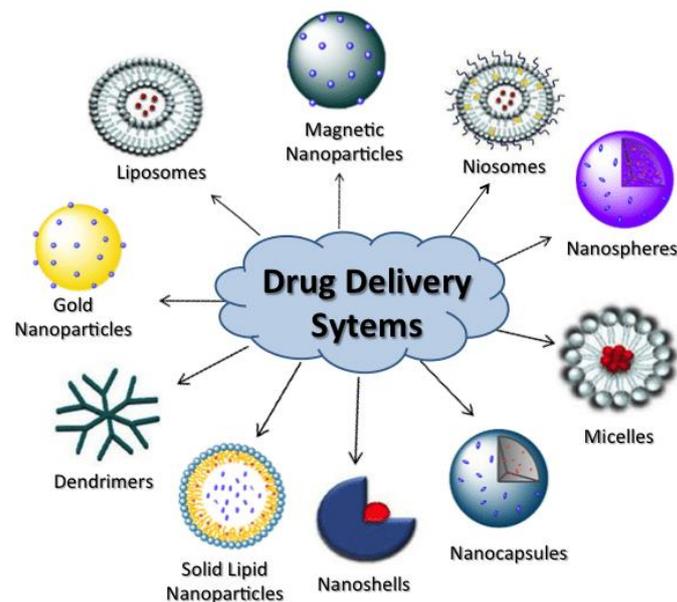


Figura 5: Rappresentazione schematica dei diversi tipi di DDS [29]

1.2.1 Nanoparticelle organiche

Le nanoparticelle organiche sono particelle solide di dimensioni nanometriche composte da materiali organici, come polimeri, lipidi e composti organici a base di carbonio. Le nanoparticelle organiche

offrono vantaggi come la possibilità di funzionalizzazione superficiale, la biocompatibilità, la stabilità chimica e la versatilità nella regolazione delle proprietà fisiche e chimiche. Possono essere progettate per avere dimensioni e forme specifiche, nonché per trasportare e rilasciare molecole bioattive come farmaci o agenti di contrasto. Alcuni esempi di nanoparticelle organiche sono: liposomi, nanoparticelle polimeriche, micelle e dendrimeri.

1.2.1.1 Liposomi

I liposomi sono vescicole micro o nanometriche composte da specie anfifiliche, come lipidi o fosfolipidi, che formano spontaneamente uno (unilamellare) o più (multilamellare) bilayer concentrici separati da compartimenti d'acqua (Figura 6). I lipidi espongono la loro testa idrofila verso l'esterno, mentre la coda idrofobica è diretta verso l'interno del bilayer. A seconda del numero di bilayer, le dimensioni delle particelle possono variare da circa 20 nm a diversi micrometri. I lipidi hanno proprietà molto versatili in termini di dimensioni, carica superficiale e composizione. Essi sono uno dei sistemi più interessanti grazie alla loro capacità di incorporare diverse tipologie di farmaco, proteine/peptidi e DNA. Nello specifico è possibile posizionare farmaci idrofilici nella parte interna del liposoma, mentre farmaci idrofobici vengono collocati all'interno del doppio strato. La composizione doppio strato lipidico del liposoma è molto simile a quella della membrana cellulare, fattore importante da un punto di vista dell'immagazzinamento del farmaco. Grazie alla superficie facilmente funzionalizzabile, i liposomi trovano largo impiego nel campo delle bionanotecnologie: inserendo gruppi funzionali specifici, è possibile favorirne il legame con molecole di interesse (come il polietilenglicole) per migliorarne la stabilità in vivo, o con molecole responsabili del riconoscimento selettivo di specifici tessuti e tipi cellulari [28] [30].

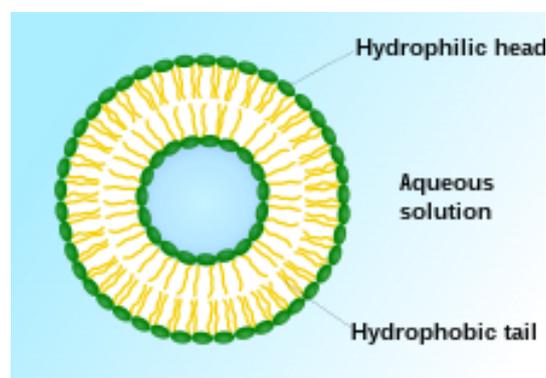


Figura 6: Rappresentazione schematica di un liposoma [31]

È stato inoltre studiato l'uso dei liposomi per individuare le cellule del sistema immunitario che regolano la risposta infiammatoria nel cuore infartuato [32]. L'utilizzo di queste nanoparticelle ha permesso di raggiungere le cellule del sistema immunitario nel sito dell'infiammazione aumentando e rendendo più efficace il riconoscimento.

1.2.1.2 Nanoparticelle polimeriche

Le nanoparticelle polimeriche per il rilascio di farmaci sono sistemi colloidali con dimensioni comprese tra 10 e 300 nm [25], costituiti da un materiale polimerico biocompatibile e biodegradabile (ad esempio acido polilattico o policaprolattone), e un agente terapeutico che può essere disciolto, intrappolato, incapsulato o attaccato alla matrice polimerica. I materiali polimerici garantiscono, rispetto ad altri materiali, una maggiore stabilità degli agenti farmaceutici, consentono un elevato caricamento dei farmaci, favoriscono il controllo sulla cinetica del rilascio del farmaco e possono essere facilmente modificati [33]. In base al metodo di preparazione si possono ottenere nanosfere o nanocapsule (Figura 7). Le nanocapsule sono sistemi in cui il farmaco è confinato in una cavità circondata da una membrana polimerica, mentre le nanosfere sono sistemi la cui matrice racchiude il farmaco, uniformemente disperso. Questo tipo di nanoparticelle si è dimostrato promettente nel trattamento delle malattie cardiovascolari [34].

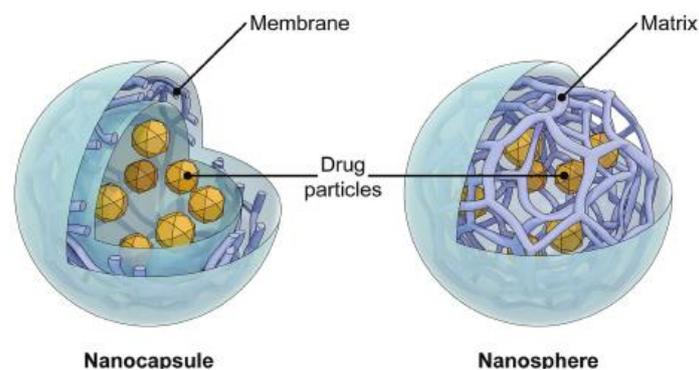


Figura 7: Rappresentazione schematica dei due tipi di nanoparticelle polimeriche in base al metodo di preparazione utilizzato [35]

1.2.1.3 Micelle

Le micelle sono strutture colloidali costituite da molecole anfifiliche, che presentano una parte idrofila e una parte idrofoba (Figura 8). In soluzione acquosa, queste molecole tendono a organizzarsi spontaneamente in strutture ordinate con cuore formato dalla frazione idrofoba (che può essere caricato con farmaci lipofili) ed un involucro esterno di natura idrofila (che conferisce solubilità al

sistema e previene il riconoscimento da parte del sistema immunitario, prolungando così l'emivita in circolo delle molecole veicolate). Gli agenti terapeutici contenuti all'interno delle micelle possono essere rilasciati per diffusione attraverso la matrice idrofobica o a seguito del disassemblamento della micella stessa, indotto solitamente da stimoli microambientali come variazioni di pH e temperatura [36].

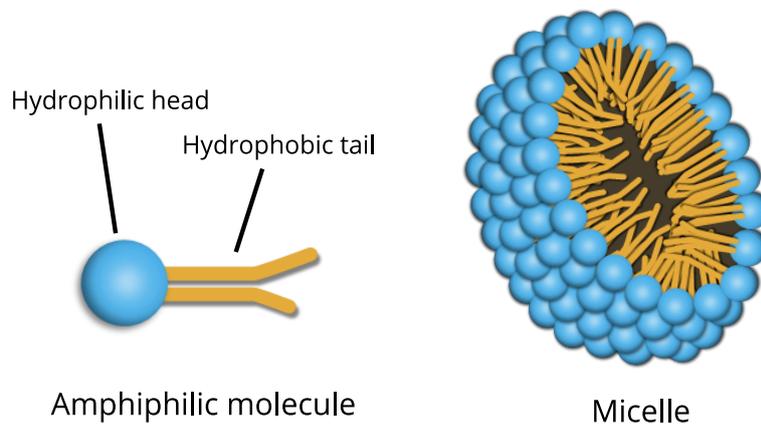


Figura 8: Rappresentazione della struttura di una micella [37]

1.2.1.4 Dendrimeri

I dendrimeri sono polimeri ramificati con una struttura a forma di albero tridimensionale (Figura 9). Queste molecole sono caratterizzate da una serie di ramificazioni multiple che si estendono da un nucleo centrale che funge da centro di nucleazione e si allargano in maniera progressiva verso la periferia.

Le ramificazioni che partono da un unico ramo formano una struttura definita dendrone, ogni ramificazione successiva è detta generazione (GN). Il dendrimero è il risultato dell'associazione di più dendroni. Il cuore centrale del dendrimero presenta una porosità maggiore rispetto alla porzione periferica: macromolecole o farmaci da veicolare vengono infatti caricati a livello di questa zona. I dendrimeri sono caratterizzati da una bassa citotossicità e solubilità e sono chimicamente stabili: queste proprietà li rendono degli ottimi candidati per il caricamento di farmaci, DNA e RNA [38] [39].

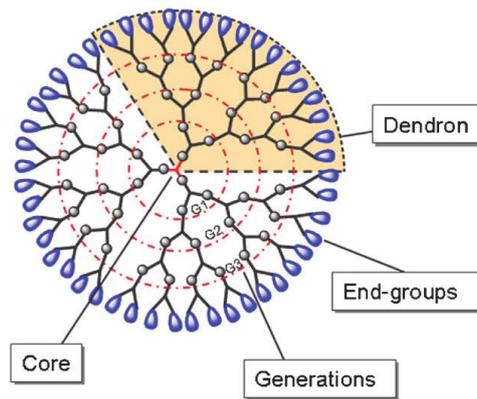


Figura 9: Rappresentazione schematica dei dendrimeri [40]

1.2.2 Nanoparticelle inorganiche

Le nanoparticelle inorganiche sono state recentemente oggetto di numerosi studi per applicazioni mediche e somministrazione di farmaci grazie alle loro proprietà fisiche, chimiche, biologiche e superficiali. Le nanoparticelle inorganiche sono particelle solide di dimensioni nanometriche (tipicamente inferiori a 100 nanometri) composte da materiali inorganici, come metalli, ossidi, semiconduttori e materiali ceramici. Rientrano in questa categoria le nanoparticelle d'oro, di argento, di ossidi metallici, di silice e i quantum dots (QD), che oltre ad avere una buona biocompatibilità presentano interessanti proprietà ottiche, magnetiche ed elettriche (Figura 10). Esse sono generalmente composte da un nucleo inorganico circondato da un guscio organico/inorganico, che conferisce maggiore biocompatibilità al sistema [28]. L'utilizzo delle nanoparticelle inorganiche offre numerosi vantaggi, ma è anche importante considerare i potenziali impatti sulla salute umana e sull'ambiente derivanti dal loro impegno.

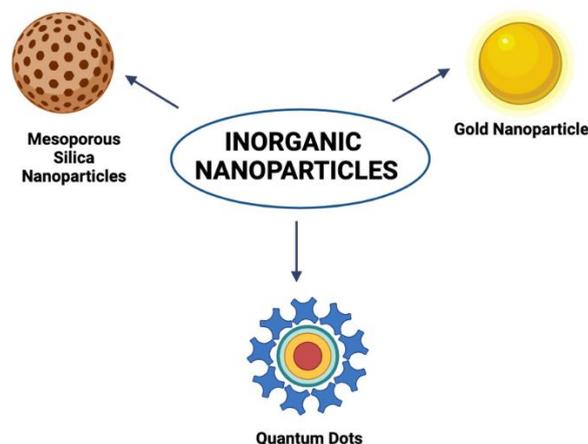


Figura 10: Rappresentazione di alcuni tipi di nanoparticelle inorganiche

1.3 Nanoparticelle di Silice Mesoporosa (MSN)

Tra le particelle inorganiche sono ampiamente studiate le nanoparticelle di silice mesoporosa. Le MSN sono materiali porosi costituiti da silice (biossido di silicio, SiO_2) con pori regolari di dimensioni comprese tra 2 e 50 nm, un'elevata area superficiale e una distribuzione controllata dei pori. Come riportato in Figura 11, queste proprietà consentono la larga applicazione delle MSN in campi come la catalisi, la sensoristica, l'immobilizzazione di enzimi ed il rilascio controllato di farmaci (Figura 11).

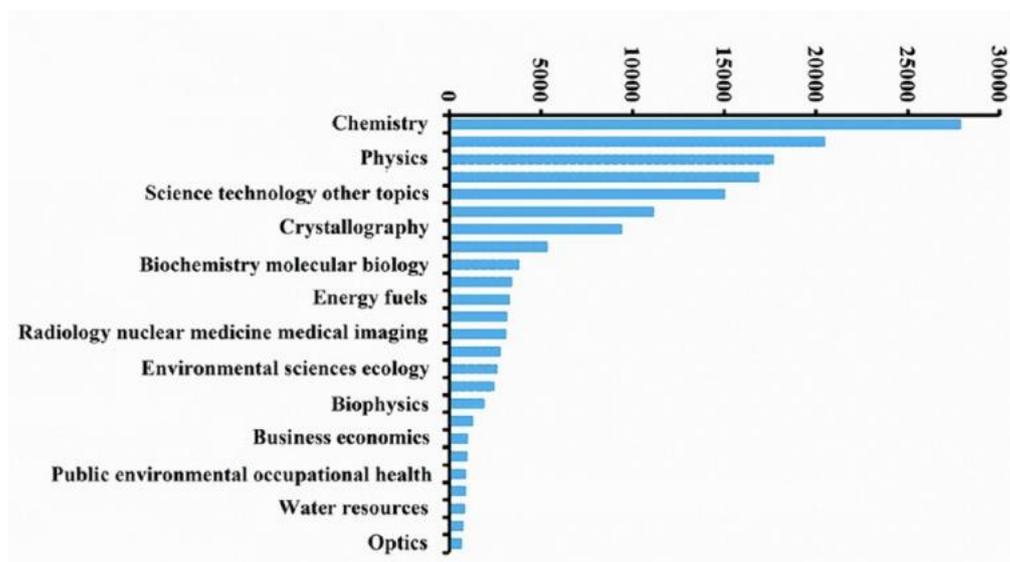


Figura 11: Grafico che mette in evidenza i diversi campi di applicazione delle MSN [41]

La silice è stata classificata sicura dalla Food and Drug Administration (FDA), nonché “riconosciuta generalmente come sicura” (GRAS, generally recognized as safe): è, pertanto, considerata un ottimo materiale per applicazioni biomediche. Le silici mesoporose possono essere impiegate per l’incorporazione di fluorofori, coloranti e agenti di contrasto per effettuare imaging diagnostico, ma il campo di studio più approfondito è legato al loro utilizzo come sistemi per il rilascio di farmaci, proposto per la prima volta nel 2001 per il rilascio di ibuprofene [42]. I nanovettori a base di silice mesoporosa possono essere usati per terapie antitumorali, per trattamenti antinfiammatori, per regolare il rilascio del farmaco in base alle condizioni circostanti e per aumentare la solubilità di farmaci scarsamente solubili, così da migliorarne l’efficacia. Le MSN si sono rivelate dei sistemi versatili per il rilascio di una varietà di agenti terapeutici (Figura 12), tra cui farmaci (come ibuprofene, doxorubicina e docetaxel), geni terapeutici (DNA plasmidico, oligonucleotidi antisense e siRNA), proteine e peptidi terapeutici (citocromo C e peptidi) [43] [44] [45].

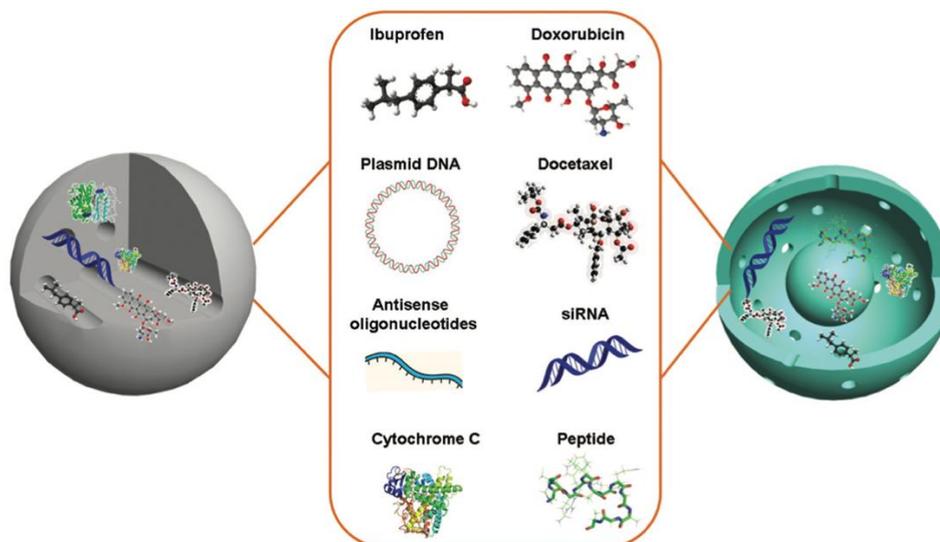


Figura 12: Le MSN utilizzate come vettori di farmaci, geni terapeutici, proteine e peptidi terapeutici [43]

1.3.1 Caratteristiche e proprietà delle MSN

Tra le proprietà che rendono interessanti le silici mesoporose in ambito biomedico vi sono: l'elevata area superficiale (più ampia di $700-1000 \text{ m}^2/\text{g}$), la geometria e le dimensioni regolabili dei pori (dai 2 ai 50 nm (Figura 13)), l'elevato volume dei pori (di circa $1 \text{ cm}^3/\text{g}$), la possibilità di introdurre funzionalizzazioni specifiche, la biocompatibilità e la possibilità di incorporare grandi quantità di farmaci [46]. È stato osservato che le nanoparticelle di dimensioni inferiori a 6 nm o le particelle biodegradabili possono essere facilmente escrete dall'organismo attraverso i reni, mentre le particelle di dimensioni inferiori a 15 nm sono in grado di attraversare la barriera emato-encefalica. Le nanoparticelle di dimensioni inferiori a 200 nm si accumulano preferenzialmente nelle cellule tumorali, sfruttando l'alterazione della vascolarizzazione delle aree tumorali [47].

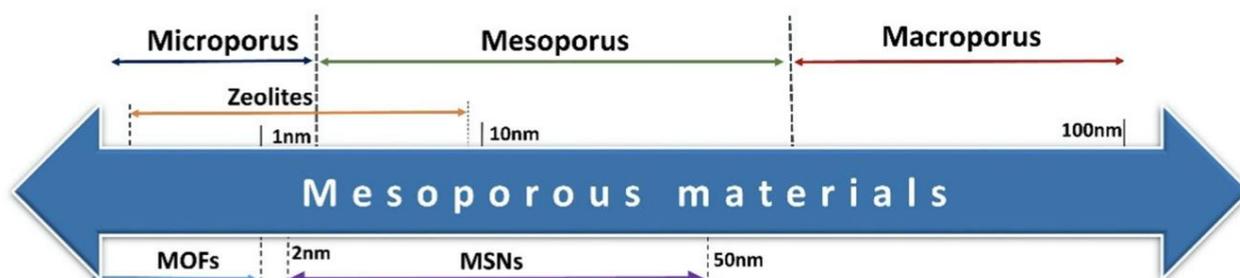


Figura 13: Rappresentazione schematica dei diversi tipi di materiali porosi per il trasporto di farmaci [48]

1.3.1.1 Area superficiale

L'area superficiale è un parametro molto importante in quanto, insieme al volume dei pori, determina la quantità di farmaco che può essere inserita all'interno delle particelle. Il fatto di poter adsorbire una maggiore quantità di farmaco sulla superficie consente una somministrazione più efficace e duratura. È sempre importante, in ogni caso, regolare la massima quantità di agente terapeutico che può essere inserita in modo da evitare problemi di tossicità [49]. Nelle MSN convenzionali è possibile caricare una dose di farmaco terapeutico di circa 200-300 mg (massimo circa 600 mg) in 1 g di silice [50]. MSN con struttura a nucleo cavo e guscio mesoporoso offrono invece più spazio per caricare i farmaci nelle cavità e possono ospitare più di 1 g di farmaco in 1 g di silice [50]. La dimensione delle particelle è una caratteristica molto importante per l'applicazione degli MSN come nanovettori di farmaci. In fase di sintesi delle MSN, il pH del mezzo di reazione gioca un ruolo fondamentale nella regolazione delle dimensioni delle particelle. La dimensione delle MSN può inoltre essere efficacemente controllata aggiungendo opportuni agenti additivi come alcoli, ammine, basi inorganiche e sali inorganici. Questi agenti influenzano le reazioni di idrolisi e condensazione del precursore di silice, accelerando la cinetica di reazione e dando luogo a particelle di dimensioni più piccole [24].

1.3.1.2 Porosità

La dimensione dei pori delle MSN per applicazioni biomedicali determina la taglia massima delle molecole che possono essere ospitate all'interno dei pori. Una caratteristica molto interessante di questi materiali è data dalla possibilità di regolare la dimensione dei pori in base ai reagenti impiegati per la sintesi. Nello specifico, un ruolo fondamentale è giocato dalla scelta del tensioattivo: tensioattivi a catena lunga producono MSN con pori più grandi, mentre quelli con catene corte risultano in MSN con pori più piccoli [51, 52, 53]. Per la sintesi di MSN per applicazioni biomediche sono comunemente utilizzati esadeciltrimetilammonio bromuro (CTAB), che porta alla formazione di pori di taglia tra 2-3 nm, e Pluronic P123 che consente di ottenere mesopori tra 8-10 nm [54].

1.3.1.3 Funzionalizzazione superficiale

Le particelle di silice mesoporosa possono essere funzionalizzate superficialmente con specifiche molecole oppure al loro interno per legare farmaci specifici: questo consente di modulare le proprietà chimiche delle particelle, di adattare alla specifica applicazione e di migliorare la selettività e l'efficacia del rilascio del farmaco. La funzionalizzazione superficiale delle MSN viene spesso fatta per limitare l'azione del sistema immunitario: una volta inseriti all'interno del corpo questi materiali vengono riconosciuti come estranei e la prima azione che il nostro corpo attua come meccanismo di

difesa è la loro eliminazione [55]. La funzionalizzazione esterna permette inoltre di legare sulla superficie delle MSN molecole biologiche che devono essere portate nel sito di interesse. La funzionalizzazione superficiale delle MSN consente inoltre di favorire il legame con molecole specifiche. Una funzionalizzazione interna alla struttura porosa delle MSN permette invece di migliorare l'interazione tra questi materiali e le molecole che vengono inserite all'interno, che possono essere ad esempio farmaci idrofobici o idrofilici [56].

1.3.1.4 Rilascio di farmaco

Il profilo di rilascio del farmaco dipende dall'interazione di questo con i pori del materiale in cui è ospitato. Le MSN sono molto utilizzate come nanovettori di farmaci in quanto consentono il rilascio del farmaco tramite degli stimoli come il pH, la temperatura, gli ultrasuoni, la luce, che causano la frammentazione del materiale o l'apertura dei pori. Il rilascio controllato, infatti, migliora l'efficacia del farmaco e riduce gli effetti collaterali negli altri tessuti [57].

1.3.1.5 Biocompatibilità e biodistribuzione

La biocompatibilità e la biodegradabilità sono due fattori importanti nella progettazione di particelle che devono circolare all'interno dell'organismo umano. Le MSN sono generalmente considerate biocompatibili, il che significa che hanno una bassa tossicità e sono ben tollerate dai tessuti biologici. Ciò è in parte dovuto alle proprietà chimiche e fisiche della silice, che è un materiale inorganico inerte e ampiamente utilizzato in campo biomedico. La superficie delle MSN può essere modificata per migliorarne la biocompatibilità attraverso la funzionalizzazione con gruppi organici, che possono migliorare l'interazione con i componenti biologici. Un vantaggio significativo delle MSN è la loro capacità di degradarsi nel tempo all'interno dell'ambiente biologico. A differenza di altre nanoparticelle inorganiche, che possono accumularsi nei tessuti nel lungo termine, le MSN sono progettate per essere biodegradabili, consentendo la loro eliminazione progressiva dal corpo. La degradazione delle MSN avviene principalmente attraverso l'idrolisi dei legami della silice, che porta alla frammentazione delle particelle in strutture più piccole che il corpo può espellere attraverso vie fisiologiche. Tuttavia, sono in corso studi su queste particelle data la loro difficoltà a degradarsi completamente; infatti, si è notato che in seguito alla somministrazione esse tendevano ad accumularsi prevalentemente nel fegato e nella milza [58].

1.3.2 Diverse tipologie di MSN

Nel 1992, i ricercatori della Mobil Research and Development Corporation hanno annunciato la sintesi di una nuova famiglia di solidi mesoporosi a base di silice, chiamati M41S [46]. Il materiale M41S è noto come MCM-41 (Mobil Composite of Matter) ed è uno dei nanovettori più esplorati per la somministrazione di farmaci [59]. Oltre a questo, sono stati sintetizzati diversi altri materiali di natura mesoporosa, variando i precursori di partenza e le condizioni di reazione. Questi possono variare nella loro disposizione strutturale o nella dimensione dei pori. Ad esempio, MCM-48 ha una disposizione dei pori cubica, mentre MCM-50 presenta una disposizione a lamelle.



Figura 14: Differenti materiali appartenenti alla famiglia M41S [60].

Tra le principali proprietà di MCM-41 vi sono diametro dei pori compreso tra 2.5 nm e 6 nm, struttura porosa molto regolare con geometria esagonale, elevata area superficiale (oltre $1000 \text{ m}^2/\text{g}$), stabilità termica (oltre i 400°C) e resistenza nei confronti di acidi. Un'altra famiglia di silici mesoporose di interesse in ambito biomedico e catalitico è costituita dai SBA (Santa Barbara Amorphous). La preparazione di SBA richiede precursori e condizioni di sintesi diverse da quelle impiegate per MCM, che portano alla formazione di silici mesoporose con pori più grandi (4,6-30 nm) e pareti più spesse. Altre tipologie di silici mesoporose sono le KIT (Korea Advanced Institute of Science and Technology), le MSU (Michigan State University), le HMS (Hexagonal Mesoporous Silica), le PCH (Porous Clay Heterostructure) e le FSM (Folded-sheet Mesoporous Material) [46].

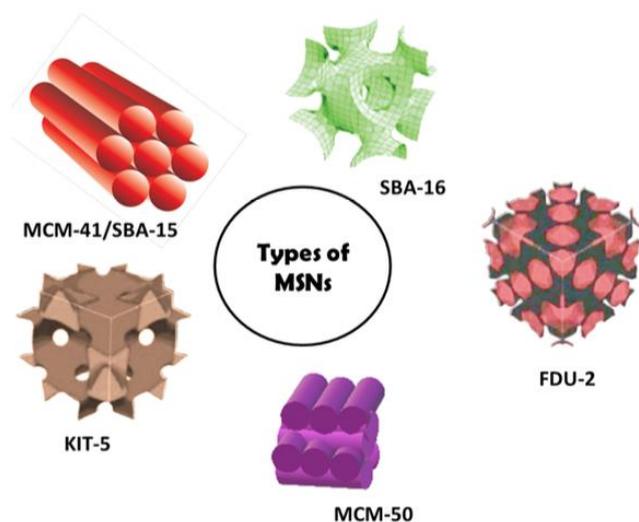


Figura 15: Rappresentazione di alcuni tipi di MSN [46]

1.3.3 Metodi di sintesi delle nanoparticelle di silice mesoporosa (MSN)

Per l'applicazione delle MSN come vettori di farmaci è necessario preparare nanoparticelle di dimensioni uniformi e controllate ed aventi pori di volume sufficientemente elevato per ospitare il farmaco. Queste caratteristiche possono essere controllate durante la sintesi variando i parametri di reazione, quali il pH, la temperatura, la concentrazione del tensioattivo e la fonte di silice. Werner Stöber, considerato un pioniere nel campo della produzione di silici, pubblicò nel 1968 insieme al suo gruppo di ricerca uno studio riguardante la possibilità di sintetizzare particelle sferiche monodisperse di silice amorfa con dimensioni micrometriche attraverso un sistema di reazioni chimiche di tipo *sol-gel* [61]. Il metodo Stöber originale coinvolge la reazione di un precursore, come il tetraetilortosilicato (TEOS), che viene idrolizzato in una soluzione di acqua e alcol ed in presenza di ammoniaca come catalizzatore basico. In assenza di ammoniaca si è osservato l'ottenimento di particelle di silice di forma irregolare. La reazione produce inizialmente una miscela di etossisilanoli e acido ortosilicico. Le reazioni di idrolisi e condensazione portano alla formazione di un sistema a base silice sufficientemente stabile ma privo di una porosità ordinata. Il lavoro svolto da Stöber ottenne due importanti risultati: la possibilità di controllare la dimensione e la forma delle particelle variando le condizioni di sintesi e la capacità di ottenere silice amorfa anche a temperatura ambiente. Tale procedimento fu, infatti, un punto di partenza per lo studio della crescita delle micro e nanoparticelle di silice. Nell'ottica di sintetizzare particelle di silice mesoporosa con un buon controllo sulla loro dimensione e morfologia, nel 1997 Grün e altri ricercatori hanno modificato il processo di Stöber introducendo tra i reagenti un surfattante con funzione di templante, ottenendo materiali mesoporosi

ma in forma di micro e nano particelle e con un range dimensionale molto più stretto [62]. Infatti, il metodo di sintesi attualmente più utilizzato per ottenere le nanoparticelle di silice mesoporose è il metodo Stöber modificato [24]. Il metodo modificato apporta numerosi vantaggi rispetto al metodo tradizionale: esso consente infatti di ottenere particelle di dimensioni più controllate e uniformi. Il metodo Stöber modificato offre inoltre la possibilità di ottenere particelle di silice con morfologie diverse da quelle classiche sferiche del metodo Stöber. L'utilizzo di solventi organici o l'uso di templanti o molecole specifiche può favorire la formazione di strutture più complesse, come particelle a forma di bastoncino, a forma di ellisse o a parete sottile. L'aggiunta di solventi organici alla soluzione di reazione (come l'etanolo o l'isopropanolo) può infatti influenzare la velocità di condensazione e la crescita delle particelle di silice, consentendo il controllo delle dimensioni e della morfologia delle particelle sintetizzate. Aggiungendo appositi reagenti in fase di sintesi, risulta inoltre possibile funzionalizzare le particelle di silice con agenti silanizzanti o molecole organiche contenenti gruppi funzionali specifici, che si legano alla superficie della silice direttamente durante il processo di formazione delle particelle. Variando le condizioni di sintesi è quindi possibile ottenere particelle aventi le proprietà ottimali per la loro applicazione finale, che è tipicamente in ambito catalitico, ottico, sensoristico e biomedico.

Vi sono tuttavia degli svantaggi nell'utilizzare il processo modificato rispetto a quello tradizionale. Il metodo Stöber modificato risulta essere più complesso in quanto, al fine di ottenere i risultati desiderati, è necessario prestare maggiore attenzione alla scelta delle condizioni di reazione, dei rapporti di miscelazione e dei tempi di reazione. Inoltre, l'utilizzo di solventi organici in questo metodo può richiedere passaggi aggiuntivi di rimozione totale del solvente residuo e altri eventuali contaminanti per ottenere silici di alta qualità [63].

1.3.3.1 Metodo sol-gel

Il metodo sol-gel è un processo bottom-up ampiamente utilizzato per la sintesi di materiali organici e inorganici, e rappresenta il principale metodo utilizzato per la realizzazione delle MSN. Esso prevede una serie di reazioni che comportano la trasformazione di un materiale dallo stato *sol* allo stato *gel* (Figura 16). Con *sol* si intende generalmente una soluzione colloidale di piccole particelle solide disperse in un liquido, mentre con *gel* un reticolo inorganico continuo contenente una fase liquida interconnessa.

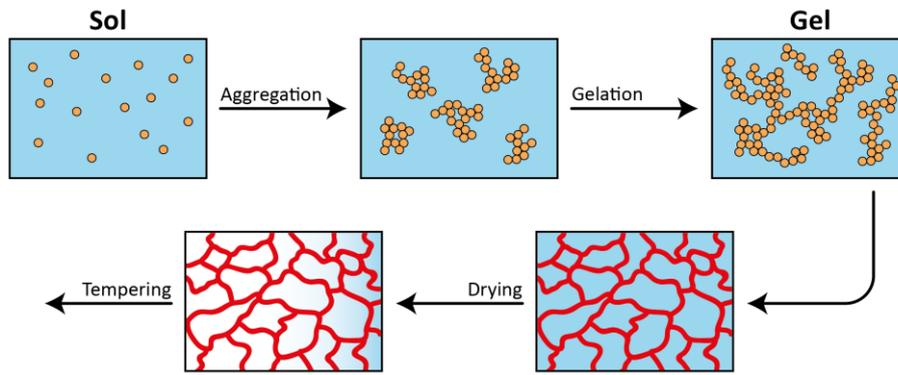


Figura 16: Rappresentazione schematica processo sol-gel [64]

La procedura generale del sol-gel comprende due fasi fondamentali, la prima è quella di idrolisi dei gruppi alcossidici e la seconda è la condensazione che porta alla formazione di un sistema reticolato. Le due reazioni procedono contemporaneamente e la loro velocità determina la qualità del prodotto finale [65]. In seguito alle reazioni di idrolisi e condensazione vi sono le fasi di crescita e aggregazione. Un tipico processo sol-gel avviene in presenza di un catalizzatore acido o di una base. Il tasso di idrolisi procede in genere più velocemente in condizioni basiche rispetto a quelle acide [24]. Il processo sol-gel inizia con la preparazione di una soluzione contenente precursori chimici in forma di sali metallici o composti organici. Questi precursori possono essere ossidi, idrossidi o alcossisilani, a seconda del materiale che si desidera sintetizzare. Gli alcossisilani più comunemente utilizzati sono il tetrametossisilano (TMOS) e il tetraetossisilano (TEOS). La soluzione viene preparata mescolando i precursori in un solvente organico o acquoso e attraverso processi di idrolisi e condensazione si ha la formazione della soluzione colloidale detta “sol”. Le reazioni coinvolte nella sintesi sol-gel sono riportate in Figura 17.

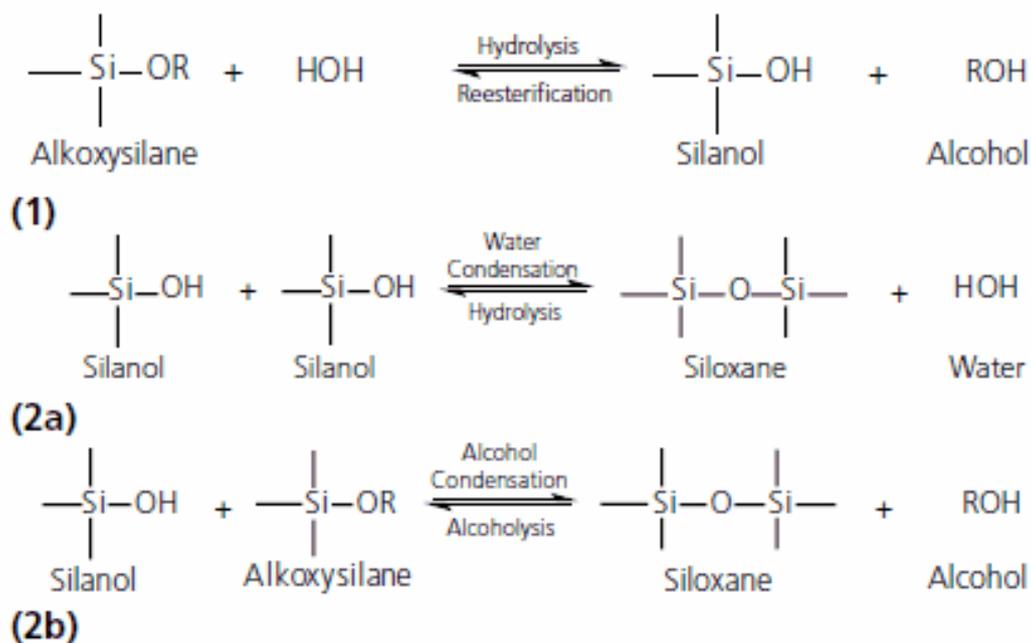


Figura 17: Schema reazioni sol-gel [66]

Nella prima reazione si ha l'idrolisi di una molecola di alcossilano in presenza di acqua con conseguente formazione di un silanolo ($\equiv\text{Si-OH}$) e di una molecola di alcol. La seconda reazione consiste nella condensazione tra due molecole di silanolo con formazione di un ponte silossano ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$) e di una molecola d'acqua (reazione 2a in figura 17) o tra un silanolo ed un alcossilano con formazione di un ponte silossano e di alcol (2b). I ponti silossano sono legami forti e all'aumentare del loro numero le particelle di silice possono raggrupparsi formando degli aggregati. La condensazione di questi porta alla formazione di un gel che "intrappola" l'acqua e i sottoprodotti dell'alcol. L'aggiunta di un agente gelificante alla soluzione provoca la formazione di una rete tridimensionale di legami chimici tra le particelle o le molecole presenti. L'agente gelificante può essere un acido o una base che reagisce con i precursori per formare legami chimici attraverso polimerizzazione o condensazione. La polimerizzazione avviene in tre fasi consecutive: la polimerizzazione del monomero per formare i primi dimeri, la crescita e la connessione delle particelle nella catena con la fase continua liquida, fenomeno che porta alla formazione del gel. Una volta formato, il gel può essere sottoposto a trattamenti termici o chimici per eliminare il solvente residuo e consolidare la struttura. Questi trattamenti possono includere processi di essiccazione, calcinazione o sinterizzazione, a seconda delle proprietà desiderate del materiale finale.

La struttura mesoporosa è ottenuta tramite l'utilizzo di un agente templante (structure directing agent, SDA), ossia un tensioattivo o un copolimero a blocchi anfifilico che, disciolto in soluzione acquosa in condizioni opportune, è in grado di auto-assemblarsi. Esistono due differenti meccanismi per la creazione della struttura porosa: il *Liquid-Crystal Templating* e il *Cooperative Self-Assembly*. Nel

primo caso il tensioattivo è presente a concentrazioni maggiori rispetto alla concentrazione critica micellare (CMC), mentre nel secondo caso si utilizzano concentrazioni di tensioattivo basse e il precursore della silice promuove l'assemblaggio e la formazione delle micelle.

Poichè la reazione di condensazione avviene sulla loro superficie, le micelle direzionano la crescita della mesostruttura, determinano la dimensione dei pori (definita dalla lunghezza delle code idrofobiche del tensioattivo) e, in base all'impaccamento che creano tra loro, l'ordine della mesostruttura. A temperature più elevate le micelle sono più grandi e si dispongono più ordinatamente, ma anche la concentrazione ha influenza sull'ordine della struttura. Infatti, mentre al di sopra della prima CMC le molecole di tensioattivo si autoassemblano in micelle isotropiche, è necessario andare a concentrazioni di tensioattivo superiori (seconda concentrazione critica micellare, CMC2) affinché le micelle si assemblino in strutture sopramolecolari cilindriche (Figura 18). La formazione delle micelle, oltre che dalla concentrazione, dipende anche da altri fattori come la temperatura, il pH, il solvente utilizzato e la presenza di altre molecole in soluzione.

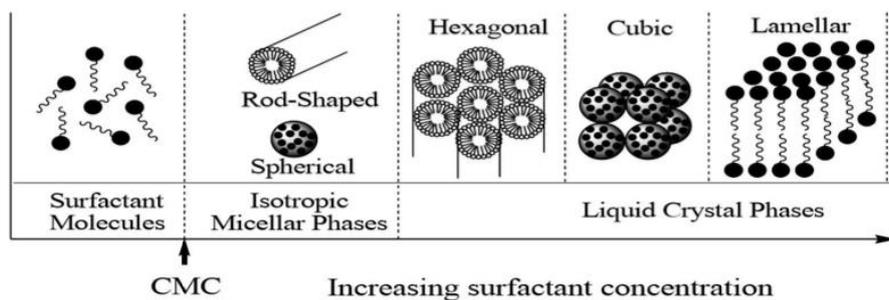


Figura 18: Impatto della concentrazione nel cambiamento di fase del tensioattivo [60]

A pH basico si ha l'interazione tra la silice che presenta una carica negativa e il surfattante che presenta una carica positiva (Figura 19). Il meccanismo di formazione della silice mesoporosa può essere riassunto nei seguenti punti (Figura 20):

1. Le molecole di tensioattivo, presenti nella soluzione in concentrazione adeguata, si autoassemblano formando micelle cilindriche. A loro volta, le micelle si organizzano in aggregati di forma esagonale che non condensano tra loro grazie alla loro carica superficiale.
2. Viene aggiunto il TEOS che va incontro a reazioni di idrolisi e condensazione; piccoli oligomeri di silice negativi si vanno a posizionare sulle micelle positive di tensioattivo riducendone la carica superficiale e favorendo l'avvicinamento tra le micelle.

3. In seguito alle reazioni di condensazione e ai fenomeni di aggregazione si ottiene una struttura mesoporosa ibrida organica-inorganica, formata da silice con porosità occupate dalle micelle di tensioattivo.
4. Tramite processi di calcinazione o estrazione tramite solvente si va a rimuovere il surfattante ottenendo alla fine del processo la silice mesoporosa inorganica.

L'idrolisi e la condensazione possono essere catalizzate sia a pH acidi che basici ma danno poi origine a polimeri strutturati in modo differente. Se il TEOS viene catalizzato in soluzione basica dà origine a SiO_4 , dalla cui polimerizzazione si viene a formare un reticolo tridimensionale. Se invece viene catalizzato in una soluzione acida tende a formare polimeri reticolati.

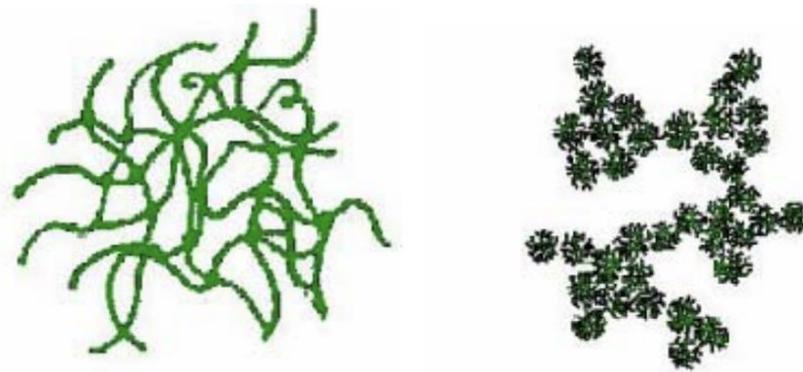


Figura 19: Rappresentazione delle diverse strutture che si ottengono in base al tipo di catalisi scelta: acida (sinistra) e basica (destra) [60]

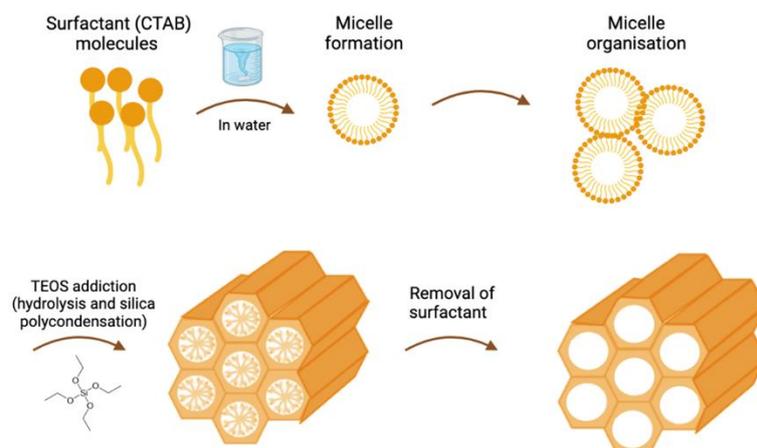


Figura 20: Schematizzazione del processo sol-gel

Il metodo sol-gel è ampiamente utilizzato per la sintesi di nanoparticelle di silice mesoporosa: tra i vantaggi più rilevanti legati a questa metodologia vi è la possibilità di controllare le proprietà delle MSN ottenute [67]. I parametri di sintesi come il tipo di reagenti ed il loro rapporto, il pH e la temperatura possono essere regolati per ottenere nanoparticelle con dimensioni dei pori specifiche e

area superficiale desiderata. È quindi possibile ottenere materiali ordinati a livello nanostrutturale, con pori di dimensioni uniformi e distribuzione dei pori omogenea, impiegabili per applicazioni nella catalisi e nella filtrazione, oltre che in campo biomedico. Il metodo sol-gel consente inoltre la funzionalizzazione delle MSN con gruppi chimici specifici in grado di conferire alle nanoparticelle la capacità di legare specifiche molecole o di reagire con determinati composti. È inoltre possibile incorporare altre sostanze, come metalli o molecole biologicamente attive, all'interno della struttura di silice mesoporosa. Il metodo sol-gel può infine essere facilmente adattato per la sintesi di nanoparticelle di silice mesoporose su scala industriale: ciò rende il processo adatto per la produzione su larga scala di materiali mesoporosi per applicazioni commerciali.

Tuttavia, tra gli svantaggi del metodo sol-gel vi sono i tempi di sintesi relativamente lunghi, legati alla necessità di permettere l'idrolisi e la condensazione dei precursori, oltre alla maturazione delle strutture. Il tempo di sintesi può variare da diverse ore a giorni, a seconda delle condizioni e delle dimensioni delle particelle desiderate: questo aspetto può limitare l'applicabilità del metodo sol-gel in applicazioni che richiedono una rapida produzione di nanoparticelle. Alcuni precursori utilizzati nel metodo sol-gel risultano inoltre piuttosto costosi, influenzando sul costo complessivo del processo di sintesi. Un altro limite del metodo sol-gel è legato alla necessità di una certa competenza e familiarità con le tecniche di sintesi ed i parametri di processo per realizzare il processo in modo efficace e riproducibile. Il controllo delle condizioni di sintesi come il pH della soluzione, la temperatura e il rapporto tra i reagenti, è fondamentale per ottenere MSN con la struttura e le proprietà desiderate. In condizioni non ottimali è possibile ottenere particelle poco uniformi a livello granulometrico e morfologico e si possono verificare fenomeni di aggregazione, in grado di influire negativamente sulla struttura e sulla uniformità dei pori delle nanoparticelle di silice mesoporosa. Nonostante questi svantaggi, il metodo sol-gel è attualmente considerato il metodo d'elezione per la realizzazione di silici mesoporose.

1.3.3.2 Metodi alternativi al sol-gel

Oltre al metodo sol-gel, in letteratura sono proposti altri metodi per la sintesi di silici mesoporose. Tra questi si annovera il metodo EISA (Evaporation-Induced Self-Assembly) che permette di realizzare la struttura mesoporosa tramite l'auto-assemblaggio indotto dall'evaporazione di solventi. La formulazione di precursori nella concentrazione richiesta viene preparata in solvente etanolo/acqua con un tensioattivo. Tramite iniezione in un generatore di aerosol, la formulazione è convertita in gocce monodisperse la cui dimensione può essere controllata modificando l'orifizio. L'evaporazione del solvente durante l'essiccazione induce la formazione di micelle e il co-assemblaggio di silice e tensioattivo in mesofasi liquido-cristalline: in questo stadio avviene la

condensazione del precursore della silice e si creano i legami alla base della struttura. Successivamente, il materiale viene sottoposto a trattamento termico per promuovere una maggiore condensazione e consentire la rimozione del surfattante [68]. Il metodo EISA permette di controllare in maniera precisa la struttura porosa e ordinata delle nanoparticelle di silice mesoporosa, ma presenta diversi svantaggi come la complessità delle condizioni di sintesi che devono essere accuratamente ottimizzate per ottenere la struttura desiderata, i tempi di processo lunghi e la difficoltà nel rimuovere accuratamente il surfattante [46].

Un approccio elettrochimico assistito a basso costo per sintetizzare gli MSN su larga scala è invece stato proposto da Ding e Su [69]. La formazione di MSN si ottiene tramite un approccio elettrochimico applicato al metodo sol-gel, che permette di produrre le nanoparticelle su un substrato conduttivo come l'acciaio inossidabile. La MSN si formano in seguito alla deposizione elettrochimica di idrossido in prossimità dell'interfaccia substrato/soluzione che porta all'autoassemblaggio di micelle di tensioattivi e alla policondensazione dei precursori di silice. Questo metodo sfrutta i principi dell'elettrochimica per controllare la nucleazione e la crescita delle particelle di silice, riuscendo a garantire un'elevata precisione per quanto riguarda la forma, le dimensioni e le loro proprietà.

Vi sono tuttavia diverse problematiche legate a questo tipo di approccio, quali la complessità sperimentale che ne limita l'applicazione su larga scala.

Altra tecnica che permette di sintetizzare le silici è quella assistita da microonde, ossia un metodo di sintesi chimica che utilizza l'irradiazione di microonde per riscaldare e attivare le reazioni chimiche in modo rapido ed efficiente. Questa tipologia di sintesi offre numerosi vantaggi in termini di velocità di reazione, resa di prodotto e selettività. Le principali limitazioni sono legate ai costi dell'attrezzatura, alla selezione dei reagenti e al controllo della temperatura. La sintesi di silici assistita da microonde consente tuttavia di ottenere rapidamente MSNs con disposizione ordinata dei pori [70].

Un altro metodo rapido ed economico per la fabbricazione di MSN è la sintesi sonochimica. Sfruttando i fenomeni di cavitazione fotoacustica, è possibile ottenere MSN ordinati in tempi brevi. Anche in questo caso vi sono delle limitazioni come l'aumento locale della temperatura in seguito all'applicazione degli ultrasuoni che potrebbe andare a influenzare le reazioni chimiche, la possibile formazione di aggregati e la necessità di apparecchiature specializzate [71].

1.3.4 Caricamento del Farmaco

L'utilizzo di nanoparticelle come vettori di farmaci è aumentato notevolmente negli ultimi anni grazie alla loro capacità migliorare la stabilità e la solubilità degli agenti terapeutici incapsulati, di

attraversare le barriere biologiche e di consentire dei rilasci localizzati e controllati migliorando, quindi, la sicurezza e l'efficacia terapeutica. Vi sono diversi studi incentrati sull'utilizzo di diversi tipi di nanoparticelle utilizzati come vettori di farmaci [29] [48] [72]. Tra queste, le nanoparticelle di silice mesoporosa hanno richiamato l'attenzione dei ricercatori per le loro eccezionali proprietà ai fini della somministrazione controllata di farmaci [73]. Grazie all'ampio volume dei pori, le MSN possiedono intrinsecamente una maggiore capacità di carico rispetto ad altri vettori. Sia i farmaci idrofilici che quelli idrofobici possono essere incorporati nei pori. Il caricamento del farmaco si basa principalmente sulle proprietà adsorbenti delle MSN. Il caricamento ed il successivo rilascio dell'agente terapeutico sono legati alla diffusione del farmaco dai pori, che può essere regolata modificando la superficie delle MSN con apposite funzionalizzazioni. Il fattore decisivo per il controllo del rilascio del farmaco è l'interazione tra i gruppi di superficie dei pori e la molecola di farmaco [74]. Ad esempio, è stato osservato che il caricamento del farmaco seguito dalla funzionalizzazione della superficie con gruppi amminici (impiegando 3-amminopropiltriethossisilano, APTES) ha svolto un ruolo significativo nel rallentare il rilascio del farmaco rispetto ai sistemi che sono stati prima funzionalizzati e poi caricati con il farmaco. Ciò potrebbe essere attribuito all'effetto di schermatura dei pori contenenti il farmaco da parte dei gruppi amminici, che ostacolano il rilascio del farmaco. Se la superficie è stata prima funzionalizzata e poi caricata, è possibile che il farmaco venga adsorbito sulla superficie degli MSN e che si verifichi un rilascio iniziale molto rapido. È stato inoltre osservato che la concentrazione di APTES impiegata nella funzionalizzazione gioca un ruolo fondamentale sulla cinetica di rilascio del farmaco dai pori [75].

Studi hanno dimostrato che le nanoparticelle di silice mesoporosa in un fluido corporeo simulato subiscono una degradazione dopo la somministrazione, che sembra essere vantaggiosa per il processo di rilascio del farmaco [76]. Inoltre, studi di assorbimento, distribuzione ed escrezione *in vivo* nei topi suggeriscono una buona tolleranza ed efficacia delle MSN somministrate per iniezione orale ed endovenosa. Al contrario, le MSN sono risultate difficili da assorbire dopo la somministrazione intramuscolare e sottocutanea [76]. In generale, si può affermare che grazie alla struttura porosa ordinata (per lo più canali senza interconnessione), all'ampia area superficiale e all'elevato volume dei pori, le MSN permettono di avere una buona cinetica di rilascio del farmaco e un rilascio controllato [77].

Il caricamento di farmaci nei pori della silice mesoporosa può essere realizzato in modi diversi: i metodi di incapsulamento devono essere semplici, efficaci e riproducibili in larga scala. In generale, i metodi di caricamento sono suddivisi in due gruppi principali: metodi senza solventi e metodi basati su solventi (i cosiddetti metodi a umido o wet methods) (Figura 21) [78].

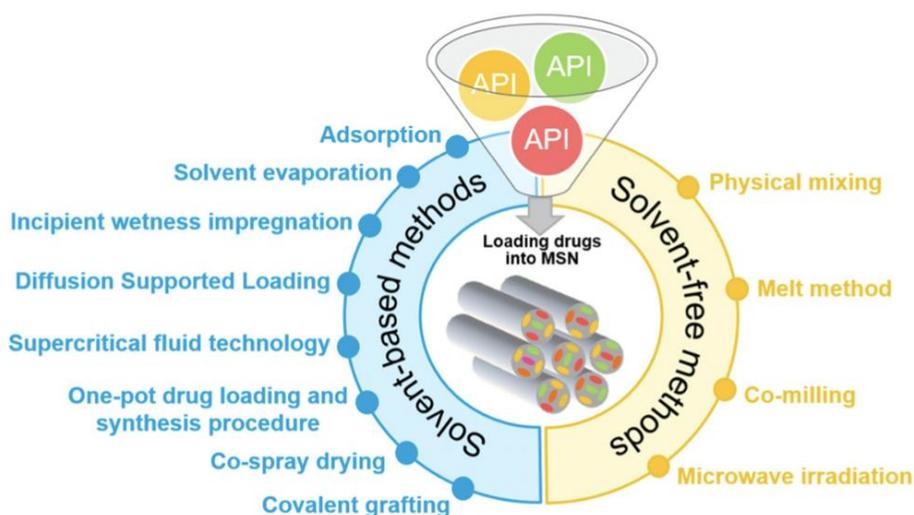


Figura 21: Rappresentazione schematica dei diversi metodi di caricamento di farmaco [78].

Metodi basati su solventi, come l'evaporazione, l'adsorbimento e l'*incipient wetness impregnation*, consentono di incapsulare vari tipi di farmaci. Tra i metodi privi di solventi, la fusione e il co-milling possono essere impiegati per caricare il farmaco nei pori delle MSNs.

1.3.4.1 Metodi che utilizzano il solvente (wet methods)

I metodi a umido, ossia i metodi che utilizzano un solvente per il caricamento del farmaco, forniscono una buona penetrazione dell'agente terapeutico, ma richiedono molto tempo e contribuiscono alla perdita di una parte significativa del farmaco a causa della fase di filtrazione. Il processo di incapsulamento del farmaco comporta l'adsorbimento delle molecole di farmaco sulla superficie interna/esterna della silice mesoporosa in condizioni che favoriscono le interazioni farmaco-vettore (interazioni di Van der Waals, legame idrogeno o covalente) [58]. Tra i parametri più significativi vi sono l'affinità del farmaco con il substrato e l'area superficiale di quest'ultimo. Per quanto riguarda i metodi a umido risultano inoltre determinanti il volume dei pori della silice, la polarità del solvente e la concentrazione del farmaco nella soluzione. La scelta del metodo di caricamento del farmaco influisce sul grado di caricamento, sulla distribuzione dell'agente nella silice e sulle proprietà fisico-chimiche del farmaco caricato [79].

Nei metodi a umido, indipendentemente dalla procedura utilizzata, è necessario rimuovere il solvente affinché la sua concentrazione risulti inferiore ai livelli accettabili specificati nelle linee guida della International Conference on Harmonization (ICH) Q3 (R5) [48]. Un fattore importante in questi metodi è la scelta di un solvente appropriato. Per la solubilizzazione del farmaco è preferibile utilizzare solventi come etanolo o CO₂ super-critica in alternativa ai solventi organici per evitare

problemi di tossicità. Le procedure di caricamento con metodi a umido spesso richiedono processi a più fasi e di lunga durata, utilizzano grandi quantità di solventi e di farmaco. [80].

Un primo metodo ampiamente utilizzato è l'adsorbimento, in cui le nanoparticelle di silice mesoporosa vengono immerse in una soluzione concentrata di farmaco per il tempo necessario a consentire l'adsorbimento del farmaco nei pori. Alla fine del processo le MSNs caricate con il farmaco vengono separate dalla soluzione attraverso centrifugazione o filtrazione, ed il solvente residuo viene rimosso. Utilizzare concentrazioni di farmaco troppo elevate non è consigliabile, in quanto le molecole terapeutiche vengono adsorbite molto velocemente dalla superficie delle MSN bloccando l'accesso ai mesopori alle altre molecole di farmaco. Per far sì che il solvente lasci lo spazio al farmaco nei pori, è necessario scegliere un solvente che sia meno affine alla silice rispetto al farmaco. Tra i principali svantaggi di questo metodo di caricamento vi sono il tempo necessario per effettuarlo e la difficoltà nel prevedere la quantità di farmaco che verrà effettivamente caricata. Inoltre, una grande percentuale di farmaco viene sprecata nel processo di filtrazione/centrifugazione. Altro metodo molto utilizzato sia in ambito catalitico che per il caricamento di farmaco nelle MSN è l'*incipient wetness impregnation*. In questo metodo una soluzione concentrata di farmaco viene caricata goccia a goccia nelle silici in più stadi, lasciando il tempo necessario per l'evaporazione del solvente tra uno stadio di caricamento e quello successivo. Il farmaco diffonde per capillarità nei pori. A fine processo, il farmaco non legato viene lavato utilizzando solvente in eccesso. Il vantaggio di questo metodo rispetto al precedente è la sensibile riduzione dello spreco di farmaco, che consente di contenere i costi e quindi di incorporare farmaci più costosi nelle matrici. La tecnica consente inoltre un buon controllo sulla quantità di principio attivo introdotta nel nanovettore e non è energeticamente dispendiosa (rispetto, ad esempio, alla tecnica di fusione che implica l'impregnazione del farmaco ad alte temperature). Tuttavia, per caricare ingenti quantità di farmaco è necessario andare a utilizzare delle soluzioni concentrate e bisogna effettuare delle impregnazioni ripetute che allungano notevolmente i tempi del processo. Inoltre, l'uniformità della distribuzione del farmaco risulta difficile da controllare. Esiste infine un elevato rischio di cristallizzazione del farmaco sulla superficie esterna della silice e di ostruzione dei mesopori [81]. Vi sono diversi studi in letteratura che utilizzano questo metodo per caricare il farmaco nelle silici. Ad esempio Azaïs et al. [82] propongono questa tipologia di impregnazione per includere Ibuprofene all'interno di silici mesoporese come SBA-15 e MCM-41.

Un'altra tecnica per il caricamento del farmaco si basa sull'evaporazione del solvente, ed è la combinazione delle due tecniche sopraccitate. In questo metodo, la silice viene dispersa in una soluzione di farmaco (si utilizzano solventi organici volatili, ad esempio etanolo o diclorometano) e asciugata mediante rapida evaporazione del solvente (con un evaporatore rotante o per riscaldamento)

per ottenere MSN caricate con farmaco. La modalità in cui avviene l'evaporazione del solvente può influenzare lo stato fisico del farmaco, la sua localizzazione nelle MSN e la velocità di rilascio dal nanovettore.

Vi sono infine metodi come il *Diffusion Supported Loading* (DiSupLo: il materiale di partenza è una miscela pre-omogeneizzata di farmaco e MSN con la proporzione desiderata di entrambi), oppure tecnologie che sfruttano fluidi supercritici (SCF) o l'ancoraggio del farmaco sul supporto mediante un legame covalente [48]. Questo ultimo metodo permette di avere un rilascio più controllato del farmaco, a differenza ad esempio del metodo dell'assorbimento, in quanto questo viene rilasciato dopo la rottura del legame covalente (che deve avvenire al raggiungimento del sito d'interesse).

1.3.4.2 Metodi che non utilizzano il solvente

La seconda famiglia di metodi prevede il caricamento del farmaco senza l'utilizzo di solventi. Questi metodi richiedono meno tempo e possono raggiungere un elevato grado di caricamento del farmaco. Inoltre, la concentrazione di farmaco incorporato nel materiale mesoporoso è facile da prevedere, poiché è dipendente dal rapporto tra l'agente farmaceutico e le MSN. Si tratta inoltre di tecniche rispettose dell'ambiente, in quanto non richiedono il controllo del solvente residuo e si collocano nel flusso della chimica a "rifiuti zero".

Appartiene a questa classe di metodi la tecnica di caricamento del farmaco per fusione (*melt method*), che si basa sulla miscelazione fisica del farmaco e della silice mesoporosa a temperature superiori al punto di fusione del farmaco. Potrzebowski et al. hanno osservato che per confinare l'ibuprofene nei pori dell'MCM-41 la tecnica per fusione può dare risultati migliori rispetto all'*incipient wetness* [83]. L'irradiazione a microonde è un altro metodo per caricare i farmaci nei materiali di silice. In questa tecnica, una soluzione del farmaco contenente le MSN viene riscaldata da microonde mentre un sistema di feedback controlla la temperatura durante il processo e protegge il farmaco dalla degradazione. Vi sono poi altri metodi come la co-macinazione oppure la miscelazione fisica.

1.3.5 Rilascio Controllato

La somministrazione del farmaco mediata da specifici ligandi a organi, tessuti o cellule avviene attraverso un rilascio controllato del farmaco, quindi un riconoscimento attivo che permette di raggiungere il sito bersaglio senza incorrere nel problema del rilascio prematuro dell'agente terapeutico nella circolazione sistemica. Questo diminuisce l'efficacia del nano-sistema in campo terapeutico e può portare a effetti collaterali indesiderati. Per questo motivo si è cercato di limitare

questo problema controllando il rilascio dell'agente terapeutico mediante stimoli interni ed esterni come la variazione di pH, enzimi, reazioni redox, oppure tramite l'applicazione di stimoli esterni come campi elettromagnetici, temperatura, elettrici e ultrasuoni (Figura 22).

Nel caso delle MSN, ad esempio, è possibile limitare il rilascio indesiderato di farmaco chiudendo i pori delle nanoparticelle (NPs) inorganiche con dei polimeri, oppure delle macromolecole biologiche. L'applicazione di uno stimolo comporta l'apertura delle strutture che bloccano i pori e il conseguente rilascio controllato dell'agente terapeutico, limitando la fuoriuscita precoce e la degradazione anticipata del farmaco. In questo modo è possibile avere un controllo preciso della dose terapeutica somministrata, con conseguente aumento dell'efficacia terapeutica del farmaco [24] [24].

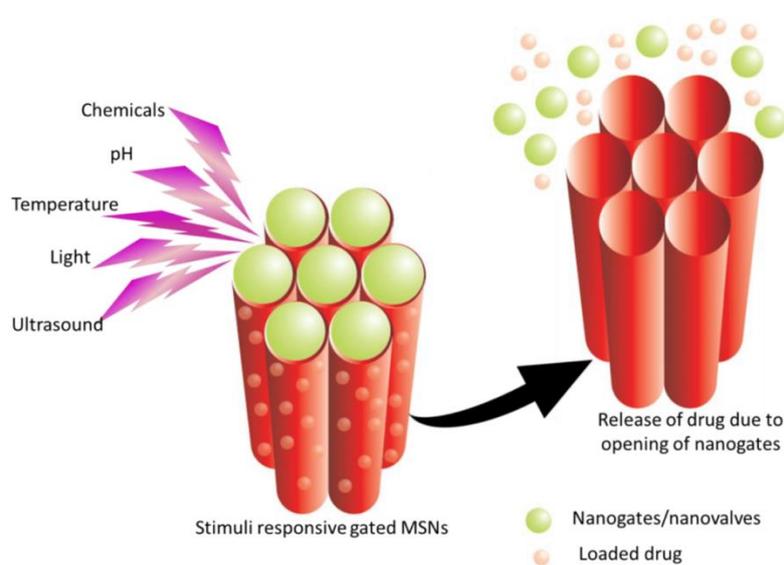


Figura 22: Differenti tipi di stimoli esterni che possono essere applicati alle MSN [24]

1.3.5.1 Stimoli interni

Le condizioni di pH variano in modo piuttosto netto nell'organismo anche tra distretti sani. Ad esempio, quando si assume un farmaco per via orale, questo passerà dallo stomaco dove il pH è piuttosto basso (pH 1-3) e proseguirà verso l'intestino dove incontrerà un pH maggiore (pH 6-8). Quindi, è possibile sfruttare la variazione di pH tra stomaco e intestino per attivare il rilascio di farmaci nel distretto desiderato. Un valore anomalo di pH può essere caratteristico di patologie, ad esempio sia in un microambiente tumorale sia nel microambiente di un tessuto infiammato il pH diventa più acido. Mentre nel microambiente sano il pH è all'incirca 7.4, nel microambiente tumorale/infiammato questo si abbassa a valori di pH tra 5 e 6.5. Il livello di acidità dipende dal livello di infiammazione e dalla localizzazione del sito infiammato [84]. Per avere un rilascio

controllato dalle condizioni di pH si possono sfruttare polimeri che presentano gruppi acidi (poliacidi) o gruppi basici (polibasi) in grado di rispondere alle variazioni di pH. In particolare, i poliacidi accettano protoni a basso pH e si stabilizzano; una volta che il pH aumenta si deprotonano, quindi assumono una carica negativa. A causa della repulsione elettrostatica tra le cariche negative presenti sulle catene polimeriche, il rilascio del farmaco viene attivato. Le polibasi, invece, presentano dei gruppi in grado di protonarsi a pH acido; quindi, acquistano protoni e si caricano positivamente, cosicché le cariche positive sulle catene polimeriche si respingono attivando il rilascio a pH acido.

L'attivazione redox è un'altra strategia ampiamente utilizzata per controllare il rilascio dei farmaci. Questa tecnica viene utilizzata per rilasciare farmaci antitumorali sfruttando gli agenti riducenti presenti a livello endogeno. I legami disolfuro scindibili per via redox sono spesso utilizzati per questo metodo di rilascio di farmaci. I vettori in questione sono sensibili alla diversa concentrazione di particelle ossidanti o riducenti tra l'ambiente intra ed extracellulare: lo stato ossidativo tra l'interno e l'esterno della cellula è diverso e questo crea un potenziale ossidativo, detto potenziale redox, tra i due compartimenti. Tra le sostanze ossidanti o riducenti che sono presenti in quantità diversa tra interno ed esterno della cellula vi sono la coppia glutazione (forma ridotta, GSH) e glutazione disolfuro. Il rapporto tra queste due molecole è un indicatore dello stato di salute della cellula: quando questo rapporto è alto (ossia si ha più glutazione nella forma ridotta) lo stress ossidativo che la cellula sta subendo è basso quindi la cellula sta bene; viceversa, quando il rapporto è basso vi è un attacco ossidativo alla cellula (come nel caso di patologie neurodegenerative).

1.3.5.2 Stimoli esterni

Un altro stimolo che può essere sfruttato per il rilascio di farmaci è la temperatura. In particolare, questo stimolo è sfruttato per vettori polimerici che cambiano le loro proprietà fisiche in funzione della temperatura (definiti polimeri termo-responsivi). La temperatura può essere uno degli stimoli più utilizzati per innescare un segnale e questo è confermato dal fatto che la temperatura corporea può spesso deviare dal valore fisiologico di 37 °C in presenza di agenti patogeni. La variazione di temperatura è relativamente facile da controllare e può essere facilmente applicata sia in condizioni in vitro che in vivo. [73]. Polimeri termoresponsivi possiedono una proprietà unica: la presenza di una temperatura critica di soluzione. La temperatura critica di soluzione è la temperatura alla quale il polimero subisce una transizione di fase (transizione di fase volumetrica o fase sol-gel) e la soluzione cambia in modo discontinuo in base alla sua composizione. I polimeri termoresponsivi possono essere classificati in due tipi: i polimeri che sono inizialmente solubili ma diventano insolubili al riscaldamento e quindi hanno una temperatura critica inferiore del sistema (LCST) e l'altro tipo in cui

il polimero è inizialmente insolubile ma diventa solubile in seguito al riscaldamento e quindi ha una temperatura critica superiore del sistema (UCST) [73].

Un altro stimolo utilizzato per innescare il rilascio di farmaci dalle MSN prevede l'applicazione di campi magnetici permanenti o alternati. Nel momento in cui viene applicato lo stimolo si verifica un aumento di temperatura che viene sfruttato in diverse applicazioni biomediche per generare la morte cellulare mediata dall'ipertermia. In questo contesto, le nanoparticelle super-paramagnetiche di ossido di ferro (SPION) sono le più applicate per la somministrazione di farmaci a stimolo magnetico, grazie alla loro capacità di trasformare l'energia magnetica in calore attraverso le fluttuazioni browniane o di Nells [73]. Normalmente queste nanoparticelle, ad esempio le NPs di Fe₃O₄, vengono incapsulate negli MSN utilizzando tecniche di aerosol o processi sol-gel [85].

Gli ultrasuoni (US) sono onde sonore di frequenza compresa tra 20 kHz a 20 MHz in grado di penetrare in modo non invasivo nei tessuti profondi dell'organismo senza essere percepite dai nervi uditivi umani. Gli US trovano largo impiego in ambito terapeutico e diagnostico. Vengono impiegati due tipi di onde, ultrasuoni a bassa intensità (20-200 kHz) e ad alta intensità o HIFU (>200 kHz) [86]. Regolando la densità di potenza, la frequenza e la durata della stimolazione è possibile modulare il livello di penetrazione dello stimolo nel luogo di interesse e, in presenza di vettori sensibili agli ultrasuoni, un'appropriata stimolazione consente il controllo spazio-temporale del rilascio del farmaco. Gli US sono molto utilizzati in ambito biomedicale grazie alle loro proprietà: non invasività, non-ionizzante, costi ridotti, e la loro buona permeabilità attraverso la membrana cellulare. A differenza degli ultrasuoni a bassa intensità, gli HIFU indirizzano l'onda ultrasonica in un sito specifico mentre nelle altre aree del corpo l'intensità dell'onda è relativamente bassa. L'HIFU è uno stimolo efficace e sicuro, che è stato ampiamente utilizzato nella somministrazione di farmaci all'uomo [87]. In generale, gli ultrasuoni hanno due effetti principali: l'effetto termico e l'effetto di cavitazione acustica; entrambi possono svolgere un ruolo nell'innescare il rilascio di farmaci dai nanovettori. Quando le onde acustiche attraversano un tessuto, queste vengono attenuate. L'energia di attenuazione viene convertita in effetto termico. La cavitazione acustica è un processo in cui si formano, crescono e collassano numerose microbolle in un periodo di tempo molto breve quando vengono applicati gli ultrasuoni. La cavitazione è più impattante con ultrasuoni a bassa intensità, mentre l'effetto termico è più significativo quando si utilizzano ultrasuoni focalizzati ad alta intensità (HIFU). Infatti, sebbene sia l'effetto termico che l'effetto di cavitazione acustica possano rendere i polimeri instabili o addirittura possono causare la rottura dei legami, quest'ultimo fattore è solitamente considerato la ragione principale del rilascio di farmaci [88].

1.4 MSN nel lavoro di Tesi

Il progetto REBORN si propone di realizzare un patch fibroso piezoelettrico acellulare caricato con nanovettori in grado di consentire il rilascio controllato e localizzato di agenti terapeutici antinfiammatori e anti-fibrotici e di favorire la proliferazione dei CM. L'impianto di questo patch potrebbe prevenire in modo significativo l'insufficienza cardiaca nei pazienti sopravvissuti a un infarto acuto, riducendo la mortalità e migliorando la loro qualità di vita. Poiché diversi fattori contribuiscono all'insufficienza cardiaca dopo l'MI acuto, ognuno di essi sarà preso di mira dal patch sviluppato per favorire un rimodellamento funzionale del tessuto in esame. L'intento è quello di limitare i diversi fattori che concorrono all'insufficienza cardiaca come l'infiammazione prolungata, lo sviluppo di tessuto fibrotico, la mancanza di potenziale rigenerativo e la perdita di capacità contrattile. Per raggiungere questo scopo, l'idea è quella di rilasciare localmente (all'epicardio) tre diverse classi di farmaci: antinfiammatori (dal giorno dell'impianto fino a 28 giorni dopo), anti-fibrotici (dalla prima settimana all'anno dall'impianto) e CM-proliferativi (dal secondo giorno ai 28 giorni dall'impianto) che forniranno, dopo l'infarto, i segnali biologici necessari per generare nuovo tessuto funzionale. A questo scopo, il progetto REBORN propone di sfruttare diversi nanovettori (ognuno caricato con uno specifico farmaco) sensibili agli US, al fine di controllare con un'apposita stimolazione US il rilascio del farmaco richiesto nella specifica fase post-operatoria, innescando in modo specifico e controllato nel tempo le risposte biologiche desiderate. Il farmaco antiinfiammatorio utilizzato come modello in questo progetto di tesi è l'ibuprofene. La risposta infiammatoria è un processo fondamentale nella riparazione del cuore infartuato e quindi dovrebbe essere rigorosamente regolata nei pazienti soggetti a infarto del miocardio in modo da ridurre la mortalità e prevenire l'insufficienza cardiaca.

2. MATERIALI E METODI

L'obiettivo del lavoro di tesi è la realizzazione di materiali nanoporosi in grado di rilasciare il farmaco caricato al loro interno quando stimolati con ultrasuoni a una specifica frequenza. A questo scopo le MSN sono state rivestite con alginato di sodio reticolato: la strategia proposta prevede l'impiego di un'opportuna stimolazione US per rompere in modo reversibile l'interazione tra i gruppi COO⁻ dell'alginato e gli ioni Ca²⁺ introdotti con la reticolazione, al fine di consentire il rilascio controllato del farmaco. Nel seguente capitolo verranno riportati i materiali utilizzati per la realizzazione delle MSN, i processi di produzione utilizzati e le caratterizzazioni effettuate sui nanovettori.

2.1 Sintesi dei nanovettori

2.1.1 Sintesi delle MSN-NH₂

Per consentire l'ancoraggio dell'alginato di sodio sulla superficie dei nanovettori è necessario avere su di essa dei gruppi amminici che consentano la formazione di legami ammidici con i -COOH dell'alginato di sodio. Le MSN-NH₂ sono state sintetizzate utilizzando due differenti protocolli che si basano sul metodo Stöber modificato [89] [90]. La prima procedura consiste nella sintesi di MSN seguita dalla post-funzionalizzazione con APST (3-aminopropil trietossisilano) in atmosfera di azoto (MSN(P)-NH₂) mentre la seconda prevede la sintesi di MSN-NH₂ per co-condensazione di tetraetilortosilicato (TEOS) e APST (MSN(C)-NH₂).

2.1.1.1 Sintesi delle MSN(P)-NH₂ per post-funzionalizzazione

La prima strategia ha previsto la sintesi delle MSN sulla base del protocollo proposto da Castillo et al. [89] seguita dall'introduzione dei gruppi amminici mediante post-funzionalizzazione (MSN(P)-NH₂). Seguendo questo protocollo (figura 23), 500 mg di Bromuro di cetil-trimetilammonio (CTAB ≥ 98%, Sigma-Aldrich), 1,75 ml di una soluzione 2 M di Idrossido di Sodio (NaOH, Sigma-Aldrich) sono stati aggiunti in un becher da 600 mL contenente 250 ml di acqua distillata. La soluzione è stata mantenuta su un agitatore magnetico riscaldante a 400 rpm; un bagno termostato a 80°C ha garantito il controllo e l'omogeneità della temperatura nel becher. Si è atteso per un periodo di tempo pari a circa 1 ora in modo tale da raggiungere la stabilità termica della soluzione e si è misurato il pH, che deve essere circa 11. Successivamente nella soluzione sono stati gocciolati 2,5 mL di Tetra-etil ossilicato (TEOS 99%, Sigma-Aldrich) (velocità di aggiunta 0.25 mL/min) e la reazione è stata portata avanti per 2 ore. In seguito all'aggiunta del TEOS, la soluzione è diventata dopo pochissimo

tempo opalescente fino ad ottenere una sospensione di particelle fini disperse nella soluzione di colore bianco, come illustrato nella figura 24.

Al termine del processo si è atteso per circa 10 minuti per consentire il raffreddamento della soluzione. Il precipitato è stato separato per centrifugazione (10'000 rpm, 10 minuti) e sono stati effettuati i lavaggi (3 lavaggi in acqua, 10'000 rpm per 5 minuti, e 1 lavaggio in etanolo 10'000 rpm per 5 minuti). Infine, le nanoparticelle sono state messe in stufa a seccare a 70°C per tutta la notte.

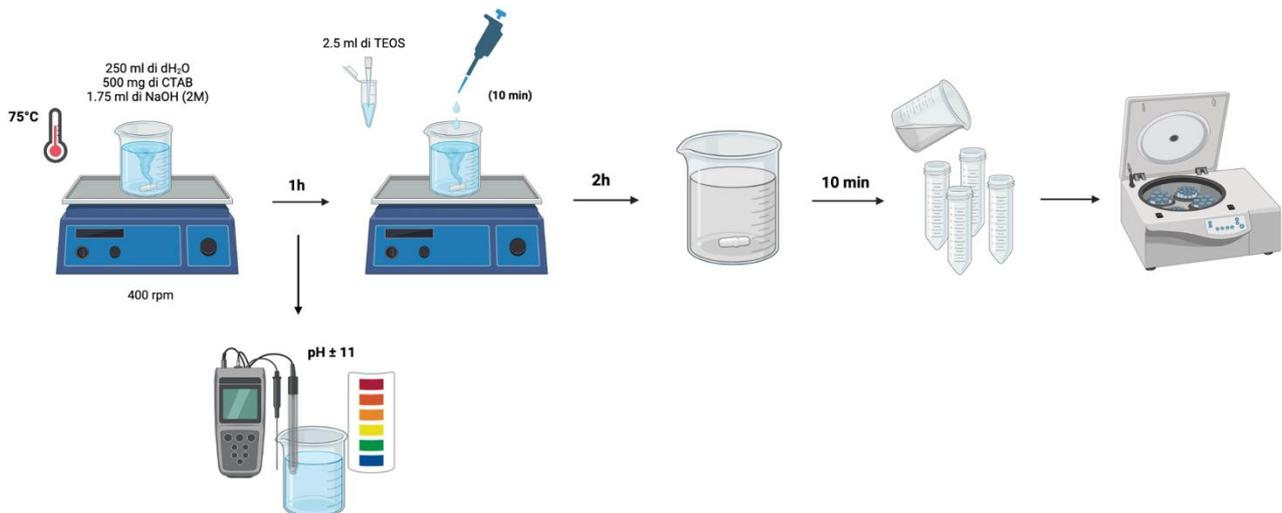


Figura 23: Rappresentazione schematica del processo di sintesi delle MSN



Figura 24: Cambiamento del colore della soluzione in seguito all'aggiunta del TEOS

Si è in seguito proceduto alla rimozione del tensioattivo sacrificale che ha consentito la formazione dei mesopori. Prima di procedere alla post-funzionalizzazione delle MSN, la rimozione del surfattante è stata effettuata per calcinazione.

La calcinazione è un processo di riscaldamento ad alte temperature con l'obiettivo di eliminare tutte le sostanze volatili da una miscela solida o da un singolo composto. Una volta seccate le polveri in stufa, esse vengono pesate e poste all'interno della muffola per calcinare. Il processo inizia a una temperatura di 25°C, procede con una rampa di riscaldamento di 1°C al minuto fino ad arrivare a 550°C e rimane a questa temperatura per 6 ore. Successivamente la temperatura si abbassa seguendo una rampa di raffreddamento di 10°C al minuto fino ad arrivare a 26°C (Figura 25). Per questo trattamento è stata utilizzato il forno a muffola dell'azienda Falc posizionato all'interno della cappa chimica Carbo 900 Exhaust.

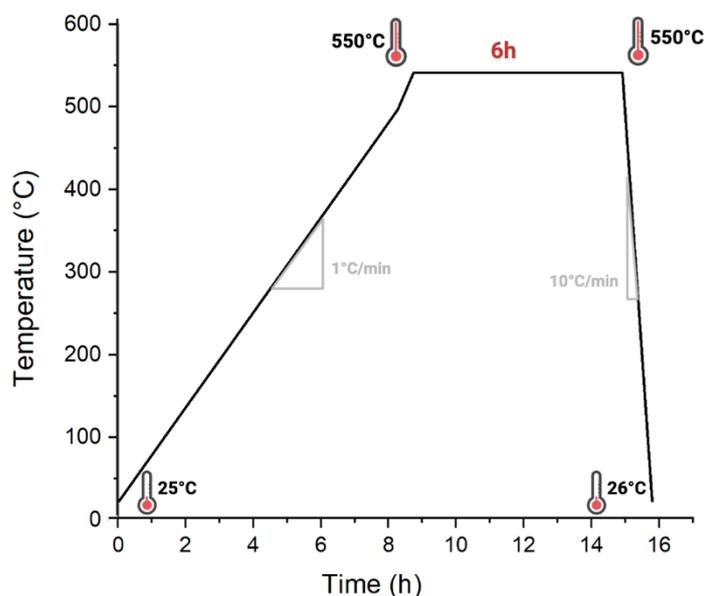


Figura 25: Rappresentazione schematica della rampa di temperatura seguita durante il processo di calcinazione

Una volta liberati i pori delle MSN dal tensioattivo si è proceduto con la funzionalizzazione delle stesse con i gruppi amminici (-NH₂). Per andare a funzionalizzare le MSN si è utilizzata la linea Schlenk (Figura 27). La linea Schlenk (chiamata anche linea vuoto-gas inerte) è un'apparecchiatura costituita da due linee con varie uscite verso l'esterno dove si vanno a collegare i campioni. Una linea è collegata ad una sorgente di gas inerte (in questo lavoro di tesi è stato utilizzato come gas inerte l'azoto), con un'uscita di sfogo attraverso un gorgogliatore a olio, e l'altra è collegata ad una pompa a vuoto. Sulla linea sono presenti diverse valvole che permettono di collegare il campione al vuoto oppure al gas inerte. La linea viene spesso utilizzata quando si sta lavorando con campioni sensibili ad aria/umidità e permette di creare l'alto vuoto che consente di eliminare le tracce di materiale

adsorbito sul campione. Prima di iniziare il processo, 600 mg di polveri e l'ancoretta sono state aggiunte in un pallone a 3 colli da 100 mL tenendo chiusi due dei colli. Il pallone è stato inserito all'interno di una campana a vuoto per un paio di ore prima di iniziare il processo (Figura 26). Inizialmente è stato collegato il pallone alla linea Schlenk, è stato creato il vuoto all'interno del pallone e poi è stato fatto fluire all'interno di esso l'azoto (N_2). Tramite l'utilizzo di due siringhe vengono inseriti all'interno del pallone i due reagenti: 50 mL di Etanolo e 500 μL di APST 1% w/v (3-trietossisililpropilammina 99%, Sigma-Aldrich). Si lascia reagire il tutto per 2 ore, mantenendo una temperatura costante di 70°C a una velocità di agitazione pari a 300 rpm.

Al termine del processo il precipitato è stato separato per centrifugazione (10'000 rpm, 5 minuti) e poi si è proceduto con i lavaggi (3 lavaggi in Etanolo, 10'000 rpm per 3 minuti). Al termine del processo le polveri sono state messe in stufa a seccare a 70°C per tutta la notte.

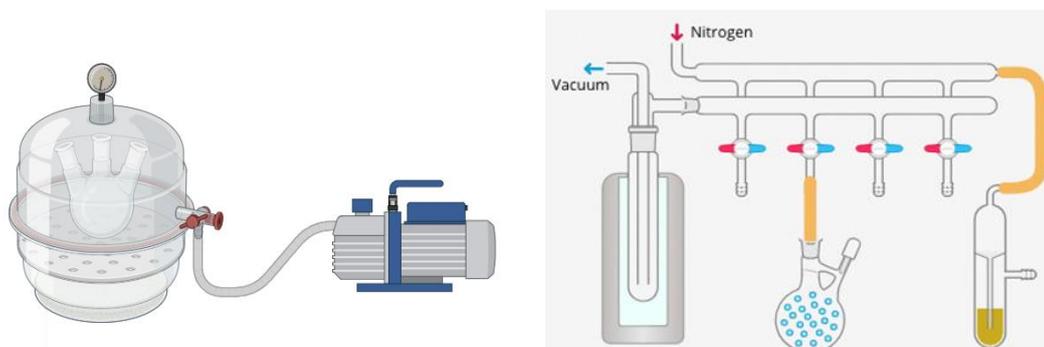


Figura 26: Rappresentazione schematica della campana a vuoto dove viene inserito il pallone a tre colli (a sinistra) e della linea Schlenk (a destra).



Figura 27: Funzionalizzazione MSN con la linea Schlenk

2.1.1.2 Sintesi delle MSN(C)-NH₂ per co-condensazione

La seconda strategia prevede la sintesi di MSN funzionalizzate con gruppi amminici (MSN(C)-NH₂) sfruttando la co-condensazione di TEOS e APST. Come illustrato nella figura 28, 500 mg di CTAB, 1,75 mL di una soluzione 2M di NaOH sono stati aggiunti in un becher da 600 mL contenente 240 mL di acqua distillata. La soluzione è stata mantenuta su un agitatore magnetico riscaldante a 400 rpm; un bagno termostato a 80°C ha garantito il controllo e l'omogeneità della temperatura nel becher. Si è atteso per un periodo di tempo pari a circa 1 ora in modo tale da raggiungere la stabilità termica della soluzione (80°C) e si è misurato il pH che deve essere circa 11. Successivamente nella soluzione sono stati gocciolati alternativamente 2.5 mL di TEOS (velocità di aggiunta 0.25 mL/min) e 0,12 mL di APST (velocità di aggiunta 120 µL/min). Il tempo di reazione è pari a 2 ore. Anche in questo caso, in seguito all'aggiunta del TEOS, la soluzione diventa dopo pochissimo tempo di colore bianco. Al termine del processo si è atteso per circa 10 minuti per consentire il raffreddamento della soluzione. In seguito, il precipitato è stato separato per centrifugazione (10'000 rpm, 10 minuti) e sono stati effettuati i lavaggi (3 lavaggi in acqua, 10'000 rpm per 5 minuti ciascuno, e 1 lavaggi in etanolo sempre per lo stesso periodo di tempo). Infine, le nanoparticelle sono state messe in stufa a seccare a 70°C per tutta la notte.

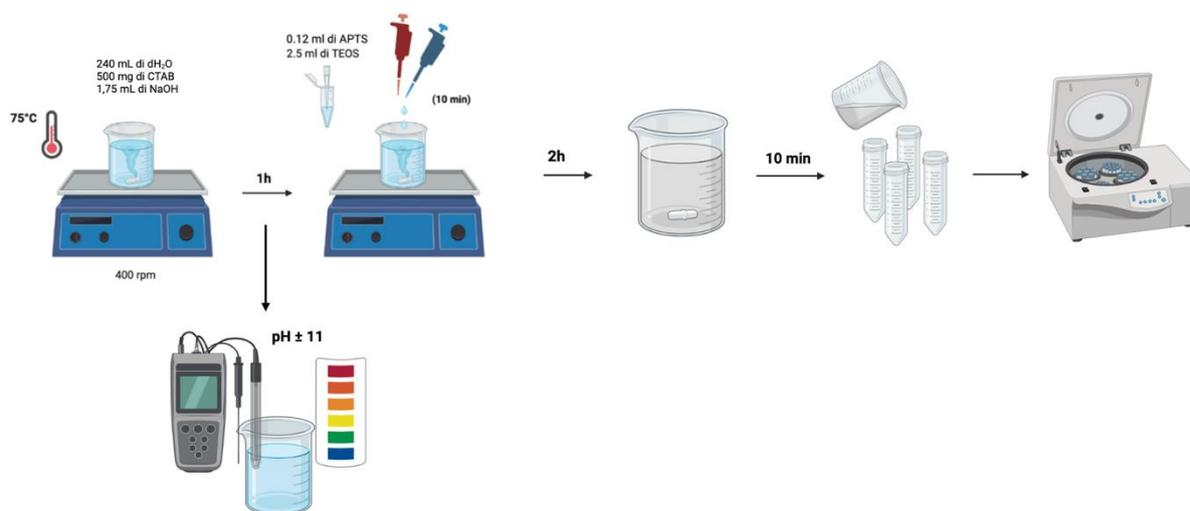


Figura 28: Rappresentazione schematica del processo di sintesi delle MSN(C)-NH₂.

Il surfattante contenuto all'interno dei pori delle MSN(C)-NH₂ è stato rimosso mediante estrazione tramite solvente. Questa differente scelta sul metodo di rimozione dell'agente templante è stata dettata dal fatto che la calcinazione, pur essendo un processo più semplice a livello operativo, si basa sull'utilizzo di alte temperature (550°C) che porterebbero al degrado dei gruppi amminici (-NH₂) presenti su di esse.

Dopo aver pesato le polveri ottenute tramite il processo di sintesi sol-gel, è stata calcolata la quantità di solvente da utilizzare per l'estrazione. In questo lavoro di tesi si è scelto di utilizzare come solvente una soluzione 1 M di Acido Cloridrico (HCl, Sigma-Aldrich) in Etanolo [91]. Si è scelto di utilizzare l'etanolo, rispetto ad esempio ad altri solventi come l'acetone, perché il CTAB utilizzato è un tensioattivo cationico più compatibile con solventi polari. Inoltre, l'aggiunta dell'HCl ha migliorato ulteriormente l'efficienza di estrazione. Il processo è stato realizzato in un pallone a fondo tondo contenente 350 mg di polveri, a cui si sono aggiunti 35,7 mL di soluzione HCl/etOH. Il collo centrale del pallone è stato collegato ad un tubo refrigerante per garantire il riflusso del solvente e la soluzione è stata mantenuta in agitazione a 300 rpm a 75°C per 24 ore. Il riflusso è stato impiegato per evitare l'eccessiva evaporazione del solvente: il tubo refrigerante è stato collegato a due tubi che si occupano rispettivamente di alimentare acqua fredda dall'ingresso superiore e rimuovere l'acqua riscaldata dall'ingresso inferiore come illustrato nella figura 29. Trascorse le 24 ore, il precipitato è stato separato per centrifugazione (10'000 rpm, 5 minuti) e successivamente sono stati effettuati 3 lavaggi in Etanolo (10'000 rpm, 3 minuti). Una volta terminato il processo, le polveri ottenute (MSN(C)-NH₂) sono state messe in stufa a seccare a una temperatura di 70°C per tutta la notte.

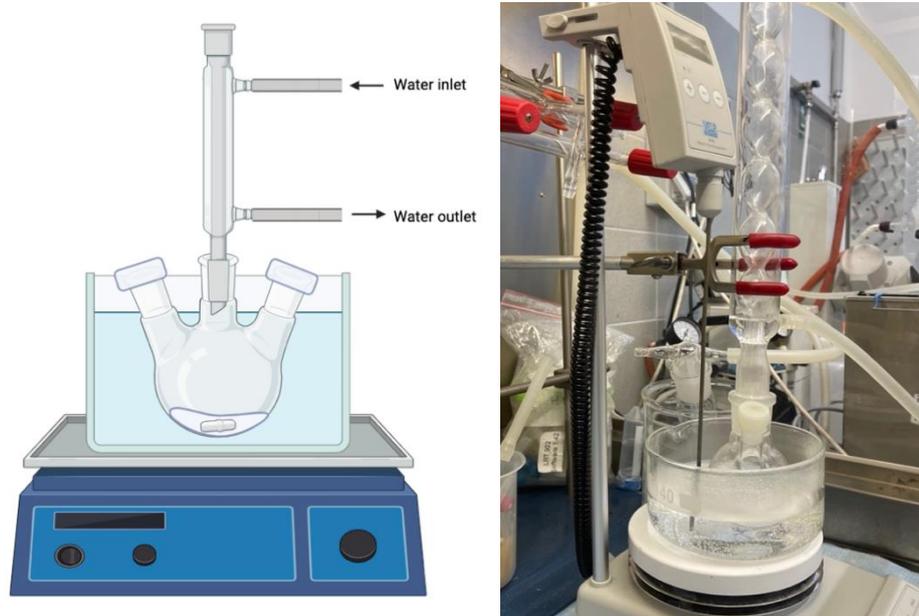


Figura 29: Rappresentazione schematica del processo di estrazione tramite solvente.

2.1.2 Caricamento del farmaco (Ibuprofene)

Le MSN-NH₂ prodotte seguendo i due differenti protocolli sono state successivamente caricate con l'ibuprofene (figura 30) utilizzando la tecnica dell'*Incipient Wetness Impregnation* (IWI) seguendo la procedura riportata da C. Charnay e al. [92].

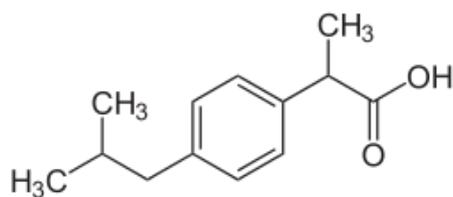


Figura 30: Struttura chimica dell'Ibuprofene [93]

Per andare a caricare il farmaco all'interno dei pori delle MSN-NH₂ è stata gocciolata su di esse una soluzione di ibuprofene in etanolo. Inizialmente si è proceduto con il calcolo della quantità di ibuprofene da utilizzare in base al peso delle MSN-NH₂ prodotte. È stata scelta come riferimento una quantità di Ibuprofene pari a 360 mg per 1 g di polveri. Successivamente vengono calcolati gli mL di etanolo in cui si andrà a disperdere l'ibuprofene, considerando un rapporto di ibuprofene in etanolo pari a 30 mg/mL. Le MSN-NH₂ (150 mg) sono state messe in delle piastre di Petri di opportuna dimensione e sminuzzate in modo tale da limitare la presenza di agglomerati. A questo punto, sulle polveri è stata gocciolata lentamente e più volte la soluzione di Ibuprofene in etanolo (54 mg di Ibuprofene in 1,8 mL di Etanolo). Al termine dell'impregnazione, l'etanolo è stato fatto evaporare in stufa a 60°C per 5 minuti e le polveri una volta secche sono state mescolate con una spatola. La procedura di impregnazione è stata effettuata con sei aliquote da 300 μ L ciascuna.

Infine, le polveri caricate con il farmaco (Ibu@MSN(P)-NH₂, realizzate per post-funzionalizzazione, e Ibu@MSN(C)-NH₂, realizzate per co-condensazione) sono state messe in stufa a seccare a 60°C per tutta la notte.

2.1.3 Rivestimento con Alginato di Sodio (SA)

Al fine di realizzare dei nanovettori in grado di rilasciare il farmaco quando stimolati con gli ultrasuoni, le MSN sono state rivestite con alginato di sodio reticolato in modo da occludere i mesopori e limitare il rilascio indesiderato del farmaco in assenza di stimolazione [94]. Grazie alla funzionalizzazione precedentemente effettuata con i gruppi amminici, è stato possibile andare a ancorare sulle MSN-NH₂ l'alginato di sodio (SA) grazie all'interazione tra gli -NH₂ presenti sulle nanoparticelle e i -COOH dell'alginato di sodio.

Per il rivestimento di 100 mg di MSN-NH₂ è stata preparata una soluzione di alginato di sodio al 1%wt. in acqua distillata. La soluzione (3,33 mL) è stata portata a pH 5 aggiungendo alcune gocce di acido cloridrico (HCl 37%, Sigma-Aldrich). Successivamente sono stati pesati 48,3 mg di 1-etil-3-(3-(dimetilammino)-propil) carbodiimmide (EDC, Sigma-Aldrich) e aggiunti alla soluzione di SA.

La soluzione viene mantenuta a una temperatura ambiente a una velocità di 300 rpm per un 30 minuti. Sono state poi aggiunte alla soluzione le MSN-NH₂ e 28,4 mg di N-idrossisuccinimide (NHS, Sigma-Aldrich): il sistema è stato lasciato in agitazione magnetica a 300 rpm a temperatura ambiente per 2 ore. La reazione sfrutta la chimica delle carbodiimidi per l'attivazione dei gruppi funzionali. I due reagenti, l'EDC e l'NHS, sono responsabili dell'attivazione dei gruppi -COOH dell'alginato di sodio e consentono la formazione di legami ammidici tra i -COOH e gli -NH₂.

I rapporti in peso dei reagenti utilizzati per la reazione sono riportati in seguito:

$$\frac{SA}{MSN - NH_2} = 0,33 (g/g)$$

$$\frac{EDC}{MSN - NH_2} = 0,48 (g/g)$$

$$\frac{NHS}{MSN - NH_2} = 0,28 (g/g)$$

Una volta terminata la reazione, il precipitato è stato separato per centrifugazione (10'000 rpm per 5 minuti) e successivamente sono stati effettuati i lavaggi (3 lavaggi in acqua deionizzata da 3 minuti ciascuno). Dopo ogni lavaggio è stata effettuata una centrifuga ed è stato rimosso il surnatante rimanente. Infine, le polveri sono state messe in stufa a seccare a una temperatura di 60°C per tutta la notte.

2.1.4 Reticolazione con CaCl₂

Le MSN-NH₂ rivestite con alginato di sodio e caricate con l'ibuprofene (Ibu@MSN(P)-SA e Ibu@MSN(C)-SA) sono state poi reticolate con CaCl₂ (Cloruro di Calcio, Sigma-Aldrich). Per fare questo è stata preparata una soluzione di CaCl₂ all'1% w/v. Per reticolare 100 mg di Ibu@MSN-SA (comprendendo sia quelle realizzate per post-funzionalizzazione che per co-condensazione) è stato utilizzato un volume di soluzione pari a 10 mL,

La soluzione di CaCl₂ è stata messa in un becher e lasciata solubilizzare per 1 ora, successivamente sono state aggiunte lentamente le polveri di Ibu@MSN-SA e lasciate in agitazione per 1 minuto a 300 rpm in modo tale che si instaurassero i legami tra i Ca²⁺ e i COO⁻.

Una volta terminata la reazione, la soluzione è stata centrifugata per 8 minuti a 10'000 rpm e successivamente le polveri reticolate (Ibu@MSN-SA-Ca²⁺) sono state messe in stufa a seccare a 60°C per tutta la notte. Per effettuare poi un confronto sono state preparate con la stessa metodologia anche le MSN-SA-Ca²⁺, quindi le MSN-SA reticolate senza il farmaco caricato al loro interno.

2.2 Caratterizzazione

2.2.1 Microscopia a scansione elettronica ad emissione di campo (FE-SEM)

La microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FE-SEM) fornisce informazioni sulle caratteristiche morfologiche, le dimensioni e la forma delle particelle con ingrandimenti da 10x a 300.000x. Il principio di funzionamento di questi microscopi è simile a quello dei microscopi elettronici a scansione (SEM) convenzionali. Un fascio di elettroni focalizzato da lenti elettromagnetiche scansiona la superficie del campione, dove gli elettroni riflessi/interagiti creano un'immagine della superficie e della topografia del campione. Rispetto alla microscopia a scansione elettronica (SEM) convenzionale, il FE-SEM produce immagini più chiare, di alta qualità e meno distorte elettrostaticamente, con una risoluzione spaziale fino a 1.5 nm, da tre a sei volte migliore.

Esso permette di avere immagini di alta qualità e a bassa tensione con una carica elettrica trascurabile dei campioni (tensioni comprese tra 0,5 e 30 kV) [95]. Per l'analisi, una piccola quantità di nanoparticelle (~1 mg) è stata dispersa in circa 5 mL di isopropanolo (Sigma-Aldrich); la sospensione è stata inserita in un bagno a ultrasuoni per circa 30 minuti. Per evitare l'accumulo di carica superficiale che può ostacolare il percorso degli elettroni, i campioni non conduttivi sono generalmente rivestiti con uno strato molto sottile (~5-10 nm) di metallo pesante conduttivo (come oro, cromo o platino). Sui campioni realizzati in questo lavoro di tesi è stato depositato un rivestimento di platino, usando il macchinario Cressington Sputter Coater 180. I campioni sono stati analizzati con lo strumento Zeiss Merlin (Figura 31).

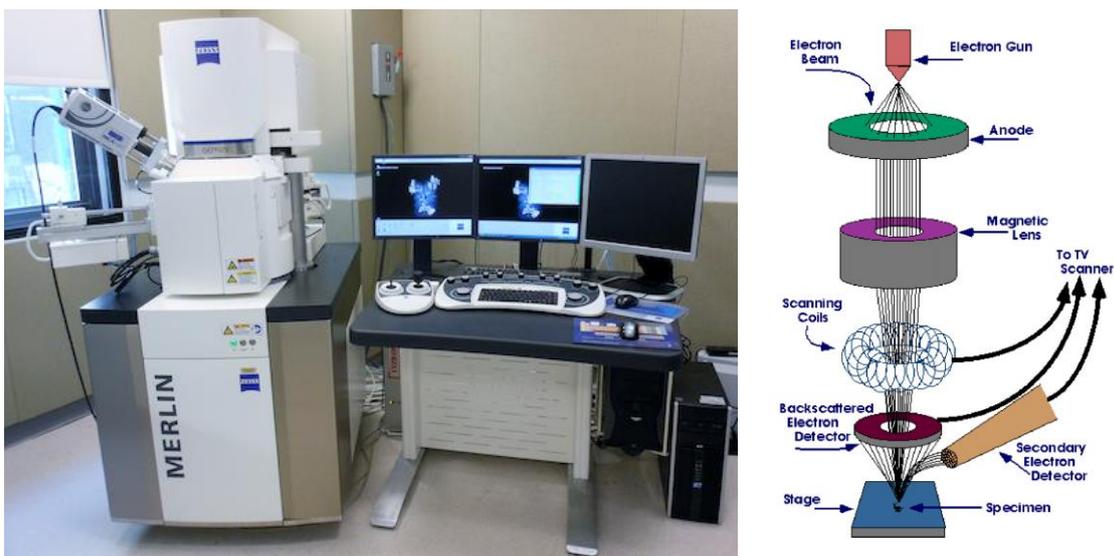


Figura 31: Macchinario utilizzato per l'analisi al FE-SEM (a sinistra) e rappresentazione schematica del principio di funzionamento del FE-SEM (a destra) [96]

Nella figura 36 è illustrato lo strumento utilizzato per l'analisi e il principio di funzionamento del FE-SEM. In particolare, si possono osservare gli elettroni generati dal cannone elettronico e accelerati, per effetto di campo, attraverso l'applicazione di una differenza di potenziale; un sistema di lenti deflette e focalizza il fascio sulla superficie del campione.

2.2.2 *Dynamic Light Scattering (DLS)*

Il DLS è una tecnica non invasiva che analizza il moto browniano delle nanoparticelle in una dispersione e lo correla al loro diametro idrodinamico. Nelle misure DLS il campione viene colpito da un raggio laser e le variazioni d'intensità della luce diffusa vengono misurate in funzione del tempo. Lo strumento, quindi, misura la variazione dinamica nel tempo della luce diffusa. Più veloce è la variazione e più le particelle che si stanno analizzando sono piccole, più la variazione è lenta e più le particelle sono grandi. Attraverso questo strumento è possibile calcolare il diametro idrodinamico delle nanoparticelle e il loro potenziale zeta. Lo strumento fornisce anche molte altre informazioni, come l'indice di polidispersità (PDI), un valore compreso tra 0 e 1 che fornisce indicazioni sulla distribuzione dimensionale delle nanoparticelle. Se lo strumento fornisce un PDI minore di 0.1 le particelle sono monodisperse, se invece questo indice è maggiore di 0.4 le nanoparticelle sono polidisperse. Lo strumento crea la funzione di autocorrelazione, ossia mette in relazione l'intensità della luce diffusa che rileva nel tempo rispetto all'intensità rilevata negli istanti iniziali. Più la funzione di autocorrelazione diminuisce in fretta e più le nanoparticelle sono piccole, viceversa più tempo ci mette a decrescere più sono grandi le nanoparticelle. Dalla funzione di autocorrelazione viene stimato il coefficiente di diffusione: più è grande il coefficiente di diffusione più sono grandi le nanoparticelle in quanto diffondono lentamente. Grazie alla relazione di Stokes-Einsten (Equazione 1), dal coefficiente di diffusione si può stimare il diametro medio idrodinamico delle nanoparticelle (nm).

$$D = \frac{k_g T}{6\pi\eta R_h} \quad (1)$$

$$k_g = \text{Costante di Boltzmann} = 1,38 * \frac{10^{-23} J}{K};$$

T = Temperatura;

η = Viscosità;

D = Coefficiente di diffusione

Oltre al diametro medio delle nanoparticelle, con questo strumento è possibile valutare il potenziale zeta (mV), indicativo della carica superficiale della particella. Un potenziale zeta elevato in valore assoluto (< -30 mV o $> +30$ mV) è indice di buona stabilità della sospensione ed è collegato a una minor tendenza nella formazione di aggregati. Per misurare il potenziale zeta si applica una differenza di potenziale tra i due elettrodi presenti sulla cella di misura. Questa differenza di potenziale induce il movimento delle particelle cariche. Il rapporto tra la velocità delle particelle e il campo esterno applicato, noto come mobilità elettroforetica, viene misurato e convertito in potenziale zeta (ζ) utilizzando l'equazione di Henry (Equazione 2):

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (2)$$

ε = costante dielettrica del mezzo

η = viscosità del mezzo;

ζ = potenziale zeta;

f = funzione di Henry;

a = raggio della particella;

k = parametro di Debye.

Per effettuare l'analisi, circa 1 mg di nanovettori sono state prelevati e inseriti in una boccetta contenente 5 mL di acqua distillata. Per limitare il più possibile fenomeni di aggregazione e stabilizzare la sospensione, il tutto viene inserito in un bagno ad ultrasuoni per circa 30 minuti. Dopodiché, si preleva una parte della dispersione e si inserisce nelle cuvette per l'analisi. In base al tipo di cuvette scelta (Figura 32) viene effettuata un'analisi differente. La cuvette di sinistra viene utilizzata per la misura del potenziale zeta, misura quindi la mobilità elettroforetica delle particelle. Per fare questo viene applicato un campo elettrico tra gli elettrodi della cella di misura in cui è presente il campione e illuminata dal raggio laser. Le particelle cariche si spostano verso l'elettrodo di segno opposto determinando una variazione di frequenza della luce diffusa dal campione direttamente proporzionale alla mobilità elettroforetica.

La cuvette a destra viene utilizzata invece per la misura della taglia delle particelle, si inserisce il campione al suo interno e il tutto viene illuminato da un raggio laser.

Tutte le misure al DLS sono state effettuate utilizzando lo strumento Zetasizer nano ZS90 Malvern Instruments Ltd.

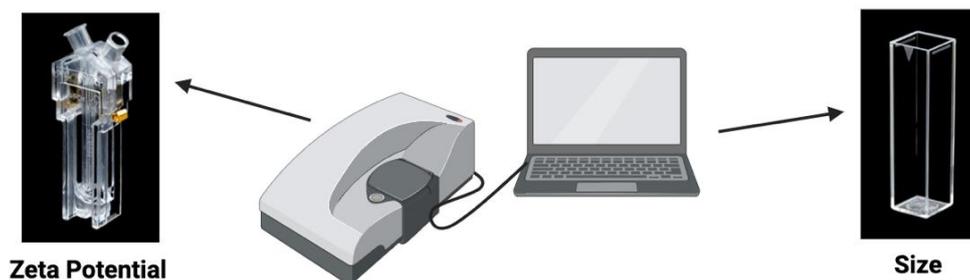


Figura 32: Strumenti utilizzati per l'analisi DLS

2.2.3 Diffrazione a raggi X (XRD)

La diffrazione dei raggi X è una tecnica non distruttiva che permette di caratterizzare i materiali cristallini, fornendo informazioni qualitative e quantitative sulla struttura del campione. I raggi X sono una radiazione elettromagnetica di alta intensità con lunghezza d'onda dell'ordine di 10^{-9} - 10^{-12} m. Quando una radiazione elettromagnetica interagisce con una sostanza possono verificarsi diversi fenomeni: riflessione della luce, trasmissione, diffrazione e assorbimento. Questa tecnica, in particolare, si basa sul fenomeno della diffrazione dei raggi X, ovvero sull'interferenza che si ha quando un'onda incontra un ostacolo di dimensioni paragonabili alla sua lunghezza d'onda. Quando i raggi X di lunghezza d'onda λ interagiscono con il reticolo cristallino, vengono diffusi in tutte le direzioni, secondo un fenomeno di interferenza che può essere sia costruttiva che distruttiva. L'analisi XRD si basa sull'interferenza costruttiva, che si verifica quando la differenza di cammino ottico tra due raggi diffratti paralleli è pari ad un multiplo intero della lunghezza d'onda, ovvero quando viene soddisfatta la legge di Bragg (Equazione 3):

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (3)$$

dove d è la distanza interplanare tra due piani cristallini e θ l'angolo di incidenza.

Poiché la distanza interplanare è caratteristica di ogni cristallo, conoscendo d , si identificano le fasi cristalline presenti. Il diffrattogramma si ottiene tramite un diffrattometro, che è costituito da una sorgente di raggi X, un detector e un portacampione. Di solito il campione è in polvere per esporre il maggior numero di piani cristallini. La sorgente di raggi X e il detector si trovano su un supporto circolare e al centro del cerchio c'è il portacampione: mentre la sorgente è fissa, portacampione e detector ruotano con una certa frequenza angolare. Prima di arrivare sul campione, il fascio di raggi X viene monocromatizzato. Il detector rileva i raggi X diffratti per i diversi θ per cui si ha interferenza costruttiva e il segnale viene elaborato in forma di picchi di diffrazione che costituiscono il

diffattogramma (Figura 33). Quest'ultimo si confronta con dei diffattogrammi già noti relativi a vari materiali cristallini, in modo da riconoscere le fasi cristalline presenti. Poiché la diffrazione dipende fortemente dalla periodicità del cristallo, qualunque deviazione da questo ordine verrà registrata dallo spettro di diffrazione [97]. Lo spettro di campioni di natura amorfa si presenta senza picchi discreti, ma è caratterizzato da un alone centrato intorno al valore di θ corrispondente al picco che si troverebbe nel diffattogramma del materiale cristallino con la stessa composizione. I materiali cristallini presentano spettri con i tipici picchi acuti risultanti dai fasci diffratti provenienti dai diversi piani. La forma del picco fornisce informazioni sulla dimensione del cristallo.

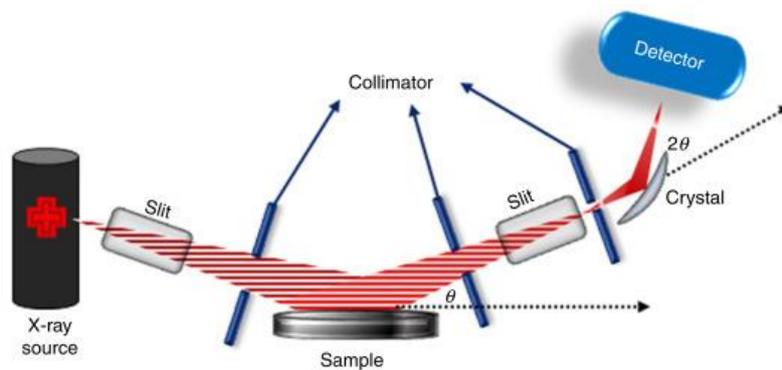


Figura 33: Rappresentazione schematica del meccanismo di funzionamento dell'analisi XRD [72]

2.2.4 Analisi di adsorbimento-desorbimento di azoto (N_2)

L'analisi di adsorbimento- desorbimento di azoto è una tecnica che misura la qualità di gas adsorbito su una superficie in funzione della temperatura e della pressione parziale dell'adsorbato. Questa tecnica permette di ricavare informazioni sull'area superficiale specifica, il diametro medio dei pori, la forma dei pori, la distribuzione dei pori e il volume totale dei pori del materiale in esame. Questa tecnica non distruttiva si basa sul fenomeno dell'adsorbimento fisico che si verifica tra un adsorbente, un gas, e la superficie di un solido. Le forze coinvolte in questo fenomeno sono quelle intermolecolari. Nel desorbimento, al contrario, la quantità di gas adsorbito diminuisce. La non perfetta coincidenza tra i processi di adsorbimento e desorbimento dà origine al ciclo di isteresi.

L'isoterma che si ottiene con questa tecnica rappresenta la quantità di gas adsorbito in funzione della pressione relativa (p/p^0). Nella figura 34 sottostante è possibile vedere le diverse isoterme di adsorbimento che possono risultare da questa tecnica.

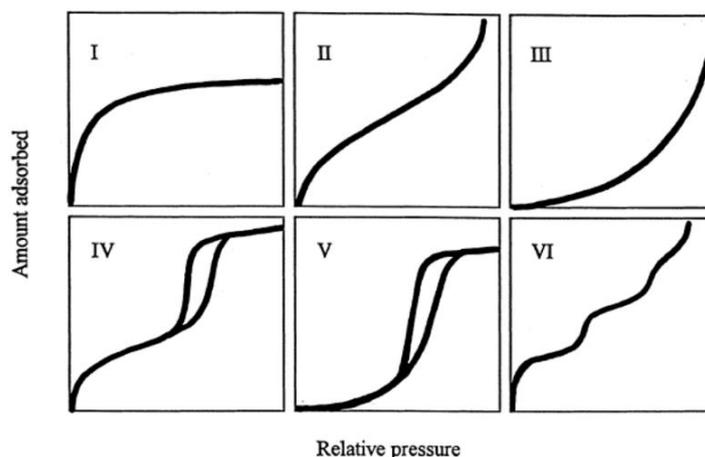


Figura 34: Isotherme di adsorbimento

La IUPAC classifica i materiali porosi in base a queste sei isoterme [98]. Nel caso dei materiali mesoporosi viene utilizzata l'isoterma IV, che presenta un andamento simile all'isoterma II (materiali macroporosi o non porosi) per pressioni basse ma diverge per valori di pressione prossimi alla pressione di vapore saturo. Tratto caratteristico di questa curva è il coppia di isteresi, più o meno accentuato, dovuto a fenomeni di condensazione capillare. Inizialmente si ha la formazione di un monostrato di adsorbente sul substrato (permette il calcolo dell'area superficiale); successivamente si riempiono i pori e si iniziano a riempire anche gli strati sovrastanti (multistrato). A pressione più elevate si verifica il fenomeno di condensazione capillare: il gas adsorbito nei mesopori non è più stabile in fase vapore e condensa, nel grafico si osserva un gradino (Figura 35) [99].

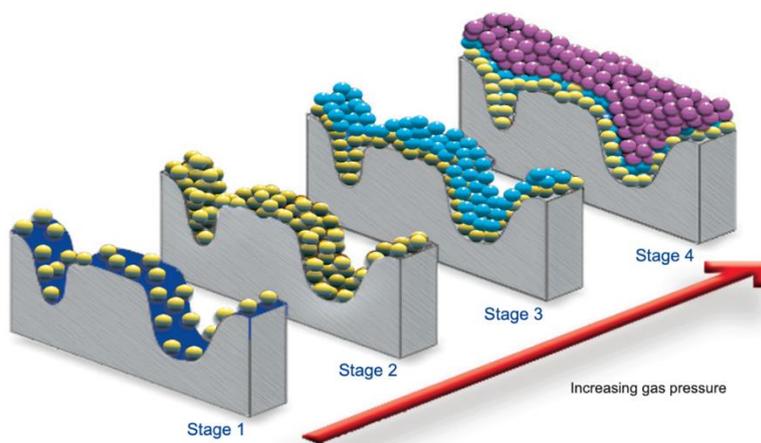


Figura 35: Meccanismo di adsorbimento di gas su una superficie porosa [100]

L'analisi è stata eseguita con lo strumento ASAP 2020 Plus della Micromeritics. Le polveri (circa 150 mg), inserite in una buretta di vetro, devono essere sottoposte ad un degasaggio a 70°C per 3 ore per eliminare l'acqua ed eventuali altre impurezze adsorbite e al termine di questo processo inizia la

misura vera e propria. In questo lavoro di tesi l'area superficiale specifica è stata calcolata tramite il modello di Brauner-Emmet-Teller (BET), che si basa sulla teoria secondo cui l'entalpia di adsorbimento è costante durante la formazione del multistrato, mentre la taglia pori è stata stimata mediante il metodo di Barrett-Joyner- Halenda (BJH) [98].

2.2.5 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier è una tecnica che permette di ricavare informazioni sulla natura e il tipo di legami chimici presenti in un campione, analizzando l'interazione della radiazione infrarossa con il campione. Quando una radiazione infrarossa investe una molecola, l'energia ceduta viene convertita in energia vibrazionale: una parte della radiazione infrarossa viene assorbita dalla molecola e una parte viene trasmessa. La determinazione della frequenza di assorbimento permette di identificare i gruppi funzionali di una molecola, poiché i vari legami assorbono a frequenze caratteristiche [101].

La radiazione IR ha un intervallo di frequenze, espresse in numeri d'onda, che si estende dai 4000 cm^{-1} ai 400 cm^{-1} .

Nello spettro IR (Figura 36) è possibile distinguere due zone:

- Zona dei gruppi funzionali, che si estende da 4000 cm^{-1} a 1300 cm^{-1} e comprende bande dovute sia a stiramenti che a deformazioni di gruppi funzionali (es. legami O-H, C-H, C=C, C=O, ecc.),
- Zona delle impronte digitali (*fingerprints*), da 1300 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , che deve il suo nome alla presenza di bande caratteristiche di ciascuna molecola perché originate da vibrazioni dell'intero scheletro molecolare.

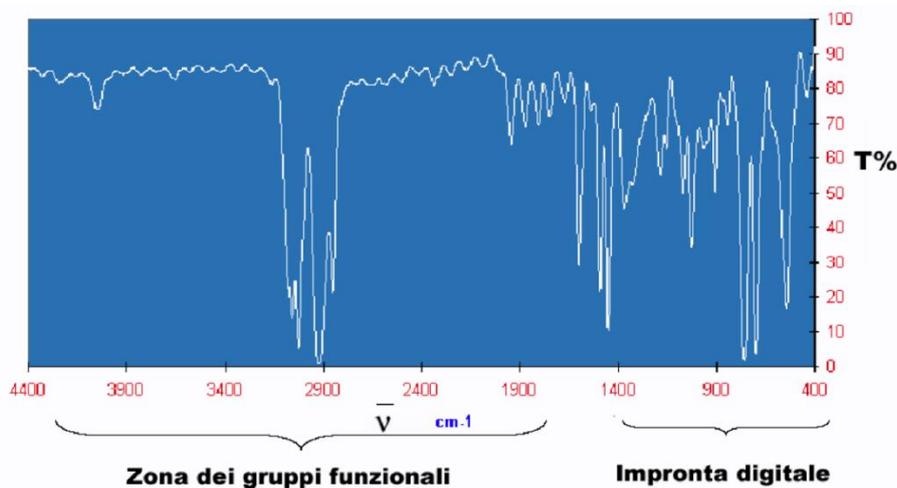


Figura 36: Rappresentazione schematica delle due differenti zone che si possono individuare in uno spettro IR [102].

All'interno di questo intervallo sono presenti le frequenze caratteristiche delle vibrazioni di stretching (stiramento del legame chimico) e di bending (deformazione/piegamento dell'angolo di legame). Di conseguenza, quando una molecola è colpita dalla radiazione elettromagnetica ad una frequenza che coincide con la frequenza di vibrazione di uno dei legami covalenti presenti, si ha un assorbimento di energia. Determinando sperimentalmente a quale frequenza avviene l'assorbimento della radiazione IR è possibile identificare i tipi di legame presenti. I moti di stretching sono dovuti allo stiramento ritmico lungo l'asse di legame, con conseguente aumento o diminuzione della distanza interatomica. I moti di bending sono dovuti alla variazione dell'angolo di legame oppure al movimento di un gruppo di atomi rispetto alla restante parte della molecola.

La FT-IR viene realizzata utilizzando un interferometro, che permette la scansione di tutte le frequenze presenti nella radiazione IR generata dalla sorgente. La scansione è possibile grazie a uno specchio mobile che spostandosi introduce una differenza di cammino ottico, che origina una interferenza costruttiva o distruttiva con il raggio riflesso da uno specchio fisso. In questo modo si ottiene un *interferogramma* che mostra la rappresentazione dell'intensità nel dominio del tempo. Applicando la trasformata di Fourier si ottiene lo spettro infrarosso, ovvero la rappresentazione dell'intensità nel dominio della frequenza.

In questo lavoro di tesi, è stata effettuata un'analisi in Trasmissione in quanto volevamo andare a valutare le caratteristiche superficiali dei campioni analizzati. Durante questo tipo di analisi le radiazioni IR non attraversano il campione ma lo colpiscono solo superficialmente per una profondità che varia tra 0.5 e 5 μm . Per l'analisi dei campioni è stato utilizzato lo strumento Bruker Tensor 27 (Figura 37). Gli spettri risultanti sono riportati in valori di assorbanza in funzione del numero d'onda. Per procedere all'analisi, il campione viene sminuzzato finemente e collocato in una pressa idraulica per ottenere delle pastiglie molto sottili del peso di poche decine di mg. Le pastiglie vengono inserite in una bustina portacampione in oro con apposito foro e il tutto viene disposto successivamente in una cella trasparente alla radiazione infrarossa. Per degasare il campione prima di effettuare la misura, la cella viene collegata ad una linea ad alto per 30 minuti a temperatura ambiente.



Figura 37: Strumentazione utilizzata per effettuare l'analisi FT-IR

Nel caso in cui il segnale saturi ovvero l'assorbanza del campione sia troppo elevata, è possibile e aggiungere KBr durante la fase di macinazione delle polveri da analizzare. Il KBr, essendo un composto ionico, è trasparente allo spettro IR e permette di diluire il campione diminuendone l'assorbanza senza spostare la posizione dei picchi.

2.2.6 Analisi termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica è una tecnica termoanalitica quantitativa che permette di misurare in continuo la variazione di massa di un campione sottoposto a un programma controllato di temperatura in atmosfera controllata. L'impiego di tale tecnica permette la valutazione degli intervalli di temperatura in cui il campione manifesta una variazione di peso, dell'entità della formazione di prodotti volatili e residuo solido, e la stima delle relative cinetiche [103] [104]. La tecnica è utile per la caratterizzazione di materiali, per lo studio di processi di volatizzazione e/o decomposizione termica, per lo studio di processi di adsorbimento. La strumentazione utilizzata per effettuare tale misura è una termobilancia costituita da un crogiolo contenente il campione, collegato a una microbilancia e circondato da una fornace che sottopone il campione ad un ciclo termico definito dall'utente (Figura 38).

Lo strumento è formato da diversi componenti:

- Bilancia analitica sensibile (di portata compresa tra 1 e 50 mg);
- Fornace (temperatura dai 25 ai 1500 °C);
- Sistema di gas di spurgo che assicura un'atmosfera inerte e la diffusione del calore in ogni punto;
- Elaboratore per il controllo dello strumento, l'acquisizione e la visualizzazione dei dati;

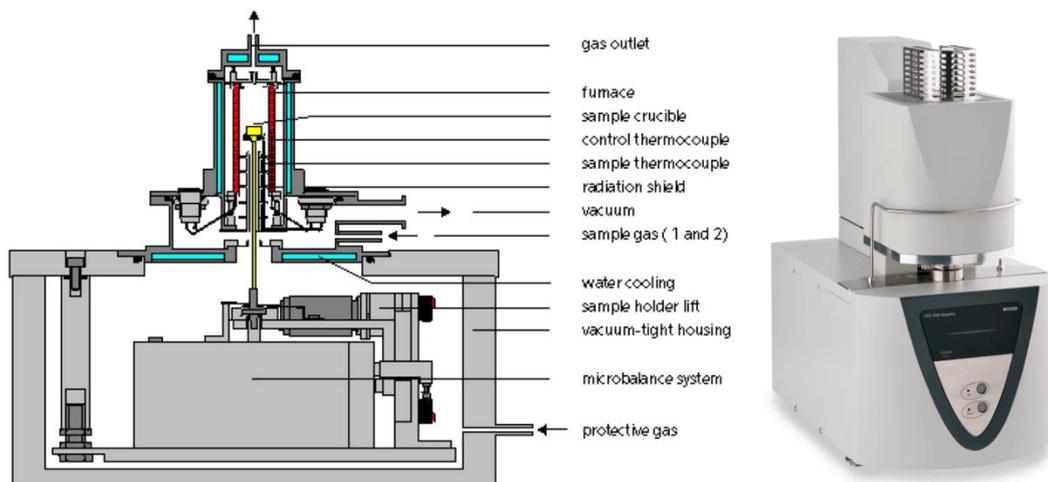


Figura 38: Rappresentazione schematica dello strumento utilizzato per effettuare la TGA.

Quando la massa del campione posto sulla termobilancia varia a causa dell'aumento della temperatura, il giogo si flette e va ad interporre un otturatore tra la lampada e uno dei due fotodiodi. La variazione della corrente del fotodiodo viene amplificata e inviata ad una bobina situata tra i poli di un magnete permanente. Questa corrente viene misurata e convertita in massa attraverso un sistema di elaborazione. Il risultato che la macchina fornisce è un termogramma che riporta in ascissa la temperatura (o il tempo) e in ordinata la variazione di massa, come valore assoluto o percentuale. L'analisi termogravimetrica può essere effettuata in atmosfere modificate, sia inerti che reattive, permettendo di ottenere informazioni sulla stabilità e sulla reattività dei materiali nelle diverse condizioni [105]. La TGA fornisce informazioni come la temperatura alla quale inizia la degradazione del materiale, mentre la presenza di un plateau alla fine della curva permette di sapere la percentuale di residuo stabile ad alta temperatura (nel momento in cui il materiale non si è degradato completamente). Lo strumento, oltre a questa curva, ne restituisce un'altra altrettanto importante chiamata derivata della TGA (o DTG) ossia della perdita di peso rispetto alla temperatura. Ogni picco rilevato nella DTG corrisponde ad un fenomeno degradativo che ha interessato il campione. Dalla curva della derivata è possibile identificare la temperatura di massima velocità di degradazione posizionata in corrispondenza del picco della derivata che nel termogramma corrisponde alla posizione del flesso.

Per la caratterizzazione dei nanovettori sono stati prelevati pochi mg di campione (circa 8 mg) e inseriti all'interno del crogiolo porta campione dello strumento NETZSCH STA 2500. I campioni sono stati analizzati impostando un incremento controllato di temperatura. Si parte da una temperatura pari a 20°C e si procede con una rampa di riscaldamento di 8 K/min fino ad arrivare a 110°C. Questa temperatura viene mantenuta costante per 90 minuti, seguita da un incremento della temperatura fino

a 600°C con rampa di 8 K/min. Il processo termina con una rampa di raffreddamento di 20 K/min, passando dai 600°C ai 25°C. I dati forniti dallo strumento sono stati poi elaborati per ricavare le curve di decomposizione termica di ciascun campione testato e quantificare il farmaco contenuto all'interno dei nanovettori.

2.2.7 Tecnica cromatografica liquida ad alta prestazione (HPLC)

L'HPLC è una tecnica cromatografica liquida che viene largamente utilizzata per valutare l'incapsulamento del farmaco e per studiare le cinetiche di rilascio. Essa permette di separare due o più componenti presenti in un solvente sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica e una "fase mobile" che fluisce attraverso essa [106] [107]. La fase stazionaria è costituita da particelle micrometriche (3-10 µm) che presentano siti attivi superficiali in grado di interagire in maniera specifica con i vari componenti della miscela da separare. La fase mobile, invece, è costituita da un liquido a bassa viscosità. A causa della granulometria fine della fase stazionaria, il flusso dell'eluente può essere ottenuto solo esercitando delle pressioni elevate (circa 100 atm) grazie all'utilizzo di apposite pompe. Nell'immagine 39 sono illustrati gli elementi necessari per effettuare l'analisi HPLC. L'elemento fondamentale è costituito proprio dalla colonna HPLC che è costituita da un cilindro metallico lungo 3-25 cm, riempita con microparticelle di resina cromatografica. La miscela campione scorre lungo il letto di particelle e i componenti entrano in contatto con la fase stazionaria. I vari analiti reagiscono con essa in modo diverso e con delle velocità diverse. Più la sostanza da analizzare è affine alla fase stazionaria, più tempo impiegherà a percorrere la colonna cromatografica. Il tempo necessario affinché un componente esca dalla colonna e raggiunga il rivelatore viene chiamato tempo di ritenzione e viene utilizzato per separare i vari componenti. Il rivelatore UV-Vis permette l'identificazione delle sostanze iniettate. Graficando l'assorbanza in funzione del tempo di ritenzione si ottiene un grafico, chiamato cromatogramma, da cui è possibile quantificare ciascun componente valutando l'area sottesa ai rispettivi picchi.

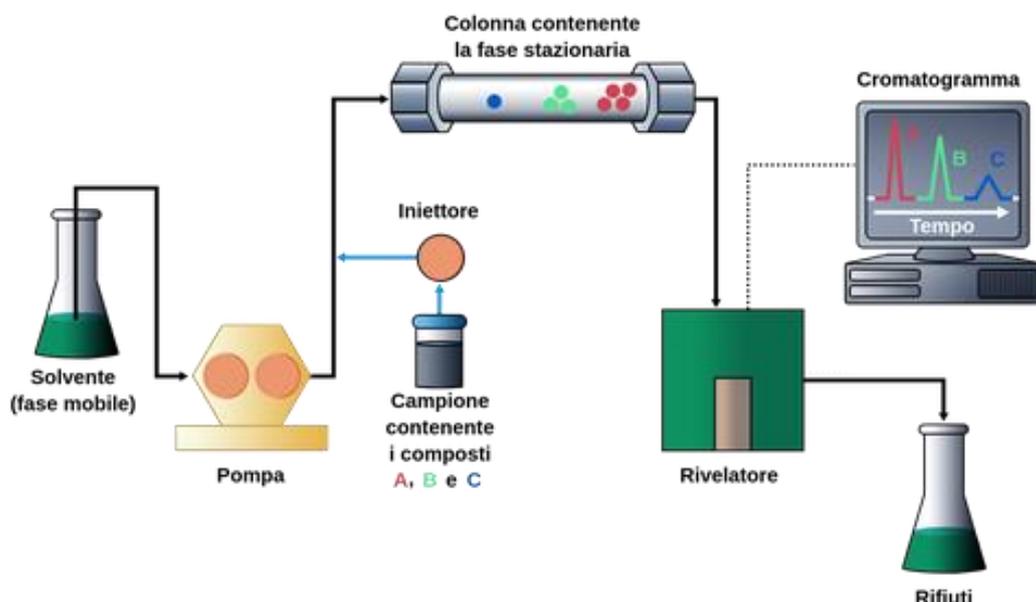


Figura 39: Strumentazione utilizzata per effettuare un'analisi cromatografica liquida [108]

Questo strumento è stato impiegato per valutare la concentrazione di ibuprofene rilasciata dai nanovettori durante i test di rilascio di farmaco con e senza stimolazione US. La quantificazione è stata effettuata sulla base di una retta di taratura risultante dall'analisi di una miscela di etanolo e Tris HCl (rapporto in volume 50:50) in cui è stato solubilizzato ibuprofene in varie concentrazioni (tra 0.05 e 7.5 mg/mL). L'etanolo è stato utilizzato per garantire la solubilizzazione dell'ibuprofene, insolubile in Tris HCl. I campioni da analizzare sono stati preparati miscelando 500 µL della soluzione in cui è stato effettuato il test di rilascio (ibuprofene in Tris HCl) e 500 µL di Etanolo, replicando quindi le condizioni in cui è stata realizzata la curva di calibrazione (Figura 40 e 41).

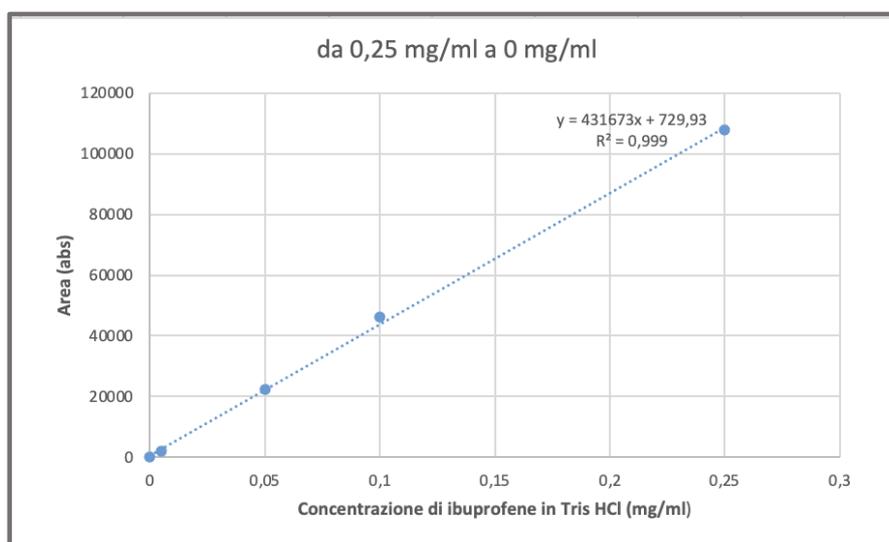


Figura 40: Retta di calibrazione di concentrazione di ibuprofene in Tris HCl da a 0,25 mg/ml a 0 mg/ml

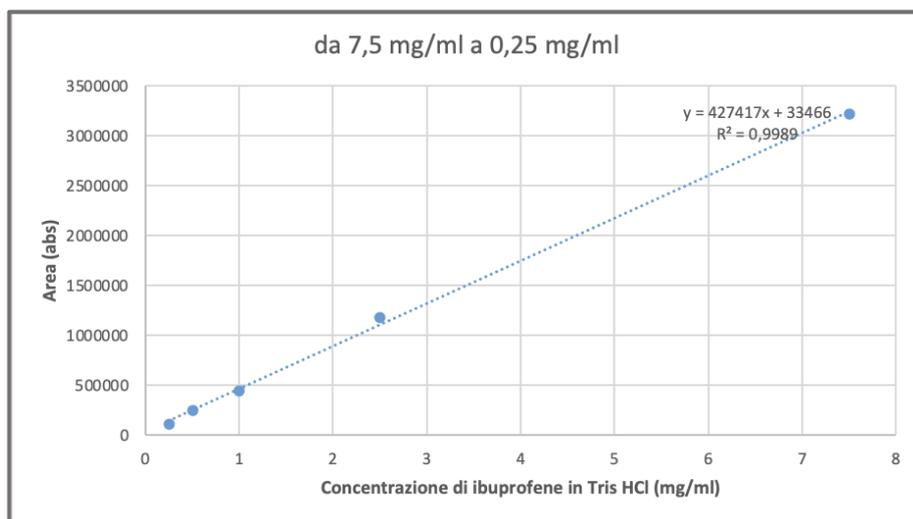


Figura 41: Retta di calibrazione di concentrazione di ibuprofene in Tris HCl da a 7,5 mg/ml a 0,25 mg/ml

Nella Tabella 1 sono riportati tutti i parametri utilizzati per effettuare l'analisi HPLC. Si è deciso di utilizzare come lunghezza d'onda 264 nm in quanto si è visto, sulla base dell'analisi della letteratura precedente, che questa è la lunghezza d'onda tipica dell'ibuprofene [109] [110].

Fase Mobile	Acetonitrile: Soluzione di acido fosforico pH 2.3 (60:40)
Eluizione	Isocratica
Flusso	1ml/min
Temperatura colonna	30°C
Iniezione	10 µL
Temperatura Portacampione	4°C
Nome Colonna	Kinitex C18 core-shell 5 µL 100 A, 150 x 4.6 mm
λ	264 nm

Tabella 1: Parametri utilizzati per l'analisi HPLC

2.2.8 Prove di rilascio di farmaco

Prima di valutare il rilascio di farmaco da parte delle Ibu@MSN(P)-SA-Ca²⁺ e delle Ibu@MSN(C)-SA-Ca²⁺ stimulate con US, sono stati eseguiti dei test di rilascio di farmaco sui nanovettori non stimolati. Per eseguire la prova, 30 mg di polveri sono state sospese in 3 mL di Tris HCl 0.1 M (2-ammino-2-(idrossimetil) -1,3-propandiolo, Sigma-Aldrich) e inserite in un agitatore orbitale a temperatura ambiente per un tempo complessivo di 5 ore. Per poter effettuare un confronto tra la

cinetica di rilascio di ibuprofene da parte dei nanovettori stimolati e non, si è proceduto a raccogliere ed analizzare il liquido in cui sono state immerse le particelle negli istanti di tempo definiti da un riferimento individuato in letteratura [111]. Nello specifico, in previsione di effettuare una stimolazione US della durata di 10 minuti ogni ora per 5 ore, si è proceduto a quantificare il rilascio di ibuprofene dopo 10 minuti, 1 h, 1 h e 10 min, 2 h, 2 h e 10 min, 3 h, 3 h e 10 min, 4 h, 4 h e 10 min e 5 h di immersione delle particelle in Tris HCl. Alle tempistiche definite, i campioni sono stati centrifugati (10'000 rpm, 8 min) e si è prelevato il surnatante; in seguito, le nanoparticelle sono state ogni volta risospese in 3 mL di Tris HCl 0,1 M e reinserite all'interno dell'agitatore orbitale fino alla successiva tempistica da analizzare. Le prove sono state eseguite in triplicato. I surnatanti prelevati alle tempistiche definite sono stati diluiti con etanolo, come spiegato nel paragrafo 2.2.7, ed analizzati con l'HPLC.

Dal momento che le prove di rilascio di farmaco da parte dei nanovettori stimolati con US secondo i parametri e le tempistiche inizialmente testate non hanno dato i risultati sperati, si è proceduto a definire una nuova metodologia di stimolazione US e, per poter effettuare un confronto consistente, le prove di rilascio di ibuprofene sui nanovettori non stimolati sono state ripetute prelevando il liquido di rilascio in corrispondenza delle nuove tempistiche di stimolazione. Nello specifico, è stato analizzato il quantitativo di ibuprofene rilasciato dai nanovettori dopo 30 s, 1 min e 5 min di immersione in Tris HCl. Le prove sono state svolte in triplicato. Per valutare la cinetica di rilascio a tempistiche più lunghe, si è proceduto per ogni campione a raccogliere il surnatante dopo 1 ora, 3 ore, 6 ore e 24 ore dall'inizio della prova. Dal momento che dai test precedenti è emerso che le nanoparticelle ottenute per post-funzionalizzazione sono più performanti in termini di rilascio sostenuto nel tempo, si è deciso di condurre questa seconda batteria di prove unicamente su di esse.

2.2.9 Prove di rilascio di farmaco da parte dei nanovettori stimolati con Ultrasuoni ad alta frequenza (HF) e a bassa frequenza (LF)

Una volta realizzate le Ibu@MSN(P)-SA-Ca²⁺ e le Ibu@MSN(C)-SA-Ca²⁺ si è proceduto con la loro stimolazione con ultrasuoni a bassa e ad alta frequenza, per valutare la possibilità di ottenere il rilascio di farmaco controllato da US. Da alcuni studi è emersa la capacità degli ultrasuoni di rompere le interazioni tra i cationi bivalenti (in questo caso gli ioni Ca²⁺) e l'alginato di sodio e la loro capacità di riformarsi quando si procede alla rimozione dello stimolo [86] [112]. Lo stato gel, caratteristico delle nanoparticelle prima dell'applicazione dello stimolo US, dovrebbe diventare sol in seguito all'applicazione di questo a bassa o alta frequenza. Dopo la rimozione dello stimolo, lo stato sol dovrebbe ritornare allo stato gel originale. L'approccio proposto prevede quindi l'impiego di un'opportuna stimolazione US in grado di indebolire in modo reversibile l'interazione tra i gruppi

COO⁻ dell'alginato e gli ioni Ca²⁺ introdotti con il processo di reticolazione, al fine di consentire il rilascio controllato del farmaco incorporato nella struttura porosa.

Per fare questo sono stati utilizzati due sistemi LIPUS (“Low-intensity pulsed ultrasound”) realizzati dal gruppo di ricerca *Regenerative Technologies Lab* della Scuola Superiore Sant’Anna [113]. I due differenti setup sono stati realizzati per esplorare rispettivamente le basse frequenze (38 kHz) e le alte frequenze (500 kHz-5 MHz). Questi sistemi consentono di selezionare i vari parametri della stimolazione: frequenza, potenza, durata del trattamento, duty-cycle e pulse repetition frequency. I test di rilascio di farmaco sui nanovettori stimolati con US sono stati effettuati variando i parametri della stimolazione, al fine di valutare la diversa risposta dei nanovettori in termini di quantità di farmaco rilasciato.

Le prime analisi sono state eseguite sul sistema LIPUS ad alta frequenza (HF) che presenta il vantaggio di consentire l’analisi di tre campioni alla volta (Figura 42).

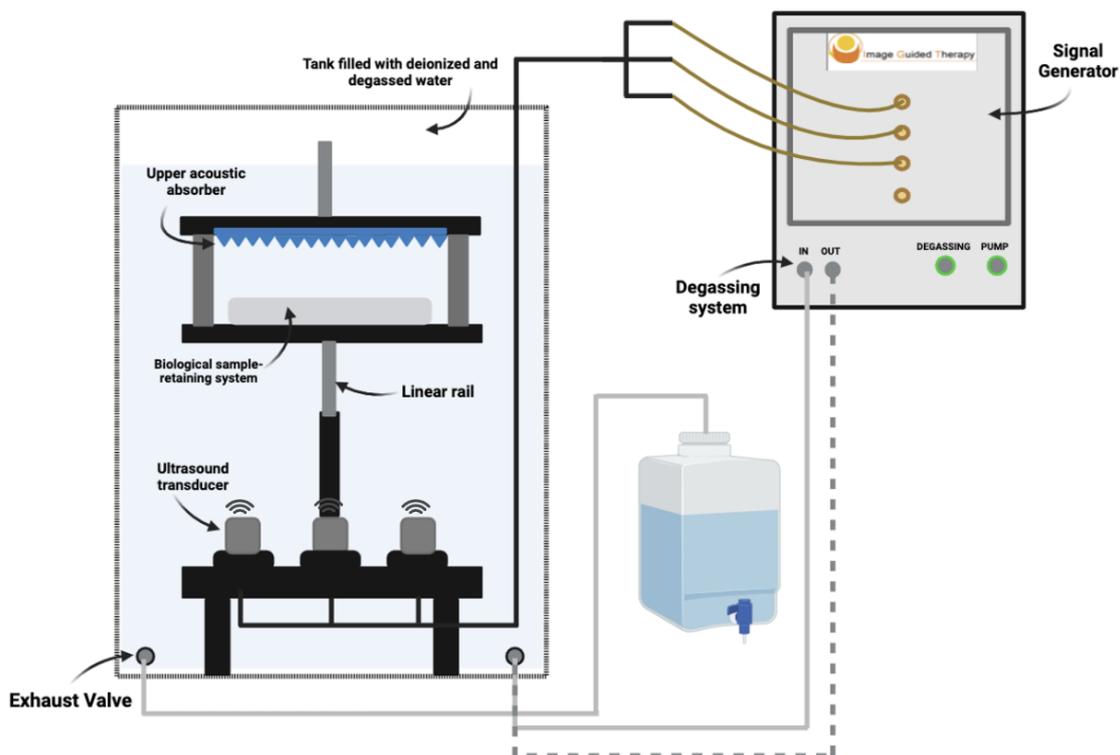


Figura 42: Rappresentazione schematica del sistema ad alta frequenza (HF)

Il sistema dedicato alle stimolazioni US ad alta frequenza presenta una vasca che è stata innanzitutto riempita con acqua deionizzata. L’acqua è poi stata degassata sfruttando il sistema di degassaggio dedicato, in modo tale da limitare la presenza di bolle all’interno della vasca che altererebbero le condizioni di stimolazione a cui i nanovettori sono sottoposti. Il sistema prevede la presenza di un

pannello posto al di sopra del disco portacampioni in grado di assorbire le onde acustiche riflesse. Vi sono 3 diversi trasduttori posti a una certa distanza dai 3 campioni, in grado di fornire la stimolazione US (500 kHz – 5 MHz). I campioni vengono posizionati in un disco portacampioni impermeabile all'acqua e costruito in modo da non alterare la stimolazione US (Figura 43). Il livello dell'acqua deionizzata e degassata deve necessariamente oltrepassare il pannello assorbente sovrastante il portacampioni, in modo tale da garantire una trasmissione controllata dell'onda ultrasonica senza attenuazioni o riflessioni. Per regolare i parametri di stimolazione viene impiegato un generatore multicanale (IGT) che è in grado di generare una potenza massima pari a 2W con la possibilità di variare i parametri elencati precedentemente.

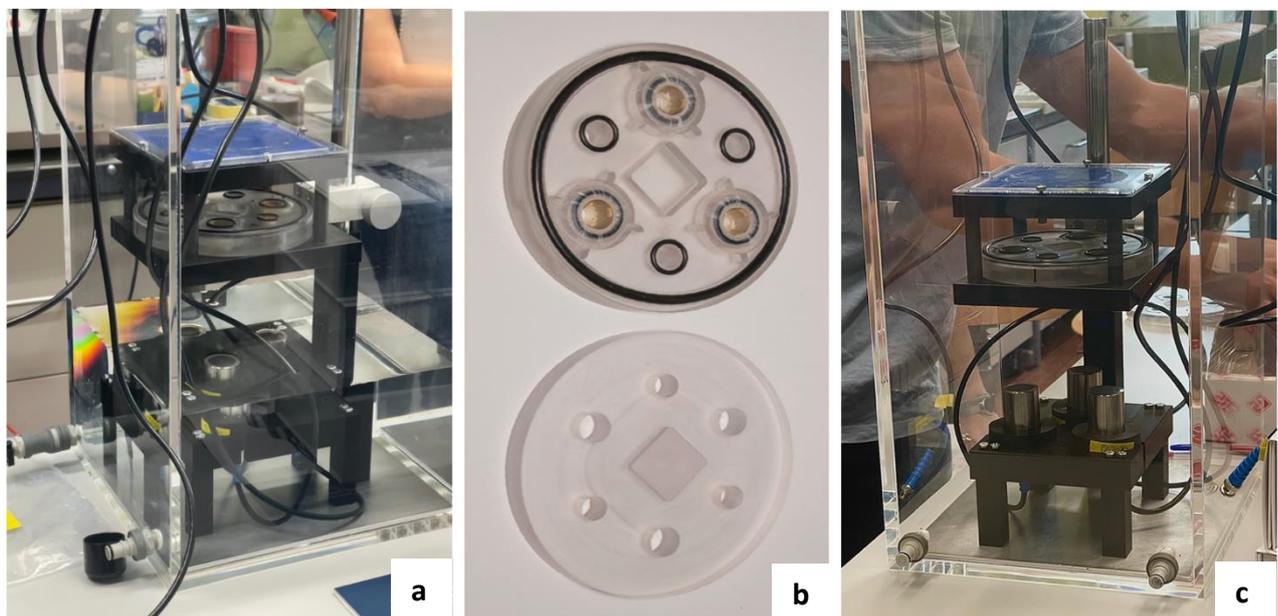


Figura 43: Sistema ad alta frequenza (HF)

Sono stati testati sia i campioni ottenuti per post-funzionalizzazione (Ibu@MSN(P)-SA-Ca²⁺) che quelli ottenuti per co-condensazione (Ibu@MSN(C)-SA-Ca²⁺). Per ottenere una misura più affidabile i test sono stati realizzati in triplicato.

Per alloggiare i campioni è stato posizionato nelle camere dei due dischi in policarbonato (superiore e inferiore) un film di latex ben teso e fissato opportunamente tramite un cilindro in PEEK, un o-ring e una guarnizione in teflon come illustrato nella Figura 43b. Per eseguire la prova, 30 mg di polveri sono state sospese in 3 mL di Tris HCl 0.1 M. La sospensione è stata introdotta all'interno dell'apposito spazio nel disco portacampioni, poi coperto con il disco di copertura fissato tramite viti e bulloni. Il portacampioni è poi stato inserito nell'apposito alloggiamento all'interno della vasca del

sistema LIPUS (come illustrato nella Figura 43) e si è proceduto alla stimolazione del campione impostando i seguenti parametri (Tabella 2):

Frequenza	1 MHz
Potenza	3 W/cm ²
Duty Cycle	20 %
Pulse Repetition Frequency	1 kHz
Time	10 min

Tabella 2: Parametri utilizzati per la stimolazione ad alta frequenza

È stata effettuata una stimolazione di durata di 10 minuti ogni ora per 5 ore, e successivamente si è proceduto a quantificare il rilascio di ibuprofene dopo 10 minuti, 1 h, 1 h e 10 min, 2 h, 2 h e 10 min, 3 h, 3 h e 10 min, 4 h, 4 h e 10 min e 5 h di immersione delle particelle in Tris HCl. Alle tempistiche definite, i campioni sono stati centrifugati (10'000 rpm, 8 min) e si è prelevato il surnatante; in seguito le nanoparticelle sono state ogni volta risospese in 3 mL di Tris HCl 0,1 M e reinserite all'interno dell'agitatore orbitale fino alla stimolazione (Figura 44). I surnatanti prelevati alle tempistiche definite sono stati diluiti con etanolo, come spiegato nel paragrafo 2.2.7, ed analizzati con l'HPLC.

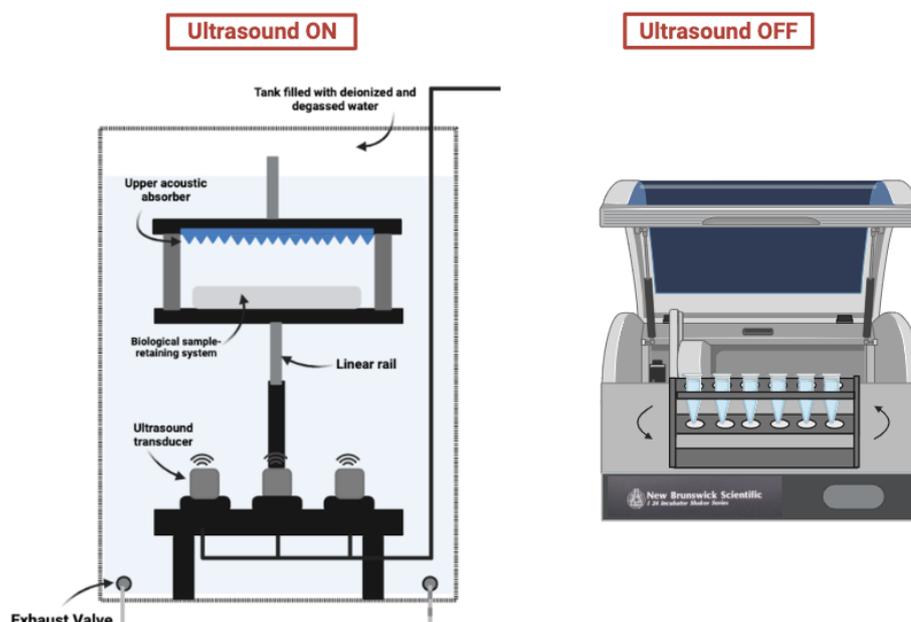


Figura 44: Rappresentazione schematica che mette in evidenza i macchinari utilizzati per la stimolazione ultrasonica on-off

Dal momento che le prove di rilascio di farmaco da parte dei nanovettori stimolati con US secondo i parametri e le tempistiche inizialmente testate non hanno dato i risultati sperati, si è proceduto a

definire una nuova metodologia di stimolazione US. Nello specifico, è stato analizzato il quantitativo di ibuprofene rilasciato dai nanovettori dopo 30 s, 1 min e 5 min di stimolazione US. Le prove sono state svolte in triplicato. Per valutare la cinetica di rilascio a tempistiche più lunghe, si è proceduto per ogni campione a raccogliere il surnatante dopo 1 ora, 3 ore, 6 ore e 24 ore dall'inizio della prova. Dal momento che dai test precedenti è emerso che le nanoparticelle ottenute per post-funzionalizzazione sono più performanti in termini di rilascio sostenuto nel tempo, si è deciso di condurre queste prove unicamente su di esse. La seconda analisi con il sistema LIPUS ad alta frequenza ha previsto l'utilizzo dei seguenti parametri (Tabella 3):

Frequenza	500 kHz
Potenza	250 mW/cm ²
Duty Cycle	20 %
Pulse Repetition Frequency	1 kHz
Time	30 sec, 1 min, 5 min

Tabella 3: Parametri utilizzati per la stimolazione ad alta frequenza

Alle tempistiche definite, i campioni sono stati centrifugati (10'000 rpm, 8 min) e si è prelevato il surnatante; in seguito, le nanoparticelle sono state ogni volta risospese in 3 mL di Tris HCl 0,1 M e reinserte all'interno dell'agitatore orbitale fino alla stimolazione. I surnatanti prelevati alle tempistiche definite sono stati diluiti con etanolo, come spiegato nel paragrafo 2.2.7, ed analizzati con l'HPLC.

Tuttavia, a causa di un problema con l'HPLC non è stato possibile analizzare i rilasci di farmaco ottenuti in seguito alla stimolazione con questi nuovi parametri.

La seconda prova è stata effettuata con il sistema LIPUS a bassa frequenza il cui set-up è illustrato nella Figura 45.

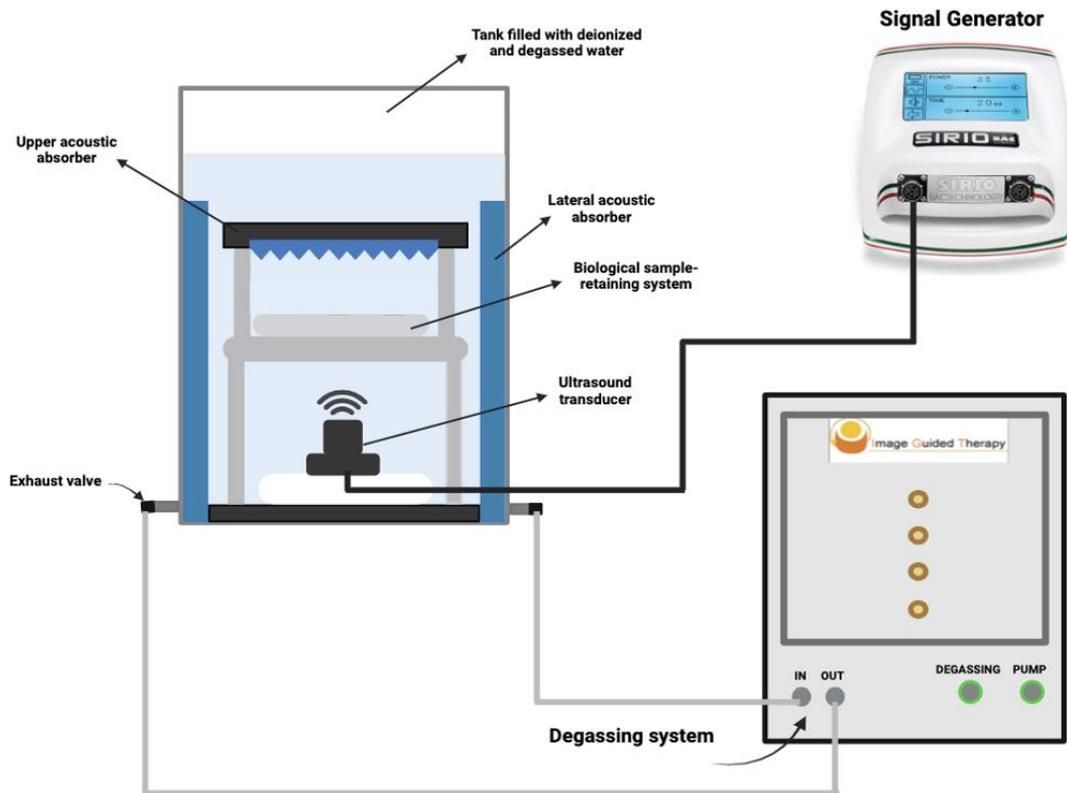


Figura 45: Rappresentazione schematica del sistema a bassa frequenza (LF).

Anche in questo caso è stato riempito un serbatoio (di dimensioni maggiori rispetto al caso precedente) con acqua deionizzata e degassata grazie al sistema dedicato. Il sistema prevede la presenza di diversi pannelli (tre laterali e uno posto al di sopra del disco portacampioni) in grado di assorbire le onde acustiche riflesse. Vi è inoltre un trasduttore, posto a una distanza fissa dal campione, in grado di fornire una stimolazione US a 38 kHz. Il campione viene posizionato in un disco portacampioni impermeabile all'acqua e costruito in modo da non alterare la stimolazione US. In questo caso, il portacampioni è dotato di un'unica camera (come si può vedere nella Figura 32) ossia è possibile andare a eseguire una singola analisi alla volta. Anche in questo caso, il livello dell'acqua deionizzata e degassata deve necessariamente oltrepassare il pannello assorbente e quindi i campioni in modo tale da garantire una trasmissione controllata dell'onda US senza attenuazioni o riflessioni. Per controllare i parametri di stimolazione del trasduttore è stato utilizzato un generatore SIRIO portatile (BAC s.r.l) come quello illustrato nella Figura 46.

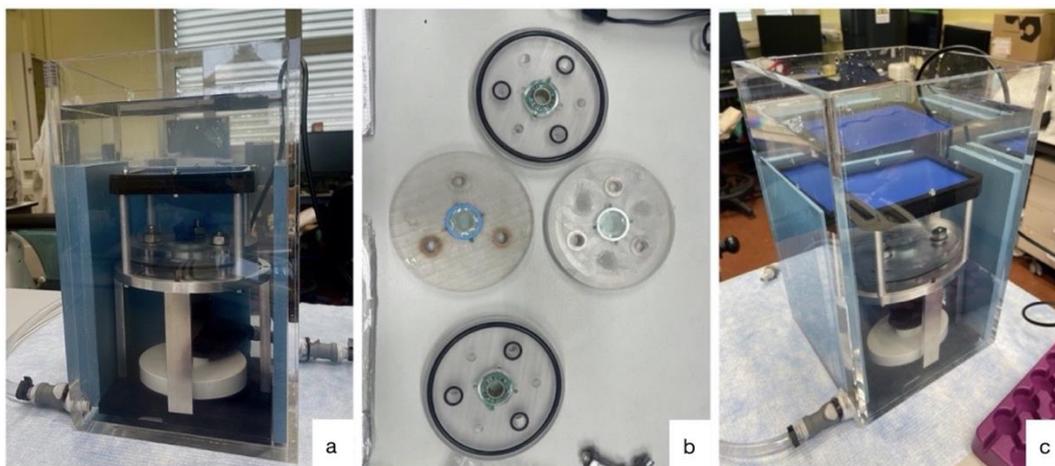


Figura 46: Sistema a bassa frequenza (LF)

Attraverso questa analisi sono stati testati i campioni ottenuti per post-funzionalizzazione (Ibu@MSN(P)-SA-Ca²⁺). Per ogni stimolazione le prove sono state eseguite in triplicato.

Il test procede in modo analogo a quanto descritto per il sistema ad alta frequenza, impostando per la stimolazione i seguenti parametri (Tabella 4):

Frequenza	38 kHz
Potenza	250 mW/cm ²
Duty Cycle	20 %
Pulse Repetition Frequency	1 kHz
Time	30 sec, 1 min, 5 min

Tabella 4: Parametri utilizzati per la stimolazione a bassa frequenza

Nello specifico, è stato analizzato il quantitativo di ibuprofene rilasciato dai nanovettori dopo 30 s, 1 min e 5 min di stimolazione US. Le prove sono state svolte in triplicato. Per valutare la cinetica di rilascio a tempistiche più lunghe, si è proceduto per ogni campione a raccogliere il surnatante dopo 1 ora, 3 ore, 6 ore e 24 ore dall'inizio della prova. Alle tempistiche definite, i campioni sono stati centrifugati (10'000 rpm, 8 min) e si è prelevato il surnatante; in seguito, le nanoparticelle sono state ogni volta risospese in 3 mL di Tris HCl 0,1 M e reinserite all'interno dell'agitatore orbitale fino alla successiva stimolazione (Figura 47). I surnatanti prelevati alle tempistiche definite sono stati diluiti con etanolo, come spiegato nel paragrafo 2.2.7, ed analizzati con l'HPLC.

Anche in questo caso a causa di un problema legato al macchinario dell'HPLC, non è stato possibile analizzare il surnatante rimanente dai test di rilascio.

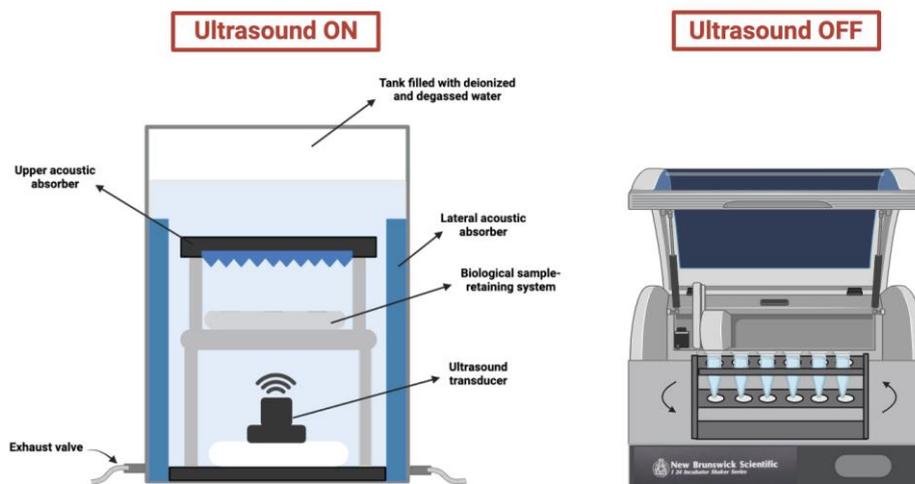


Figura 47: Rappresentazione schematica che mette in evidenza i macchinari utilizzati per la stimolazione ultrasonica on-off

2.2.10 Test di stabilità delle nanoparticelle nei solventi impiegati per l'elettrofilatura di fibre contenenti i nanovettori

Il progetto REBORN si propone di sviluppare un patch impiantabile a livello del miocardio, caratterizzato da una struttura fibrosa elettrofilata arricchita con le nanoparticelle sviluppate in questo lavoro di tesi. L'elettrofilatura richiede la preparazione di una sospensione stabile delle nanoparticelle nella soluzione polimerica da filare. Nello specifico, il solvente selezionato per il processo è una miscela di etanolo ed acetone. Risulta quindi necessario valutare se l'interazione con il solvente selezionato provoca la degradazione dei nanovettori. A questo fine, è stato preparato 1 mL di soluzione contenente DMSO (50% w/v) e acetone (50% w/v) a cui sono stati aggiunti 100 mg di Ibu@MSN(P)-SA-Ca²⁺. La sospensione è stata lasciata nell'agitatore orbitale a T ambiente per 3 ore. Si è quindi proceduto con la centrifugazione del precipitato (8 min, 10'000 rpm), il lavaggio con acqua deionizzata (8 min, 10'000 rpm) e alla successiva rimozione del surnatante. Le nanoparticelle sono state poi fatte seccare in stufa a 70°C per tutta la notte e successivamente si è proceduto con le caratterizzazioni. I nanovettori essiccati sono stati caratterizzati al FE-SEM e alla FT-IR per andare a valutare eventuali alterazioni della morfologia e della chimica superficiale.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo capitolo verranno presentati e discussi i risultati delle analisi condotte sui nanovettori preparati. Nello specifico, è stata realizzata una caratterizzazione completa delle due tipologie di nanovettori prodotte al fine di studiare le differenze tra le nanoparticelle realizzate per post-funzionalizzazione e per co-condensazione.

Inizialmente verranno analizzati i risultati ottenuti al microscopio elettronico a scansione ad emissione di campo (FE-SEM) che ha permesso di analizzare la morfologia delle particelle, mentre per valutarne le dimensioni ed il potenziale zeta si è utilizzato il Dynamic Light Scattering (DLS). L'analisi di adsorbimento-desorbimento di azoto ha permesso di valutare l'area superficiale, la taglia e il volume dei pori. La spettroscopia infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR) ha confermato la corretta funzionalizzazione della superficie delle nanoparticelle in ogni step del processo di preparazione. Attraverso l'analisi termogravimetrica (TGA) si è valutato il quantitativo di farmaco caricato nella struttura mesoporosa. Successivamente sono state realizzate delle prove per valutare il rilascio di farmaco da parte delle nanoparticelle in assenza di stimolazione US. Infine è stato svolto un test preliminare per valutare il rilascio di ibuprofene da parte dei due tipi di nanovettori sottoposti a stimolazione con US ad alta frequenza.

3.1 Microscopia a scansione elettronica ad emissione di campo (FE-SEM)

I nanovettori sono stati analizzati al FE-SEM in ogni fase del processo di preparazione, per osservare la morfologia, le dimensioni e la tendenza delle nanoparticelle ad aggregare in seguito a ciascuna funzionalizzazione.

La figura 48 mostra le nanoparticelle tal quali non funzionalizzate con gruppi amminici. È possibile osservare una forma abbastanza sferica e regolare delle particelle, in accordo con quanto riportato in letteratura [89] [90]. Le sospensioni delle nanoparticelle in isopropanolo, da cui sono state prelevate le gocce depositate sul retino in rame per l'analisi, sono state trattate nel bagno ad ultrasuoni (frequenza 40 kHz) in modo tale da avere una maggiore dispersione delle nanoparticelle e da limitare la presenza di agglomerati. Nell'immagine sono, infatti, chiaramente visibili le singole particelle e grazie al FE-SEM è stato possibile valutarne il diametro in modo da stimare le dimensioni e la loro uniformità.

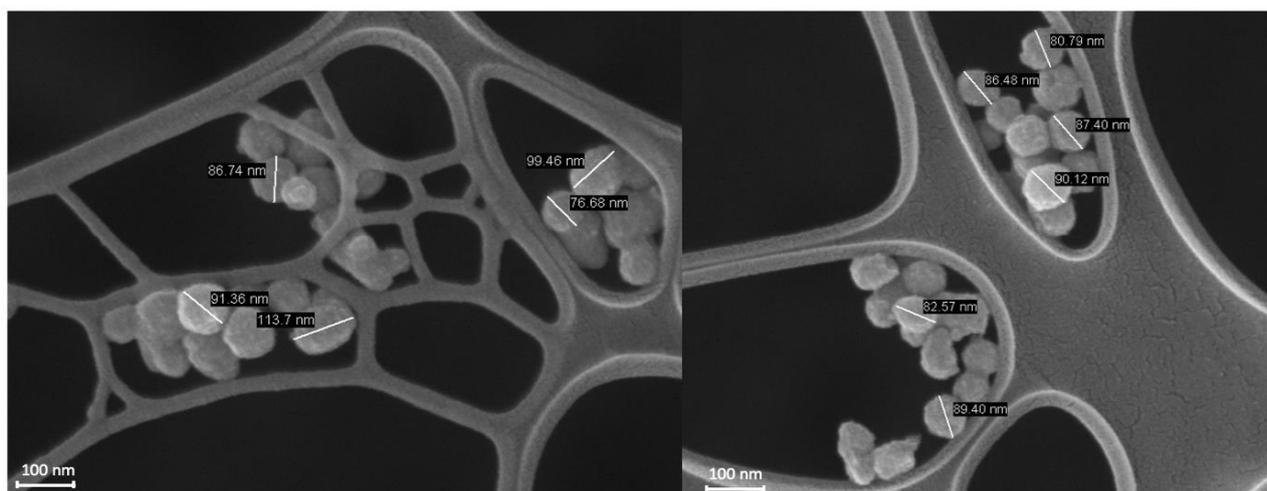


Figura 48: Immagini al FE-SEM delle MSN

Le nanoparticelle sono stati successivamente funzionalizzati con gruppi amminici e per vedere se in seguito alla funzionalizzazione vi fossero delle differenze morfologiche, dimensionali e sull'aggregazione delle nanoparticelle. Nell'immagine 49 è possibile osservare che, in seguito alla funzionalizzazione, le MSN(P)-NH₂, continuano a mantenere una forma sferica e regolare. Anche in questo caso la sospensione di nanoparticelle in isopropanolo è stata inserita nel bagnetto ad ultrasuoni che ha permesso di limitare la presenza di agglomerati. Infatti, nell'immagine è possibile osservare la presenza di singole particelle ed è stato possibile andare a misurarne i diametri. In questo caso, i diametri calcolati risultano essere leggermente superiori rispetto a quelli trovati precedentemente. Questo aumento di dimensione, nell'ordine dei 90-100 nm, è riconducibile all'avvenuta funzionalizzazione con gruppi amminici, aspetto che è stato osservato anche in letteratura [111].

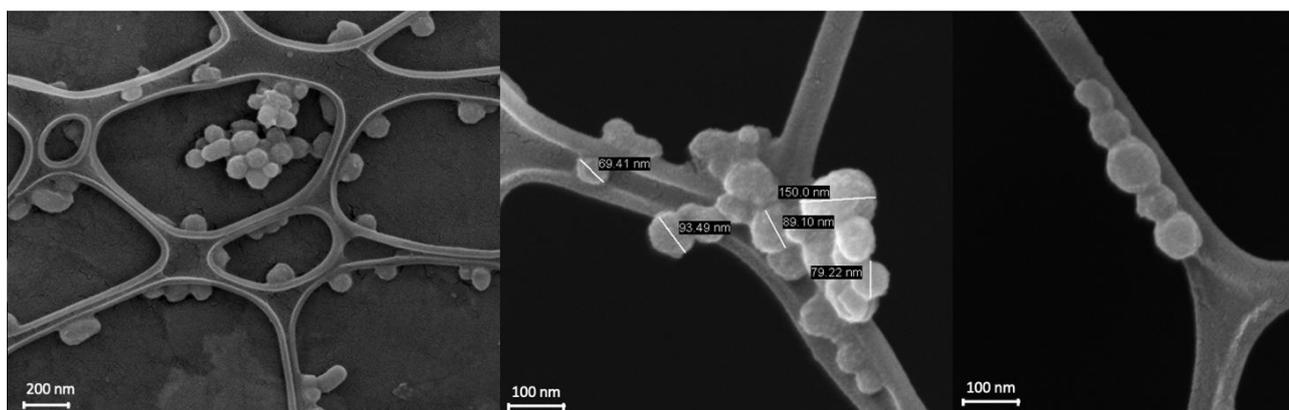


Figura 49: Immagini al FE-SEM delle MSN(P)-NH₂

Nella figura 50 sono, invece, illustrate le MSN(C)-NH₂ che presentano una morfologia prevalentemente sferica e regolare simile a quella osservata in figura 46 relativa alle MSN(P)-NH₂. Come per le nanoparticelle post-funzionalizzate, la sospensione di MSN(C)-NH₂ in isopropanolo è stata soggetta al trattamento nel bagnetto a ultrasuoni che ha limitato, in questo modo, la presenza di agglomerati. I diametri delle nanoparticelle in questione misurati al FE-SEM risultano essere leggermente superiori rispetto a quelli calcolati in precedenza per le MSN(P)-NH₂,

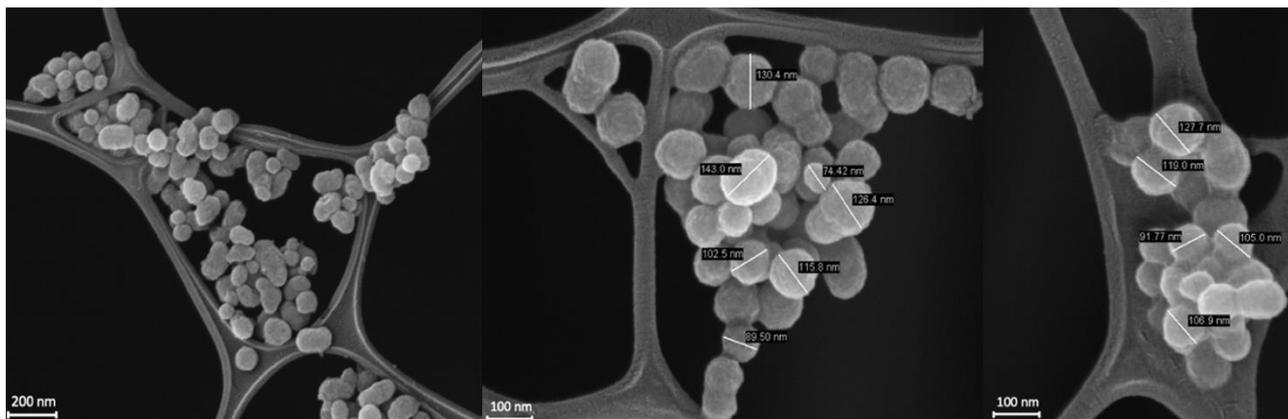


Figura 50: Immagini al FE-SEM delle MSN(C)-NH₂

Successivamente sulle nanoparticelle è stato caricato il farmaco ed è stato poi effettuato il rivestimento con catene di SA. In seguito all'aggiunta di quest'ultimo, l'interazione tra il fascio e l'alginato di sodio produce una distorsione dell'immagine chiaramente visibile in figura 48 e 49. Il caricamento di farmaco non comporta alcuna modifica sulla morfologia e sulle dimensioni delle nanoparticelle. Per questo motivo, si è deciso di eseguire l'analisi sulle nanoparticelle non caricate ed è stata effettuata solo alla fine un'analisi sul campione caricato con il farmaco.

In questo caso è stato adottato un accorgimento nella preparazione del campione: le sospensioni delle nanoparticelle in isopropanolo non sono state trattate nel bagno ad ultrasuoni. Un trattamento nel bagnetto ad ultrasuoni potrebbe infatti alterare la morfologia dell'alginato di sodio che riveste le nanoparticelle: si è quindi deciso di omettere questo passaggio. In accordo con le aspettative, l'analisi morfologica nelle figure 51 e 52 mostra che le nanoparticelle presentano maggiore aggregazione, a causa della mancanza dell'effetto disperdente del trattamento nel bagno ad ultrasuoni. Si osserva che i nanoparticelle risultano tuttavia ben individualizzati, ad indicare che il rivestimento polimerico ha interessato le singole particelle e non è stato ancorato su agglomerati di particelle funzionalizzate con amminogruppi.

Nella figura 51 sono illustrate le MSN(P)-SA che risultano aggregate tra di loro ma presentano ugualmente una morfologia sferica e regolare in accordo con quanto osservato precedentemente.

Anche in questo caso, nonostante la presenza degli agglomerati, è comunque stato possibile misurare le dimensioni delle singole nanoparticelle che risultano essere di circa 90-100 nm.

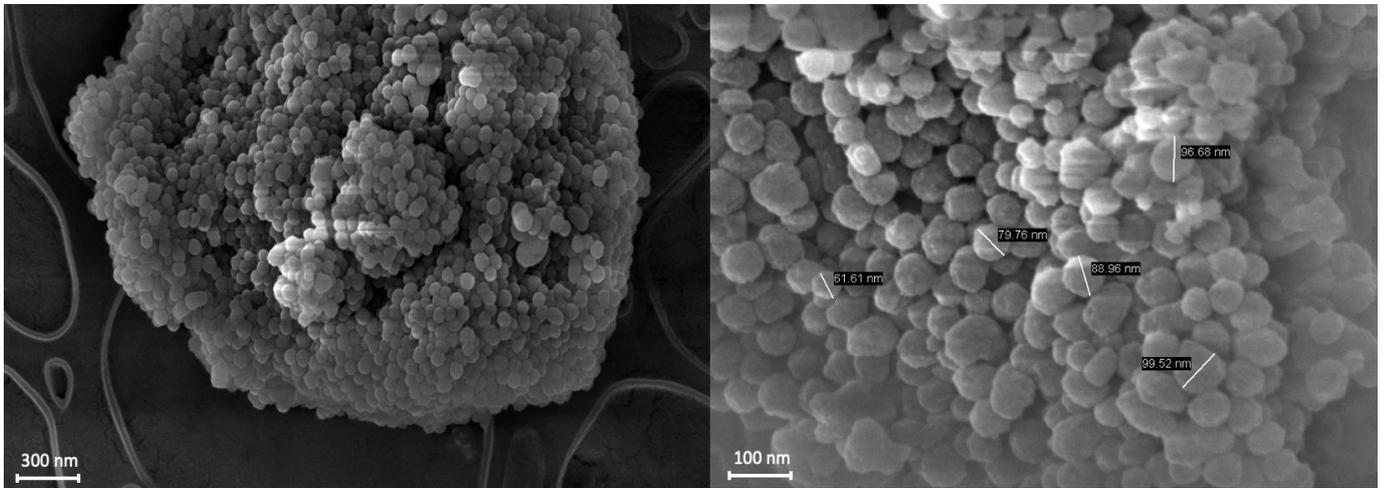


Figura 51: Immagini al FE-SEM delle MSN(P)-SA

Nell'immagine 52 sono invece illustrate le MSN(C)-SA, che presentano la stessa morfologia sferica e regolare osservata precedentemente. Anche in questo caso, nonostante la mancanza dell'effetto disperdente del trattamento nel bagno ad ultrasuoni, è stato possibile andare a misurare al FE-SEM la taglia delle nanoparticelle che risulta essere, anche in questo caso, nell'ordine dei 90-100 nm. Quindi, da un punto di vista morfologico, non è stata osservata fino ad ora alcuna differenza tra le due tipologie di nanoparticelle.

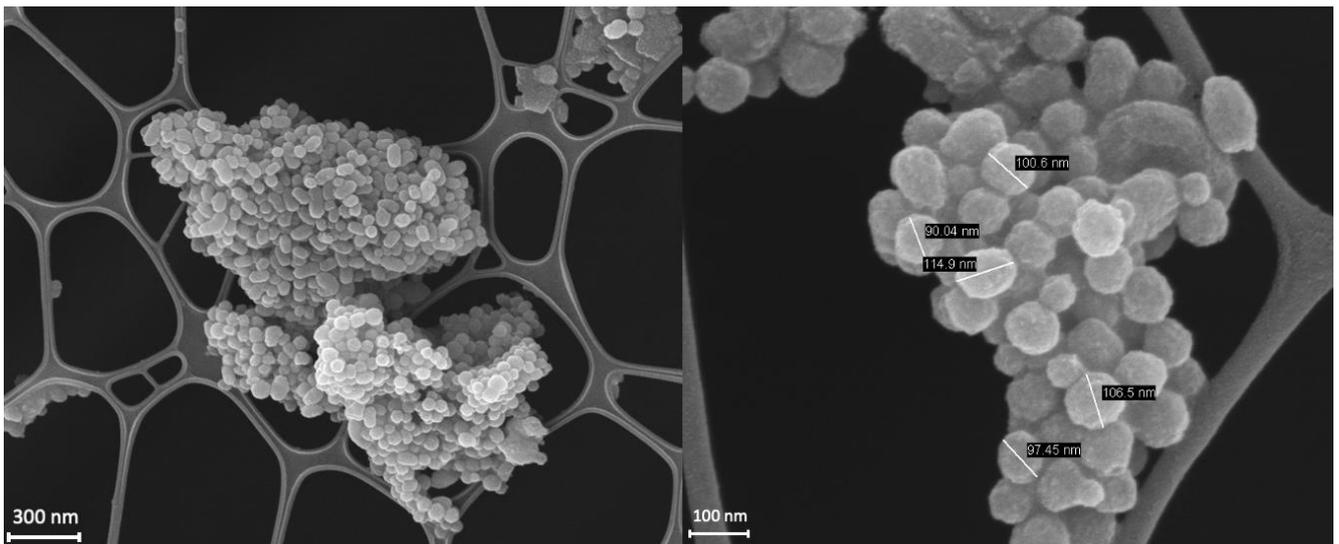


Figura 52: Immagini al FE-SEM delle MSN(C)-SA

L'alginato di sodio è stato successivamente reticolato con il CaCl_2 (Figura 53 e 54). Dall'immagine 53 è possibile osservare che anche in seguito a tutte le funzionalizzazioni effettuate, le $\text{Ibu@MSN(P)-SA-Ca}^{2+}$ presentano una morfologia sferica e abbastanza regolare e delle dimensioni nell'ordine dei 90-100 nm. Anche in questo caso, si è scelto di non trattare il campione nel bagno a ultrasuoni in quanto si rischierebbe di alterare il rivestimento e della reticolazione effettuata. Infatti, si osserva nell'immagine la presenza di agglomerati ma, anche in questo caso, si riscontra una buona individualizzazione delle singole particelle.

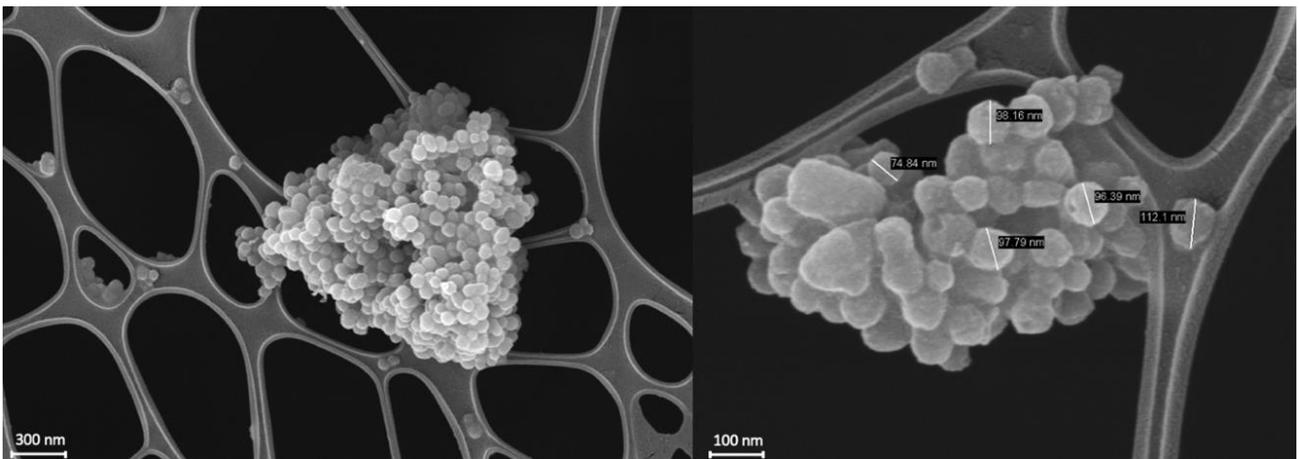


Figura 53: Immagini al FE-SEM delle $\text{Ibu@MSN(P)-SA-Ca}^{2+}$

Anche nel caso delle $\text{Ibu@MSN(C)-SA-Ca}^{2+}$, è possibile osservare nella figura 54, il mantenimento della forma sferica e regolare delle nanoparticelle anche in seguito alle funzionalizzazioni effettuate. Il non trattamento delle nanoparticelle nel bagno a ultrasuoni ha determinato la formazione di aggregati chiaramente visibile nell'immagine. Anche in questo caso si riescono comunque ad individuare delle singole particelle e a misurare la taglia media che risulta sempre pari ai 90-100 nm.

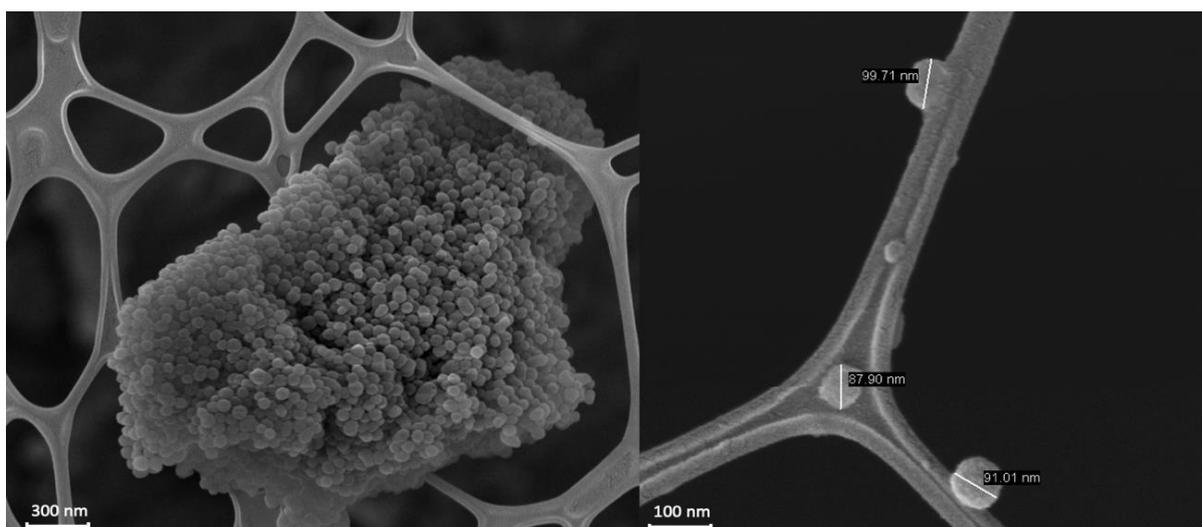


Figura 54: Immagini al FE-SEM delle Ibu@MSN(C)-SA-Ca²⁺

3.2 Dynamic Light Scattering (DLS)

Nel seguente paragrafo vengono esposti i risultati dell'analisi DLS, che ha permesso di valutare la taglia e il potenziale zeta delle nanoparticelle. Successivamente sono stati confrontati i risultati ottenuti da questa analisi con quelli dell'analisi FE-SEM.

	Taglia	Potenziale Zeta (ζ)
MSN	124 ± 8 nm	-22 ± 1 mV
MSN(P)-NH ₂	190 ± 3 nm	-17 ± 4 mV
MSN(P)-SA	180 ± 8 nm	-25 ± 3 mV
Ibu@MSN(P)-SA-Ca ²⁺	332 ± 4 nm	-21 ± 1 mV

Tabella 5: Valori ottenuti dall'analisi al DLS

Osservando la tabella 5, le dimensioni delle nanoparticelle risultano essere superiori in confronto a quanto osservato con l'analisi FE-SEM, in cui si è osservata una dimensione media di 90 nm, ma questo può essere spiegato andando a valutare il valore del potenziale zeta. È possibile osservare, sia nel caso delle MSN che in quello delle MSN(P)-NH₂, un valore di potenziale zeta inferiore in valore assoluto a 30 mV. Avendo dei valori di potenziale zeta pari a -22 ± 1 mV e -17 ± 4 mV, le nanoparticelle hanno una maggiore tendenza a formare aggregati e, per questo motivo, la taglia risulta essere superiore rispetto ai valori osservati al FE-SEM. In accordo con le aspettative, le nanoparticelle di silice mesoporosa presentano potenziale zeta negativo [111]. Dal confronto tra il valore del potenziale zeta delle MSN prima e dopo la funzionalizzazione con APST (MSN(P)-NH₂) si osserva come l'aggiunta di amminogruppi sulla superficie delle nanoparticelle sia associata alla diminuzione

del potenziale zeta: grazie alla presenza dei gruppi amminici protonati in acqua, la superficie delle particelle diventa meno negativa.

In seguito al rivestimento con SA il potenziale zeta diventa ancora di più negativo a causa dei numerosi gruppi carbossilici dell'alginato di sodio [86]. La taglia delle MSN(P)-SA non corrisponde alla taglia media osservata tramite l'analisi FE-SEM. Osservando, anche in questo caso il valore del potenziale zeta, inferiore in valore assoluto a 30 mV, viene spiegato il valore della taglia delle nanoparticelle e la loro tendenza a formare aggregati. In seguito alla reticolazione con CaCl₂, le Ibu@MSN(P)-SA-Ca²⁺ presentano un valore del potenziale zeta pari a -21 ± 1 mV, che risulta essere un po' meno negativo a causa della presenza dei Ca²⁺ [111]. La taglia delle nanoparticelle finite, pari a 332 ± 4 nm, risulta essere notevolmente superiore rispetto a quella osservata con l'analisi FE-SEM e questo viene confermato dal potenziale zeta che si discosta ancora di più dai 30 mV in valore assoluto rispetto al caso precedente.

	Taglia	Potenziale Zeta (ζ)
MSN(C)-NH ₂	204 ± 8 nm	-16 ± 1 mV
MSN(C)-SA	220 ± 6 nm	-22 ± 3 mV
Ibu@MSN(C)-SA-Ca ²⁺	354 ± 8 nm	-20 ± 1 mV

Tabella 6: Valori ottenuti dall'analisi al DLS

Nella tabella 6 sono riportati i valori delle nanoparticelle preparate per co-condensazione. Le MSN(C)-NH₂ presentano un potenziale zeta di -16 ± 1 mV e presentano una taglia superiore a quella delle MSN(P)-NH₂. Quindi, anche in questo caso le nanoparticelle hanno la tendenza ad avvicinarsi le une con le altre e formare agglomerati. In seguito al rivestimento con catene di SA si osserva un comportamento analogo a quanto descritto precedentemente, in questo caso il potenziale zeta risulta essere leggermente inferiore in valore assoluto a quello delle MSN(P)-SA e a 30 mV. In seguito alla reticolazione, il potenziale zeta tende a crescere leggermente grazie alla presenza dei Ca²⁺ ma risulta sempre inferiore ai 30 mV cosa che permette di spiegare una taglia media delle nanoparticelle così elevata.

A seguito di questi risultati, l'analisi al DLS non risulta essere un'analisi affidabile per la valutazione della taglia media delle nanoparticelle con tendenza alla formazione di agglomerati: non è infatti possibile effettuare un confronto con le dimensioni misurate con l'analisi FE-SEM che offre una visione più precisa sulla taglia effettiva delle nanoparticelle.

3.3 Diffrazione a raggi X (XRD)

Nella figura 55 è possibile osservare gli spettri di diffrazione di raggi X realizzati sui campioni di silice funzionalizzata con amminogruppi in seguito al caricamento del farmaco (Ibu@MSN(P)-NH₂ e Ibu@MSN(C)-NH₂). Da questa analisi è stato possibile valutare lo stato cristallino dell'ibuprofene caricato all'interno dei pori delle nanoparticelle. Entrambi gli spettri presentano il caratteristico "alone amorfo" della silice. I picchi di diffrazione dei raggi X caratteristici dell'ibuprofene non vengono infatti rilevati nello spettro di diffrazione delle silici funzionalizzate e caricate con il farmaco. L'analisi mostra che la ri-cristallizzazione dell'ibuprofene all'interno dei pori non si è verificata durante l'evaporazione del solvente con il processo di incorporazione. Questa analisi ha permesso di confermare il voluto stato amorfo dell'ibuprofene all'interno dei pori delle nanoparticelle, caratteristica voluta in quanto i farmaci in forma cristallina presentano una velocità di dissoluzione inferiore rispetto a quelli in forma amorfa [114].

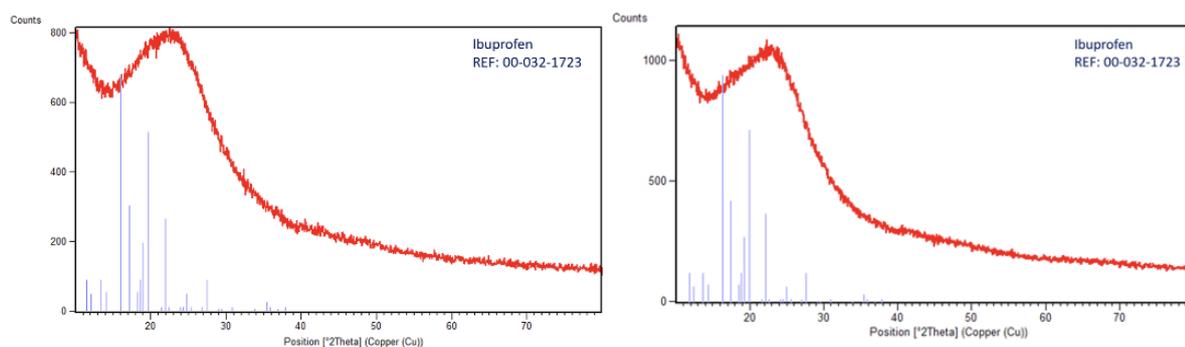


Figura 55: Analisi XRD delle Ibu@MSN(P)-NH₂ (sinistra) e delle Ibu@MSN(C)-NH₂ (destra)

3.4 Isoterma di adsorbimento-desorbimento di azoto (N₂)

Dall'analisi di adsorbimento-desorbimento di azoto è stato verificato che tutte le curve sono isoterme di tipo IV, caratteristiche dei materiali mesoporosi. Attraverso l'equazione BET è stato valutato il valore dell'area superficiale specifica, il modello DFT ha consentito la stima del volume dei pori mentre il metodo BJH ha permesso di valutare la taglia dei pori.

I risultati ottenuti da questa analisi sono stati riportati nella Tabella 5 sottostante.

	BET Area Superficiale Specifica	Volume totale dei pori	Taglia dei pori - BJH
MSN	1558 ± 47 m ² /g	0,79 cm ³ /g	2,45 nm
MSN(P)-NH ₂	449 ± 12 m ² /g	0,26 cm ³ /g	2,14 nm

	BET Area Superficiale Specifica	Volume totale dei pori	Taglia dei pori - BJH
MSN(C)-NH ₂	1244 ± 41 m ² /g	0,81 cm ³ /g	2,73 nm

Tabella 7: Valori ricavati dall'Analisi di adsorbimento-desorbimento di azoto

Dall'analisi dell'area superficiale specifica è emerso che i risultati sono confrontabili e coerenti con quanto riportato in letteratura [115] [116]. Dalla tabella 7 è possibile osservare che, le MSN in seguito alla post-funzionalizzazione presentano un'area superficiale specifica notevolmente inferiore, si passa da un valore di area superficiale specifica pari a 1558± 47 m²/g delle MSN a un valore di 449± 12 m²/g delle MSN(P)-NH₂. Questa diminuzione è dovuta alla presenza di gruppi amminici all'interno dei pori dei nanovettori che vanno a limitare l'adsorbimento dell'N₂ [57]. Confrontando questo valore con quello delle MSN(C)-NH₂, è possibile osservare che queste ultime presentano un valore di area superficiale superiore, pari a 1244 ± 41 m²/g paragonabile alle MSN dopo la calcinazione ma non ancora funzionalizzate.

Analizzando il volume dei pori, le MSN(C)-NH₂ presentano dei valori di area superficiale specifica e taglia e volume dei pori paragonabili a quelli delle MSN, pur presentando già la funzionalizzazione con -NH₂.

Analizzando la taglia dei pori, è possibile osservare un comportamento analogo a quanto riportato in letteratura [86]. Dalla tabella 7 si osserva che, per quanto riguarda le nanoparticelle post-funzionalizzate, la taglia dei pori diminuisce passando dai 2,45 nm (MSN) ai 2,14 nm (MSN(P)-NH₂). Questa diminuzione è dovuta, come nel caso del volume totale dei pori e dell'area superficiale specifica, alla funzionalizzazione con amminogruppi [57]. Confrontando questi valori con le MSN(C)-NH₂ si osserva che la taglia dei pori in questo ultimo caso risulta essere pari a 2,73 nm, superiore a quella riportata per le MSN(P)-NH₂. Questo risultato è paragonabile a quello delle MSN dopo la calcinazione ma non ancora funzionalizzate.

I risultati ottenuti sono conformi alle previsioni iniziali e con quanto riportato in letteratura.

3.5 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)

Per confermare la corretta funzionalizzazione della superficie delle nanoparticelle in ogni step del processo di preparazione è stata condotta l'analisi FT-IR. In particolare, in ogni spettro sono stati individuati i picchi caratteristici dei legami chimici presenti sulla superficie del campione.

Nella figura 56 sono illustrati i due spettri FT-IR relativi ai nanovettori prima e dopo la funzionalizzazione con gruppi amminici (MSN e MSN(P)-NH₂, rispettivamente).

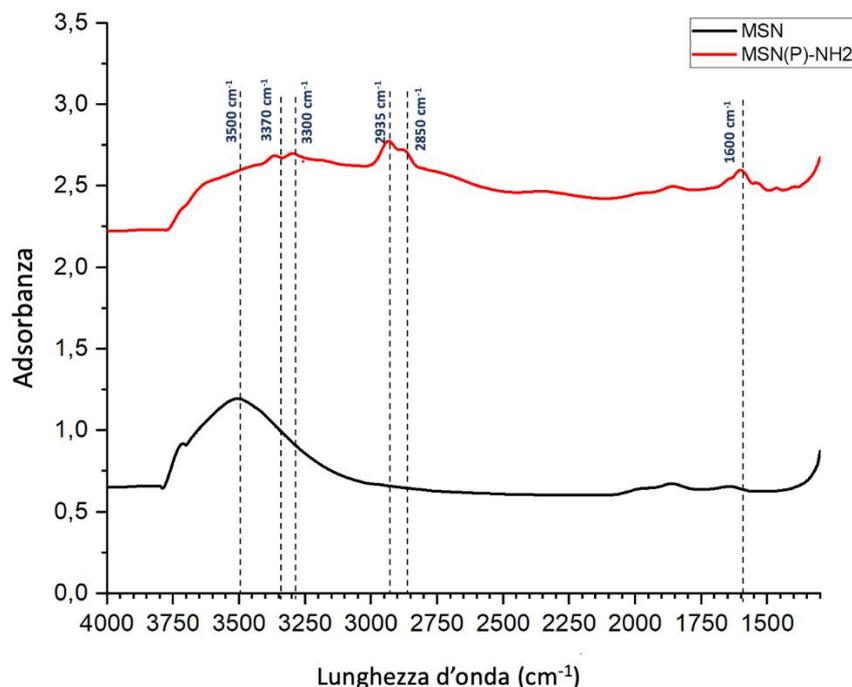


Figura 56: Analisi FTIR dei nanovettori pre e post funzionalizzazione con gruppi amminici

Nello spettro delle MSN, l'unico picco chiaramente visibile tra è quello nella banda intorno ai 3500 cm⁻¹ attribuito alla vibrazione di stretching simmetrico degli O-H dovuti all'acqua adsorbita sulla superficie delle nanoparticelle [117].

In confronto allo spettro delle MSN, quello delle MSN(P)-NH₂ presenta un picco nella banda intorno ai 1600 cm⁻¹ dovuto allo scissoring degli N-H₂. Presenta, poi, due picchi più visibili a 2850 cm⁻¹ e a 2935 cm⁻¹ relativi alla vibrazione di stretching simmetrico e asimmetrico dei C-H e altri due picchi intorno ai 3300 cm⁻¹ e 3370 cm⁻¹ relativi alla vibrazione di stretching simmetrico e asimmetrico degli N-H [117]. La presenza di questi picchi conferma, quindi, l'avvenuta funzionalizzazione con gruppi amminici della superficie dei nanovettori.

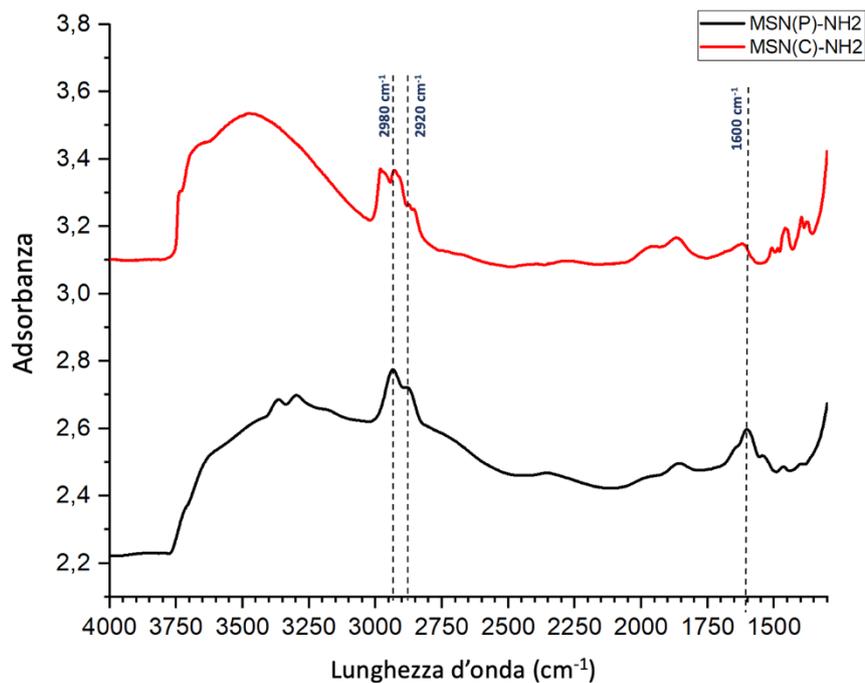


Figura 57: Analisi FT-IR che mette a confronto le nanoparticelle prodotte per post-funzionalizzazione e per co-condensazione

Nella figura 57 sono messi a confronto gli spettri relativi alle nanoparticelle prodotte per post funzionalizzazione e per co-condensazione in modo da vedere se presentassero picchi confrontabili. Osservando i due spettri è possibile notare che in quello delle MSN(C)-NH₂ non sono ben visibili i picchi di vibrazione di stretching degli N-H in quanto sovrapposti alla banda degli O-H, a differenza dello spettro delle MSN(P)-NH₂. In entrambi gli spettri è presente il picco intorno a 1600 cm⁻¹ relativo allo scissoring degli N-H₂. Quindi, anche nel caso delle nanoparticelle co-condensate, viene confermata l'avvenuta funzionalizzazione con amminogruppi.

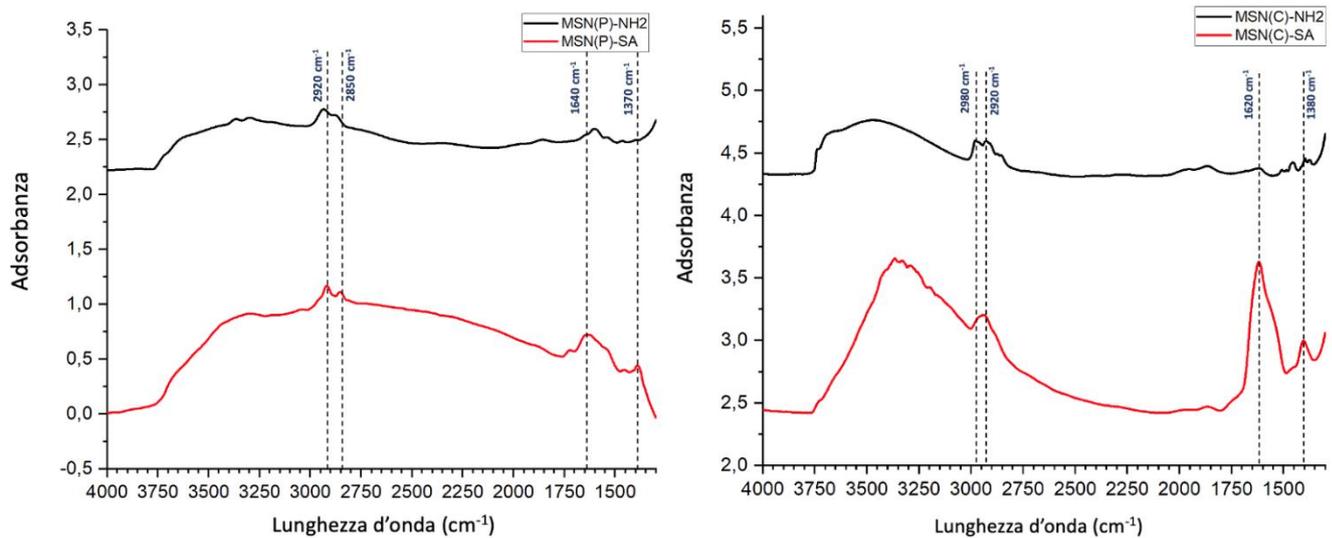


Figura 58: Analisi FTIR dei campioni preparati per post-funzionalizzazione (a sinistra) e per co-condensazione (a destra) in seguito al rivestimento con catene di SA

In seguito al rivestimento con alginato di sodio, è possibile osservare nella figura 58 la comparsa di nuovi picchi. In seguito al legame tra i gruppi NH_2 sulla superficie delle nanoparticelle ed i gruppi $-\text{COOH}$ dell'alginato di sodio, nello spettro relativo alle nanoparticelle post-funzionalizzate si osserva la comparsa di due picchi, uno a 1640 cm^{-1} e l'altro intorno ai 1370 cm^{-1} relativi al gruppo carbossilato ($-\text{COO}^-$) simmetrico e asimmetrico ($-\text{COO}^-$). Anche nello spettro delle nanoparticelle realizzate per co-condensazione osserviamo la presenza degli stessi picchi. La presenza di questi picchi conferma l'avvenuto rivestimento con SA sulla superficie delle nanoparticelle [111]. Si osserva anche la presenza dei picchi relativi allo scissoring degli N-H_2 e allo stretching dei legami C-H , confermando anche in seguito al rivestimento con SA la presenza della funzionalizzazione con gruppi amminici.

In seguito, è stato effettuato un confronto tra il campione rivestito con SA e il campione finito ($\text{Ibu@MSN(P)-SA-Ca}^{2+}$ e $\text{Ibu@MSN(C)-SA-Ca}^{2+}$) (Figura 59). Con il caricamento dell'Ibuprofene, nello spettro FT-IR (Figura 56) di entrambi i campioni si può osservare la comparsa di un picco intorno ai 1700 cm^{-1} relativo allo stretching del C=O dell'ibuprofene [118]. Nello spettro delle nanoparticelle post-funzionalizzate si osservano sempre i picchi a 2960 cm^{-1} e a 2920 cm^{-1} relativi allo stretching simmetrico e asimmetrico C-H_2 . Inoltre, è presente il picco relativo allo scissoring degli N-H_2 intorno ai 1640 cm^{-1} e il picco dovuto al gruppo carbossilato ($-\text{COO}^-$) dell'alginato di sodio intorno ai 1370 cm^{-1} . Anche nel caso delle nanoparticelle preparate per co-condensazione sono visibili gli stessi picchi descritti precedentemente ma a lunghezze d'onda leggermente diverse, comportamento che potrebbe essere dovuto all'interazione tra l'alginato di sodio e l'ibuprofene [119]. In entrambi i casi, dall'analisi degli spettri FT-IR è possibile confermare le avvenute funzionalizzazioni e il corretto caricamento del farmaco.

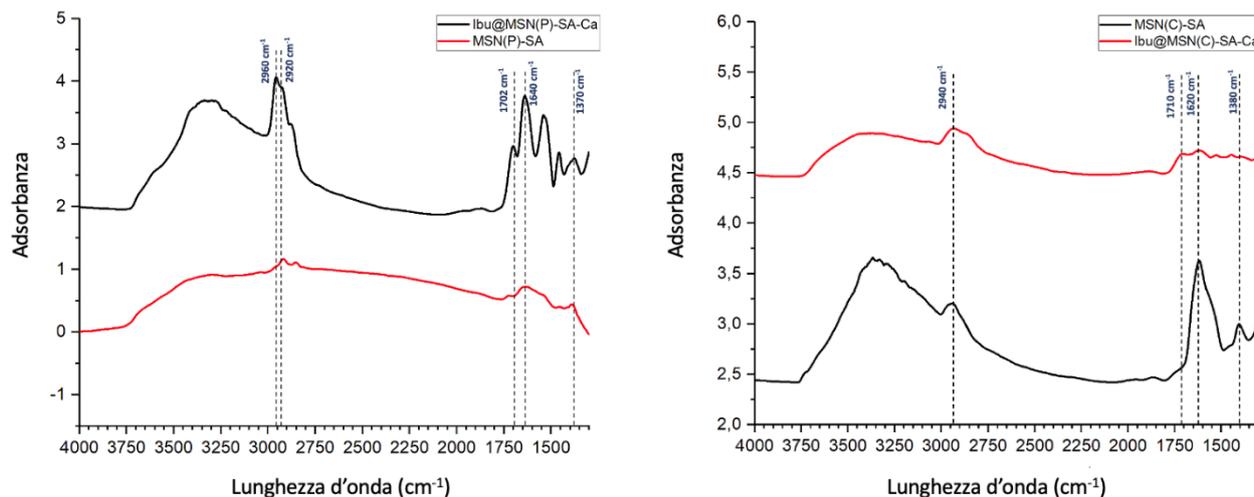


Figura 59: Analisi FTIR dei campioni preparate post-funzionalizzazione (a sinistra) e per co-condensazione (a destra) in seguito al rivestimento con catene di SA e alla reticolazione con CaCl_2

3.6 Analisi termogravimetrica (TGA)

Al fine di verificare la variazione di peso dei vari campioni in funzione della temperatura e in particolare per valutare il quantitativo di farmaco caricato nella struttura mesoporosa è stata eseguita sui vari campioni un'analisi termogravimetrica. La perdita in peso viene osservata quando un evento termico comporta la perdita di un componente volatile. Nei vari passaggi della preparazione dei nanovettori è stata eseguita un'analisi TGA, che ha consentito di valutare la percentuale in massa aggiunta al campione nelle varie funzionalizzazioni e di confrontare il comportamento tra i campioni preparati per post-funzionalizzazione e quelli per co-condensazione.

Innanzitutto, l'analisi effettuata sulle MSN è stata confrontata con quella relativa alle MSN post-funzionalizzate (MSN(P)-NH_2); quest'ultima analisi è poi stata confrontata con quella effettuata sulle MSN(C)-NH_2 preparate per co-condensazione.

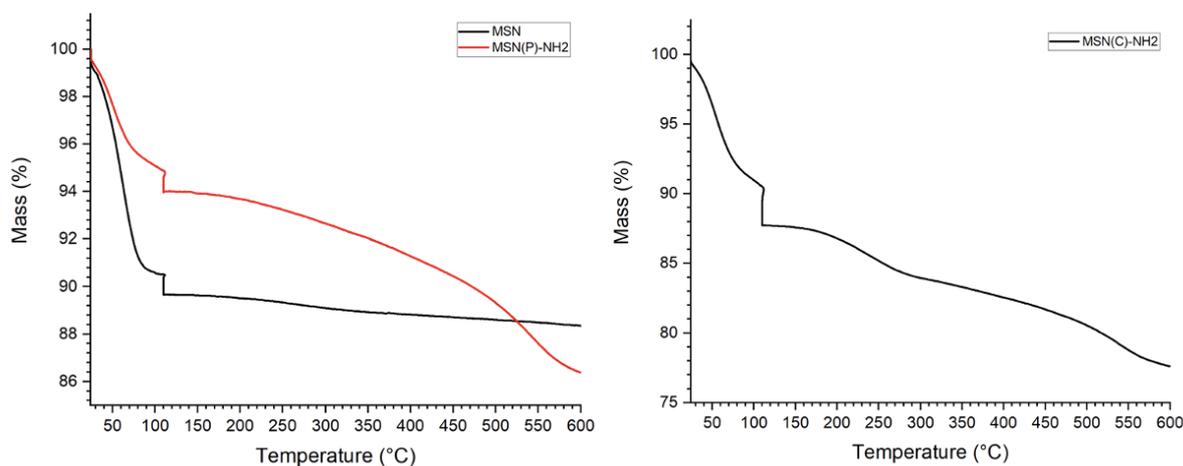


Figura 60: Grafico che mette a confronto la perdita in peso percentuale delle nanoparticelle prima e dopo la funzionalizzazione (a sinistra) delle nanoparticelle preparate per co-condensazione (a destra).

Dai grafici illustrati nella figura 60 è possibile osservare che il valore di perdita di peso percentuale aumenta all'aumentare delle avvenute funzionalizzazioni sul campione.

La perdita in peso dei campioni risulta essere rispettivamente pari a circa l'1% per le MSN e all'8% per MSN(P)-NH₂. Questi valori sono stati calcolati dalla differenza tra la percentuale in massa a 600°C e quella a 110°C, considerando come valore a 110°C quello corrispondente al punto più basso del gradino mostrato dai grafici a questa temperatura (dovuta alla stabilizzazione della massa del campione in seguito alla rimozione dell'acqua adsorbita sulla superficie). Per rimuovere l'acqua si attende per un periodo di tempo pari a 1 ora e mezza, tempo che si può osservare nell'immagine attraverso la presenza del gradino. L'evidente aumento di perdita in peso indica l'avvenuta funzionalizzazione con i gruppi amminici. Per differenza tra le due analisi è possibile calcolare la percentuale in massa dei gruppi amminici aggiunti nel passaggio di funzionalizzazione, che risulta essere pari a circa il 7%. Ad alte temperature è possibile osservare che vi è un residuo stabile di campione.

Il grafico a destra, invece, è relativo alle MSN(C)-NH₂. Facendo un confronto con il caso precedente, la perdita in peso relativa al campione realizzato per co-condensazione risulta essere maggiore rispetto a quella del campione post-funzionalizzato. La perdita in peso in questo ultimo caso risulta essere del 10%.

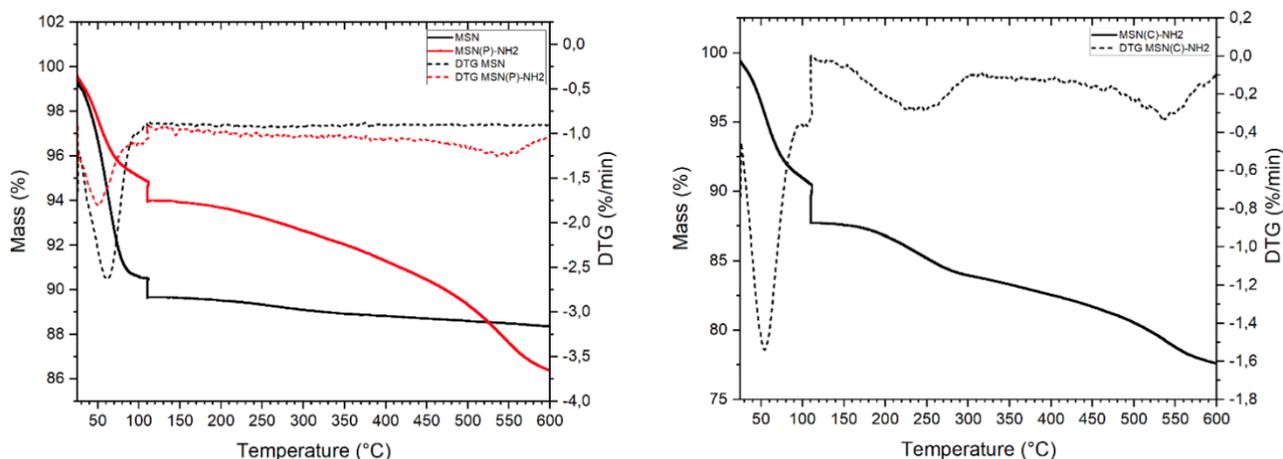


Figura 61: Grafico che mette a confronto le TGA delle MSN ottenute per post-funzionalizzazione (a sinistra) e per co-condensazione (a destra)

Dato che le temperature di decomposizione sono sufficientemente separate tra di loro, è possibile associare le variazioni di peso alle singole sostanze presenti nel campione.

La figura 61 riporta i grafici TGA precedentemente discussi con le relative derivate (DTG) dei campioni realizzati per post-funzionalizzazione e per co-condensazione.

Analizzando il grafico a sinistra relativo ai campioni post-funzionalizzati, è possibile osservare che nel caso delle MSN (curva nera), non essendoci alcuna funzionalizzazione ed essendo le silici termicamente stabili, vi è unicamente la presenza del primo picco relativo alla perdita dell'acqua adsorbita nel campione a una temperatura di circa 60°C. All'aumentare della temperatura la massa del campione è stabile e non si riscontrano picchi relativi alla presenza di tensioattivo residuo. Considerando, invece, la curva relativa alle MSN(P)-NH₂ (curva rossa) possiamo osservare sempre la presenza del primo picco, molto più pronunciato rispetto al caso precedente, intorno ai 70°C e di un secondo picco meno evidente dovuto alla degradazione degli -NH₂ intorno ai 530°C [120].

Nel caso invece delle MSN(C)-NH₂, si può osservare la presenza del picco relativo alla perdita dell'acqua rimasta nel campione a una temperatura di circa 50°C e poi di due picchi a circa 240°C e a 540°C riconducibili alla degradazione degli -NH₂ [121].

Per la preparazione dei nanovettori, in seguito alla funzionalizzazione con gruppi amminici le nanoparticelle sono state caricate con l'ibuprofene e in seguito rivestite con alginato di sodio. Per discriminare i contributi in massa relativi alle varie funzionalizzazioni, l'analisi TGA è stata effettuata sui campioni non carichi con ibuprofene. Sono quindi stati preparati dei campioni in cui il rivestimento di SA e la successiva reticolazione sono stati realizzati sulle nanoparticelle senza

farmaco caricato: i risultati delle analisi consentiranno, per confronto con le analisi sui nanovettori completi, la quantificazione dell'ibuprofene incorporato.

Nella figura 62 sono illustrati i due grafici delle nanoparticelle realizzate per post-funzionalizzazione e per co-condensazione in seguito al rivestimento con alginato di sodio.

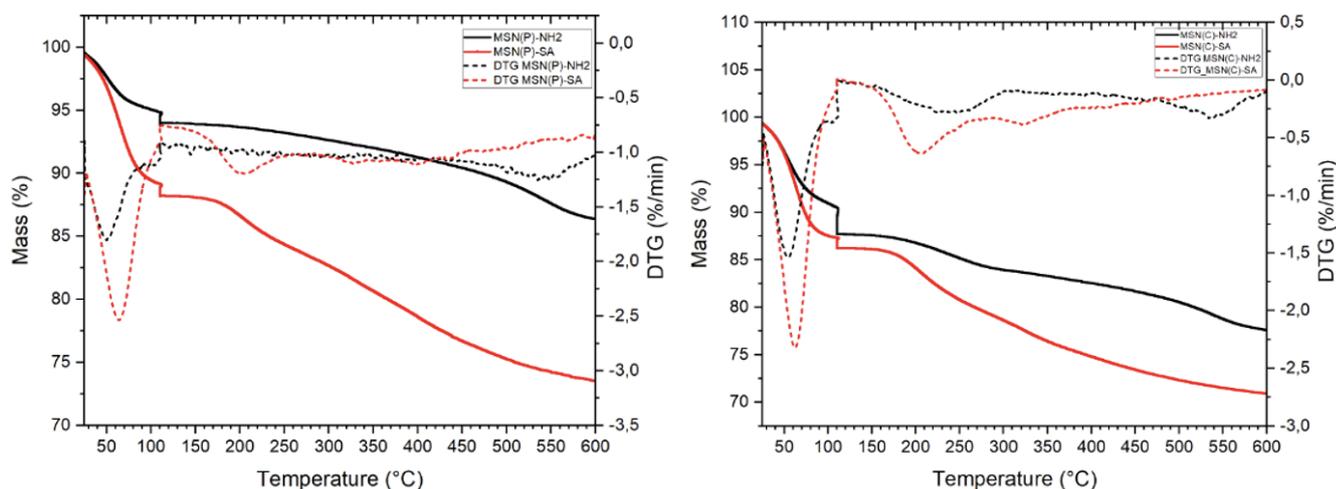


Figura 62: Grafico TGA delle nanoparticelle ottenute per post-funzionalizzazione (a sinistra) e per co-condensazione (a destra) in seguito al rivestimento con catene di SA.

Dalla curva DTG relativa alle MSN(P)-SA è possibile osservare la presenza di un primo picco intorno ai 60°C relativo alla perdita di acqua residua nel campione e un secondo picco intorno ai 205°C relativo all'alginato di sodio [122]. Vi sono inoltre due picchi molto meno pronunciati intorno ai 400°C e ai 440°C relativi a residui di alginato di sodio che si sono degradati a temperatura maggiore a causa del legame ammidico tra i $-\text{COO}^-$ dell'alginato di sodio e gli $-\text{NH}_2$ già presenti sul campione [123].

Il valore di perdita in peso percentuale in seguito al rivestimento con alginato di sodio è pari a 15%, quindi si osserva un valore di perdita in peso percentuale pari a circa il doppio del peso rispetto alla sola funzionalizzazione con gruppi amminici. Effettuando un confronto tra le TGA relative alle MSN(P)-NH₂ e le MSN(P)-SA è stata calcolata la percentuale in peso dell'SA ancorato sulla superficie delle nanoparticelle che risulta essere pari al 7%.

Analizzando invece il grafico delle MSN(C)-SA, oltre al solito picco a 60°C, si osserva un picco più pronunciato intorno ai 205°C relativo all'alginato di sodio e un picco un po' meno visibile intorno ai 330°C che potrebbe essere relativo a residui di alginato di sodio che si sono degradati a una temperatura maggiore [124]. In questo caso, la perdita in peso percentuale risulta essere di 15% e confrontando le TGA relative alle MSN(C)-NH₂ e le MSN(C)-SA è stata calcolata la percentuale in peso dell'SA reticolato sulla superficie delle nanoparticelle che risulta essere pari al 5%.

In confronto alla percentuale di perdita in peso di SA calcolata nel caso precedente, nel caso delle MSN(C)-SA si osserva una percentuale inferiore. Questo risultato differente è riconducibile al processo in acqua utilizzato per effettuare il rivestimento con catene di SA [125]. Inoltre, tenendo conto del diverso metodo di sintesi utilizzato e dei risultati delle analisi precedentemente discussi è possibile affermare che nel caso delle nanoparticelle prodotte per post-funzionalizzazione i gruppi amminici si trovano prevalentemente sulla superficie delle nanoparticelle. Vi sarà, per questo motivo, un maggior numero di gruppi carbossilici dell'alginato di sodio che si troveranno a interagire con i gruppi amminici introdotti con la post-funzionalizzazione. Invece, nel caso delle nanoparticelle realizzate per co-condensazione, i gruppi amminici sono localizzati sia all'imbocco che lungo l'estensione dei pori. Quindi, i gruppi carbossilici dell'alginato di sodio si legano con i gruppi amminici presenti sia sulla superficie che all'interno dei pori. Per questo motivo il valore di perdita in peso percentuale dell'SA reticolato sulla superficie delle nanoparticelle risulta essere minore nel caso delle nanoparticelle preparate per co-condensazione.

Successivamente è stata valutata la perdita in peso percentuale dei campioni post-funzionalizzati e co-condensati in seguito al rivestimento con SA e alla reticolazione con CaCl_2 .

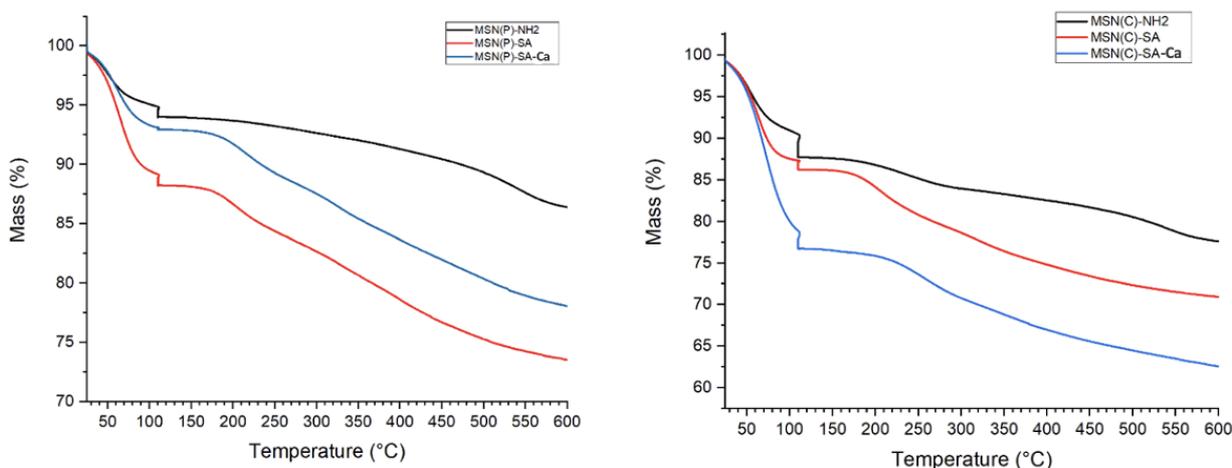


Figura 63: Perdita in peso percentuale delle nanoparticelle (preparate per post-funzionalizzazione a sinistra e preparate co-condensazione a destra) in seguito al rivestimento con SA e alla reticolazione con CaCl_2 .

Dalla figura 63 è possibile osservare che in seguito alla reticolazione con CaCl_2 si ha una maggiore perdita in peso rispetto al solo caso con alginato di sodio. In particolare, in seguito alla reticolazione osserviamo un valore di perdita in peso percentuale per quanto riguarda le nanoparticelle realizzate per post-funzionalizzazione pari al 15% (MSN(P)-SA-Ca^{2+}). Invece, per quanto riguarda le nanoparticelle preparate per co-condensazione si osserva un valore pari al 15% (MSN(C)-SA-Ca^{2+}). In questo ultimo caso si osserva un comportamento non atteso, in seguito alla reticolazione la perdita

di peso percentuale è risultata essere inferiore a quella del campione con solo alginato di sodio. Dai valori ottenuti da questa analisi è possibile affermare che in seguito alla reticolazione non si riscontra un significativo aumento della perdita in peso percentuale rispetto al campione non ancora reticolato.

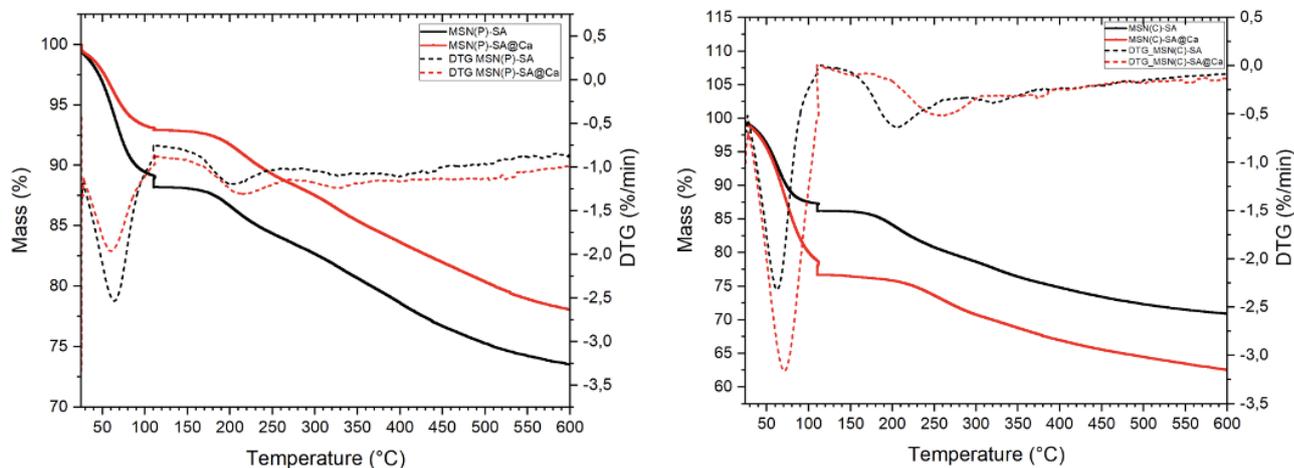


Figura 64: Curva TGA delle nanoparticelle preparate per post-funzionalizzazione (a sinistra) e di quelle realizzate per co-condensazione (a destra) in seguito al rivestimento con SA e alla reticolazione con CaCl_2

Osservando la figura 64, rispetto al grafico relativo alle MSN(P)-SA e MSN(C)-SA, in seguito alla reticolazione con CaCl_2 i due picchi a 400°C e a 440°C relativi a residui di alginato di sodio sono scomparsi, indice dell'avvenuta reticolazione [122]. Questo comportamento però non risulta molto visibile nel caso nanoparticelle prodotte per co-condensazione. In entrambi i casi è possibile, però, osservare il picco marcato a 210°C dell'alginato di sodio, che risulta essere leggermente spostato a temperature maggiori nel caso delle nanoparticelle prodotte per post-funzionalizzazione rispetto a quelle prodotte per co-condensazione. Questo comportamento è dovuto all'interazione tra l'alginato di sodio e il CaCl_2 , che sposta la temperatura di degradazione a temperature maggiori [122].

Dalla curva DTG è possibile osservare che, in seguito alla reticolazione con CaCl_2 , le temperature di degradazione sono più elevate rispetto al caso in cui è presente solo l'alginato non ancora reticolato. Quindi, attraverso la reticolazione sono state aggiunte delle interazioni tra le molecole che ritardano la degradazione termica dei campioni.

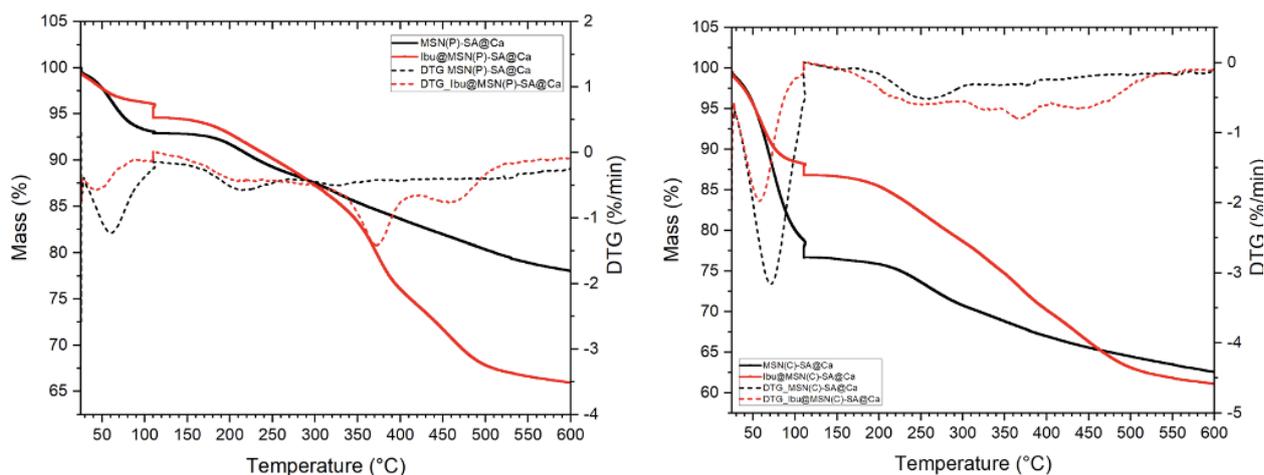


Figura 65: Curva TGA delle nanoparticelle preparate per post-funzionalizzazione (a sinistra) e per co-condensazione (a destra) rivestite con alginato di sodio, reticolate con CaCl_2 e caricate con l'ibuprofene

Nella figura 65 è possibile osservare le curve TGA dei nanovettori caricati con ibuprofene, preparati per post-funzionalizzazione (curva rossa a sinistra) e per co-condensazione (curva rossa a destra). In entrambi i grafici relativi ai due campioni sono chiaramente visibili due picchi molto pronunciati intorno ai 370°C e ai 460°C relativi all'ibuprofene e all'alginato di sodio. La temperatura di degradazione dell'ibuprofene dovrebbe essere intorno ai 200°C , in questo caso risulta essere notevolmente spostata. Questo comportamento è dovuto all'interazione tra l'ibuprofene e l'alginato di sodio reticolato sulla superficie delle nanoparticelle [119].

Per quanto riguarda le nanoparticelle realizzate per post-funzionalizzazione, la percentuale di perdita in peso dei campioni caricati con il farmaco è pari al 29% ($\text{Ibu@MSN(P)-SA-Ca}^{2+}$). Dal confronto tra le due TGA relative al campione caricato con ibuprofene e non caricato, è possibile calcolare la quantità di farmaco caricata nel campione, che risulta essere pari a 14%. Nel caso invece delle nanoparticelle ottenute per co-condensazione la perdita in peso percentuale in seguito al caricamento del farmaco è del 25,8% ($\text{Ibu@MSN(C)-SA-Ca}^{2+}$). Il quantitativo di farmaco nel campione, in questo caso, risulta essere pari a 12%, percentuale che risulta essere inferiore rispetto a quella delle nanoparticelle post-funzionalizzate. La differenza in termini di percentuale in peso di farmaco nel campione è riconducibile al processo di rivestimento delle nanoparticelle con catene di SA. È un processo che viene effettuato in acqua e questo potrebbe portare a un rilascio anticipato e non voluto dell'agente terapeutico prima dell'effettivo rivestimento. Tenendo conto del diverso metodo di sintesi utilizzato e dei risultati delle analisi precedentemente discussi (analisi di adsorbimento-desorbimento di azoto) è possibile affermare che nel caso delle nanoparticelle prodotte per co-condensazione i gruppi amminici si trovano sia sulla superficie che all'interno dei pori. Quindi, durante la fase di caricamento del farmaco, ci sarà una riduzione dello spazio disponibile per il medesimo. In seguito

al rivestimento con SA e reticolazione con CaCl_2 , oltre a un rilascio di farmaco dovuto al processo di rivestimento con SA in acqua ci sarà anche un minor quantitativo iniziale di farmaco all'interno dei pori. Nel caso delle nanoparticelle prodotte per post-funzionalizzazione i gruppi amminici si trovano prevalentemente sulla superficie delle nanoparticelle; quindi, il volume disponibile per caricare il farmaco è maggiore rispetto al caso precedente.

3.7 Test di rilascio di farmaco con e senza stimolazione US

Prima di osservare la cinetica di rilascio di ibuprofene da parte delle $\text{Ibu@MSN(P)-SA-Ca}^{2+}$ e delle $\text{Ibu@MSN(C)-SA-Ca}^{2+}$ stimulate con US, sono stati eseguiti dei test rilascio senza alcun tipo di stimolazione al fine di valutare quale delle due tipologie di nanoparticelle rilasciasse il minor quantitativo di farmaco quando non stimolata.

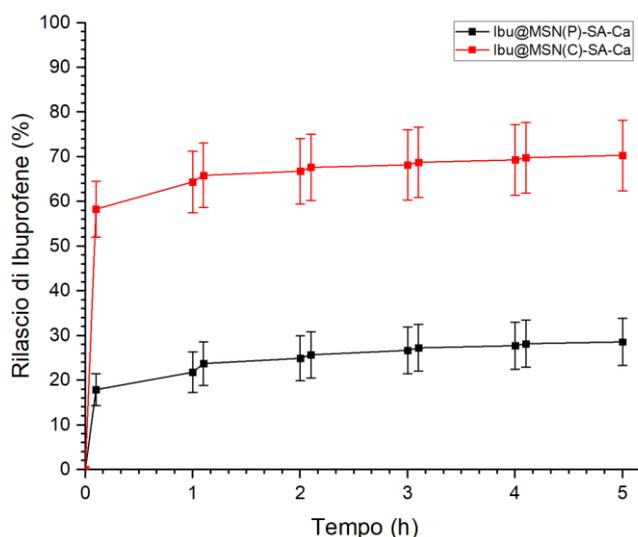


Figura 66: Test di rilascio di ibuprofene senza stimolazione US

Nella figura 66 sono illustrate le due curve relative alla percentuale di ibuprofene rilasciato rispetto alla quantità di ibuprofene totale in funzione del tempo senza stimolazione US nei campioni preparati per post-funzionalizzazione e per co-condensazione. Osservando il grafico è chiaramente visibile la differenza in termini di rilascio percentuale tra i due campioni. La percentuale di ibuprofene rilasciata dalle $\text{Ibu@MSN(P)-SA-Ca}^{2+}$ risulta essere inferiore rispetto a quella rilasciata dalle $\text{Ibu@MSN(C)-SA-Ca}^{2+}$. Infatti, esse dopo le 5h rilasciano un quantitativo di ibuprofene % pari al $29 \pm 8\%$ in confronto al $70 \pm 8\%$ delle $\text{Ibu@MSN(C)-SA-Ca}^{2+}$. Già nei primi 10 minuti di test è evidente la differenza tra i due campioni, in cui il rilascio di ibuprofene è pari a $18 \pm 4\%$ per le $\text{Ibu@MSN(P)-SA-Ca}^{2+}$ e a $58 \pm 6\%$ per le $\text{Ibu@MSN(C)-SA-Ca}^{2+}$. Il test senza stimolazione US ha evidenziato che le

nanoparticelle ottenute per post-funzionalizzazione sono risultate più idonee rispetto a quelle ottenute per co-condensazione in quanto rilasciano una minor quantità di agente terapeutico quando non stimolate con gli ultrasuoni.

Nella figura 66 è possibile vedere un rilascio del farmaco iniziale maggiore che potrebbe essere dovuto al farmaco incorporato tra le catene polimeriche dell'alginato durante la procedura di rivestimento.

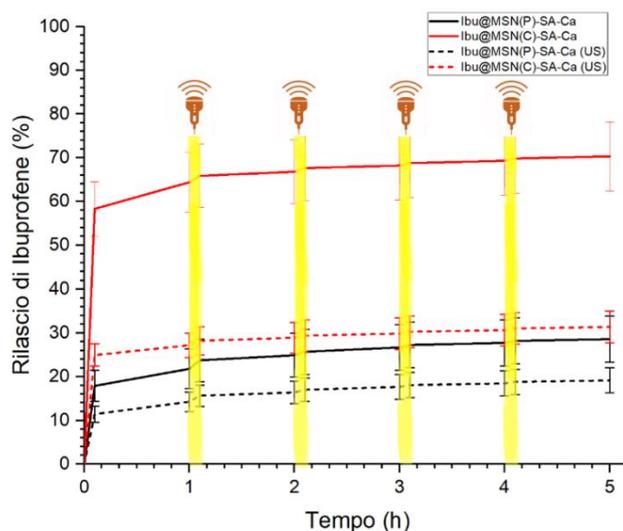


Figura 67: Test di rilascio di ibuprofene con e senza stimolazione US

Nella figura 67 sono, invece, illustrate le curve relative al rilascio di ibuprofene (%) nei campioni post-funzionalizzati e co-condensati in assenza e in presenza di stimolazione US. Osservando il grafico, anche in presenza di stimolazione US, è chiaramente visibile la differenza in termini di rilascio % tra i campioni. Le Ibu@MSN(P)-SA-Ca²⁺ rilasciano una minore quantità di farmaco in confronto alle Ibu@MSN(C)-SA-Ca²⁺ sia nel caso delle nanoparticelle stimulate che in quelle non stimulate. Dopo le 5h, le nanoparticelle post-funzionalizzate stimulate hanno un rilascio di ibuprofene pari al 19±3% in confronto al 31±4% delle Ibu@MSN(C)-SA-Ca²⁺ stimulate. Anche in questo caso, già nei primi 10 minuti di test è evidente la differenza tra i due campioni, le Ibu@MSN(P)-SA-Ca²⁺ rilasciano una quantità di ibuprofene pari a 11±2% mentre le Ibu@MSN(C)-SA-Ca²⁺ ne rilasciano 25±3%, circa il doppio.

Osservando le curve di rilascio di farmaco di entrambe le nanoparticelle quando stimulate con gli ultrasuoni, è possibile osservare un comportamento diverso da quello atteso. In seguito alla stimolazione US è come se le nanoparticelle rilasciassero meno farmaco rispetto a quando non stimulate, è come se gli ultrasuoni inibissero il rilascio del farmaco. Questo comportamento potrebbe essere dovuto al danneggiamento del rivestimento di alginato di sodio in seguito alla stimolazione

US che potrebbe aver occluso i pori impedendo la fuoriuscita dell'ibuprofene (Figura 68). In seguito alla stimolazione.

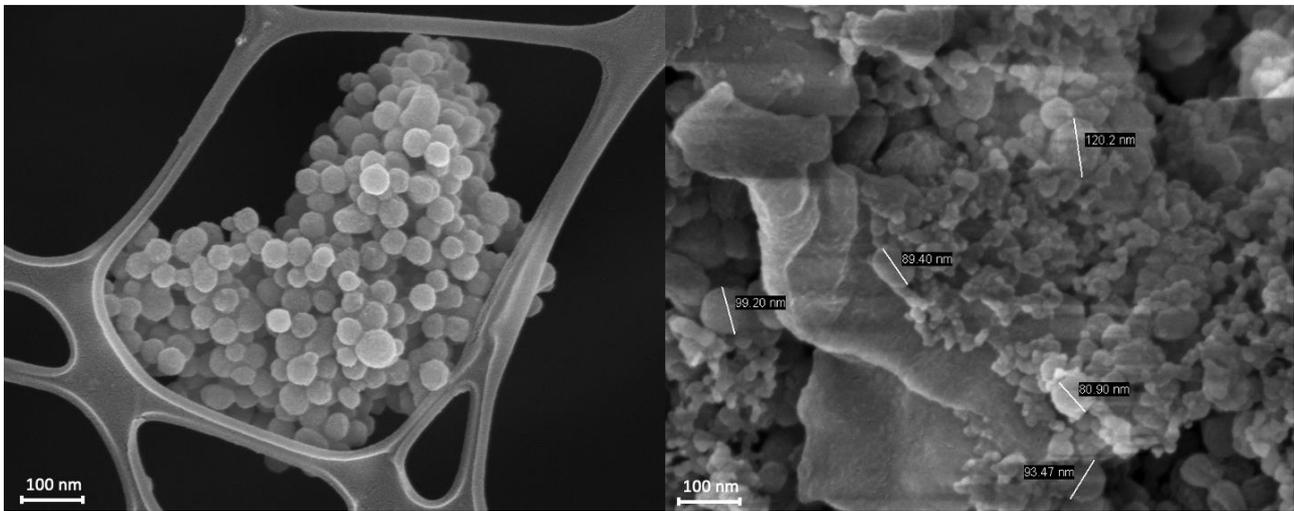


Figura 68: Immagini al FE-SEM delle nanoparticelle prodotte per post-funzionalizzazione al termine della stimolazione US ad alta frequenza (5h)

In seguito a questi test si è scelto di effettuare i nuovi test di rilascio di farmaco con e senza stimolazione US solo sui campioni post-funzionalizzati.

3.8 Test di stabilità delle nanoparticelle nei solventi impiegati per l'elettrofilatura di fibre contenenti i nanovettori

Il progetto REBORN si pone l'obiettivo di sviluppare un patch impiantabile a livello del miocardio, caratterizzato da una struttura fibrosa elettrofilata caricata con nanoparticelle in grado di rilasciare agenti terapeutici quando stimolate con ultrasuoni. A tal fine, si è studiata la stabilità delle nanoparticelle quando disperse nei solventi impiegati per l'elettrofilatura, nello specifico una miscela di DMSO ed acetone. È stata effettuata un'analisi al FE-SEM in modo da osservare la morfologia delle nanoparticelle dopo 3 ore di immersione in DMSO/acetone. Successivamente sullo stesso campione è stata fatta un'analisi FT-IR che ha permesso di valutare eventuali danneggiamenti delle funzionalizzazioni precedentemente effettuate. Questa analisi è stata condotta unicamente sui campioni post-funzionalizzati in quanto sono risultati più performanti in termini di rilascio sostenuto nel tempo.

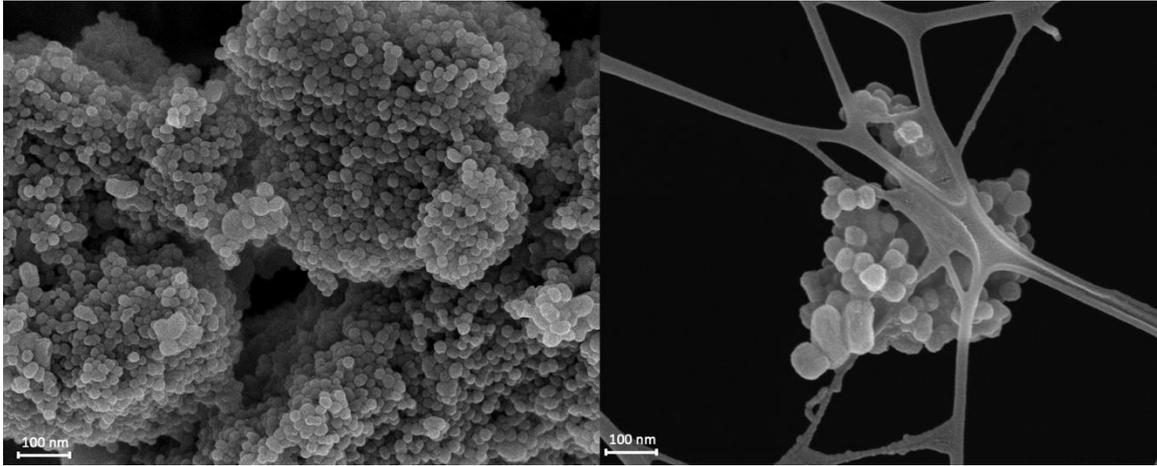


Figura 69: Analisi al FE-SEM delle Ibu@MSN(P)-SA-Ca²⁺ dopo il test di stabilità (3h)

Nella figura 69 è possibile osservare che, anche in seguito al test di stabilità nei solventi impiegati per l'elettrofilatura, le Ibu@MSN(P)-SA-Ca²⁺ continuano a mantenere la loro forma sferica e regolare con dimensioni nell'ordine dei 90 nm. Anche in questo caso, il campione preparato per il FE-SEM non è stato trattato nel bagnetto ad ultrasuoni: questo spiega la presenza di grandi agglomerati di particelle.

4. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Nonostante la diminuzione del tasso di mortalità osservata negli ultimi anni, le malattie cardiovascolari sono ancora responsabili di circa 17 milioni di decessi nel mondo ogni anno. Una percentuale significativa è dovuta all'infarto del miocardio (MI) e all'ictus.

In seguito all'infarto del miocardio, ossia alla necrosi di una zona di tessuto muscolare cardiaco dovuto all'occlusione totale di un grosso ramo coronarico e quindi alla mancanza di afflusso sanguigno in quella zona, si verifica la morte dei cardiomiociti. I miofibroblasti e i macrofagi migrano verso quest'area per la riparazione cardiaca. Queste cellule creano un tessuto cicatriziale che ha l'obiettivo di mantenere l'integrità dell'organo ed evitare ulteriori danni, ma riduce notevolmente la capacità contrattile del cuore, alterandone la funzionalità e la struttura e portando infine all'insufficienza cardiaca. Considerata la scarsa capacità rigenerativa del cuore dei mammiferi, in seguito a infarto miocardico i cardiomiociti (CM) ischemici vengono persi in modo permanente e sostituiti da tessuto fibroso. Un importante fattore che contribuisce alla transizione verso l'insufficienza cardiaca è la formazione di un'eccessiva fibrosi che aumenta la rigidità ventricolare, facilita le aritmie e contribuisce alla disfunzione dell'organo. La tempestività nel trattamento di questa patologia è fondamentale per cercare di limitare il danneggiamento irreversibile del muscolo cardiaco. Le terapie attualmente utilizzate sono di tipo farmacologico o chirurgico, con scarso recupero funzionale. Negli ultimi anni, sono stati realizzati dei tentativi di migliorare la capacità di rigenerazione del miocardio infartuato. Alcuni approcci terapeutici promettenti includono la terapia cellulare, la terapia genica e l'ingegneria tissutale. In questo contesto, il progetto REBORN si propone di sviluppare un patch impiantabile a livello del miocardio, caratterizzato da una struttura fibrosa elettrofilata caricata con nanoparticelle in grado di rilasciare agenti terapeutici quando stimulate con ultrasuoni (US). Il presente lavoro di Tesi ha previsto lo sviluppo di nanoparticelle di silice mesoporosa (MSN) funzionalizzate con alginato di sodio reticolato con CaCl_2 . L'approccio proposto prevede l'impiego di un'opportuna stimolazione US in grado di indebolire in modo reversibile l'interazione tra i gruppi COO^- dell'alginato e gli ioni Ca^{2+} introdotti con il processo di reticolazione, al fine di consentire il rilascio controllato del farmaco incorporato nella struttura mesoporosa.

Al fine di fornire alla superficie delle MSN i gruppi amminici necessari per l'ancoraggio dell'SA, sono state realizzate le MSN-NH₂ secondo due diversi metodi di sintesi: sintesi di MSN e successiva post-funzionalizzazione con APST in atmosfera di azoto e sintesi di MSN-NH₂ per co-condensazione di TEOS e APST.

In seguito alla funzionalizzazione con gruppi amminici le nanoparticelle sono state caricate con il farmaco, successivamente si è proceduto con il loro rivestimento con alginato di sodio e alla loro successiva reticolazione con CaCl_2 . Dopo ogni fase del processo si è effettuata una caratterizzazione

completa delle nanoparticelle prodotte. Al fine di valutare la morfologia, è stata eseguita, dopo ogni funzionalizzazione, un'analisi FE-SEM grazie alla quale è stato possibile osservare la forma sferica, uniforme e regolare delle nanoparticelle. È stato possibile andare a misurare la taglia che si è rivelata essere di circa 90-100 nm sia per le nanoparticelle realizzate per post-funzionalizzazione che per quelle prodotte per co-condensazione. La taglia misurata al FE-SEM è stata confrontata con quella misurata durante l'analisi DLS, che però ha sovrastimato la dimensione delle nanoparticelle a causa della presenza di aggregati nella sospensione analizzata; la stima del potenziale zeta ha confermato la tendenza delle nanoparticelle a formare aggregati. Successivamente è stata effettuata l'analisi di adsorbimento-desorbimento di azoto che ha permesso di calcolare l'area superficiale specifica, il volume totale dei pori e la loro taglia media. Da questa analisi è stato possibile osservare che, sia nel caso delle nanoparticelle ottenute per post-funzionalizzazione che in quelle ottenute per co-condensazione, la presenza dei gruppi amminici superficiali comporta la diminuzione di tutti i parametri precedentemente elencati.

In seguito al caricamento del farmaco, attraverso l'analisi XRD è stato confermato lo stato amorfo dell'ibuprofene all'interno dei mesopori, stato desiderato per aumentare la velocità di dissoluzione dell'agente terapeutico. Dopo ogni funzionalizzazione è stata eseguita un'analisi FT-IR: attraverso la valutazione dei picchi relativi ai legami chimici presenti sulla superficie delle nanoparticelle è stata confermata l'avvenuta funzionalizzazione delle stesse. Attraverso l'analisi TGA è stato possibile valutare il quantitativo di farmaco caricato all'interno dei nanovettori. Da quest'ultima valutazione, è emerso che le nanoparticelle prodotte per post-funzionalizzazione presentano un maggior quantitativo di farmaco caricato al loro interno (14%) rispetto a quelle ottenute per co-condensazione (12%).

Dopo aver effettuato una caratterizzazione completa delle nanoparticelle (Ibu@MSN(P)-SA- Ca²⁺ e Ibu@MSN(C)-SA- Ca²⁺) sono stati effettuati i test di rilascio con e senza stimolazione US. Sono stati, inizialmente, eseguiti i test di rilascio ad alta frequenza senza stimolazione US, attraverso cui è stato possibile osservare che le nanoparticelle realizzate per post-funzionalizzazione presentano una cinetica di rilascio sostenuta nel tempo rispetto alle nanoparticelle realizzate per co-condensazione. Successivamente sono stati eseguiti i test di rilascio di farmaco con stimolazione US: per effettuare questa analisi sono stati utilizzati due diversi sistemi LIPUS ("Low-intensity pulsed ultrasound") realizzati dal gruppo di ricerca *Regenerative Technologies Lab* della Scuola Superiore Sant'Anna. Nello specifico, sono stati impiegati un sistema US a basse frequenze (38 kHz) e uno ad alte frequenze (500 kHz-5 MHz). Per effettuare il primo test di rilascio di farmaco è stata impostata una frequenza di stimolazione pari a 1 MHz, una potenza pari a 3 W/cm², un duty cycle pari al 20%, una pulse repetition frequency di 1 kHz e un tempo di stimolazione di 10 minuti. Mettendo a confronto i dati

ottenuti dai rilasci con e senza stimolazione, è stato osservato un comportamento diverso da quello atteso. Si è visto infatti che, con i parametri di stimolazione US utilizzati, il rilascio del farmaco da parte dei nanovettori stimolati risulta inferiore a quello dei nanovettori non stimolati. Questo risultato potrebbe essere dovuto al danneggiamento del rivestimento con catene di SA in seguito alla stimolazione US, che potrebbe aver bloccato i mesopori delle nanoparticelle impedendo la fuoriuscita dell'ibuprofene. A seguito di questi risultati, si è proceduto con l'impostazione di nuovi parametri al fine di conseguire il comportamento desiderato sia per la stimolazione a bassa frequenza che quella ad alta frequenza. In particolare, per quanto riguarda la stimolazione ad alta frequenza sono state scelte una frequenza di stimolazione e una potenza inferiore pari a 500 kHz e 250 mW/cm², sono rimasti invariati i parametri del duty cycle e della pulse repetition frequency e sono stati testati tre diversi tempi di stimolazione (30 secondi, 1 minuto e 5 minuti) . Per quanto riguarda invece la stimolazione dei campioni a bassa frequenza, l'unico parametro modificato è la frequenza, che è stata impostata pari a 38 kHz. al fine di conseguire il comportamento desiderato. Tuttavia, a seguito di un problema con l'HPLC non è stato possibile osservare i risultati dei test di rilascio di farmaco eseguiti utilizzando i nuovi parametri.

I prossimi passi prevedono sicuramente l'ottimizzazione dei parametri di stimolazione US utilizzati, in modo da ottenere il rilascio di farmaco controllato da US sfruttando la possibilità si indebolire in modo reversibile l'interazione tra i gruppi COO⁻ dell'alginato e gli ioni Ca²⁺, senza però danneggiare il nanovettori.

Nella cornice del progetto REBORN, i nanovettori sono destinati ad essere incorporati nelle fibre elettrofilate del patch impiantabile. Per valutare la stabilità dei nanovettori realizzati per post-funzionalizzazione nei solventi impiegati per l'elettrofilatura, le nanoparticelle sono state immerse nei solventi per tre ore (tempo stimato per il processo di elettrofilatura). Le analisi FE-SEM e FT-IR realizzate sui nanovettori sottoposti alla prova di stabilità nei solventi hanno confermato il mantenimento della forma sferica, regolare e uniforme delle nanoparticelle e delle funzionalizzazioni effettuate.

BIBLIOGRAFIA

- [1] P. Zhou et al., «Recounting cardiac cellular composition.,» *Circulation research*, vol. 118, n. 3, pp. 368-370, 2016.
- [2] [Online]. Available: <https://www.microbiologiaitalia.it/didattica/apparato-cardiovascolare-funzioni-e-caratteristiche/>, Settembre 2023
- [3] [Online]. Available: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).«Word Health Organisation,» Giugno 2021.
- [4] [Online]. Available: <https://www.notiziariochimicofarmaceutico.it/2016/12/05/evolocumab-riduce-la-placca-aterosclerotica/>.
- [5] G. W. Reed et al., «Acute myocardial infarction,» *The Lancet*, vol. 389, n. 197-210, 2017.
- [6] [Online]. Available: «https://www.degasperis.it/notizie/392/aterosclerosi_angina_e_infarto_cosa_succede_nell_organismo.html».
- [7] K. L. Christman et al., «Biomaterials for the Treatment of Myocardial Infarction.,» *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 48, n. 5, p. 907–913., Settembre 2006.
- [8] O. Bergmann et al.,«Evidence for cardiomyocyte renewal in humans,» *Science*, vol. 324, pp. 98-102, 2009 .
- [9] M. Cassani, et al. «Combining nanomaterials and developmental pathways to design new treatments for cardiac regeneration: the pulsing heart of advanced therapies,» *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8, n. 323, 2020.
- [10] P. Anversa e. al., «Regenerating New Heart with Stem Cells,» *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 123, p. 62–70, 2013.
- [11] M. Gyöngyösi et al., «Meta-Analysis of Cell Therapy Studies in Heart Failure and Acute Myocardial Infarction,» *Circulation Researc*, vol. 8, n. 16, pp. 1361-1377, 2015.
- [12] [Online]. Available: <https://www.tecnomedicina.it/un-cerotto-biologico-per-il-cuore-danneggiato/>.«Tecnomedicina,» Luglio 4 2023.
- [13] [Online]. Available: <https://www.santannapisa.it/it/news/nuova-terapia-genetica-cura-linfarto-su-nature-lo-studio-dei-ricercatori-dellistituto-di.S. Scuola Universitaria Superiore Pisa, 18 Luglio 2019>.
- [14] K. Gabisonia et al., «MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs.,» *Nature*, vol. 569, n. 418–422, p. 2019.
- [15] J. Batty et al., «Direct cellular reprogramming for cardiac repair and regeneration.,» *European Journal of Heart Failure*, vol. 18, n. 145-156, 2016.
- [16] E. Olson et al., «Pervasive Roles of microRNAs in Cardiovascular Biology,» *Science*, vol. 324, n. 5923, p. 98–102, 2009.
- [17] A. Eulalio, «Functional Screening Identifies miRNAs Inducing Cardiac Regeneration,» *Nature*, vol. 492, n. 7429, p. 376–81, 2012.

- [18] G. Ciardelli, *Slide del corso "Frontiers in Bioengineering enabling nanotechnologies"*, 2022-2023.
- [19] J. Bejarano et al., «Nanoparticles for diagnosis and therapy of atherosclerosis and myocardial infarction: Evolution toward prospective theranostic approaches.,» *Theranostics*, vol. 8, pp. 4710-4732, 2018.
- [20] M. Karam, «Polymeric nanoparticles in the diagnosis and treatment of myocardial infarction: Challenges and future prospects.,» *Materials Today Bio*, vol. 14, 2022.
- [21] K. Jain et al., *Drug delivery systems*, Totowa, NJ, USA.: : Humana press, 2008.
- [22] R. K. Prud'homme, *Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery Applications: Imaging, Targeting, and Delivery*, New York: Springer , 2012.
- [23] M. Manzano et al., «Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery.,» *Advanced functional materials*, vol. 30, n. 2, pp. 3-5, 2020.
- [24] R. Narayan et al., «Mesoporous silica nanoparticles: A comprehensive review on synthesis and recent advances.,» *Pharmaceutics*, vol. 10, n. 3, p. 118, 2018.
- [25] C. Mattu, *Slide del corso "Formazione pratica in nanotecnologie biomediche e terapie avanzate"*, 2022-2023.
- [26] K. Letchford et al., «A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticle structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes.,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 65, n. 1, pp. 259-269, 2007.
- [27] R. Solaro et al., «Targeted Delivery of Protein Drugs by Nanocarriers.,» *Materials*, vol. 3, n. 3, pp. 1928-1980, 2010.
- [28] M. Cassani et al., «Combining nanomaterials and developmental pathways to design new treatments for cardiac regeneration: the pulsing heart of advanced therapies.,» *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* , vol. 8, p. 323, 2020.
- [29] M. Silindir Gunay et al., «Drug Delivery Systems for Imaging and Therapy of Parkinson's Disease.,» *Current neuropharmacology*, vol. 14, 2015.
- [30] G. Bozzuto et al., «Liposomes as nanomedical devices.,» *International journal of nanomedicine*, vol. 10, n. 975, 2015.
- [31] [Online]. Available: <https://it.wikipedia.org/wiki/Liposoma>. [Consultato il giorno Ottobre 2023].
- [32] B. Fadeel, «Hide and seek: Nanomaterial interactions with the immune system.,» *Frontiers in immunology* , vol. 10, n. 133, 2019.
- [33] J. Patel et al., «Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system.,» *Advanced drug delivery reviews*, vol. 64, n. 7, pp. 701-705, 2012.
- [34] C. Chauvierre et al., «The European project NanoAthero to fight cardiovascular diseases using nanotechnologies.,» *Nanomedicine*, vol. 10, n. 22, pp. 3391-3400, 2015.
- [35] G. Suffredini et al., «New Applications of Nanotechnology for Neuroimaging.,» *American journal of neuroradiology*, p. 35, 2013.
- [36] V. P. Torchilin, «Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives.,» *Pharmaceutical research* , vol. 24, pp. 1-16, 2007.

- [37] [Online]. Available: https://psiberg.com/micelle-formation/#google_vignette.
- [38] M. Chandarana et al., «The use of nanotechnology in cardiovascular disease,» *Applied Nanoscience*, vol. 8, pp. 1607-1619, 2018.
- [39] S. Svenson et al., «Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field.,» *Advanced drug delivery reviews*, vol. 64, pp. 102-115, 2012.
- [40] A. Carlmark et al., «New methodologies in the construction of dendritic materials,» *Chemical Society reviews*, vol. 38, pp. 352-362, 2009.
- [41] H. Ghaedi et al., «Review on Template Removal Techniques for Synthesis of Mesoporous Silica Materials,» *Energy & Fuels*, vol. 36, n. 5, pp. 2424-2446, 2022.
- [42] M. Vallet-Regí et al., «A new property of MCM-41: drug delivery system.,» *Chemistry of Materials*, vol. 13, n. 2, pp. 308-331, 2001.
- [43] F. Tang et al., «Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery.,» *Advanced materials*, vol. 24, n. 12, pp. 1504-1534, 2012.
- [44] A. Chen et al., «Co-delivery of doxorubicin and Bcl-2 siRNA by mesoporous silica nanoparticles enhances the efficacy of chemotherapy in multidrug resistant cancer cells.,» *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, vol. 5, n. 23, p. 2673, 2009.
- [45] J. Lu et al., «Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for hydrophobic anticancer drugs.,» *Small*, vol. 3, n. 8, pp. 1341-1346, 2007.
- [46] R. Narayan et al., «Mesoporous silica nanoparticles: A comprehensive review on synthesis and recent advances.,» *Pharmaceutics*, vol. 10, n. 3, p. 118, 2018.
- [47] M. Lück et al., «Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics,» *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials*, vol. 39, n. 3, pp. 478-485, 1998.
- [48] K. Trzeciak et al., «Mesoporous silica particles as drug delivery systems—The state of the art in loading methods and the recent progress in analytical techniques for monitoring these processes.,» *Pharmaceutics*, vol. 13, n. 7, p. 950, 2021.
- [49] M. Vallet-Regí et al., «Mesoporous materials for drug delivery,» *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, n. 40, pp. 7548-7558, 2007.
- [50] C. Bharti et al., «Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review,» *International journal of pharmaceutical investigation*, vol. 5, n. 3, p. 124, 2015.
- [51] K. Yano et al., «Synthesis of mono-dispersed mesoporous silica spheres with highly ordered hexagonal regularity using conventional alkyltrimethylammonium halide as a surfactant.,» *Journal of Materials Chemistry*, vol. 14, n. 10, pp. 1579-1584, 2004.
- [52] S. Egger, et al. «Egger, Sam M., et al.,» *Chemistry of Materials*, vol. 27, n. 9, pp. 3193-3196, 2015.
- [53] A. Ganguly et al., «Silica mesostructures: Control of pore size and surface area using a surfactant-templated hydrothermal process.,» *Langmuir*, vol. 26, n. 10, pp. 14901-14908, 2010.
- [54] P. Horcajada et al., «Influence of pore size of MCM-41 matrices on drug delivery rate.,» *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 16, n. 1-3, pp. 105-109, 2004.

- [55] G. Yang et al., «Degradability and clearance of inorganic nanoparticles for biomedical applications.,» *Advanced Materials*, vol. 31, n. 10, p. 1805730, 2019.
- [56] M. Vallet-Regí et al., «Mesoporous materials for drug delivery,» *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, n. 40, pp. 7548-7558, 2007.
- [57] J. Gupta et al., «Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis and multifaceted functionalization for controlled drug delivery.,» *ournal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 81, p. 104305, 2023.
- [58] Z. Li et al., «Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, classification, drug loading, pharmacokinetics, biocompatibility, and application in drug delivery,» *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 16, p. 219–237, 2019.
- [59] C. Kresge. e. al., «Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid- crystal template mechanism,» *Nature*, vol. 359, p. 710, 1992.
- [60] Z. A. ALOthman, «A review: fundamental aspects of silicate mesoporous materials.,» *Materials*, vol. 5, n. 12, pp. 2874-2902, 2012.
- [61] W. Stöber, et al. «Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range,» *Journal of colloid and interface science*, vol. 26, n. 1, pp. 62-69, 1968.
- [62] M. Grün et al., «The synthesis of micrometer-and submicrometer- size spheres of ordered mesoporous oxide MCM-41,» *Advanced Materials*, vol. 9, n. 3, p. 254–257, 1997.
- [63] D. Bokov et al., «Nanomaterial by sol-gel method: synthesis and application.,» *Advances in Materials Science and Engineering*, pp. 1-21, 2021.
- [64] [Online]. Available: <https://wiki.aalto.fi/display/SSC/Sol-gel+synthesis>. [Consultato il giorno Ottobre 2023].
- [65] J. M. Q. a. M. M. Gupta, «Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis and multifaceted functionalization for controlled drug delivery,» *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 81, p. 104305, 2023.
- [66] [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/technical-documents/technical-article/materials-science-and-engineering/solid-state-synthesis/sol-gel-science-for>.
- [67] D. Bokov et al., «Nanomaterial by sol-gel method: synthesis and application,» *Advances in Materials Science and Engineering*, vol. 2021, pp. 1-21, 2021.
- [68] C. Brinker et al. , «Evaporation-Induced Self-Assembly: Nanostructures Made Easy.,» *Advanced materials*, vol. 11, n. 7, pp. 579-585, 1999.
- [69] L. Ding et al., «An electrochemistry assisted approach for fast, low-cost and gram-scale synthesis of mesoporous silica nanoparticles.,» *RSC advances*, vol. 5, n. 81, pp. 65922-65926, 2015.
- [70] S. Bian et al., «Organic/inorganic hybrid mesoporous silica membrane rapidly synthesized by a microwave-assisted method and its application in enzyme adsorption and electrocatalysis.,» *Journal of Materials Chemistry* , vol. 1, n. 26, pp. 3267-3276, 2013.
- [71] Y. Snoussi et al., «Sonochemical synthesis of Fe₃O₄@ NH₂-mesoporous silica@ Polypyrrole/Pd: A core/double shell nanocomposite for catalytic applications.,» *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 41, pp. 551-561, 2018.

- [72] M. Gumustas e. al., «Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems,» in *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*, 2017.
- [73] B. Dumontel et al., «Natural Biopolymers as Smart Coating Materials of Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery,» *Pharmaceutics*, vol. 15, n. 2, p. 447, 2023.
- [74] A. Nieto et al., «Surface electrochemistry of mesoporous silicas as a key factor in the design of tailored delivery devices,» *Langmuir*, vol. 26, n. 7, pp. 5038-5049, 2010.
- [75] Y. Wang et al., «Charge-reversal APTES-modified mesoporous silica nanoparticles with high drug loading and release controllability,» *ACS applied materials & interfaces*, vol. 8, n. 27, pp. 17166-17175, 2016.
- [76] T. Liu et al. «Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice,» *Biomaterials*, vol. 32, p. 1657–1668, 2011.
- [77] C. Chircov et al., «Mesoporous Silica Platforms with Potential Applications in Release and Adsorption of Active Agents,» *Molecules*, vol. 25, p. 3814, 2020.
- [78] K. Trzeciak et al., «Mesoporous silica particles as drug delivery systems—The state of the art in loading methods and the recent progress in analytical techniques for monitoring these processes,» *Pharmaceutics*, vol. 13, n. 7, p. 950, 2021.
- [79] C. McCarthy et al., «Mesoporous silica formulation strategies for drug dissolution enhancement: A review,» *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 13, p. 93–108, 2016.
- [80] A. Hillerström et al. «Ibuprofen loading into mesostructured silica using liquid carbon dioxide as a solvent,» *Green Chem.*, vol. 11, pp. 662-667, 2009.
- [81] A. Maleki et al. «Mesoporous silica materials: From physico- chemical properties to enhanced dissolution of poorly water-soluble drugs,» *Journal of Controlled Release*, vol. 262, pp. 329-347, 2017.
- [82] G. Azaïs et al., «Implication of Water Molecules at the Silica-Ibuprofen Interface in Silica-Based Drug Delivery Systems Obtained through Incipient Wetness Impregnation,» *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 121, n. 48, pp. 26833-26839, 2017.
- [83] E. Skorupska et al. «Ibuprofen in Mesopores of Mobil Crystalline Material 41 (MCM-41): A Deeper Understanding,» *Molecular Pharmaceutics*, vol. 11, p. 1512–1519, 2014.
- [84] G. Ciardelli, *Corso di Bionanotecnologie*, 2021-2022.
- [85] E. Guisasola et al., «Magnetic-responsive release controlled by hot spot effect,» *Langmuir*, vol. 31, n. 46, pp. 12777-12782, 2015.
- [86] X. Li et al., «Ultrasound reversible response nanocarrier based on sodium alginate modified mesoporous silica nanoparticles,» *Frontiers in chemistry*, vol. 7, n. 59, 2019.
- [87] J. Xuan et al., «Ultrasound-responsive block copolymer micelles based on a new amplification mechanism,» *Langmuir*, vol. 28, n. 47, pp. 16463-16468, 2012.
- [88] X. Chen et al., «Dual bioresponsive mesoporous silica nanocarrier as an “AND” logic gate for targeted drug delivery cancer cells,» *Advanced Functional Materials* , vol. 24, n. 44, pp. 6999-7006, 2014.

- [89] R. Castillo et al., «Production of MCM-41 nanoparticles with control of particle size and structural properties: optimizing operational conditions during scale-up.» *International journal of molecular sciences*, p. 7899, 2020.
- [90] W. Liu et al., «Dopamine modulated ionic permeability in mesoporous silica sphere based biomimetic compartment.» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 142, pp. 266-271, 2016.
- [91] H. Ji et al., «Synthesis of Si-MCM-48 membrane by solvent extraction of the surfactant template.» *Journal of non-crystalline solids*, vol. 354, n. 18, pp. 2010-2016, 2008.
- [92] C. Charnay et al., «Inclusion of ibuprofen in mesoporous templated silica: drug loading and release property.» *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, vol. 57, n. 3, pp. 533-540, 2004.
- [93] [Online]. Available: <https://www.pharmamedix.com/principiovoce.php?pa=ibuprofene&vo=Classificazione>.
- [94] K. Lv et al. «Incorporation of small extracellular vesicles in sodium alginate hydrogel as a novel therapeutic strategy for myocardial infarction.» *Theranostics*, vol. 9, n. 24, p. 7403, 2019.
- [95] [Online]. Available: <https://photometrics.net/field-emission-scanning-electron-microscopy-fesem/>. [Consultato il giorno 4 Settembre 2023].
- [96] A. Billah et al., «Investigation of multiferroic and photocatalytic properties of Li doped BiFeO₃ nanoparticles prepared by ultrasonication.» 2016.
- [97] [Online]. Available: [https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/XRD.html#:~:text=X%2Dray%20powder%20diffraction%20\(XRD\)%20is%20a%20rapid%20analytical,average%20bulk%20composition%20is%20determined..](https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/XRD.html#:~:text=X%2Dray%20powder%20diffraction%20(XRD)%20is%20a%20rapid%20analytical,average%20bulk%20composition%20is%20determined..)
- [98] M. Thommes et al., «Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report).» *Pure and applied chemistry*, vol. 87, n. 9-10, pp. 1051-1069, 2015.
- [99] M. Silvestri et al., «ENEA, Agenzia Nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo ecosostenibile.» [Online]. Available: <https://iris.enea.it/retrieve/dd11e37c-d779-5d97-e053-d805fe0a6f04/RT-2013-7-ENEA.pdf>. [Consultato il giorno Novembre 2023].
- [100] [Online]. Available: https://www.micromeritics.com/Repository/Files/Gas_Adsorption_Theory_poster.pdf. [Consultato il giorno Novembre 2023].
- [101] D. Peak, «FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY,» in *Encyclopedia of Soils in the Environment*, 2005, pp. 80-85.
- [102] Zanichelli, Bande di Assorbimento IR, 2014.
- [103] N. Saadatkhah et al., «Experimental methods in chemical engineering: Thermogravimetric analysis—TGA.» *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, vol. 98, n. 1, pp. 34-43, 2020.
- [104] R. Prime et al., «Thermogravimetric analysis (TGA),» *Thermal analysis of polymers: Fundamentals and applicatio*, 2009, pp. 241-317.

- [105] P. Stagnaro et al., «La calorimetria differenziale a scansione e l'analisi termogravimetrica nella caratterizzazione termica dei materiali polimerici,» 2016.
- [106] S. Bhardwaj et al., «A review: HPLC method development and validation,» *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 5, n. 4, pp. 76-81, 2015.
- [107] B. A. Bidlingmeyer, *Practical HPLC methodology and applications.*, John Wiley & Sons, 1993.
- [108] [Online]. Available: https://theory.labster.com/high_performance_liquid_chromatography-it/. [Consultato il giorno 10 Ottobre 2023].
- [109] K. Nie et al., «In situ fiber-optic dissolution assisted by a mathematical separation model of dynamic three-wavelength K-ratio spectrophotometry.,» *Dissolution Technol* , vol. 17, n. 2, pp. 15-18, 2010.
- [110] M. Ganesh et al., «Synthesis, characterization and drug release capability of new cost effective mesoporous silica nano particle for ibuprofen drug delivery.,» *Int. J. Control Autom*, vol. 6, n. 5, pp. 207-16, 2013.
- [111] X. Li et al., «Ultrasound reversible response nanocarrier based on sodium alginate modified mesoporous silica nanoparticles.,» *Frontiers in chemistry*, vol. 7, p. 59, 2019.
- [112] N. Huebsch et al., «Ultrasound-triggered disruption and self-healing of reversibly cross-linked hydrogels for drug delivery and enhanced chemotherapy.,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, n. 27, pp. 9762-9767, 2014.
- [113] F. Fontana et al., «Development and validation of low-intensity pulsed ultrasound systems for highly controlled in vitro cell stimulation.,» *Ultrasonics*, vol. 116, p. 106495, 2021.
- [114] S. Shen et al., «Solvent-free direct formulation of poorly-soluble drugs to amorphous solid dispersion via melt-absorption.,» *Advanced Powder Technology*, vol. 28, n. 5, pp. 1316-1324, 2017.
- [115] C. Chang et al., «ABJ triality: from higher spin fields to strings.,» *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical*, vol. 46, n. 21, p. 214009, 2013.
- [116] X. Li et al., «Ultrasound reversible response nanocarrier based on sodium alginate modified mesoporous silica nanoparticles.,» *Frontiers in chemistry*, vol. 7, p. 49, 2019.
- [117] Y. He et al., «Amino-functionalized mesoporous silica nanoparticles as efficient carriers for anticancer drug delivery,» *Journal of biomaterials applications*, vol. 32, n. 4, pp. 524-532, 2017.
- [118] A. Ewing et al., «Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopic imaging of pharmaceuticals in microfluidic devices.,» *Biomicrofluidics*, vol. 10, n. 2, 2016.
- [119] S. Meissner, et al. «Investigating the influence of ultrasound parameters on ibuprofen drug release from hydrogels,» *Drug Delivery and Translational Research* , vol. 13, n. 5, pp. 1390-1404, 2023.
- [120] A. Mousavi et al., «Modification of graphene with silica nanoparticles for use in hybrid network formation from epoxy, novolac, and epoxidized novolac resins by sol-gel method: Investigation of thermal properties.,» *Express Polymer Letters*, vol. 12, n. 3, 2018.

- [121] A. Tasić et al., «Synthesis, structure and thermogravimetric analysis of alpha, omega-telechelic polydimethylsiloxanes of low molecular weight.,» *Journal of the Serbian Chemical Society*, vol. 82, n. 12, pp. 1395-1416, 2017.
- [122] P. e. a. dos Santos Araújo, «Thermal degradation of calcium and sodium alginate: A greener synthesis towards calcium oxide micro/nanoparticles.,» *International journal of biological macromolecules*, vol. 140, pp. 749-760, 2019.
- [123] X. Chen et al., «Alginate composite hydrogel bead with multilayer flake structure for dye adsorptions.,» *Journal of Renewable Materials*, vol. 7, n. 10, p. 983, 2019.
- [124] S. Jana et al., «Characterization of physicochemical and thermal properties of chitosan and sodium alginate after biofield treatment.,» *Pharmaceutica Analytica Acta*, vol. 6, n. 10, 2015.
- [125] F. Sabri, et al. «Sodium alginate-grafted submicrometer particles display enhanced reversible aggregation/disaggregation properties.,» *Carbohydrate polymers*, vol. 194, pp. 61-68, 2018.
- [126] M. Chandarana et al., «The use of nanotechnology in cardiovascular disease.,» *Applied Nanoscience*, vol. 8, pp. 1607-1619, 2018.
- [127] M. Radisic et al., «Challenges in cardiac tissue engineering.,» *Tissue Engineering Part B: Reviews* , vol. 16, n. 2, pp. 169-187, 2010.
- [128] Wexler RK et al., «Cardiomyopathy: an overview.,» *Am Fam Physician*, vol. 79, n. 9, pp. 778-784, 2009.
- [129] N. Shadjou et al., «Bone tissue engineering using silica-based mesoporous nanobiomaterials: Recent progress.,» *Materials Science and Engineering*, vol. 55, pp. 401-409, 2015.
- [130] A. Farjadian et al., «Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, pharmaceutical applications, biodistribution, and biosafety assessment.,» *Chemical Engineering Journal* , vol. 359, pp. 684-705, 2019.
- [131] [Online]. Available: <https://www.ormascientific.com/portfolio-articoli/agitatori-a-rulli/>. [Consultato il giorno Ottobre 2023].