



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



Università
degli Studi
di Palermo

Dottorato di Ricerca in Oncologia e Chirurgia Sperimentali
Dipartimento di Discipline Chirurgiche, Oncologiche e Stomatologiche (Di.Chir.On.S.)
Settori Scientifici Disciplinari CHIM/09 e MED/28

Sviluppo di spugne bioerodibili multifunzionali per la promozione di processi riparativi mediante il rilascio controllato di agenti antibiotici e antiossidanti. Utilizzo in chirurgia orale

TESI DI DOTTORATO DI:
DOTT. GIUSEPPE ANGELLOTTI

IL COORDINATORE
PROF. ANTONIO RUSSO

IL TUTOR
PROF. SSA VIVIANA DE CARO

CO TUTOR
PROF.SSA GIUSEPPINA CAMPSISI

CICLO XXXV
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2023

INDICE

ABSTRACT	1
1. INTRODUZIONE	4
1.1. PATOLOGIE A CARICO DEI TESSUTI DURI E MOLLI DEL CAVO ORALE E STRATEGIE TERAPEUTICHE CONVENZIONALI	5
1.2. RIGENERAZIONE TISSUTALE	7
1.3. I POLIFENOLI NATURALI E LE LORO POTENZIALITÀ TERAPEUTICHE.....	8
1.4 STRATEGIE PER LA VEICOLAZIONE DI POLIFENOLI.....	19
1.5 TECNICHE DI PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI DRUG DELIVERY SYSTEMS	30
2. SCOPO DELLA TESI.....	37
3. MATERIALI E METODI.....	39
3.1. MATERIALI.....	39
3.2. METODI.....	41
3.2.1. <i>METODI PER REALIZZARE UN NANOCOMPOSITO COSTITUITO DA NLC DI CURCUMINA INCORPORATE IN UNA SPUGNA BIOERODIBILE DI ACIDO IALURONICO CARICA DI METRONIDAZOLO PER IL TRATTAMENTO DELLA CAVITÀ POST ESTRATTIVA</i>	41
3.2.2 <i>METODI PER REALIZZARE SCAFFOLD IN POLICAPROLATTONE CONTENENTI CURCUMINA E BETA- TRICALCIOFOSFATO MEDIANTE STAMPA 3D PER LA RIGENERAZIONE DEL TESSUTO OSSEO DEL CAVO ORALE (IN COLLABORAZIONE CON LA WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, VARSAVIA).....</i>	54
3.2.3 <i>METODI PER REALIZZARE UN NANOCOMPOSITO COSTITUITO DA NLC DI QUERCETINA INCORPORATE IN UNA SPUGNA BIOERODIBILE DI CHITOSANO CARICA DI CIPROFLOXACINA PER MIGLIORARE IL SUCCESSO DI INTERVENTI DI IMPIANTO DENTALE</i>	58
3.2.4. <i>METODI PER PROMUOVERE L'ASSORBIMENTO SUBLINGUALE DEL RESVERATROLO E REALIZZAZIONE DI MICROPARTICELLE POLIMERICHE MEDIANTE SPRAY DRYING PER LA PREPARAZIONE DI MINI-TABLETS SUBLINGUALI FAST-DISSOLVING</i>	70
3.2.5 <i>METODI PER REALIZZARE NLC CARICHE DI RESVERATROLO COME PROMETTENTE DELIVERY PLATFORM</i>	77
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	84
4.1. <i>REALIZZAZIONE DI UN NANOCOMPOSITO COSTITUITO DA NLC DI CURCUMINA INCORPORATE IN UNA SPUGNA BIOERODIBILE DI ACIDO IALURONICO CARICA DI METRONIDAZOLO PER IL TRATTAMENTO DELLA CAVITÀ POST ESTRATTIVA</i>	84
4.2 <i>REALIZZAZIONE DI SCAFFOLD IN POLICAPROLATTONE CONTENENTI CURCUMINA E BETATRICALCIOFOSFATO MEDIANTE STAMPA 3D PER LA RIGENERAZIONE DEL TESSUTO OSSEO DEL CAVO ORALE (IN COLLABORAZIONE CON LA WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, VARSAVIA)</i>	116
4.3 <i>REALIZZAZIONE DI UN NANOCOMPOSITO COSTITUITO DA NLC DI QUERCETINA INCORPORATE IN UNA SPUGNA BIOERODIBILE DI CHITOSANO CARICA DI CIPROFLOXACINA PER MIGLIORARE IL SUCCESSO DEGLI INTERVENTI DI IMPIANTO DENTALE</i>	130
4.4. <i>PROMOZIONE DELL'ASSORBIMENTO SUBLINGUALE DEL RESVERATROLO E REALIZZAZIONE DI MICROPARTICELLE POLIMERICHE MEDIANTE SPRAY DRYING PER LA PREPARAZIONE DI MINI-TABLETS SUBLINGUALI FAST-DISSOLVING</i>	161
4.5 <i>REALIZZAZIONE DI NLC CARICHE DI RESVERATROLO COME PROMETTENTE DELIVERY PLATFORM... </i>	183
5. CONCLUSIONI	212
6. BIBLIOGRAFIA.....	213
7. PRODOTTI SCIENTIFICI NEL TRIENNIO DEL DOTTORATO	232

Abstract

La salute delle strutture molli e dure del cavo orale è essenziale non solo per preservare le funzioni ad esse direttamente associate, ma anche per promuovere la salute generale dell'organismo. Tra le problematiche di maggiore interesse clinico a carico della cavità orale ritroviamo: i) le complicazioni post-operatorie che possono verificarsi a seguito di comuni avulsioni dentali che, se non trattate tempestivamente, possono sfociare in gravi parodontiti; ii) i fenomeni di osteonecrosi a carico di mascella e mandibola associate a trattamenti farmacologici nonché alla radioterapia; iii) il carcinoma orale a cellule squamose (OSCC) che è tra i più aggressivi tumori del collo e della testa, caratterizzato dal più basso tasso di sopravvivenza a 5 anni. Va inoltre presa in considerazione la posizione anatomica del cavo orale che, essendo facilmente accessibile dall'esterno, è suscettibile ad infezioni batteriche che possono compromettere uno stato di salute già debilitato e/o peggiorare la condizione clinica delle problematiche sopra citate. Nel trattamento delle affezioni del cavo orale è di fondamentale importanza ottenere una rapida remissione della sintomatologia, favorendo la rigenerazione del tessuto lesa e prevenendo le complicazioni infettive mediante una terapia mirata, efficace e localizzata. Tuttavia, le strategie terapeutiche attualmente in uso sono spesso invasive e in alcuni casi meramente palliative (es. rimozione chirurgica del tessuto necrotico anche osseo), o spesso la necessità di ricorrere a terapie farmacologiche aggressive non scevre da effetti avversi anche gravi può contribuire ad un peggioramento di una condizione patologica preesistente.

Per superare gli inconvenienti dati dai trattamenti convenzionali, recentemente è stato proposto l'utilizzo di sostanze naturali di origine vegetale aventi comprovate proprietà terapeutiche benefiche (es. antiossidanti, antinfiammatorie, antitumorali, antibatteriche), capacità di stimolazione dei processi di rigenerazione tissutale, e soprattutto, effetti collaterali trascurabili. Tra le varie classi di composti naturali che potrebbero rispondere a tali requisiti, i polifenoli sono quella di maggiore interesse scientifico. Si tratta di un gruppo di molecole molto eterogeneo accomunato chimicamente dalla presenza di uno o più gruppi fenolici. Sebbene i polifenoli si trovino in molteplici fonti alimentari e le loro svariate proprietà benefiche siano ben note, il loro utilizzo in ambito clinico è ancora una sfida aperta a causa delle loro caratteristiche chimico-fisiche e farmacocinetiche generalmente sfavorevoli, quali instabilità chimica e fisica, quando soggette ai fenomeni ambientali come le radiazioni ultraviolette, temperatura elevata o pH fortemente acido o alcalino, scarsa solubilità in ambiente acquoso, elevata suscettibilità al metabolismo epatico e, quindi, bassa biodisponibilità a seguito di somministrazione orale. Per superare tali limiti e rendere somministrabili ed efficaci i polifenoli è quindi auspicabile la realizzazione di *drug delivery platform* o *carrier* in grado di incorporare efficacemente tali attivi, preservarne l'integrità strutturale e funzionale e modularne il rilascio al sito target. Inoltre, per promuovere la guarigione dagli stati patologici sopra elencati, può risultare utile la co-somministrazione di polifenoli ed antibatterici tra quelli già utilizzati in chirurgia orale. Tenendo in considerazione queste premesse nel presente lavoro di dottorato sono stati realizzati innovativi sistemi di veicolazione capaci di incorporare polifenoli quali Curcumina, Quercetina e Resveratrolo da soli o in co-somministrazione con antibiotici quali il

Metronidazolo e la Ciprofloxacina, per il trattamento localizzato delle suddette patologie associate al cavo orale.

Una strategia per la veicolazione dei polifenoli consiste nella loro incapsulazione in sistemi micro e nanoparticellari. A tal fine sono state realizzate microparticelle polimeriche contenenti Resveratrolo con la tecnica dello Spray Drying, ottimizzando accuratamente i parametri operativi al fine di ottenere particelle sferiche, di dimensione omogenea ed uniformi in termini di contenuto in attivo. Tale strategia ha consentito la completa amorfizzazione del Resveratrolo, incrementandone notevolmente la solubilità in ambiente acquoso, e promuoverne la permeabilità attraverso la mucosa sublinguale.

I Carrier Lipidici Nanostrutturati (NLC), costituiti da particelle di dimensioni nanometriche, si sono rivelati un altro sistema di veicolazione dei polifenoli particolarmente promettente, proprio grazie alla loro natura lipidica che ben si è adattata alle caratteristiche chimico-fisiche dei polifenoli. Un'attenta selezione dei componenti lipidici e del bilanciamento degli stessi in relazione al tipo ed alla quantità di polifenolo da incapsulare, ha consentito la preparazione di miscele omogenee, aventi temperatura di rammollimento opportuna (stabilità, storage e maneggevolezza) ma soprattutto contenenti il polifenolo nella sua forma amorfa. Sono stati pertanto preparati e caratterizzati diversi sistemi NLC contenenti rispettivamente Curcumina, Quercetina e Resveratrolo. L'ottimizzazione della tecnica di preparazione top-down ad alta energia caratterizzata da omogeneizzazione seguita da sonicazione ad alte frequenze, ha portato alla produzione di nanoparticelle riproducibili ed omogenee (<500 nm, $PDI < 0.600$), caratterizzate da un'elevata efficienza di incapsulazione ($>95\%$) ed in grado di controllare il rilascio degli attivi secondo cinetiche ben definite. Per consentire la co-somministrazione dei polifenoli (lipofili) con gli antibiotici precedentemente menzionati (idrofilici), sono stati ulteriormente realizzati dei sistemi nanocompositi sotto forma di spugne bioerodibili, costituite da una matrice polimerica biocompatibile e bioerodibile (a base di Chitosano o Acido Ialuronico, e PVP K90) all'interno della quale sono state intrappolate le nanoparticelle lipidiche. I nanocompositi, essendo formulazioni polverulente, hanno mostrato diverse caratteristiche favorevoli, tra cui: omogeneità, elevata porosità, capacità di promuovere l'accumulo degli attivi nei tessuti del cavo orale ed elevata stabilità nel tempo, preservando così i polifenoli dalla degradazione. Inoltre, la "trasformazione" delle dispersioni acquose di NLC in un sistema anidro porta all'ottenimento di una polvere secca estremamente semplice da manipolare ed applicare, consentendo di dosare i principi attivi in modo accurato e riproducibile. Studi in vitro, hanno dimostrato, inoltre, la citocompatibilità delle spugne bioerodibili a base di Curcumina, così come la citocompatibilità delle NLC cariche di Resveratrolo con i fibroblasti murini, mentre le spugne a base di Quercetina e Ciprofloxacina hanno evidenziato proprietà antibatteriche e antibiofilm nei confronti dello *Staphylococcus aureus* superiori all'antibiotico in forma libera. Parallelamente, è stata impiegata la tecnica della stampa 3D per la realizzazione di scaffold polimerici carichi sia di Curcumina, in cui l'aggiunta di beta-tricalcio fosfato (bioceramica), è stata in grado di influenzare positivamente le caratteristiche dello scaffold, aumentandone la porosità e promuovendo la stabilità della Curcumina in fase di preparazione.

In conclusione, il lavoro di ricerca svolto ha portato allo sviluppo tecnologico, da una parte, di valide ed efficienti *delivery platform* nano- e micrometriche per la veicolazione dei

polifenoli e, dall'altra, alla produzione di sistemi di *drug delivery* macroscopici (nanocompositi e scaffold) potenzialmente utili per il trattamento delle patologie del cavo orale.

1. Introduzione

La bocca è la porta di ingresso degli apparati digerente e respiratorio, deputata dunque a funzioni digestive, respiratorie e fonatorie, nonché sede del senso del gusto. Dal punto di vista anatomico (**Figura 1**), il cavo orale è circondato dalle labbra ed è suddivisibile in due regioni separate: un'area più esterna delimitata da vestibolo, denti e labbra, e un'area più interna che costituisce la cavità orale propriamente detta. Sotto le labbra vi sono le arcate gengivo-dentarie formate dalle ossa mascellare (arcata superiore) e mandibolare (arcata inferiore). La cavità orale propriamente detta è delimitata anteriormente e lateralmente dai processi alveolari costituiti da tessuto osseo e mucosa gengivale e contenenti i denti, e posteriormente dall'istmo delle fauci. Il tetto buccale è formato anteriormente dal palato duro e posteriormente dal palato molle dal quale pende l'ugola. I muscoli miloioidei costituiscono il pavimento della cavità orale vera e propria. Il rivestimento interno della bocca è costituito da mucose distinguibili dal punto di vista anatomo-funzionale in: mucosa buccale, sublinguale, gengivale e palatale. Diverse sono, inoltre, le strutture accessorie presenti nel cavo orale: ghiandole salivari, denti e lingua. Le ghiandole salivari (principalmente parotide, sottomandibolare e sublinguale) secernono saliva e muco essenziali per la lubrificazione della cavità orale, ma anche per i processi digestivi. La saliva è un fluido acquoso costituito da sali, anticorpi ed enzimi ed essenziale per lo svolgimento di diverse funzioni. Contribuisce alla masticazione, consentendo la formazione del bolo alimentare in grado di scivolare dalla bocca all'esofago, e all'alimentazione, lavorando di concerto con i denti per "rompere" gli alimenti in modo che possano essere assaporati. La saliva riveste gli alimenti ingeriti e, grazie alla presenza di enzimi digestivi, inizia il processo di digestione. La secrezione salivare è inoltre dotata di componenti con blanda attività antibiotica atte all'eliminazione di batteri, lieviti e virus e costituisce, quindi, una prima linea di protezione da carie e altri disturbi. Il fluido salivare umetta e mantiene integra le mucose orali, previene la demineralizzazione dei denti e svolge funzioni tampone che garantiscono il mantenimento di un pH orale fisiologico anche a seguito dell'ingestione di alimenti acidi/alcalini o di metabolismo microbico. I denti sono le strutture più rappresentative all'interno della cavità orale. Deputati alla prima fase dei processi di ingestione e digestione, strappano e macinano il cibo in pezzi abbastanza piccoli per la deglutizione. La lingua riveste ruoli funzionali e sensoriali. Da una parte contribuisce alla prima digestione del cibo comprimendolo contro il palato e determinando, così, la formazione del bolo alimentare che verrà successivamente inghiottito e destinato al percorso lungo l'apparato digerente. D'altro canto, la superficie della lingua è caratterizzata dalla presenza delle papille gustative che determinano il senso del gusto (Kamrani & Sadiq, 2022). Non va inoltre dimenticato che le mucose poste a rivestimento della cavità orale costituiscono una prima barriera contro le infezioni microbiche.

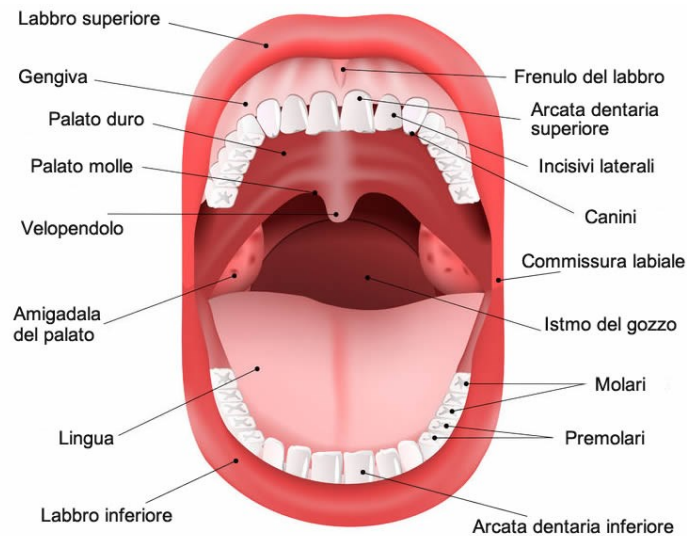


Figura 1: Rappresentazione anatomica del cavo orale

Nonostante si tratti di tessuti costitutivamente resistenti sia agli stress meccanici che ai patogeni, le componenti del cavo orale non sono scevre dall'instaurarsi di possibili condizioni patologiche di rilevanza e prognosi varie. Tra queste ricordiamo: patologie dentali che necessitano di avulsioni, il carcinoma orale squamoso e l'osteonecrosi della mascella. Alla luce delle differenti ed essenziali funzioni che la bocca svolge nella vita quotidiana, il mantenimento del buono stato di salute di tutte le strutture del cavo orale e il trattamento delle eventuali condizioni patologiche in essere risulta vitale per garantire una buona qualità di vita.

1.1. Patologie a carico dei tessuti duri e molli del cavo orale e strategie terapeutiche convenzionali

1.1.1. Avulsione dentale, complicanze e trattamento

Le avulsioni, o estrazione, dentali sono procedure chirurgiche che prevedono la rimozione di un dente dall'alveolo, ovvero dalla naturale cavità ossea (mandibolare o mascellare) in cui esso alberga. L'estrazione di un dente si rende necessaria quando, per motivi patologici od impedimenti fisici o per ragioni profilattiche, la permanenza nella sua sede naturale creerebbe un danno maggiore. Un dente viene dunque estratto esclusivamente quando necessario e solo se non può essere salvato o trattato mediante altri metodi conservativi (es. devitalizzazione, ricostruzione, apicectomia). Nonostante l'ampio ricorso alla pratica dell'estrazione dentale, non sono infrequenti le conseguenze post-operatorie che possono comportare cambiamenti significativi delle strutture molli e dure del cavo orale oltre che notevoli complicazioni per il paziente. Quelle più comuni sono facilmente gestibili e trattabili e riguardano l'instaurarsi di processo infiammatorio caratterizzato da una sintomatologia (es. gonfiore e dolore) che può rimanere localizzata nel sito chirurgico o in alcuni casi irradiarsi fino alle strutture muscolari e nervose sottostanti. In questo caso si parla di trisma, una condizione medica caratterizzata dalla contrattura dolorosa dei muscoli masticatori con conseguente costrizione della mascella.

Nella maggior parte dei casi il trattamento convenzionale con farmaci antiinfiammatori come i FANS è in grado di risolvere efficacemente il problema (Passarelli et al., 2020). Tuttavia, in alcuni pazienti il decorso post-operatorio può essere più severo con l'insorgenza di disordini temporo-mandibolari e problematiche parodontali. In particolare, la parodontite è un'infezione dei tessuti parodontali che può avere differenti gradi di severità fino a determinare una grave condizione patologica caratterizzata da perdita di adesione dei denti all'alveolo con conseguente formazione di tasche parodontali, mobilità dentale, sanguinamento gengivale e ascessi, fino alla perdita di uno o più denti. Uno studio sostenuto da Karapataki nel 2000 ha evidenziato come pazienti che si erano sottoposti all'avulsione dei terzi molari, a distanza di 5 anni manifestassero una perdita di attacco dentario del 43%, attribuibile al peggioramento di una condizione parodontale preesistente (Karapataki et al., 2000).

La prescrizione di antibiotici sistemici per la prevenzione di complicazioni come l'alveolite e l'infezione del sito chirurgico durante l'estrazione del terzo molare è una pratica diffusa tra i dentisti, ma anche questa è controversa e dibattuta. La polemica nasce perché la terapia antibiotica profilattica non è solitamente indicata in pazienti sani e l'uso inappropriato di antibiotici mette i pazienti a rischio di reazioni avverse e contribuisce allo sviluppo di resistenza agli antibiotici. Inoltre, considerando il rapporto costi-benefici, revisioni sistematiche e meta-analisi pubblicate non supportano l'uso sistematico profilattico di antibiotici. In ogni caso, i pazienti sottoposti a questa terapia chirurgica, oltre alla profilassi antibiotica, sono spesso costretti ad utilizzare altre terapie farmacologiche in base alla durata e alla complessità dell'intervento per la gestione della fase postoperatoria (Troiano et al., 2018). Inoltre, le complicanze infiammatorie dopo avulsione del terzo molare rivestono un fattore importante nella qualità della vita dei pazienti nei primi periodi postoperatori. Vi sono numerosi metodi di trattamento della rapida risposta infiammatoria associata alla chirurgia del terzo molare. Questi includono diverse tecniche di trattamento chirurgico con o senza incorporazione di drenaggi, l'uso di farmaci analgesici, e corticosteroidi (Troiano et al., 2018), o ancora altre modalità quali metodi fisici come la crioterapia (Fernandes et al., 2019) e l'applicazione laser (Amarillas-Escobar et al., 2010). La scelta del trattamento è sempre demandata alla consapevolezza del chirurgo orale delle diverse modalità di alleviamento di queste complicanze, al fine di rendere più confortevole il recupero postoperatorio per il paziente.

1.1.2 Carcinoma Orale a Cellule Squamose

Tra i tumori del collo e della testa quelli del cavo orale sono quelli più comuni e nel 90% dei casi sono caratterizzati dal carcinoma a cellule squamose (OSCC). L'esordio è multifattoriale ed origina da un cambiamento nell'aspetto della mucosa orale, in seguito a mutazioni dei cheratinociti, che evolve in una lesione tumorale e in seguito in metastasi. La sfida principale è il miglioramento del tasso di sopravvivenza dei pazienti poiché, nonostante il miglioramento delle strategie terapeutiche come la chemioterapia e la chirurgia, questo è ancora al di sotto del 50% dei casi clinici (Givony, 2020; D. Liu et al., 2016). L'OSCC è una tipologia di cancro che può colpire diverse regioni del cavo orale, come il labbro, la lingua, la gengiva e il palato (Jerjes et al., 2010). Tra i fattori di rischio, l'abuso di alcol e tabacco sono considerati le cause principali, in quanto agenti pro-infiammatori ed è comunque noto

che lo sviluppo del cancro orale è strettamente correlato a molte vie infiammatorie. In particolare, le sostanze chimiche contenute nel fumo di tabacco (benzopireni e nitrosammine) abbassano le difese immunitarie dei tessuti orali, oltre a compromettere il DNA delle cellule, e favoriscono la carcinogenesi (Rivera, 2015). Solitamente i casi di OSCC vengono diagnosticati in una fase molto avanzata della carcinogenesi che compromette gravemente le probabilità di sopravvivenza e riduce la qualità della vita dei pazienti (Varela et al., 2012). Di conseguenza risulta cruciale trattare questa forma di tumori nelle fasi iniziali della malattia. Gli approcci terapeutici convenzionali si basano principalmente sul trattamento chirurgico, sulla radioterapia, sulla chemioterapia sistemica o in una loro combinazione. Tali trattamenti sono certamente aggressivi, compromettendo la qualità di vita del paziente e, spesso risultano insoddisfacenti in termini di sopravvivenza.

1.1.3 Osteonecrosi della mascella

L'osteonecrosi della mascella è una condizione rara ma grave che si manifesta con una o più lesioni ossee necrotiche che rimangono esposte nella regione maxillo-facciale per tempi prolungati (anche mesi) senza risposta efficace ad alcuna terapia. L'osteonecrosi colpisce principalmente la mascella ma può colpire anche la mandibola. La sintomatologia è accompagnata da dolore, infiammazione, eritema e perdita dei denti (Anastasilakis et al., 2022). La patologia può insorgere spontaneamente ma nella maggior parte dei casi è una complicazione in seguito ad un intervento chirurgico orale, anche una comune avulsione dentale se il paziente soffre già di altre patologie associate al cavo orale (AlDhalaan et al., 2020). È stato inoltre dimostrato che l'utilizzo di farmaci che impediscono il riassorbimento osseo, come i bisfosfonati o il denosumab, attualmente impiegati come agenti nel trattamento dell'osteoporosi o nei tumori che riducono il turnover osseo, sono fattori di rischio per l'insorgenza dell'osteonecrosi della mascella (Kuroshima, Sasaki, & Sawase, 2019). Inoltre, la presenza di un'infezione batterica nel cavo orale di pazienti in terapia con questi farmaci contribuisce alla necrotizzazione del tessuto osseo poiché il metabolismo dei microorganismi crea un ambiente fortemente acido che riduce la capacità autorigenerativa del tessuto (Shibahara, 2019). Il trattamento di questa patologia rimane tuttora difficile e controversa e cambia in funzione dello stadio e della condizione fisica del paziente. Solitamente il trattamento della sintomatologia e la rimozione chirurgica del tessuto necrotico sono gli approcci più comuni. Tuttavia, recentemente l'ossigenoterapia e l'utilizzo di cellule mesenchimali per stimolare la rigenerazione del tessuto osseo hanno dimostrato risultati promettenti (Favia et al., 2018; Kuroshima, Sasaki, Murata, et al., 2019).

1.2. Rigenerazione tissutale

La rigenerazione di un tessuto leso avviene mediante la compartecipazione di più fenomeni accuratamente sincronizzati che si verificano secondo una sequenza ben specifica. In seguito alla formazione della lesione entrano in gioco tutti i meccanismi legati all'emostasi mediante la vasocostrizione dei vasi sanguigni ed il lavoro delle piastrine. La fase emostatica è seguita da quella infiammatoria dove il rilascio di citochine pro-infiammatorie e di fattori di crescita stimolano la migrazione di granulociti neutrofili e macrofagi nel sito della lesione. A questo livello viene rilasciato dalle piastrine attivate un importante fattore di crescita quale il TGF- β , il quale stimola la chemiotassi, l'angiogenesi e la formazione di nuova matrice

extracellulare. L'attivazione di questo fattore di crescita, inoltre, richiama una grossa quantità di cellule del sistema immunitario (neutrofili e macrofagi) necessari per la fagocitosi delle cellule batteriche e del materiale necrotico. Segue quindi all'inizio della formazione di nuovi vasi sanguigni e all'arrivo delle cellule mesenchimali per la formazione del nuovo tessuto (Politis et al., 2016). Quando una di queste fasi dura in maniera anomala rispetto le altre, non si raggiungerà l'omeostasi e di conseguenza la riparazione del tessuto. Ad esempio, la fase infiammatoria può perdurare per più di 7 giorni, comportando un ritardo nella ri-epitelizzazione e necrosi tissutale. Questo è dovuto alla continua secrezione di citochine pro-infiammatorie che alimentano un circolo vizioso capace di amplificare notevolmente la risposta infiammatoria. L'intervento chirurgico atto alla rimozione del tessuto necrotico e la giunzione dei lembi della ferita (se presenti) è una possibile soluzione al problema. In alcuni casi in cui l'intervento chirurgico non è risolutivo possono essere utilizzati dei tessuti mucosali allogenici, che tuttavia soffrono del problema del rigetto, oppure autologi maggiormente tollerati dal paziente (Toma et al., 2021). Nel caso del tessuto osseo, per la sua rigenerazione è quasi sempre necessaria la presenza di un innesto che funga da sostegno meccanico per cellule e vasi che può essere un biomateriale come l'idrossiapatite o gli scaffold polimerici. Tuttavia, negli ultimi anni l'utilizzo di emocomponenti non trasfusionali di natura autologa ricchi in fattori di crescita e piastrine ha mostrato risultati promettenti nella guarigione del tessuto sia osseo che mucosale, sia quando utilizzati da soli che in associazione ad altri biomateriali o impianti dentali (Albanese et al., 2013). Tutte queste strategie applicate alla rigenerazione dei tessuti del cavo orale sono, comunque, supportate dall'uso di farmaci antiinfiammatori steroidei e non steroidei in associazione alla terapia antibiotica.

1.3. I polifenoli naturali e le loro potenzialità terapeutiche

Oggi giorno, la necessità di trovare valide alternative ai metodi convenzionali di trattamento delle problematiche associate al cavo orale ha portato la comunità scientifica a produrre una notevole quantità di letteratura sul ruolo, sull'importanza e sull'efficacia nell'ambito del mantenimento o ripristino della salute umana di sostanze naturali di origine vegetale. In particolare, una delle principali classi di sostanze oggetto di sempre crescente interesse è costituita dalla famiglia dei polifenoli. I polifenoli sono sostanze chimicamente caratterizzate dalla presenza di uno o più gruppi fenolici, naturalmente presenti in numerosi prodotti vegetali come frutta, verdura, noci, semi e fiori (Manach et al., 2004). Le piante producono queste interessanti molecole come secondi messaggeri essenziali sia nel favorire il richiamo di insetti impollinatori che a fini protettivi contro le radiazioni ultraviolette (UV) e le infezioni da parte di microorganismi. Quest'ultima proprietà li rende inoltre protagonisti nell'industria alimentare ed agricola.

I polifenoli possono essere classificati in base al numero di unità fenoliche presenti ed alla loro complessità chimica (es. anelli fenolici condensati) in cinque classi di composti: acidi fenolici, flavonoidi, stilbeni, tannini, lignani e curcuminoidi. Inoltre, in natura si trovano spesso coniugati con uno o più zuccheri quali monosaccaridi, disaccaridi ed oligosaccaridi, generalmente mediante un ponte ossidrilico, sebbene possa verificarsi anche un legame diretto dell'unità zuccherina con un atomo di carbonio aromatico (Cutrim & Cortez, 2018)

Esistono due vie di biosintesi dei polifenoli che possono verificarsi indipendentemente o meno. Una delle vie biosintetiche prevede la creazione di legami tra unità a due atomi di carbonio (acetato attivato) con formazione di polichetidi i quali subiscono la successiva ciclizzazione che li converte in polifenoli. Il secondo meccanismo è denominato *shikimate pathway* ed è quello che porta alla produzione della maggior parte dei composti fenolici. Tale via metabolica prevede l'impiego dei carboidrati ottenuti dalle vie della glicolisi e del pentoso fosfato che vengono inizialmente convertiti in amminoacidi aromatici (fenilalanina, tirosina e triptofano). In seguito, la delezione di una molecola di ammoniaca ad opera dell'enzima Fenilalanina Ammonio Liasi porta alla formazione di acido cinnamico poi convertito in acido p-OH-cinnamico, utilizzato come substrato per l'inserimento sequenziale di gruppi idrossilici (-OH) e metossilici (-OCH₃) con conseguente formazione di acidi caffeico e ferulico, precursori dei flavonoidi (Cutrim & Cortez, 2018).

1.3.1. Acidi fenolici

Si tratta di una classe di molecole chimicamente caratterizzate dalla presenza di un unico anello fenolico ed a loro volta suddivisibili in acidi idrossicinnamici e acidi idrossibenzoici (Figura 2).

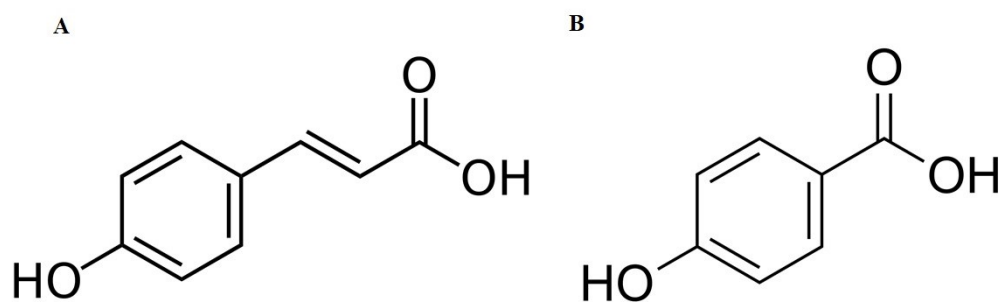


Figura 2: Struttura chimica dell'acido idrossicinnamico (A) e dell'acido idrossibenzoico (B)

Sono i principali responsabili del colore e delle proprietà organolettiche dei prodotti alimentari di origine vegetale e posseggono proprietà *scavenger* che li rendono utili nella protezione delle biomolecole dai danni causati dai radicali liberi (Kumar & Goel, 2019). Gli acidi fenolici sono da alcuni anni *focus* dell'industria agroalimentare grazie al ruolo che rivestono nei processi di maturazione e prevenzione dall'imbrunimento enzimatico dei frutti, che li rendono estremamente interessanti come conservanti alimentari naturali (Martillanes et al., 2017). L'effetto degli acidi fenolici sulla salute umana è ancora poco chiaro. Tuttavia, alcuni studi suggeriscono una correlazione tra la loro somministrazione ed effetti antinfiammatori legati sia all'inibizione della sintesi dei leucotrieni coinvolti nell'immunoregolazione dei processi allergici (Robbins, 2003), che alla regolazione dell'attività della proteina AP-1, implicata nei processi di regolazione dell'infiammazione e di differenziazione e proliferazione cellulare (Maggi-Capeyron et al., 2001).

1.3.2. Flavonoidi

Insieme agli acidi fenolici costituiscono la classe di sostanze naturali a struttura fenolica più diffusa e sono comunemente presenti in numerosi prodotti alimentari quali frutta, verdura e bevande (es. vino). I flavonoidi costituiscono un ampio gruppo di composti notevolmente

studiati negli ultimi anni poiché associati ad un ampio spettro di effetti benefici per la salute dell'uomo e per questo di largo impiego nelle industrie nutraceutica, farmaceutica e cosmetica. Il loro spettro d'azione è estremamente vasto: dai poteri antiossidante e antiinfiammatorio, fino ad attività antitumorali e antidiabetiche ed antiparkinson che li rendono ottimi candidati sia come medicine alternative che come coadiuvanti e sinergizzanti delle terapie convenzionali del morbo di Parkinson, delle patologie cardiovascolari e del cancro (T. yang Wang et al., 2018). In natura i flavonoidi giocano un ruolo chiave nella determinazione del colore e dell'aroma dei fiori utili per attirare insetti impollinatori, disperdere i frutti e aiutare la germinazione. Sono inoltre determinanti nella protezione delle piante sia dagli stress ossidativi, in quanto sono in grado di agire come filtri chimici contro le radiazioni UV (Takahashi & Ohnishi, 2004), che dalle infezioni microbiche. Conferiscono, inoltre, resistenza alle variazioni termiche svolgendo, quindi, un ruolo funzionale nell'acclimatamento al calore e nella tolleranza al congelamento (Mathesius, 2018).

Dal punto di vista chimico, i flavonoidi sono costituiti da due anelli fenolico e tetraidropiranico condensati tra loro ed a quest'ultimo è a sua volta legato un anello benzenico (**Figura 3**). In funzione del numero e della tipologia dei sostituenti presenti nell'anello benzenico e del grado di insaturazione dell'anello tetraidropiranico sono identificabili le seguenti sottoclassi: flavoni, flavonoli, flavanoni, isoflavonoidi, neoflavonoidi, catechine, antocianine e calconi.

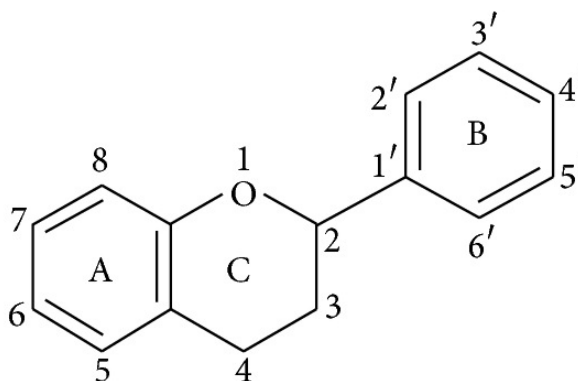


Figura 3: Struttura chimica generale dei flavonoidi

1.3.2.1. La Quercetina (QRC)

La Quercetina (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone. (**Figura 4. A**)) è un flavonoide appartenente alla classe dei flavonoli. Si presenta come una polvere di colore giallo tendente al verde, scarsamente solubile in acqua ma solubile in alcol e nei lipidi. È uno dei flavonoidi più abbondanti e si ritrova in molteplici alimenti come agrumi, verdura a foglia verde, grano, noci, olio d'oliva, mele, tè verde e frutta rossa (uva rossa, ciliegie, mirtilli rossi). Tuttavia, le più alte concentrazioni di Quercetina (QRC) sono state registrate nei broccoli e nelle cipolle (Erlund, 2004) dove, però, è maggiormente presente in forma glicosilata e prendere il nome di Rutina (**Figura 4. B**).

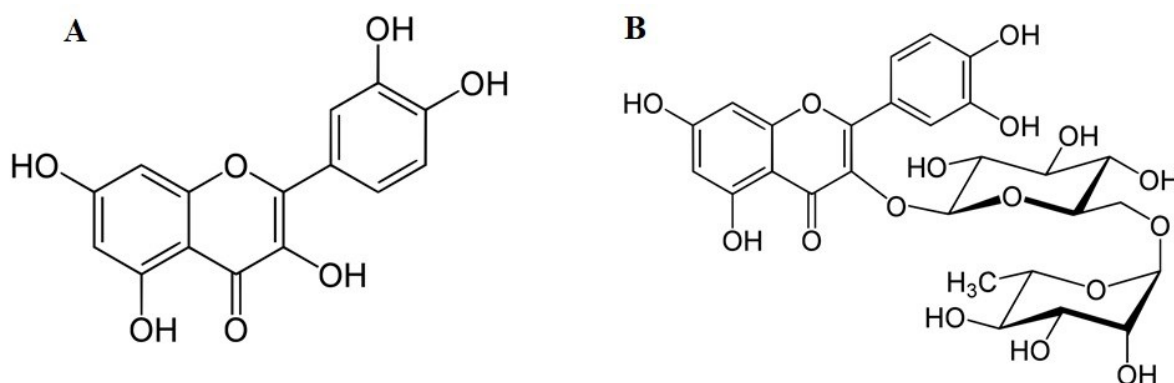


Figura 4: Struttura chimica della Quercetina (A) e Rutina (B)

La QRC è uno dei flavonoidi maggiormente attenzionati dalla comunità scientifica grazie alle sue numerose proprietà terapeutiche. Le attività antiinfiammatorie (Y. Ge et al., 2020) ed antiossidanti (Xu et al., 2019), che la accomunano agli altri polifenoli, sono dovute all'inibizione degli enzimi pro-infiammatori come le cicloossigenasi (COX) e le lipoossigenasi, con conseguente modulazione della sintesi di prostaglandine e leucotrieni rispettivamente, ma anche all'azione stabilizzante nei confronti dei radicali liberi. Inoltre, studi *in vitro* hanno suggerito una correlazione tra la somministrazione di QRC e la riduzione dell'espressione della proteina C-reattiva (PCR), ad alti livelli della quale sono associati stati patologici come obesità, problemi cardiaci e lupus (García-Mediavilla et al., 2007). La QRC è considerata un fitoestrogeno, cioè una molecola naturale esogena analoga all'ormone fisiologico 17- β -estradiolo e quindi capace di interagire con i recettori E α ed E β . Poiché questi ultimi sono espressi anche dal tessuto osseo alcuni studi hanno dimostrato una correlazione tra la somministrazione della QRC e la stimolazione alla formazione di nuovo tessuto osseo aprendo alla possibilità di usare questo flavonoide nell'ambito della medicina rigenerativa (Kim et al., 2006; Zhou & Lin, 2014). Tra le varie potenzialità terapeutiche della QRC vanno senza dubbio annoverate le sue interessanti proprietà antitumorali e chemopreventive. È stato, infatti, dimostrato che la QRC è in grado di indurre apoptosi nei tumori cerebrali, epatici e gastrointestinali (Anand David et al., 2016) con un meccanismo legato alla capacità di inibire il rilascio di fattori di crescita coadiuvato dalle sue già discusse e intrinseche proprietà antiossidanti (Hashemzaei et al., 2017). Tra le ulteriori innumerevoli proprietà benefiche attribuite alla QRC si ritrova l'attività antiulcera (De la Lastra et al., 1994), antiallergica (Mlcek et al., 2016), antidiabetica (Bule et al., 2019), antiipertensiva (Perez-Vizcaino et al., 2009), immunomodulatoria (Y. Li et al., 2016), gastroprotettiva (De Lira Mota et al., 2009) e antibatterica sia contro ceppi Gram-positivi che Gram-negativi (Rigano et al., 2007). Inoltre, alcuni recenti studi ne hanno comprovato l'attività antivirale alla luce della quale ne è stato suggerito l'impiego per la prevenzione ed il trattamento del COVID-19 (Colunga Biancatelli et al., 2020; Wu et al., 2015).

Tuttavia, nonostante la moltitudine di effetti positivi sulla salute umana la QRC, a causa della sua scarsa solubilità in acqua, è caratterizzata da bassa biodisponibilità dopo somministrazione orale (Kaşıkçı & Bağdatlıoğlu, 2016). È, inoltre, soggetta a rapida degradazione se esposta alle radiazioni ultraviolette o a pH fortemente acidi o alcalini (Dall'Acqua et al., 2012; Jurasekova et al., 2014) e risulta pertanto difficile da maneggiare.

Studi *in vivo* condotti sull'uomo e sugli animali hanno dimostrato che, dopo assunzione attraverso fonti alimentari, solo una piccola quantità di QRC viene assorbita (circa 6% della dose) dal tratto gastrointestinale (A. F. Almeida et al., 2018). Questo fenomeno si verifica anche quando la QRC assunta è in forma glicosidata (coniugata con zuccheri quali ramnosio, glucosio, ecc.) poiché, sebbene i derivati glicosidici siano più solubili negli ambienti fisiologici essi sono soggetti a idrolisi già nel cavo orale e pertanto la risultante QRC libera precipita a causa di fenomeni di insolubilità (Walle et al., 2005). Inoltre, è stato osservato come l'ambiente fortemente acido del tratto gastrico degradi la struttura chimica della QRC convertendola in acidi fenolici (W. Wang et al., 2016).

1.3.3. Stilbeni

Gli stilbeni costituiscono una classe di polifenoli poco diffusa nel regno animale ma che ha recentemente attratto l'interesse della comunità scientifica per l'ampio spettro di proprietà biologiche che li caratterizza. Dal punto di vista chimico (**Figura 5**) sono caratterizzati dalla presenza di un nucleo 1,2-difeniletilenico e possono essere suddivisi in due sottoclassi: stilbeni oligomerici e monomerici.

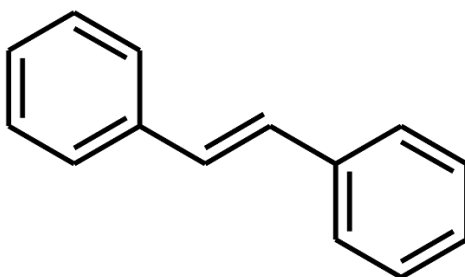


Figura 5: Struttura chimica generale degli stilbeni

Se comparati ad altre famiglie di polifenoli ritenute quantitativamente più rappresentative, quali gli antociani e i flavonoli, la loro distribuzione nelle fonti alimentari è piuttosto scarsa ed è pertanto difficile stimare la quantità di assunzione giornaliera di questa classe di sostanze. Inoltre, l'analisi quali-quantitativa degli stilbeni è limitata alle forme più semplici (come resveratrolo e suoi derivati glicosidici) per mancanza di standard o per limiti di detectabilità (Rivière et al., 2012). È necessario sottolineare, inoltre, l'estrema variabilità del contenuto di stilbeni nel singolo *cultivar* dovuta all'influenza di fattori genetici e ambientali, nonché alle pratiche di lavorazione del prodotto alimentare. D'altro canto, molte piante ricche di questi polifenoli sono raramente consumate o sono localizzate in aree specifiche. Per fare un esempio, il *Polygonum cuspidate*, una pianta erbacea originaria dell'Asia orientale, viene usata in Europa come fonte primaria di Resveratrolo (ottenuto tramite estrazione) mentre nei Paesi asiatici è comunemente utilizzata come nutraceutico. Per questi motivi negli ultimi anni sono state proposte diverse strategie biosintetiche, tuttavia, a causa della loro complessa struttura molecolare solo pochi stilbeni sono attualmente sintetizzabili *in vitro* (T. Shen et al., 2009).

1.3.3.1. Il Resveratrolo (RSV)

Il Resveratrolo (RSV) o *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene, (**Figura 6. A**) è uno stilbene che può fungere da fitoalessina, ossia sostanze con natura antimicrobica prodotte dalle piante in seguito ad infezioni microbiche, presente in molteplici fonti alimentari quali l'uva rossa, le bacche e le arachidi e sintetizzato dalle piante in risposta a stimoli esterni principalmente dovuti alle infezioni microbiche (Ding et al., 2013). Dal punto di vista chimico, il RSV esiste in due forme isomeriche *cis* e *trans*, ma solo quest'ultima è biologicamente attiva. L'isomerizzazione (che comporta un'inattivazione) è il risultato di vari fenomeni (quali l'irraggiamento UV ed esposizione a determinati pH) che si verificano, ad esempio, durante la fermentazione del mosto d'uva. Il RSV è una molecola poco solubile in acqua, soprattutto a valori di pH alcalini. Inoltre, il RSV nella forma *trans* possiede una scarsa stabilità in soluzioni a pH>7. È stato dimostrato che in soluzioni tampone a pH 7.4 la solubilità del *trans*-resveratrolo è di circa il 14% inferiore rispetto a quella in soluzioni fortemente o debolmente acide (pH 1.2 o 6) (Zupančič et al., 2015). Come spesso accade, anche il RSV in natura si trova spesso coniugato con uno zucchero. In tal senso il derivato glicosidato più importante è la Polidatina (**Figura 6. B**) la quale, grazie alla presenza della porzione zuccherina, risulta più solubile in ambiente acquoso, senza che però vengano intaccate o ridotte le proprietà benefiche del RSV (Du et al., 2013).

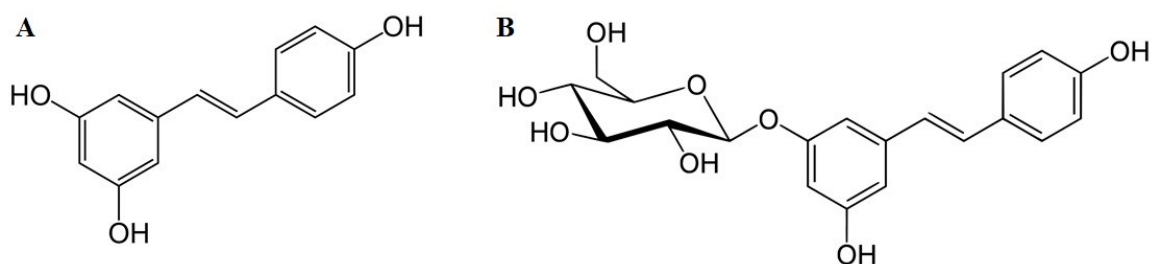


Figura 6: Struttura chimica del Resveratrolo (A) e Polidatina (B)

Il RSV è il polifenolo naturale maggiormente studiato nell'ultimo ventennio grazie alle numerose proprietà benefiche che esercita sulla salute dell'uomo. Oltre a possedere attività antiossidante e antiinfiammatoria (Colica et al., 2018; De Sá Coutinho et al., 2018), il RSV è ampiamente utilizzato come sostanza funzionale in ambito cosmetico come agente *anti-aging* poiché è in grado di ridurre lo stress ossidativo e regolare il pathway SIRT1 fortemente correlato alla capacità delle cellule di resistere all'attacco dei radicali liberi (J. Li et al., 2017). È inoltre un fitoestrogeno in quanto strutturalmente analogo al dietilstilbenstrolo, un estrogeno sintetico, ed è, pertanto in grado di legarsi ai recettori estrogenici sia come agonista che come antagonista regolando la trascrizione dei geni responsivi agli estrogeni e prevenendo le patologie legate all'età come l'osteoporosi (Ruivo et al., 2015). Inoltre, sono state ampiamente dimostrate sia *in vitro* che *in vivo* le sue proprietà osteoinduttive legate al riconoscimento ed all'interazione con i recettori per gli estrogeni che comportano una stimolazione diretta e indiretta dell'espressione di fattori di trascrizione come il RUNX2 e la Fosfatasi alcalina (ALP), usata come marker clinico per verificare la formazione del tessuto osseo.

Queste proprietà concorrono a candidare il RSV come un valido agente terapeutico in medicina rigenerativa per il trattamento dei pazienti edentuli o con impianti dentali e per coloro che soffrono di riassorbimento osseo periodontale causato da radioterapia o terapia farmacologica (Murgia et al., 2019). Le capacità *scavenger* e antiossidanti del RSV sono importanti anche nel prevenire problematiche cardiovascolari. Infatti, questo stilbene è in parte responsabile di quello che viene comunemente conosciuto come “paradosso francese” che spiega come un consumo costante di vino rosso sia in grado di ridurre l’incidenza di patologie cardiovascolari nonostante si segua una dieta ricca di grassi. Questo è dovuto anche alla capacità del RSV di modulare il metabolismo lipidico proteggendo le lipoproteine dallo stress ossidativo ed inibendo l’attivazione e l’aggregazione piastrinica (Catalgol et al., 2012; De La Lastra & Villegas, 2005). È necessario sottolineare che l’interesse della comunità scientifica nei confronti di questo stilbene è notevolmente cresciuta negli ultimi anni soprattutto per le sue possibili applicazioni nel trattamento di vari tipi di tumore. Sebbene il reale ruolo chemopreventivo del RSV sia ancora poco chiaro, sono stati comunque proposti diversi meccanismi per descrivere le proprietà antitumorali del RSV. In particolare, è stato osservato che il RSV agisce inducendo l’apoptosi delle cellule tumorali mediante l’attivazione di molteplici vie che regolano la morte e la sopravvivenza cellulare regolando l’espressione di fattori quali le proteine chinasi attivate da mitogeno (MAPK) o la proteina p53 (Udenigwe et al., 2008). L’effetto chemiopreventivo del RSV può essere attribuibile alle sue capacità di ridurre l’attitudine delle cellule tumorali a metastatizzare inibendo l’espressione genica delle metalloproteinasi (MMP-2 e MMP-9) e bloccando l’espressione del fattore di crescita dell’endotelio vascolare (VEGF) che induce la formazione di nuovi vasi sanguigni specifici per la crescita tumorale (Da Costa et al., 2017). Queste interessanti proprietà antitumorali sono state comprovate anche sia *in vitro* che *in vivo* in linee cellulari e modelli animali associati all’OSCC nei quali è emerso possedere citotossicità dose-dipendente selettiva, ma anche effetti pro-apoptotici, antiproliferativi e antimetastatici (Chang et al., 2021; Uzawa et al., 2019).

A discapito di tutti questi promettenti effetti benefici per la salute, la somministrazione orale di RSV comporta bassa biodisponibilità. In particolare, una volta raggiunto l’intestino il RSV viene massivamente assorbito dalle mucose intestinali (circa il 75% della dose) mediante diffusione passiva o trasporto mediato da proteine. Tuttavia, una volta assorbito subisce un primo metabolismo da parte degli enzimi intestinali ma soprattutto un estensivo metabolismo di primo passaggio epatico con conseguente riduzione della biodisponibilità fino a meno dell’1%. Il RSV biodisponibile risulta in genere sotto forma di coniugato con l’acido glucuronico o con gruppi solfato. In particolare, la glucuronazione sembra proteggere il RSV dai processi di degradazione chimica e consente, quindi, all’attivo di raggiungere organi e tessuti dove una volta idrolizzato dalle glucoronidasi viene riattivato e può, così, esplicare le sue funzioni biologiche (King et al., 2006). La forma libera del RSV biodisponibile si trova, invece, legata all’albumina ed alle lipoproteine. Queste ultime in corrispondenza delle membrane cellulari si legano ai propri recettori e rilasciando il RSV libero direttamente all’interno delle cellule (Latruffe et al., 2014).

1.3.4. Tannini

I Tannini sono un gruppo di polifenoli di peso molecolare compreso tra 500 e 3000 Da che possono essere suddivisi in idrolizzabili e non idrolizzabili. I primi sono costituiti da un legame con il glucosio o un gruppo ossidrilico che li rendono facilmente esterificabili con gli acidi fenolici (es. acido gallico) e sono quelli che hanno interessato maggiormente la comunità scientifica. Si trovano comunemente nei frutti, foglie e semi di piante facenti parte della famiglia delle *Leguminosae*, *Fabaceae*, *Combretaceae* e *Anacardiaceae* (Oluwole et al., 2022). Alcuni composti come gli Ellagitannini possiedono attività antimicrobica contro *Stafilococchi* e *Candida albicans*, infatti, è stato provato che il consumo di bacche nordiche, ricche di questi tannini, ha un effetto inibitorio verso una serie di infezioni batteriche nell'essere umano (Puupponen-Pimiä et al., 2005). Tra i tannini le Procianidine sono i derivati idrolizzabili maggiormente studiati, grazie alle loro attività antimicrobiche (Serrano et al., 2009) ma soprattutto per la capacità di ritardare l'assorbimento del glucosio a livello intestinale. Questo effetto legato alle caratteristiche insulino-mimetiche delle procianidine, le quali agiscono sia sul controllo positivo dell'espressione della proteina insulinica che direttamente legandosi ai recettori cellulari che favoriscono l'espressione della GLUT-4, rendono questi tannini degli interessanti componenti per il trattamento del diabete mellito e delle sindromi insulino-resistenti (Ma & Zhang, 2017).

1.3.5 Lignani

I Lignani sono una classe di polifenoli spesso associata ai componenti fibrosi delle piante. Sono chimicamente costituiti da un core 1,4-diarilbutanico e si ottengono attraverso la via biosintetica *Shikage*. Fino a 30 anni fa si credeva che i lignani fossero prodotti esclusivamente dal regno animale, ma ulteriori studi hanno dimostrato come anche i microorganismi che vivono in simbiosi con gli esseri umani e animali producono questi polifenoli (Yeung et al., 2020). Il consumo giornaliero di lignani è strettamente associato alla dieta condotta dal singolo individuo ed è maggiore nei paesi europei rispetto a quelli asiatici. I lignani comunemente presenti nelle fonti alimentari sono i secoisolariciresinoli, lariciresinoli, matairesinoli e medioresinoli (Durazzo et al., 2019). Alcuni lignani come il matairesinolo e il lariciresinolo hanno mostrato interessanti attività chemopreventiva contro l'incidenza del cancro al seno nelle donne durante la menopausa. Questa attività sembra essere correlata alla loro capacità di agire come modulatori ormonali inibendo sia la proliferazione tumorale che l'eventuale metastasi (S. F. De Silva & Alcorn, 2019). Inoltre, possiedono attività antiinfiammatoria inibendo l'espressione del fattore NF-KB coinvolto nella regolazione delle citochine pro-infiammatorie nelle cellule umane (Rodríguez-García et al., 2019). Come i tannini, anche i lignani possiedono attività antibatterica contro ceppi Gram-positivi alterando il metabolismo microbico, ostacolando l'espressione di proteine nella parete cellulare ed inibendo la formazione di biofilm (Álvarez-Martínez et al., 2020).

1.3.6 Curcuminoidi

I Curcuminoidi sono un gruppo di polifenoli presenti nel rizoma della *Curcuma longa* una pianta appartenente alla famiglia delle *Zingiberaceae* usata per centinaia di anni non solo come principale ingrediente della cucina indiana, conosciuta infatti con il nome di “zafferano delle indie”, ma anche come alternativa alla medicina tradizionale per il trattamento delle ferite, per la riduzione del dolore e come agente antibatterico (Gupta et al., 2013).

Utilizzando diverse tecniche estrattive ed analisi cromatografiche è stato possibile identificare circa 235 componenti diversi contenuti all'interno di questo rizoma, tra i quali ritroviamo 109 sesquiterpeni, 68 monoterpeni e 3 curcuminoidi. Di questi ultimi riconosciamo la Curcumina, la Demetossicurcumina e la bis-Demetossicurcumina, inoltre è presente anche una quarta molecola chiamata Ciclocurcumina che inizialmente è stata identificata come curcuminoidi ma successivamente considerata solo un isomero strutturale della curcumina (Mukherjee et al., 2021). Tipicamente, e in base al tipo di *cultivar*, il contenuto percentuale di curcuminoidi nella pianta è compreso tra il 2 ed il 9% ed il metodo convenzionale attualmente utilizzato per estrarli consiste in una estrazione solido-liquido, in cui quest'ultimo viene a sua volta fatto passare attraverso una colonna cromatografica per separare i curcuminoidi dalle altre sostanze (Tripathy et al., 2021). Un'altra tecnica recentemente utilizzata descrive un metodo estrattivo più efficace mediante l'utilizzo di ultrasonicazione seguito da trattamento con microonde. Ogni curcuminoidi è costituito da due anelli orto-metossifenolici, eccetto la bis-demetossicurcumina che ne ha solo uno, legati tra loro con un ponte a 7 atomi di carbonio contenente gruppi β -dichetonici α,β -insaturi (Figura 7).

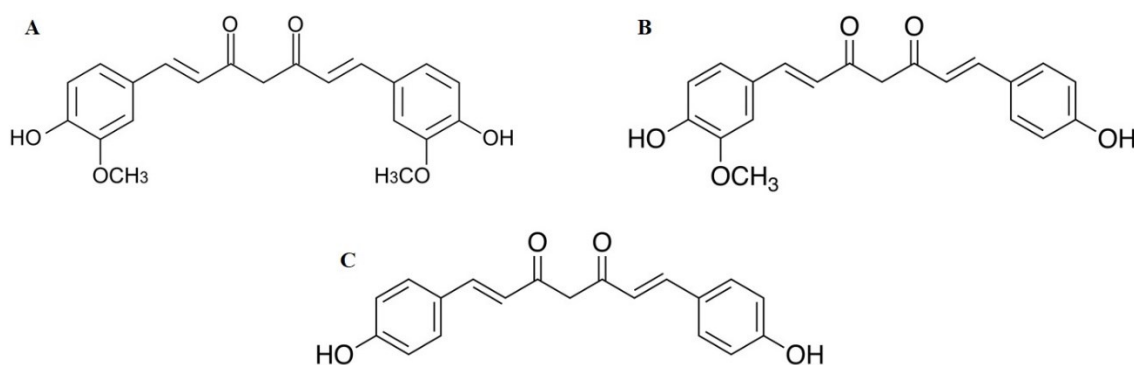


Figura 7: Struttura chimica della Curcumina (A), Demetossicurcumina (B) e Bis-Demetossicurcumina (C)

La presenza di questo ponte è una caratteristica univoca dei curcuminoidi e permette loro di esistere in forma chetonica od enolica in funzione del pH ed è il gruppo funzionale che ne determina le attività biologiche (Indira Priyadarsini, 2013). Nello specifico, quando il pH è compreso tra 3 e 7 la forma predominante è quella chetonica mentre a pH alcalini predomina quella enolica. È molto importante per le proprietà chimico-fisiche ed antiossidanti dei curcuminoidi questo equilibrio cheto-enolico, infatti, considerando la Curcumina quando si trova nella sua forma enolica entrambi gli anelli aromatici possono interagire delocalizzando gli elettroni presenti negli orbitali π . A causa dei vincoli strutturali determinati dalla struttura chimica della molecola, per far sì che possa avvenire la delocalizzazione degli elettroni i due anelli fenolici devono trovarsi sullo stesso piano facendo sì che l'intera molecola assuma una struttura planare. Questo rende i curcuminoidi delle sostanze in grado di stabilizzare fortemente la formazione di radicali liberi conferendo a questa classe di composti spiccate proprietà antiossidanti e *scavenger* (Mondal et al., 2016).

1.3.6.1 Curcumina (CUR)

La Curcumina (CUR) o [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] è il curcuminoide di maggiore interesse tra quelli presenti all'interno del rizoma della *Curcuma longa*. È una sostanza con un elevato punto di fusione (183°C) praticamente insolubile in acqua a qualsiasi valore di pH ma solubile in solventi organici sia polari che apolari così come in solventi estremamente acidi come l'acido acetico glaciale. Inoltre, in ambienti acquosi neutri/alcalini, così come quando esposta alle radiazioni UV ed a temperature superiori a 70°C, subisce un rapido processo di degradazione chimica (Tønnesen et al., 2002). La CUR viene ottenuta per estrazione insieme agli altri due curcuminoidi, ma è necessario sottolineare il lavoro pubblicato da Pabon *et al.* nel quale viene per la prima volta descritto un metodo per ottenerla sinteticamente (Pabon, 1964). La CUR è una sostanza ben nota per le sue proprietà antiossidanti determinate dalla presenza dell'idrogeno appartenente al gruppo fenolico e dal gruppo metilenico centrale. Infatti, perdendo un protone si forma un radicale fenossilico facilmente delocalizzabile all'interno della molecola. Vista la struttura, il radicale può originarsi anche a partire dal gruppo metilenico centrale. Tuttavia, nonostante il radicale fenossilico sia più stabile di quello metilenico, dati sperimentali suggeriscono che entrambi contribuiscono all'attività biologica della CUR. Inoltre, grazie alla presenza dei due gruppi metossilici possiede un potere antiossidante superiore rispetto agli altri curcuminoidi. Alla luce della complessa struttura altamente coniugata, questo polifenolo agisce come un potente *scavenger* dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS), inclusi quelli idrossilici, perossidici e dell'anione superossido, prevenendo in questo modo il danno alle macromolecole presenti nei tessuti ed all'interno delle cellule (Karthikeyan et al., 2020). La CUR possiede di conseguenza proprietà antinfiammatorie, strettamente legate alla sua capacità di ridurre la quantità di radicali liberi o ROS che si originano in risposta ad uno stimolo infiammatorio, ma è stato dimostrato che è anche in grado di inibire l'espressione di una citochina specifica, il fattore nucleare NF- κ B, che dà origine alla cascata infiammatoria (Panahi et al., 2016). Dal punto di vista farmacologico, negli ultimi anni, sono stati condotti studi che ne hanno proposto una possibile applicazione nel trattamento di varie patologie e disturbi nell'essere umano. In particolare, data la natura polifenolica, è stata dimostrata l'attività antitumorale nei confronti del cancro al colon (Carroll et al., 2011), al fegato (J. Wang et al., 2018) ed alla prostata (Choi et al., 2019). Inoltre, uno studio condotto in doppio cieco su pazienti affetti da Leucoplachia orale, uno dei più aggressivi tumori del cavo orale, ha dimostrato che la costante somministrazione di CUR era in grado di ridurre la dimensione della massa tumorale rispetto al gruppo trattato con placebo (Kuriakose et al., 2016). Numerosi studi hanno dimostrato un effetto neuroprotettivo della CUR in pazienti affetti da depressione maggiore, Sclerosi laterale amiotrofica, schizofrenia ed Alzheimer. Questo effetto può essere giustificato dalle proprietà antiossidanti ed antiinfiammatorie della molecola, la quale protegge dallo stress ossidativo il tessuto neuronale rallentando il progredire della patologia (Mukherjee et al., 2021). Tra le molecole di natura polifenolica la CUR è tra quelle più utilizzate nella medicina rigenerativa. In particolare, è stato dimostrato che è in grado di accelerare il processo di rigenerazione del tessuto cutaneo, se applicata localmente, agendo contemporaneamente su più livelli, da una parte up-regolando i pathways che controllano la sintesi di collagene e dall'altra riducendo significativamente l'espressione delle

metalloproteinasi (Yen et al., 2018). Un altro lavoro ha studiato gli effetti della CUR applicata topicamente su ustioni di secondo grado in un modello animale. Dai risultati è emerso che il gruppo trattato con CUR mostrava una maggiore deposizione di collagene, angiogenesi, formazione di tessuto di granulazione ed epitelizzazione rispetto a quello che aveva ricevuto il placebo (Kulac et al., 2013). È stato, inoltre, dimostrato che la CUR ha un effetto osteoinduttivo e osteoprotettivo in animali affetti da diabete mellito tipo-2, agendo sia direttamente sulla proliferazione osteoblastica che indirettamente modulando positivamente l'espressione dei geni legati all'osteogenesi (He et al., 2020). A causa della sua scarsa solubilità in acqua, e quindi nei fluidi fisiologici, la CUR soffre di una scarsa biodisponibilità quando somministrata per via orale, inoltre in ambienti neutri e debolmente alcalini, come quelli presenti nel tratto intestinale, va velocemente incontro a processi di degradazione chimica che la convertono in vari prodotti quali l'aldeide ferulica, l'acido ferulico, la vanillina, ecc. Tuttavia, è stato ipotizzato che l'effetto benefico di questa sostanza nel trattamento di varie patologie come il morbo di Alzheimer ed il cancro sia legato più ai prodotti di degradazione che alla CUR stessa. Infatti, la CUR agisce modulando l'attività di alcuni enzimi la cui tasca di legame non è compatibile con la molecola in quanto tale, suggerendo che siano i suoi prodotti di degradazione *in vivo* a svolgere l'effetto bioattivo (L. Shen & Ji, 2012).

1.4 Strategie per la veicolazione di polifenoli

I molteplici effetti dei polifenoli sono strettamente legati alla loro integrità chimico-fisica ed alla loro biodisponibilità una volta somministrati. Tutti i composti polifenolici sono suscettibili ai fattori ambientali come le radiazioni ultraviolette, le alte temperature ed il pH che ne favoriscono l'ossidazione o l'idrolisi convertendoli in molecole biologicamente meno attive. Diventa pertanto estremamente rilevante la ricerca di nuovi approcci per stabilizzare e proteggere i polifenoli dalla degradazione e conseguenzialmente aumentarne la biodisponibilità. Per superare i problemi legati alla scarsa stabilità dei polifenoli, negli anni, sono state proposte diverse strategie, tra le quali l'incapsulazione sembra essere quella più promettente. Per incapsulazione si intende la possibilità di intrappolare particelle solide o liquide di principio attivo all'interno di un sistema strutturato, detto *carrier*, che ne controlla il rilascio in funzione delle condizioni ambientali (Desai & Park, 2007). In questo modo si possono ottenere sistemi dove la sostanza di interesse si trova omogeneamente dispersa in un sistema matriciale solido, o avvolta da un rivestimento polimerico che la separa dall'ambiente esterno. Inoltre, il *carrier* può essere in grado di veicolare il principio attivo nel sito di interesse e, una volta raggiunto, di rilasciarla affinché possa svolgere le sue funzioni bioattive. Con questa tecnica si possono ottenere micro e nanocapsule/nanoparticelle in funzione del metodo di preparazione. Le micro- e nanocapsule sono caratterizzate da un core solido, liquido o semisolido, dove è contenuta la sostanza funzionale, avvolto da una membrana polimerica più o meno stratificata, mentre nelle micro e/o nanoparticelle la sostanza funzionale si trova omogeneamente distribuita in tutta la massa matriciale che costituisce la particella.

Per microsistemi si intendono quelle particelle o capsule il cui diametro è compreso tra 0.7 e 700 micrometri, mentre per valori da 700 nm fino a dimensioni sub-nanometriche (0.5 nm) si parla di sistemi nanometrici. Sia i sistemi micro che nano possono essere costituiti da materiali di natura polimerica (sintetica o naturale) e lipidica. Tra i *carrier* di natura polimerica si ritrovano: micro e nanoparticelle (o capsule), dendrimeri e micelle; mentre tra quelli di natura lipidica: liposomi, micro e nanoparticelle lipidiche solide. La maggior parte dei *carrier* appena elencati sono sistemi dispersi e, in quanto tali, soffrono di fenomeni di instabilità fisica, oltre ad essere difficili da maneggiare e di conseguenza da somministrare. Per superare tali inconvenienti generalmente vengono essiccati (solitamente tramite liofilizzazione) per ottenere una polvere facilmente dosabile e più stabile. La polvere così ottenuta può essere utilizzata come tale o può essere utilizzata quale intermedio per la preparazione di sistemi complessi (nanocompositi) di tipo matriciale.

Una ulteriore strategia per veicolare i polifenoli potrebbe essere rappresentata dagli scaffold. Si tratta di sistemi solidi reticolati, spesso utilizzati nella medicina rigenerativa che, grazie alla loro struttura porosa tridimensionale, favoriscono l'attecchimento e la moltiplicazione cellulare. Gli scaffold potrebbero avvalersi con successo della presenza dei polifenoli nella loro composizione per migliorare le proprietà rigenerative dei tessuti.

1.4.1 Micro e nano particelle polimeriche

Le particelle di natura polimerica sono le tipologie di *carrier* maggiormente utilizzate in ambito farmaceutico, cosmetico e dell'industria alimentare poiché sono sistemi molto versatili. Le caratteristiche di tali sistemi sono determinate principalmente dalle proprietà chimico-fisiche e meccaniche del materiale polimerico impiegato per la loro preparazione e dalle tecnologie di formulazione. I polimeri usati nella loro preparazione possono essere naturali, sintetici o semisintetici. Tra i polimeri aventi caratteristiche ottimali per la veicolazione di farmaci ritroviamo quelli di origine naturale come il chitosano, la gelatina e l'albumina. Tuttavia, i polimeri sintetici sono quelli principalmente utilizzati per la loro versatilità e la facilità di preparazione. Tra questi ritroviamo i polietilenglicoli, i polivinilpirrolidoni ed i poliesteri. Quest'ultimo gruppo è rappresentato da polilattidi, poliglicolidi, polilattidi-co-glicolidi, e policaprolattoni che sono polimeri largamente usati nella formulazione di *carriers micro e nanometrici*, grazie alla loro biocompatibilità, tanto da essere già approvati dalla FDA per la somministrazione parenterale (Alexis et al., 2010). La biocompatibilità dei poliesteri è determinata da un'importante caratteristica dovuta alla capacità, una volta messi a contatto con l'ambiente acquoso, o mediante l'attività di enzimi idrolitici, di subire fenomeni di degradazione della loro struttura polimerica che porta a prodotti innocui o addirittura fisiologici. La loro degradazione può avvenire superficialmente o all'interno. Nel caso di una degradazione superficiale si parla di erosione, ed il materiale polimerico viene rapidamente eliminato dalla superficie della particella lasciando la forma della stessa costante. Nel secondo caso, la particella è in grado di richiamare acqua al suo interno dove avvengono i fenomeni di idrolisi, dal punto di vista morfologico non si apprezzano cambiamenti fino a quando il processo di degradazione non è esaustivo e si osserva il collassamento della particella. I fenomeni solitamente avvengono contemporaneamente ma uno prevale sempre sull'altro e questo dipende dalla velocità con il quale il solvente acquoso penetra all'interno del sistema matriciale polimerico (Stevanović et al., 2009). Il bilancio tra il contributo erosivo e dissolutivo dell'acqua sulla particella determina il meccanismo con il quale quest'ultima rilascia il principio attivo incapsulato. Per questo motivo diventa fondamentale conoscere bene il comportamento del polimero quando interagisce con i fluidi fisiologici. Un'estremizzazione di questo concetto è identificabile nei *carriers* costituiti da polimeri sensibili agli stimoli ambientali come il pH, la temperatura, la luce o agli enzimi. Queste strategie sono principalmente utilizzate per la veicolazione di farmaci antitumorali, caratterizzati da un basso indice terapeutico, i quali vengono così rilasciati in maniera selettiva nel microambiente tumorale, generalmente caratterizzato da condizioni differenti rispetto a quelle fisiologiche. Per fare un esempio il pH del sangue e dei tessuti è circa 7.4 (con possibili variazioni in funzione del metabolismo cellulare o di uno stato infiammatorio) mentre nei tessuti tumorali il pH è acido, con valori che vanno da 6.8 a 4.5 a causa delle costanti condizioni di ipossia (J. Gu et al., 2008). Quindi si utilizzano polimeri sensibili al pH, come i polimetacrilati, che possiedono dei gruppi funzionali ionizzabili, i quali a pH fisiologico sono neutri, e mantengono la struttura ordinata, mentre si ionizzano una volta raggiunto l'ambiente tumorale. Questo fa sì che le forze repulsive delle cariche formatesi costringono la struttura polimerica a destabilizzarsi aumentando la permeabilità al farmaco. In alcuni casi, il rilascio del farmaco può essere controllato dall'erosione del *carrier* a base di polimeri che a pH acidi si idrolizzano (Y. Li

et al., 2013) poiché costituiti da legami acetale, idrazone od imminici i quali sono fortemente sensibili all'idrolisi ad un pH compreso tra 5 e 7.

1.4.2 Dendrimeri

I dendrimeri sono una nuova classe di composti polimerici di sintesi considerati una evoluzione dei tradizionali polimeri lineari. Sono caratterizzati da una struttura altamente ramificata avente un'architettura tridimensionale che si origina dall'interazione di tre componenti principali: un nucleo (detto iniziatore), uno strato interno, che comprende più unità ripetitive collegato radialmente al nucleo e infine i gruppi funzionali legati alla struttura più esterna che vanno a determinare le caratteristiche del dendrimero (**Figura 8**).

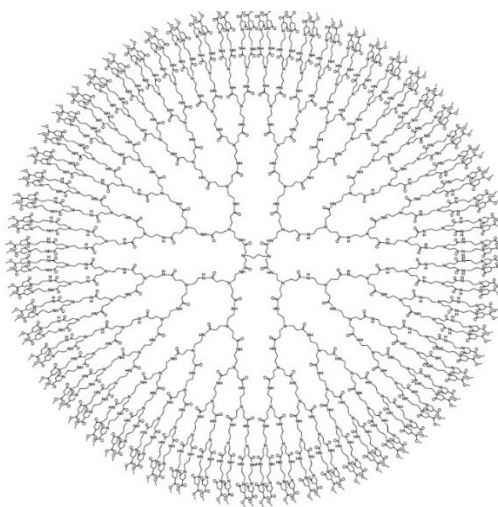


Figura 8: Struttura chimica generale di un dendrimero
(<https://www.ncl.ac.uk/press/articles/latest/2021/08/dendrimers>)

Questi gruppi, infatti, possono essere neutri o ionizzabili e quindi facilmente modificabili per la veicolazione di farmaci o per la terapia genica, poiché i dendrimeri che esprimono gruppi funzionali cationici possono interagire con le cariche negative delle membrane cellulari e nucleari ed essere internalizzate. La regione più vicina al core centrale è caratterizzata da una maggiore porosità rispetto a quella periferica ed è proprio qui che vengono caricati i farmaci che si desidera veicolare. La presenza di cavità, così come il meccanismo di rilascio dell'attivo in esse caricato, è strettamente correlato allo stato conformazionale del dendrimero, che a sua volta dipende da condizioni ambientali esterne (pH o tipo di solvente) ed interne, quali la lunghezza del segmento ramificato, le dimensioni del nucleo centrale e la quantità di ramificazioni (Devarakonda et al., 2004). Il primo dendrimero ad essere sintetizzato è stato ottenuto facendo reagire un'etilendiammina con acetato di metile ottenendo sistemi conosciuti come poliamidoammin- (PAMAM) dendrimeri che appartengono alla prima generazione. Recentemente, i dendrimeri vengono sintetizzati attraverso due meccanismi principali. Il primo, chiamato approccio divergente, dove la sintesi avviene a partire dal core che funge da centro focale per le successive ramificazioni, mentre il secondo, detto approccio convergente, comincia dalla parte periferica della struttura procedendo verso l'interno. Per quest'ultima via, il numero di ramificazioni finali deve essere predeterminato, permettendo di controllare la dimensione e

la struttura del dendrimero (Grayson & Fréchet, 2001). L'applicazione di questi sistemi come *carrier* per la veicolazione di farmaci sta aumentando notevolmente negli ultimi anni soprattutto per la loro capacità di aumentare il tempo di permanenza degli attivi nel circolo sistemico, proteggendoli dalla degradazione chimica ed enzimatica. Inoltre, grazie alla facilità con la quale i gruppi funzionali periferici possono essere modificati è possibile legare o altre catene polimeriche, come per esempio Poliossietilene (PEG), creando così un sistema *stealth* per sfuggire al riconoscimento del sistema immunitario e quindi dall'attacco dei macrofagi, oppure un direzionante, cioè un gruppo funzionale in grado di legarsi selettivamente ad uno specifico recettore target, incrementando notevolmente la capacità di veicolare la sostanza attiva nel sito d'azione (Markowicz-Piasecka & Mikiciuk-Olasik, 2016).

1.4.3 Micelle

Le micelle sono sistemi nanometrici caratterizzati da una struttura *core-shell* che si origina dalla capacità dei copolimeri anfifilici di autoassemblarsi quando si trovano in soluzioni acquose. Quando presenti in soluzione a concentrazione molto diluita esistono come unimeri anfifilici che agiscono come tensioattivi riducendo la tensione interfacciale, che permette loro di essere utilizzati come componenti per la realizzazione di nanoemulsioni o di altri sistemi *carrier* nanometrici. Quando la concentrazione degli unimeri aumenta questi spontaneamente si aggregano formando micelle (**Figura 9**).

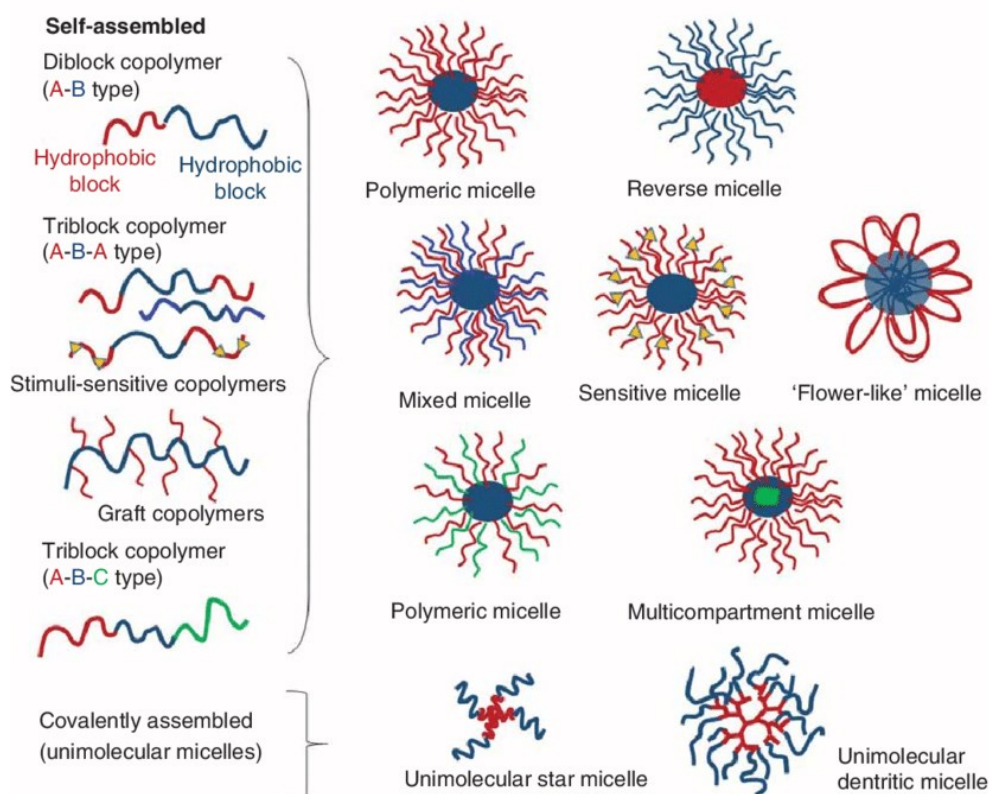


Figura 9: Rappresentazione grafica delle tipologie di micelle polimeriche generalmente utilizzate come *carrier* di sostanze funzionali (Simões et al., 2015)

Questo punto è chiamato concentrazione micellare critica (CMC) o concentrazione critica di associazione (CAC) definiti come concentrazione minima di unimeri che dispersi in

soluzione si associano in micelle. I valori di CMC o CAC sono parametri molto importanti per conoscere la stabilità termodinamica delle micelle; infatti, più è basso questo valore più le micelle possono essere diluite senza incorrere nel loro disassemblaggio. Inoltre, sopra questi valori si assiste ad un equilibrio dinamico e caratterizzato da un continuo scambio tra gli unimeri disposti a formare le micelle e quelli liberi (Owen et al., 2012). In particolare, micelle preparate con unimeri (molecole) a basso peso molecolare si disassemblano molto più velocemente di quelle ottenute con polimeri, i quali mantengono la loro struttura per più tempo. La maggiore stabilità termodinamica insieme alla bassa tossicità rendono le micelle di natura polimerica preferibili a quelle costituite da tensioattivi a basso peso molecolare. I polimeri maggiormente utilizzati sono copolimeri a blocco con caratteristiche anfifiliche, ovvero caratterizzate da una porzione polare ed affine al solvente acquoso ed una apolare. Tra questi troviamo i polistireni legati ai polietilenglicoli ed i Pluronic cioè polimeri tri-blocco costituiti da due porzioni polietilenglicoliche legate tra loro da una porzione polioossipropilenica, o ancora, polimeri che di natura sono polari (es. chitosano) che vengono modificati chimicamente con gruppi funzionali apolari (Ghezzi et al., 2021). Le sostanze funzionali possono essere caricate all'interno delle micelle durante la loro formazione o successivamente, in base alla tecnica di preparazione ed alle caratteristiche chimico-fisiche dell'attivo. Le micelle sono ampiamente utilizzate come *carrier* per differenti vie di somministrazione, anche se la mancanza di tossicità li rende dei veicoli ottimali per la somministrazione sistemica di farmaci. Tuttavia, essendo dei sistemi termodinamicamente dinamici a seconda della via di somministrazione bisogna tenere in considerazione che le micelle possono essere soggette a stress diversi. Per esempio, dopo somministrazione intravenosa subiscono una repentina diluizione nel torrente ematico che le potrebbe fare disassemblare, o possono interagire con le proteine plasmatiche e le lipoproteine; o quando somministrate attraverso le mucose o la pelle, il muco, così come le componenti lipidiche dei tessuti, possono interagire con la struttura micellare del veicolo. Per questi motivi è necessario conoscere le caratteristiche delle micelle come la dimensione, la stabilità termodinamica, la carica superficiale, ecc. Infatti, gli attivi 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 particolari stimoli ambientali come variazioni di pH e temperatura, nonché dalla diluizione stessa (Han et al., 2015).

1.4.4 Liposomi

I liposomi rientrano nella categoria di micro e nanosistemi di natura lipidica. Sono strutturalmente simili dal punto di vista concettuale ai sistemi micellari, dove però i costituenti sono i fosfolipidi che si associano a formare un doppio strato, o bilayer, esattamente nello stesso modo in cui sono disposti nelle membrane biologiche. Le vescicole che si formano possono avere uno o più bilayer, e ciò determina la presenza di compartimenti acquosi alternati a compartimenti lipofili.

Nelle strutture a doppio strato, i lipidi anfifilici orientano le teste idrofile nelle regioni superficiali a contatto diretto con il solvente polare e le code idrofobe negli strati più interni a costituire una fase idrofobica separata dal solvente polare circostante. Gli strati possono essere concentrici e hanno la capacità di poter inglobare al loro interno principi attivi di natura sia idrofila che idrofoba (P. Liu et al., 2022) (**Figura 10**).

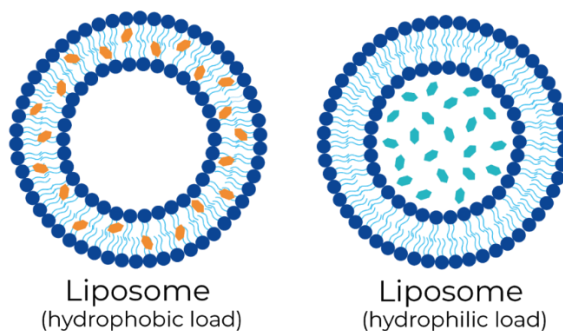


Figura 10: Rappresentazione grafica di un liposoma nel quale è caricato un farmaco lipofilo o idrofilo (<https://www.pharmaexcipients.com/news/cannabinoid-liposome-formulations>)

I liposomi sono classificati in vescicole unilamellari (ULV), vescicole oligolamellari (OLV) e vescicole multilamellari (MLV) in funzione del numero di bilayer concentrici che li costituiscono. Esistono anche un'altra categoria di liposomi quali le vescicole multivescicolari (MMV) che sono caratterizzate dalla presenza di 1 o più bilayers non concentrici ma decentrati. Inoltre, in funzione del diametro delle vescicole i liposomi possono essere ulteriormente suddivisi in *small unilamellar vesicles* (SUV) che sono rappresentati da vescicole unilamellari aventi diametro compreso tra i 30 e i 100 nm, *large unilamellar vesicles* (LUV) anche esse vescicole unilamellari ma con dimensioni superiori ai 100 nm e *giant unilamellar vesicles* (GUV) che invece non rientrano nella categoria dei sistemi nanometrici (diametro superiore ai 1000 nm) (Fan et al., 2021). I componenti principali dei liposomi sono i fosfolipidi, in particolare i glicerolfosfolipidi, seguiti dalla sfingomieline e dal colesterolo. La testa polare dei glicerolfosfolipidi può essere funzionalizzata con gruppi sensibili alle variazioni di pH per migliorare la selettività con i recettori esocellulari o con catene di PEG per conferire proprietà *stealth* (Kohli et al., 2014). La sfingomieline ha una struttura simile ai glicerolfosfolipidi ma al posto del glicerolo si trova la sfingosina, e viene utilizzata per conferire alle vescicole una maggiore stabilità quando somministrate per via intravenosa. Infine, il colesterolo è un componente chiave nella formulazione dei liposomi poiché grazie alla sua natura anfipila ed alle dimensioni relativamente piccole va ad interagire sia con le teste polari che con le code idrofobiche dei fosfolipidi modulandone la fluidità in funzione della temperatura. Appare chiaro quindi che giocando sulla quantità di colesterolo è possibile modulare l'integrità strutturale del liposoma e la velocità con la quale è in grado di rilasciare il principio attivo (Sadeghi et al., 2018). Grazie alla loro struttura e composizione che richiama molto quella delle membrane biologiche, i liposomi sono *carrier* biocompatibili e biodegradabili, motivo per il quale sono stati approvati dall'FDA per la loro applicazione in campo medico, farmaceutico e cosmetico. Tuttavia, soffrono di alcune limitazioni. La prima è che sono poco adatti per la veicolazione di sostanze funzionali lipofile, poiché queste ultime si vanno a ripartire nel doppio strato fosfolipidico, il quale ha un'area totale decisamente piccola se paragonata a quella dell'intero liposoma, limitando la quantità di farmaco caricabile. Un altro problema è dovuto alla scarsa ritenzione dell'attivo una volta incapsulato. Questo fenomeno si può verificare per due cause principali: da una parte la sostanza attiva può nel tempo diffondere fuori dal liposoma, dall'altra può interagire con le lipoproteine (in particolare HDL ed LDL)

perdendo componenti lipidici con conseguente variazione strutturale e rilascio dell'attivo (P. Liu et al., 2022)

1.4.5 Micro e nanoparticelle lipidiche solide

Le microparticelle e le nanoparticelle lipidiche solide sono costituite da una struttura lipidica solida a temperatura ambiente. Dal punto di vista applicativo le nanoparticelle lipidiche sono molto più versatili delle prime e per questo motivo estensivamente studiate. La prima generazione di nanoparticelle lipidiche solide (SLN) è stata formulata intorno alla seconda metà del XX secolo. Esse si presentano come particelle sferiche costituite da una singola tipologia di lipide solido a temperatura ambiente, atossico, biocompatibile e privo di insaturazioni per essere inerte ai fenomeni ossidativi. Il principio attivo viene incapsulato al suo interno durante la fase di preparazione e generalmente deve essere solubile nei lipidi utilizzati, quindi essere apolare (Puri et al., 2009). Non mancano però NLC contenenti attivi polari i quali tuttavia sono caricati in forma solida nelle nanoparticelle, le quali, in questo caso, prendono il nome di nanocapsule lipidiche solide. Le SLN hanno cambiato il modo di intendere le nanoparticelle lipidiche grazie alla loro facilità di preparazione, alla capacità di proteggere i principi attivi dai fenomeni di degradazione e, poiché costituite da lipidi, alla elevata biocompatibilità, biodegradabilità ed affinità con i tessuti biologici. La presenza di un solo tipo di lipide nella composizione è però il limite più evidente delle SLN. Infatti, durante la preparazione delle nanoparticelle, che contempla una prima fase di fusione con conseguente raffreddamento e solidificazione, i lipidi si andranno ad organizzare in strutture simil-cristalline ordinate con pochi spazi disponibili per il caricamento della sostanza funzionale, determinando così una bassa efficienza di incapsulazione (Ghasemiyeh & Mohammadi-Samani, 2018). Inoltre, a causa dei fenomeni di polimorfismo, ai quali sono soggetti i lipidi, nel tempo, durante la conservazione, il lipide passa da una forma metastabile ad alto contenuto energetico ad una più stabile a basso contenuto energetico che contribuisce al fenomeno dello *shrinkage* che consiste nella riduzione del volume della nanoparticella con conseguente espulsione dell'attivo (Tamjidi et al., 2013). Per ovviare a questi problemi, dieci anni dopo sono state formulate le nanoparticelle lipidiche solide, appartenenti alla seconda generazione, conosciute come Carrier Lipidici Nanostrutturati (NLC). Considerate come un'evoluzione delle SLN, queste nuove nanoparticelle sono costituite da un *core* lipidico nel quale sono presenti almeno un lipide solido ed uno liquido, a temperatura ambiente. La presenza di un olio nella composizione gioca un ruolo chiave poiché frapponendosi tra le molecole dei lipidi solidi crea una struttura altamente disordinata, ad alto contenuto energetico che si traduce in una maggiore efficienza di caricamento della sostanza funzionale ma soprattutto nell'annullamento dei fenomeni di polimorfismo che si verificavano nelle SLN (Varshosaz et al., 2010) (**Figura 11**).

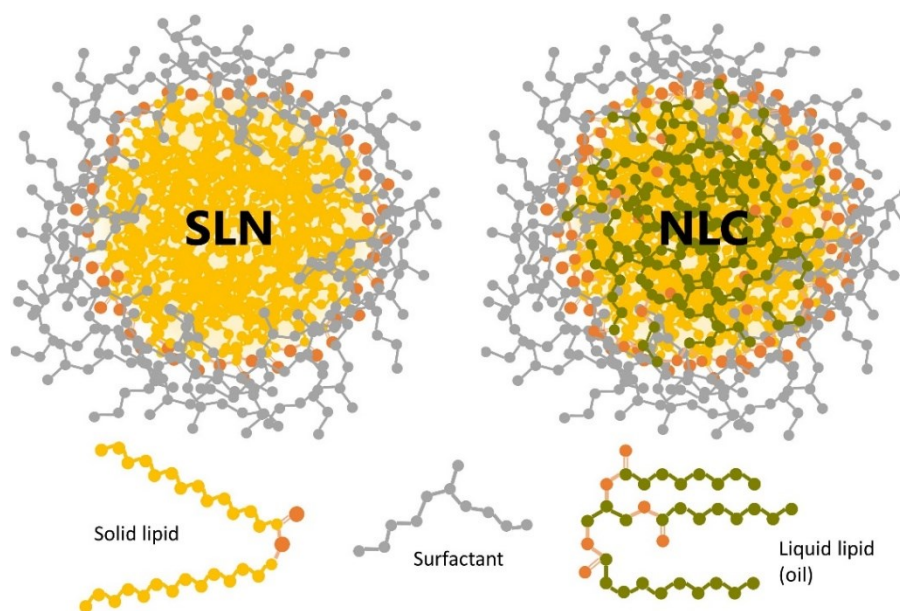


Figura 11: Rappresentazione grafica della struttura delle SLN e delle NLC (Scioli Montoto et al., 2020)

Alla luce di quanto detto le NLC possono essere suddivise in tre diverse tipologie I, II e III. Nel tipo I, detto “imperfetto”, i lipidi solidi e liquidi vengono miscelati (previa fusione dei componenti solidi) creando una struttura lipidica matriciale disordinata dove l’attivo viene incorporato nella sua forma amorfa. Generalmente le sostanze funzionali sono più solubili negli oli piuttosto che nei lipidi solidi e sulla base di questo fondamento sono state proposte nuove NLC con un maggior contenuto di lipide liquido conosciute come “amorfe” o di tipo II. Sorge però un problema, ad alte concentrazioni di olio si ha un problema di miscibilità con il lipide solido durante la fase di raffreddamento, portando ad una separazione di fase; quindi, risulta cruciale trovare il giusto rapporto tra lipide solido e liquido. L’ultima tipologia di NLC detta “multipla” o di tipo III, è un’estremizzazione del tipo II. In questo caso l’olio in elevate quantità viene emulsionato con il lipide solido, forma una struttura di per sé rigida contenente al suo interno globuli di fase liquida nei quali è solubilizzato l’attivo. Queste proprietà rendono praticamente impossibile la perdita di farmaco durante le fasi di stoccaggio ma soprattutto permettono di avere un maggiore controllo nel suo rilascio dopo somministrazione (K & P, 2018; Selvamuthukumar & Velmurugan, 2012). Grazie a queste caratteristiche le NLC sono diventate i sistemi nanoparticellari lipidici maggiormente impiegati in ambito farmaceutico e cosmetico. Tuttavia, vale la pena sottolineare che, essendo fortemente idrofobiche, le NLC in ambienti acquosi sono molto poco idratate o per nulla idratate, e quindi non sono in grado di dissolversi o disperdersi spontaneamente in acqua. Pertanto, la preparazione di queste dispersioni implica necessariamente il trasferimento di energia al sistema, in modo da generare particelle molto piccole, con area superficiale specifica molto elevata. Infatti, per la preparazione delle NLC è fondamentale l’utilizzo di uno o più tensioattivi capaci di abbassare la tensione interfacciale, in modo tale da utilizzare meno energia e stabilizzare le nanoparticelle dopo la preparazione. I tensioattivi adoperati per la preparazione delle NLC sono di tipo non ionico, specificatamente polisorbati e pluronic ad alto valore di HLB. L’utilizzo di tensioattivi non ionici favorisce la stabilità fisica delle nanoparticelle poiché creano un guscio di elettroni in superficie che le stabilizza

stericamente impedendogli di collidere tra loro ed accrescere in dimensione. Le NLC hanno uno spettro di applicazione molto ampio e sono soprattutto impiegate nel trattamento antitumorale, antimicrobico e delle patologie associate al sistema nervoso centrale (Scioli Montoto et al., 2020). E' stato infatti dimostrato che, modificando la superficie delle NLC con specifici ligandi, è possibile aumentare notevolmente l'efficacia di questi sistemi come *carrier*. Per fare un esempio, l'acido folico viene usato come direzionante attivo per il trattamento dei tumori epatici e del tratto gastro-intestinale, poiché tali tessuti esprimono molti recettori per i folati (Holm & Hansen, 2020); o ancora, l'angiopep-2, un peptide che si lega specificatamente ai recettori per le lipoproteine nella barriera ematoencefalica è stato usato come direzionante per favorire il passaggio delle NLC dal torrente ematico al sistema nervoso centrale (Kadari et al., 2018). La versatilità di applicazione delle NLC è direttamente collegata alla possibilità di somministrarle attraverso diverse vie. In particolare, la via percutanea e la via transmucosale sono quelle che possono avvalersi con successo della tecnologia delle NLC. Infatti, sia i tessuti epiteliali della pelle che le mucose di rivestimento, come quelle della cavità orale, sono caratterizzate da regioni intercellulari ricche di lipidi quali colesterolo, acidi grassi e ceramidi che risultano pertanto affini a formulazioni lipofile come le NLC rendendo tali *carriers* di prima scelta per la veicolazione di principi attivi in questi tessuti (Mendes et al., 2013).

1.4.6 Nanocompositi

I nanocompositi sono per definizione dei sistemi solidi composti da diverse fasi, delle quali almeno una deve essere di dimensioni nanometriche. La fase nanometrica può essere rappresentata da nanoparticelle, nanofibre o nanoceramiche. La fase esterna può avere composizione eterogenea e può essere una struttura matriciale. L'inserimento di strutture nanometriche in una matrice fa sì che possano creare tra di essi delle interazioni che migliorano le proprietà meccaniche e strutturali del materiale nel suo complesso (Omanović-Miklićanin et al., 2020). Quest'ultimo può essere di natura non-metallica, metallica e polimerica ed essere utilizzato da solo o con l'aggiunta di un plasticizzante, quali fibre di vetro, fibre organiche o sintetiche. I nanocompositi rappresentano una nuova frontiera per la preparazione di materiali con caratteristiche fisiche e meccaniche peculiari, ed ultimamente vengono utilizzati anche in ambito farmaceutico come *carrier* di principi attivi. I nanocompositi si suddividono in tre gruppi, in funzione del materiale che costituisce la matrice: materiale ceramico, metallico o polimerico. L'uso di ceramiche permette di migliorare la resistenza all'usura, alle temperature ed all'attacco di agenti chimici. Tuttavia, tali materiali soffrono di elevata fragilità agli urti ed alle torsioni che gli impediscono di avere applicazioni industriali. Tali limitazioni possono essere superate inserendo nel materiale ceramico additivi di natura polimerica che ne riducono la fragilità e ne aumentano le proprietà elastiche (Harmer et al., 1992). I nanocompositi di matrice metallica sono materiali multifasici composti da un metallo duttile o una lega rinforzati dall'aggiunta di materiali in dimensione nanometrica. Questi sistemi sono caratterizzati da un'elevata duttilità, tenacia, forza e resistenza alla torsione. Comunemente questi nanocompositi vengono utilizzati nell'industria spaziale, automobilistica e militare (Omanović-Miklićanin et al., 2020). Il gruppo più diffuso di materiali adoperato per la realizzazione di nanocompositi è quello dei polimeri, poiché hanno una vasta gamma di campi di

applicazione: alimentare (packaging), elettronico (componentistica), medico (protesi) e farmaceutico (Drug Delivery Systems). L'uso dei nanocompositi polimerici in medicina è aumentato notevolmente negli ultimi anni anche alla luce di numerosi paper scientifici pubblicati sull'argomento (Feldman, 2016). I polimeri utilizzati possono essere di natura sintetica, semisintetica e naturale (Darekar et al., 2019). L'applicazione più diffusa di questi sistemi è nella medicina rigenerativa, anche odontoiatrica, oltre ad essere utilizzati quali veicoli di farmaci per il trattamento chemioterapico ed antibatterico. In particolare, questi nanocompositi giocano un ruolo molto importante nella rigenerazione tissutale poiché possono essere utilizzati per la preparazione di sistemi simil-scaffold aventi una struttura tridimensionale porosa capace di mimare la matrice extracellulare. Questa caratteristica favorisce l'adesione delle cellule e la loro conseguente proliferazione (Bigdeli et al., 2013). La progettazione di un nanocomposito deve quindi tenere in considerazione diversi fattori quali, il tipo di tessuto bersaglio e le caratteristiche delle cellule che deve accogliere. Per fare un esempio, gli osteoblasti hanno bisogno di una struttura estremamente porosa per poter proliferare e generare nuovo tessuto osseo (Feldman, 2016). Sulla base di quanto accennato, un'altra importante applicazione dei nanocompositi a base polimerica è il loro utilizzo come *carrier* di farmaci. In particolare, lavorando sull'ingegneria del sistema è possibile preparare nanocompositi capaci di controllare la velocità ed il meccanismo di rilascio dei principi attivi. Uno studio ha dimostrato che il diclofenac veicolato attraverso un nanocomposito a base di sodio alginato veniva rilasciato in maniera sostenuta con una velocità 8 volte più lenta rispetto a quando somministrato attraverso le forme di dosaggio convenzionali (J. Zhang et al., 2010). Uno studio di Tomoda *et al* riporta che un nanocomposito costituito da nanoparticelle di acidopolilattico-co-glicolico cariche di Indometacina intrappolate in una matrice di polivinilalcol, somministrato sulla pelle, è stato in grado di far accumulare il farmaco nel tessuto cutaneo e di farlo giungere anche nel circolo sistemico e nel tessuto muscolare quando veniva applicato un campo iontoforetico, ottenendo così un assorbimento transdermico. (Tomoda et al., 2014).

1.4.7 Scaffolds

Gli scaffold sono i pilastri su cui si fonda l'ingegneria tissutale in medicina rigenerativa. Sono strutture tridimensionali utilizzate per riparare o favorire la ricostruzione di tessuti danneggiati nell'organismo. Essendo macrostrutture porose, fungono da scheletro per promuovere l'adesione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule e favoriscono il passaggio di gas e sostanze funzionali necessarie al sostentamento dei tessuti; in questo modo agiscono come matrici extracellulari esogene (Chan & Leong, 2008). Il design di questi sistemi si è notevolmente evoluto negli ultimi anni. Per agire come promotori della rigenerazione tissutale, infatti, gli scaffold devono essere progettati in modo tale da mimare la struttura anatomica e biomeccanica del tessuto in cui vengono applicati, resistendo alle sollecitazioni causate dalla formazione del nuovo tessuto stesso. È stato dimostrato che le caratteristiche meccaniche tessuto-specifiche sono in grado di indirizzare la differenziazione delle cellule mesenchimali in una specifica tipologia cellulare (Engler et al., 2006). Dal momento che gli scaffold vengono impiantati è necessario che siano degradati per essere, nel tempo, riassorbiti dall'organismo. Pertanto, controllare la velocità di degradazione degli scaffold gioca un ruolo chiave nel processo rigenerativo. La degradazione, in funzione del

tipo di materiale con il quale vengono preparati i sistemi, può avvenire superficialmente o dall'intero mediante processi fisici, chimici e biologici. Si utilizzano quindi materiali biodegradabili che subiscono fenomeni idrolitici o vengono metabolizzati dagli enzimi cellulari. In altri casi, tuttavia, è necessario che lo scaffold rimanga permanentemente impiantato nel tessuto e che non subisca fenomeni di degradazione, come nel caso di applicazioni per la rigenerazione guidata della cartilagine nelle articolazioni (Nikolova & Chavali, 2019). I materiali utilizzati per la realizzazione degli scaffold devono essere atossici e biocompatibili, e soprattutto inerti nei confronti del sistema immunitario per evitare fenomeni di rigetto dopo essere stati impiantati. In funzione del tipo di materiale adoperato è possibile classificare gli scaffold in alloplastici, hydrogel e naturali. I primi sono costituiti da una vasta gamma di materiali metallici, bioceramici, vetrosi e polimerici e rappresentano il gruppo più numeroso e versatile di scaffold. Tra i materiali polimerici più usati si ritrovano i derivati acrilici, ottenuti per foto-polimerizzazione, i quali hanno dimostrato possedere ottime proprietà meccaniche in chirurgia ortopedica per la sostituzione totale delle articolazioni (W. Wang & Yeung, 2017), e i polimeri biodegradabili come i poliesteri, che sono preferiti sia per le loro proprietà fisiche (elastici, facilmente lavorabili e termoplastici) che per la loro biocompatibilità e assenza di tossicità (D. C. Chen et al., 2006). Gli hydrogel sono preparati utilizzando polimeri idrofili naturali (gelatina, fibrina, alginato, chitosano, ecc.) o sintetici (PEG, polimetacrilati, poliesteri, ecc.) i quali possiedono reticolazioni intermolecolari di tipo chimico o fisico. Questa caratteristica è fondamentale poiché una volta a contatto con i fluidi fisiologici gli hydrogel richiamano una grossa quantità di acqua rigonfiandosi, pur mantenendo intatta la loro struttura. Gli hydrogel vengono utilizzati nella rigenerazione del tessuto cutaneo, osseo e cartilagineo (Guadalupe et al., 2015). Infine, per arricchire le proprietà dei materiali utilizzati possono essere inserite cellule, fattori di crescita o componenti della matrice extracellulare quali fibre collagene, fibronectina o proteoglicani come l'acido ialuronico che vengono generalmente utilizzati nel trattamento di ferite od ustioni cutanee. Il vantaggio di usare additivi compatibili con la struttura della matrice extracellulare è duplice: da una parte si sostituiscono temporaneamente al tessuto leso e dall'altra stimolano attivamente la proliferazione cellulare (Sudhakar et al., 2022).

1.5 Tecniche di preparazione e caratterizzazione di Drug Delivery Systems

Nella scelta del sistema *carrier* idoneo alla veicolazione di principi attivi bisogna tenere in considerazione anche della tecnica di preparazione del sistema, la quale deve essere scelta in funzione del tipo di materiale adoperato e delle caratteristiche chimico-fisiche dell'attivo. Di seguito sono riportati i più recenti metodi di preparazione.

1.5.1 Spray drying

Lo Spray drying è una tecnica a basso costo, flessibile e scalabile utilizzata per la preparazione di micro e nanoparticelle polimeriche mediante atomizzazione di un solvente acquoso od organico nel quale il principio attivo e gli altri componenti della formulazione possono trovarsi in soluzione o dispersione. Il processo è suddiviso in quattro fasi: preparazione del campione, atomizzazione del liquido in goccioline, essiccazione, e recupero del materiale. Nel dettaglio, per la preparazione del campione è necessario che i componenti polimerici che andranno a costituire la particella finale siano solubili nel solvente scelto e che la sostanza attiva sia omogeneamente dispersa (nel caso in cui si vuole ottenere una capsula) o solubilizzata. Il campione di liquido così ottenuto, attraverso una pompa peristaltica che ne controlla la velocità del flusso, viene condotto ad un atomizzatore, il quale lo scomporrà in goccioline. Esistono tre modelli di atomizzatore classificati in funzione della tipologia di energia utilizzata. Gli atomizzatori rotanti, che utilizzano l'energia centrifuga per produrre le goccioline; gli atomizzatori ad ugello pneumatico, che sfruttano l'aria compressa per creare elevate forze di frizione nel liquido disintegrandolo; gli atomizzatori a pressione, che forzano il liquido a ruotare velocemente all'interno dell'ugello con conseguente comparsa di getti a forma di cono. Quest'ultimi producono delle goccioline di dimensioni meno omogenee e grossolane (Dumoulin & Bimbenet, 1998). A questo punto, le goccioline arrivano nella camera di essiccazione dove una resistenza posta nell'inlet riscalda il flusso di aria (spesso sostituita con gas inerte quale l'azoto) che ne fa velocemente evaporare il solvente e produce le particelle secche, che vengono convogliate in un ciclone. È necessario sottolineare che questa tecnica è idonea anche al trattamento di sostanze termosensibili poiché le goccioline atomizzate presentano un elevato rapporto superficie-volume che si traduce in una veloce evaporazione del solvente. Ne consegue che, anche se durante il processo le goccioline potrebbero essere esposte a temperature elevate, questo tempo di esposizione è estremamente breve da non essere in grado di innescare reazioni di degradazione. Infine, le particelle solide si depositano in un pallone di raccolta, mentre i vapori del solvente evaporato passano attraverso dei filtri e vengono ricondensati. Questo processo è economicamente vantaggioso poiché il solvente recuperato è puro e può essere riutilizzato (Sosnik & Seremeta, 2015) (**Figura 12**).



Figura 12: Immagine di un mini Spray Dried Buchi modello B-290
(<https://www.buchi.com/it/prodotti/strumenti/mini-spray-dryer-b-290>)

L'aspetto finale della polvere, la resa e la dimensione delle particelle sono strettamente legate ai parametri di lavoro impostati. Il primo fattore da tenere in considerazione è la concentrazione del campione (principio attivo più eccipienti) che influenza direttamente la viscosità del liquido da sottoporre a spray drying. Alti valori di viscosità del liquido producono una polvere grossolana e poco uniforme. Solitamente un range di concentrazione di fase solida ottimale dovrebbe essere compreso tra 35-45% p/v. Tuttavia, in funzione della viscosità del materiale polimerico adoperato è possibile utilizzare soluzioni con valori di concentrazione superiori od inferiori (Murúa-Pagola et al., 2009). La velocità di flusso con il quale il liquido raggiunge l'atomizzatore è un altro parametro fondamentale per la riuscita del processo. È stato osservato che elevati valori di velocità riducono la resa del prodotto. Questo è giustificabile dal fatto che la quantità di solvente che arriva alla camera di essiccazione è talmente elevata da non essere integralmente evaporata dal flusso di aria calda e quindi le particelle si depositano ancora bagnate sulle pareti del ciclone. Inoltre, se il solvente è costituito da una soluzione acquosa si rischia che la polvere ottenuta abbia una certa quantità di acqua che ne influenza negativamente le proprietà di scorrimento, coesione e stabilità nel tempo (Janiszewska & Witrowa-Rajchert, 2007; Tonon et al., 2008). Infine, bisogna tenere in considerazione anche la temperatura di riscaldamento del flusso di aria per l'evaporazione del solvente. Risulta ovvio che questa deve necessariamente essere settata a valori superiori al punto di evaporazione del solvente. Tuttavia, è stato dimostrato che temperature molto alte producono una polvere con particelle più grandi e fortemente igroscopiche. Questo fenomeno è dovuto ad una troppo rapida evaporazione del solvente che impedisce alle particelle di ridurre le proprie dimensioni durante l'essiccamento rendendole porose (Nijdam & Langrish, 2006; Reineccius, 2007). Considerando che il brevetto di questa tecnologia è stato depositato nel 1870, il successo della tecnica dello spray drying è evidenziato dal largo utilizzo che già ne viene fatto dall'industria farmaceutica, grazie alla possibilità di incapsulare farmaci, sostanze funzionali, oli essenziali e pigmenti all'interno

di micro e nano sistemi polimerici e nanocompositi. Il prodotto così ottenuto può essere utilizzato tal quale o come intermedio per la realizzazione di differenti forme di dosaggio (es. compresse, tablet, ecc.). Tuttavia, è una tecnica non esente da svantaggi. In particolare, la resa di prodotto ottenuta non è ottimale e si aggira tra un 20 e 70%, dovuto alla perdita di campione nelle pareti durante il processo di essiccamento. Inoltre, in funzione del tipo di strumento utilizzato, spesso il ciclone non è in grado di separare la polvere in particelle fini (Sosnik & Seremeta, 2015).

1.5.2 Coacervazione

La coacervazione è una tecnica di incapsulazione di principi attivi in nano e microparticelle, basata sulla separazione di una soluzione acquosa polimerica, indotta da variazioni di temperatura, pH o solubilità, in due differenti fasi, una ricca di solvente ed un'altra di coacervato. La coacervazione è un processo che può suddividersi in tre fasi: i) preparazione della soluzione acquosa contenente i polimeri nel quale viene anche solubilizzato il principio attivo, o preparazione di una emulsione olio/acqua dove l'attivo viene disciolto nella fase oleosa ed il tutto emulsionato con la soluzione acquosa polimerica; ii) induzione del processo di coacervazione; iii) stabilizzazione della dispersione ottenuta ed evaporazione del solvente organico (se presente) (Parisi et al., 2014). La coacervazione è classificata in semplice e complessa. La prima si riferisce ai casi in cui viene utilizzato un solo tipo di polimero e la coacervazione viene indotta mediante *salting out*, cioè aggiungendo alla soluzione un elettrolita che, togliendo solvente disponibile per la solvatazione, fa precipitare il polimero, oppure si aggiunge un secondo solvente miscibile con il primo ma capace di abbassare la solubilità del polimero utilizzato (X. L. Gu et al., 2010). Nella coacervazione complessa, invece, la formazione del coacervato è determinata dall'interazione di due differenti polimeri aventi cariche nette opposte, solitamente proteine e polisaccaridi. Questo processo è influenzato dal pH (dove la formazione del coacervato si verifica all'interno di un ristretto range di pH ed al di sotto del punto isoelettrico nel caso delle proteine), dalla forza ionica, dal rapporto tra la proteina ed il polisaccaride e dal tipo di materiale (Napiórkowska & Kurek, 2022). Inoltre, la differenza tra i due polimeri deve essere tale da formare un coacervato ma non un prodotto di precipitazione. Per esempio, molecole fortemente cariche hanno una conformazione tale da renderle non idonee al fenomeno della coacervazione (Timilsena et al., 2019). Le particelle ottenute con la coacervazione complessa hanno il vantaggio di possedere una maggiore efficienza di incapsulazione e una struttura tale da poter controllare il rilascio dell'attivo rispetto a quelle ottenute con la coacervazione semplice (Evans et al., 2013)

1.5.3 Evaporazione del solvente

L'evaporazione del solvente è uno dei metodi maggiormente utilizzato, oltre ad essere uno dei più antichi, per la realizzazione di particelle polimeriche. In questo metodo è necessario, innanzitutto, preparare una emulsione olio/acqua nella quale la fase oleosa è costituita da un solvente organico. Quest'ultimo deve essere volatile e scelto in funzione del tipo di polimero che si vuole utilizzare poiché è necessario che quest'ultimo sia solubile in esso. Inoltre, il principio attivo da incapsulare viene inserito all'interno della fase organica e può trovarsi sia in forma molecolare che in dispersione (Yuldasheva et al., 2018). Il diclorometano ed il cloroformio erano i solventi organici di elezione in passato, ma a causa della loro tossicità

sono stati rimpiazzati dall'etilacetato, il quale mostra un profilo tossicologico migliore e quindi compatibile con le applicazioni biomediche (Božič et al., 2018). La fase organica così costituita viene emulsionata con una acquosa contenente una quantità opportuna di tensioattivi. Le due fasi possono essere emulsionate utilizzando diverse tecniche quali agitazione, sonicazione e ultracentrifugazione, e, in funzione della quantità di energia applicata al sistema, si possono ottenere micro o nanoemulsioni. A questo punto si fa evaporare il solvente causando la precipitazione del polimero ottenendo così le particelle. Il solvente viene evaporato mediante agitazione magnetica a temperatura ambiente o creando lentamente delle condizioni di vuoto (es. quando si utilizza diclorometano o cloroformio). Una volta ottenute le particelle queste vengono recuperate, lavate dal solvente in eccesso e liofilizzate per essere conservate nel tempo (Zielinska et al., 2020).

1.5.4 Diffusione del solvente

Il metodo della diffusione del solvente è strettamente legato a quello precedentemente descritto poiché è necessario partire dalla preparazione di un'emulsione olio/acqua. A differenza del metodo dell'evaporazione del solvente, in questo caso si sceglie un solvente organico parzialmente miscibile con la fase acquosa, come alcool benzilico od etilacetato, nel quale viene aggiunto il polimero e l'attivo da incapsulare. Questa fase organica viene prima saturata con acqua (per aumentarne la stabilità termodinamica) e successivamente emulsionata con una soluzione acquosa e tensioattivi. A questo punto l'emulsione viene diluita in una grossa quantità d'acqua che induce la diffusione del solvente organico con conseguente precipitazione del polimero e formazione della dispersione particellare. Il metodo della diffusione del solvente viene generalmente adoperato per ottenere nanoparticelle; tuttavia, necessita di un elevato volume di acqua, il quale deve essere allontanato dalla dispersione e può favorire la diffusione dell'attivo dall'interno delle particelle verso l'acqua, soprattutto se si parla di sostanze idrofile (Quintanar-Guerrero et al., 1998). Una derivazione di questa tecnica è basata sull'utilizzo del metodo *salting-out*. In breve, si prepara una emulsione tra un solvente completamente miscibile con l'acqua, come etanolo od acetone, ed una fase acquosa contenente sia i tensioattivi ma soprattutto satura di elettroliti. La presenza di elettroliti nella soluzione acquosa fa sì che si instaurino forti interazioni tra le molecole d'acqua e quelle dell'elettrolita, facendo in modo che la soluzione risultante sia immiscibile con il solvente organico. Quindi si prepara l'emulsione olio/acqua e successivamente si diluisce in un elevato volume di acqua nello stesso modo descritto precedentemente per la tecnica della diffusione del solvente (Y. Wang et al., 2016).

1.5.5 Nanoprecipitazione

La tecnica della nanoprecipitazione viene utilizzata per la preparazione di nanoparticelle e nanocapsule polimeriche, ed è considerata facente parte del metodo della diffusione del solvente ma richiede l'utilizzo di due solventi miscibili tra loro. La fase interna è costituita dal polimero, insolubile in acqua, e dall'attivo (disciolto o disperso) in un solvente organico miscibile con l'acqua, come acetonitrile, etanolo o acetone. Quest'ultima viene aggiunta goccia a goccia ad una soluzione acquosa sottoposta a costante agitazione. A causa della rapida diffusione del solvente organico, il polimero istantaneamente si associa a formare nanoparticelle precipitando ed inglobando al suo interno la sostanza attiva. In alcuni casi è possibile ritrovare nella composizione della fase acquosa la presenza di tensioattivi utili a

stabilizzare la dispersione colloidale. Le nanoparticelle ottenute per nanoprecipitazione sono caratterizzate da un range dimensionale più ristretto rispetto a quelle ottenute con altri metodi quali evaporazione o diffusione del solvente (Zielinska et al., 2020).

1.5.6 Polimerizzazione *in situ*

Nella tecnica della polimerizzazione *in situ* si prepara un'emulsione olio/acqua costituita da una fase interna organica nella quale viene inserito l'attivo e un monomero, solitamente composti vinilici ed acrilici, mentre la fase disperdente è una soluzione acquosa contenente tensioattivi. Le due fasi vengono emulsionate ed in funzione della quantità di energia adoperata si possono ottenere micro o nanoemulsioni. L'emulsione viene messa a contatto con agenti in grado di generare radicali liberi (composti attivi dell'ossigeno, idroperossidi o radiazioni UV) che innescano il processo di polimerizzazione permettendo ai monomeri di associarsi tra loro generando le particelle. Infine, il solvente organico viene allontanato per evaporazione (Munin & Edwards-Lévy, 2011).

1.5.7 Preparazione dei Liposomi

La tipologia dei liposomi, intesa come sistemi uni-, oligo- o multilamellari, è strettamente legata alla composizione quali-quantitativa dei lipidi ma soprattutto al metodo di preparazione con il quale è possibile ottenerli. Per questo motivo negli ultimi anni sono state proposte diverse strategie, le quali sono enunciate di seguito:

1. Evaporazione su strato sottile (TLE): una delle prime tecniche utilizzate, consiste nella solubilizzazione dei fosfolipidi e degli altri componenti del liposoma in un solvente organico volatile il quale viene successivamente evaporato sotto flusso di azoto o in condizioni di bassa pressione. Al termine del processo si forma un film fosfolipidico che una volta addizionato di una soluzione acquosa contenente l'attivo si riarrangia formando liposomi. Con questa tecnica non è possibile controllare le dimensioni dei liposomi, i quali saranno multilamellari; inoltre soffre di una scarsa capacità di caricamento della sostanza funzionale;
2. Evaporazione in fase inversa (REV): La tecnica è identica alla TLE fino alla formazione del film fosfolipidico, il quale in questo caso viene solubilizzato in etere dietilico/soluzione acquosa sotto agitazione mediante ultrasuoni per ottenere un'emulsione olio/acqua. Il solvente organico viene allontanato per evaporazione con conseguente inversione dell'emulsione e formazione dei liposomi. Con questo metodo è possibile ottenere liposomi uni-, oligo- o multilamellari in funzione della quantità di materiale lipidico utilizzato. Tra i vantaggi ritroviamo una maggiore capacità di caricamento dell'attivo rispetto ai liposomi ottenuti con la tecnica TLE;
3. Congelamento e scongelamento di Liposomi multilamellari (FATMLC): I liposomi multilamellari ottenuti con TLE o REV vengono congelati rapidamente per mezzo di azoto liquido che determina la formazione di aghi di ghiaccio che rompono i doppi strati fosfolipidici. Segue scongelamento in bagno termostato e ripetizione della procedura per aumentare la capacità di caricamento degli attivi idrofili e controllare meglio le dimensioni dei liposomi.
4. Deidratazione e reidratazione (DRV): La tecnica segue quella del FATMLC con la differenza che i liposomi congelati vengono liofilizzati e successivamente ridispersi

con la medesima soluzione acquosa. Il procedimento viene ripetuto più volte fino all'ottenimento della tipologia desiderata.

5. Estrusione ad alta pressione (VET): Si sfrutta la fluidità meccanica dei liposomi. In breve, i liposomi ottenuti con TLE o FATMLV vengono forzati a passare attraverso filtri con calibro standardizzato. In questo modo si ottengono sistemi unilamellari. In questo modo è possibile ottenere anche i SUV (Šturm & Ulrih, 2021).

1.5.8 Preparazione Nanoparticelle lipidiche solide

La prima fase di preparazione delle nanoparticelle lipidiche solide è dedicata alla ricerca degli eccipienti lipidici idonei all'ottenimento di una miscela solida a temperatura ambiente, omogenea e facilmente lavorabile capace di veicolare il principio attivo in forma molecolare o in sospensione. Una volta ottenuta, la miscela lipidica può essere trattata secondo varie tecniche per ottenere le NLC. Uno di quelli più utilizzati è il metodo di omogeneizzazione ad alta pressione che non prevede l'utilizzo di solventi organici e può avvenire sia a caldo che a freddo. Nel primo caso, la miscela lipidica fusa viene addizionata di una fase acquosa preriscaldata contenente tensioattivi. Il tutto viene omogeneizzato mediante un omogeneizzatore ad alta pressione ottenendo una nanoemulsione olio/acqua, che viene in seguito lasciata raffreddare a temperatura ambiente per ottenere le nanoparticelle. L'utilizzo di alte temperature, necessarie a fondere la miscela e mantenere tutto il sistema in forma liquida durante l'omogeneizzazione, favorisce l'ottenimento di nanoparticelle di piccole dimensioni ed omogenee in dimensione ma potrebbe essere sfavorevole per farmaci altamente instabili a queste temperature. Per superare questo inconveniente è possibile lavorare a freddo. In questo caso le nanoparticelle si ottengono mediante rottura meccanica della miscela lipidica in particelle nanometriche, le quali però hanno una distribuzione dimensionale disomogenea e grossolana rispetto a quelle che si ottengono operando ad alte temperature (Q. Li et al., 2017). Un'altra tecnica ampiamente utilizzata è quella della microemulsione. In breve, si fonde la fase lipidica, nella quale viene incorporato il farmaco e si emulsiona con una soluzione acquosa, contenente uno o più tensioattivi ed un co-tensioattivo, a temperature elevate. Questa microemulsione viene addizionata goccia a goccia ad una soluzione acquosa fredda, sotto agitazione, determinando la formazione delle nanoparticelle. Una variante nel metodo di preparazione consiste nell'utilizzo di un sonificatore ad alta energia. In questo caso la microemulsione viene ridotta in dimensioni nanometriche grazie all'energia determinata dagli ultrasuoni; la nanoemulsione viene in seguito raffreddata per ottenere le NLC (Ghasemiyeh & Mohammadi-Samani, 2018). Il vantaggio delle tecniche sopradescritte è la totale assenza di solventi organici che rende le NLC estremamente sicure in termini di tossicità ma anche semplici da preparare, ecocompatibili ed ecosostenibili.

1.5.9 Stampa 3D

In ingegneria rigenerativa l'utilizzo di stampanti 3D per la realizzazione di scaffold ha suscitato l'interesse di una grossa fetta della comunità scientifica. Il vantaggio sta nella possibilità di controllare minuziosamente i parametri di forma, dimensione e porosità grazie all'utilizzo di software (es. AutoCAD) con i quali viene inizialmente disegnato il progetto e, in seguito, inviato alla stampante 3D che inizierà la produzione dello scaffold strato per strato. In questo modo è possibile realizzare scaffold *ad hoc* in funzione della necessità dei pazienti, così come del tipo di tessuto da trattare. Esistono diverse tecniche, e di conseguenza diverse tipologie di stampanti 3D, che vengono prese in considerazione basandosi sul tipo di materiale utilizzato e su quello che deve essere il prodotto finale. Nelle stampanti 3D di vecchia generazione si utilizzava una tecnica conosciuta come "produzione additiva" nella quale lo scaffold si preparava mediante la deposizione e stratificazione di uno o più materiali attraverso un processo automatizzato (Do et al., 2018). Questo metodo si è evoluto negli anni con la stampa 3D-Bioplotter nella quale il materiale è sostituito da cellule staminali (o derivati biologici e farmaci) da sole o da incorporate in un polimero biocompatibile. Le cellule vengono depositate in modo tale da ottenere una struttura simil-tessuto da applicare tal quale sul sito leso, oppure le stesse cellule possono essere inserite all'interno o sulla superficie di uno scaffold preesistente (Ozbolat et al., 2014). Tra le tecniche maggiormente utilizzate troviamo la modellazione a deposizione fusa (FDM), nella quale si utilizza un materiale termoplastico che viene fuso ed estruso attraverso un ugello riscaldato. Il materiale viene depositato in un piano di stampa, dove solidifica. Spesso per favorire l'adesione di alcuni materiali si utilizzano piani riscaldati o vengono aggiunti additivi adesivi (Zein et al., 2002). Il processo di stampa è determinato dal movimento lungo l'asse x e y dell'ugello e z del piano di stampa. In questo modo lo scaffold viene stampato strato per strato in funzione di come è stato progettato tramite programma CAD. I parametri da tenere in considerazione quando si adopera questa tecnica sono il diametro dell'ugello, la temperatura e la velocità di stampa. Alcuni di questi parametri dipendono dal tipo di materiale da utilizzare (come la temperatura di fusione) e possono influenzare la qualità del prodotto finale. Nel caso in cui si vuole preparare uno scaffold con microporosità, si utilizzano ugelli con piccolo calibro e velocità di stampa ridotte (Kowalczyk et al., 2019). In medicina rigenerativa i materiali utilizzati sono polimeri biocompatibili aventi proprietà termoplastiche come il Policaprolattone (PCL), l'Acido polilattico (PLA) e l'acido polilattico-co-glicolico (PLGA), utilizzati da soli o come compositi con altri materiali. In particolare, l'utilizzo di PCL composito con fibre di vetro o il PLA con l'acido ialuronico ha dimostrato di stimolare la proliferazione delle cellule osteoblastiche con formazione di nuovo tessuto osseo (Esposito Corcione et al., 2017). Tuttavia, uno dei maggiori limiti della tecnica FDM è la scarsa risoluzione di stampa dovuta al diametro della fibra polimerica superiore ai 200 μm ed alla deposizione del materiale fuso non sempre estruso in maniera omogenea. Per superare questo limite esistono stampanti 3D che adoperano sempre la tecnica FDM ma associata ad un generatore di campo elettrico a livello dell'ugello, il quale permette di ridurre il diametro della fibra estrusa a dimensioni inferiori ai 10 μm . In questo modo si possono progettare scaffold altamente ingegnerizzati con un'elevata superficie specifica poiché molto più porosi rispetto a quelli ottenuti con la tecnica tradizionale. Ovviamente tutto ciò si traduce in un maggiore vantaggio in termini di adesione e proliferazione cellulare (B. Zhang et al., 2016).

2. Scopo della tesi

Sulla base di quanto descritto, la cavità orale è una struttura anatomica fondamentale per la sopravvivenza ed il mantenimento del buono stato di salute dell'uomo ed è quindi cruciale ristabilirne l'omeostasi quando le condizioni fisiologiche risultano compromesse o alterate in seguito ad una lesione od insulto. Inoltre, va considerato che alterate condizioni di salute preesistenti, così come fattori fisiologici (es. età avanzata) possono compromettere la corretta guarigione dei tessuti orali anche in seguito ad una comune operazione di estrazione dentale, portando a complicanze anche gravi. Poiché le strategie terapeutiche attualmente messe in atto per garantire una corretta rigenerazione tissutale a seguito del trattamento delle complicazioni post-operatorie o tumorali sono generalmente invasive (es. rimozione chirurgica del tessuto necrotico), o consistere in trattamenti farmacologici che possono contribuire ad un peggioramento di una condizione patologica preesistente, diventa necessario trovare dei validi coadiuvanti o anche soluzioni alternative. Come emerge ampiamente dalla letteratura, l'utilizzo di sostanze polifenoliche di origine naturale può risultare una strategia vincente. La somministrazione di polifenoli tal quali, però, risulta praticamente inefficace, a causa delle loro caratteristiche-chimico fisiche sfavorevoli, portando ad una bassissima biodisponibilità a seguito di assunzione per via orale. Tenendo in considerazione queste premesse lo scopo generale di questo lavoro di dottorato è stato quello di utilizzare tre sostanze polifenoliche appartenenti a classi di composti diversi, ed in particolare la Curcumina (classe dei curcuminoidi), il Resveratrolo (classe degli stilbeni) e la Quercetina (classe dei flavonoidi), per favorire la rigenerazione tissutale dei tessuti molli e duri del cavo orale, inficiata da patologie e/o problematiche associate alle lesioni.

Il progetto di dottorato si pone in particolare l'obiettivo di superare i limiti associati alla somministrabilità di queste molecole così valide dal punto di vista terapeutico mediante l'impiego di diversi approcci tecnologici, al fine di identificare i migliori sistemi di veicolazione.

In particolare, sono state prese in considerazione, opportunamente progettate, realizzate e caratterizzate le seguenti tipologie di sistema *carrier*:

- a) Carrier lipidici nanostrutturati (NLC): sono particelle lipidiche solide di dimensione nanometrica costituite da almeno un lipide liquido ed uno solido a temperatura ambiente, all'interno del quale la sostanza attiva viene incapsulata in forma molecolare. La loro natura lipidica conferisce loro un duplice vantaggio. Da una parte sono in grado di caricare al loro interno alte quantità di polifenoli, in quanto molecole lipofile, dall'altra, possono interagire con le strutture lipidiche dei tessuti agendo da veri e propri *enhancer* dell'assorbimento, per migliorare la veicolazione di sostanze poco solubili. Le NLC possono essere somministrate tal quale oppure utilizzate per la preparazione di forme di dosaggio più complesse. In particolare, il presente progetto di ricerca mira all'incorporazione di NLC cariche di polifenoli all'interno di spugne polimeriche bioerodibili al fine di ottenere dei nanocompositi. Quest'ultimi sono *carrier* solidi costituiti da una struttura matriciale polimerica, spesso di origine naturale, molto porosa, all'interno della quale vengono intrappolate le NLC. Data l'elevata porosità di questi sistemi sono spesso utilizzati in alternativa agli scaffold nella medicina rigenerativa. I nanocompositi offrono, inoltre, notevoli vantaggi, tra cui la possibilità di dosare in maniera semplice e riproducibile le NLC e l'opportunità di trarre vantaggio da una co-somministrazione di polifenoli e farmaci

ad idrofili ad azione antibiotica (es. Ciprofloxacina e Metronidazolo) potenziandone presumibilmente l'efficacia.

- b) Microparticelle polimeriche: si tratta di versatili piattaforme di veicolazione costituite da particelle di dimensioni micrometriche capaci di incapsulare l'attivo all'interno del proprio *entanglement* polimerico, proteggendolo dai fenomeni di degradazione ed aumentandone la biodisponibilità. Sono *carrier* caratterizzati da molteplici vantaggi in termini tecnologici, tra cui la possibilità di essere prodotti in maniera estremamente riproducibile a mezzo di tecniche facilmente scalabili e, dunque, industrialmente vantaggiose, come lo Spray drying. Grazie alle loro dimensioni micrometriche possono essere somministrati tal quali o utilizzati come intermedi per la preparazione di altre forme di dosaggio (es. compresse, capsule).
- c) Scaffold polimerici: costituiscono la nuova generazione di impianti e sono ampiamente utilizzati in medicina rigenerativa grazie alle loro caratteristiche di porosità e rigidità meccanica che simulando l'ambiente extra-cellulare, favoriscono la rigenerazione dei tessuti lesi. Inoltre, la possibilità di prepararli mediante la tecnica innovativa della stampa 3D consente di ingegnerizzarli *ad hoc* per meglio rispondere alle necessità dei pazienti.

L'obiettivo generale è, dunque, quello di selezionare per ogni molecola polifenolica scelta, i migliori carrier e, in seguito, realizzarli e caratterizzarli sotto differenti punti di vista: sono stati condotti i necessari studi preliminari per ciascun polifenolo (es. solubilità, stabilità); sono stati ottimizzati tutti i parametri di processo necessari per la realizzazione di ciascun Drug Delivery System (DDS) (es. parametri di stampa 3D, parametri di spray drying, metodiche ad alta energia per l'ottenimento di NLC); sono state eseguite analisi quali-quantitative degli attivi finalizzate a valutarne la stabilità alle condizioni di preparazione validando, dunque, la tecnica di preparazione stessa; i DDS preparati sono stati valutati in termini di storage, stato fisico dell'attivo, caratteristiche peculiari del DDS in questione (es. dimensione particellare e polidispersità per le micro- e nanoparticelle, omogeneità per i nanocompositi e gli scaffold), capacità di agire come efficaci piattaforme di veicolazione valutando *in vitro* la cinetica di rilascio degli attivi, valutazioni preliminari sia *ex vivo* che *in vitro* della potenziale efficacia una volta applicati, utilizzando opportuni modelli tissutali e cellulari.

3. Materiali e Metodi

3.1. Materiali

Il Glicole propilenico, il Tween 20, il Sorbitolo, il Saccarosio, il Mannitolo, la Lisina cloridrato, il Miristato di isopropile, il Trigliceride caprilico/caprico, la Stearina, il Cetilpalmitato e il PEG-18 Gliceril oleato/cocoato (PEG18 G/C) sono stati acquistati presso la ditta Farmalabor (Canosa di Puglia, Italia). Il *trans*-resveratrolo (RSV), il Metronidazolo (MTZ), il Chitosano LipoSan ULTRA® (CTS), il Sodio ialuronato, l'N-Acetilcisteina (NAC), l'Acido-18- β -glicirretico (GA), le β -Ciclodestrine (β -CD) e l'Isopropil palmitato sono stati acquistati presso la ditta A.C.E.F S.p.a. (Fiorenzuola D'Arda, Italia). Il 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 95% (DPPH), il Mentolo, l'Urea, il Sodio dodecilsolfato (SDS), il Polietilenglicole 200 (PEG200), il Dimetilsolfossido (DMSO) e l'1-ottanolo sono stati acquistati presso la ditta Carlo Erba (Milano, Italia). La Quercetina (QRC), il Glicerilmonostearato 40-55 (tipo II) secondo Farmacopea Europea (GMS), l'Esadecanolo, il β -Tricalciofosfato (β -TCP), l'Albumina sierica bovina (BSA), il Polivinilpirrolidone K90 (PVP-K90), il Tween 80, il Pluronic F-68, Pluronic F-127, la Ciprofloxacina (CPX), il (R)-(+)-Limonene (LIM), il Transcutol®, l'Acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonico) (ABTS) e l'Acido trifluoroacetico (TFA) sono stati acquistati presso la ditta Merck (Darmstadt, Germania). Il Trealosio diidrato è stato acquistato presso Hayashibara Shoji (Okayama, Giappone). Il Sodio deidrocolato (SDC) è stato acquistato presso Aakon Polichimica Srl (Milano, Italia). La Curcumina (CUR) e l'Acido acetico glaciale sono stati acquistati presso la ditta Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Il Labrasol®, il Capryol PGMC®, il Plurol®, il Maisine® e il Labrafil®M 1944 CS sono stati donati dalla ditta Gattefossé (Lione, Francia). L' ϵ -Policaprolattone 6500 CAPA6500® (PCL; MW=50 kDa) è stato acquistato presso la ditta Ingevity (Carolina del Sud, USA).

Per la preparazione dei campioni e per la conduzione degli esperimenti sono stati impiegati i seguenti *media* acquosi:

- Soluzione isotonica, preparata dissolvendo NaCl (9 g) in 1 L di acqua distillata.
- Soluzione isotonica al 5% (p/v) di trealosio, preparata dissolvendo NaCl (9 g) e trealosio (50 g) in 1 L di acqua distillata.
- Saliva artificiale non enzimatica pH 6.8, preparata dissolvendo NaCl (0.126 g), KCl (0.937 g), NaHCO₃ (0.631 g), KSCN (0.655 g), KH₂PO₄ (0.200 g), Urea (0.200 g), Na₂SO₄ (0.154 g), NH₄Cl (0.178 g), CaCl₂ (0.130 g), e NaHCO₃ (0.631 g) in 1 L di acqua distillata.
- Tampone fosfato salino (PBS) pH 7.4, preparato dissolvendo NaCl (8.00 g), KCl (0.20 g), KH₂PO₄ (0.24 g), e Na₂HPO₄ · 2 H₂O (1.81 g) in 1 L di acqua distillata.
- Tampone fosfato pH 5.8, preparato dissolvendo NaH₂PO₄ · H₂O (6.464 g) e NaH₂PO₄ · H₂O (33.130 g) in 1 L di acqua distillata.
- Tampone citrato pH 5.5, preparato dissolvendo Citrato di sodio biidrato (2.052 g) e Acido citrico monoidrato (0.636 g) in 1 L di acqua distillata.
- Tampone citrato pH 6.2, preparato dissolvendo Na₃C₆H₅O₇ · 2 H₂O (2.675 g) e C₆H₈O₇ · H₂O (0.190 g) in 1 L di acqua distillata.

Tutti i Sali utilizzati per la preparazione dei *media* acquosi sono stati acquistati presso la ditta VWR International (Lovanio, Belgio). Tutti i solventi utilizzati sono di grado analitico o per HPLC e sono stati acquistati presso la ditta Carlo Erba (Milano, Italia). Sia i solventi che i reagenti sono stati utilizzati tal quali, senza ricorrere a previe procedure di purificazione.

I risultati sperimentali ottenuti sono stati elaborati utilizzando Microsoft Excel dotata dell'estensione DDSolver, Origin 8.5 e Curve Expert 1.34.

3.2. Metodi

3.2.1. Metodi per realizzare un nanocomposito costituito da NLC di Curcumina incorporate in una spugna bioerodibile di Acido Ialuronico carica di Metronidazolo per il trattamento della cavità post estrattiva

3.2.1.1. Preparazione e caratterizzazione della miscela lipidica

Ottimizzazione della composizione quali-quantitativa della miscela lipidica

La composizione della miscela lipidica ha previsto l'utilizzo di un lipide liquido quale l'isopropil palmitato (IP) e due lipidi solidi: l'esadecanolo (EXA) e l'acido glicirretico (GA). Al fine di incorporare il 5-8% (p/p) di CUR in questi eccipienti ottenendo una miscela lipidica ottimale sono state condotte diverse prove variando il rapporto in peso tra i diversi componenti come indicato in **Tabella 1**. Per ogni composizione è stato preparato 1 g di miscela aggiungendo 50 o 80 mg di attivo all'opportuna quantità di lipidi previamente pesati e collocati all'interno di un becker posizionato in un bagnetto di silicone liquido termostato alla temperatura di $70 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (Heidolph MR3001K Hotplate Stirrer con HeidolphEXT3001 Temperature Probe, Heidolph Instruments, Schwabach, Germania) e mantenuto sotto agitazione magnetica a 100 rpm per 1 ora. Le miscele fuse così ottenute sono state immediatamente sottoposte a ispezione visiva volta a valutare l'eventuale presenza di cristalli di CUR ma anche l'aspetto generale di ogni miscela. Ogni miscela è stata preparata tre volte ($n=3$). La miscela fusa di aspetto migliore (MIX 7) è stata inserita all'interno di un bagno di ghiaccio e sale per 5 min, poi raffreddata a -20°C per 15 min e, a seguito di completa solidificazione, nuovamente sottoposta a ispezione visiva, quindi, conservata a 4°C . Analogamente sono state preparate due miscele lipidiche prive di CUR (Blank-1) e di CUR e GA (Blank-2) corrispondente al MIX 7.

Tabella 1. Composizione quali-quantitativa delle miscele lipidiche espressa in mg

Formula code	CUR (mg)	GA (mg)	EXA (mg)	IP (mg)
MIX 1	80	100	490	330
MIX 2	80	100	410	410
MIX 3	80	30	530	360
MIX 4	80	30	445	445
MIX 5	50	100	510	340
MIX 6	50	100	425	425
MIX 7	50	30	550	370
Blank 1	-	30	550	370
Blank 2	-	-	550	370

Valutazione della temperatura di fusione/rammollimento della miscela lipidica MIX 7

Un'aliquota di MIX 7 è stata posta in un capillare di vetro ed il range di temperatura di rammollimento e conseguente fusione della stessa è stato valutato utilizzando uno strumento

Büchi Menting Point B-540, impostando una velocità di incremento della temperatura pari a 5°C/min. Le analisi sono state condotte in triplicato ed i risultati sono espressi come media $\pm$ errore standard (SE).

3.2.1.2. Preparazione dei Carrier Lipidici Nanostrutturati (NLC) contenenti CUR

Le NLC sono state preparate con una tecnica top-down mediante formazione dapprima di una microemulsione poi ridotta a nanoemulsione. A tal fine sono state utilizzate tecniche ad alta energia quali l'omogenizzazione seguita da sonicazione ad alte frequenze. Quantità esattamente pesate di MIX 7 (100, 200 o 300 mg) sono state riscaldate fino a completa fusione ed omogeneizzate a 15,000 rpm per 1 minuto (Polytron Model PT MR 2100, Kinematica, Svizzera) con un mezzo disperdente costituito da 20 mL di una soluzione di tampone citrato pH 6.2 contenente i tensioattivi scelti (Tween 80; Pluronic F-68) e precedentemente riscaldata a $90 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Le microemulsioni così ottenute sono state sottoposte a sonicazione ad alta frequenza utilizzando un sonicatore ad immersione con sonda SONOPLUS (Bandelin, mod. HD 2070) impostando i seguenti parametri operativi: frequenza 20 kHz, potenza 88-90%, operante in modalità pulsante con cicli di 0.7 secondi di attività e 0.3 secondi di inattività per un totale di 10 minuti. La procedura è stata ripetuta due volte, la prima a temperatura ambiente, e la seconda ponendo la dispersione all'interno di un bagno di ghiaccio e sale per favorire la solidificazione delle NLC. Analogamente sono state preparate NLC vuote utilizzando la miscela Blank 1. In **Tabella 2** sono riportate le NLC prodotte. Ogni preparazione è stata eseguita 3 volte ($n=3$).

Tabella 2. Composizione quantitativa (mg) delle dispersioni di NLC

Formula Code	MIX 7 (mg)	Blank 1 (mg)	Blank 2 (mg)	Tween 80 (mg)	Pluronic F-68 (mg)
A-100	100	-	-	200	-
A-200	200	-	-	200	-
A-300	300	-	-	200	-
B-100	100	-	-	200	200
B-200	200	-	-	200	200
B-300	300	-	-	200	200
BL-1	-	300	-	200	200
BL-2	-	-	300	200	200

3.2.1.3. Studi di Dinamic Light Scattering (DLS) e Potenziale Z

Tutte le NLC appena preparate sono state opportunamente diluite (1:99 o 1:999 con H₂O milli-Q, in dipendenza della concentrazione della fase dispersa) e, quindi, sottoposte a studi di DLS e Potenziale Z, condotti a $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ usando uno strumento Malvern Zetasizer NanoZS ($\lambda_{\text{laser}} = 532 \text{ nm}$; angolo di scattering fisso = 173°). Sono stati presi in considerazione i seguenti parametri ottenuti attraverso analisi cumulative della funzione di correlazione: Z-average, indice di polidispersità (PDI) e Potenziale Z. Ogni misurazione è stata ripetuta due volte su ciascun campione di NLC ($n=6$) ed i risultati sono espressi come media $\pm$ SE.

3.2.1.4. Preparazione e caratterizzazione dei Carrier Lipidici Nanostrutturati (NLC) contenenti CUR in presenza di MTZ

In analogia a quanto riportato nel paragrafo 3.2.1.2., sono state preparate le NLC corrispondenti alla preparazione B-300 aggiungendo in fase disperdente 150 mg di MTZ (Tabella 3). La preparazione è stata eseguita 3 volte (n=3). La dispersione ottenuta è stata denominata B-300-M ed è stata immediatamente diluita e sottoposta ad analisi di DLS e Potenziale Z (n=6) come descritto nel paragrafo 3.2.1.3.

Tabella 3. Composizione quantitativa (mg) della dispersione B-300-M

Componenti	mg
MIX 7	300
MTZ	150
Tween 80	200
Pluronic F-68	200

3.2.1.5. Analisi morfologica delle NLC mediante Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)

Il campione B-300-M è stato sottoposto ad analisi morfologica mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) utilizzando uno strumento Zeiss EVO MA10 (Zeiss, Oberkochen, Germania) dotato di un detector di elettroni secondari di tipo SE-Everhart-Thornley con un catodo di esaboruro di lantanio (LaB₆) come fonte di elettroni primari e operante ad un voltaggio di 20 keV. Le immagini sono state acquisite in condizioni di vuoto spinto (circa 10⁻⁷ mbar). Al fine di aumentare la conduttività elettrica del campione da analizzare 10 µL della dispersione di NLC sono stati posizionati su un supporto d'alluminio ed essiccati a 4.0±0.5° C con CaCl₂ per 24 ore. In seguito, il campione è stato inserito all'interno di uno Sputter Coater (AGAR Sputter Coater type system) e ricoperto con uno strato d'oro (circa 2 nm di spessore) prima dell'osservazione al microscopio. L'analisi morfologica è stata condotta su ciascun lotto di NLC (n=3).

3.2.1.6. Analisi morfologica delle NLC mediante Microscopia Elettronica a trasmissione (TEM)

Il campione B-300-M è stato sottoposto ad analisi morfologica mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM) utilizzando uno strumento JEOL JEM-1011 (JEOL Ltd., Tokyo, Giappone) dotato di una fonte di elettroni primari tungsteno termionico accelerati con un voltaggio di 100 kV. Il campione opportunamente diluito è stato posizionato su una griglia di rame (200 mesh) ricoperta di carbonio, colorato con una soluzione di acetato di uranile all'1% (p/v) e, quindi, lasciato ad asciugare. Le immagini sono state acquisite con una camera di tipo 11 MPx Orius 1000 CCD camera (Gatan, Pleasanton, USA). L'analisi morfologica è stata condotta su ciascun lotto di NLC (n=3).

3.2.1.7. Determinazione quantitativa della CUR e del MTZ nella dispersione di NLC

Valutazione della quantità totale di CUR e MTZ presente nella dispersione di NLC e calcolo della Drug Recovery % (DR%)

La quantità totale (Q_{tot}) di CUR e MTZ (quando presente) nelle dispersioni B-300 e B-300-M è stata determinata prelevando aliquote da 100 μ L, ponendole in un matraccio ambrato e diluendole fino a 20 mL con Metanolo al fine di solubilizzare tutti i componenti della preparazione. Le soluzioni limpide ottenute sono state sottoposte ad analisi spettrofotometriche UV-Vis utilizzando le opportune rette di taratura ed i relativi bianchi al fine di quantificare gli attivi, come riportato nel paragrafo 3.2.1.20. Le analisi sono state condotte in triplicato su ciascun lotto di NLC (n=9). I risultati ottenuti sono riportati come media $\pm$ SE ed espressi in termini di Drug Recovery % (DR%) calcolata secondo la seguente equazione:

$$DR\% = \frac{Q_{tot} (mg)}{Quantità\ teorica (mg)} \times 100$$

dove Q_{tot} è la quantità di CUR e MTZ effettiva ottenuta sperimentalmente e rapportata alla quantità teorica presente nella dispersione di NLC.

Valutazione della Drug Loading% (DL%) e della Loading Efficacy% (LE%)

La capacità carrier delle NLC nei confronti degli attivi inseriti è stata valutata a mezzo di due distinte tecniche:

1. Metodo della dialisi: 1 mL di dispersione di NLC è stato inserito all'interno di un tubo da dialisi di cellulosa rigenerata (cut off: 12–14 kDa; Visking Dialysis Membrane Medicell Membranes Ltd., UK) immerso in 350 mL di acqua distillata e tenuto sotto costante agitazione magnetica ed al riparo dalla luce per 24 ore. Al termine del test il fluido esterno alla dialisi è stato campionato, opportunamente diluito con metanolo e sottoposto ad analisi UV-Vis, come descritto nel paragrafo 3.2.1.20.
2. Metodo dell'Ultrafiltrazione: 450 μ L di dispersione di NLC sono stati posizionati nel compartimento superiore di un dispositivo centrifugo (Ultrafree-MC, Millipore) aventi cut-off di 30 kDa e centrifugati a 8000 rpm per 30 minuti a $4.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (Microfuge 22R, Beckman coulter™, Brea, USA). Le soluzioni acquose accumulate nel compartimento inferiore del dispositivo sono state, quindi, prelevate, opportunamente diluite con metanolo e sottoposte ad analisi UV-Vis, come descritto nel paragrafo 3.2.1.20.

I dati quantitativi ottenuti sono stati impiegati per calcolare indirettamente la Drug Loading% (DL%) e la Loading Efficacy% (LE%) secondo le seguenti equazioni:

$$DL\% = \frac{Q_{tot} - Q_{out} (mg)}{MIX\ 7 (mg)} \times 100$$

$$LE\% = \frac{Q_{tot} - Q_{out} (mg)}{Q_{tot} (mg)} \times 100$$

dove Q_{tot} è la quantità di CUR o MTZ totali presenti nella dispersione di NLC precedentemente calcolata, mentre Q_{out} è la quantità degli attivi non incapsulata e pertanto ritrovata in fase disperdente. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato su ciascun lotto di NLC (n=9) ed i risultati sono riportati come media $\pm$ SE.

3.2.1.8. Preparazione dei nanocompositi carichi di CUR e MTZ

Per la preparazione dei nanocompositi sono state utilizzate le NLC denominate BL-1, B-300 e B-300-M che sono state incorporate all'interno di un gel opportunamente preformato e contenente Sodio Ialuronato (HA), PVP K90 e trealosio. Sono stati valutati due gel differenti in termini di rapporto tra i vari componenti e preparati in accordo a quanto riportato in **Tabella 4**. I tre componenti sono stati aggiunti a 100 mL di acqua distillata sotto costante agitazione magnetica fino all'ottenimento di un gel omogeneo che è stato, successivamente, conservato a $4.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ per 24 ore.

Tabella 4. Composizione (g) dei gel preparati utilizzando 100 mL di acqua

Formula Code	HA (g)	PVP-K90 (g)	Trealosio (g)
Gel 1	2.50	0.40	15.00
Gel 2	4.00	0.60	10.00

Per la preparazione dei nanocompositi (**Tabella 5**), aliquote accuratamente pesate di gel sono state aggiunte alle opportune dispersioni di NLC appena preparate. La miscela ottenuta è stata sottoposta a sonicazione ad alta frequenza in modalità pulsante per 10 minuti, come descritto nel paragrafo **3.2.1.2.**, ponendo il campione all'interno di un bagnetto di ghiaccio e sale. In seguito, i campioni sono stati trasferiti in falcon da 50 mL, sottoposti a congelamento $-80.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ per 24 ore (Forma 902 ULT Freezer, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) e a successiva essiccazione per 48 ore mediante freeze drying (Labconco FreeZone[®] 2.5 Liter Freeze Dry System, Kansas City, USA) impostando il vuoto a 0.014 mbar e la temperatura a $\approx -50^\circ\text{C}$. Al termine della procedura di essiccamento i nanocompositi ottenuti sotto forma di polvere sono stati conservati a temperatura ambiente al riparo dalla luce. Ogni nanocomposito è stato preparato in triplicato (n=3).

Tabella 5. Composizione e denominazione dei nanocompositi preparati

Formula Code	Dispersione di NLC impiegata				Tipologia e quantità di gel (g)	
	BL-1	BL-2	B-300	B-300-M	Gel 1	Gel 2
NC1	-	-	√	-	2.00	-
NC1-M	-	-	-	√	2.00	-
NC2	-	-	√	-	4.00	-
NC2-M	-	-	-	√	4.00	-
NC3	-	-	√	-	-	4.00
NC3-M	-	-	-	√	-	4.00
NC-BL1	√	-	-	-	-	4.00
NC-BL2	-	√	-	-	-	4.00

3.2.1.9. Determinazione della quantità di CUR e MTZ nel nanocomposito

I nanocompositi NC2, NC2-M, NC3 ed NC3-M sono stati sottoposti a studi quantitativi dei due attivi. 5 mg di ciascun nanocomposito sono stati solubilizzati in 20 mL di metanolo e sottoposti ad analisi spettrofotometriche UV-Vis al fine di quantificare il/gli attivo/i in essi presente/i, come riportato nel paragrafo **3.2.1.20**. Al fine di valutare sia l'omogeneità di contenuto di ciascun campione, che la riproducibilità degli stessi, ogni valutazione è stata fatta su tre differenti aliquote del medesimo lotto di nanocomposito e su tutti i nanocompositi prodotti (n=9). I risultati sono espressi come media ± SE.

3.2.1.10. Test di Igroscopicità

L'igroscopicità dei nanocompositi NC2, NC2-M, NC3 ed NC3-M è stata valutata in termini di variazione di peso, utilizzando una bilancia analitica a 5 cifre decimali (Mettler, Mod. AE 240, Italia). Prima di ogni misurazione, un sacchetto di silice pre-essicata in stufa (StabiliTherm, Thermo Scientific) è stato inserito all'interno della bilancia per 10 minuti al fine di rimuovere ogni traccia di umidità. In seguito, un'opportuna quantità di nanocomposito è stata posta sul piatto della bilancia e il suo peso iniziale (P_i) è stato registrato avendo cura di tenere le porte della bilancia ben chiuse. Successivamente, il sacchetto di silice è stato rimosso e le porte della bilancia sono state aperte consentendo al campione di equilibrarsi con l'umidità ambientale (Umidità Relativa: 60%). Ad intervalli di tempo stabiliti (10 minuti) viene registrato il peso del campione (P_f) fino a quando non si assiste più ad un incremento di peso per almeno 3 misure consecutive. L'igroscopicità è stata, quindi, indicata in termini di incremento percentuale in peso e calcolato secondo la seguente equazione:

$$\text{Incremento in peso \%} = \frac{P_f - P_i}{P_f} \times 100$$

Ogni esperimento è stato condotto in triplicato ed i risultati sono espressi come media ± SE.

3.2.1.11. Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC)

Lo stato fisico dei componenti che costituiscono il nanocomposito è stato investigato mediante analisi di calorimetria a scansione differenziale (DSC) utilizzando uno strumento SETARAM DSC 131 EVO (Setaram, Francia). Sono stati analizzati i seguenti campioni: MIX 7, miscela fisica dei componenti del Gel 2 (addizionato di Tween 80 e Pluronic F-68), Gel 2 (addizionato di Tween 80 e Pluronic F-68) sottoposto al processo di freeze drying e nanocomposito NC3. In breve, 8 mg di ciascun campione sono stati posizionati all'interno di capsule d'alluminio (Perkin Elmer) ed analizzati nel range di temperatura da -10 a 250°C impostando una rampa di temperatura di 10°C/min, sotto flusso di azoto. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

3.2.1.12. Determinazione matematica della porosità

La porosità percentuale dei nanocompositi NC3 ed NC3-M è stata determinata matematicamente prendendo in considerazione il volume teorico di ciascun componente e valutando il volume reale del nanocomposito. Il volume teorico (V_t) inteso come sommatoria dei volumi nominali di ogni componente del nanocomposito è stato calcolato secondo la seguente equazione:

$$V_t = \sum \frac{m_n}{\rho_n}$$

dove m e ρ sono rispettivamente la massa e la densità di ciascun componente.

Il volume reale (V_r) è stato determinato ponendo una quantità accuratamente pesata di nanocomposito all'interno di un cilindro graduato e misurandone il volume occupato. La determinazione del V_r è stata condotta in triplicato (n=3). Quindi, la Porosità % è stata determinata secondo la seguente equazione:

$$Porosità \% = \frac{V_r - V_t (mL)}{V_t (mL)} \times 100$$

I risultati sono riportati come media $\pm$ SE.

3.2.1.13. Analisi morfologica del nanocomposito mediante Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)

Il nanocomposito NC3-M è stato sottoposto ad analisi morfologica mediante SEM, in accordo con quanto descritto nel paragrafo 3.2.1.5. in termini di preparazione del campione e parametri strumentali. Le valutazioni morfologiche sono state condotte su ciascun nanocomposito prodotto (n=3).

3.2.1.14. Valutazione delle proprietà scavenger mediante saggio ABTS

È stata valutata la proprietà scavenger dei nanocompositi NC3, NC3-M e NC-BL2 mediante il test ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). Innanzitutto, il catione radicalico del reattivo ABTS ($ABTS^{\cdot+}$) è stato generato facendo reagire una soluzione acquosa 7 mM di BTS con una soluzione 2.45 mM di persolfato di potassio a temperatura ambiente ed al riparo dalla luce per 12-16 ore. La soluzione così ottenuta è stata diluita opportunamente con acqua distillata e sottoposta ad analisi spettrofotometriche (Cary 300

Scan UV-Vis spectrophotometer) finalizzate all'identificazione di una soluzione con assorbanza pari a 1 alla lunghezza d'onda di riferimento (734 nm). Successivamente, 10, 7.5, 5, 2.5, e 1 mg dei nanocompositi in studio sono stati aggiunti a 3 mL della soluzione sopradescritta di ABTS^{•+} e, ad intervalli di tempo prestabiliti, è stata valutata la riduzione di assorbanza del reattivo mediante analisi spettrofotometriche. L'attività scavenger è stata espressa come percentuale di inibizione dei radicali liberi (RSA%) e calcolata secondo la seguente equazione:

$$RSA\% = \frac{A_0 - A_n}{A_0} \times 100$$

dove A_0 ed A_n sono rispettivamente i valori di assorbanza del reattivo ABTS^{•+} al tempo zero e ad ogni intervallo di tempo considerato. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato ed i risultati sono riportati come media $\pm$ SE.

3.2.1.15. Preparazione e caratterizzazione di mini-tablet

Per standardizzare la quantità di attivi e rendere più facilmente dosabile e somministrabile il nanocomposito, il campione NC3-M è stato compattato in mini-tablet. 30 mg di nanocomposito NC3-M sono stati inseriti all'interno di uno stampo graduato (diametro: 5 mm) avente stantuffi superiore e inferiore mobili. Con l'ausilio di una pressa idraulica (Perkin Elmer IR Accessory, Waltham, USA) è stata esercitata una pressione di 6 tonnellate, sufficiente per la preparazione delle minitabiet. La riproducibilità del metodo di preparazione è stata verificata valutando 6 campioni in termini di uniformità in peso, spessore e diametro (n=6). I risultati sono riportati come media $\pm$ SE.

3.2.1.16. Test di swelling

L'abilità delle mini-tablet di rigonfiare quando poste a contatto con soluzioni acquose è stata valutata sia mediante analisi di variazioni in peso che mediante il test di swelling visivo.

Per il test di swelling in peso, le mini-tablet sono state collocate su un vetrino ad orologio e pesate (P_s) usando una bilancia analitica a 5 cifre decimali (Mettler, Mod. AE 240). In seguito, il campione è stato bagnato con 0.5 mL di saliva artificiale pH 6.8 preriscaldata alla temperatura di $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Ad intervalli di tempo predefiniti (5 min), l'eccesso di liquido è stato accuratamente rimosso utilizzando carta da filtro e la minitabiet è stata nuovamente pesata (P_{idr}). Questa operazione è stata ripetuta più volte fino a 60 minuti. La quantità di fluido assorbita dal campione è stata espressa in termini di Indice di Swelling e calcolata come segue:

$$Indice\ di\ Swelling = \frac{[P_s - (P_{idr} - P_s)]}{P_s} \times 100$$

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e i risultati sono stati riportati come media dell'Indice di Swelling $\pm$ SE in funzione del tempo di incubazione.

Per il test di swelling visivo, le minitabiet sono state posizionate su un vetrino ad orologio posto sopra un foglio di carta millimetrata. Ad intervalli di tempo prestabiliti (5 min) e fino a 2 ore il campione è stato bagnato con 0.5 mL di saliva artificiale pH 6.8. e, contestualmente, sono state scattate delle foto sia sul piano orizzontale che longitudinale, al fine di osservare

eventuali cambiamenti nella forma del nanocomposito. Anche questo test è stato condotto in triplicato.

3.2.1.17 Studi di rilascio in vitro di CUR e MTZ e valutazione della cinetica di rilascio

La capacità del nanocomposito NC3-M di rilasciare sia la CUR che il MTZ è stata valutata in vitro utilizzando celle di diffusione verticali di tipo Franz (Permeagear, flat flange joint, 9 mm orifice diameter, 15 mL acceptor volume, SES GmbH-Analyses systeme, Germania) costituite da:

- Compartimento donatore caricato con le mini-tablet precedentemente preparate e bagnate con 0.5 mL di tampone citrato pH 6.2;
- Membrana di nitrato di cellulosa (cut-off 0.45 μ m);
- Compartimento accettore riempito con fluidi differenti per i due attivi considerati, in dipendenza delle loro caratteristiche chimico-fisiche. In particolare, per lo studio di rilascio della CUR è stato scelto il miristato di isopropile, mentre per il MTZ è stato utilizzato il tampone citrato pH 6.2 addizionato di 4% (p/v) di Tween 20.

Gli esperimenti sono stati condotti per 4 ore, sotto costante agitazione magnetica (200 rpm), alla temperatura di 37.0 ± 0.5 °C ed al riparo dalla luce. A intervalli di tempo determinati (15 min) aliquote da 0.5 mL vengono prelevate dal compartimento accettore ed immediatamente rimpiazzate con lo stesso volume di fluido accettore fresco per mantenere le condizioni sink. I campioni prelevati dagli esperimenti di rilascio della CUR sono stati diluiti con diclorometano in rapporto 1:1 (v/v) e sottoposti a valutazione quantitativa spettrofotometrica, mentre, i campioni relativi agli studi di rilascio del MTZ sono stati analizzati tal quali. Per le quantificazioni sono state utilizzate le curve di calibrazione descritte nel paragrafo 3.2.1.20. Gli esperimenti sono stati ripetuti 6 volte ed i risultati sono stati riportati come media della frazione della dose rilasciata $\pm$ SE (n=6) in funzione del tempo.

Elaborazione cinetica

I dati sperimentali ottenuti dai test di rilascio sono stati elaborati mediante l'impiego del software Origin 8.5. In particolare, sono stati condotti studi di fitting delle curve di rilascio ottenute prendendo in considerazione i più comuni modelli matematici che si applicano allo studio della cinetica di rilascio dei principi attivi dai Drug Delivery Systems. Sono state prese in considerazione le seguenti equazioni cinetiche: Ordine zero, Primo ordine, Primo ordine con F_{MAX} , Higuchi, Korsmeyer-Peppas (Power Law) e Peppas Sahlin. Per valutare l'aderenza ai modelli presi in considerazione sono stati presi in considerazione i valori di R^2 ottenuti e l'effettiva bontà visiva del fitting stesso.

3.2.1.18 Studi *ex vivo* di penetrazione/permeazione della mucosa buccale porcina

Preparazione del tessuto mucosale

La capacità di CUR e MTZ di permeare e/o accumularsi all'interno dei tessuti è stata valutata mediante studi *ex vivo*, utilizzando la mucosa buccale porcina come modello. Il tessuto biologico è stato gentilmente donato dal Mattatoio comunale di Villabate (Palermo,

Italia) ed è stato ottenuto dall'area vestibolare del trigono retromolare di maiali di età compresa tra i 6 e gli 8 mesi, destinati al consumo umano e, pertanto senza necessità di approvazione da parte di un comitato etico. Entro 1 ora dal campionamento, i tessuti sono stati trasferiti presso i laboratori del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF) con l'ausilio di una borsa refrigerata. Qui sono stati immediatamente lavati in soluzione isotonica e quindi trattati chirurgicamente per rimuovere i tessuti in eccesso (connettivo ed adiposo). Successivamente, i campioni tissutali sono stati immersi in una soluzione isotonica di NaCl addizionata del 5% (p/v) di trealosio, per 30 minuti, e di seguito asciugati e conservati a $-80\pm 1^\circ\text{C}$ per almeno 7 giorni. Prima del loro utilizzo i tessuti sono stati accuratamente lavati con soluzione isotonica per eliminare il trealosio in eccesso e, quindi, sottoposti a shock termico al fine di separare l'epitelio mucosale dal tessuto adiposo e dal connettivo submucosale. Brevemente, i campioni sono immersi in soluzione isotonica preriscaldata a $70\pm 1^\circ\text{C}$ per circa 1 minuto per consentire il distacco manuale dell'epitelio mucosale (Diaz del Consuelo et al., 2005). La mucosa buccale ricavata è, quindi, immersa in soluzione isotonica per 24 ore al fine di rimuovere il materiale biologico che potrebbe interferire con le successive analisi quantitative. È stato provato che il trattamento a caldo non comporta nessuna modifica in termini di permeabilità ed integrità della mucosa (De Caro et al., 2012).

Studi di permeazione ex vivo

Gli studi di permeazione sono stati condotti utilizzando la cella di diffusione verticale di tipo Franz già descritta e ponendo il campione di mucosa buccale tra il compartimento donatore ed accettore. Ciascun compartimento è stato inizialmente riempito con il fluido accettore (saliva artificiale pH 6.8) o donatore (tampone citrato pH 6.2 al 4 % p/v di Tween 20) scelto e lasciato a condizionare per 10 minuti a $37.0\pm 0.5^\circ\text{C}$. Successivamente il compartimento donatore è stato svuotato e caricato con una mini-tablet del nanocomposito NC3-M bagnata con 0.4 mL di saliva artificiale pH 6.8. Gli esperimenti sono stati condotti alla temperatura di $37.0\pm 0.5^\circ\text{C}$, per 6 h, sotto costante agitazione magnetica (200 rpm), ed al riparo dalla luce. Ad intervalli di tempo prestabiliti (30 min) sono state prelevate aliquote da 0.5 mL dal compartimento accettore, immediatamente rimpiazzate con un uguale volume di fluido accettore fresco al fine di mantenere le condizioni sink. I campioni prelevati sono stati sottoposti ad analisi UV-Vis al fine di quantificare gli attivi eventualmente presenti, come descritto nel paragrafo 3.2.1.20. Gli esperimenti sono stati ripetuti 6 volte ($n=6$) ed i risultati ottenuti sono stati espressi in termini di flusso (J) medio $\pm$ SE in funzione del tempo. Il flusso (J), espresso in $\text{mg}/\text{cm}^2 \text{ h}^{-1}$, è stato calcolato come segue:

$$J = \frac{Q}{A \cdot t} (\text{mg}/\text{cm}^2 \text{ h}^{-1})$$

dove Q è la quantità di farmaco (CUR o MTZ) permeato nell'intervallo di tempo t (espresso in ore) e A è l'area di mucosa buccale porcina effettivamente a contatto con la formulazione (0.636 cm^2). In condizioni di *steady state*, il flusso è uguale al coefficiente angolare della retta ottenuta diagrammando la quantità permeata di attivo per unità di superficie in funzione del tempo (ore).

Studi di accumulo ex vivo

Gli studi di accumulo tissutale degli attivi sono stati condotti al termine dei test di permeazione ex vivo. Le celle di Franz sono state disassemblate ed il tessuto mucosale è stato recuperato, accuratamente lavato con PBS pH 7.4 e sottoposto ad estrazione degli attivi. Brevemente, la mucosa è stata immersa in 2 mL di metanolo riscaldato a $60.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ per 2 min al termine dei quali il liquor di estrazione è stato prelevato e trasferito in un matraccio da 10 mL. La procedura di estrazione è stata ripetuta due volte e le aliquote ricavate sono state unite e portate a volume con metanolo fresco, quindi sottoposte ad analisi UV-Vis, come riportato nel paragrafo **3.2.1.20**. Inoltre, per valutare la dipendenza del fenomeno di accumulo tissutale della CUR dal tempo di contatto, le estrazioni sono state condotte interrompendo gli esperimenti di permeazione a differenti time points (da 30 min a 6 ore). I risultati sono stati riportati come percentuale media della dose intrappolata nel tessuto rispetto alla dose caricata nel compartimento donatore $\pm$ SE per ciascun attivo. Gli esperimenti sono stati ripetuti 6 volte ($n=6$).

3.2.1.19. Prove biologiche

Studi di vitalità cellulare mediante MTT test

I saggi di vitalità cellulare sono stati condotti su cellule stromali di midollo osseo umano (HS5) dopo trattamento con i nanocompositi NC3-M e NC-BL1. Le cellule sono state piastrate in una piastra a 96 pozzetti (10000 cellule per pozzetto) in 100 μL DMEM (ATCC 30-2002) addizionato del 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS) ed opportuni antibiotici, e poste all'interno di un incubatore al 5% di CO_2 ed alla temperatura di $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Dopo 24 h, il mezzo di coltura è stato allontanato e rimpiazzato con 100 μL mezzo di coltura fresco contenente una dispersione dei nanocompositi a differenti concentrazioni (0.025, 0.050, 0.080, 0.120 e 0.150 mg/mL). La vitalità delle cellule è stata monitorata mediante saggio MTT (Invitrogen M6494) dopo 24 h di trattamento, valutando l'assorbanza dei vari pozzetti a 540 nm mediante un Microplate Reader (BioTek Instruments, USA). Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e rapportati a un triplicato di cellule controllo non trattate poste come valori di riferimento (vitalità del 100%). I risultati sperimentali sono espressi come vitalità % ($n=3$) in relazione ai valori del controllo e riportati come media $\pm$ SE.

Studi di vitalità cellulare con Fluoresceina diacetato (FDA) e Ioduro di Propidio (PI)

Un ulteriore test di citocompatibilità è stato condotto su fibroblasti di origine murina (cellule NIH3T3) utilizzando dei sistemi transwell. Le cellule sono state piastrate in una piastra a 48 pozzetti (30000 cellule/ cm^2) in DMEM addizionato del 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS) ed opportuni antibiotici, e poste all'interno di un incubatore al 5% di CO_2 ed alla temperatura di $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Dopo 24 h, dispersioni standard di NC3, NC3-M nonché soluzioni di CUR in DMEM ottenute dopo solubilizzazione della stessa in DMSO e successiva diluizione ([CUR]: 1, 2.5, 5 e 10 μM) sono state inserite nel compartimento donatore di pozzetti Transwell con membrana microporosa ($\varnothing$ 3 μm) in policarbonato (Corning incorporated, New York, US), quindi immersi nei pozzetti contenenti le cellule adese e lasciati ad incubare per 48 ore. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato. La

vitalità delle cellule è stata monitorata visivamente valutando la morfologia cellulare tramite microscopio ottico e successivamente mediante test colorimetrico FDA/PI osservando le immagini ottenute mediante microscopia a fluorescenza (la fluoresceina diacetato colora di verde le cellule vitali, lo ioduro di propidio si intercala alle catene di DNA rilasciate dalle cellule morte e lisate colorandole di rosso). La vitalità cellulare è stata comparata a quella di cellule controllo non trattate.

Scatch wound healing assay

Lo scratch test è stato condotto utilizzando fibroblasti di origine murina (cellule NIH3T3) piastrati in una piastra a 48 pozzetti (30000 cellule/cm²) in DMEM addizionato del 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS) ed opportuni antibiotici, e posti all'interno di un incubatore al 5% di CO₂ ed alla temperatura di 37.0±0.5°C. Dopo 24 h, il tappeto cellulare ottenuto è stato inciso con un puntale e al di sopra di esso è stato posto il sistema Transwell con membrana microporosa (3 µm) in polycarbonato (Corning incorporated, New York, US) carico della dispersione di NC3, o NC3-M o delle soluzioni di CUR in DMEM ottenute dopo solubilizzazione della stessa in DMSO e successiva diluizione ([CUR]: 1, 2.5, 5 e 10 µM). Il tutto è stato lasciato ad incubare per 24 ore. La capacità della CUR e dei nanocompositi di favorire la rigenerazione tissutale è stata valutata visivamente monitorando la capacità delle cellule di risanare l'incisione precedentemente fatta mediante l'impiego di un microscopio ottico. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

3.2.1.20. Tecniche utilizzate per la quantificazione degli attivi

Analisi quantitativa della CUR

Le determinazioni quantitative della CUR sono state effettuate mediante analisi spettrofotometriche UV-Vis utilizzando uno strumento Shimadzu 1700 (Kyoto, Giappone). Al fine di quantificare la CUR nei differenti mezzi necessari per ciascuna tipologia di analisi sono state costruite tre curve di calibrazione utilizzando tre diversi solventi ed impiegando in ogni caso 5 soluzioni standard di CUR e determinando mediante regressione lineare l'equazione relativa alla retta di taratura:

1. Metanolo → $\lambda_{\text{max}} = 428 \text{ nm}$; range di concentrazione: 0.0025–0.0100 mg/mL, regressione lineare: $\text{Abs} = -0.0108 + 136.0 \times [\text{mg/mL}]$, ($R = 0.999$, $\text{SE} = 0.0397$); impiegata per la determinazione quantitativa della CUR nella dispersione di NLC, nel nanocomposito e all'interno della mucosa buccale al termine degli esperimenti *ex vivo*.
2. Tampone citrato pH 6.2 al 4% (p/v) di Tween 20 → $\lambda_{\text{max}} = 428 \text{ nm}$, range di concentrazione: 0.0001–0.0010 mg/mL; regressione lineare: $\text{Abs} = 0.01277 + 160.0 \times [\text{mg/mL}]$, ($R = 0.997$, $\text{SE} = 0.0105$); impiegata per la determinazione quantitativa della CUR durante gli esperimenti di permeazione *ex vivo*.
3. Diclorometano:Isopropil miristato 50:50 (v/v) → $\lambda_{\text{max}} = 428 \text{ nm}$; range di concentrazione: 0.000025–0.0005 mg/mL; regressione lineare: $\text{Abs} = 0.0014 + 0.0117 \times [\text{mg/mL}]$ ($R = 0.998$, $\text{SE} = 0.0015$); impiegata per la determinazione della CUR durante gli esperimenti di rilascio *in vitro*.

Alle concentrazioni testate non sono state osservate interferenze tra la CUR e gli altri componenti utilizzati nella preparazione (MTZ, lipidi, tensioattivi, sali, ecc.), né variazioni in termini di $\lambda_{\max}$. Le variazioni interday e intraday risultano trascurabili poiché al di sotto della soglia di sensibilità dello strumento.

Analisi quantitativa del MTZ

Le determinazioni quantitative del MTZ sono state effettuate mediante analisi spettrofotometriche UV-Vis in analogia a quanto precedentemente descritto per la CUR. Cinque soluzioni standard di MTZ in tre differenti solventi sono state impiegate per la costruzione delle relative curve di calibrazione utili per quantificare il MTZ nei diversi esperimenti condotti. Le rette di calibrazione sono state determinate mediante regressione lineare:

1. Metanolo $\rightarrow \lambda_{\max} = 310$ nm; range di concentrazione: 0.0025–0.0300 mg/mL; regressione lineare: $\text{Abs} = 0.0011 + 62.00 \times [\text{mg/mL}]$ ($R = 0.999$, $\text{SE} = 0.0092$); impiegata per la determinazione quantitativa del MTZ nella dispersione di NLC, nel nanocomposito e all'interno della mucosa buccale al termine degli esperimenti *ex vivo*
2. Tampone citrato pH 6.2 al 4% (p/v) di Tween 20 $\rightarrow \lambda_{\max} = 310$ nm; range di concentrazione: 0.0025–0.0200 mg/mL; regressione lineare: $\text{Abs} = 0.0771 + 46.80 \times [\text{mg/mL}]$ ($R = 0.998$, $\text{SE} = 0.0102$); impiegata per la determinazione quantitativa del MTZ durante gli esperimenti di permeazione *ex vivo* e di rilascio *in vitro*.

Anche in questo caso, alle concentrazioni testate non sono state osservate interferenze tra il MTZ e gli altri componenti utilizzati nella preparazione (CUR, lipidi, tensioattivi, sali, ecc.), né variazioni in termini di $\lambda_{\max}$. Le variazioni interday e intraday risultano trascurabili poiché al di sotto della soglia di sensibilità dello strumento.

3.2.2 Metodi per realizzare scaffold in Policaprolattone contenenti Curcumina e Beta-tricalciofosfato mediante stampa 3D per la rigenerazione del tessuto osseo del cavo orale (in collaborazione con la Warsaw University of Technology, Varsavia)

3.2.2.1 Preparazione dei foil a base di Policaprolattone

Per la preparazione degli scaffold sono stati realizzati differenti foil a base di Policaprolattone 6500 (PCL) contenenti CUR e/o Beta-tricalciofosfato (β -TCP) aventi composizione p/p riportata nella seguente **Tabella 6**:

Tabella 6. composizione percentuale (%p/p) dei materiali utilizzati per la preparazione di scaffold tramite stampante 3D

Campioni	CUR (% p/p)	β-TCP (% p/p)	PCL (% p/p)
PC-0.5	0.5	-	99.5
PC-0.5-TC	0.5	25	74.5
PC-1	1	-	99
PC-1-TC	1	25	74
PC-1.5	1.5	-	98.5
PC-1.5-TC	1.5	25	73.5
Blank	-	25	75

In particolare, opportune quantità di PCL sono state solubilizzate in 100 mL di Diclorometano mantenendo il sistema sotto agitazione magnetica (500 rpm) per circa 24 ore. La risultante soluzione limpida è stata addizionata dei rispettivi componenti nei rapporti riportati in **Tabella 6**, mantenendo costante l'agitazione, fino a completa solubilizzazione della CUR e, successivamente, è stato aggiunto il β -TCP (quando presente) in sospensione, mantenendo il tutto a temperatura ambiente ed al riparo dalla luce. I campioni così ottenuti sono stati versati su una piastra di vetro utilizzando un Elcometer 3700 film Applicator e lasciati essiccare al buio ed a temperatura ambiente per 12 ore. I risultanti foil sono stati tagliati in dischi da 12 mm di diametro e conservati in un contenitore di plastica contenente silice per assorbire l'umidità fino al momento del loro utilizzo.

3.2.2.2 Preparazione dei filamenti e 3D-Printing degli scaffold

Ogni campione di foil è stato inserito all'interno di un Filastruder artigianale, riscaldato fino a completa fusione ($140 \pm 1^\circ\text{C}$) e fatto estrarre attraverso un ugello avvalendosi di un flusso di aria compressa alla pressione di 4 bar generata da un compressore. I filamenti così ottenuti aventi diametro di 3 mm sono stati conservati all'interno di sacchetti di plastica a temperatura ambiente ed al buio fino a loro utilizzo. I filamenti così ottenuti sono stati utilizzati per la preparazione degli scaffold mediante la tecnica della modellazione a deposizione fusa. In breve, ciascun filamento è stato inserito all'interno di una stampante 3D modello ZMorph SX FDM impostando i parametri come descritto di seguito: temperatura dell'ugello 160°C , temperatura del supporto riscaldato 40°C e velocità di stampa 30 mm/s. La struttura degli scaffold è stata progettata tramite il software Blender 2.78. Gli scaffold

così ottenuti sono stati recuperati dal supporto, accuratamente trattati per rimuovere l'eccesso di polimero e conservati al riparo dalla luce. Ogni preparazione è stata eseguita 12 volte (n=12).

3.2.2.3 Caratterizzazione degli scaffold

Gli scaffold una volta preparati sono stati caratterizzati in termini di peso, spessore, diametro, porosità e contenuto medio di CUR al fine di confermare l'efficacia della tecnica di preparazione.

Peso, spessore, diametro e porosità

Gli scaffold appartenenti a ciascun lotto di preparazione sono stati pesati in una bilancia analitica e analizzati in termini di diametro e spessore utilizzando un micrometro digitale VOGEL (Germania). Successivamente si è proceduto alla determinazione della loro porosità (ε), la quale è stata calcolata secondo la seguente equazione:

$$\varepsilon = 1 - \left(\frac{\rho_{sc}}{\rho_{Bulk}} \right)$$

dove ρ_{sc} e ρ_{Bulk} sono rispettivamente la densità media degli scaffold e quella derivante dalla sommatoria delle densità di ciascun componente (mg/mm^3). Per determinare ρ_{sc} è stata divisa la massa di ciascuno scaffold per il suo volume (conoscendo sperimentalmente sia lo spessore che il diametro). I risultati sono stati riportati come media di 12 misurazioni (n=12) $\pm$ SE.

Uniformità in contenuto della CUR

La determinazione quantitativa della CUR è stata effettuata su 9 campioni di scaffold prelevati randomicamente da ciascun lotto. Brevemente, i campioni sono stati solubilizzati in diclorometano e le risultanti soluzioni sono state opportunamente diluite con lo stesso solvente e sottoposte ad analisi spettrofotometrica UV-Vis, come descritto nel paragrafo 3.2.2.5, utilizzando l'opportuna retta di taratura ed il relativo bianco. I risultati sono stati riportati sia come percentuale in peso di CUR che come variazione percentuale di CUR rispetto al suo valore teorico espressa come $\Delta\text{CUR}\%$ calcolata come segue:

$$\Delta\text{CUR}\% = \left(\frac{\text{CUR}_{real} - \text{CUR}_{teor}}{\text{CUR}_{teor}} \right) \times 100$$

dove CUR_{teor} e CUR_{real} sono rispettivamente la quantità teorica e sperimentale di CUR in ciascuno scaffold. I risultati ottenuti sono riportati come media $\pm$ SE (n=9).

3.2.2.4 Studi di rilascio in vitro della CUR dagli scaffold e valutazione della cinetica di rilascio

Prova di solubilità in solvente acquoso

Al fine di individuare un opportuno liquido accettore idrofilo nel quale la CUR potesse essere rilasciata dalla forma di dosaggio sono stati condotti preliminarmente dei test di solubilità. In breve, sono state preparate soluzioni di tampone fosfato pH 5.8 contenenti lo 0.1% p/v di N-acetilcisteina (NAC) addizionate di albumina bovina sierica (BSA) a tre diverse concentrazioni quali 1, 2 o 3% p/v. Se soluzioni sono state poste ad agitazione magnetica a temperatura ambiente e a quest'ultime è stata aggiunta CUR via via crescente fino a formazione di corpo di fondo. Il sistema così fatto è stato mantenuto sotto costante agitazione, al riparo dalla luce ed a temperatura ambiente per 24 e 48 ore. Al termine di

ciascun tempo sono state prelevate aliquote da 1 mL da ciascun campione e centrifugate a 12,500 rpm per 10 minuti. I surnatanti prelevati sono stati filtrati (0.45 µm), opportunamente diluiti con lo stesso medium e sottoposti ad analisi spettrofotometrica UV-Vis (come riportato nel paragrafo 3.2.2.5) per quantificare la CUR. Gli esperimenti sono stati ripetuti 3 volte ed i risultati sono stati riportati come media ± SE (n=3).

Test di rilascio della CUR dagli scaffold

La capacità degli scaffold di rilasciare la CUR è stata valutata tecnologicamente mediante test di rilascio *in vitro* condotti in liquido accettore idrofilo e lipofilo. Ciascuno scaffold (compreso il campione Blank) è stato inserito all'interno di un vial di vetro tipo borosilicato riempito con 3 mL di liquido accettore tenuto sotto costante agitazione esterna (350 rpm) con un Orbital Shaker (Thermo-Shaker PST 60HL, Biosan) alla temperatura di 37.0±0.5 °C ed al riparo dalla luce.

Per lo studio di rilascio in ambiente idrofilo è stato scelto un medium acquoso costituito da tampone fosfato pH 5.8 addizionato del 5% p/v di BSA e 0.1% di NAC.

Per effettuare il test di rilascio in ambiente lipofilo è stato scelto come liquido accettore il miristato di isopropile. Ad intervalli di tempo determinati, per un totale di 21 giorni per gli esperimenti in solvente idrofilo e 14 giorni per quelli in solvente lipofilo, sono state prelevate aliquote da 1 mL dall'interno del vial ed immediatamente rimpiazzate con uno stesso volume di solvente fresco per mantenere le condizioni sink. I campioni prelevati dagli esperimenti di rilascio in ambiente lipofilo sono stati diluiti con diclorometano in rapporto 1:50 (v/v) e sottoposti a valutazione quantitativa spettrofotometrica, mentre, quelli relativi agli studi di rilascio in ambiente idrofilo sono stati analizzati tal quali. Per la quantificazione della CUR sono state utilizzate le rispettive rette di taratura descritte nel paragrafo 3.2.2.5. Gli esperimenti sono stati ripetuti 3 volte ed i risultati sono stati riportati come percentuale della dose rilasciata ± SE (n=3) in funzione del tempo. Al termine degli esperimenti è stata, inoltre, confrontata la quantità di CUR rilasciata dagli scaffold contenenti il β-TCP con i rispettivi scaffold senza β-TCP, espressa come variazione percentuale media (Δ%) calcolata come segue:

$$\Delta\% = \left(\frac{mg_{\beta} - mg_{no}}{mg_{\beta}} \right) \times 100$$

dove mg_{β} e mg_{no} sono rispettivamente la quantità (in milligrammi) di CUR rilasciata dopo 21/14 giorni dai campioni con e senza β-TCP.

Elaborazione cinetica

I dati ottenuti dai test di rilascio sono stati opportunamente elaborati mediante l'impiego di Microsoft Excel dotato dell'estensione DDSolver (Y. Zhang et al., 2010a). In particolare, sono stati condotti studi di fitting delle curve di rilascio sperimentali con i modelli matematici che si applicano allo studio delle cinetiche di rilascio dei principi attivi dai Drug Delivery Systems. Sono state prese in considerazione i seguenti modelli cinetici: Ordine zero, Primo ordine, Primo ordine con F_{max} e T_{lag} (esclusivamente per gli esperimenti condotti in miristato di isopropile), Higuchi, Korsmeyer-Peppas (Power Law), Korsmeyer-Peppas con T_{lag} , Peppas Sahlin e Peppas- Sahlin con T_{lag} . Per valutare l'aderenza dei dati sperimentali con i modelli presi in considerazione sono stati presi come parametri di riferimento il valore di R^2 e l'andamento grafico della curva dei dati sperimentali.

3.2.2.5 Tecniche usate per la quantificazione di CUR

Le misurazioni UV-Vis sono state eseguite utilizzando uno strumento Shimadzu 1700 (Kyoto, Giappone). La linearità della procedura analitica è stata determinata statisticamente mediante analisi di regressione lineare usando cinque diverse concentrazioni standard di CUR come sotto specificato e valutate in triplicato. Una volta preparate le curve di calibrazione, tre soluzioni di CUR a diversa concentrazione (rientranti nel range esaminato) sono state analizzate e ne è stata calcolata la deviazione standard relativa al fine di validare rispettivamente l'accuratezza e la precisione del metodo analitico. Per la quantificazione della CUR sono state preparate due rette di taratura:

1. Diclorometano: $\rightarrow\lambda_{\max} = 419 \text{ nm}$, range di concentrazione: 0.00005–0.0075 mg/mL; regressione lineare: $\text{Abs} = 0.0036 + 121.56 \times [\text{mg/mL}]$, ($R = 0.999$, SE 0.0035); impiegata per la determinazione quantitativa della CUR negli scaffold e durante i test di rilascio in ambiente lipofilo.
2. Tampone fosfato a pH 5.8 + 0.1% p/v di N-acetilcisteina + 5% p/v di BSA: $\rightarrow\lambda_{\max} = 429.5 \text{ nm}$, range di concentrazione: 0.00075–0.0075 mg/mL; regressione lineare: $\text{Abs} = -0.0014 + 10.86 \times [\text{mg/mL}]$, ($R = 0.999$, SE 0.0016). impiegata per la determinazione quantitativa della CUR per le prove di solubilità e durante i test di rilascio in ambiente lipofilo

Non si osservano interferenze tra la CUR e gli altri componenti utilizzati alle concentrazioni testate, né variazioni in termini di $\lambda_{\max}$. Le variazioni interday e intraday risultano trascurabili poiché al di sotto della soglia di sensibilità dello strumento.

3.2.3 Metodi per realizzare un nanocomposito costituito da NLC di Quercetina incorporate in una spugna bioerodibile di Chitosano carica di Ciprofloxacina per migliorare il successo di interventi di impianto dentale

3.2.3.1 Studi preliminari sulla QRC

Studi di stabilità della QRC in ambiente acquoso

Per la valutazione della stabilità della QRC in ambiente acquoso, finalizzati alla ottimizzazione delle condizioni sperimentali per i successivi studi, sono stati preparati i seguenti solventi:

- PBS pH 7.4 al 10% v/v di DMSO;
- Tampone citrato pH 5.5 al 10% v/v di DMSO;
- Tampone citrato pH 5.5 al 10% v/v di DMSO contenente NAC allo 0.002% p/v.

In breve, tre diverse soluzioni di QRC alla concentrazione di 0.01 mg/mL sono state preparate utilizzando i suddetti solventi, poste all'interno di cuvette di quarzo ed inserite in uno spettrofotometro UV-Vis (Shimadzu 1700, Shimadzu, Kyoto, Giappone). Ogni 10 minuti per un totale di 6 ore sono stati acquisiti gli spettri UV delle soluzioni di QRC (range di lunghezze d'onda: 190-700 nm) valutando eventuali modifiche in termini di forma del picco e valore di assorbanza (abs). I risultati sono stati espressi come variazione percentuale del valore di assorbanza alla massima lunghezza d'onda di assorbimento della QRC (360 nm) nel tempo, secondo la seguente equazione:

$$\text{Variazione abs \%} = \left(\frac{abs_{tn}}{abs_{t0}} \right) \times 100$$

dove abs_{t0} e abs_{tn} sono i valori di assorbanza a 360 nm rispettivamente al tempo zero e ad ogni intervallo di tempo. Ogni test di stabilità è stato condotto in triplicato (n=3) ed i risultati riportati come media $\pm$ errore standard (SE).

Studi di solubilità della QRC e della CPX in ambiente acquoso

Le prove di solubilità della QRC sono state effettuate in una soluzione di tampone citrato pH 5.5 contenente lo 0.002% p/v di NAC ed addizionata alternativamente di DMSO al 10% v/v o di β -CD al 2 o al 3% p/v. Le prove di solubilità della CPX sono state effettuate in una soluzione acquosa contenente il 3% p/v di β -CD ed acido acetico al 0.1% v/v.

I test sono stati condotti aggiungendo QRC o CPX ai rispettivi solventi fino a formazione di corpo di fondo, mantenendo il tutto sotto agitazione magnetica (200 rpm), a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (Heidolph MR3001K Hotplate Stirrer con HeidolphEXT3001 Temperature Probe, Heidolph Instruments, Schwabach, Germania) ed al riparo dalla luce per 120 minuti. Al termine dell'intervallo di tempo selezionato aliquote di 1 mL da ogni soluzione sono state prelevate e centrifugate a 12.500 rpm per 15 minuti (microcentrifuge mySPIN™12 Mini Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, USA). I rispettivi surnatanti sono stati prelevati, filtrati con filtri di PTFE aventi cut-off di 0.2 μm (Millipore, Burlington, USA), diluiti opportunamente con metanolo e quantificati mediante analisi spettrofotometriche UV-Vis, utilizzando le opportune rette di taratura ed il relativo bianco, come riportato nel paragrafo 3.2.3.19. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato (n=3) ed i risultati riportati come media $\pm$ errore standard (SE).

3.2.3.2 Preparazione e caratterizzazione della miscela lipidica

Screening e scelta del lipide liquido

È stata valutata la solubilità della QRC in differenti eccipienti lipidici liquidi a temperatura ambiente quali: Labrasol[®], Capryol PGMC[®], Plurol[®], Maisine[®], Labrafil[®] M 1944 CS, e PEG18G/C. Nello specifico, 950 mg di ciascun eccipiente lipidico sono posti in un becker e addizionati di 50 mg di polvere di QRC. Il sistema è stato sottoposto al trattamento ad ultrasuoni (Emerson Branson 1200, Branson, USA) per 15 minuti al fine di disintegrare eventuali granuli di polvere. Successivamente la miscela è stata posta in un bagno di silicone termostato alla temperatura di $60 \pm 1^\circ\text{C}$ e tenuta sotto agitazione magnetica per 30 minuti al buio. Dopo aver riportato il campione a temperatura ambiente ne è stato osservato il grado di limpidezza. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

Ottimizzazione della composizione quali-quantitativa della miscela lipidica

La composizione della miscela lipidica ha previsto l'utilizzo di un lipide liquido quale il Labrasol[®] (LB) e due lipidi solidi: il glicerilmonostearato (GMS) e l'acido glicerretico (GA). Al fine di incorporare il 5% (p/p) di QRC in questi eccipienti per ottenere una miscela lipidica ottimale sono state condotte diverse prove variando il rapporto in peso tra i diversi componenti come riportato in **Tabella 7**. Per ogni composizione sono stati preparati 1 g di miscela aggiungendo in un becker 50 mg di QRC ad un'appropriata quantità di Labrasol[®] e mantenendo il tutto sotto agitazione magnetica a $60 \pm 1^\circ\text{C}$ per 5 minuti. Successivamente sono stati addizionati il GMS e GA, in quest'ordine, aumentando la temperatura a $120 \pm 1^\circ\text{C}$, per favorirne la fusione e tenendo la miscela sotto costante agitazione magnetica (200 rpm) fino alla formazione di una soluzione limpida. Le miscele fuse così ottenute sono state immediatamente sottoposte a ispezione visiva volta a valutare l'eventuale presenza di cristalli di QRC e l'aspetto generale in termini di colore ed omogeneità. Ogni miscela è stata preparata tre volte (n=3). I campioni che mostravano l'aspetto migliore sono stati posti in un bagnomaria di ghiaccio e sale per 5 min, raffreddati a -20°C per 15 min e, una volta solidificati, nuovamente sottoposti a ispezione visiva, quindi, conservati a 4°C al buio. Analogamente, sono state preparate due miscele senza QRC come controllo, tenendo in considerazione il rapporto tra gli eccipienti del MIX 4 (Blank 1) e MIX 5 (Blank 2).

Tabella 7. Composizione quali-quantitativa delle miscele lipidiche con e senza QRC espressa come percentuale p/p

Miscele	QRC (% p/p)	Labrasol® (% p/p)	GMS (% p/p)	GA (% p/p)
MIX 1	5	46	46	3
MIX 2	5	42.5	42.5	10
MIX 3	5	45	45	5
MIX 4	5	24	68	3
MIX 5	5	24	66	5
Blank 1	0	25	72	3
Blank 2	0	25	70	5

Valutazione del range di temperatura di fusione/rammollimento della miscela lipidica

Piccole aliquote di ogni miscela lipidica sono state inserite all'interno di un capillare di vetro ed il range di fusione/rammollimento è stato valutato utilizzando uno strumento Stuart Melting Point Apparatus SMP30. È stata impostata una velocità di incremento della temperatura pari a 5°C/min. I risultati ottenuti sono stati confrontati con i rispettivi punti di fusione di ciascun componente che costituisce la miscela. Le misurazioni sono state condotte in triplicato ed i risultati sono espressi come media $\pm$ errore standard (SE).

3.2.3.3 Preparazione dei Carrier Lipidi Nanostrutturati (NLC) contenente QRC

Le NLC vuote (NLC) e cariche di QRC (QRC-NLC) sono state preparate secondo il metodo top-down utilizzando la tecnica dell'omogeneizzazione e sonicazione ad alta frequenza come precedentemente descritto nel paragrafo 3.2.1.2. In breve, una quantità accuratamente pesata (800 mg) della miscela lipidica selezionata (MIX 4, MIX 5, Blank 1 e Blank 2) è stata riscaldata fino a completa fusione, addizionata di 160 μ L di limonene (LIM) ed omogeneizzata mediante un Ultraturrax (Polytron Model PT MR 2100, Kinematica, Malvern, Svizzera) a 19.000 rpm per 1 minuto con 40 mL di una fase acquosa costituita da tampone citrato pH 5.5 contenente l'1% p/v di Tween 80, l'1% p/v di Pluronic F-68 e lo 0.002% p/v di NAC, precedentemente riscaldata a $80 \pm 0.5^\circ\text{C}$. La risultante microemulsione è stata sottoposta a sonicazione ad alta frequenza utilizzando un sonicatore con sonda ad immersione SONOPLUS (Bandelin, mod. HD 2070) impostando i seguenti parametri operativi: frequenza 20 kHz, potenza 88-90%, operante in modalità pulsante con cicli di 0.7 secondi di attività e 0.3 secondi di inattività per un totale di 15 minuti. La procedura è stata ripetuta due volte, la prima a temperatura ambiente, e la seconda ponendo la dispersione all'interno di un bagno di ghiaccio e sale per favorire la solidificazione delle NLC. I campioni così ottenuti dalle rispettive miscele sono stati denominati come riportato in **Tabella 8**. Ogni preparazione è stata eseguita 3 volte (n=3).

Tabella 8. denominazione dei campioni di nanoparticelle in funzione della miscela lipidica utilizzata

Miscele lipidiche	Dispersione di NLC
MIX 4	QRC-NLC-A
MIX 5	QRC-NLC-B
Blank 1	NLC-A
Blank 2	NLC-B

3.2.3.4 Determinazione quantitativa della QRC nella dispersione di NLC

Valutazione della quantità totale di Quercetina presente nella dispersione di NLC e della Drug Recovery % (DR%)

La quantità totale di QRC (QRC_{tot}) nelle dispersioni QRC-NLC-A e QRC-NLC-B è stata determinata prelevando aliquote di 100 μ L, ponendole in un matraccio ambrato e diluendole fino a 20 mL con Metanolo al fine di solubilizzare tutti i componenti della preparazione. Le soluzioni limpide ottenute sono state sottoposte ad analisi spettrofotometriche UV-Vis utilizzando l'opportuna retta di taratura ed il relativo bianco, come riportato nel paragrafo 3.2.3.19. Le analisi sono state condotte in triplicato su ciascun lotto di NLC (n=6). I risultati ottenuti sono riportati come media $\pm$ SE ed espressi in termini di Drug Recovery% (DR%) calcolata secondo la seguente equazione:

$$DR\% = \frac{QRC_{tot}(mg)}{\text{Quantità teorica di QRC nella dispersione (mg)}} \times 100$$

Valutazione della Drug Loading % (DL%) e della Loading Efficacy (LE%)

Per valutare l'effettiva quantità di QRC incapsulata all'interno delle NLC è stata utilizzata la tecnica dell'ultrafiltrazione. Aliquote di dispersione appena preparate sono state diluite 100 volte con acqua distillata, inserite nel compartimento superiore di un dispositivo centrifugo Ultrafree-MC avente cut-off 30,000 NMWL (Millipore, USA) e sottoposte ad ultracentrifugazione (Eppendorf Centrifuge 5415 C, Amburgo, Germania) per 20 minuti a 4000 rpm. Al termine del processo, le nanoparticelle sono state ritenute nel filtro, mentre nel compartimento inferiore è stato separato il liquido contenente la quota di QRC non incapsulata. Tale liquido è stato prelevato, opportunamente diluito con metanolo e sottoposto ad analisi HPLC-DAD (Agilent Instrument 1260 Infinity, Agilent Technologies, California, USA) come riportato nel paragrafo 3.2.3.19 per quantificare la QRC ivi presente (QRC_{out}). La Drug Loading % (DL%) e la Loading efficacy % (LE%) sono state quindi indirettamente determinate secondo le seguenti equazioni:

$$DL\% = \frac{(QRC_{tot} - QRC_{out})}{800 \text{ mg di miscela}} \times 100$$
$$LE\% = \frac{(QRC_{tot} - QRC_{out})}{QRC_{tot}} \times 100$$

dove QRC_{tot} è la quantità di QRC totale presente nella dispersione di NLC precedentemente calcolata e QRC_{out} è la quantità di QRC non incapsulata ritrovata in fase disperdente. Gli

esperimenti sono stati condotti in triplicato su ciascun lotto di NLC (n=6) ed i risultati sono riportati come media $\pm$ SE

3.2.3.5 Studi di Dinamic Light Scattering (DLS) e Potenziale Z

Tutte le NLC appena preparate sono state opportunamente diluite (1:99 con H₂O milli-Q) e sottoposte a studi di DLS e Potenziale Z usando uno strumento Malvern Zetasizer NanoZS nelle stesse condizioni descritte nel paragrafo 3.2.1.3. Analogamente è stato analizzato il solo mezzo disperdente acquoso contenente i tensioattivi. Sono stati presi in considerazione i seguenti parametri ottenuti attraverso analisi cumulative della funzione di correlazione: Z-average, indice di polidispersità (PDI) e Potenziale Z. Ogni misurazione è stata ripetuta due volte su ciascun campione di NLC (n=8) ed i risultati sono espressi come media $\pm$ SE.

3.2.3.6 Analisi morfologica delle NLC mediante Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)

L'analisi morfologica del campione QRC-NLC-A è stata investigata tramite microscopia elettronica a scansione (SEM) utilizzando uno strumento Zeiss EVO MA10 (Zeiss, Oberkochen, Germania). La preparazione del campione così come i parametri di analisi e di acquisizione delle immagini sono analoghi a quelli riportati nel paragrafo 3.2.1.5. Le analisi sono state condotte in triplicato (n=3).

3.2.3.7 Preparazione e caratterizzazione delle NLC contenenti QRC in presenza di CPX

La dispersione di NLC arricchita di CPX è stata preparata utilizzando il MIX 4 come fase dispersa. Brevemente, quantità esattamente pesate di CPX (100 mg) sono state solubilizzate in 10 mL di tampone citrato pH 5.5 contenente lo 0.1% v/v di acido acetico glaciale. La soluzione così ottenuta è stata diluita con la fase acquosa (concentrazione di CPX finale pari a 2 mg/mL) e si è proceduto alla preparazione delle nanoparticelle lipidiche come descritto nel paragrafo 3.2.3.3 denominate QRC-NLC-CPX. Analogamente, sono state preparate le NLC vuote utilizzando la miscela Blank 1 (NLC-CPX). Ciascuna dispersione è stata preparata in triplicato (n=3) ed una volta ottenuta è stata immediatamente diluita e sottoposta ad analisi di DLS e Potenziale Z (n=4) come descritto nel paragrafo 3.2.3.5.

3.2.3.8 Preparazione dei nanocompositi

Per la preparazione dei nanocompositi sono state utilizzate le dispersioni di NLC denominate QRC-NLC-A, QRC-NLC-CPX e NLC-CPX. Preliminarmente è stato preparato un gel a base di chitosano e PVP-K90. Il gel è stato preparato aggiungendo 300 mg di CTS e 30 mg di PVP K90 ad una soluzione acquosa pre-acidificata a pH 4 con acido acetico, mantenendo il tutto sotto costante agitazione magnetica (800 rpm) per 4 ore a temperatura ambiente. Il gel, una volta ottenuto, è stato conservato a $4.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ per 24 ore prima dell'uso. Per la preparazione dei nanocompositi (**Tabella 9**) 320 mg di Trealosio ed aliquote di 10.67 g di gel sono state aggiunte alle rispettive dispersioni di NLC ed omogeneizzate a 12.000 rpm per 1 minuto, mantenendo i campioni all'interno di un bagnomaria con ghiaccio per tutta la durata del processo. Le dispersioni ottenute sono state trasferite in falcon da 50 mL, sottoposte a congelamento a $-80.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ per 24 ore (Thermo Forma ultra-freezer -86°C mod. 902 Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) e a successiva disidratazione per 72 ore mediante freeze drying (Labconco FreeZone[®] Kansas City, USA 2.5 Liter Freeze Dry System), impostando il vuoto a 0.014 mbar e la temperatura a $\approx -50^\circ\text{C}$. Al termine della procedura di deidratazione i nanocompositi ottenuti sotto forma di polvere sono stati

conservati a temperatura ambiente al riparo dalla luce. Ogni nanocomposito è stato preparato in triplicato (n=3).

Tabella 9. denominazione di ciascun nanocomposito in funzione della dispersione di NLC utilizzata

Dispersione di NLC	Nanocomposito
QRC-NLC-A	BioQ
QRC-NLC-CPX	BioQ-CPX
NLC-CPX	BioNLC-CPX

3.2.3.9 Determinazione della quantità di QRC e CPX nel nanocomposito

I nanocompositi BioQ, BioQ-CPX e BioNLC-CPX sono stati sottoposti ad analisi quantitative di QRC (quando presente) e CPX. 5 mg di ciascun nanocomposito sono stati solubilizzati in 20 mL di metanolo e sottoposti ad analisi spettrofotometriche UV-Vis al fine di quantificare il/gli attivo/i in essi presente/i, come riportato nel paragrafo **3.2.3.19**. Al fine di valutare sia l'omogeneità di contenuto di ciascun lotto che la riproducibilità del metodo di preparazione, ogni valutazione quantitativa è stata effettuata su tre differenti aliquote del medesimo lotto di nanocomposito e su tutti i nanocompositi prodotti (n=9). I risultati sono espressi come media $\pm$ SE.

3.2.3.10 Determinazione della porosità

La porosità percentuale (Porosità %) del campione BioQ-CPX è stata determinata matematicamente come precedentemente descritto nel paragrafo **3.2.1.12**. La misura del volume apparente della polvere di nanocomposito è stata condotta in triplicato (n=3) e i risultati espressi come media $\pm$ SE.

3.2.3.11 Analisi morfologica del nanocomposito mediante Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)

Il nanocomposito BioQ-CPX è stato sottoposto ad analisi morfologica mediante SEM, in accordo con quanto descritto nel paragrafo **3.2.3.6** in termini di preparazione del campione e di parametri strumentali. Le valutazioni morfologiche sono state condotte su ciascun nanocomposito prodotto (n=3).

3.2.3.12 Test di swelling in peso

La capacità del nanocomposito BioQ-CPX di rigonfiare quando messo a contatto con soluzioni acquose è stata valutata mediante test di swelling in peso. Per poter facilmente maneggiare il campione durante l'esperimento, sono state preparate delle minitabledt in accordo con quanto descritto precedentemente nel paragrafo **3.2.1.15**. Gli esperimenti di swelling sono stati condotti utilizzando quale fluido di imbibizione una soluzione di tampone citrato pH 5.5 seguendo la procedura già descritta nel paragrafo **3.2.1.16**.

I risultati sono stati riportati in termini di Indice di swelling secondo la seguente equazione:

$$\text{Indice di swelling \%} = \left(\frac{Q_{idr} - Q_{sec}}{Q_{sec}} \right) \times 100$$

dove Q_{idr} è il peso del nanocomposito idratato ad ogni intervallo di tempo considerato e Q_{sec} è il peso secco del campione. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato ($n=3$) e i risultati sono stati riportati come media $\pm$ SE in funzione del tempo.

3.2.3.13 Test di igroscopicità

Per valutare la capacità di BioQ-CPX di equilibrarsi con l'umidità ambientale è stato condotto un test di igroscopicità in peso, mediante l'utilizzo di una bilancia analitica a 5 cifre decimali (Mettler, Mod. AE 240) come descritto nel paragrafo **3.2.1.10**. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato ($n=3$) e i risultati sono stati riportati come media $\pm$ SE in funzione del tempo.

3.2.3.14 Test di rilascio di QRC e CPX e valutazione della cinetica del processo

La capacità del nanocomposito BioQ-CPX di rilasciare sia la QRC che la CPX è stata valutata *in vitro* mediante due differenti setting sperimentali.

Test di rilascio della QRC in solvente apolare

Il rilascio della QRC è stato investigato usando un supporto permeabile Tranwell (Corning, US) modificato, avente cut-off pari a 0.45 μm riempito con 5 mg di nanocomposito e 0.2 mL di tampone citrato pH 5.5. Il sistema così fatto è stato immerso in un becker pre-riempito con 8 mL di 1-ottanolo, scelto come liquido accettore apolare, tenuto sotto costante agitazione magnetica a 200 rpm, termostato alla temperatura di 37 ± 0.5 °C ed al buio. A determinati intervalli di tempo, per un totale di 30 ore, sono state prelevate dal liquido accettore aliquote di 1 mL, rapidamente rimpiazzate con un uguale volume di solvente puro, al fine di mantenere le condizioni sink del sistema. Le aliquote sono state opportunamente diluite in metanolo e sottoposte ad analisi spettrofotometriche UV-Vis per quantificare la QRC, come riportato nel paragrafo **3.2.3.19** utilizzando la rispettiva curva di taratura e bianco. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato ($n=3$) ed i risultati sono stati riportati come media della frazione della dose rilasciata $\pm$ SE in funzione del tempo.

Test di rilascio della Ciprofloxacina in solvente polare

Gli studi di rilascio della CPX sono stati condotti utilizzando una soluzione di tampone citrato pH 5.5 contenente lo 0.1% v/v di acido acetico glaciale, selezionata come liquido accettore polare, a mezzo di due distinte tecniche:

- a. Metodo della dialisi: Inizialmente viene preparata una dispersione di nanocomposito ad una concentrazione di 10 mg/mL disperdendo la polvere in tampone citrato pH 5.5 contenente lo 0.1% v/v di acido acetico glaciale. 1 mL di questa dispersione è stata inserita all'interno di un tubo per dialisi di cellulosa rigenerata pre-attivata (Spectra/Por[®], MWCO 12–14,000 Da, Thermo Fisher Scientific). L'intero sistema è stato immerso in un becker contenente 15 mL di liquido accettore polare, tenuto sotto costante agitazione magnetica a 200 rpm, termostato alla temperatura di 37 ± 0.5 °C ed al buio. Gli esperimenti sono stati condotti per 30 ore;
- b. Metodo della cella di Franz: 10 mg di nanocomposito e 0.5 mL di tampone citrato pH 5.5 vengono inseriti nel compartimento donatore di una cella a diffusione

verticale di tipo Franz (Permeagear, flat flange joint, 9 mm orifice diameter, 15 mL acceptor volume, SES GmbH-Analysesysteme, Bechenheim, Germany) e separati tramite una membrana per dialisi dal compartimento accettore riempito con 15 mL di liquido accettore polare. L'intero sistema viene tenuto sotto costante agitazione magnetica a 200 rpm, termostato alla temperatura di 37 ± 0.5 °C ed al buio. Gli esperimenti sono stati condotti per 6 ore.

Per entrambe le tipologie di esperimento, a determinati intervalli di tempo, dal liquido accettore polare sono state prelevate aliquote di 0.5 mL, rapidamente rimpiazzate con un uguale volume di solvente puro al fine di mantenere le condizioni sink. I campioni prelevati sono stati opportunamente diluiti con metanolo ed analizzati mediante spettrofotometria UV-Vis, come riportato nel paragrafo **3.2.3.19** per quantificare la CPX, utilizzando la rispettiva retta di taratura e bianco. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato ($n=3$) ed i risultati sono stati riportati come media della frazione della dose rilasciata $\pm$ SE in funzione del tempo.

Elaborazione cinetica dei dati di rilascio della QRC e CPX

I dati ottenuti dai test di rilascio in vitro sono stati opportunamente elaborati mediante l'impiego del software Origin 8.5. In particolare, sono stati condotti studi di fitting delle curve di rilascio ottenute con i più comuni modelli che si applicano allo studio delle cinetiche di rilascio dei principi attivi dai Drug Delivery Systems. Sono state prese in considerazione le seguenti equazioni cinetiche: Ordine zero, Primo ordine, Higuchi e Korsmeyer-Peppas (Power Law). L'aderenza dei punti sperimentali con modelli matematici considerati è stata valutata utilizzando il valore di R^2 ottenuto e l'effettiva coincidenza tra i punti sperimentali e la curva teorica restituita dal software.

3.2.3.15 Studi ex vivo

Studi di permeazione della QRC e CPX attraverso mucosa buccale porcina

La capacità di QRC e CPX di permeare e/o accumularsi all'interno dei tessuti è stata valutata mediante studi *ex vivo*, utilizzando la mucosa buccale porcina come modello tissutale. La modalità di ottenimento e preparazione del tessuto mucosale così come il setting sperimentale sono analoghi a quelli riportati nel paragrafo **3.2.1.18**. Il compartimento donatore è stato riempito con 30 mg di BioQ-CPX e 0.2 mL di tampone citrato pH 5.5 mentre il compartimento accettore è stato riempito con 15 mL di una soluzione composta da tampone citrato pH 5.5, 0.1% v/v di acido acetico glaciale, 0.002% p/v di NAC e 3% p/v di β -CD. Ad intervalli di tempo prestabiliti (30 min) sono state prelevate aliquote da 0.5 mL dal compartimento accettore, immediatamente rimpiazzate con un uguale volume di fluido accettore fresco al fine di mantenere le condizioni sink. I campioni prelevati sono stati sottoposti ad analisi UV-Vis al fine di quantificare gli attivi eventualmente presenti nel liquido accettore, come descritto nel paragrafo **3.2.3.19**. Gli esperimenti sono stati ripetuti 6 volte ($n=6$).

Valutazione dell'accumulo della QRC e CPX in membrana

Gli studi di accumulo tissutale degli attivi sono stati condotti al termine dei test di permeazione *ex vivo*. Per valutare la dipendenza del fenomeno di accumulo tissutale della QRC e della CPX dal tempo di contatto della formulazione con la mucosa, sono stati condotti ulteriori test di permeazione *ex vivo* terminando gli stessi a diversi time points nell'intervallo

tra 1 e 6 ore. Dopo ogni test di permeazione la cella di Franz è stata disassemblata ed il tessuto mucosale è stato trattato con metanolo a caldo come precedentemente descritto nel paragrafo **3.2.1.18**. La risultante soluzione metanolica è stata sottoposta ad analisi spettrofotometrica UV-Vis al fine di quantificare gli attivi eventualmente presenti all'interno del tessuto come riportato nel paragrafo **3.2.3.19**. I risultati sono stati riportati come media $\pm$ SE della percentuale della dose intrappolata nel tessuto rispetto alla dose caricata nel compartimento donatore, per ciascun attivo. Ogni esperimento è stato effettuato 6 volte (n=6).

3.2.3.16 valutazione del potere antiossidante del nanocomposito mediante test DPPH

Il potere antiossidante del nanocomposito è stato valutato mediante l'utilizzo del saggio di DPPH. Prima di ogni esperimento una soluzione preparata aggiungendo 0.5 mL di metanolo puro con 2.5 mL di una soluzione di DPPH (0.0295 mg/mL) è stata posta in una cuvette di polistirene e sottoposta ad analisi spettrofotometrica UV-Vis alla lunghezza d'onda di riferimento (515 nm) utilizzando etanolo puro come bianco al fine di determinare il valore di assorbanza del reattivo al tempo 0. Quindi, aliquote accuratamente pesate del campione BioQ-CPX sono state dissolte in metanolo al fine di ottenere quattro soluzioni aventi concentrazione di 4, 2, 1 e 0.5 mg/mL di nanocomposito. Da ciascuna soluzione sono stati prelevati 0.5 mL e diluiti fino a 3 mL con una soluzione etanolica di DPPH (0.0295 mg/mL) all'interno di una cuvette di polistirene e conservata al riparo dalla luce ed a temperatura ambiente. A determinati intervalli di tempo (15 minuti, 1 e 2 ore) le soluzioni sono state sottoposte ad analisi spettrofotometrica UV-Vis alla lunghezza d'onda di 515 nm utilizzando etanolo puro come bianco. Nello stesso modo sono stati analizzati sia il nanocomposito BioNLC-CPX (concentrazioni: 4, 2 e 1 mg/mL) usato come controllo negativo che soluzioni metanoliche di QRC (concentrazioni: 0.08, 0.04, 0.02, and 0.01 mg/mL) usate invece come controllo positivo. I valori di concentrazione di DPPH sono stati calcolati mediante la seguente retta di taratura preparata in etanolo: 5 soluzioni in un range di concentrazione 0.039–0.0156 mg/mL; ($\lambda_{\max} = 515$ nm, $\text{Abs} = 27.15 + 0.048 \times [\text{DPPH mg/mL}]$, $R = 0.999$). I risultati sono stati espressi come percentuale di DPPH residua (RCD %) secondo la seguente equazione:

$$\text{RCD \%} = \frac{\text{DPPH}_i - \text{DPPH}_t}{\text{DPPH}_i} \times 100$$

dove DPPH_i e DPPH_t sono rispettivamente la concentrazione di DPPH al tempo zero calcolata dall'assorbanza ottenuta analizzando la soluzione di DPPH senza nanocomposito prima dell'esperimento e quella ottenuta analizzando l'assorbanza registrata durante l'esperimento ad ogni intervallo di tempo considerato. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato (n=3) e i risultati sono riportati come media $\pm$ SE.

3.2.3.17 Valutazione delle proprietà antimicrobiche del nanocomposito

Valutazione della concentrazione minima inibitoria (MIC)

Per valutare le proprietà antimicrobiche, i campioni BioQ-CPX, BioQ, e CTR (gel senza attivi e nanoparticelle dopo deidratazione mediante freeze-drying) sono stati selezionati e trattati con ceppi di *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, il quale cresce sottoforma di cellule planctoniche (Presentato et al., 2020). Gli esperimenti sono stati condotti come segue. Inizialmente una singola colonia di *S. aureus* è stata pre-coltivata in brodo di soia triptico

(di seguito denominato come TSB; Merck, Milano, Italia) per circa 16 ore a 37 ± 0.5 °C sotto costante agitazione esterna (160 rpm). Prima di ogni esperimento aliquote di campioni di nanocomposito e di CTR sono stati omogeneamente dispersi (mediante l'ausilio di un vortex) in TBS al fine di ottenere tre concentrazioni pari a 1, 2.5 e 5 mg/mL di polvere. Quindi le cellule batteriche sono state inoculate ad una concentrazione di 0.05% v/v [corrispondente a circa 5×10^5 unità formanti colonie (CFU) per millilitro di coltura] nei campioni precedentemente descritti e incubate per 24 ore. Il numero di cellule batteriche sopravvissute al trattamento con BioQ-CPX, BioQ e CTR (espresso come CFU/mL vitali) è stato valutato mediante il metodo di conteggio su piastra e confrontate con un controllo (cellule batteriche non trattate). Ogni esperimento è stato condotto in triplicato e i dati sono riportati come CFU/mL in scala logaritmica in base dieci.

Valutazione delle proprietà anti-biofilm

Il nanocomposito BioQ-CPX è stato ulteriormente utilizzato per studiarne le capacità sia di inibire la formazione di biofilm da *S. aureus* che di eradicare un biofilm preformato. Ceppi batterici pre-coltivati come descritto nel paragrafo precedente sono stati aliquotati (200 µL) in piastre da 96 pozzetti ed ogni coltura è stata trattata con 5 mg di nanocomposito sotto forma di minitabulet (preparata come riportato nel paragrafo **3.2.1.15**). Le piastre sono state incubate per 24 ore a 37 ± 0.5 °C in statico per permettere la formazione del biofilm. Dopo il periodo di incubazione le colture batteriche sono state tolte ed ogni pozzetto lavato 3 volte con 200 µL di soluzione fisiologica sterile (NaCl 0.9% p/p) per rimuovere tutte le cellule non adese. Il biofilm è stato trattato con 200 µL di una soluzione di cristal- violetto allo 0.1% p/v per 15 minuti a temperatura ambiente. Infine, i pozzetti sono stati nuovamente lavati 5 volte con uno stesso volume di soluzione fisiologica sterile ed essiccati per 20 minuti a 65 ± 0.5 °C. Il cristal-violetto rimasto legato al biofilm è stato solubilizzato con 200 µL di una soluzione di acido acetico al 30% v/v e il rispettivo valore di assorbanza è stato valutato con uno spettrofotometro DU-730 Life Science spectrophotometer (Beckman Coulter, Brea, USA) impostando 600 nm come lunghezza d'onda di riferimento. Nelle stesse condizioni è stato valutato l'effetto di una soluzione di sola CPX alla stessa concentrazione di quella presente nel nanocomposito. Inoltre, colture cellulari non trattate sono state utilizzate come controllo positivo, mentre pozzetti senza cellule ma riempiti del solo *medium* sono stati usati come controllo negativo. Le proprietà antibiofilm sono state riportate come percentuale di inibizione del biofilm (BI%) o di eradicazione del biofilm (BE%) e calcolato secondo la seguente equazione:

$$BI \text{ (o BE) } \% = \frac{Abs \text{ controllo positivo} - Abs \text{ pozzetto trattato}}{Abs \text{ controllo positivo}} \times 100$$

ogni esperimento è stato condotto in triplicato (n=3) ed i risultati sono riportati come media $\pm$ SE.

3.2.3.18 Valutazione della stabilità del nanocomposito

Valutazioni della stabilità della QRC in BioQ-CPX dopo irradiazione UV mediante spettroscopia EPR

La capacità del nanocomposito di preservare le proprietà antiossidanti della QRC è stata valutata mediante misure di EPR utilizzando uno strumento Bruker ELEXSYS E-500 (Bruker, Billerica USA) operante a 9.8 GHz (X-band), 6 mW di potenza delle microonde e 0.15 mT di ampiezza di modulazione. Inizialmente è stato caratterizzato il comportamento del centro paramagnetico della QRC pura prima e dopo 20 minuti di esposizione alle radiazioni UV, usando una lampada da 50 W. Successivamente campioni da 25 mg di BioQ-CPX o 1 mg di QRC sono stati posizionati su un vetrino in maniera tale da avere uno spessore inferiore a 5 mm ed ottenere così una buona distribuzione dell'irraggiamento. I campioni sono stati irradiati con raggi UVA/UVB mediante rispettivamente lampade da 25 e 50 W (Light-Emitting Diode Philips, Amsterdam, Olanda). I campioni sono stati misurati mediante EPR ogni 5 minuti per un tempo totale di irraggiamento di 60 minuti. I segnali ottenuti da ogni misurazione sono stati normalizzati alla quantità di QRC presente in ogni campione analizzato. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato (n=3) ed i risultati sono riportati come media $\pm$ SE.

Valutazione della stabilità alla conservazione della QRC e CPX all'interno del nanocomposito

Per valutare la stabilità degli attivi nel campione BioQ-CPX durante la conservazione a temperatura ambiente ed esposto all'illuminazione naturale, sono state condotte delle analisi quantitative di QRC e CPX nel tempo. Immediatamente dopo la preparazione del nanocomposito (t=0) sono state prelevate da porzioni diverse del lotto tre aliquote, accuratamente pesate, dissolte in metanolo e analizzate spettrofotometricamente per quantificarne gli attivi (Q_0) come riportato nel paragrafo 3.2.3.19. A determinati intervalli di tempo, per un totale di 9 mesi, sono state ripetute le analisi, come descritto per il tempo zero e quantificati rispettivamente QRC e CPX (Q_n). I risultati sono riportati come quantità percentuale di QRC e CPX ad ogni intervallo di tempo rispetto al loro valore iniziale (imposto come 100%), come riportato nella seguente equazione:

$$\frac{Q_n}{Q_0} \times 100$$

i test di stabilità sono stati condotti su tre lotti di nanocomposito (n=9).

3.2.3.19 Analisi quantitative di QRC e CPX

Mediante analisi spettrofotometrica UV-Vis

Le analisi UV-Vis sono state eseguite utilizzando uno strumento Shimadzu 1700 (Kyoto, Giappone). La linearità della procedura analitica è stata determinata statisticamente mediante analisi di regressione lineare usando cinque diverse concentrazioni di attivi come sotto specificato e valutate in triplicato.

Per quantificare la QRC nei differenti fluidi degli esperimenti sono state costruite due rette di taratura

- 1) in metanolo: $\rightarrow \lambda_{\max} = 360 \text{ nm}$, range di concentrazione: 0.0006–0.05 mg/mL, regressione lineare: $\text{Abs} = -0.00224 + 44.36 \times [\text{mg/mL}]$, ($R = 0.999$, SE 0.0059); impiegata per la determinazione quantitativa della QRC durante le prove di

solubilità, analisi quantitative delle NLC e nanocomposito, durante i test di rilascio e in seguito alle estrazioni di membrana negli esperimenti *ex vivo*.

- 2) in tampone citrato pH 5.5 al 3% β -CD (p/v): $\rightarrow\lambda_{\max} = 370$ nm, range di concentrazione: 0.0001–0.005 mg/mL; regressione lineare: $\text{Abs} = -0.00461 + 64.57 \times [\text{mg/mL}]$, ($R = 0.999$, SE 0.0026). Utilizzata per la quantificazione dell'attivo durante i test di permeazione *ex vivo*.

Per quantificare la CPX nei differenti fluidi degli esperimenti sono state costruite due rette di taratura:

- 1) in metanolo: $\rightarrow\lambda_{\max} = 282$ nm, range di concentrazione: 0.0005–0.01 mg/mL; regressione lineare: $\text{Abs} = -0.00646 + 119 \times [\text{mg/mL}]$, ($R = 0.999$; SE 0.0054); impiegata per la determinazione quantitativa della CPX nelle dispersioni di NCL e nei nanocompositi così come in seguito alle estrazioni di membrana negli esperimenti *ex vivo*.
- 2) in tampone citrato pH 5.5 al 3% p/v di β -CD: $\rightarrow\lambda_{\max} = 276$ nm, range di concentrazione: 0.0005–0.008 mg/mL; regressione lineare: $\text{Abs} = -0.0355 + 106 \times [\text{mg/mL}]$; ($R = 0.999$, SE 0.0048). Impiegata per la determinazione quantitativa della CPX durante i test di solubilità, rilascio e permeazione *ex vivo*.

Alle concentrazioni testate non sono state osservate interferenze tra QRC, CPX e gli altri componenti utilizzati (lipidi, tensioattivi, Sali ecc), né variazioni in termini di $\lambda_{\max}$. Le variazioni interday e intraday sono risultate trascurabili poiché al di sotto della soglia di sensibilità dello strumento.

Mediante analisi HPLC-DAD

Le analisi HPLC sono state condotte per la determinazione quantitativa della QRC utilizzando uno strumento Agilent dotato di una pompa quaternaria (G1311B) Agilent 1260 Infinity, un detector DAD 1260 Infinity II, un autocampionatore, un compartimento termostato per le colonne cromatografiche 1260 Infinity II (volume iniettato: 20 μ L; temperatura vano colonna: $25 \pm 1^\circ\text{C}$) e il software OpenLAB CDS ChemStation Workstation. La separazione cromatografica è stata condotta utilizzando una colonna ACE[®] Excel Super C18 (lunghezza: 12.5 cm; diametro interno 4.6 mm; pore size 5 μ m) e una fase mobile costituita da Acqua allo 0.1% (v/v) di acido trifluoroacetico (TFA) (solvente A) e Acetonitrile (solvente B) impiegando il seguente gradiente: 0-2 minuti $\rightarrow$ A:B = 70:30; 2-8 minuti $\rightarrow$ A:B = 20:80; 8-12 minuti $\rightarrow$ A:B = 70:30. Il flusso è stato impostato a 1 mL/min e la lunghezza d'onda della lampada UV è stata settata a 360 nm (range di scansione: 190-800 nm); in queste condizioni la QRC ha un tempo di ritenzione di 5,89 minuti. Per la quantificazione della QRC viene usata una curva di calibrazione preparata iniettando sei soluzioni standard in un range di concentrazione 0.0002-0.01 mg/mL [retta di taratura: $y = -1.144 + 18321.5 [\text{mg/mL}]$ ($R = 0.999$); LOD e LOQ sono rispettivamente 0.0006 μ g/mL e 0.002 μ g/mL]. Le variazioni interday e intraday risultano trascurabili poiché al di sotto della soglia di sensibilità dello strumento.

3.2.4. Metodi per promuovere l'assorbimento sublinguale del Resveratrolo e realizzazione di microparticelle polimeriche mediante spray drying per la preparazione di mini-tablets sublinguali fast-dissolving

3.2.4.1. Studi di stabilità del RSV in ambiente acquoso

Gli studi di stabilità del RSV in ambiente acquoso sono stati condotti utilizzando una miscela di tampone citrato pH 5.5 e PEG200 in rapporto 80:20 (v/v), in presenza o in assenza di N-Acetilcisteina (NAC) alla concentrazione di 0.002 mg/mL (rapporto 1:1 p/p con il RSV). 10 mL di una soluzione 0.001 mg/mL di RSV, con e senza NAC, è stata preparata in un matraccio ambrato e tenuta per 6 ore sotto costante agitazione magnetica (200 rpm), a $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ed al riparo dalla luce. Ogni 30 minuti, una aliquota da 0.5 mL è stata prelevata e sottoposta ad analisi quantitativa sia mediante HPLC che mediante spettrofotometria UV-Vis, come descritto nel paragrafo 3.2.4.13. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato ed i risultati sono espressi come media $\pm$ errore standard (SE).

3.2.4.2. Studi *ex vivo* di permeazione/accumulo in tessuto porcino del RSV

Preparazione del tessuto mucosale

I campioni di mucosa sublinguale porcina sono stati ricavati dal tessuto rimosso dalla superficie ventrale della lingua subito dopo il sacrificio di maiali domestici di età media di 12 mesi destinati all'alimentazione umana. In analogia a quanto precedentemente descritto (paragrafo 3.2.1.18), le lingue sono state trasferite entro 1 h dal sacrificio dell'animale presso il laboratorio di ricerca, lavate con soluzione isotonica, trattate con la stessa al 5% (p/v) di trealosio per un'ora e, in seguito, conservate a una temperatura di -80°C , per una settimana. Prima del loro utilizzo le mucose sono state lavate con soluzione isotonica e sottoposte a shock termico per ottenere l'epitelio mucosale separato dai tessuti sottostanti. La mucosa sublinguale ottenuta, di spessore $80 \pm 8 \mu\text{m}$, è stata sottoposta a condizionamento e rilascio enzimatico in soluzione isotonica (sostituita più volte), conservata a 4°C ed utilizzata entro 24 ore.

*Studi di permeazione *ex vivo* attraverso mucosa sublinguale porcina*

Gli esperimenti di permeazione *ex vivo* sono stati condotti utilizzando celle di diffusione verticale di tipo Franz, come descritto nel paragrafo 3.2.1.18. In questo caso, la mucosa sublinguale è stata interposta tra i due compartimenti accettore e donatore riempiti rispettivamente con 15 mL di tampone citrato pH 5.5 addizionato del 3% (p/v) di β -CD ed 1 mL di una soluzione 1 mg/mL di RSV (in tampone citrato pH 5.5 e PEG200 in rapporto 80:20 v/v) in assenza o in presenza di *chemical permeation enhancer* (CPE). I CPE utilizzati sono stati i seguenti: sodio dodecil solfato (SDS), lisina cloridrato (LYS), mentolo (M), urea (U), sodio deidrocolato (SDC) e Transcutol® (T). In tutti i casi questi sono stati aggiunti alla concentrazione di 0.2 mg/mL al fine di ottenere un rapporto in peso tra il RSV e i CPE di 5:1. L'intero sistema è stato mantenuto sotto costante agitazione magnetica a 200 rpm, termostato alla temperatura di $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ed al riparo dalla luce per un totale di 3 ore. Ogni 15 minuti sono state prelevate aliquote di 0.5 mL dal compartimento accettore, repentinamente rimpiazzate con solvente fresco per mantenere le condizioni *sink*. Le aliquote collezionate sono state sottoposte ad analisi spettrofotometriche UV-Vis, come descritto nel paragrafo 3.2.4.13. Ogni esperimento è stato ripetuto 6 volte ($n=6$) ed i risultati sono riportati come media $\pm$ SE.

Studi di accumulo del RSV nella mucosa sublinguale porcina

Gli studi di accumulo tissutale del RSV sono stati condotti al termine dei test di *permeazione ex vivo*. In breve, le celle sono state disassemblate e la quantità di RSV accumulata all'interno della mucosa sublinguale porcina è estratta utilizzando metanolo, in analogia a quanto descritto nel paragrafo **3.2.1.18**. Le soluzioni di estrazione ottenute sono state sottoposte ad analisi spettrofotometriche UV-Vis, come descritto nel paragrafo **3.2.4.13**. Ogni estrazione è stata ripetuta 6 volte (n=6) ed i risultati sono riportati come media $\pm$ SE.

3.2.4.3. Determinazione dei parametri biofarmaceutici

Dai dati relativi agli esperimenti di permeazione *ex vivo* del RSV è possibile determinare i seguenti parametri biofarmaceutici: flusso attraverso la membrana (J), coefficiente di permeabilità (Kp) e lag time (T_{lag}). In particolare, il flusso è stato calcolato come già riportato nel paragrafo **3.2.1.18**. In seguito è stato quindi possibile calcolare il coefficiente di permeabilità Kp, che si ottiene dividendo i valori di J per la concentrazione di farmaco presente nel compartimento donatore (Cd), come riportato nella seguente equazione:

$$Kp = \frac{J}{Cd} \text{ (cm/h)}$$

Infine, valutando l'intercetta della tangente alla porzione lineare della curva di permeazione con l'asse delle x, è possibile determinare il T_{lag}.

Analogamente, i dati sperimentali ottenuti dagli studi di accumulo in mucosa sono stati elaborati in termini di Drug entrapment (De) ed Accumulation (Ac). La De rappresenta la quantità di farmaco intrappolato in membrana per unità di superficie e può essere calcolata come segue:

$$De = \frac{Q_t}{A} \left(\frac{\text{mg}}{\text{cm}^2} \right)$$

dove Q_t è la quantità di farmaco che rimane intrappolata nel tessuto (espressa in mg) e A è l'area effettiva disponibile per l'accumulo (0.636 cm²). Una volta ottenuto il valore di De è possibile calcolarne l'Ac, ovvero l'accumulo in membrana normalizzato alla dose somministrata, che si ottiene come segue:

$$Ac = \frac{De}{Cd} \text{ (cm)}$$

Dove Cd rappresenta la concentrazione del farmaco caricata nel compartimento donatore (Di Prima et al., 2019). I risultati ottenuti sono espressi come media di 6 esperimenti $\pm$ SE.

3.2.4.4. Preparazione di microparticelle cariche di RSV tramite Spray drying

Per la realizzazione delle microparticelle cariche di RSV sono state preparate soluzioni etanoliche al 5% (p/v) secondo le composizioni riportate in **Tabella 10**. Un totale di 2.5 g di materiale costituito da eccipienti e RSV è stato solubilizzato in 50 mL di etanolo, partendo dal PVP K90 e aggiungendo a seguire il sorbitolo, il PEG200, il glicole propilenico (quando presente) e infine il RSV. Le soluzioni limpide ottenute sono state utilizzate per la preparazione delle microparticelle mediante Spray Drying utilizzando un MINI Spray Dryer BUCHI B-290 equipaggiato con un inert-loop B-295 e settando i seguenti parametri: temperatura di inlet pari a 110°C, flusso di soluzione pari a 100 mL/h, aspirazione di azoto al 100%, temperatura di raffreddamento (inert-loop) pari a -20°C. Lo strumento è stato, inizialmente condizionato con 30 mL di etanolo; quindi si è proceduto trattando le soluzioni

preparate. Infine, lo strumento è stato lavato con ulteriori 30 mL di etanolo avendo cura di lasciare i tubi asciutti. A seguito di raffreddamento il campione di microparticelle è stato recuperato.

Tabella 10. Composizione percentuale (p/p) delle microparticelle preparate mediante Spray Drying

Componenti (%)	RSV-A	RSV-B	RSV-C	RSV-D
PVP-K90	59	45	49	35
PEG 200	20	20	30	20
Sorbitolo	6	20	6	10
Glicole propilenico	-	-	-	10
RSV	15	15	15	15

Analogamente sono stati preparati lotti di microparticelle preparati a partire dalle composizioni indicate come RSV-B e RSV-C ma addizionati di differenti CPE quali M, LYS e U all'1-3% (p/v). I CPE sono stati aggiunti a discapito del PVP K90 secondo le composizioni riportate in **Tabella 11**. Tuttavia, poiché la LYS alle quantità considerate è insolubile in etanolo è stata preventivamente solubilizzata in 1.5 mL di acqua per HPLC e successivamente aggiunta alla soluzione etanolica in cui erano stati già solubilizzati gli altri eccipienti. Ciascuna preparazione è stata prodotta in triplicato (n=3).

Tabella 11. Composizione percentuale (p/p) delle microparticelle contenenti i CPE preparate mediante Spray Drying

Componenti (%)	RSV-B/LYS-3	RSV-B/M-3	RSV-B/U-3	RSV-B/U-1	RSV-C/LYS-3
PVP-K90 (%)	42	42	42	44	46
PEG 200 (%)	20	20	20	20	30
Sorbitolo (%)	20	20	20	20	6
LYS (%)	3	-	-	-	3
M (%)	-	3	-	-	-
U (%)	-	-	3	1	-
RSV (%)	15	15	15	15	15

3.2.4.5. Caratterizzazione delle microparticelle in termini di Resa percentuale (RS%), Drug loading (DL%) e Loading Efficacy (LE%)

Le microparticelle ottenute mediante Spray Drying sono state immediatamente pesate e la resa percentuale (RS%) del processo è stata calcolata come segue:

$$RS\% = \frac{\text{microparticelle ottenute (g)}}{\text{Peso componenti iniziale (g)}} \times 100$$

Successivamente, 5 mg di campione sono stati solubilizzati in metanolo e portati al volume di 10 mL in un matraccio ambrato. Le soluzioni così ottenute sono state opportunamente diluite, filtrate con filtri di nylon (0.22 µm) e sottoposte ad analisi HPLC, come riportato nel paragrafo 3.2.4.13. Al fine di valutare sia l'omogeneità di contenuto di ciascun campione, che la riproducibilità degli stessi, ogni valutazione è stata fatta su tre differenti aliquote di ciascun lotto di microparticelle preparato (n=9). I risultati ottenuti sono stati riportati in termini di Drug Loading (DL%) e Loading Efficacy (LE%) calcolate come segue:

$$DL\% = \frac{RSV (mg)}{\text{microparticelle cariche di RSV (mg)}} \times 100$$

$$LE\% = \frac{RSV (mg)}{\text{quantità teorica di RSV (mg)}} \times 100$$

I risultati sono espressi come media ± SE.

3.2.4.6. Preparazione e caratterizzazione delle mini-tablets sublinguali

Al fine di standardizzare la dose di microparticelle in termini di peso, volume e contenuto di RSV sono state preparate delle mini-tablets sublinguali (aventi volume di 0.2 cm³) come già descritto nel paragrafo 3.2.1.15. Per confermare la riproducibilità del metodo di preparazione è stata valutata l'uniformità in peso di 6 mini-tablets utilizzando una bilancia analitica Mettler Toledo AE240. I dati ottenuti sono espressi come media di 6 misurazioni (n=6) ± SE.

3.2.4.7. Studi di permeazione e accumulo *ex vivo* dopo somministrazione di mini-tablets sublinguali cariche di RSV

Gli studi di permeazione e accumulo *ex vivo* sono stati condotti come già descritto nel paragrafo 3.2.4.2 caricando nel compartimento donatore le mini-tablets sublinguali precedentemente preparate e bagnate con 300 µL di tampone citrato pH 5.5. Al termine di ogni esperimento, e prima di procedere con la valutazione del RSV accumulato in mucosa (come descritto nel paragrafo 3.2.4.2), il liquido presente nel compartimento donatore è stato prelevato, centrifugato, e sottoposto ad analisi HPLC a seguito di opportuna diluizione metanolica, come descritto nel paragrafo 3.2.4.13 al fine di determinare la concentrazione reale di RSV nel compartimento donatore. Inoltre, sono state condotti ispezioni sia visive che tattili su ciascuna mini-tablet residua al termine dei test *ex vivo* e sono stati calcolati i parametri biofarmaceutici di interesse come descritto nel paragrafo 3.2.4.3. Gli esperimenti sono stati ripetuti 6 volte e tutti i risultati sono riportati come media ± SE.

3.2.4.8. Analisi morfologica delle microparticelle mediante Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)

Le analisi SEM sono state condotte sulle microparticelle denominate RSV-B. La preparazione del campione e i parametri operativi adottati sono analoghi a quanto riportato nel paragrafo 3.2.1.5.

3.2.4.9. Spettroscopia a infrarossi in modalità di riflettanza totale attenuata (FTIR-ATR)

Le analisi FTIR sono state condotte in modalità ATR utilizzando uno spettrometro a infrarossi a trasformata di Fourier (Nicoret iS5, Thermo Scientific™, Waltham, USA) equipaggiato con un'unità IDR (ZnSe ATR) della Thermo Scientific™. Gli spettri del RSV, del PVP K90 e delle microparticelle denominate RSV-B sono stati ottenuti come sommatoria di 32 misurazioni nel range 500-4000 cm⁻¹ e normalizzati ai rispettivi spettri del background.

3.2.4.10. Analisi di Diffrazione a raggi X (XRD)

Lo stato fisico dei componenti delle microparticelle RSV-B e del RSV tal quale è stato valutato tramite diffrazione a raggi X utilizzando uno strumento D-8 Focus (Bruker, USA) e settando i seguenti parametri operativi: angoli compresi tra 5 e 60° in $\theta/2\theta$; velocità pari a 2°/min; voltaggio pari a 40 kV e 30 mA; temperatura ambiente. Le analisi XRD condotte sul campione di microparticelle sono state effettuate sia immediatamente dopo la preparazione che dopo 6 mesi di conservazione a temperatura ambiente ed al riparo della luce.

3.2.4.11. Studi di disintegrazione delle mini-tablets sublinguali di RSV-B

Al fine di determinare il tempo di disintegrazione (TD) delle mini-tablets sublinguali ottenute dalle microparticelle RSV-B sono stati condotti due differenti test.

Test di disintegrazione

Il test di disintegrazione secondo farmacopea è stato valutato immergendo una mini-tablet in 900 mL di acqua distillata termostata a 37.0±0.5°C sotto costante agitazione magnetica (100 rpm). Il tempo necessario per osservare la completa disgregazione della mini-tablet è stato cronometrato e riportato in secondi. Il test è stato ripetuto 6 volte ed i risultati espressi come media ± SE.

Test visivo di disintegrazione

Un test puramente visivo è stato condotto per mimare il comportamento della mini-tablet dopo somministrazione sublinguale. Una mini-tablet è stata posizionata all'interno di un crogiolo e bagnata con 1 mL di una soluzione di tampone citrato pH 5.5 preriscaldata a 37.0±0.5°C. Durante tutto l'esperimento sono state acquisite immagini e video (velocità normale o slow motion) fino alla completa disintegrazione del campione. Ogni test è stato ripetuto 6 volte.

3.2.4.12. Test di dissoluzione *in vitro*

La quantità di RSV rilasciato dalle mini-tablets sublinguali nel tempo è stato valutato con un test di dissoluzione secondo quanto riportato in Farmacopea XII Ed. utilizzando un apparato USP di tipo II dotato di un agitatore a palette. Il test è stato condotto su 6 mini-tablet ottenute dalle microparticelle RSV-B, le quali sono state inserite all'interno di 500 mL di tampone citrato pH 5.5 termostato alla temperatura di $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ sotto costante agitazione (50 rpm). Ad intervalli di tempo prestabiliti (2, 5, 8, 10, 15, 20 e 25 minuti) sono state prelevate aliquote da 1 mL immediatamente rimpiazzate con uno stesso volume di solvente fresco per mantenere le condizioni *sink*. I campioni collezionati sono stati centrifugati ed il surnatante è stato sottoposto ad analisi spettrofotometrica UV-Vis, come riportato nel paragrafo 3.2.4.13. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato ed i risultati sono riportati come media $\pm$ SE.

3.2.4.13. Tecniche utilizzate per la quantificazione del RSV

Mediante analisi spettrofotometrica UV-Vis

Le analisi spettrofotometriche sono state condotte in accordo a quanto riportato nel paragrafo 3.2.1.20. In questo caso, per l'analisi quantitativa del RSV sono state costruite tre curve di calibrazione:

1. Curva di calibrazione in metanolo $\rightarrow \lambda_{\text{max}}$: 305 nm; range di linearità: 0.001–0.005 mg/mL, regressione lineare: $\text{Abs} = 0.04 + 143.38 \times [\text{mg/mL}]$, ($R = 0.999$); impiegata per la determinazione quantitativa del RSV presente all'interno di ciascun lotto di microparticelle e nella mucosa sublinguale al termine degli esperimenti *ex vivo*.
2. Curva di calibrazione in tampone citrato pH 5.5 al 3% (p/v) di β -CD $\rightarrow \lambda_{\text{max}}$: 305 nm, range di linearità: 0.0005–0.0075 mg/mL; regressione lineare: $\text{Abs} = -0.02 + 123.72 \times [\text{mg/mL}]$, ($R = 0.999$); impiegata per la determinazione quantitativa del RSV durante i test di permeazione *ex vivo* e di dissoluzione *in vitro*.
3. Curva di calibrazione in tampone citrato pH 5.5/PEG 200 80/20 (v/v): λ_{max} : 305 nm, range di linearità: 0.00002–0.00800 mg/mL; regressione lineare: $\text{Abs} = -0.001 + 112.56 \times [\text{mg/mL}]$, ($R = 0.999$); impiegata per la determinazione quantitativa del RSV durante le prove di stabilità.

Alle concentrazioni testate non si osservano interferenze tra il RSV e gli altri componenti utilizzati (lipidi, tensioattivi, sali ecc), né variazioni in termini di λ_{max} . Le variazioni interday e intraday risultano trascurabili poiché al di sotto della soglia di sensibilità dello strumento.

Mediante analisi HPLC-DAD

Le analisi HPLC sono state condotte utilizzando lo strumento Agilent già descritto nel paragrafo 3.2.3.19. La separazione cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna ACE[®] Excel Super C18 (lunghezza: 12.5 cm; diametro interno 4.6 mm; pore size 5 μm) e una fase mobile costituito da acqua per HPLC allo 0.1% (v/v) di acido trifluoroacetico (TFA) (solvente A) e Acetonitrile (solvente B) impiegando il seguente gradiente: 0-2 minuti $\rightarrow$ A:B = 70:30; 2-8 minuti $\rightarrow$ A:B = 20:80; 8-12 minuti $\rightarrow$ A:B = 70:30. Il flusso è stato impostato a 1 mL/min e la lunghezza d'onda della lampada UV è stata settata a 305 nm (range di scansione: 190-800 nm). In queste condizioni il RSV ha un tempo di ritenzione di 5,3 minuti.

Per la quantificazione del RSV viene usata una curva di calibrazione preparata iniettando sei standard: range di linearità: 0.0001-0.0100 mg/mL; regressione lineare: $\text{Area} = 87,308.09x$ [mg/mL], ($R = 0.999$). LOD e LOQ sono rispettivamente 0.017 $\mu\text{g/mL}$ e 0.050 $\mu\text{g/mL}$. Le variazioni interday e intraday risultano trascurabili poiché al di sotto della soglia di sensibilità dello strumento.

3.2.5 Metodi per realizzare NLC cariche di Resveratrolo come promettente delivery platform

3.2.5.1 Preparazione e caratterizzazione della miscela lipidica

Screening dei lipidi liquidi

È stata valutata l'abilità del RSV di dissolversi in tre differenti eccipienti lipidici liquidi quali l'isopropil palmitato (IP), il trigliceride caprilico/caprico (TCC) e il Labrasol® (LB). 950 mg di ciascun lipide liquido sono stati posti all'interno di un becker ed addizionati di 50 mg di RSV. Le dispersioni sono state tenute sotto costante agitazione magnetica (200 rpm) alla temperatura di $40.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (Heidolph MR3001K Hotplate Stirrer con una sonda per la temperatura Heidolph EXT3001, Heidolph Instruments, Schwabach, Germania) fino a completa solubilizzazione dell'attivo o fino all'insorgenza di eventuali modifiche in termini di aspetto (es. imbrunimento). Le soluzioni o dispersioni ottenute sono state analizzate visivamente sia per tutta la durata dell'esperimento che a seguito di raffreddamento alla temperatura ambiente (circa 20°C). Ogni prova è stata condotta in triplicato ($n=3$).

Screening dei lipidi solidi

Per la determinazione dell'eccipiente lipidico solido si è proceduto a miscelare il LB con tre differenti lipidi quali la Stearina (ST), il Glicerilmonostearato (GMS) ed il Cetilpalmitato (CP). Opportune quantità di LB sono state inserite in un becker e riscaldate fino a $60 \pm 0.5^\circ\text{C}$ sotto costante agitazione magnetica. Successivamente, i campioni sono stati addizionati di ciascun lipide solido in tre diversi rapporti in peso quali 40:60, 50:50 e 60:40 mantenendo costante la temperatura e l'agitazione fino a completa fusione degli eccipienti. Le miscele ottenute sono state analizzate visivamente sia durante la miscelazione a caldo che dopo il raffreddamento a temperatura ambiente. Ogni prova è stata condotta in triplicato ($n=3$).

Ottimizzazione della composizione quali-quantitativa della miscela lipidica

La miscela lipidica è stata preparata utilizzando LB quale lipide liquido ed i seguenti eccipienti lipidici solidi: il GMS, precedentemente scelto per la sua compatibilità con il LB; l'acido glicirretico (GA) ed il mentolo (M). Al fine di massimizzare la quantità di RSV in questi eccipienti, sono state condotte diverse prove, variando il rapporto in peso tra i diversi componenti come riportato in **Tabella 12**. Per la preparazione della miscela lipidica è stato inizialmente solubilizzato il RSV in LB sotto costante agitazione (200 rpm) in un bagnomaria termostato a $40.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (Heidolph MR3001K, Hotplate Stirrer con una sonda per la temperatura Heidolph EXT3001, Heidolph Instruments, Schwabach, Germania). Successivamente, mantenendo costante l'agitazione, la temperatura del bagnomaria è stata aumentata fino a $60.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ e sono stati aggiunti gli eccipienti lipidici solidi in quest'ordine: GMS, GA ed M (quando presente), mantenendo il tutto a $60.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ fino alla loro completa fusione. Le miscele così ottenute sono state rapidamente raffreddate all'interno di un bagno di ghiaccio e sale per 5 min, successivamente mantenute a -20°C per 15 min e in seguito, dopo essersi solidificate, conservate a 4°C . Nelle stesse condizioni è stata preparata una nuova miscela considerando la composizione del MIX-F ma priva di RSV mantenendo costanti i rapporti tra gli eccipienti e nominata "Blank". Le diverse miscele sono state valutate in termini visivi sia durante la fase di fusione e miscelazione, che dopo solidificazione, prendendo in considerazione caratteristiche quali aspetto, colore ed omogeneità. Ogni miscela è stata preparata in triplicato ($n=3$).

Tabella 12. Composizione quali-quantitativa delle miscele lipidiche cariche di RSV espressa come quantità dei singoli componenti (mg) per 1 g di miscela.

Formula Code	RSV (mg)	LB (mg)	GMS (mg)	GA (mg)	M (mg)
MIX-A	50	230	690	30	-
MIX-B	75	365	530	30	-
MIX-C	100	350	520	30	-
MIX-D	100	400	470	30	-
MIX-E	50	320	600	30	-
MIX-F	50	300	600	30	20
Blank	-	300	600	30	20

Analisi quantitativa del Resveratrolo all'interno della miscela lipidica

La miscela MIX-F, scelta perché ritenuta la migliore, è stata sottoposta ad analisi quali-quantitativa del contenuto di RSV. 5 mg di MIX-F sono stati posti in un matraccio ambrato (da 100 mL), solubilizzati in metanolo con l'ausilio di un bagnetto ad ultrasuoni (Branson 1200) e portati a volume con lo stesso solvente. Le soluzioni ottenute sono state sottoposte ad analisi spettrofotometrica UV-Vis, come riportato nel paragrafo **3.2.5.8**, per la quantificazione del RSV. Le analisi sono state condotte in triplicato su ciascuna miscela preparata, prelevando aliquote di materiale da porzioni diverse del medesimo lotto di miscela, al fine di valutarne l'omogeneità in contenuto (n=6). I risultati sono espressi come percentuale in peso di RSV presente all'interno della miscela e riportati come media $\pm$ SE.

Valutazione del range di temperatura di fusione/rammollimento della miscela lipidica

La temperatura di rammollimento del MIX-F è stata valutata come già descritto nel paragrafo **3.2.1.1**. Le analisi sono state condotte in triplicato ed i risultati sono espressi come media $\pm$ SE.

Analisi di Diffrazione a raggi X (XRD)

Le analisi sullo stato fisico del RSV all'interno del MIX-7 sono state condotte mediante diffrazione a raggi X utilizzando uno strumento D-8 Focus (Brucker, USA) e settando i parametri operativi nelle stesse condizioni descritte nel paragrafo **3.2.4.10**. Le misurazioni sono state eseguite sui seguenti campioni: RSV puro, miscela Blank, MIX-7 fresco e dopo 1 mese di conservazione a $4 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

3.2.5.2 Preparazione dei Carrier Lipidi Nanostrutturati (NLC) contenenti RSV

Per la preparazione delle NLC è stato utilizzato il metodo già descritto nel paragrafo **3.2.1.2**. In breve, quantità accuratamente pesate (100, 200 o 300 mg) di MIX-F sono state fuse, omogeneizzate a 19.000 rpm (Ultraturrax, Polytron Model PT MR 2100, Kinematica, Malvern, Svizzera) per 1 minuto con 40 mL di una fase acquosa preriscaldata a $70.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ costituita da tampone citrato pH 5.5 contenente Pluronic F-127 all'1% (p/v). Successivamente, la risultante microemulsione è stata sottoposta ad ultrasuonizzazione

(sonicatore con sonda ad immersione SONOPULS, Bandelin, mod. HD 2070) impostando i seguenti parametri operativi: frequenza 20 kHz, potenza 88-90%, operante in modalità pulsante con cicli di 0.7 secondi di attività e 0.3 secondi di inattività per un totale di 10 minuti. La procedura è stata ripetuta due volte, la prima a temperatura ambiente, e la seconda ponendo la dispersione all'interno di un bagno di ghiaccio e sale per favorire la solidificazione delle NLC. In **Tabella 13** sono riportate le denominazioni dei campioni preparati al variare della quantità di miscela lipidica impiegata. Ogni preparazione è stata eseguita 3 volte (n=3).

Tabella 13. Composizione delle dispersioni di NLC contenenti RSV

Formula Code	MIX-F (mg)	Tampone citrato (mL)	Pluronic F-68 (mg)
NLC-F1	100	40	400
NLC-F2	200	40	400
NLC-F3	300	40	400

3.2.5.3 Determinazione quantitativa del Resveratrolo nella dispersione di NLC

Valutazione della quantità totale di Resveratrolo presente nella dispersione di NLC e della Drug Recovery % (DR%)

Per valutare la quantità totale di RSV nelle dispersioni di NLC (RSV_{tot}) è stato utilizzato il metodo già riportato nel paragrafo 3.2.1.7. Brevemente, 100 μ L di dispersione sono stati diluiti fino a 10 mL con metanolo e sottoposti ad analisi spettrofotometrica, come riportato nel paragrafo 3.2.5.8. Le analisi sono state condotte in triplicato su ciascun lotto di NLC (n=6), avendo cura di campionare casualmente la quantità di dispersione da analizzare per valutare l'omogeneità della stessa. I risultati ottenuti sono riportati come media $\pm$ SE ed espressi in termini di Drug Recovery% (DR%) calcolata secondo la seguente equazione:

$$DR\% = \frac{RSV_{tot}}{RSV_{teorico}} \times 100$$

Valutazione della Drug Loading % (DL%) e della Loading Efficacy (LE%)

La Drug Loading % (DL%) e la Loading Efficacy % (LE%) sono state valutate indirettamente mediante la tecnica dell'ultrafiltrazione, come descritto nel paragrafo 3.2.3.4. Brevemente, le dispersioni di NLC sono state diluite 10 volte con tampone citrato pH 5.5, poste in un dispositivo centrifugo Ultrafree-MC avente cut-off 30,000 NMWL (Millipore, USA) e centrifugate a 4000 rpm per 20 minuti. Al termine del processo di centrifugazione, il liquido raccolto nella camera inferiore è stato prelevato ed analizzato mediante HPLC-DAD, come descritto nel paragrafo 3.2.5.8, al fine di quantificare il RSV non incapsulato. Dai risultati ottenuti è stato possibile calcolare la DL% e la LE% come segue:

$$DL\% = \frac{RSV_{tot} - RSV_{out}}{Miscela\ lipidica} \times 100$$

$$DL\% = \frac{RSV_{tot} - RSV_{out}}{RSV_{tot}} \times 100$$

dove RSV_{tot} è la quantità di attivo contenuta nell'intera dispersione e precedentemente determinata, mentre RSV_{out} è la quantità di RSV determinata sperimentalmente e presente nella fase disperdente. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato su ciascun lotto di NLC (n=6), avendo cura di campionare casualmente la quantità di dispersione da analizzare per valutare l'omogeneità della stessa, ed i risultati sono riportati come media $\pm$ SE.

3.2.5.4 Studi di Dinamic Light Scattering (DLS)

Tutte le NLC preparate (opportunamente diluite 100 volte con tampone citrato pH 5.5), così come il solo mezzo disperdente contenente Pluronic-F127 (1% p/v), sono state sottoposte a studi di DLS come descritto nel paragrafo 3.2.3.5. Ogni misurazione è stata ripetuta due volte su ciascun campione di NLC (n=6) ed i risultati sono espressi come media $\pm$ SE.

3.2.5.5 Studi di ridisperdibilità dopo freeze drying e scelta del crioprotettore

Gli studi di ridisperdibilità sono stati condotti solo sulla preparazione scelta come migliore, ovvero NLC-F3. Aliquote della dispersione nanoparticellare fresca sono state sottoposte a freeze drying in assenza ed in presenza di 4 diversi crioprotettori (trealosio, sorbitolo, mannitolo e saccarosio), ognuno valutato in 3 diverse concentrazioni, prendendo in considerazione i seguenti rapporti in peso tra le nanoparticelle ed il crioprotettore: 1:3, 1:8 e 1:13. La denominazione dei campioni analizzati è riportata in **Tabella 14**.

Tabella 14. Denominazione dei campioni di NLC freeze dried utilizzando 3 diversi rapporti in peso tra NLC e crioprotettori

Formula Code	Rapporto p/p	Crioprotettore
NLC-T (A)	1:3	Trealosio
NLC-T (B)	1:8	
NLC-T (C)	1:13	
NLC-So (A)	1:3	Sorbitolo
NLC-So (B)	1:8	
NLC-So (C)	1:13	
NLC-M (A)	1:3	Mannitolo
NLC-M (B)	1:8	
NLC-M (C)	1:13	
NLC-Sa (A)	1:3	Saccarosio
NLC-Sa (B)	1:8	
NLC-Sa (C)	1:13	
NLC-Blank	-	NO

Ciascun campione è stato aliquotato in frazioni da 1.5 mL e posto all'interno di tubi Eppendorf, congelato a $-80.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ per 24 ore e sottoposto al processo di freeze drying (Labconco FreeZone® 2.5 Liter Freeze Dry System) per 72 h (pressione: 0.014 mPa; temperatura: $\approx -50^\circ\text{C}$). Una volta terminato il processo i campioni così ottenuti sono stati ricostituiti con 1.5 mL di acqua distillata e la loro ri-dispersione è stata promossa utilizzando

un vortex (LLG-uni TEXER 1) e/o un bagno ad ultrasuoni (Branson 1200). Le dispersioni sono state sottoposte sia ad analisi visiva che a studi di DLS come precedentemente illustrato. Ciascun campione è stato preparato in triplicato (n=3) e i risultati sono stati riportati come media $\pm$ SE.

3.2.5.6 Test di rilascio in vitro del RSV e valutazione cinetica del processo

Gli studi di rilascio sono stati condotti utilizzando tre diversi campioni:

- 1) NLC-F3: dispersione di NLC fresche preparate con 300 mg di MIX-F;
- 2) NLC-Sa (B) fresche: dispersione di NLC-F3 fresche addizionate di Saccarosio nel mezzo disperdente (NLC:Sa=1:8);
- 3) NLC-Sa (B) ri-disperse: dispersione di NLC-F3 contenente Saccarosio quale crioprotettore (NLC:Sa=1:8) ottenuta dopo ricostituzione della polvere ottenuta mediante freeze drying.

In **Tabella 15** sono riportate le denominazioni utilizzate per i tre differenti campioni.

Tabella 15. Campioni impiegati per i test di rilascio *in vitro*

Formula Code	Campione di partenza
NLC	NLC-F3
NLC-Sa	NLC-Sa (B) fresco
NLC-Sa-R	NLC-Sa (B) ridisperso dopo freeze drying

Test di rilascio in liquido accettore idrofilo

Per valutare la capacità delle NLC di rilasciare il RSV in esse incapsulato una volta messe a contatto con un ambiente acquoso, sono stati condotti test di rilascio *in vitro* usando il metodo della dialisi. I campioni preparati sono stati diluiti 10 volte con tampone citrato pH 5.5 ed 1 mL della risultante dispersione (concentrazione di RSV: 0.038 mg/mL) è stato caricato all'interno di un tubo per dialisi in cellulosa rigenerata (cut-off: 3.5 KDa; SpectraPore®), posto all'interno di un Falcon contenente 10 mL di liquido accettore. L'esperimento è stato condotto a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, sotto costante agitazione esterna (350 rpm, Orbital Shaker, Thermo-Shaker PST 60HL, Biosan) ed al riparo dalla luce. Gli esperimenti di rilascio sono stati condotti utilizzando differenti tipi di liquido accettore e variando la durata complessiva del test. In particolare, sono state utilizzate le seguenti condizioni:

- 1) Fluido accettore $\rightarrow$ Tampone citrato pH 5.5; End point $\rightarrow$ 24 giorni.
- 2) Fluido accettore $\rightarrow$ Tampone citrato pH 5.5 con β -CD 0.1% (p/v); End point $\rightarrow$ 48 h.

Ad intervalli di tempo prestabiliti vengono prelevate aliquote da 1 mL dal compartimento accettore che vengono immediatamente sostituite con un identico volume di liquido accettore fresco, per mantenere le condizioni *sink* del sistema. Le aliquote prelevate sono state sottoposte ad analisi spettrofotometrica UV-Vis, come riportato nel paragrafo **3.2.5.8**. Al termine di ogni esperimento, 100 μL di fluido donatore sono stati prelevati, diluiti fino a 1 mL con metanolo e sottoposti ad analisi quantitativa mediante HPLC-DAD (vedi paragrafo **3.2.5.8**) per quantificare il RSV residuo all'interno del tubo per dialisi e poter fare un bilancio di massa tra la quota di RSV rilasciata e quella non rilasciata, verificando che somma dei due contributi fosse coerente con i dati di DR%. Ogni esperimento è stato condotto in

triplicato (n=3) ed i risultati, espressi come frazione della dose rilasciata in funzione del tempo, sono riportati come media $\pm$ SE.

Test di rilascio in liquido accettore lipofilo

L'abilità delle NLC di rilasciare il RSV in un ambiente lipofilo è stata valutata mediante test di rilascio *in vitro* utilizzando un sistema tipo Transwell opportunamente modificato. 200 μ L di ciascuna dispersione di NLC sono stati caricati all'interno degli inserti Transwell (membrana in policarbonato; cut-off 0.45 μ m) immersi a loro volta in un becker preriempito con 10 mL di liquido accettore (1-ottanolo o il miristato di isopropile), tenuto sotto costante agitazione magnetica (200 rpm), a temperatura ambiente ed al riparo dalla luce. Gli esperimenti hanno avuto una durata complessiva di 48 ore. A intervalli di tempo predefiniti sono state prelevate aliquote da 1 mL dal compartimento accettore, immediatamente sostituite con un identico volume di liquido accettore fresco, per mantenere le condizioni *sink* del sistema. Le aliquote prelevate sono state opportunamente diluite con metanolo e sottoposte ad analisi spettrofotometrica UV-Vis, come riportato nel paragrafo 3.2.5.8. Al termine di ogni esperimento, 10 μ L di fluido donatore sono stati prelevati, diluiti fino a 1 mL con metanolo e sottoposti ad analisi quantitativa HPLC-DAD (vedi paragrafo 3.2.5.8) per quantificare il RSV residuo all'interno del transwell e poter fare un bilancio di massa tra la quota di RSV rilasciata e quella non rilasciata, verificando che somma dei due contributi fosse coerente con i dati di DR%. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato (n=3) ed i risultati, espressi come frazione della dose rilasciata in funzione del tempo, sono riportati come media $\pm$ SE.

Elaborazione cinetica dei dati di rilascio del RSV

I dati sperimentali ottenuti dai test di rilascio *in vitro* sono stati opportunamente elaborati mediante l'impiego del software Origin 8.5 e della componente aggiuntiva di Microsoft Excel DD Solver (Y. Zhang et al., 2010b). In particolare, sono stati condotti studi di fitting delle curve di rilascio sperimentali con i più comuni modelli matematici che si applicano nello studio delle cinetiche di rilascio dei principi attivi dai Drug Delivery Systems. Sono state prese in considerazione le seguenti equazioni cinetiche: Ordine zero, Primo ordine, Higuchi, Hixson-Crowell, Baker-Lonsdale e Korsmeyer-Peppas (Power Law). Per valutare l'aderenza ai modelli presi in considerazione sono stati presi, quali parametri di riferimento, il valore di R^2 e l'aderenza visiva dei punti sperimentali alle curve cinetiche restituite dal software.

3.2.5.7 Prove biologiche

Studi di vitalità cellulare mediante MTT test

I saggi di vitalità cellulare sono stati condotti su cellule di fibroblasti murini BALB/3-T3 piastrate in una piastra da 96 pozzetti e coltivate come descritto nel paragrafo 3.2.1.19. Dopo 24 h, il mezzo di coltura è stato allontanato e rimpiazzato con 100 μ L di mezzo di coltura fresco contenente una soluzione di RSV a differenti concentrazioni (tra 2.5 e 50 μ M) o la dispersione di NLC-F3 opportunamente diluita alle medesime concentrazioni di RSV. Analogamente, gli esperimenti sono stati condotti sulla sola fase disperdente acquosa delle NLC, utilizzata come controllo. La vitalità delle cellule è stata monitorata mediante saggio MTT (Invitrogen M6494). Dopo 24 ore di trattamento, il terreno è stato accuratamente

rimosso, ogni pozzetto è stato lavato con 200 μ L di PBS pH 7.4 e riempito con il medesimo volume di terreno fresco contenente MTT (5 mg/mL). Le piastre sono state incubate per 2 ore a 37 °C e poi centrifugate a 1000 rpm per 5 minuti (Allegra X12, Beckman Coulter, Life Sciences, Milano, Italia). Il surnatante è stato, quindi, scartato e sostituito con 100 μ L di DMSO per solubilizzare i cristalli di formazano precedentemente precipitati. L'assorbanza a 540 nm è stata misurata mediante un Microplate Reader (BioTek Instruments, USA). Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e rapportati a un triplicato di cellule controllo non trattate poste come riferimento (vitalità del 100%). I risultati sono espressi come vitalità cellulare % (n=3) in relazione ai valori del controllo e riportati come media $\pm$ SE.

3.2.5.8 Tecniche utilizzate per la quantificazione del RSV

Mediante analisi spettrofotometrica UV-Vis

Le analisi spettrofotometriche sono state condotte in accordo con quanto riportato nel paragrafo 3.2.1.20. In questo caso, per la quantificazione del RSV sono state costruite due curve di calibrazione:

1. Curva di calibrazione in metanolo, come riportato nel paragrafo 3.2.4.13; impiegata per la quantificazione del RSV nelle dispersioni di NLC, per la valutazione della quantità residua di RSV nel fluido donatore durante i test di rilascio in vitro e per la determinazione quantitativa del RSV durante i test di rilascio in vitro in liquido accettore lipofilo.
2. Curva di calibrazione in tampone citrato allo 0.1 % di β -CD (p/v) $\rightarrow \lambda_{\max}$: 305 nm; range di linearità: 0.0001-0.0075 mg/mL; regressione lineare: $Abs = 0.014 + 114.70 \times [mg/mL]$ ($R = 0.999$); impiegata per la quantificazione del RSV durante i test di rilascio *in vitro* in liquido accettore idrofilo.

Mediante analisi HPLC-DAD

Le analisi HPLC sono state condotte utilizzando lo strumento Agilent già descritto nel paragrafo 3.2.3.19. La separazione cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna ACE[®] Excel Super C18 (lunghezza: 12.5 cm; diametro interno 4.6 mm; pore size 5 μ m) e una fase mobile costituita da Acqua allo 0.1% (v/v) di acido trifluoroacetico (TFA) (solvente A) e Acetonitrile (solvente B) impiegando il seguente gradiente: 0-2 minuti $\rightarrow$ A:B = 70:30; 2-8 minuti $\rightarrow$ A:B = 20:80; 8-12 minuti $\rightarrow$ A:B = 70:30. Il flusso è stato impostato a 1 mL/min e la lunghezza d'onda della lampada UV è stata settata a 305 nm (range di scansione: 190-800 nm). In queste condizioni il RSV ha un tempo di ritenzione di 5.3 minuti. Per la quantificazione del RSV sono state costruite due curve di calibrazione, preparate iniettando, per ciascuna, 6 soluzioni standard:

1. range di linearità: 0.0001-0.0100 mg/mL; regressione lineare: $Area = -5.6024 + 133858.66 \times [mg/mL]$ ($R = 0.999$); utilizzata per la quantificazione del RSV dopo aver sottoposto le nanoparticelle ad ultracentrifugazione.
2. range di linearità: 0.00005-0.0001 mg/mL; regressione lineare: $Area = 1.062 + 152464.17 \times [mg/mL]$ ($R = 0.999$); utilizzata per la quantificazione del RSV nel compartimento donatore al termine dei test di rilascio.

LOD e LOQ sono rispettivamente 0.017 μ g/mL e 0.050 μ g/mL. Le variazioni interday e intraday risultano trascurabili poiché al di sotto della soglia di sensibilità dello strumento.

4. Risultati e Discussione

4.1. Realizzazione di un nanocomposito costituito da NLC di Curcumina incorporate in una spugna bioerodibile di Acido Ialuronico carica di Metronidazolo per il trattamento della cavità post estrattiva

4.1.1. Ottimizzazione quali-quantitativa della miscela lipidica

L'obiettivo di questo lavoro è la realizzazione di un sistema nanocomposito per la co-somministrazione della Curcumina (CUR) ed un opportuno antibiotico (il Metronidazolo, MTZ), al fine di favorire il processo di rigenerazione dei tessuti mantenendo contestualmente le condizioni di asepsi della cavità post estrattiva dopo avulsione del terzo molare. Per fare questo la CUR viene intrappolata all'interno di Carrier Lipidici Nanostrutturati (NLC) i quali vengono inseriti all'interno di una struttura matriciale polimerica somministrata sottoforma di mini-tablet avente dimensioni compatibili con la cavità alveolare. La CUR è una sostanza polifenolica con una bassa solubilità in soluzioni acquose acide ed alcaline ma abbastanza solubile in solventi organici polari ed apolari come metanolo, acetone e diclorometano (Kurien et al., 2007). Inoltre, essa soffre di fenomeni di instabilità in condizioni di pH neutro ed alcalino, se sottoposta a radiazioni UV e ad alte temperature per un intervallo di tempo sostenuto (Kharat et al., 2017). Queste caratteristiche legate alle proprietà benefiche della sostanza si sposano con la necessità di veicolarla attraverso sistemi nanoparticellari di natura lipidica come le NLC capaci di preservarne l'integrità strutturale proteggendola dai fenomeni di degradazione. Il punto fondamentale per la realizzazione delle NLC risiede nella preparazione di una miscela lipidica solida a temperatura ambiente, omogenea e facilmente lavorabile costituita da almeno due lipidi, uno solido e l'altro liquido, in grado di solubilizzare la sostanza funzionale che si desidera incapsulare. L'utilizzo di due lipidi con caratteristiche fisiche diverse (uno liquido e l'altro solido) permette di creare all'interno delle nanoparticelle una struttura altamente disordinata che, da una parte aumenta la capacità di *carrier* di una sostanza funzionale e dall'altra non permette i fenomeni di polimorfismo dei lipidi, ovvero che passando da una forma metastabile ad una stabile potrebbero espellere l'attivo. La scelta degli eccipienti lipidici deve essere accuratamente studiata. Innanzitutto, essi devono essere chimicamente inerti ai fenomeni di degradazione, miscibili tra di loro, non cancerogeni o teratogeni, biocompatibili e biodegradabili. Sulla base di queste premesse per la realizzazione delle NLC cariche di CUR sono stati selezionati tre eccipienti lipidici quali l'esadecanolo (EXA), l'Isopropil palmitato (IP) e l'acido glicirretico (GA). Il primo è un alcol saturo a lunga catena che appare sottoforma di scaglie di colore bianco e ceroso al tatto ed è largamente utilizzato dall'industria cosmetica nella composizione di creme poiché possiede proprietà emollienti ed una debole attività antimicrobica (Togashi et al., 2007) (Figura 13).

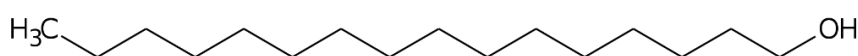


Figura 13: Struttura chimica dell'esadecanolo

L'IP è un estere ottenuto dalla condensazione dell'acido palmitico con il 2-propanolo e si presenta come un liquido poco denso ed incolore a temperatura ambiente. Come l'EXA è un eccipiente utilizzato in ambito cosmetico per le sue proprietà emollienti, emulsionanti e plasticizzanti. È altamente stabile alle alte temperature ed ai fenomeni di auto-ossidazione. Inoltre, la ramificazione ed il basso peso molecolare lo rendono un componente affine alla struttura lipidica dei tessuti, quindi facilmente assorbibile e con una buona capacità solvente per principi attivi lipofili (**Figura 14**).

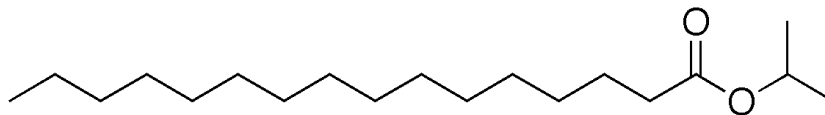


Figura 14: Struttura chimica dell'Isopropil palmitato

Infine, il GA è una molecola attiva ricavata dalla radice della *Glycyrriza Glabra* e si trova sottoforma di solido bianco. Essa è stata scelta perché caratterizzata da un elevato punto di fusione che permette di stabilizzare la miscela lipidica conferendole consistenza e rendendola facilmente lavorabile e stabile alla conservazione. Inoltre, è ben noto in letteratura che questa molecola è un interessante agente antinfiammatorio nel trattamento delle dermatiti acute e croniche, oltre a possedere proprietà antiossidanti, antivirali, antibatteriche, anti-ulcera e citoprotettive (Ge et al., 2017) (**Figura 15**).

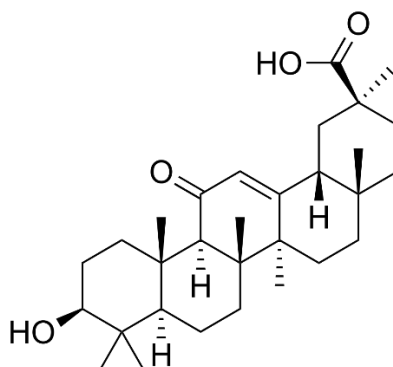


Figura 15: Struttura chimica dell'acido glicirretico

Una volta selezionati i componenti lipidici sono state valutate diverse miscele (paragrafo **3.2.1.1, Tabella 1**) al fine di individuare la migliore in termini di rapporto tra i componenti. Per fare questo si è provveduto inizialmente a valutare la capacità della CUR di solubilizzarsi negli eccipienti lipidici, variandone volta per volta il loro rapporto in peso, ma mantenendo fissa la concentrazione dell'attivo all'8% o al 5% p/p. In breve, gli eccipienti lipidici sono stati riscaldati a $70 \pm 0.5^\circ\text{C}$ fino a loro completa fusione e successivamente addizionati della quantità di CUR desiderata mantenendo tutto sotto agitazione magnetica fino alla sua completa solubilizzazione. L'obiettivo è ottenere una miscela lipidica uniforme e trasparente a caldo ma che risulti omogenea nell'aspetto anche dopo solidificazione, e che sia poco cerosa e facilmente lavorabile. Dai risultati ottenuti emerge che in nessun caso è possibile solubilizzare efficientemente la CUR all'8% (p/p) ed infatti i MIX 1-4 sono stati tutti scartati poiché presentavano dei residui di CUR non solubilizzata identificabile poiché sotto forma di polvere gialla che, prolungando il tempo di esposizione al calore, andava incontro a processi di decomposizione imbrunendosi. Nel ridurre la quantità di CUR al 5% (p/p) è stata

ridotta anche la quantità di IP che nel MIX 5 risulta insufficiente per garantire la completa dissoluzione dell'attivo. I MIX 6 e 7 risultano i migliori in termini di aspetto poiché si presentano limpidi a caldo ed omogenei dopo raffreddamento. Tuttavia, il MIX 6, contenente una più elevata quantità di lipide liquido, è stato scartato poiché l'eccesso di IP rende la miscela lipidica troppo cerosa e pertanto difficilmente lavorabile. Il MIX 7 è, invece, stato scelto quale miscela lipidica ottimale, avente una consistenza ottimale per le successive operazioni di manipolazione ed un range di temperatura di rammollimento compreso tra i 35 e i 40°C. Tale risultato è estremamente importante poiché conferma la potenziale bontà del MIX 7 per la preparazione di NLC solide e stabili a temperatura ambiente, ma soprattutto capaci di fondere alla temperatura corporea una volta a contatto con i tessuti biologici. Come è stato osservato, poiché la miscela lipidica è costituita dall'insieme di più componenti lipidici non ha un punto di fusione ben definito ma rammollisce nel range indicato. Il dato sperimentale ottenuto, se confrontato ai dati di letteratura inerenti i punti di fusione dei singoli componenti della miscela (**Tabella 16**) suggerisce la completa amorfizzazione di tutti i componenti. L'ottenimento di solidi in forma amorfa determina numerosi vantaggi, in particolare quando una sostanza funzionale si trova nel suo stato amorfo possiede un'elevata energia libera rispetto al corrispettivo solido cristallino con conseguente promozione delle sue proprietà quali una maggiore solubilità e stabilità che si traducono in una maggiore biodisponibilità, (Hancock & Parks, 2000).

Tabella 16. Punto di fusione dei singoli componenti della miscela lipidica e del MIX-F

Campioni	Temperatura di rammollimento-fusione (°C)
*IP	11
*EXA	49.3
*GA	296
*CUR	183
**MIX 7	35-40

*EPA database; **sperimentale

4.1.2. Preparazione e caratterizzazione di Carrier Lipidici Nanostrutturati (NLC) carichi di CUR

La realizzazione di una dispersione colloidale quale template per l'ottenimento di nanoparticelle lipidiche quali le NLC può avvenire in due modi:

- Metodi bottom up. Partendo da singoli atomi o molecole vengono guidate una serie di reazioni chimiche che permettono al precursore di accrescere fino ad ottenere un colloide con le dimensioni e le caratteristiche desiderate.
- Metodi top down. Partendo da particelle o goccioline di grandi dimensioni queste vengono ridotte fino a raggiungere dimensioni nanometriche mediante agitazione, miscelazione o applicazione di alti sforzi di taglio o in generale di alte energie.

Le tecniche di preparazione delle nanoparticelle, sia polimeriche che lipidiche, possono essere generalmente classificate in base all'energia impiegata in tecniche a bassa o ad alta

energia. I metodi a bassa energia sfruttano la formazione spontanea di una nanoemulsione, ma richiedono, spesso, l'impiego di solventi organici e sono generalmente più sfruttati per la realizzazione di nanoparticelle polimeriche. Per la produzione di nanoparticelle lipidiche sono più frequentemente utilizzati i metodi ad alta energia che necessitano di apparecchi meccanici (ultraturrax, ultrasuoni, omogeneizzatori ad alta pressione) in grado di aumentare la superficie di contatto tra le due fasi immiscibili mediante somministrazione di un lavoro, portando così alla formazione di una nanoemulsione che sarà il template per la solidificazione delle NLC (Singh et al., 2017). Per la preparazione della NLC cariche di CUR è stato scelto un metodo top down ad alta energia sfruttando, in particolare, la tecnica dell'omogeneizzazione seguita da sonicazione ad alte frequenze. Questa metodica è stata selezionata poiché non richiede l'impiego di solventi organici. In breve, dopo completa fusione di una quantità esattamente pesata di miscela lipidica, questa viene emulsionata mediante ultraturrax con l'opportuna fase disperdente acquosa calda contenente i tensioattivi con conseguente formazione di una microemulsione, poi frammentata in una nanoemulsione a caldo mediante trattamento con ultrasuoni. Il raffreddamento della nanoemulsione ottenuta comporta, quindi, l'ottenimento delle NLC. Per ottimizzare la preparazione delle NLC sono vari i parametri su cui è possibile intervenire: volume e tipologia di fase disperdente, scelta dei tensioattivi, quantità di fase dispersa, parametri di processo. In questo caso è stata scelta una soluzione acquosa di tampone citrato pH 6.2 quale fase disperdente, per stabilizzare la CUR, poiché è noto che a pH debolmente acido essa risulta meno soggetta a degradazione (Mondal et al., 2016). Inoltre, è stato impiegato un volume costante di fase disperdente (20 mL) poiché questo risulta ottimale per garantire la completa immersione dell'omogeneizzatore e della punta del sonificatore. Una componente chiave della fase disperdente è, certamente, il tensioattivo.

L'utilizzo di uno o più tensioattivi è di cruciale importanza per l'ottenimento di una nanoemulsione termodinamicamente stabile. Infatti, durante la preparazione della nanoemulsione viene forzata la dispersione di una fase dispersa lipofila all'interno di una disperdente idrofila, ad essa immiscibile ed è, pertanto, necessario fornire un'elevata quantità di energia per ridurre la dimensione dei globuli di fase dispersa fino a dimensioni nanometriche. Poiché la quantità di energia da fornire è uguale al prodotto della tensione interfacciale per la variazione della superficie di contatto liquido/liquido, gli agenti attivi di superficie o tensioattivi giocano un ruolo chiave nella stabilizzazione della nanoemulsione (Singh et al., 2017). In questo caso è stata valutata l'efficacia di un solo tensioattivo (Tween 80) o di una miscela di due tensioattivi (Tween 80 e Pluronic F-68 in rapporto in peso 1:1). Si tratta di due tensioattivi non ionici ad alto valore di HLB. In particolare, il Tween 80 (**Figura 16**) appartiene alla classe dei polisorbati, tensioattivi largamente utilizzati dall'industria cosmetica e farmaceutica. Si presenta come liquido a temperatura ambiente e si ottiene per esterificazione del sorbitolo etossilato con l'acido oleico.

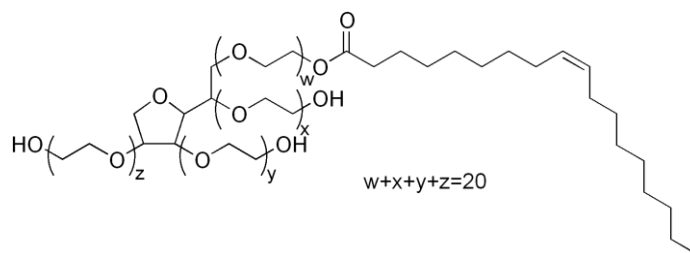


Figura 16. struttura chimica del Tween 80.

Il Pluronic F-68 (**Figura 17**), invece, fa parte del gruppo dei poloxamer ed è, pertanto, un copolimero triblocco non ionico costituito da una catena polioossipropilenica centrale alle cui estremità sono legate due catene di poliossietilene. L'utilizzo di tensioattivi non ionici che si dispongono all'interfaccia liquido/liquido della nanoemulsione e, quindi, solido/liquido della dispersione di nanoparticelle, permette di stabilizzare ulteriormente il sistema colloidale prodotto poiché, favorendo la repulsione sterica, impedisce alle NLC di collidere ed accrescere.

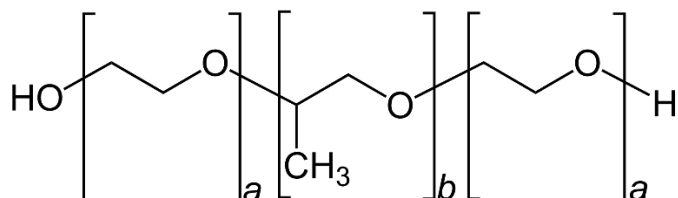


Figura 17. struttura chimica generale di un Pluronic.

Le NLC preparate in presenza di solo Tween 80 saranno indicate con la lettera A, quelle preparate inserendo entrambi i tensioattivi saranno indicate con la lettera B. In entrambi i casi sono state valutate le dispersioni colloidali ottenute impiegando 100, 200 o 300 mg di MIX 7. Ulteriori fattori considerati sono stati i parametri di processo. In particolare, per la preparazione della microemulsione è stato utilizzato un Ultraturrax dotato di un rotore-statore, settato ad una rotazione pari a 15000 rpm. È stato infatti osservato che a valori inferiori si ottenevano emulsioni grossolane con evidente separazione di fase. La microemulsione preparata per omogeneizzazione è stata, di seguito, trattata con un sonicatore ad immersione operando in modalità pulsante ad una potenza compresa tra 88 e 90%. Valori di potenza inferiori all'85% non sono, infatti, insufficienti a ridurre le dimensioni dei globuli. Al contrario, valori superiori al 90% risultano talmente alti da fratturare il contenitore contenente la dispersione. Il trattamento a mezzo di ultrasuoni è stato ripetuto due volte: la prima a caldo per consentire la formazione di una nanoemulsione a partire dalla preformata microemulsione, ed in seguito a freddo, al fine di favorire la solidificazione delle NLC. Tutte le dispersioni ottenute sono risultate visivamente omogenee. Tuttavia, la sola analisi visiva non è sufficiente a discriminare quale sia il campione migliore e, pertanto, si è proceduto alla valutazione della dimensione particellare, della polidispersità e della carica superficiale delle nanoparticelle mediante studi di Dynamic Light Scattering (DLS) e Potenziale Z. Questo tipo di analisi rappresenta il *gold standard* nella valutazione morfologica di una dispersione nanometrica e si basa sul principio fisico dello scattering. Quando una dispersione colloidale, contrariamente ad una soluzione, viene

attraversata da un raggio di luce questa viene diffusa, riflessa o rifratta (effetto Tyndall-Faraday) poiché le dimensioni delle particelle di fase dispersa sono paragonabili alla lunghezza d'onda del raggio incidente. Grazie a questa proprietà è possibile studiare il fenomeno di scattering ed utilizzare tali informazioni per misurare accuratamente la dimensione dei sistemi colloidali. Affinché non vi siano interferenze è importante utilizzare una sorgente luminosa che non venga assorbita dal materiale in studio (Di Prima et al., 2020). Nella fattispecie per il presente studio è stato utilizzato uno strumento Zetasizer Nano ZS dotato di laser a 532 nm ed in grado di valutare un angolo di scattering fisso pari a 173° . L'analisi eseguita consente di ottenere diverse informazioni, tra cui Z-average, Intensity e indice di polidispersità (PDI). I primi due parametri danno indicazioni sulle dimensioni delle particelle di fase dispersa mentre il PDI fornisce informazioni sulla distribuzione dimensionale e quindi sull'omogeneità della dispersione. In particolare, il valore di Z-average rappresenta la dimensione idrodinamica media ponderata dell'insieme di particelle presenti in dispersione e in grado di deviare la luce. Il parametro Intensity incorpora la media sotto forma di Z-average restituendo le singole popolazioni di nanoparticelle e la relativa intensità di scattering, considerando che particelle più grandi deviano maggiormente la luce. In questo contesto, per comprendere meglio l'effettiva dimensione delle NLC prodotte è stato preso in considerazione il valore di Intensity poiché la presenza dei tensioattivi in fase disperdente comporta la formazione di un sistema micellare e, pertanto, rende il nostro campione caratterizzato da due distinte popolazioni. Poiché la dimensione delle micelle di tensioattivo è estremamente piccola (≈ 20 nm), la loro presenza falsa il valore di Z-average restituendo una dimensione particellare più piccola di quella effettiva che è, però, identificabile in termini di Intensity. I valori di PDI vanno da 0 ad 1: un PDI prossimo allo zero è indice di un sistema monodisperso. Generalmente, nel valutare l'omogeneità di un sistema colloidale nanoparticellare, vengono considerati accettabili valori di PDI al di sotto di 0.4 (Danaei et al., 2018a). I risultati ottenuti dall'analisi dei diversi campioni di NLC preparati (**Tabella 17**) mostrano il ruolo chiave del tensioattivo nell'ottenimento di una buona dispersione colloidale. Infatti, utilizzando solo il Tween 80 si osserva un progressivo aumento della dimensione particellare e del PDI all'aumentare della quantità di fase lipidica impiegata. Viceversa, quando si utilizza una miscela (1:1 p/p) dei due tensioattivi le dimensioni delle nanoparticelle non variano di molto aumentando la quantità di fase lipidica utilizzata. Inoltre, utilizzare entrambi i tensioattivi produce una dispersione più omogenea in termini di distribuzione dimensionale come osservabile dal PDI inferiori a 0.4 per tutti e tre i campioni della serie B. Non va, inoltre, dimenticato che i valori di PDI prendono in considerazione la dispersione nella sua interezza e, come già discusso, questa presenta in realtà due distinte popolazioni: le micelle di tensioattivo e le NLC. Pertanto, non è azzardato supporre che in realtà le NLC prodotte siano ancora meno polidisperse in quanto il dato numerico ricavato è "falsato" dalla presenza della popolazione micellare. Un ulteriore parametro che caratterizza le dispersioni colloidali è la presenza di cariche elettriche superficiali determinate dall'adsorbimento degli ioni disciolti in soluzione. Queste cariche determinano la formazione di un campo elettrico responsabile della distribuzione degli ioni nello spazio che circonda la particella con formazione di due strati in prossimità della superficie colloidale: lo strato più interno, detto strato fisso, è costituito dagli ioni fortemente legati alla particella, mentre il secondo strato, più esterno, conosciuto come strato diffuso è

caratterizzato da interazioni tra le cariche più deboli. La carica presente nello strato fisso viene definita Potenziale Z ed è un parametro molto importante per prevedere la stabilità di una dispersione nanoparticellare. Infatti, poiché le particelle sono soggette ai moti browniani, esse si muovono insieme al loro strato fisso che determina, quindi, un guscio elettronico in grado di impedire alle nanoparticelle di attrarsi e collidere tra loro, stabilizzando, dunque, la dispersione. Maggiore sarà, in valore assoluto, il potenziale Z e più stabile risulterà la dispersione colloidale (Selvamani, 2019). I risultati ottenuti non mostrano evidenti differenze tra i campioni analizzati in termini di potenziale Z. Questo perché, probabilmente, tale valore è determinato dalla quantità di sali disciolti in soluzione ed in particolare dai componenti utilizzati per la preparazione del tampone citrato che sono gli stessi in tutte le preparazioni. Inoltre, la presenza di uno o due tensioattivi non influenza il potenziale Z poiché in entrambi i casi si parla di tensioattivi non ionici che, quindi, anche posizionandosi sulla superficie delle NLC non ne cambiano la carica. In tutti i casi comunque è possibile osservare valori compresi tra -13 e -25 mV, indice di stabilità delle NLC.

Tabella 17. Intensity (nm), indice di polidispersità (PDI) e potenziale z (mV) $\pm$ SE delle dispersioni di NLC

Formula Code	Intensity (nm)	PDI	Potenziale Z (mV)
A-100	88.5 $\pm$ 8.7	0.372	-20.5 $\pm$ 6.8
A-200	121.8 $\pm$ 15.4	0.733	-19.5 $\pm$ 6.4
A-300	689.4 $\pm$ 17.1	0.709	-20.5 $\pm$ 5.9
B-100	117.9 $\pm$ 32.8	0.290	-19.5 $\pm$ 5.1
B-200	182.2 $\pm$ 36.9	0.265	-13.5 $\pm$ 7.9
B-300	157.0 $\pm$ 25.5	0.389	-25.5 $\pm$ 7.8

Alla luce dei risultati ottenuti è stata scelta la dispersione B-300 poiché consente di utilizzare una maggiore quantità di MIX 7 garantendo comunque l'ottenimento di NLC di dimensione ottimale (< 200 nm) e con buoni valori di PDI. Inoltre, a parità di volume di dispersione prodotta è così possibile ottenere una maggiore concentrazione di NLC, e quindi di CUR, abbattendo i tempi e i costi di preparazione.

Poiché l'obiettivo finale è quello di somministrare la CUR come coadiuvante di un antibiotico, in questo lavoro è stato utilizzato il Metronidazolo (MTZ) (**Figura 18**).

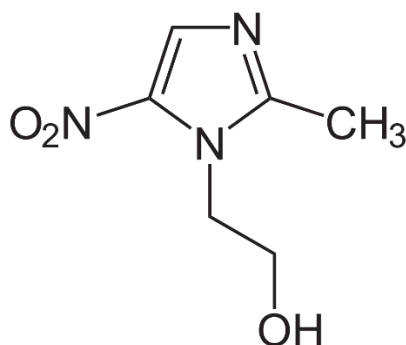


Figura 18. Struttura chimica del Metronidazolo

Quest'ultimo è un antimicrobico appartenente alla classe dei nitroimidazoli e risulta particolarmente efficace contro batteri anaerobi e protozoi. Si presenta come solido cristallino di colore bianco, ha un peso molecolare di 171.16 g/mol ed un punto di fusione di 160°C. È somministrabile attraverso tutte le vie di somministrazione ed è caratterizzato da una buona biodisponibilità. Dopo somministrazione orale si osservano rapido assorbimento gastrointestinale, debole legame alle proteine plasmatiche ($\approx 10\%$) e ottima distribuzione verso quasi tutti i tessuti. Il suo spettro d'azione antimicrobica lo rende efficace nei confronti di vari protozoi, come *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis*, e della maggior parte dei batteri anaerobici sia Gram-negativi che Gram-positivi. Per questo motivo è considerato uno degli antibiotici più efficaci per l'eradicazione delle infezioni a carico delle tasche parodontali infiammate, generalmente legate alla colonizzazione da parte di specie anaerobiche (El-Kamel et al., 2007). Tuttavia, l'uso sistemico del MTZ per la cura delle affezioni parodontali comporta una serie di problemi: la somministrazione prolungata aumenta, infatti, il rischio dell'insorgenza di fenomeni di resistenza e sono anche registrate reazioni avverse come nausea, diarrea e colite pseudomembranosa. Di conseguenza, è attualmente di grande interesse lo sviluppo di sistemi di *drug delivery* per la somministrazione topica degli antibiotici al livello delle tasche parodontali. Questo tipo di approccio porta a concentrazioni più elevate di farmaco nei siti bersaglio, riducendo al minimo gli effetti collaterali sistemici (Joshi et al., 2016).

Al fine di co-somministrare MTZ ed NLC cariche di CUR, queste ultime sono state preparate utilizzando una fase disperdente arricchita di MTZ (150 mg). Poiché la presenza di un nuovo componente in fase disperdente può comportare modifiche nelle caratteristiche delle NLC ottenute, queste sono state opportunamente caratterizzare. Il campione, denominato B-300-M, ha mostrato dimensione media delle particelle inferiore a quella delle NLC B-300 di riferimento (Intensity: 112.0 ± 28.6 vs 157.0 ± 25.5 nm per B-300-M e B-300 rispettivamente), buoni valori di PDI (0.337) e potenziale Z pari a -24.0 ± 5.3 mV. Questi risultati mostrano come l'aggiunta dell'antibiotico comporti una riduzione della dimensione delle particelle senza modificare in maniera evidente gli altri parametri considerati. I risultati dimensionali ottenuti mediante DLS sono stati, inoltre, confermati dalle analisi SEM e TEM, come riportato in **Figura 19**, ove nanoparticelle sferiche di circa 200 nm sono visibili.

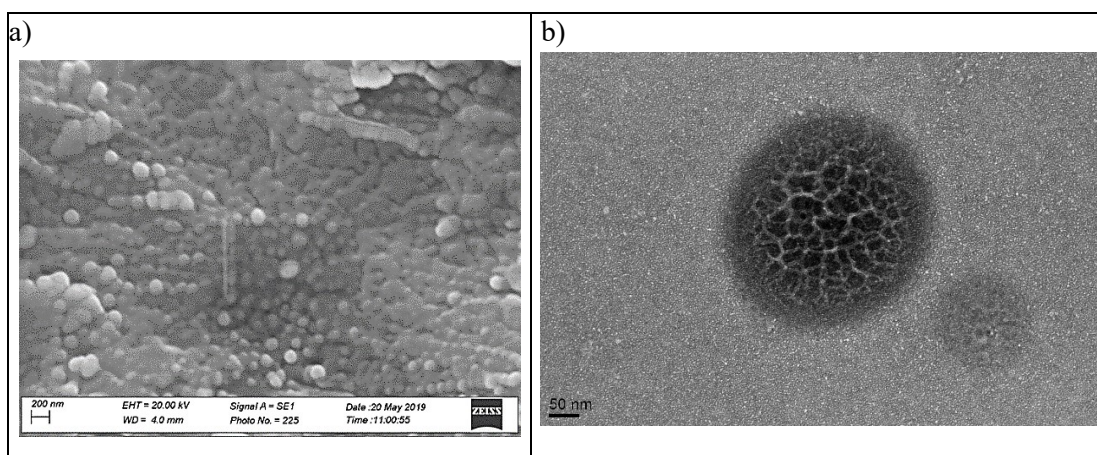


Figura 19: A) fotografia SEM della dispersione B-300-M; barra=200 nm, B) Fotografia TEM della singola nanoparticella del campione B-300-M; barra=50nm

Validata la possibilità di preparare le NLC cariche di CUR anche in presenza di MTZ, la dispersione B-300-M è stata caratterizzata dal punto di vista quantitativo di CUR e di MTZ, in vista del suo utilizzo per la realizzazione del nanocomposito. Per valutazione quantitativa degli attivi si intende un'analisi articolata in più step volti a valutare la quantità complessiva di CUR e/o MTZ nella dispersione, la loro quantità libera e infine, per differenza, la quantità effettivamente incapsulata all'interno delle NLC. Nel primo caso la determinazione della quantità totale di CUR nella dispersione ci dà informazioni circa la bontà del metodo di preparazione, infatti, lavorando con una sostanza polifenolica di origine naturale fortemente suscettibile ai fenomeni di degradazione termica diventa cruciale verificare se quest'ultima si mantiene stabile durante le varie tappe di preparazione. Per poter descrivere meglio questo parametro viene espresso come Drug Recovery % inteso come percentuale di attivo residuo nell'intera dispersione. Valori tendenti al 100% indicano che durante la preparazione delle NLC la sostanza funzionale non ha subito fenomeni di degradazione permettendo di validare il metodo di preparazione. Le analisi UV-Vis condotte hanno rivelato valori di DR% pari a $93.0 \pm 1.6\%$ e $88.0 \pm 2.1\%$ per CUR e MTZ rispettivamente, dimostrando la stabilità degli attivi e validando, di conseguenza, il metodo di preparazione. Successivamente è stata valutata la capacità carrier delle NLC nei confronti degli attivi mediante un'analisi indiretta. Nella fattispecie, alla quantità totale di attivi precedentemente calcolata è stata sottratta la quota degli stessi presente nel mezzo disperdente e quindi esterna alle NLC. Questa è stata valutata mediante i metodi della dialisi e dell'ultrafiltrazione scegliendo in entrambi i casi membrane inerti aventi cut-off tale da consentire il libero passaggio della soluzione di fase disperdente ma bloccando le NLC. È importante sottolineare che nella valutazione mediante ultracentrifugazione il processo è stato condotto termostatando lo strumento a circa 4°C in modo da prevenire fenomeni di riscaldamento che potrebbero causare rammollimento o fusione delle NLC con conseguente rilascio degli attivi incapsulati, falsando, dunque, i risultati. I due set-up sperimentali hanno condotto ad analoghi risultati, utilizzati per il calcolo della Drug Loading % (DL%) e Loading Efficacy % (LE%), e riportati in **Tabella 18**.

Tabella 18. Drug loading % (DL%) e Loading Efficacy % (LE%) $\pm$ SE di CUR e MTZ della dispersione B-300-M

Sostanza attiva	DL%	LE%
CUR	$4.65 \pm 0.60 \%$	$100 \pm 0.0\%$
MTZ	$2.21 \pm 0.04 \%$	$5.0 \pm 0.4 \%$

I risultati dimostrano che la totalità della CUR presente in dispersione è effettivamente incapsulata all'interno delle NLC come atteso, considerandone l'elevata affinità verso la miscela lipidica e la solubilità in soluzioni acquose estremamente bassa. È invece interessante sottolineare che, nonostante il MTZ sia solubile in acqua, circa il 5% dello stesso si trova all'interno delle NLC. Quanto osservato è in accordo con i dati di DLS poiché la presenza di MTZ nelle NLC, seppure in minima quota, comporta un cambiamento strutturale

delle stesse che, quindi, assumono una dimensione inferiore a quelle nella NLC B-300 di partenza.

4.1.3. Preparazione e caratterizzazione del nanocomposito contenente CUR e MTZ

Alla luce degli ottimi risultati ottenuti in termini di preparazione di NLC cariche di CUR anche in presenza di MTZ, si è proceduto alla realizzazione di una spugna polimerica bioerodibile in grado di intrappolare al suo interno le NLC per realizzare nel complesso un sistema nanocomposito. L'impiego di un sistema siffatto contenente le NLC permette di sfruttare i vantaggi offerti sia dalla matrice idrofila polimerica che dalle nanoparticelle lipofile, rendendo la dispersione nanoparticellare precisamente dosabile e localizzabile sul sito di applicazione, conferendole adesione con conseguente prolungamento del tempo di residenza della forma di dosaggio sul sito target. Questo dovrebbe favorire, da un lato, l'interazione del principio attivo insolubile con i tessuti circostanti grazie al suo intrappolamento all'interno delle nanoparticelle lipidiche e, dall'altro, la permanenza dell'antibiotico idrosolubile con il tessuto target per tempi prolungati creando nel complesso un sito altamente concentrato di entrambi gli attivi al fine di sfruttarne l'azione sinergica. Per ottenere un'opportuna spugna è stato quindi necessario individuare idonei polimeri in grado di costituire un reticolo idrofilo che, dopo somministrazione allo stato secco, avesse la capacità di richiamare acqua, rigonfiare, aderire ai tessuti e trattenere le NLC sulla superficie di contatto promuovendone la penetrazione. A tal fine è stata scelta una miscela di polimeri: l'acido ialuronico (HA) e il PVP K90. L'HA (**Figura 20**) è un glicosamminoglicano non solforato, costituito da una catena polisaccaridica non ramificata avente come unità ripetitiva un disaccaride formato da acido glucuronico e *N*-acetilglucosammina, legati tra di loro alternativamente da legami glicosidici $\beta 1 \rightarrow 4$ e $\beta 1 \rightarrow 3$, la cui conformazione viene ulteriormente stabilizzata da legami a idrogeno intramolecolari. A pH fisiologico i gruppi carbossilici delle unità glucuroniche sono ionizzati e questo conferisce al polimero elevata polarità nonché elevata solubilità in acqua. L'HA è stato quindi scelto in qualità di polimero biocompatibile, biodegradabile ed ampiamente usato in ambito odontoiatrico come cicatrizzante e coadiuvante la rigenerazione tissutale, ma anche per la sua capacità di complessarsi con moltissime molecole di acqua raggiungendo un elevato grado di swelling (Casale et al., 2016).

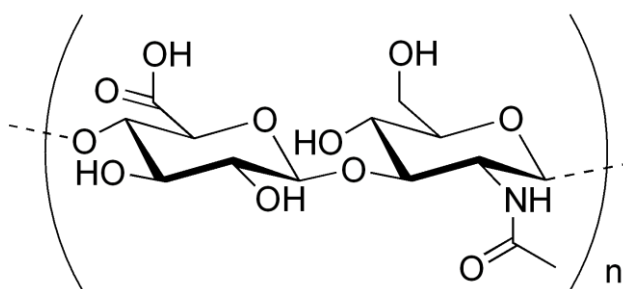


Figura 20. Struttura chimica dell'acido ialuronico

Il PVP K90 (**Figura 21**) è un polimero idrosolubile costituito da monomeri di 1-vinil-2-pirrolidone. Possiede una elevata inerzia dal punto di vista chimico e biologico ed è in grado di costituire gel trasparenti, non influenzando così l'estetica del prodotto finale. Grazie alla sua versatilità, il PVP K90 è un eccipiente ampiamente utilizzato nell'industria farmaceutica, alimentare e cosmetica. È infatti un polimero biodegradabile, stabile e non tossico, in grado

di interagire con molecole sia idrofile che lipofile e, pertanto, spesso utilizzato per migliorare la solubilità e promuovere la velocità di dissoluzione e quindi la biodisponibilità di attivi scarsamente solubili in acqua. Inoltre, è in grado di aumentare la stabilità fisica dei solidi in forma amorfa prevenendone la cristallizzazione ed è spesso utilizzato per la realizzazione di formulazioni da applicare sulle mucose orali grazie alle sue spiccate proprietà mucoadesive (Kurakula & Rao, 2020; Perioli et al., 2004).

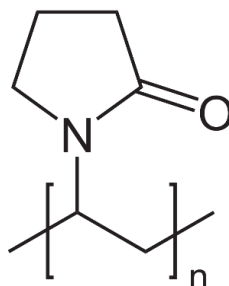


Figura 21. Struttura chimica generica del Polivinilpirrolidone

Poiché per la realizzazione del nanocomposito è stato scelto il processo di Freeze drying, la miscela di polimeri è stato inoltre addizionata di un opportuno agente crioprotettivo quale il trealosio. Un crioprotettore è una sostanza di origine naturale o sintetica che durante il congelamento impedisce ai cristalli di ghiaccio di danneggiare un determinato prodotto. Solitamente i crioprotettori agiscono abbassando la temperatura di transizione vetrosa di un materiale o posizionandosi tra quest'ultimo e le molecole d'acqua creando un vero e proprio cuscinetto isolante. Il trealosio (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranoside, **Figura 22**) è uno zucchero idrofilo, biocompatibile, utile nel rallentare le reazioni chimiche e prevenire la degradazione di materiali biologici. Numerosi studi hanno dimostrato, inoltre, che esso è in grado di preservare dall'essiccamento enzimi, membrane e sistemi artificiali, come i liposomi. Ciò è dovuto alla capacità del trealosio di formare legami ad idrogeno con le biostrutture, sostituendosi così all'acqua, o di interporli tra esse e l'acqua presente (Chiantia et al., 2005).

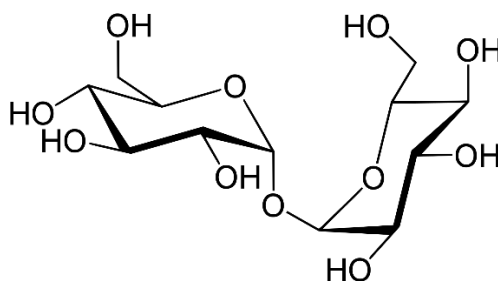


Figura 22. Struttura chimica del trealosio

Utilizzando, quindi, HA, PVP K90 e trealosio e variandone i rapporti in peso sono stati realizzati due diversi gel: il Gel 1 è caratterizzato da una minore quantità di polimeri e una più alta percentuale di trealosio, viceversa il Gel 2 contiene una minore quantità di trealosio ma quantità maggiori di polimeri. Quantità note (2 o 4 g) di gel son state miscelate con le

dispersioni B-300 e B-300-M fresche mediante un ciclo di sonicazione. I campioni così ottenuti sono stati congelati e sottoposti a freeze drying ottenendo delle polveri gialle e porose, conservate sottovuoto e al riparo dalla luce. Tutti i nanocompositi appena preparati appaiono polverosi, friabili, ed uniformi in colore. Tuttavia, i nanocompositi NC1 ed NC1-M (contenenti il Gel 1) quando mantenuti alle condizioni ambientali cambiavano d'aspetto sia in termini di colore (viraggio da giallo a marrone) che di texture, divenendo appiccicosi e difficilmente lavorabili. Questo è probabilmente legato ad una insufficiente quantità di polimeri insieme ad un eccesso di trealosio. Di contro i nanocompositi preparati utilizzando 4 g sia di Gel 1 che di Gel 2 non erano soggetti a questo fenomeno e sono stati caratterizzati innanzitutto in termini di quantità degli attivi.

Per verificare che entrambi gli attivi fossero omogeneamente distribuiti nel nanocomposito sono state prelevate aliquote da parti diverse della medesima polvere (per ciascun lotto di preparazione), solubilizzate in metanolo e sottoposte ad analisi spettrofotometriche UV-Vis. I risultati ottenuti dimostrano l'effettiva omogeneità dei nanocompositi preparati aventi, nel caso del campione NC2-M, un contenuto medio di CUR e MTZ rispettivamente pari a $0.88 \pm 0.15\%$ e $9.32 \pm 0.11\%$, mentre per il campione NC3-M di $0.90 \pm 0.10\%$ e $9.50 \pm 0.10\%$ p/p rispettivamente di CUR e MTZ. Data la natura polverulenta dei prodotti finali e la presenza nella loro composizione di polimeri ed eccipienti idrofili diventa cruciale valutare la capacità di ciascun nanocomposito di equilibrarsi con l'umidità ambientale. Questa caratterizzazione è di fondamentale importanza poiché la presenza di acqua all'interno del campione potrebbe influenzarne le caratteristiche di scorrimento e maneggevolezza ma soprattutto innescare fenomeni di degradazione degli attivi in esso contenuti. A tal fine sono stati condotti studi di igroscopicità valutando l'incremento in peso percentuale in funzione del tempo, ed i risultati sono riportati graficamente (**Figura 23**).

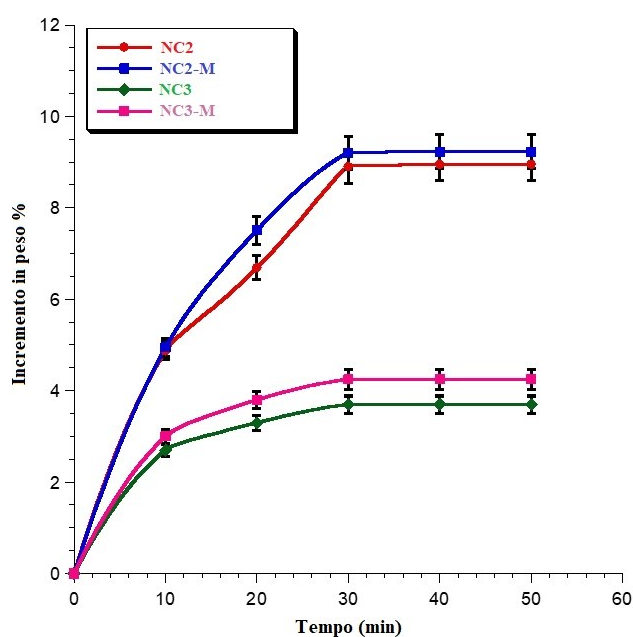


Figura 23: Variazione in peso percentuale in funzione del tempo dei quattro nanocompositi quando messi a contatto con l'umidità ambientale. Dati espressi come media $\pm$ SE ($n = 3$).

Come si evince dal grafico tutti i nanocompositi incrementano il loro peso fino a circa 30 minuti dall'inizio dell'esperimento per poi stabilizzare questo valore nei restanti intervalli di tempo considerati. In particolare, nei campioni NC2 ed NC2-M si osserva un rapido adsorbimento di acqua nei primi minuti, il quale una volta raggiunto l'equilibrio comportava un'evidente variazione nell'aspetto delle polveri, le quali apparivano più coese e poco scorrevoli. Questo fenomeno è probabilmente dovuto alla maggiore quantità di trealosio nella composizione (Gel 1) che, essendo una sostanza fortemente igroscopica, è in grado di richiamare una maggiore quantità di acqua dall'ambiente. Per questo motivo i campioni NC2 ed NC2-M sono stati scartati. Contrariamente, i nanocompositi NC3 ed NC3-M, i quali contengono nella loro composizione una maggiore quantità di polimeri a discapito del trealosio, al termine dell'esperimento mantenevano le loro proprietà di scorrimento, non erano appiccicosi al tatto e per questo motivo scelti come nanocompositi definitivi per le successive caratterizzazioni. *In primis* è stato valutato lo stato fisico dei componenti mediante analisi di calorimetria a scansione differenziale (DSC) ed i termogrammi sono riportati in **Figura 24**.

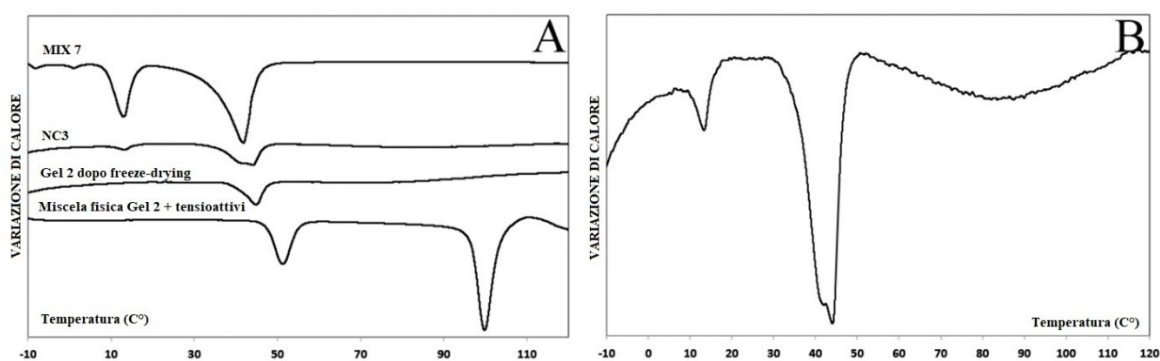


Figura 24: **A)** Confronto termogrammi di MIX 7, NC3, Gel 2 dopo essiccazione con freeze-drying e miscela fisica dei componenti del Gel 2 e tensioattivi; **B)** Ingrandimento del termogramma del nanocomposito NC3.

Osservando il termogramma acquisito analizzando la miscela fisica dei componenti del Gel 2 compresi i tensioattivi è possibile notare la presenza di due picchi endotermici a 52 °C e 97 °C relativi rispettivamente ai punti di fusione del Pluronic F-68 e del Trealosio, mentre non sono presenti quelli dei polimeri (PVP K90 e HA) poiché in quanto tali sono privi di un punto di fusione ben definito. Tuttavia, nelle analisi condotte sul gel essiccato così come sul nanocomposito NC3 è assente il picco endotermico del Trealosio suggerendone la sua completa amorfizzazione. La curva MIX 7 rappresenta la miscela lipidica utilizzata per la realizzazione delle NLC preparata per fusione, miscelazione e successiva solidificazione dei componenti lipidici 24h prima dell'analisi e mostra un primo picco di assorbimento calorimetrico a 11-13 °C corrispondente all'IP ed un secondo picco a 40°C corrispondente alla fusione dell'EXA. Confrontando il termogramma del MIX 7 con quello del nanocomposito si nota in quest'ultimo l'analogo picco di assorbimento calorimetrico dell'IP, seppur poco evidente, e la presenza di un picco tra 44 e 46 °C di difficile attribuzione poiché potrebbe essere relativo sia al punto di fusione dell'EXA che a quello del Pluronic F-68.

In ambito rigenerativo l'utilizzo di sistemi estremamente porosi è sicuramente un vantaggio, poiché la porosità influenza da una parte la capacità di un sistema matriciale di adsorbire i

fluidi biologici e permettere così il rilascio delle sostanze attive in essa inglobate e dall'altra di favorire l'adesione cellulare con conseguente rigenerazione del tessuto lesa (Loh & Choong, 2013). A tal fine la porosità dei nanocompositi NC3 ed NC3-M è stata investigata sia matematicamente che mediante analisi SEM. Nel primo caso i risultati, riportati come porosità percentuale, hanno dimostrato l'elevata porosità di entrambi i campioni con valori di $93.15 \pm 0.14\%$ e $92.86 \pm 0.18\%$ rispettivamente per i nanocompositi con e senza MTZ. Questi valori sono considerati ottimali per l'obiettivo previsto in quanto in medicina rigenerativa sono generalmente richiesti sistemi matriciali aventi porosità percentuale superiore al 90%. Inoltre, dalle analisi SEM condotte sul campione NC3-M (**Figura 25**) è possibile osservare più nel dettaglio l'aspetto morfologico della matrice polimerica, la quale si presenta con numerose porosità aventi un diametro medio di 10-20 μm .

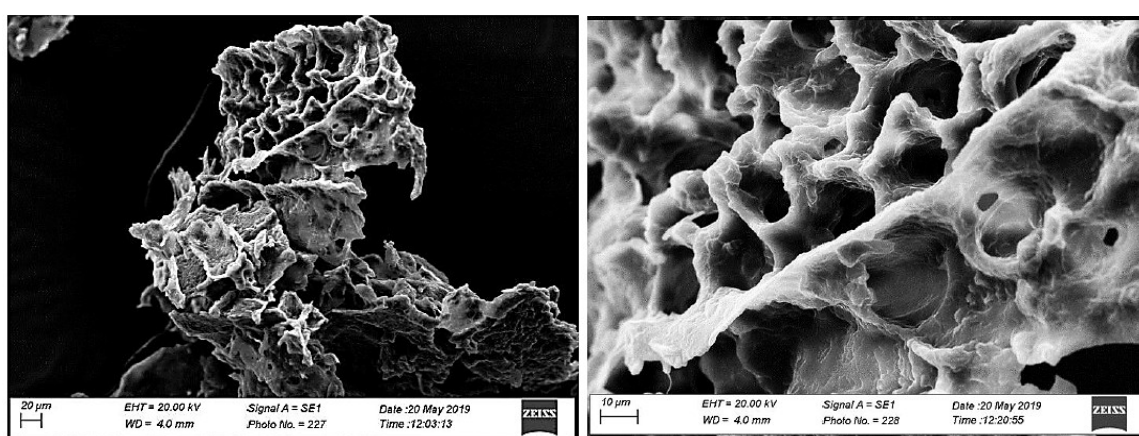


Figura 25: Immagini SEM della morfologia superficiale del nanocomposito NC3-M A) barra = 20 μm ; B) barra = 10 μm

Un efficiente sistema di veicolazione deve essere in grado di proteggere le sostanze funzionali in esso caricate dai fenomeni di degradazione. Questa caratteristica è fondamentale al fine di preservare l'integrità strutturale degli attivi e di conseguenza le loro proprietà terapeutiche. In questo contesto la CUR, essendo una sostanza di natura polifenolica è molto sensibile a diversi fattori coinvolti nei processi di degradazione come la radiazione luminosa UV, la temperatura ed il pH. Pertanto, la sua incorporazione in veicoli lipidici dovrebbe proteggere la sua struttura chimica mantenendo integre le sue proprietà *scavenger* contro i radicali liberi. Inoltre, bisogna sottolineare che durante la preparazione delle NLC i parametri di processo contemplano l'utilizzo di diverse fonti di energia (calore, ultrasuoni, ecc.) le quali possono innescare una parziale degradazione della sostanza. Per questi motivi è stata valutata l'attività antiossidante dei nanocompositi NC3 ed NC3-M mediante test di ABTS, utilizzando il campione NC-BL2 come controllo. I risultati espressi come percentuale di inibizione dei radicali liberi (RSA%) in funzione del tempo sono riportati nei seguenti grafici (**Figura 26**).

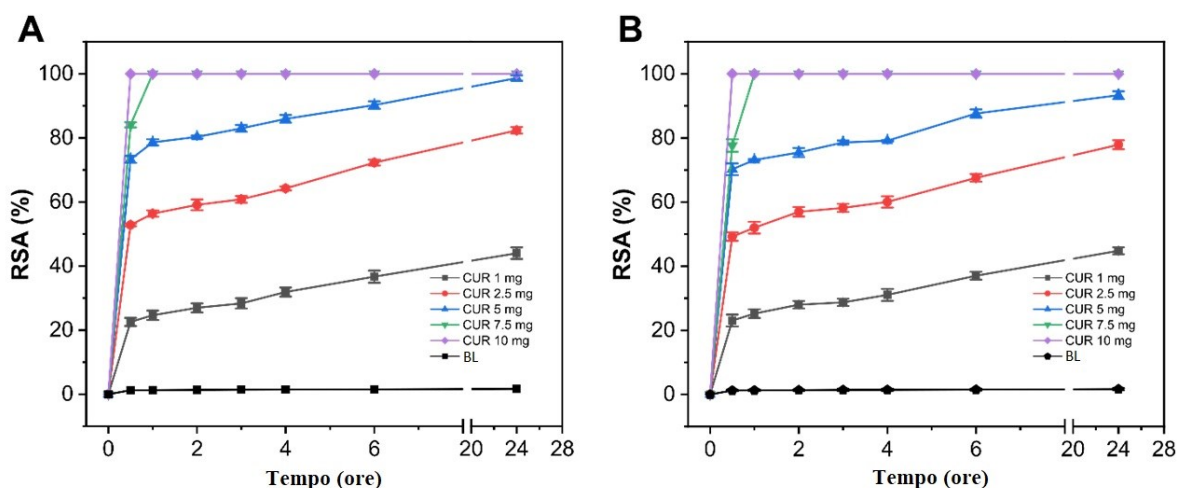


Figura 26: Attività contro radicali liberi di 10, 7.5, 5, 2.5, and 1 mg del campione NC3 (A) e NC3-M (B); è stato riportato il valore di RSA% del campione NC-BL2 usato come controllo.

Come era prevedibile il campione controllo non mostra nessuna proprietà *scavenger*, mentre i campioni contenenti la CUR mostrano un'attività antiossidante dose e tempo-dipendente. Nello specifico 10 e 7.5 mg del nanocomposito raggiungevano il 100% di inibizione rispettivamente nel giro di 30 e 60 minuti, mentre quando se ne utilizzavano 5 mg il massimo si raggiungeva dopo 24 ore. Utilizzando quantità inferiori, invece, il grafico dimostra che 2.5 e 1 mg di nanocomposito erano in grado di inibire la quantità di radicali liberi rispettivamente del 82% e 44% dopo 24 ore. È stato possibile osservare lo stesso andamento anche quando gli esperimenti sono stati condotti sul campione contenente l'antibiotico, a conferma del fatto che il potere antiossidante è determinato dalla sola presenza della CUR. Questi risultati confermano che le fasi di preparazione del nanocomposito non influenzano in alcun modo le proprietà *scavenger* della CUR.

4.1.4 Preparazione e caratterizzazione delle mini-tablet

Come già accennato, l'obiettivo di questo lavoro è la co-somministrazione della CUR e del MTZ nella cavità post-estrattiva dopo rimozione del terzo molare, tuttavia, sottoforma di polvere il nanocomposito è difficilmente somministrabile e dosabile. Per ovviare a questo inconveniente il campione NC3-M è stato compattato avvalendosi di un dispositivo cilindrico graduato avente diametro interno di 4.7 mm e alle estremità due stantuffi mobili (Figura 27). In questo modo sono state realizzate le mini-tablets caratterizzate da un peso, diametro e spessore medio rispettivamente di 30.0 ± 1.0 mg, 4.50 ± 0.01 mm e 2.50 ± 0.05 mm. I bassi valori di errore standard dimostrano l'omogeneità *intra batch* delle mini-tablets validando il metodo di preparazione.

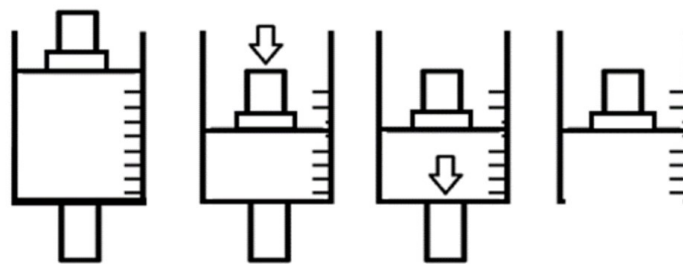


Figura 27. Rappresentazione schematica dello stampo graduato per la realizzazione delle mini-tablets

Le mini-tablet così ottenute sono state inizialmente caratterizzate per valutare le loro proprietà di swelling mediante due differenti test: in peso e visivo. Nel primo caso, ciascun campione è stato fatto condizionare con un liquido idrofilo simulante la saliva e ne è stato monitorato il suo incremento in peso in funzione del tempo. I risultati, espressi come indice di swelling in funzione del tempo sono riportati nel seguente grafico (**Figura 28**).

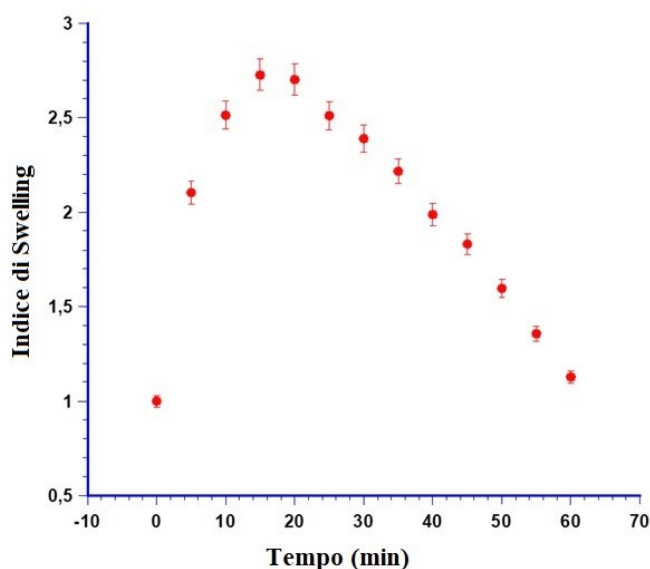


Figura 28: Indice di Swelling misurato come variazione del peso del nanocomposito in funzione del tempo (n=3)

Dal grafico si evince l'elevata attitudine del sistema a richiamare acqua e rigonfiare nei primi 15 minuti, con un picco massimo corrispondente ad un aumento in peso della mini-tablet idratata pari a circa 3 volte il suo peso secco. Questo comportamento è legato a due principali caratteristiche dei nanocompositi in esame: da una parte i componenti in maggiore quantità sono tutti idrofili e quindi in grado di interagire con le molecole d'acqua, dall'altra parte l'elevata porosità del sistema generatosi in seguito al processo di freeze-drying aumenta la superficie di contatto e di conseguenza la quantità di acqua assorbita. Tuttavia, una volta raggiunto il valore più alto di indice di swelling, la mini-tablet comincia ad erodersi come si evince dalla graduale riduzione del peso evidenziata nel grafico. A supporto di quanto descritto, la capacità di swelling dei campioni è stata, inoltre, valutata visivamente mediante

fotografie scattate a predeterminati intervalli di tempo sia radialmente che orizzontalmente, durante il processo di imbibizione della mini-tablet (**Figura 29**).

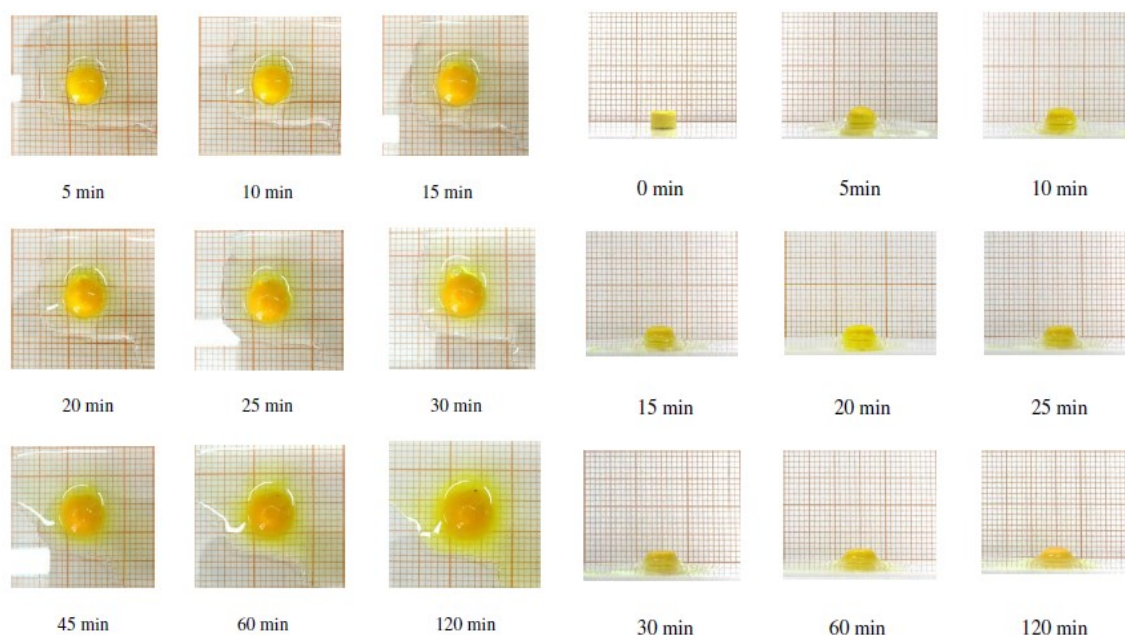


Figura 29: Timeline da 0 a 120 minuti dello swelling radiale ed orizzontale della mini-tablet.

Le fotografie confermano quello già osservato dagli esperimenti di swelling in peso, cioè un rapido rigonfiamento della mini-tablet fino ad un valore massimo seguito dall'insorgenza dei fenomeni di erosione (30-120 min). Tuttavia, nonostante le mini-tablets possiedano una notevole capacità di richiamare acqua e rigonfiare non si apprezza un'evidente variazione nel loro volume, pertanto una volta inserite all'interno della cavità post-estrattiva non dovrebbero arrecare alcun fastidio al paziente. Comprovata la capacità delle mini-tablets di interagire con i fluidi acquosi, sono stati condotti test di rilascio *in vitro* per studiare le modalità di rilascio della CUR e del MTZ nell'ambiente circostante. Un efficiente carrier di sostanze funzionali deve essere in grado, in seguito alla sua somministrazione, di rilasciare gli attivi affinché questi possano entrare in contatto con il sito bersaglio ed espletare, quindi, l'azione farmacologica. Per riprodurre la sequenza di eventi chimico-fisici che porta dalla somministrazione al rilascio della sostanza funzionale sono stati messi a punto opportuni modelli *in vitro*. Si tratta, tuttavia, di saggi puramente tecnologici che non sono predittivi di quanto accadrebbe *in vivo*, ma che danno informazioni essenziali circa l'influenza della composizione e del metodo di preparazione del *carrier*, sulla sua capacità di controllare la velocità di rilascio dell'attivo, fornendo le indicazioni necessarie per la formulazione di forme di dosaggio più efficienti ed efficaci. Sono, inoltre, saggi indispensabili per eseguire studi di controllo qualità mirati alla valutazione della riproducibilità della formulazione. In generale i test di rilascio sono test fisici, distruttivi, che consentono di determinare la velocità ed il meccanismo con i quali una sostanza passa in soluzione quando viene rilasciata da una piattaforma di veicolazione. Per quanto riguarda le forme di dosaggio convenzionali, nelle Farmacopee si ritrovano opportuni test di dissoluzione *in vitro* standardizzati che utilizzano varie apparecchiature in base alla tipologia di formulazione da testare (es. dissolutore con

agitatore a pale, sistemi a cella di flusso, celle di diffusione di Franz). Tuttavia, per condurre un test di rilascio è necessario tenere in considerazione alcuni fattori. Nel compartimento donatore nel quale andrà inserita la formulazione da analizzare bisogna stabilire la natura del fluido, il volume e la quantità di attivo; mentre nel compartimento accettore dal quale vengono fatti i prelievi per valutare la quantità di attivo rilasciato da sistema bisogna considerare tipologia e volume del fluido accettore. È molto importante considerare il volume ed il tempo di ogni prelievo poiché è imperativo mantenere le condizioni *sink* dell'intero sistema. In particolare, è necessario sottoporre grande attenzione sulla scelta del fluido accettore poiché esso deve essere in grado di solubilizzare la sostanza funzionale da analizzare in modo tale che durante l'esecuzione del test la sua concentrazione non superi il 10% della concentrazione di saturazione, garantendo così le condizioni *sink* del sistema. Inoltre, l'attivo deve rimanere stabile nel fluido accettore, onde evitare una sua degradazione durante tutta la durata degli esperimenti. In questo caso il setting sperimentale è stato individuato nelle celle verticali tipo Franz, quale sistema a due compartimenti aperti (**Figura 30**).

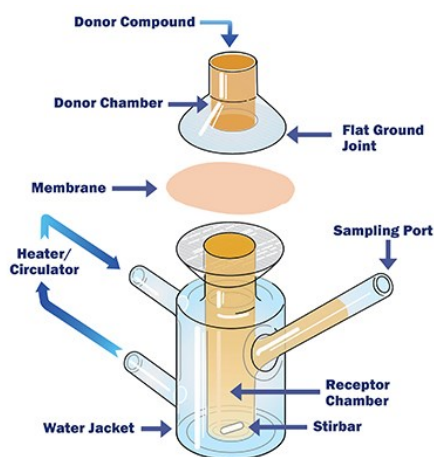


Figura 30. Rappresentazione schematica di una cella a diffusione verticale tipo Franz

Questi sistemi sono costituiti da cinque elementi principali quali: i) un compartimento donatore, all'interno del quale viene inserita la formulazione od il campione da analizzare; ii) un compartimento ricevente, contenente il liquido accettore; iii) il sito di allocazione della membrana, che separa il compartimento donatore da quello ricevente, caratterizzato in questo caso da una superficie pari a 0.636 cm²; iv) il braccio laterale inclinato, comunicante con il compartimento accettore, utilizzato per il prelievo dei campioni di fluido da analizzare per valutare l'eventuale presenza di attivi permeati e per l'immissione di fluido accettore fresco a seguito di ogni singolo prelievo, per mantenere le condizioni *sink*; v) una camicia esterna di termostatazione, per garantire il mantenimento della corretta temperatura per tutta la durata dell'esperimento. Infine, all'interno del sistema viene anche introdotto un agitatore magnetico, posto nel compartimento accettore, che mantiene omogenea la soluzione in esso contenuta. Per questi esperimenti è stata interposta tra i due compartimenti una membrana liberamente permeabile di Nitrato di Cellulosa con un cut-off di 0.45 µm capace di far permeare sia il MTZ che le NLC. Nel compartimento donatore è stata inserita la mini-tablet

bagnata con 0.5 mL di tampone citrato pH 6.2 per permettere alla stessa di rigonfiare, requisito fondamentale per favorire il rilascio degli attivi. Il compartimento ricevente è stato riempito, alternativamente, con due differenti solventi: il miristato di Isopropile è stato selezionato per studiare il rilascio della CUR, mentre il tampone citrato pH 6.2 con il 4% p/v di Tween 20 per osservare il rilascio del MTZ. La scelta di utilizzare liquidi accettori differenti ma affini di volta in volta alla sostanza di interesse, è dovuto alle diverse caratteristiche chimico-fisiche degli attivi e dalla impossibilità di avere un unico liquido accettore in cui entrambi fossero solubili. Nel caso del liquido accettore idrofilo questo è stato addizionato di Tween 20 alla concentrazione di 4 % p/v poiché a questi valori i tensioattivi formano micelle che agiscono da solubilizzanti garantendo le condizioni *sink* dell'intero sistema. Per quanto riguarda il liquido accettore lipofilo, la scelta era ricaduta su due diversi solventi quali l'1-ottanolo ed il miristato di isopropile poiché essi sono noti per il loro impiego nei test di rilascio *in vitro* come modelli dei lipidi che costituiscono le membrane dei tessuti biologici (Proniuk et al., 2001). L'1-ottanolo (**Figura 31**) è un alcol a lunga catena che a temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore da un odore caratteristico.

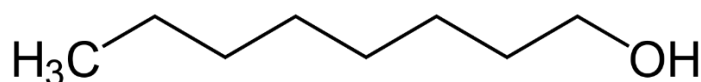


Figura 31. Struttura chimica dell'1-ottanolo

Il miristato di isopropile (**Figura 32**) è un estere tra l'alcol isopropilico e l'acido miristico che a temperatura ambiente si presenta come un liquido inodore e incolore.

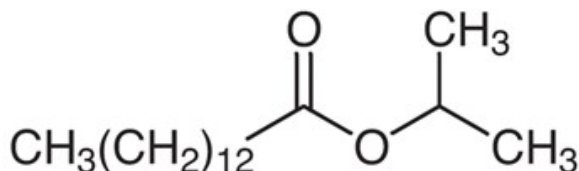


Figura 32. Struttura chimica del miristato di isopropile

Tuttavia, l'1-ottanolo è stato scartato poiché non era in grado di solubilizzare opportunamente né la CUR che alcuni componenti della miscela lipidica, mentre il miristato di isopropile mostrava ottime proprietà solventi e quindi è stato preferito come liquido accettore. Al termine degli esperimenti i dati sono stati elaborati come frazione della dose rilasciata in funzione del tempo (**Figura 33**). Inoltre, per comprendere al meglio il meccanismo di rilascio al termine di ogni esperimento, i dati sperimentali sono stati elaborati matematicamente e fittati con i modelli matematici più comunemente usati per l'analisi e la interpretazione del rilascio dei farmaci dalle forme di dosaggio (ordine zero, primo ordine, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin). Le elaborazioni matematiche sono state condotte impostando la frazione della dose (M_t/M_∞) come variabile dipendente ed il tempo come variabile indipendente. La bontà del fitting è stata valutata sia osservando i valori di R^2 che valutando graficamente il miglior fitting (Y. Zhang et al., 2010). In particolare:

- La cinetica di **ordine zero** descrive un fenomeno di rilascio del farmaco che avviene a velocità costante in funzione esclusivamente del tempo e che è totalmente indipendente dalla sua concentrazione (Laracuent et al., 2020). L'equazione che descrive tale cinetica è la seguente:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_0 \cdot t$$

Questa può essere modificata come segue per includere fenomeni di lag time:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_0 \cdot (t - T_{lag})$$

- La cinetica di **primo ordine** descrive un rilascio di farmaco proporzionale alla quantità di attivo residua e che quindi si riduce in funzione del tempo (Noyes & Whitney, 1897) L'equazione che descrive tale cinetica è la seguente:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t})$$

Questa può essere modificata come segue per includere fenomeni di lag time:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 \cdot [1 - e^{-k_1 \cdot (t - T_{lag})}]$$

Inoltre, poiché la cinetica di primo ordine tende matematicamente ad un valore massimo in quanto considera la progressiva riduzione della velocità di rilascio dell'attivo dovuta alla riduzione della quantità residua dello stesso, qualora sperimentalmente si osservi il raggiungimento di un plateau è opportuno modificare l'equazione introducendo il parametro F_{MAX} come segue:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = F_{max} \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t})$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = F_{max} \cdot [1 - e^{-k_1 \cdot (t - T_{lag})}]$$

Dove F_{MAX} è la quantità massima di farmaco che fuoriesce dal sistema, che ovviamente è inferiore a 1.

- La cinetica secondo **Higuchi** descrive un fenomeno di dissoluzione del farmaco da un sistema matriciale inerte e si applica per lo studio di rilascio di farmaci sia molto solubili che scarsamente solubili inglobati all'interno di una matrice solida o semisolida inerte (Higuchi, 1961). L'equazione che descrive tale cinetica è la seguente:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \cdot t^{0.5}$$

Questa può essere modificata come segue per includere fenomeni di lag time:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \cdot (t - T_{lag})^{0.5}$$

- Il modello cinetico secondo **Korsmeyer-Peppas** (o Power Law) è semi-empirico e si applica per descrivere il rilascio del farmaco quando non è nota la cinetica o quando sono coinvolti meccanismi di rilascio multipli. È generalmente il modello più utilizzato per descrivere il rilascio dei principi attivi da matrici polimeriche poiché questo può essere governato contemporaneamente da più fenomeni apparentemente indipendenti quali diffusione, rilassamento ed erosione (Korsmeyer et al., 1983). L'equazione che descrive tale cinetica è la seguente:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{KP} \cdot t^n$$

Questa può essere modificata come segue per includere fenomeni di lag time:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{KP} \cdot (t - T_{lag})^n$$

In entrambi i casi, la valutazione del valore dell'esponente n consente di trarre informazioni sul tipo di fenomeno in atto: i) $n = 0.5$. Si parla di modello Fickiano. Il rilascio del farmaco è governato dai fenomeni di diffusione (con tale esponente l'equazione coincide con quella di Higuchi); ii) $0.5 < n < 1$. Si parla di trasporto anomalo non-Fickiano. Il rilascio del farmaco è governato sia dalla diffusione che dallo swelling; iii) $n = 1$. Si parla di modello non-Fickiano. Il rilascio del farmaco è governato dallo swelling o dal rilassamento; iv) $n > 1$. Si parla di super case II model. Il rilascio del farmaco è governato da complessi meccanismi intrinseci alla matrice dovuti a tensione e rottura con conseguente massivo ingresso di solvente.

- Il modello cinetico secondo **Peppas-Sahlin** viene applicato per descrivere meccanismi di rilascio anomali di attivi da un sistema matriciale, considerando il contributo di due meccanismi diversi uno di tipo diffusivo fickiano e l'altro dipendente dalle variazioni conformazionali del sistema (erosione, rilassamento delle maglie polimeriche). Viene descritto matematicamente dalla seguente equazione:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 \cdot t^m + k_2 \cdot t^{2m}$$

Questa può essere modificata come segue per includere fenomeni di lag time:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 \cdot (t - T_{lag})^m + k_2 \cdot (t - T_{lag})^{2m}$$

Considerando l'equazione, il primo termine rappresenta il contributo diffusivo di tipo fickiano (F) mentre il secondo il caso anomalo tipo II (R). Il coefficiente m è l'esponente di diffusione puramente fickiano (come già osservato nelle precedenti cinetiche), si ricollega all'esponente n della cinetica di Korsmeyer-peppas ed è dipendente dalla geometria del sistema *carrier*. Questa equazione può essere

rimodulata in modo tale da comprendere quale dei due contributi è preponderante nel governare il rilascio dell'attivo, secondo la seguente relazione:

$$\frac{R}{F} = \frac{k_2 \cdot t^m}{k_1}$$

I risultati del fitting dei dati sperimentali con le suddette equazioni sono di seguito riportati (**Tabella 19**).

Tabella 19. Parametri di ciascun fitting applicati al rilascio della CUR e del MTZ

	MTZ			CUR		
Equazioni	k	n or m	R ²	k	n or m	R ²
$F = k_0 \cdot t$ Ordine Zero	1.60*10 ⁻³		null	2.42*10 ⁻⁴		0.798
$F = 100 \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t})$ Primo ordine	1.60*10 ⁻⁵		null	2.43*10 ⁻⁶		0.799
$F = F_{\max} \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t})$ Primo ordine con F _{max} ^a	2.30*10 ⁻²	Fmax= 0.261	0.994	8.21*10 ⁻³	Fmax= 0.055	0.990
$F = k_H \cdot t^{0.5}$ Higuchi	2.065*10 ⁻²		0.735	3.00*10 ⁻³		0.929
$F = k_{KP} \cdot t^n$ Korsmeyer–Peppas	4.77*10 ⁻²	0.32788	0.916	1.54*10 ⁻³	0.6355	0.961
$F = k_1 \cdot t^m + k_2 \cdot t^{2m}$ Peppas–Sahlin	k1= 2.16*10 ⁻² k2= -5.43*10 ⁻⁶	0.54138	0.992	k1= 3.47*10 ⁻⁴ k2= -9.54*10 ⁻⁷	1.0354	0.993
In tutti i modelli F è la frazione della dose (Mt/M_∞) rilasciata nel tempo: ^a Fmax = Dose massima rilasciata al tempo t kH = Costante di Higuchi kKP = Costante del modello di Korsmeyer-Peppas; n è il coefficiente che descrive il meccanismo di rilascio k1 è la costante che esprime il coefficiente di rilascio fickino; k2 è la costante riferita al meccanismo di rilascio anomalo di tipo II; m è il coefficiente di diffusione ottenuto matematicamente tenendo conto della geometria del sistema.						

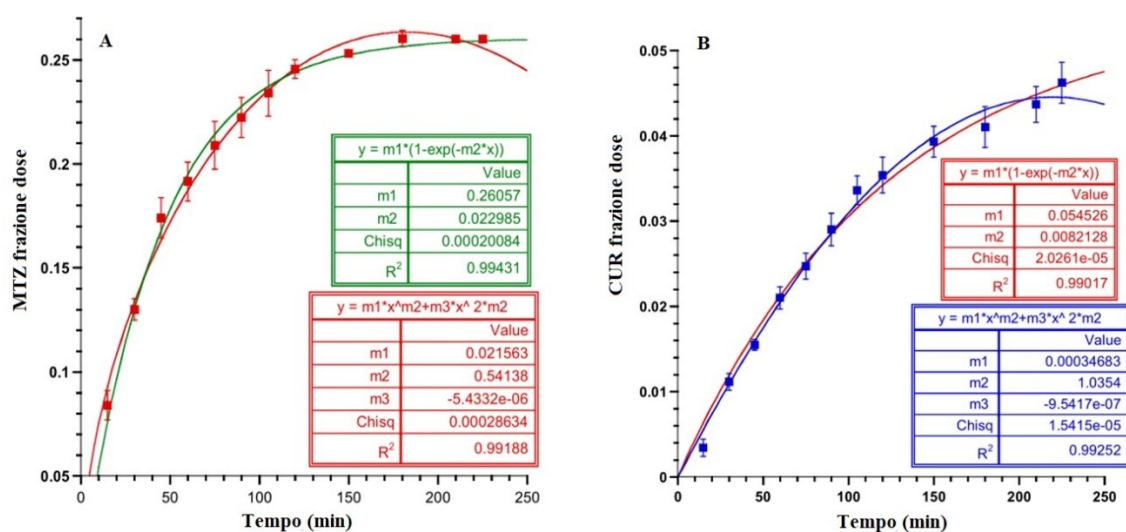


Figura 33: Dati di rilascio del MTZ (A) e CUR (B) dalle mini-tablet espressi come frazione della dose in funzione del tempo. Le curve sono il risultato del *fitting* applicando l'equazione matematica del modello secondo Peppas-Sahlin (Rosso MTZ, Blu CUR) e del Primo Ordine (Verde MTZ, Rosso CUR). I dati sono riportati come media $\pm$ SE (n = 6).

Una prima informazione deducibile dai grafici è la differente velocità di rilascio della CUR e del MTZ dal nanocomposito, risultando rilasciati dopo 2 ore di esperimento rispettivamente il 4 ed il 25% della dose somministrata. Questa evidente differenza in termini di quantità di attivo rilasciato è probabilmente dovuta alla struttura matriciale del sistema stesso che rallenta la diffusione delle NLC (e di conseguenza della CUR) ma non dell'antibiotico in gran parte non incapsulato nelle nanoparticelle, ma omogeneamente disperso tra le maglie dei polimeri. Dalle elaborazioni cinetiche si osserva che il rilascio di CUR e MTZ è governato dallo stesso meccanismo, identificabile con il modello di Peppas-Sahlin che, come descritto deriva dal modello Power Law ma considera il contributo di due differenti meccanismi, uno di tipo diffusivo fickiano ed un altro determinato dal rilassamento della matrice, dovuto a variazione dello stato di transizione vetroso, dallo swelling o dall'erosione (trasporto anomalo di tipo II). Questo modello si applica bene al nanocomposito in studio poiché esso è costituito da una matrice polimerica idrofila capace di rigonfiare quando a contatto con i fluidi acquosi. Quindi, è possibile ipotizzare che il rilascio degli attivi è governato sia da fenomeni di tipo diffusivo degli attivi (o delle NLC) che determinato dalle variazioni strutturali del nanocomposito. Tuttavia, bisogna sottolineare che la cinetica del primo ordine con F_{max} applicata allo studio di rilascio del MTZ restituiva un elevato valore di coefficiente R^2 suggerendo che il meccanismo di rilascio dell'antibiotico è primariamente regolato da un contributo di tipo diffusivo. Questa ipotesi può essere giustificata dal fatto che il MTZ essendo omogeneamente distribuito nel network della matrice idrofila, viene prontamente solubilizzato e può fuoriuscire per semplice diffusione, limitato esclusivamente dal gradiente di concentrazione.

I risultati ottenuti dai test di rilascio permette di validare il sistema nanocomposito preparato come piattaforma di veicolazione. Un'ulteriore caratterizzazione ha riguardato la valutazione delle abilità del nanocomposito di promuovere l'assorbimento e/o la

permeazione nei tessuti biologici degli attivi incapsulati. A tal fine, sono stati condotti studi *ex vivo* utilizzando una mucosa buccale porcina come modello di tessuto. Il metodo più accreditato per effettuare una valutazione della permeabilità dei principi attivi attraverso membrane biologiche prevede l'uso di modelli bicompartimentali in cui i due compartimenti, uno donatore e l'altro accettore, sono separati da una membrana atta a simulare il tessuto biologico in studio.

Affinché si possa studiare il passaggio (permeazione) attraverso la membrana è necessario che vi sia un sufficiente gradiente di concentrazione del principio attivo. Pertanto, nel modello d'uso corrente, rappresentato dalla cella verticale di tipo Franz, il compartimento donatore deve essere costituito da una soluzione di attivo sufficientemente concentrata che garantisca il corretto gradiente e quindi il libero passaggio per diffusione passiva del principio attivo nel compartimento accettore. Inoltre, quando si valuta la permeabilità di molecole scarsamente solubili in acqua è fondamentale migliorarne la solubilità nel compartimento accettore per aumentare il gradiente di concentrazione. Risulta, anche in questo caso, indispensabile selezionare un fluido accettore in cui l'attivo in esame sia liberamente solubile per essere sicuri che qualsiasi limitazione in termini di permeazione sia dovuta solo alle caratteristiche della sostanza stessa anziché alle restrizioni dovute alla saturazione del mezzo accettore (dovuto al non mantenimento delle condizioni *sink*).

In questo studio è stata utilizzata la mucosa buccale porcina come tessuto modello poiché essa è considerata la più rappresentativa del tessuto umano per spessore, composizione, morfologia e contenuto lipidico, essendo l'epitelio del maiale non cheratinizzato (Kulkarni et al., 2010). Nel compartimento donatore è stata inserita la mini-tablet bagnata da un piccolo volume di tampone citrato pH 6.2, mentre in quello accettore è stato aggiunto tampone citrato a pH 6.2 contenente il 4 % p/v di Tween 20 per simulare il compartimento ricevente fisiologico.

Dai risultati è possibile osservare che l'antibiotico, a differenza della CUR, data la sua natura idrofila è in grado di attraversare la membrana buccale e raggiungere il compartimento ricevente della cella di Franz. I risultati sono stati elaborati ed espressi in termini di flusso come riportato nel paragrafo **3.2.1.18** e riportati graficamente (**Figura 34**)

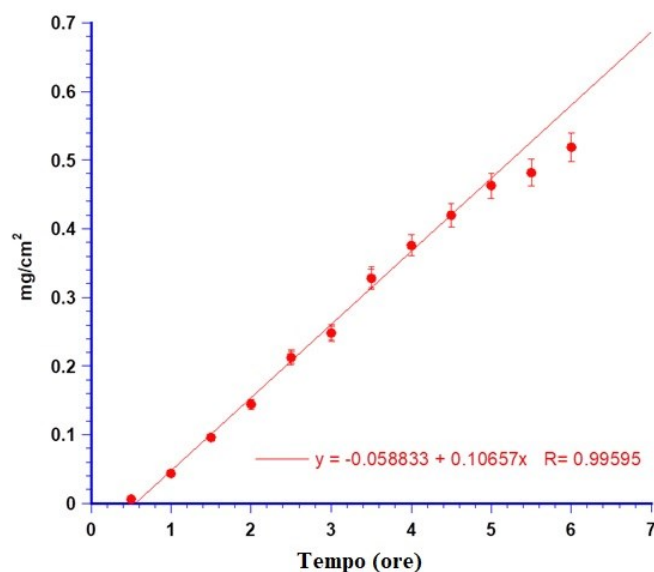


Figura 34: Permeazione del MTZ attraverso la mucosa buccale, espressa come quantità permeata per cm^2 in funzione del tempo. La retta è stata tracciata considerando l'andamento allo steady state. I risultati sono riportati come media $\pm$ SE ($n = 6$).

In particolare, i valori di flusso (J) sono stati ricavati dal coefficiente angolare della retta ottenuta in condizioni di *steady-state*, diagrammando la quantità permeata di MTZ per unità di superficie in funzione del tempo, espresso in ore, risultando pari a $0.106 \text{ mg/cm}^2\text{h}^{-1}$. Al termine di ogni esperimento, le celle sono state disassemblate e si è proceduto alla valutazione quantitativa di CUR e MTZ intrappolati all'interno della mucosa, che sono risultati rispettivamente il $17.45 \pm 0.52\%$ e il $10.80 \pm 0.33 \%$ della dose somministrata. Volendo determinare se esistesse una correlazione tra il tempo di contatto della formulazione con la mucosa e l'accumulo di CUR al suo interno sono stati ripetuti gli esperimenti *ex vivo* nelle stesse condizioni ma terminandoli in differenti intervalli di tempo. Quindi, al termine di ciascun esperimento, si è proceduto alla valutazione della quantità di attivo all'interno della membrana ed i risultati sono stati riportati nel seguente grafico (**Figura 35**).

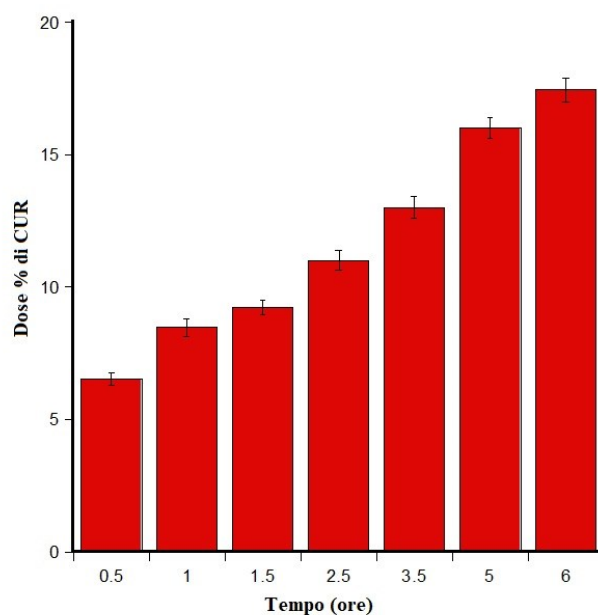


Figura 35: Dose percentuale di CUR accumulata nella mucosa buccale porcina a differenti intervalli di tempo. I risultati sono riportati come media $\pm$ SE (n = 6).

Da questi dati si deduce che fino a 6 ore non si verifica alcuna saturazione della mucosa e che la CUR veicolata attraverso le NLC si accumula in maniera tempo-dipendente. Si può concludere che il sistema di veicolazione formulato, una volta somministrato *in vivo* sarà verosimilmente in grado di promuovere la penetrazione della CUR nei domini lipofili delle mucose, dove si troverà accumulata e potrà svolgere le sue attività terapeutiche coadiuvanti la rigenerazione tissutale. Il nuovo nanocomposito è inoltre in grado di favorire la penetrazione ed accumulo del MTZ nel tessuto mucosale in modo tale da poter esplicare la sua attività antibatterica in sede loco-regionale.

4.1.5 Valutazione biologica del nanocomposito

Per escludere eventuali effetti citotossici della formulazione una volta somministrata, sono stati condotti studi di citotossicità su diverse linee cellulari. Una prima valutazione è stata effettuata su cellule stromali tipo HS5 trattate con il campione NC3-M ed NC-BL1, quest'ultimo usato come controllo negativo, in un intervallo di concentrazione compreso tra 0.025 e 0.15 mg/mL per 24 ore. Al termine degli esperimenti le cellule vitali sono state analizzate mediante il test MTT (**Figura 36**).

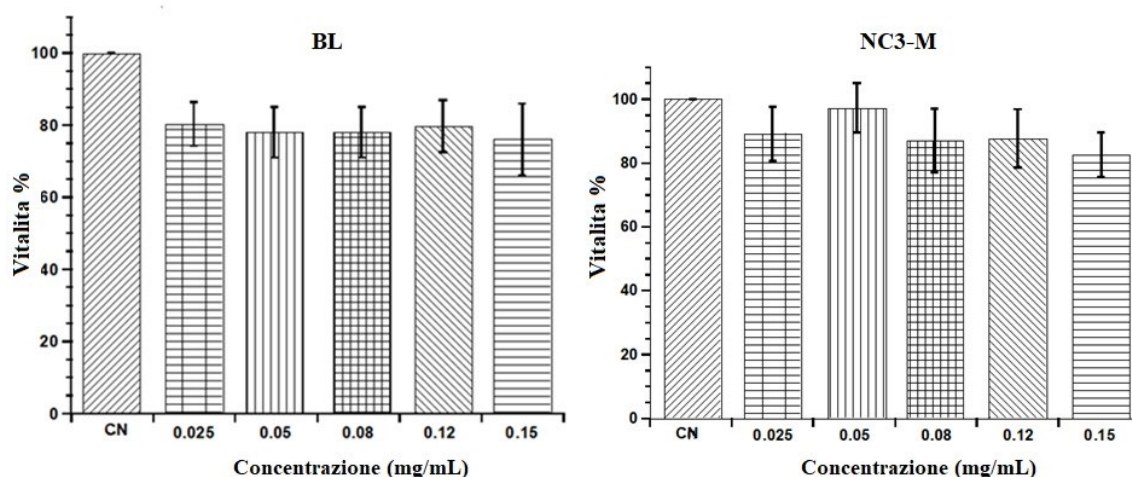


Figura 36: Vitalità percentuale delle cellule HS5 dopo 24 ore di trattamento con differenti concentrazioni del campione NC-BL1 e NC3-M comparate alle cellule non trattate (CN). I risultati sono riportati come media $\pm$ SE (n=3).

Dai risultati si evince che il campione NC3-M non influenzava significativamente la vitalità cellulare a nessuna delle concentrazioni valutate, rimanendo quest'ultima tra il 90 e l'80%, se paragonata alle cellule non trattate. Inoltre, la presenza della CUR e del MTZ sembra conferire una certa proprietà citoprotettiva alla formulazione se si considera che il campione NC-BL1 mostra una lieve citotossicità (vitalità cellulare tra 80 e 70%). Sebbene la CUR sia ben nota per l'attività antitumorale, questa sostanza è caratterizzata da un effetto bifasico sulla proliferazione delle cellule staminali, a seconda delle concentrazioni di trattamento e del tipo di cellule utilizzate. È stato riportato che le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo hanno mostrato un aumento della proliferazione quando trattate con concentrazioni di CUR fino a 10 μ M, mentre per valori più elevati cominciavano a manifestarsi gli effetti citotossici (Attari et al., 2015). Nel contesto degli esperimenti riportati, le concentrazioni di CUR testate erano comprese tra 0.61 e 3.66 μ M, quindi inferiori a quelle considerate citotossiche, suggerendo così un effetto protettivo sulle cellule e rendendo il nanocomposito NC3-M potenzialmente valido per la somministrazione *in vivo*. Ulteriori analisi biologiche sono state condotte sui campioni di nanocomposito NC3 ed NC3-M utilizzando cellule fibroblastiche di tipo NIH3T3, valutando sia la loro citocompatibilità che le proprietà rigenerative, quest'ultime mediante *scratch test*. I risultati ottenuti sono stati confrontati con un trattamento di controllo usando la sola CUR nelle stesse condizioni sperimentali, utilizzando concentrazioni di flavonoidi crescenti fino a 10 μ M. Nel primo caso la vitalità cellulare è stata determinata sia mediante analisi microscopica della morfologia delle cellule trattate che con un test colorimetrico FDA/PI dopo 48 ore di trattamento, ed i risultati sono riportati nelle seguenti immagini (**Figura 37**).

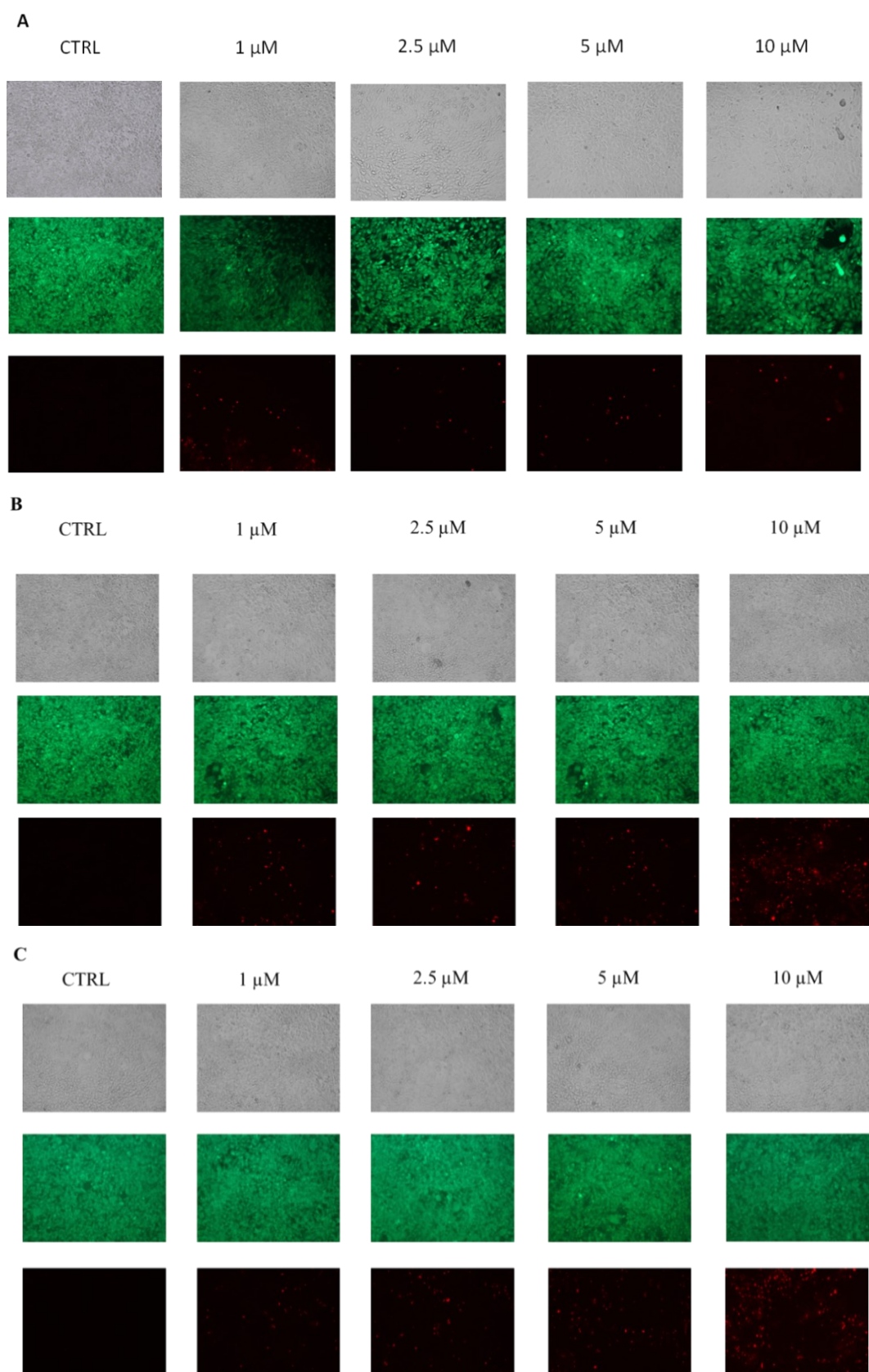


Figura 37. Valutazione morfologica (grigio), di vitalità cellulare (FDA in verde) e di mortalità cellulare (PI in rosso) su fibroblasti NIH3T3 di: CUR (**A**), NC3-M (**B**) e NC3 (**C**) a diverse concentrazioni molari di flavonoide dopo 48 ore di trattamento.

Dai risultati si può osservare che l'effetto citotossico della sola CUR dopo 48 ore di trattamento è dipendente dalla sua concentrazione, dove fino a 5 μM non si apprezza un'evidente variazione delle cellule vitali se confrontate con il controllo, ma a valori superiori (10 μM) aumenta leggermente l'intensità della fluorescenza rossa data dall'interazione dello ioduro di propidio con il DNA delle cellule lisate, indice di mortalità cellulare. Tuttavia, la quantità di cellule vive (visualizzabili dall'intensità della fluorescenza verde) rimane paragonabile a quella del controllo. Questi risultati confermano quello noto in letteratura riguardo gli effetti citotossici della CUR (Attari et al., 2015). Per quanto riguarda le cellule trattate con entrambi i nanocompositi si apprezza, se pur di poco, una maggiore citotossicità dose dipendente se paragonata con i risultati ottenuti sulla sola CUR, ma comunque accettabile se consideriamo il segnale derivante dalle cellule vitali, il quale risulta paragonabile a quello ottenuto dalle cellule non trattate. Inoltre, dall'investigazione microscopica non si evidenzia in nessun caso alcuna evidente modificazione conformazionale delle cellule alle concentrazioni di CUR testata. Una volta confermata la citocompatibilità di entrambi i campioni NC3 ed NC3-M, sono stati condotti degli studi preliminari sulla capacità di rigenerazione *in vitro* mediante *scratch test* conducendo gli esperimenti alle stesse condizioni considerate per quelli di citotossicità (**Figura 38**).

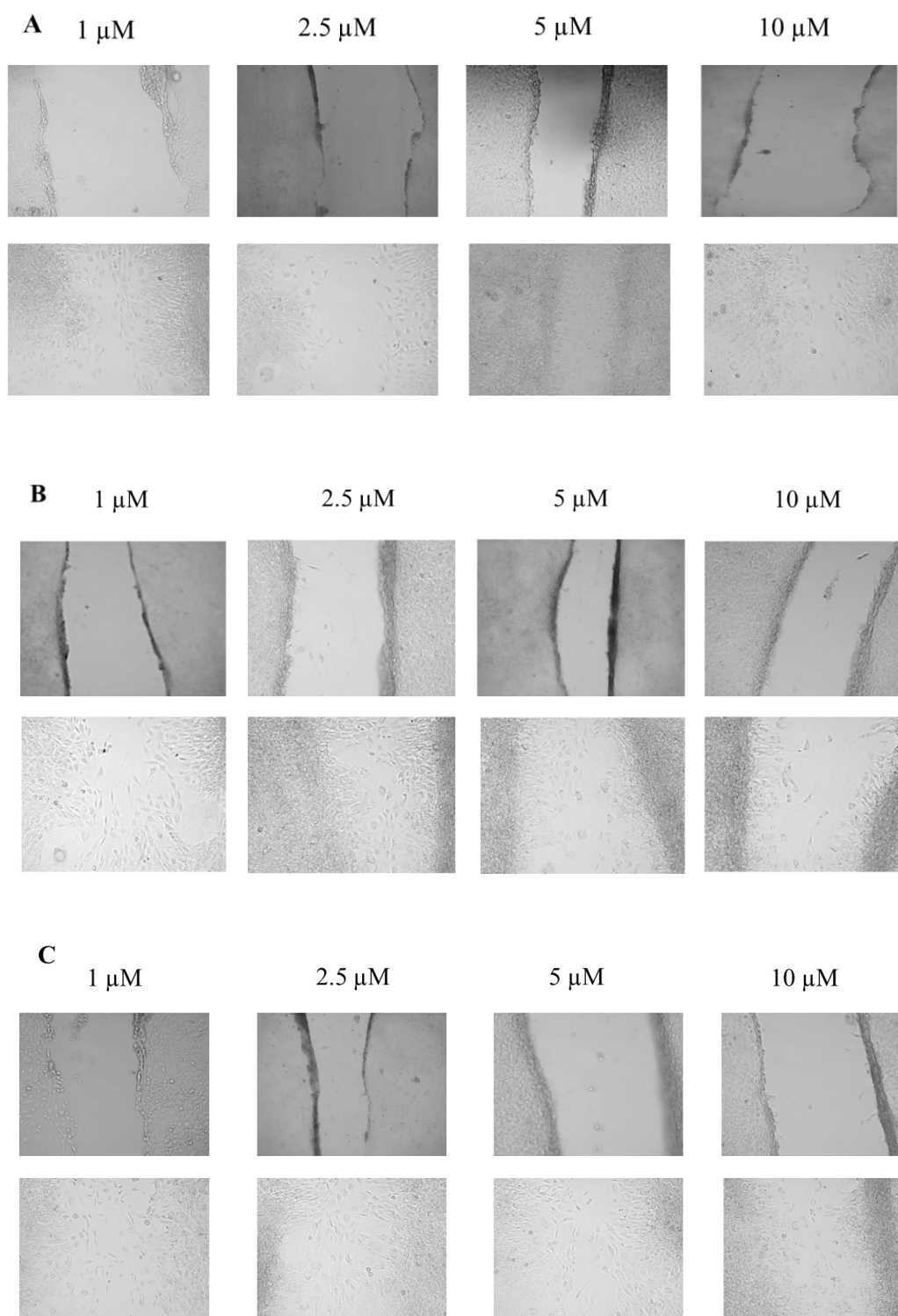


Figura 38. Valutazione delle proprietà di rigenerazione tissutale mediante *scratch test* su fibroblasti NIH3T3 di: CUR (**A**), NC3-M (**B**) e NC3 (**C**) a diverse concentrazioni molari di flavonoide dopo 24 ore di trattamento

Gli esperimenti di *scratch test* servono per simulare la capacità di rigenerazione tissutale effettuando un'incisione sulla superficie di un monostrato di cellule confluenti per creare uno stretto spazio senza cellule, simile a una ferita. Il test monitora quindi la migrazione

delle cellule rimaste sui bordi verso lo spazio vuoto, fino a quando esso non viene riempito. Dai risultati è emerso che la somministrazione della sola CUR è in grado di stimolare la migrazione cellulare in maniera dose dipendente con ottimi risultati già alle concentrazioni più basse considerate. Il trattamento con i nanocompositi dimostra che la veicolazione della CUR attraverso le NLC non influenza negativamente sulla sua capacità rigenerative. Tuttavia, a parità di dose somministrata l'effetto sulla migrazione cellulare sembra rallentato dalla presenza del MTZ nel nanocomposito. Tali test sono ancora in via di definizione e si aspetta una conferma dei dati dalla loro replicazione. Questi risultati sono molto promettenti circa la capacità dei nanocompositi di favorire la rigenerazione del tessuto dopo avulsione dentale.

4.2 Realizzazione di scaffold in Policaprolattone contenenti Curcumina e Betatricalciofosfato mediante stampa 3D per la rigenerazione del tessuto osseo del cavo orale (in collaborazione con la Warsaw University of Technology, Varsavia)

4.2.1 Preparazione degli scaffold

L'ingegneria tissutale è una branca della medicina rigenerativa che negli ultimi anni si è affermata prepotentemente in campo medico. Si fonda sull'applicazione di principi di bioingegneria e della scienza dei materiali per ottenere validi sostituti biologici per la promozione dei processi di rigenerazione di un tessuto lesa o per supportare le funzioni di organi e tessuti. Il suo crescente interesse è legato alla possibilità di creare materiali *ad hoc* per le necessità dei pazienti e modellati per adattarsi al tipo di tessuto bersaglio. A questo proposito l'ingegneria tissutale basata sull'utilizzo di scaffold è ampiamente studiata (C. Wang et al., 2020). Lo scaffold è un supporto, spesso di natura matriciale, preparato per facilitare la migrazione e l'adesione cellulare oltre che funzionare come piattaforma di veicolazione di agenti bioattivi. Tuttavia, in ambito rigenerativo uno scaffold ideale non solo deve essere conforme con le caratteristiche sopracitate, ma deve costituire un microambiente tridimensionale stabile con una porosità adeguata, tale da permettere la crescita cellulare all'interno della struttura (Law et al., 2016). La fase preliminare di progettazione di uno scaffold parte con la ricerca del biomateriale più opportuno e del metodo di preparazione. Il materiale scelto deve essere completamente biocompatibile, non rilasciare prodotti di degradazione tossici né indurre risposte infiammatorie o immunologiche. Inoltre, deve essere in grado, una volta trasformato in scaffold, di conferire a quest'ultimo proprietà meccaniche come resistenza alla torsione e alla trazione, ed elasticità, parametri che devono essere adeguati, ovviamente, in funzione del tipo di tessuto o di sito di applicazione. Un'altra importante caratteristica che bisogna tenere in considerazione è la biodegradabilità del materiale. Infatti, gli scaffold sono strumenti che una volta impiantati nella maggior parte dei casi non vengono più rimossi, quindi è cruciale che nel tempo vengano riassorbiti dall'organismo (Bitar & Zakhem, 2014).

Negli anni più recenti, si è consolidato l'utilizzo delle stampanti 3D, quale metodo di preparazione standard per la realizzazione di scaffold per l'ingegneria tissutale. Il maggiore vantaggio di questa tecnica è la possibilità di fabbricare scaffold paziente-specifici mediante un'accurata progettazione del prodotto finale, che viene effettuata a monte con programmi di *computer-aided-design* (CAD) per riprodurre la conformazione anatomica del tessuto da trattare (Salerno & Netti, 2021). Esistono diverse tipologie di stampante 3D. Tra queste, la *fused deposition modelling* (FDM) o modellazione a deposizione fusa, è quella maggiormente utilizzata e consiste nella deposizione *layer-by-layer* di un materiale termoplastico che permette di ottenere degli scaffold con un'elevata accuratezza nella riproduzione del modello CAD di partenza. Sulla base di quanto detto, in questo lavoro sperimentale sono stati realizzati presso i laboratori di Ingegneria chimica e di processo dell'Università delle Tecnologie di Varsavia (Polonia) degli scaffold per la rigenerazione del tessuto osseo del cavo orale carichi di Curcumina (CUR) utilizzando una stampante 3D operante con tecnica FDM. La CUR, infatti, ha un notevole potenziale circa la sua applicazione in campo rigenerativo, grazie alle sue capacità di indurre la differenziazione

cellulare specialmente delle cellule osteoblastiche (Son et al., 2018). Inoltre, è stato dimostrato che può essere inserita con successo all'interno di un materiale per la preparazione di scaffold destinati alla rigenerazione del tessuto osseo (Jain et al., 2016). Il materiale termoplastico scelto per questo lavoro sperimentale è l' ϵ -policaprolattone (PCL) (**Figura 39**) ovvero un poliestere semicristallino biodegradabile ottenuto per polimerizzazione ad anello a partire dall' ϵ -caprolattone, usando lo stagno (II) 2-etilesanoato come catalizzatore. Il PCL è stato approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) per il suo utilizzo nella preparazione di sistemi *carrier* per il rilascio controllato di farmaci e per la preparazione di scaffold per l'ingegneria tissutale (Yao et al., 2015).

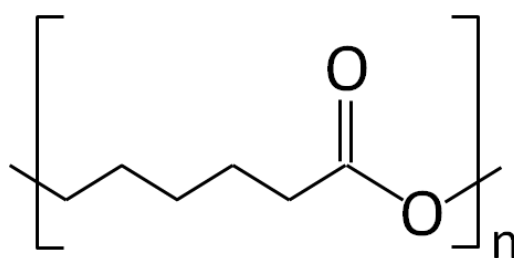


Figura 39. struttura chimica del l' ϵ -policaprolattone

Grazie alla sua bassa temperatura di fusione (60°C) ed elevata cristallinità il PCL è facilmente lavorabile a temperatura ambiente; tuttavia, il PCL è un materiale idrofobico che può influenzare negativamente l'adesione cellulare. A tal fine, si è deciso di aggiungere alla composizione dello scaffold anche una bioceramica quale il β -tricalciofosfato (β -TCP) una bioceramica policristallina, dotata di proprietà osteoconduttrici, che a contatto con acqua rilascia cristalli di idrossiapatite e che per questo possiede una forte similarità con le componenti minerali del tessuto osseo ed è oggetto di studio dal punto di vista clinico (Guarino et al., 2014). La presenza di una bioceramica all'interno dell'*entanglement* polimerico dovrebbe favorire l'interazione con i fluidi fisiologici grazie alla formazione di una struttura simile all'idrossiapatite endogena che si traduce in un forte legame con il tessuto osseo (Gerhardt & Boccaccini, 2010). Inoltre, l'aggiunta del β -TCP al PCL può aiutare a compensare l'elevata idrofobicità di quest'ultimo favorendo l'adesione e la proliferazione cellulare (Fazeli et al., 2021; Rezaei & Mohammadi, 2013). Pertanto, sono stati prodotti scaffold sia con che senza β -TCP. I campioni di materiale da inserire all'interno della stampante 3D sono stati ottenuti dissolvendo e disperdendo in un solvente organico volatile tutti i componenti che costituiranno lo scaffold finale (paragrafo 3.2.2.1, **Tabella 6**). Il solvente selezionato è stato il diclorometano poiché in grado di solubilizzare sia il polimero che la CUR nelle quantità prescelte. Nello specifico sono stati preparati foil contenenti CUR allo 0.5, 1.0 e 1.5 % per poi ottenere mediante stampa 3D gli scaffold con le corrispondenti percentuali, oggetto di questo studio.

In breve, opportune quantità di PCL sono state aggiunte al solvente posto all'interno di un contenitore di plastica e mantenuto sotto agitazione. Solo una volta che il polimero si è totalmente solubilizzato viene aggiunta la CUR, avendo cura che la risultante soluzione si mantenesse al riparo dalla luce e dalle fonti di calore per evitare fenomeni di degradazione dell'attivo (**Figura 40**).



Figura 40. aspetto della soluzione in diclorometano costituita da PCL e CUR

Tuttavia, il β -TCP è insolubile in questo solvente ed è stato aggiunto alla soluzione sotto forma di polvere in sospensione. Ciascuna miscela è stata posta su un piano in vetro e spalmata con l'ausilio di un applicatore per formare un film ed aumentare la superficie a contatto con l'aria, al fine di velocizzare il processo di evaporazione del solvente. I campioni sono stati valutati visivamente per individuare la presenza di particelle di CUR non solubilizzate e successivamente conservati al buio ed a temperatura ambiente fino a completa evaporazione del diclorometano. Si ottengono così dei fogli di materiale solido (**Figura 41**) il cui componente principale è il PCL. Essi risultano molto flessibili, e praticamente indistruttibili alla torsione e trazione. Questi sono stati ritagliati in dischi da 12 mm di diametro e conservati in contenitori di plastica contenenti sacchettiini di silice per preservarli dall'umidità ambientale.

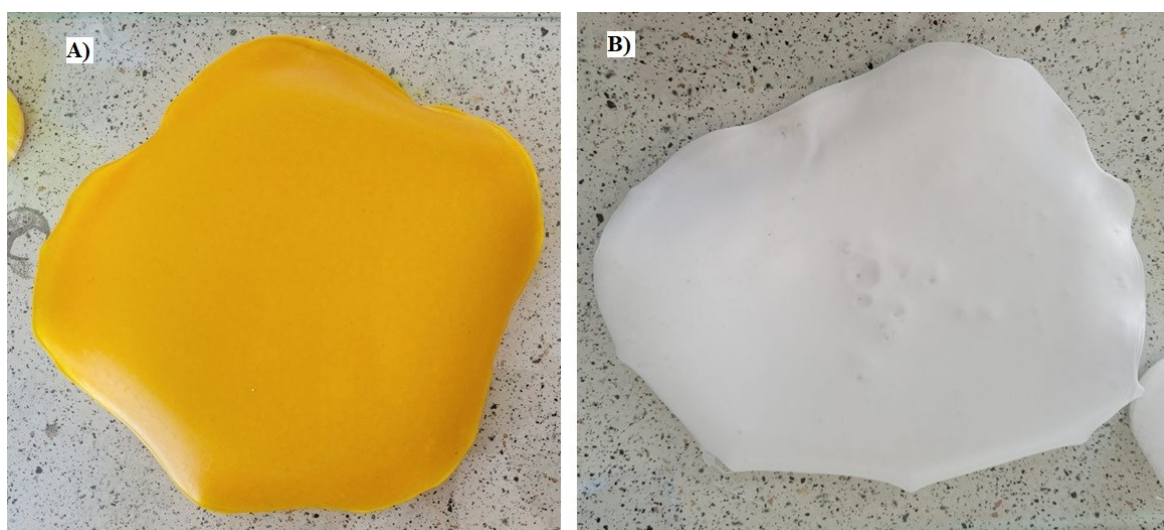


Figura 41. aspetto rappresentativo di due fogli (*foil*) di materiale dopo completa evaporazione del solvente:
A) campione PC-1.5- β ; **B)** campione Blank

A questo punto, per poterli inserire nella stampante 3D, i campioni devono essere modellati sottoforma di filamenti di forma cilindrica aventi un diametro medio di 3 mm. A tal fine i campioni di materiale ritagliato sono stati inseriti in un estrusore per filamenti (filastruder), preparato artigianalmente dall'officina del dipartimento di Ingegneria Chimica e di processo dell'Università delle Tecnologie di Varsavia, riscaldati a $140 \pm 1^\circ\text{C}$ fino a completa fusione ed estrusi attraverso un ugello metallico del diametro desiderato. Grazie alle caratteristiche termoplastiche del PCL, l'estruso fuso solidifica rapidamente ed i filamenti ottenuti sono stati conservati in sacchetti di plastica prima dell'uso. Per la preparazione degli scaffold è stata utilizzata una stampante 3D modello ZMorph SX FDM (**Figura 42**), questa tipologia di strumento lavora fondendo il polimero termoplastico e deponendo il materiale fuso su un supporto riscaldato, strato per strato, seguendo le istruzioni progettate dall'Ing. PhD Rafal Pogdorski tramite il software CAD Blender 2.78. Al fine di ottenere degli scaffold con caratteristiche il più possibile vicine a quelle progettate è necessario tenere in considerazione diversi parametri operativi quali temperatura dell'ugello, velocità di stampa e temperatura del supporto.

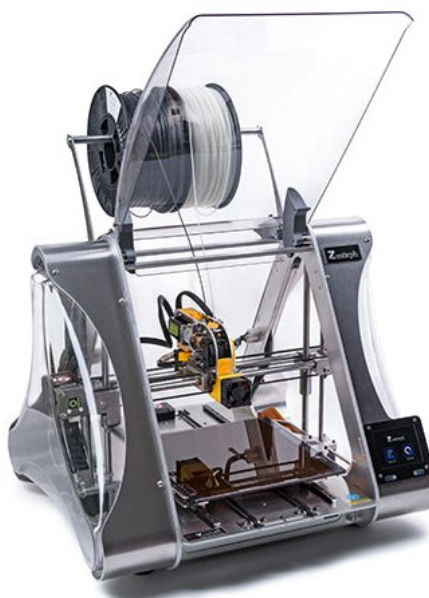


Figura 42. rappresentazione della stampante 3D modello Zmorph SX FDM

La temperatura dell'ugello è chiaramente il parametro più importante poiché determina la fusione del materiale da stampare e deve essere settata ad un valore superiore rispetto al punto di fusione del polimero scelto. In questo caso, trattandosi di PCL, sono state provate temperature comprese tra 140 e 160°C , ma inferiori a 170°C , corrispondente alla temperatura di degradazione del polimero. La scelta di temperature decisamente superiori alla temperatura di fusione del polimero (60°C) è dettata dall'evidenza già nota in letteratura che, stampando ad elevate temperature si ottiene generalmente un prodotto più uniforme. Infatti, mantenendo il supporto di deposizione a 60°C , si osservava che, settando la temperatura dell'ugello a 140°C , le stampe risultavano grossolane e con numerose imperfezioni; di contro, aumentando la temperatura fino a 160°C , la situazione migliorava, e gli scaffold apparivano meglio definiti. Tuttavia, poiché il PCL fonde a 60°C , la temperatura del supporto di deposizione è stata successivamente abbassata a 40°C ed in

questo modo si sono ottenuti scaffold molto più uniformi, facilmente rimovibili e lavorabili, una volta terminato il processo di stampa. Anche la velocità di movimento dell'ugello è un parametro chiave per la buona riuscita del processo. Infatti, a basse velocità si ottengono prodotti molto più accurati, ma si rischia di avere strati che solidificano troppo presto e sui quali l'ulteriore strato di polimero fuso non riesce ad aderire, mentre ad elevate velocità si ottengono scaffold molto meno accurati nella forma. Risulta quindi necessario trovare la velocità ottimale che, sulla base delle numerose prove effettuate, è risultata pari a 30 mm/s. Una volta ottenuti (**Figura 43**), gli scaffold sono stati lavorati manualmente per rimuovere i filamenti di supporto (utilizzati come guida per lo strumento durante la stampa in eccesso) e conservati al buio e lontano da fonti di calore fino alle successive caratterizzazioni.

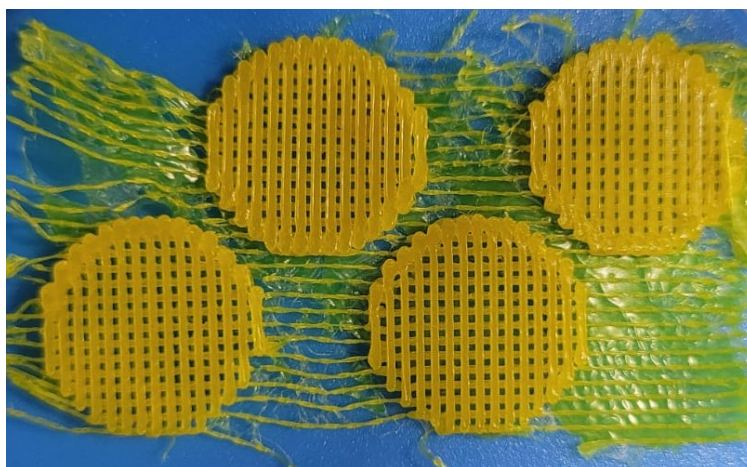


Figura 43. aspetto degli scaffold PC-1 una volta rimossi dalla stampante 3D.

4.2.2 caratterizzazione degli scaffold

Preliminarmente, la bontà e la riproducibilità del metodo di preparazione degli scaffold è stata valutata in termini di uniformità in peso, spessore, diametro, contenuto medio di CUR e porosità degli stessi. Il diametro medio misurato risulta coerente tra tutti gli scaffold e ha un valore di 13.85 ± 0.12 mm, che è rappresentativo della precisione dello strumento durante le fasi di stampa. I risultati delle analisi di peso, spessore medio e porosità degli scaffold sono riportati nella seguente **Tabella 20**:

Tabella 20. peso, spessore e porosità $\pm$ SE (n=6) degli scaffold ottenuti mediante stampa 3D

Scaffold	Peso (mg $\pm$ SE)	Spessore (mm $\pm$ SE)	Porosità
PC-0.5	99.2 ± 4.7	0.756 ± 0.005	0.228 ± 0.039
PC-0.5-TC	107.3 ± 1.9	0.815 ± 0.003	0.463 ± 0.009
PC-1	103.3 ± 1.6	0.832 ± 0.023	0.277 ± 0.030
PC-1-TC	101.4 ± 1.7	0.829 ± 0.005	0.498 ± 0.008
PC-1.5	101.3 ± 4.6	0.825 ± 0.021	0.283 ± 0.046
PC-1.5-TC	106.6 ± 3.6	0.848 ± 0.013	0.485 ± 0.022
Blank	100.7 ± 2.9	0.786 ± 0.013	0.477 ± 0.011

Dai valori di peso e spessore si denota l'omogeneità sia intra che inter-batch per tutti gli scaffold preparati, evidenziata dal basso valore di errore standard. Inoltre, l'aggiunta del β -TCP alla composizione crea verosimilmente un sistema composito insieme al polimero che porta ad un aumento nella porosità degli scaffold, come è possibile notare dai valori riportati. Bisogna sottolineare che la porosità è una caratteristica fondamentale in medicina rigenerativa poiché favorisce l'adesione e la proliferazione cellulare. Il progetto CAD utilizzato per la preparazione degli scaffold prevede pochi strati di deposizione del materiale, verificabile dai bassi valori di spessore osservati in ciascun campione (<1 mm), che non favoriscono la formazione di una struttura tridimensionale complessa. Tuttavia, i risultati ottenuti dal calcolo della porosità sono promettenti. Verosimilmente, infatti, aumentando la stratificazione del materiale ne aumenterà proporzionalmente la porosità (Kowalczyk et al., 2019). Inoltre, poiché la CUR è una sostanza polifenolica suscettibile ai fenomeni di degradazione, è stato necessario verificare se al termine del processo di preparazione essa si sia mantenuta stabile od abbia subito fenomeni di degradazione, soprattutto considerando le elevate temperature operative, sia durante la preparazione dei filamenti da stampare che durante la stampa stessa. Su alcune porzioni di scaffold scelti casualmente da ciascun batch è stata quindi condotta l'analisi quantitativa dell'attivo, mediante spettrofotometria UV-Vis, rapportandola alla quantità di CUR inizialmente inserita nella formulazione. (**Tabella 21**).

Tabella 21. analisi quantitativa della CUR nei rispettivi scaffold. Riportato come contenuto percentuale medio e variazione percentuale rispetto al valore teorico $\pm$ SE (n=9)

Scaffold	Contenuto medio CUR (%p/p)	Δ CUR% (%p/p)
PC-0.5	0.440 ± 0.002	$-11.94 \pm 0.52\%$
PC-0.5-TC	0.482 ± 0.003	$-3.52 \pm 0.58\%$
PC-1	0.876 ± 0.010	$-12.40 \pm 1.03\%$
PC-1-TC	0.995 ± 0.024	$-0.48 \pm 0.24\%$
PC-1.5	1.334 ± 0.012	$-11.07 \pm 0.82\%$
PC-1.5-TC	1.498 ± 0.016	$-0.13 \pm 0.04\%$

I risultati confermano l'omogeneità di ciascun lotto di preparazione anche dal punto di vista quantitativo. In questo caso, infatti, i bassi valori di errore standard suggeriscono una uniforme distribuzione dell'attivo in ciascuno scaffold, confermando che durante la preparazione del materiale la CUR è effettivamente in forma molecolare. Tuttavia, dalle analisi quantitative emerge un dato importante, tutti i campioni privi di β -TCP hanno subito una evidente riduzione, superiore al 10%, della quantità di CUR rispetto al valore teorico, di contro la presenza della bioceramica nella composizione degli scaffold sembra proteggere la sostanza polifenolica dai fenomeni di degradazione. Questa evidenza è difficile da giustificare visto che il β -TCP è un materiale inorganico con nessuna proprietà antiossidante o conservante, si potrebbe tuttavia ipotizzare che la CUR trovandosi in forma molecolare durante la preparazione del materiale sia in grado di adsorbirsi o penetrare all'interno della struttura tridimensionale della bioceramica venendo in questo modo protetta dai fenomeni

di degradazione (Sareethammanuwat et al., 2021; Yashima et al., 2003). Inoltre, la miscelazione del β -TCP con il PCL potrebbe produrre un materiale composito capace di dissipare meglio il calore proteggendo in maniera indiretta la CUR dalla degradazione termica (Siqueira et al., 2015).

Gli scaffold sono stati, in seguito, caratterizzati dal punto di vista tecnologico per valutarne l'abilità di rilasciare l'attivo quando messi a contatto con i fluidi ed i tessuti biologici. A tal fine sono stati condotti due serie di test di rilascio, usando lo stesso setting sperimentale ma impiegando liquidi accettori di natura completamente diversa: uno idrofilo e l'altro lipofilo, al fine di studiare il meccanismo di rilascio della CUR dallo scaffold nei due differenti ambienti fisiologici. Come è stato già spiegato precedentemente, in un test di rilascio *in vitro* è imperativo mantenere le condizioni *sink* del sistema al fine di massimizzare il gradiente di concentrazione, vero motore del processo di fuoriuscita del farmaco. È stato pertanto necessario individuare il solvente più opportuno in grado di stabilizzare la CUR e massimizzarne la solubilità. Per gli esperimenti condotti in ambiente idrofilo la scelta è ricaduta sul tampone fosfato pH 5.8 al quale viene aggiunta l'N-acetilcisteina (NAC) allo 0.1% p/v in quanto sostanza antiossidante che agisce in sinergia con l'ambiente debolmente acido per stabilizzare la CUR. Tuttavia, alla luce della ben nota scarsa solubilità in acqua della CUR si sono resi necessari degli studi preliminari di solubilità della CUR in presenza di albumina sierica bovina (BSA) al 2, 3 e 5%. La BSA è stata scelta in quanto modello di proteina plasmatica capace di legare molecole lipofile agendo da promotore della solubilità mimando ragionevolmente anche le condizioni fisiologiche. Gli esperimenti sono stati condotti per 24 e 48 ore ed i risultati sono riportati nella seguente **Tabella 22**:

Tabella 22. solubilità della CUR in diversi solventi acquosi dopo 24 e 48 ore. Media $\pm$ SE (n=3)

Medium acquoso (Tampone fosfato pH 5.8 + 0.1% p/v NAC)	Solubilità CUR (mg/mL)	
	24 ore	48 ore
BSA 2% p/v	0.022 $\pm$ 0.007	0.036 $\pm$ 0.004
BSA 3% p/v	0.036 $\pm$ 0.001	0.055 $\pm$ 0.008
BSA 5% p/v	0.064 $\pm$ 0.012	0.124 $\pm$ 0.004

Come è possibile osservare, la solubilità della CUR aumenta proporzionalmente sia con la concentrazione di BSA che nel tempo, quest'ultimo dato dovuto verosimilmente alla lenta velocità di dissoluzione dell'attivo in ambiente acquoso. Dettagliatamente, già utilizzando la più bassa concentrazione di proteine (2% p/v) il valore di solubilità in acqua aumenta di circa sette volte (solubilità CUR in acqua 0.003 mg/mL; fonte: PubChem), inoltre dopo 48 ore tutti i valori risultano aumentati con il massimo ottenuto utilizzando il 5% p/v di BSA. Infine, nelle analisi non sono state rilevate né variazioni nella forma dello spettro UV né la comparsa di nuovi picchi suggerendo che la CUR si mantenga stabile per almeno 48 ore. Alla luce di quanto detto, si è scelto di condurre i test di rilascio in ambiente idrofilo utilizzando il medium alla più alta concentrazione di BSA. Gli esperimenti sono stati

condotti per 21 giorni. In **Figura 44** sono riportati i risultati espressi come quantità cumulativa di CUR rilasciata in funzione del tempo.

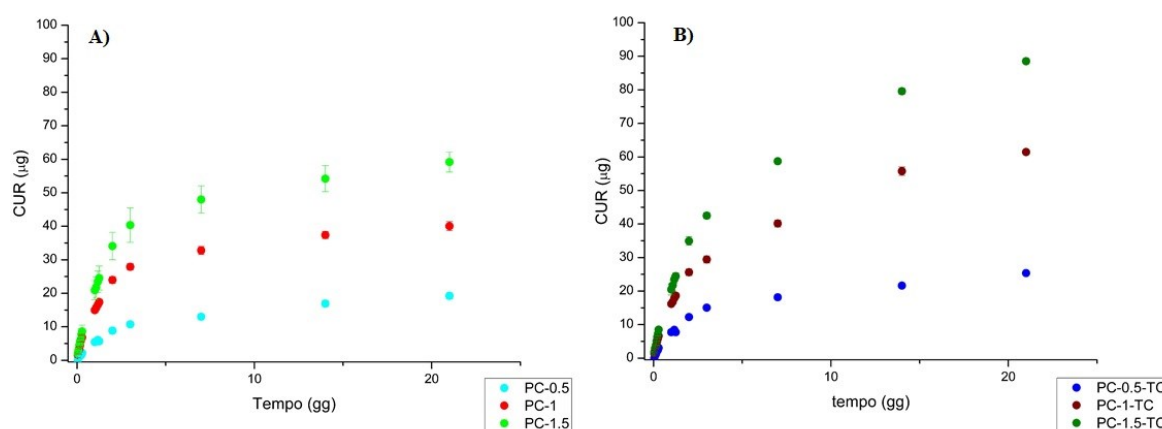


Figura 44. profilo di rilascio della CUR in tampone fosfato pH 5.8 con il 5% p/v di BSA espressa come quantità (µg) rilasciata da ciascuno scaffold in funzione del tempo (giorni). **A)** PC-0.5 (ciano), PC-1 (rosso), PC-1.5 (verde); **B)** PC-0.5-TC (blu), PC-1-TC (rosso scuro), PC-1.5-TC (verde scuro). Media $\pm$ SE (n=3).

Gli esperimenti di rilascio in ambiente lipofilo sono stati condotti utilizzando come liquido accettore l'isopropil miristato, poiché questo è altamente affine alla CUR, ed è considerato il solvente di elezione per mimare *in vitro* le strutture lipidiche delle membrane biologiche. Gli esperimenti sono stati condotti per 14 giorni. I risultati sono stati riportati in **Figura 45**, espressi come quantità cumulativa di CUR rilasciata in funzione del tempo.

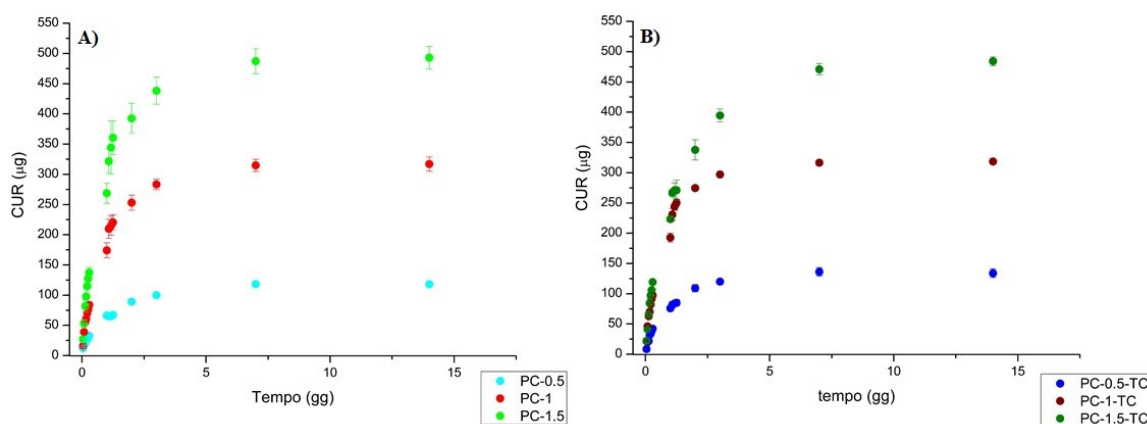


Figura 45. profilo di rilascio della CUR in miristato di isopropile espressa come quantità (µg) rilasciata da ciascuno scaffold in funzione del tempo (giorni). **A)** PC-0.5 (ciano), PC-1 (rosso), PC-1.5 (verde); **B)** PC-0.5-TC (blu), PC-1-TC (rosso scuro), PC-1.5-TC (verde scuro). Media $\pm$ SE (n=3).

Come si può osservare, la quantità di CUR rilasciata è proporzionale alla quantità di CUR presente all'interno di ciascuno scaffold all'inizio di ogni esperimento.

In ambiente acquoso, confrontando il comportamento degli scaffold aventi la stessa dose di CUR, si evince che la presenza del β -TCP aumenta la velocità e la quantità di attivo rilasciata.

Questo fenomeno è attribuibile alla maggiore porosità che la bioceramica conferisce agli scaffold traducendosi in una maggiore superficie specifica a contatto con il medium acquoso. In particolare, considerando i punti sperimentali al termine di ciascun esperimento (dopo 21 giorni) si assiste ad un incremento della CUR rilasciata del 24.2 %, 34.9 % e 33.2 % rispettivamente per i campioni PC-0.5-TC, PC-1-TC e PC-1.5-TC quando confrontati con i corrispettivi senza β -TCP. Tuttavia, confrontando questi risultati con quelli ottenuti dagli esperimenti condotti in miristato di isopropile è possibile osservare che in quest'ultimi la quantità totale di CUR rilasciata è decisamente superiore per qualsiasi intervallo di tempo considerato.

Ciò è attribuibile alla natura lipofila della CUR che risulta molto affine all'ambiente lipofilo considerato, facendo pertanto ipotizzare una massiva ripartizione della CUR nei tessuti una volta che gli scaffold saranno impiantati *in vivo*. Inoltre, è interessante sottolineare che, in ambiente lipofilo, la presenza della bioceramica nella composizione non influenza in alcun modo la velocità con cui la CUR esce dallo scaffold. Elaborando i dati sperimentali in funzione della dose di CUR applicata, si evince che, in entrambi i liquidi accettori il rilascio non è influenzato dalla quantità iniziale di CUR ma è dipendente dalla tipologia del sistema di veicolazione. Tuttavia, solo in ambiente lipofilo si assiste alla fuoriuscita del 100% di CUR dallo scaffold nell'arco di 14 giorni. Questo fenomeno potrebbe essere dovuto all'ambiente acquoso dove la velocità di dissoluzione della CUR è molto lenta.

Al fine di condurre studi cinetici atti ad investigare il meccanismo con cui gli scaffold rilasciano la CUR, sono stati eseguiti dei fitting dei dati sperimentali con alcuni modelli matematici comunemente utilizzati per descrivere i fenomeni di rilascio da piattaforme di veicolazione. Il coefficiente di correlazione (R^2) e l'aderenza delle curve ottenute dalle funzioni matematiche con i punti sperimentali sono stati considerati i parametri identificativi la bontà del fitting. In questo caso, per entrambi i set di esperimenti, sono state considerate le seguenti equazioni cinetiche: Ordine zero (1), Primo Ordine (2), Primo Ordine considerando t_{lag} ed F_{max} (3), Higuchi (4), Higuchi considerando il t_{lag} (5), Korsmeyer-Peppas (6), Korsmeyer-Peppas considerando il t_{lag} (7), Peppas-Salhin (8) e Peppas-Salhin considerando il t_{lag} (9) ed i risultati sono stati riportati nelle **Tabelle 23 e 24**.

Bisogna puntualizzare che lo studio di una cinetica di rilascio da un sistema *carrier* è rappresentativo nel caso in cui è stato rilasciato almeno il 60% della dose di attivo applicata. Tuttavia, anche se in ambiente acquoso queste condizioni non vengono raggiunte, il numero e l'andamento dei punti sperimentali sono sufficienti per ipotizzare un meccanismo di rilascio.

Tabella 23. Parametri farmacocinetici determinati per ogni modello matematico applicato alle curve sperimentali di rilascio della CUR dagli scaffold in ambiente idrofilo.

	PC-0.5	PC-1	PC-1.5	PC-0.5-TC	PC-1-TC	PC-1.5-TC
(1)	null	null	null	null	null	null
(2)	k=0.009±0.001 R²=0.5869	k=0.009±0.001 R²=0.2327	k=0.009±0.001 R²=0.3259	k=0.014±0.002 R²=0.5732	k=0.014±0.002 R²=0.6758	k=0.013±0.001 R²=0.7212
(4)	k=3.612±0.312 R²=0.9539	k=3.588±0.123 R²=0.8514	k=3.500 ±0.208 R²=0.8749	k=4.934±0.200 R²=0.9467	k=4.923±0.129 R²=0.9782	k=4.563±0.117 R²=0.9803
(5)	k=3.637±0.314 T _{lag} =-0.042±0.002 R²=0.9561	k=3.496±0.067 T _{lag} =-0.188±0.116 R²=0.8598	k=3.484±0.227 T _{lag} =-0.069±0.154 R²=0.8675	k=4.954±0.209 T _{lag} =-0.042±0.059 R²=0.9452	k=4.960±0.138 T _{lag} =-0.040±0.047 R²=0.9778	k=4.617±0.112 T _{lag} =-0.073±0.027 R²=0.9828
(6)	k=4.115±0.413 n=0.441±0.007 R²=0.9629	k=4.817±0.281 n=0.364±0.012 R²=0.9370	k=4.555±0.344 n=0.381±0.032 R²=0.9295	k=5.719±0.393 n=0.432±0.028 R²=0.9592	k=5.338±0.273 n=0.463±0.021 R²=0.9809	k=4.713±0.270 n=0.485±0.023 R²=0.9795
(7)	k=6.376±0.709 n=0.278±0.043 T _{lag} =0.805±0.198 R²=0.9698	k=7.566±0.776 n=0.189±0.044 T _{lag} =0.924±0.145 R²=0.9212	k=7.334±0.640 n=0.199±0.037 T _{lag} =0.925±0.117 R²=0.9474	k=8.816±0.990 n=0.271±0.044 T _{lag} =0.789±0.212 R²=0.9698	k=7.602±1.125 n=0.335±0.055 T _{lag} =0.665±0.301 R²=0.9692	k=7.155±0.799 n=0.336±0.004 T _{lag} =0.780±0.182 R²=0.9775
(8)	k1=4.606±0.313 k2=-0.256±0.091 m=0.480 R²=0.9725	k1=5.756±0.290 k2=-0.622±0.085 m=0.480 R²=0.9717	k1=5.419±0.334 k2=-0.539±0.098 m=0.480 R²=0.9638	k1=6.437±0.441 k2=-0.397±0.129 m=0.480 R²=0.9707	k1=5.743±0.326 k2=-0.185±0.095 m=0.480 R²=0.9642	k1=4.999±0.349 k2=-0.072±0.102 m=0.480 R²=0.9801
(9)	k1=5.561±0.763 k2=-0.502±0.200 m=0.480 T _{lag} =0.298±0.31 R²=0.9635	k1=6.374±0.271 k2=-0.785±0.077 m=0.480 T _{lag} =0.131±0.027 R²=0.9820	k1=6.541±0.840 k2=-0.832±0.224 m=0.480 T _{lag} =0.331±0.305 R²=0.9438	k1=7.494±0.279 k2=-0.672±0.080 m=0.480 T _{lag} =0.174±0.023 R²=0.9916	k1=7.107±0.958 k2=-0.532±0.251 m=0.480 T _{lag} =0.354±0.278 R²=0.9895	k1=5.859±0.282 k2=-0.292±0.080 m=0.480 T _{lag} =0.179±0.027 R²=0.9907

In tutti i modelli F è la frazione della dose (Mt/M_∞) rilasciata nel tempo; ^a Fmax = Dose massima rilasciata al tempo t; k = Costante di Higuchi, costante del modello di Korsmeyer-Peppas; n è il coefficiente che descrive il meccanismo di rilascio; per la cinetica di Peppas-Salhin k1 è la costante che esprime il coefficiente di rilascio fickiano; k2 è la costante riferita al meccanismo di rilascio anomalo di tipo II (rilassamento/erosione); m è il coefficiente di diffusione ottenuto matematicamente che descrive il rilascio di tipo diffusivo tenendo conto della geometria del sistema.

Tabella 24. modelli matematici e i corrispondenti parametri cinetici applicati per studiare il meccanismo di rilascio della CUR dagli scaffold in miristato di isopropile.

	PC-0.5	PC-1	PC-1.5	PC-0.5-TC	PC-1-TC	PC-1.5-TC
(1)	null	null	null	null	null	null
(2)	k=0.723±0.019 R²=0.9543	k=0.851±0.057 R²=0.9806	k=0.861±0.046 R²=0.9778	k=0.837±0.033 R²=0.9594	k=1.099±0.041 R²=0.9831	k=0.660±0.022 R²=0.9735
(3)	k=0.681±0.002 T _{lag} =-0.160±0.011 F _{max} =93.358±0.463 R²=0.9985	k=0.858±0.0609 T _{lag} =-0.070±0.006 F _{max} =94.634±0.153 R²=0.9957	k=0.874±0.043 T _{lag} =-0.071±0.003 F _{max} =94.217±0.218 R²=0.9944	k=0.758±0.019 T _{lag} =-0.141±0.003 F _{max} =95.609±0.292 R²=0.9936	k=1.070±0.039 T _{lag} =-0.059±0.005 F _{max} =96.329±0.234 R²=0.9948	k=0.653±0.018 T _{lag} =-0.102±0.002 F _{max} =94.283±0.329 R²=0.9926
(4)	k=35.249±0.300 R²=0.6997	k=37.224±0.598 R²=0.6583	k=37.266 ±0.480 R²=0.6507	k=37.181±0.401 R²=0.6396	k=36.608±0.334 R²=0.5273	k=35.070±0.343 R²=0.7811
(5)	k=32.738±0.047 T _{lag} =-0.424±0.042 R²=0.7596	k=34.568±0.213 T _{lag} =-0.370±0.055 R²=0.6992	k=34.487±0.148 T _{lag} =-0.390±0.049 R²=0.6951	k=33.777±0.105 T _{lag} =-0.504±0.047 R²=0.7126	k=35.260±0.106 T _{lag} =-0.624±0.034 R²=0.6147	k=33.640±0.198 T _{lag} =-0.196±0.020 R²=0.7969
(6)	k=47.345±0.692 n=0.321±0.004 R²=0.9086	k=49.807±1.336 m=0.319±0.007 R²=0.8659	k=50.039±1.107 n=0.317±0.006 R²=0.8664	k=50.424±0.882 n=0.310±0.005 R²=0.8884	k=55.134±0.719 n=0.293±0.003 R²=0.8332	k=44.774±0.709 n=0.349±0.004 R²=0.9080
(7)	k=49.328±0.689 n=0.301±0.004 T _{lag} =0.040±0.004 R²=0.9274	k=55.932±2.074 n=0.261±0.015 T _{lag} =0.111±0.026 R²=0.9144	k=57.173±1.212 n=0.149±0.006 T _{lag} =0.127±0.006 R²=0.9303	k=54.735±0.939 n=0.268±0.005 T _{lag} =0.079±0.001 R²=0.9284	k=62.709±0.830 n=0.227±0.003 T _{lag} =0.127±0.001 R²=0.9015	k=51.146±0.785 n=0.283±0.004 T _{lag} =0.126±0.001 R²=0.9550
(8)	k1=58.632±4.275 k2=-8.026±1.317 m=0.480 R²=0.9800	k1=63.963±4.335 k2=-9.587±2.323 m=0.480 R²=0.9496	k1=52.160±5.347 k2=1.303±4.169 m=0.480 R²=0.9716	k1=54.206±3.057 k2=-0.710±2.384 m=0.480 R²=0.9826	k1=62.490±6.315 k2=-2.290±4.924 m=0.480 R²=0.9575	k1=42.470±4.216 k2=3.971±3.287 m=0.480 R²=0.9723
(9)	k1=65.446±4.275 k2=-11.078±2.169 m=0.480 T _{lag} =0.083±0.029 R²=0.9628	k1=74.349±3.921 k2=-14.303±2.016 m=0.480 T _{lag} =0.104±0.018 R²=0.9723	k1=70.759±7.103 k2=-11.114±5.244 m=0.480 T _{lag} =0.097±0.023 R²=0.9643	k1=60.603±2.415 k2=-4.961±1.830 m=0.480 T _{lag} =0.034±0.005 R²=0.9839	k1=83.394±9.288 k2=-16.340±6.894 m=0.480 T _{lag} =0.098±0.023 R²=0.9575	k1=57.310±5.929 k2=-5.832±4.325 m=0.480 T _{lag} =0.090±0.024 R²=0.9770
In tutti i modelli F è la frazione della dose (Mt/M _∞) rilasciata nel tempo; ^a F _{max} = Dose massima rilasciata al tempo t; k = Costante di Higuchi, costante del modello di Korsmeyer-Peppas; n è il coefficiente che descrive il meccanismo di rilascio; per la cinetica di Peppas-Salhin k1 è la costante che esprime il coefficiente di rilascio fickiano; k2 è la costante riferita al meccanismo di rilascio anomalo di tipo II (rilassamento/erosione); m è il coefficiente di diffusione ottenuto matematicamente che descrive il rilascio di tipo diffusivo tenendo conto della geometria del sistema.						

I dati riportati suggeriscono che, quando immersi in un fluido acquoso, gli scaffold rilasciano la CUR con un meccanismo ben descritto dalla cinetica di Peppas-Salhin come dimostrato dagli alti valori di coefficiente di correlazione (R^2). Tuttavia, la presenza del β -TCP nella composizione degli scaffold non influenza la cinetica di rilascio dell'attivo, la quale sembra dipendere principalmente dal polimero utilizzato. Questi risultati vengono confermati dall'andamento grafico delle curve teoriche che mostrano una rilevante coincidenza con i punti sperimentali (**Figura 46**).

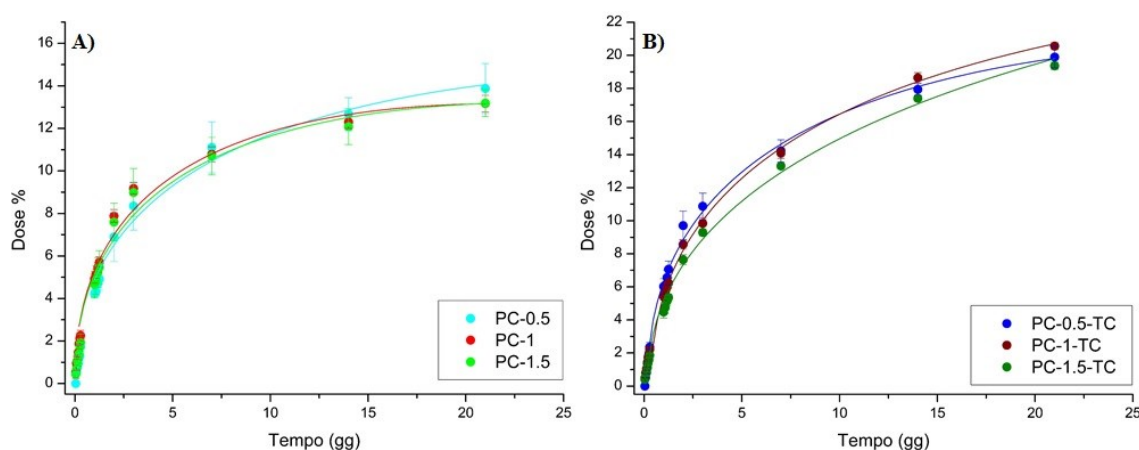


Figura 46. Percentuale della dose di CUR rilasciata in funzione del tempo dagli scaffold privi di β -TCP (**A**) e contenenti β -TCP (**B**) in ambiente idrofilo. Le curve sono il risultato del *fitting* applicando l'equazione matematica del modello Peppas-Sahlin. Media $\pm$ SE (n = 3).

La cinetica di Peppas-Salhin deriva da quella di Korsmeyer-Peppas come si può notare dal primo termine dall'equazione stessa che, se preso da solo, descrive meccanismi di rilascio governati prettamente dalla diffusione. Diventa intuitivo quindi che se gli esponenti m ed n , rispettivamente della cinetica di Peppas-Salhin e della Korsmeyer-Peppas, sono uguali allora si è davanti ad un meccanismo di rilascio dove il contributo fickiano rende trascurabile quello legato al rilassamento/erosione della matrice (Unagolla & Jayasuriya, 2018). È necessario sottolineare, però, che la cinetica di Peppas-Salhin prevede che il coefficiente di diffusione m di un sistema matriciale cilindrico sia imposto come costante e calcolato in funzione del rapporto tra il diametro e lo spessore del sistema stesso (Peppas & Sahlin, 1989). In questo caso, considerando le dimensioni di ciascuno scaffold è stato possibile ricavare il parametro m risultando pari a 0.480. Come possibile notare dalla **Tabella 23** il valore dei coefficienti m ed n differisce, pertanto ne consegue che il contributo di rilassamento/erosione del materiale non può essere considerato trascurabile nel determinare il rilascio della CUR dagli scaffold. A tal fine, per comprendere meglio quale dei due fenomeni (diffusivo o di rilassamento) è preponderante bisogna applicare l'equazione riportata nel capitolo precedente dove viene calcolato il rapporto tra il contributo di rilassamento (R) e quello fickiano (F). I risultati di tale elaborazione sono stati riportati in **Figura 47**. In particolare, quando $R/F=1$, il rilascio viene controllato in egual misura sia dall'erosione che la diffusione, se $R/F>1$ o $R/F<1$ allora si è in presenza di un rilascio principalmente governato o dal rilassamento/erosione o dalla diffusione.

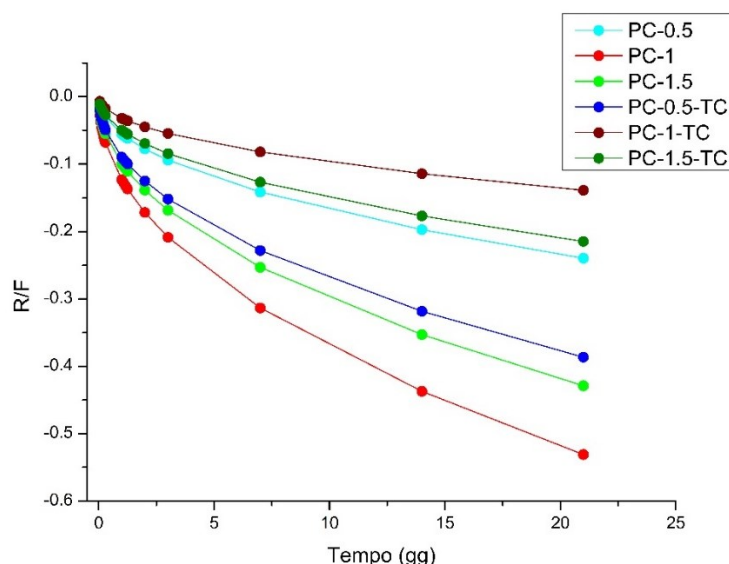


Figura 47. Valutazione del contributo di diffusione fickiano (F) e di rilassamento/erosione della matrice (R) nel modello Peppas-Salhin per il rilascio della CUR dagli scaffold, espresso come rapporto R/F in funzione del tempo. **A)** PC-0.5 (ciano), PC-1 (rosso), PC-1.5 (verde); **B)** PC-0.5-TC (blu), PC-1-TC (rosso scuro), PC-1.5-TC (verde scuro). Media $\pm$ SE (n=3).

Dai risultati ottenuti si evince che per tutti gli scaffold il rapporto R/F è inferiore a 1 dimostrando che il contributo fickiano (o diffusivo) (F) vince su quello legato al rilassamento del polimero (R) nel determinare il meccanismo di rilascio della CUR. Questo comportamento è giustificabile con la natura idrofobica del PCL secondo cui la velocità della sua erosione/rilassamento in ambiente acquoso è estremamente lenta rispetto alla diffusione della CUR dal suo interno, pertanto l'erosione del polimero è solo un fenomeno secondario che contribuisce in minore misura alla fuoriuscita della CUR. Inoltre, sembra che la presenza del β -TCP nella composizione non influenzi in maniera evidente il meccanismo di rilascio, nonostante la sua presenza dovrebbe conferire una maggiore idrofilia al materiale, aumentando l'interazione con l'acqua e favorendo l'erosione del polimero.

Il meccanismo di rilascio di tipo fickiano (diffusivo) viene invece ben evidenziato negli esperimenti condotti in ambiente lipofilo. Secondo quanto riportato in **Tabella 24** il miglior fitting dei dati sperimentali si ottiene applicando l'equazione cinetica del Primo Ordine, in particolare considerando anche i parametri di t_{lag} ed F_{max} . Come riportato, i valori di *lag time* sono risultati positivi, seppur di piccola entità, verosimilmente dovuto al tempo impiegato dal solvente per imbibire lo scaffold, solubilizzare la CUR e determinare la sua ripartizione tra lo scaffold ed il liquido accettore. Inoltre, nonostante gli esperimenti siano andati al completamento si osserva la presenza di un plateau per valori di poco inferiori al 100% della dose. Per tale motivo, al fine di condurre uno studio cinetico più accurato ed attendibile è stato introdotto il parametro di F_{max} . A conferma di quanto detto in **Figura 48**, sono riportate le curve risultanti dal fitting del modello cinetico del Primo Ordine con i dati sperimentali.

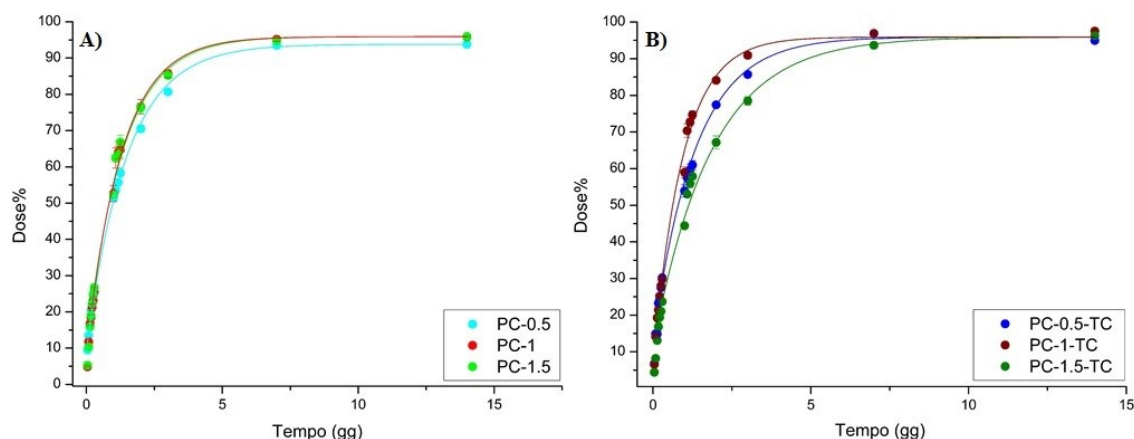


Figura 48. Percentuale della dose di CUR rilasciata in funzione del tempo dagli scaffold privi di β -TCP (A) e contenenti β -TCP (B) in ambiente lipofilo. Le curve sono il risultato del *fitting* applicando l'equazione del Primo Ordine con t_{lag} ed F_{max} . Media $\pm$ SE (n = 3).

La cinetica del Primo ordine descrive fenomeni di rilascio governati esclusivamente dalla diffusione e dipendenti dalla concentrazione del farmaco. In ambiente lipofilo, infatti, la velocità di dissoluzione della CUR risulta trascurabile permettendo alla stessa di diffondere liberamente secondo gradiente di concentrazione. Inoltre, il miristato di isopropile, essendo un solvente di natura lipidica, non ha la capacità di indurre modificazioni conformazionali nella struttura polimerica degli scaffold rendendo nullo il contributo di erosione osservato negli esperimenti condotti in ambiente acquoso.

In definitiva, le caratterizzazioni fin qui effettuate hanno dimostrato la potenziale validità degli scaffold di PCL e β -TCP per la veicolazione di CUR. Gli scaffold sono risultati tra loro omogenei in contenuto di CUR ed in dimensioni validando il metodo di preparazione mediante stampante 3D, e sono risultati capaci di rilasciare la CUR in ambienti biologici diversi per natura. Tuttavia, successive caratterizzazioni saranno necessarie per comprendere meglio l'aspetto microscopico degli scaffold con e senza β -TCP, così come saranno indispensabili le prove biologiche per investigare sia sulla citocompatibilità dei materiali che sulla capacità di indurre differenziazione delle cellule mesenchimali in osteoblasti e fibroblasti.

4.3 Realizzazione di un nanocomposito costituito da NLC di Quercetina incorporate in una spugna bioerodibile di Chitosano carica di Ciprofloxacina per migliorare il successo degli interventi di impianto dentale

4.3.1 Studi preliminari sulla QRC

La Quercetina (QRC) è un composto polifenolico naturale appartenente alla classe dei flavonoidi di cui sono note le sue proprietà antiossidanti, antiinfiammatorie, antibatteriche ed antitumorali (Anand David et al., 2016). È una molecola lipofila che possiede una scarsa solubilità in acqua, mentre risulta solubile in solventi organici quali metanolo, etere, etanolo ed acido acetico. Data la sua struttura chimica altamente coniugata è suscettibile ai fenomeni di degradazione indotti dalla temperatura, pH e dall'esposizione alla luce (Dall'Acqua et al., 2012; Srinivas et al., 2010). Come tutte le sostanze polifenoliche anche la QRC mostra una scarsa biodisponibilità una volta somministrata per via orale. Studi condotti *in vivo*, infatti, hanno dimostrato che solo il 6% della dose somministrata viene assorbita nel tratto gastro intestinale (A. F. Almeida et al., 2018). In particolare, la bassa solubilità della QRC nei fluidi fisiologici, la sua scarsa stabilità al pH fortemente acido dello stomaco (che la degrada velocemente in acidi fenolici) ed il massivo metabolismo intestinale alla quale è soggetta sono le cause principali che ne caratterizzano i valori così bassi di biodisponibilità (W. Wang et al., 2016). Inoltre, nonostante la QRC si trovi, nelle fonti alimentari, anche in forma glicosidica, cioè coniugata con zuccheri come ramnosio o glucosio che le conferiscono una maggiore solubilità, una volta giunta nell'ambiente del cavo orale, essa viene trasformata nella forma agliconica meno solubile e meno stabile (Walle et al., 2005).

Anche per la QRC, pertanto, l'incapsulamento in sistemi nanoparticellari lipidici potrebbe rappresentare la strategia vincente per aumentarne la stabilità e la biodisponibilità. Questa ricerca ha come obiettivo la preparazione di un nanocomposito multifunzionale contenente un antibiotico, la Ciprofloxacina, insieme alla Quercetina, utile a mantenere le condizioni di asepsi e contestualmente a promuovere la rigenerazione dei tessuti molli e duri nel sito di applicazione di un impianto dentale. In particolare, si è voluto realizzare un sistema costituito da una spugna bioerodibile contenente sia l'antibiotico che nanoparticelle lipidiche (NLC) cariche di QRC.

Poiché per la preparazione delle NLC cariche di QRC è necessario l'utilizzo di una fase disperdente acquosa, è stato preliminarmente necessario individuare un opportuno mezzo acquoso capace di mantenere inalterata la struttura chimica della QRC. Pertanto, si è deciso di studiare la stabilità nel tempo della QRC in due differenti soluzioni acquose quali PBS pH 7.4 e tampone citrato pH 5.5 entrambi addizionati di un cosolvente (DMSO) per poter solubilizzare una maggiore quantità di attivo e renderlo facilmente individuabile mediante spettrofotometria UV-Vis. Per confrontare al meglio l'influenza delle due soluzioni sulla possibile degradazione della QRC, ad ogni intervallo di tempo considerato, sono stati acquisiti i valori di assorbanza alla lunghezza d'onda massima di assorbimento della sostanza (370 nm). I risultati sono stati espressi come variazione percentuale del valore di assorbanza rispetto a quello osservato al tempo iniziale ($t=0$). Dopo 6 ore, si osserva una riduzione di questo valore in entrambi i solventi. Tuttavia, analizzando la soluzione di QRC in PBS si osservava una riduzione più marcata rispetto a quella individuata in tampone citrato, rispettivamente del 42% contro il 25%. Questi risultati hanno confermato i dati in letteratura, ovvero che all'aumentare del pH aumenta la velocità di degradazione della QRC.

Di conseguenza il PBS è stato scartato e per aumentare la stabilità dell'attivo in tampone citrato pH 5.5 è stato aggiunto un antiossidante quale l'N-acetilcisteina (NAC) alla concentrazione di 0.002% p/v. I risultati riportati graficamente in **Figura 49**, dimostrano che dopo l'aggiunta del conservante il valore di assorbanza della QRC nel tempo si mantiene pressoché costante, indice del fatto che la sostanza non subisce degradazione per almeno 6 ore.

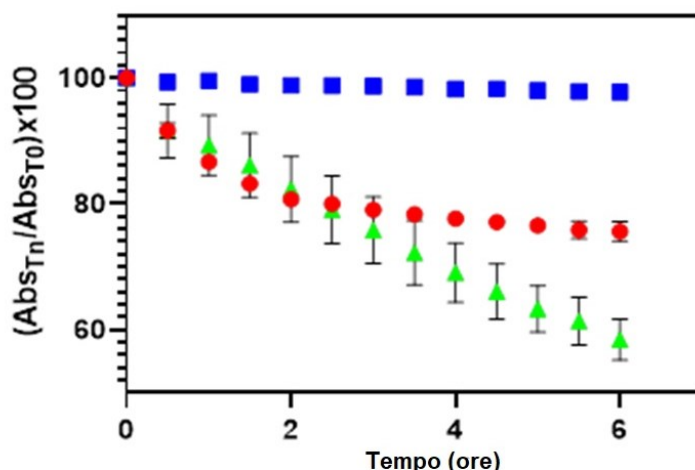


Figura 49. Valutazione della stabilità della QRC espressa come variazione percentuale dell'assorbanza nel tempo in: PBS 7.4 pH + DMSO (▲); tampone citrato a pH 5.5 + DMSO (●); tampone citrato a pH 5.5 + DMSO e NAC (■)

Una volta stabilito il solvente acquoso ottimale per mantenere stabile la QRC nel tempo, le successive prove sono state volte alla ricerca di un solubilizzante in grado di aumentare la solubilità dell'attivo, condizione necessaria per mantenere le condizioni *sink* e mimare quelle fisiologiche durante gli studi di permeazione/accumulo *ex vivo*. Trovare un solvente/agente solubilizzante in grado di aumentare la solubilità dell'attivo è cruciale nel momento in cui si vuole studiare la sua affinità a permeare/accumularsi all'interno di un tessuto poiché è necessario mimare al meglio le condizioni fisiologiche, questo perché il compartimento ricevente *in vivo* è costituito da plasma e proteine (così come lipoproteine) che possono sequestrare l'attivo mantenendo sempre elevato il gradiente di concentrazione. Per le prove di solubilità quindi al tampone citrato pH 5.5 + NAC allo 0.002% p/v, sono state addizionate le β -ciclodestine (β -CD) (**Figura 50**) a diverse percentuali (usate come promotori della solubilità) oppure il DMSO (usato come cosolvente).

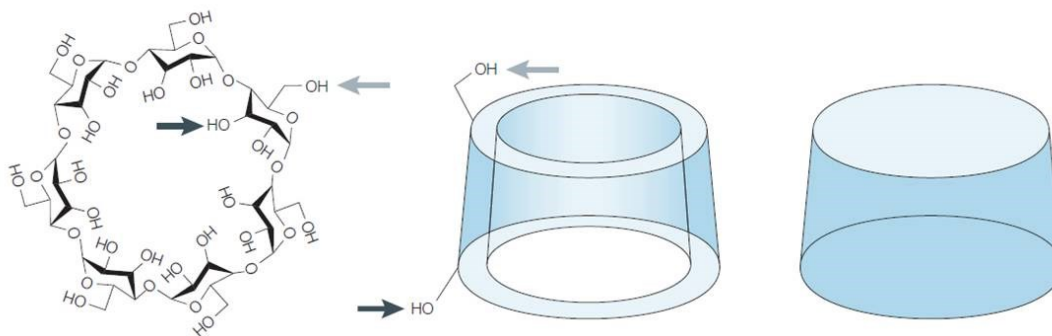


Figura 50. Struttura delle β -Ciclodestrine

Le Ciclodestrine sono oligosaccaridi ciclici di origine naturale ottenuti per scissione dell'amido e sono costituite da 6, 7 o 8 monomeri di D-(+)-glucopiranosio uniti tra loro con un legame $\alpha(1 \rightarrow 4)$ glucosidico e chiusi ad anello. Al crescere del numero di unità zuccherine si distinguono α , β e γ ciclodestrine. Sono tutte caratterizzate da una struttura tridimensionale rigida a forma di tronco di cono con cavità interna idrofoba, mentre le funzioni ossidriliche sono esposte verso l'esterno e sono responsabili della loro disperdibilità in ambiente acquoso. Le β -CD possono complessare all'interno della loro cavità molecole lipofile che risultano, così, protette dall'ossidazione e dall'ambiente esterno, più resistenti alle variazioni di temperatura e, apparentemente, più solubili in ambienti idrofili (Hashidzume et al., 2017). I risultati di ciascuna prova di solubilità sono riportati nella seguente **Tabella 25**.

Tabella 25. solubilità della QRC espressa in mg/mL $\pm$ SE in diversi solventi acquosi a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$

Solventi acquosi	QRC Solubilità (mg/mL)
Tampone citrato pH 5.5/NAC + β -CD 2% p/v	0.083 ± 0.002
Tampone citrato pH 5.5/NAC + β -CD 3% p/v	0.1033 ± 0.008
Tampone citrato pH 5.5/NAC + DMSO 10% v/v	0.029 ± 0.004
Acqua distillata pH 7	0.002 (Srinivas et al., 2010)

Prevedibilmente, l'aggiunta di un solubilizzante aumenta decisamente la solubilità dell'attivo in ambiente idrofilo. Infatti, è noto, dai dati riportati in letteratura, che la QRC presenta una solubilità in acqua molto bassa (0.002 mg/mL; fonte PubChem), che risulta migliorata di un ordine di grandezza in presenza di DMSO (0.029 ± 0.004 mg/mL), ma notevolmente incrementata quando si utilizzano le β -CD al 3% p/v (0.1033 ± 0.008 mg/mL). Inoltre, poiché l'obiettivo del lavoro è quello di aggiungere un antibiotico alla formulazione finale sono state eseguite prove di solubilità della Ciprofloxacina (CPX) in quest'ultimo *medium* acquoso addizionato di acido acetico glaciale. La CPX è un chemioterapico antibatterico di seconda generazione appartenente alla classe dei fluorochinoloni, ad azione batteriolitica. I fluorochinoloni grazie all'aggiunta di un atomo di fluoro e un gruppo piperazinico presentano, rispetto ai chinoloni, una maggiore attività, uno spettro d'azione più ampio e una farmacocinetica tale da permettere un'efficace penetrazione endocellulare e una buona distribuzione tissutale. La maggiore potenza della CPX si ascrive all'introduzione di un sostituito ciclopropilico in posizione 1 (**Figura 51**).

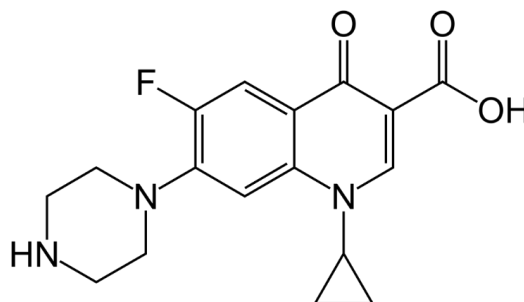


Figura 51. Struttura chimica della Ciprofloxacina

Appare come una polvere bianca con un elevato punto di fusione ed una solubilità in acqua di circa 36 mg/mL a 25°C (fonte: PubChem). Il suo meccanismo d'azione antibatterico è

basato sulla capacità di interferire con due topoisomerasi batteriche in ceppi Gram-positivi e Gram-negativi (Dodd-Butera & Broderick, 2014). Inoltre da uno studio condotto da Alamanda *et al* su 20 pazienti adulti con parodontite cronica volto a valutare la concentrazione di CPX dopo somministrazione sistemica è emerso che nel fluido crevicolare gengivale si ottenevano concentrazioni superiori fino ad 8 volte rispetto a quelle plasmatiche. La concentrazione di CPX, inoltre, era maggiore nei siti parodontali infiammati rispetto a quelli sani e data l'attività antimicrobica dose- dipendente della CPX, si può ipotizzare un suo effetto antibatterico contro i microrganismi sub-gengivali (Alamanda et al., 2016). A tal proposito, negli ultimi anni è stata posta l'attenzione sull'utilizzo della CPX per il trattamento delle patologie parodontali come alternativa al Metronidazolo verso il quale si è sviluppata un'elevata resistenza. La CPX è l'unico antibiotico nella terapia parodontale a cui sono sensibili tutti i ceppi di *A. actinomycetemcomitans*, ritenuti responsabili della mancata regressione della parodontite aggressiva nei pazienti trattati con le terapie convenzionali. È noto che questi agenti patogeni permangono nell'area sub-gengivale rendendo difficoltosa la loro eradicazione oltre ad essere in grado di invadere i tessuti parodontali e i tubuli dentinali (Prakasam et al., 2012). Un altro studio ha dimostrato che la somministrazione per via topica di CPX incorporata in nanofibre per il trattamento delle parodontiti portava all'insorgenza di minori effetti collaterali rispetto a quando somministrata per via sistemica oltre che sviluppare un numero minore di specie resistenti all'antibiotico (Bottino et al., 2014).

I risultati delle prove di solubilità hanno dimostrato che aggiungendo acido acetico alla soluzione di tampone citrato pH 5.5 contenente il 3% p/v di β -CD la solubilità dell'antibiotico aumentava fino a valori superiori a 100 mg/mL. Alla luce dei risultati ottenuti questo *medium* acquoso è stato scelto per le successive caratterizzazioni quando presente l'antibiotico.

4.3.2 Preparazione e caratterizzazione della miscela lipidica

La preparazione di una miscela lipidica è cruciale per l'ottenimento di NLC con caratteristiche ottimali e ben definite. Per questo motivo il primo step è stato la ricerca di appropriati eccipienti lipidici sia liquidi che solidi in grado di solubilizzare la QRC e di miscelarsi tra loro, al fine di ottenere una miscela lipidica solida a temperatura ambiente, omogenea e lavorabile. In primis sono stati condotti studi di screening volti a selezionare l'eccipiente lipofilo liquido. A tal fine sono state eseguite delle prove di solubilità a concentrazione fissa (5% p/p) di QRC in lipidi liquidi differenti tra di loro dal punto di vista chimico. In particolare, sono stati selezionati degli eccipienti lipidici modificati chimicamente con funzioni idrofile tali da conferire proprietà anfifiliche. Questa scelta è frutto delle caratteristiche chimico-fisiche della QRC la quale è caratterizzata da un coefficiente di partizione pari a 1.81 (Fonte PubChem). Il coefficiente di partizione (LogP) è un parametro che misura la capacità di una sostanza di ripartirsi tra un solvente lipofilo (ottanolo) ed uno idrofilo (acqua), e viene comunemente espresso come logaritmo decimale calcolato secondo la seguente equazione:

$$LogP = Log \left(\frac{C_{solutoOTTANOLO}}{C_{solutoACQUA}} \right)$$

Questo parametro permette di identificare le caratteristiche fisiche di una sostanza, in particolare valori superiori a 2 sono caratteristici di sostanze estremamente lipofile come il Triamcinolone acetone, di contro valori inferiori ad 1 sono propri di sostanze idrofile.

Valori intermedi, invece identificano una sostanza con proprietà anfifiliche, cioè affini sia alla fase lipofila che a quella idrofila.

Le prove di solubilità della QRC nei lipidi sono state condotte riscaldando fino a 60°C le miscele, per aumentare la fluidità degli eccipienti e favorire la solubilizzazione dell'attivo. Dopo 30 minuti, le miscele sono state ricondizionate alla temperatura ambientale e analizzate visivamente per valutare la presenza di precipitato. I risultati sono riportati in **Tabella 26**.

Tabella 26. Valutazione visiva degli eccipienti lipidici liquidi contenenti QRC

Lipide liquido	QRC % (p/p)	Aspetto
Labrasol [®]	5	Trasparente
Capryol PGMC [®]	5	Opalescente
Plurol [®]	5	Opalescente
Maisine [®]	5	Opalescente
Labrafil [®] M 1944 CS	5	Opalescente
PEG-18 G/C	5	Lievemente opalescente

Come si evince da quanto riportato in tabella solo il Labrasol[®] (LB), tra i lipidi analizzati, è capace di solubilizzare integralmente la quantità desiderata di QRC, essendo l'unico campione trasparente anche a temperatura ambiente. Il LB è costituito da una miscela di mono-, di- e trigliceridi e mono e di- esteri di acidi grassi con polietilenglicole (PEG)-8 e PEG-8 libero, con acido caprilico (C8)- e acido caprico (C10) come principali acidi grassi (**Figura 52**).

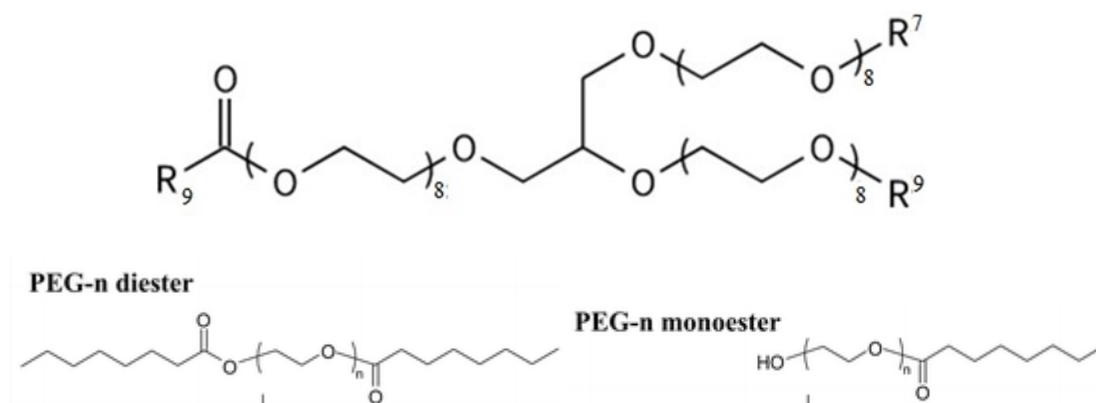


Figura 52. Struttura chimica del Labrasol[®]

Viene solitamente utilizzato come solubilizzante nelle formulazioni semisolide topiche ed è caratterizzato da un HLB pari a 12. La presenza di numerose funzioni peghilate si sposa perfettamente con le caratteristiche della QRC. Il LB risulta, quindi, un ottimo solvente per la QRC rispetto agli altri eccipienti che pur possedendo gruppi funzionali idrofili non possiedono sufficienti proprietà anfifiliche.

Per la componente solida della miscela lipidica sono stati scelti due eccipienti il Glicerilmonostearato (GMS) e l'acido glicirretico (GA). Il primo è il monoestere dell'acido

octadecanoico, con 1,2,3-propantriolo. In realtà si trova in commercio sottoforma di miscela di monoacilgliceroli, principalmente monostearilglicerolo, con una certa quantità di di- e triacilgliceroli. (NOME INCI Glyceryl stearate) (**Figura 53**).

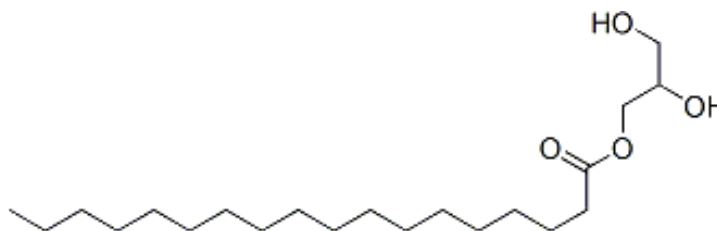


Figura 53. struttura chimica del glicerilmonostearato

È un agente emulsionante di origine vegetale che possiede proprietà emollienti e stabilizzanti. La presenza di funzioni ossidriliche non esterificate rende il GMS abbastanza miscibile con il LB.

Il GA è un composto attivo ricavato dalla radice della *Glycyrrhiza glabra* le cui caratteristiche e proprietà sono già state descritte nel paragrafo **4.1.2**.

Mantenendo fissa la percentuale di QRC al 5% p/p, e variando il rapporto tra gli eccipienti lipidici, sono state preparate diverse miscele lipidiche, al fine di individuare la migliore in termini di aspetto e consistenza (vedi paragrafo **3.2.3.2**, **Tabella 7**). La miscelazione di eccipienti e QRC è stata effettuata a caldo (fino a 120 °C) e la valutazione per la scelta della migliore è stata fatta in termini di limpidezza ed omogeneità a caldo ed omogeneità a freddo.

In particolare, il MIX 1 presentava un aspetto omogeneo durante la fase di miscelazione a caldo, ma una volta raffreddato era disomogeneo con la presenza di due evidenti fasi. Il MIX 2, con la più elevata percentuale di GA, andava incontro ad imbrunimento dovuto ad un maggior tempo di permanenza a 120°C necessario per la solubilizzazione della QRC. Il MIX 3, contenente il 5% di GA,

presentava le stesse caratteristiche già mostrate dal MIX 1. Si è potuto così comprendere che LB e GMS non sono completamente miscibili se utilizzati in rapporto in peso pari a 50:50. Contrariamente, modificando il rapporto tra il LB ed il GMS a favore di quest'ultimo (MIX 4 e MIX 5) si ottenevano miscele caratterizzate da un brillante colore giallo (caratteristico della QRC) limpide ed omogenee durante la fase di fusione e miscelazione ma anche dopo solidificazione. Successivamente sulla base della loro composizione sono state preparate delle miscele lipidiche senza la QRC, mantenendo costante il rapporto tra i componenti lipidici (Blank 1 e Blank 2), le quali risultavano bianche, lisce ed omogenee. Le quattro miscele così ottenute sono state valutate in termini di range di temperatura di rammollimento ed i risultati sono riportati in tabella (**Tabella 27**).

Tabella 27. Range di temperatura di rammollimento delle miscele con e senza QRC.

Miscela	Range di temperatura (°C)
MIX 4	50-55
Blank 1	30-35
MIX 5	55-60
Blank 2	40-45

Come si evince dai risultati le miscele non sono caratterizzate da un punto di fusione ben definito dovuto alla natura stessa del campione costituito dalla miscela di più componenti lipidici. Tuttavia, confrontando il MIX 4 con il MIX 5 si nota che la quantità di GA gioca un ruolo chiave nel determinare il range di rammollimento delle miscele. Il dato viene confermato dai risultati ottenuti per le miscele prive di QRC, le quali hanno comunque delle temperature di rammollimento inferiori, determinate dalla mancanza della QRC che, grazie al suo punto di fusione elevato, contribuisce a dare consistenza e solidità alla miscela lipidica. È necessario sottolineare che in tutti i casi le temperature osservate sono coerenti con l'obiettivo da raggiungere, ovvero ottenere nanoparticelle lipidiche solide a temperatura ambiente. Inoltre, alla luce dei risultati ottenuti se si considerano gli alti punti di fusione della QRC e del GA, rispetto a quelli degli altri componenti della miscela riportati in **Tabella 28**, si può supporre che i singoli componenti si combinino tra di loro formando una struttura presumibilmente amorfa e quindi idonea per la preparazione di NLC, ma soprattutto che possa essere avvenuta anche la completa amorfizzazione della QRC (quando presente).

Tabella 28. punto di fusione dei componenti della miscela lipidica (*EPA database*)

Campione	Punto di fusione (°C)
Labrasol®	Liquido a t.a.
GMS	58-62
GA	296
QRC	316

4.3.3 Preparazione e caratterizzazione delle NLC contenenti QRC

Per la preparazione della NLC è stato adoperato un metodo ad alta energia basato sulla omogeneizzazione seguita da sonicazione ad alte frequenze, descritto nel paragrafo 4.1.2. In questo caso la fase dispersa è costituita da 800 mg di ogni miscela lipidica fusa ed addizionata di 160 µL di R-(+)-Limonene (LIM) al fine di aumentare la permeabilità della QRC nei tessuti biologici. Infatti, il LIM (**Figura 54**) appartiene alla classe dei terpeni, sostanze di origine naturale, considerate *enhancer* della permeabilità sia per farmaci idrofili che lipofili, in grado di agire anche a basse concentrazioni. I meccanismi attraverso cui agisce questa classe di composti sono diversi ma generalmente correlati ad una interazione con i lipidi intercellulari degli strati di membrana (J. Chen et al., 2016).

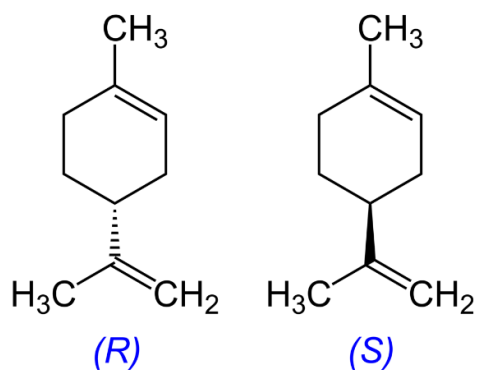


Figura 54. struttura chimica dei due enantiomeri del Limonene

Il LIM viene inserito prima della preparazione delle NLC poiché data la sua volatilità sarebbe impossibile addizionarlo durante la preparazione della miscela lipidica che richiede l'utilizzo di elevate temperature per un tempo prolungato. Quindi la fase dispersa viene emulsionata con 40 mL di fase acquosa preriscaldata a $80 \pm 0.5^\circ\text{C}$ costituita da tampone citrato pH 5.5 addizionato dello 0.002% di NAC, scelto sulla base dei risultati ottenuti dalle prove di stabilità. Per favorire la formazione della microemulsione prima e successiva nanoemulsione, alla fase acquosa sono stati aggiunti due tensioattivi entrambi all'1 % p/v di concentrazione. I tensioattivi utilizzati sono stati il Tween 80 e il Pluronic F-68 scelti sulla base dell'esperienza con il nanocomposito di Curcumina. Essi, infatti, se usati in combinazione, favoriscono la formazione di una nanodispersione stabile ed omogenea (vedi paragrafo 4.1.2). Le due fasi sono state miscelate a caldo per 1 minuto utilizzando un omogeneizzatore Ultraturrax a 19.000 rpm e la risultante microemulsione è stata immediatamente trattata con un sonicatore con sonda ad immersione per 15 minuti. La procedura è stata ripetuta due volte, la prima a temperatura ambiente la seconda ponendo un bagno di ghiaccio e sale attorno alla dispersione per favorire la solidificazione delle NLC. Le dispersioni di NLC ottenute risultavano visivamente omogenee e non si apprezzava separazione di fase. Una volta preparate, le NLC contenenti QRC sono state immediatamente caratterizzate in termini di valutazione quantitativa. Dai risultati ottenuti la DR% del campione QRC-NLC-A è pari al $99.4 \pm 0.5\%$ permettendo di validare il metodo di preparazione. La stessa cosa non si può dire del campione QRC-NLC-B, dove la DR% è risultata del $88.4 \pm 0.8\%$ con una riduzione di circa il 12% di QRC rispetto al teorico utilizzato. Questa discrepanza di valori è giustificabile con la presenza di una maggiore quantità di GA che comporta il mantenimento della miscela su piastra riscaldante per più tempo affinché questa possa fondere completamente prima della preparazione delle NLC favorendo, in questo modo, la degradazione termica dell'attivo.

Una volta nota la quantità totale di QRC nelle dispersioni si è proceduto a valutare la quota di attivo effettivamente incapsulato nelle NLC. Per fare questo è necessario effettuare un'analisi indiretta ovvero quantificare la QRC libera in dispersione e per differenza ottenere quella dentro le nanoparticelle. A tal fine è stato utilizzato di un dispositivo centrifugo avente cut-off di dimensioni inferiori al diametro delle particelle. All'interno di questo dispositivo viene inserita un'aliquota di dispersione di NLC fresca, e sottoposto a ultracentrifugazione. Al termine del processo si ottengono due fasi: la prima, contenente le nanoparticelle

trattenute dal filtro, viene scartata, la seconda contenente la QRC non incapsulata viene analizzata mediante HPLC-DAD (**Figura 55**).

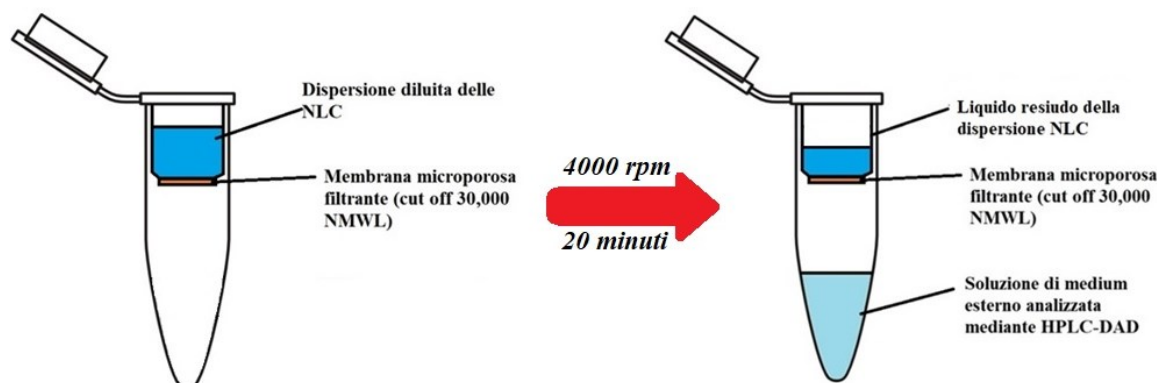


Figura 55. Rappresentazione schematica del dispositivo centrifugo Ultrafree-MC (Millipore) con membrana microporosa prima e dopo il processo di ultracentrifugazione.

Il punto cruciale di questa analisi risiede nella definizione dei parametri di centrifugazione in termini di forza centrifuga applicata (in rpm) e tempo. I parametri ottimali sono stati ottenuti centrifugando i campioni a 4000 rpm per 20 minuti e sono stati scelti in seguito a diverse prove sperimentali. Infatti, applicando una maggiore forza centrifuga la pellettizzazione delle NLC sul filtro è talmente repentina che esse lo occludono impedendo il recupero di idonee quantità di fase esterna necessarie per gli studi quantitativi. Di contro, aumentando il tempo di centrifugazione il riscaldamento del rotore causa fusione delle nanoparticelle con conseguente rilascio dell'attivo incapsulato restituendo un risultato falsato. Note la quantità totale di QRC e quella libera è stato possibile valutare per differenza la quota incapsulata espressa in termini di Drug Loading % (DL%) e Loading Efficacy % (LE%). I risultati sono riportati nella **Tabella 29**:

Tabella 29. Valori di Drug loading % e Loading Efficacy % + SE delle NLC

Campioni	DL%	LE%
QRC-NLC-A	4.98 ± 0.11	97.77 ± 0.08
QRC-NLC-B	3.89 ± 0.12	88.80 ± 0.56

Dai risultati ottenuti si evidenzia l'elevata efficienza di incapsulazione delle NLC (LE > 85%) per entrambe le composizioni, confermando la loro validità come sistema *carrier* per la QRC. Inoltre, osservando l'elevata riproducibilità intra-batch e inter-batch (bassi valori di errore standard) è ulteriormente possibile confermare il metodo di preparazione. Si è proceduto quindi alla caratterizzazione morfologica delle NLC mediante misure di Dinamic light scattering (DLS) e del potenziale Z ed i risultati sono riportati nella **Tabella 30**.

Tabella 30. Parametri dimensionali (intensity), di polidispersità (PDI) e di carica superficiale (potenziale zeta) + SE delle dispersioni di NLC

Campioni	Intensity (nm)	PDI	Potenziale Z (mV)
QRC-NLC-A	337.8 ± 61.4	0.546	-24.8 ± 5.3
QRC-NLC-B	399.2 ± 138.1	0.608	-16.1 ± 4.5
NLC-A	878.3 ± 177.1	0.353	-26.4 ± 6.1
NLC-B	332.1 ± 96.8	0.350	-29.2 ± 5.3

La dimensione delle particelle non è stata riportata come Z-Average, che corrisponde alla media tra le intensità di tutti i segnali registrati dallo strumento (dipendenti dal diametro delle particelle) poichè dalle analisi è emersa la presenza, in tutte le dispersioni, di una seconda popolazione, attribuibile alla presenza di micelle di tensioattivi, in quanto essi sono contenuti nei campioni in una quantità superiore al loro valore di concentrazione micellare critica (CMC). Questa ipotesi è stata confermata dall'analisi del solo mezzo disperdente utilizzato come controllo, il quale restituisce un unico segnale del valore di 34.6 ± 2.5 nm. Tale evidenza ha portato a comprendere che anche in valori di PDI restituiti dallo strumento possano non essere veritieri. Pertanto, i risultati sono stati riportati come valore di Intensity e la polidispersità di ogni dispersione è misurabile dal valore di deviazione standard. Infine, i valori del potenziale Z indicano che la repulsione elettrostatica, insieme alla stabilizzazione sterica derivata dai tensioattivi, contribuiscono a rendere le dispersioni termodinamicamente stabili, evitando fenomeni di aggregazione tra le nanoparticelle. Come è possibile osservare dai risultati ottenuti, il campione QRC-NLC-A mostra i parametri migliori sia in termini di dimensione delle particelle che per distribuzione dimensionale, di contro, NLC-A possiede i parametri peggiori, il che può essere giustificato considerando che la miscela di partenza (Blank 1) è caratterizzata da un range di temperatura di rammollimento più basso. Si può ipotizzare che durante le fasi di raffreddamento i globuli di nanoemulsione fusi raggiungano più lentamente la loro temperatura di solidificazione (dovuto all'elevata energia adoperata durante il processo di sonicazione) rimanendo in uno stato semisolido che potrebbe favorire l'aggregazione particellare. L'aggiunta della QRC, infatti, aumentando il punto di fusione della miscela, favorisce una rapida solidificazione già durante le prime fasi di raffreddamento, evitandone l'aggregazione. Questa ipotesi potrebbe anche giustificare la dimensione delle particelle di NLC-B così come di QRC-NLC-B, le cui miscele lipidiche hanno un range di temperatura di rammollimento di almeno 10 gradi superiore alla miscela Blank 1, e quindi capaci di raggiungere più velocemente la loro temperatura di solidificazione. Tuttavia, tra le dispersioni analizzate per le successive caratterizzazioni è stato scelto il campione QRC-NLC-A poiché ha mostrato i migliori risultati in termini di DR%, DL%, LE%, diametro medio delle particelle ed una più omogenea distribuzione dimensionale. Per confermare i dati di DLS, il suddetto campione è stato ulteriormente caratterizzato dal punto di vista morfologico mediante SEM (**Figura 56**).

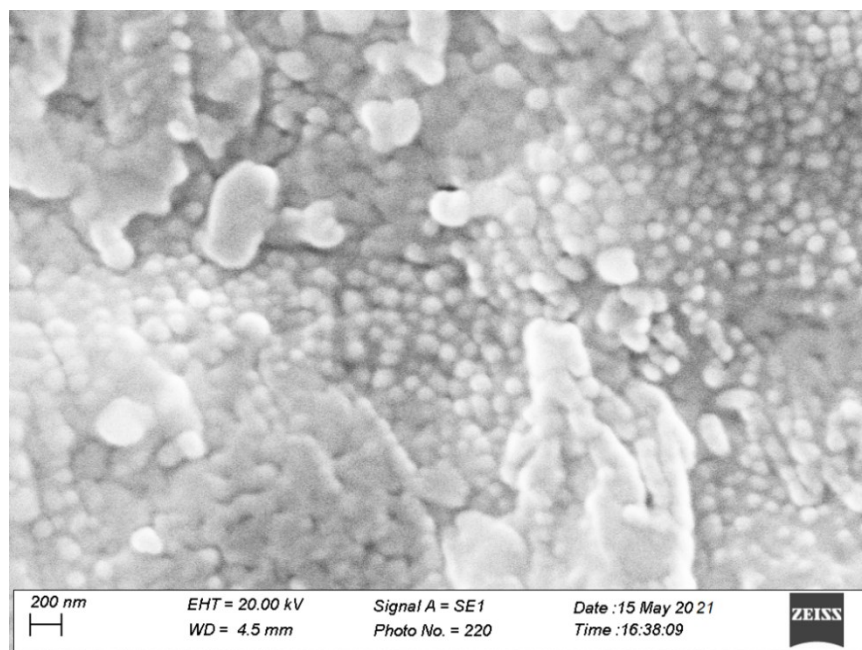


Figura 56. morfologia superficiale del campione QRC-NLC-A; barra ingrandimento: 200 nm

Dall'immagine SEM si osserva la sfericità delle nanoparticelle ottenute, con un diametro medio coerente con quanto osservato dalle misure al DLS. Inoltre, non è stata osservata alcuna presenza di cristalli, suggerendo che la QRC sia effettivamente incapsulata all'interno delle nanoparticelle probabilmente nel suo stato amorfo. Tuttavia, in alcune regioni è possibile notare un'evidente agglomerazione delle nanoparticelle, probabilmente dovuto al fascio di elettroni concentrato sulla superficie del campione che potrebbe aver portato alla fusione dei componenti lipidici durante l'analisi, e che impedisce di poter fare un'analisi accurata su diametro e dimensioni delle particelle. Sulla base di questi risultati, si è proceduto alla preparazione di un nuovo lotto di NLC arricchito dell'antibiotico CPX, il quale viene aggiunto all'interno della fase disperdente acquosa (denominato QRC-NLC-CPX). Per i successivi studi antimicrobici, è stato anche preparato il corrispondente campione privo di QRC (denominato NLC-CPX). Anche queste dispersioni sono state adeguatamente caratterizzate in termini di DLS e Potenziale Z, per verificare l'influenza dell'antibiotico su dimensioni e carica superficiale delle NLC ottenute. I risultati riportati in **Tabella 31** sono soddisfacenti e dimostrano che la presenza della CPX nella fase disperdente ha migliorato i valori di dimensione delle particelle, PDI e potenziale Z. Sorprendentemente, l'effetto maggiore è stato osservato sulle dimensioni delle particelle del campione NLC-CPX (se confrontato con il corrispettivo NLC-A) probabilmente dovuto all'adsorbimento delle molecole di antibiotico sulla superficie delle nanoparticelle che ne previene l'accrescimento durante le fasi di raffreddamento per ingombro sterico. Ipotesi in qualche modo confermata dalla variazione del potenziale Z, poiché la CPX si trova solubilizzata nella fase acquosa sotto forma di sale, il quale avendo una carica elettrica netta, una volta adsorbitosi sulla superficie delle NLC ne influenza la carica dello strato fisso (Nugraheni et al., 2019).

Tabella 31. Parametri dimensionali (intensity), di polidispersità (PDI) e di carica superficiale (potenziale zeta) + SE delle dispersioni di NLC preparate con l'aggiunta della CPX nella fase disperdente

Campioni	Intensity (nm)	PDI	Potenziale Z (mV)
QRC-NLC-CPX	292.5 ± 78.5	0.388	-7.23 ± 9.3 V
NLC-CPX	358.16 ± 113	0.301	-13.9 ± 4.9 V

4.3.4 Preparazione e caratterizzazione del nanocomposito contenente QRC e CPX

In accordo con quanto osservato durante la preparazione del nanocomposito di Curcumina, un punto cruciale per la realizzazione di un valido sistema di veicolazione sottoforma di spugna polimerica bioerodibile, capace di intrappolare le nanoparticelle lipidiche mantenendo una struttura porosa allo stato secco, è la scelta dei polimeri che costituiscono l'impalcatura del sistema. In questo caso si è voluto strutturare il nanocomposito con un reticolo matriciale di Chitosano e Polivinilpirrolidone K-90 (PVP-K90) nel quale si trova omogeneamente disperso l'antibiotico (CPX) e le NLC cariche di QRC. L'impiego di un sistema nanocomposito così fatto permette di sfruttare i vantaggi offerti sia dalla matrice idrofila polimerica che dalle nanoparticelle lipofile, ovvero un materiale soffice e polverulento da poter applicare facilmente in situ e che possedesse buone caratteristiche di adesione ai tessuti dove poter rilasciare gli attivi per un tempo prolungato. Il sistema dovrebbe favorire, da un lato, la ripartizione della QRC nei tessuti biologici grazie al suo intrappolamento all'interno delle NLC, e dall'altro, la liberazione per tempi prolungati dell'antibiotico nei fluidi fisiologici a contatto con i tessuti, grazie alla sua idrofilia. Il polimero principale del nanocomposito è rappresentato dal Chitosano. Esso è un polisaccaride lineare originato dal legame $\beta(1-4)$ tra la D-glucosammina e l'N-acetil-D-glucosammina. Si ottiene per deacetilazione della chitina estratta generalmente da fonti animali (crostacei) o vegetali (funghi), ed il grado di deacetilazione viene determinato mediante spettroscopia NMR e può essere compreso tra 60 e 100% (**Figura 57**).

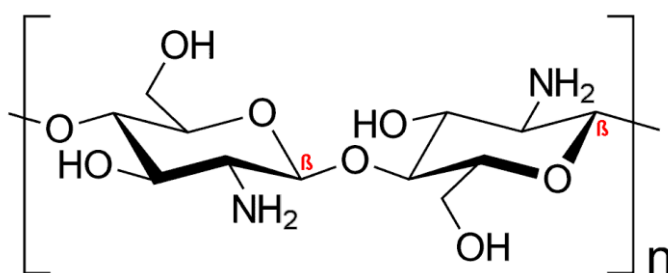


Figura 57. Struttura chimica dell'unità ripetitiva del Chitosano [in evidenza i legami $\beta(1-4)$]

In ambiente neutro, come quello fisiologico, la maggior parte dei gruppi amminici si trova nella forma protonata, conferendo così al polimero proprietà mucoadesive ed antibatteriche (Islam & Ferro, 2016). Inoltre, la sua somiglianza strutturale con i glicosamminoglicani, le proprietà osteoinduttive e la sua ben nota capacità di stimolare l'adesione e proliferazione cellulare ne fanno un affascinante biomateriale in ambito rigenerativo tissutale (Sultankulov et al., 2019). In questo studio è stato utilizzato il Chitosano Liposan Ultra (CTS) il quale è una miscela fisica di Chitosano deacetilato al 90% e acido succinico. Questo specifico

materiale è stato scelto poiché la presenza dell'acido succinico tra le catene polissaccaridiche del chitosano fa sì che la risultante struttura matriciale sia più rigida, permettendo di avere maggiore controllo sul rilascio delle NLC. Inoltre, è noto in letteratura che il CTS possiede un basso grado di swelling quando messo a contatto con soluzioni acquose debolmente acide (Bigucci et al., 2008). Al fine di aumentare le proprietà meccaniche e mucoadesive del nanocomposito è stato scelto un secondo polimero di supporto, quale il PVP-K90, le cui proprietà sono state già ampiamente discusse in questa tesi.

Per la realizzazione del nanocomposito, è stato prima ottenuto un gel strutturato di CTS e PVP-K90 in acqua acidificata a pH 4 (per favorire la dispersione del chitosano), e poi una opportuna quota di questo gel è stata diluita nella dispersione di NLC. Alla dispersione è stato ulteriormente aggiunto il trealosio, per le sue ben note capacità di stabilizzazione delle biomolecole e per fungere da crioprotettore, come già ampiamente discusso precedentemente. Dopo un trattamento di omogeneizzazione finalizzato a distribuire omogeneamente tutti i componenti nella dispersione di NLC e a distendere le maglie polimeriche per l'intero volume del liquido, il campione è stato congelato e sottoposto al processo di Freeze-drying ottenendo una polvere gialla e di colore uniforme, soffice e friabile, caratterizzata da una notevole struttura porosa, creatasi a seguito della rimozione del solvente durante il processo di liofilizzazione (**Figura 58**).



Figura 58. Aspetto della polvere di BioQ-CPX ottenuta dopo il processo di freeze-drying

I campioni di nanocomposito con e senza antibiotico sono stati nominati come riportato nel paragrafo **3.2.3.8, Tabella 9**. Per verificare l'uniformità di contenuto in QRC e CPX della matrice liofilizzata, porzioni di polvere dei campioni BioQ, BioNLC-CPX e BioQ-CPX sono state prelevate da zone differenti del medesimo lotto, solubilizzate in metanolo ed analizzate spettrofotometricamente, utilizzando le relative rette di taratura (**Tabella 32**).

Tabella 32. Percentuale $\pm$ SE di QRC e/o CPX nei nanocompositi ottenuti per freeze-drying. (n = 9)

Nanocomposito	QRC (%p/p)	CPX (%p/p)
BioQ	$1.92 \pm 0.05\%$	-
BioNLC-CPX	-	$4.07 \pm 0.02\%$
BioQ-CPX	$2.10 \pm 0.03\%$	$3.50 \pm 0.05\%$

Secondo quanto riportato in tabella è possibile osservare un'omogenea distribuzione degli attivi, come dimostrato dai bassi valori di errore standard. Questi risultati permettono di validare il metodo di preparazione. Tuttavia, poiché l'obiettivo di questo lavoro è coadiuvare gli effetti benefici della QRC con le proprietà antibatteriche della CPX, le successive caratterizzazioni sono state condotte sul campione BioQ-CPX. Suddetto campione è caratterizzato da una struttura spugnosa caratteristica dei prodotti ottenuti dal processo di freeze-drying. La rimozione dell'acqua per sublimazione genera numerosi spazi vuoti che contribuiscono all'elevata porosità del nanocomposito la quale, come ampiamente riportato, è una caratteristica importante in medicina rigenerativa. Inoltre, la porosità di una matrice polimerica influenza la capacità di adsorbire fluidi biologici e di rilasciare quindi sostanze funzionali o farmaci in essa incorporati.

La porosità del campione BioQ-CPX, risultante dal rapporto tra la densità apparente del nanocomposito e la densità vera dei materiali che la compongono, è risultata pari a $94.1 \pm 0.5\%$. Tale valore è in linea con l'obiettivo prefissato, poiché è noto che i materiali con una porosità superiore al 90% sono ideali per essere applicati nell'ingegneria tissutale. Inoltre, è stato dimostrato che sistemi matriciali aventi una porosità superiore al 75% e dimensioni dei pori di circa 150 μm mostrano spiccate proprietà osteoconduttive (Danaei et al., 2018b). In maniera specifica, un'adeguata dimensione dei pori così come le interconnessioni tra le maglie dei polimeri consente all'ossigeno e ai nutrienti di fluire verso le cellule oltre a favorire il drenaggio dell'essudato influenzando, in questo modo, la migrazione cellulare, l'infiltrazione e i fenomeni di angiogenesi (Rafieian et al., 2019). L'elevata porosità del nanocomposito così come il diametro dei pori è stata inoltre confermata dalle immagini SEM (Figura 59).

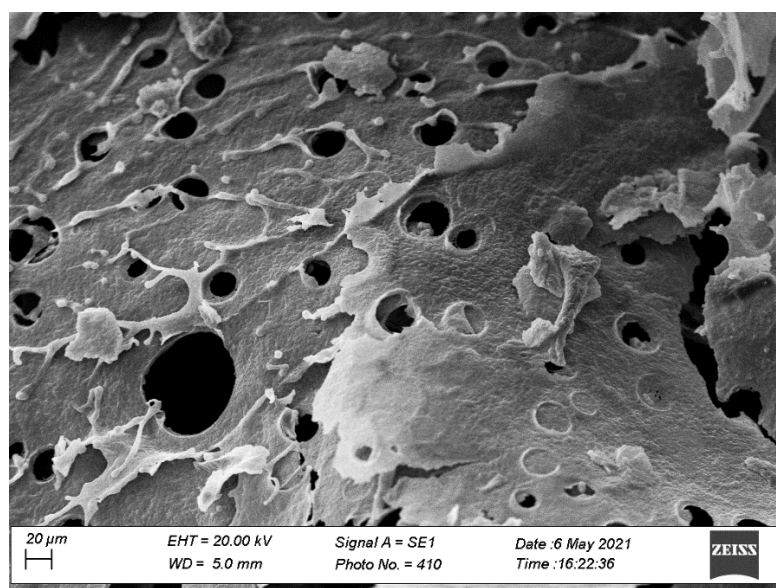


Figura 59. valutazione morfologica mediante SEM della superficie del nanocomposito BioQ-CPX; barra ingrandimento: 20 μm .

Successivamente, si è proceduto alla valutazione della capacità di swelling del nanocomposito, una volta messo a contatto con i fluidi acquosi. Per ovviare alla difficoltà di valutare il campione sottoforma di polvere, quest'ultima è stata leggermente compressa

(come riportato nel paragrafo 3.2.1.15) per ottenere delle mini-tablets aventi rispettivamente un diametro e uno spessore di 4.50 ± 0.02 mm e 2.50 ± 0.08 mm. I risultati sono stati riportati come indice di swelling % ed hanno mostrato un rapido aumento di peso entro i primi 5 minuti seguito da un andamento graduale fino a 40 minuti per poi stabilizzarsi al suo valore massimo, corrispondente ad un incremento in peso di circa il doppio di quello misurato allo stato secco (**Figura 60**).

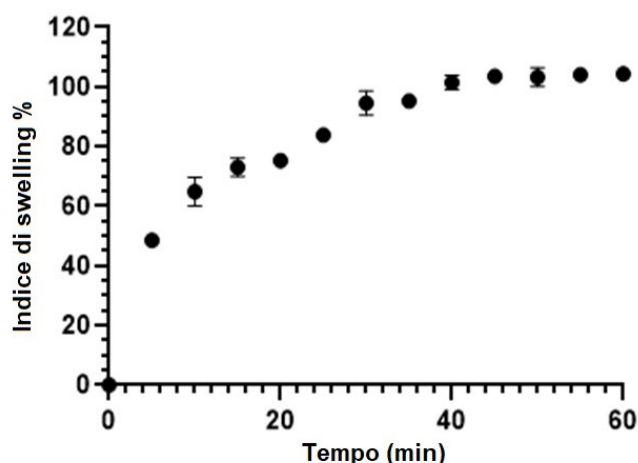


Figura 60. Indice di swelling % di BioQ-CPX in funzione del tempo (min); media $\pm$ SE (n=3).

È noto che l'attitudine al rigonfiamento di sistemi matriciali a base di Chitosano è fortemente dipendente dal pH, dovuto alla struttura chimica del polimero. Infatti, la protonazione dei gruppi amminici che avviene in ambiente acido porta alla repulsione delle catene polimeriche e la migrazione dei controioni all'interno della struttura con conseguente variazione della pressione osmotica che richiamando acqua favorisce lo swelling. Tuttavia, con l'aumento del pH, questo fenomeno si riduce portando al restringimento dell'intera struttura (Rohindra et al., 2004). In questo caso, poiché è stata utilizzata una soluzione tampone citrato debolmente acida (pH 5.5), i gruppi amminici del chitosano ed i gruppi carbossilici dell'acido succinico si trovano sia nella loro forma ionizzata che non ionizzata. Pertanto, l'interazione tra cariche positive del chitosano e quelle negative dell'acido succinico può portare ad una neutralizzazione della carica netta del sistema con conseguente diminuzione della sua capacità di swelling (Bigucci et al., 2008). Quest'ipotesi è stata confermata dal massimo grado di rigonfiamento osservato con il campione BioQ-CPX (100%) risultando 8 volte inferiore rispetto al valore misurato sul chitosano puro allo stesso valore di pH (Rohindra et al., 2004).

Un altro importante parametro da considerare è l'igroscopicità del nanocomposito, poiché gioca un ruolo chiave nel determinare le proprietà di una polvere. Infatti, polveri umide o eccessivamente igroscopiche potrebbero essere poco scorrevoli, difficilmente maneggiabili e instabili durante le fasi di stoccaggio (Juarez-Enriquez et al., 2017). In particolare, la capacità del nanocomposito di adsorbire acqua dall'ambiente circostante (Umidità relativa al 60%) è stata valutata in termini di incremento in peso percentuale nel tempo (**Figura 61**).

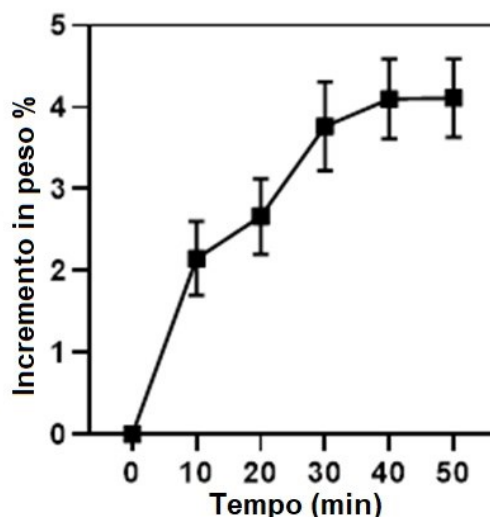


Figura 61. Incremento in peso percentuale di BioQ-CPX in funzione del tempo (min). Media $\pm$ SE (n=3).

Dai risultati si evince un rapido incremento in peso nei primi minuti, che raggiunge un plateau dopo 40 minuti suggerendo quindi l'instaurarsi di un equilibrio con l'umidità ambientale. In ogni caso, l'aumento di peso massimo osservato è stato del $4.11 \pm 0.48\%$, evidenziando una bassa tendenza del nanocomposito ad adsorbire l'umidità ambientale che si traduce in una maggiore maneggevolezza e facilità nella lavorazione. Inoltre, come accennato, questo parametro influenza la conservazione delle polveri nel tempo. La produzione di forme di dosaggio sottoforma di polvere è una strategia utilizzata per aumentare la *shelf-life* di principi attivi, come la QRC, suscettibili ai fenomeni di degradazione. Pertanto, incorporare siffatte sostanze all'interno di un nanocomposito avente una bassa tendenza ad adsorbire l'umidità ambientale è imperativo per mantenerle integre durante la conservazione. Affinché il sistema nanocomposito, una volta somministrato, possa favorire la rigenerazione dei tessuti è necessario che sia in grado di rilasciare gli attivi incapsulati nell'ambiente circostante. A tal fine sono stati condotti studi di rilascio *in vitro*. Data la natura chimica differente di QRC e CPX ($\text{LogP}_{\text{CPX}} = 0.28$; $\text{LogP}_{\text{QRC}} = 1.81$) i loro profili di rilascio sono stati studiati separatamente, utilizzando condizioni sperimentali differenti. Le curve di rilascio ottenute diagrammando la frazione della dose in funzione del tempo, sono state in seguito elaborate al fine studiare il meccanismo con cui la forma di dosaggio libera i principi attivi. L'applicazione di opportuni modelli matematici alle curve sperimentali permette infatti di conoscere la cinetica di fuoriuscita dei farmaci e validare la riproducibilità.

Una prima tecnica per saggiare il comportamento dell'antibiotico è stata quella della dialisi, utilizzando come fluido ricevente una soluzione di tampone citrato pH 5.5 addizionata di acido acetico (scelto alla luce dei risultati ottenuti dai test di solubilità) per assicurare le condizioni *sink* del sistema. E' stata scelta una membrana di cellulosa rigenerata, con cut-off 12–14,000 Da, per favorire la diffusione del farmaco ma impedire la diffusione delle NLC o di altri componenti della formulazione che potevano interferire con le analisi. Tuttavia, a causa dell'eccessiva velocità di diffusione osservabile dai risultati ottenuti (**Figura 62-** curva blu) con circa l'80% della dose rilasciata dopo 1.5 ore, non è stato possibile determinare con accuratezza il meccanismo che governa il rilascio dell'antibiotico

dal nanocomposito. Pertanto, è stato variato il setting sperimentale, utilizzando le celle di Franz verticali, come sistema bicompartimentale, e la medesima membrana per dialisi tra i due compartimenti. Il liquido accettore usato è stato comunque il tampone citrato pH 5.5 addizionato di acido acetico. Il nanocomposito è stato inserito nel compartimento donatore sotto forma di polvere imbibita con 0.5 mL di tampone citrato pH 5,5. L'utilizzo della cella di Franz piuttosto che del sacchetto per dialisi comporta una minore superficie di contatto tra formulazione e liquido accettore, nonché una minore quantità di fluido che imbibisce il nanocomposito, consentendo di osservare un rallentamento dell'andamento del rilascio fin dai primi minuti di esperimento (**Figura 62**-curva rossa) e correlarlo con il processo di swelling, osservato negli specifici esperimenti sopra menzionati.

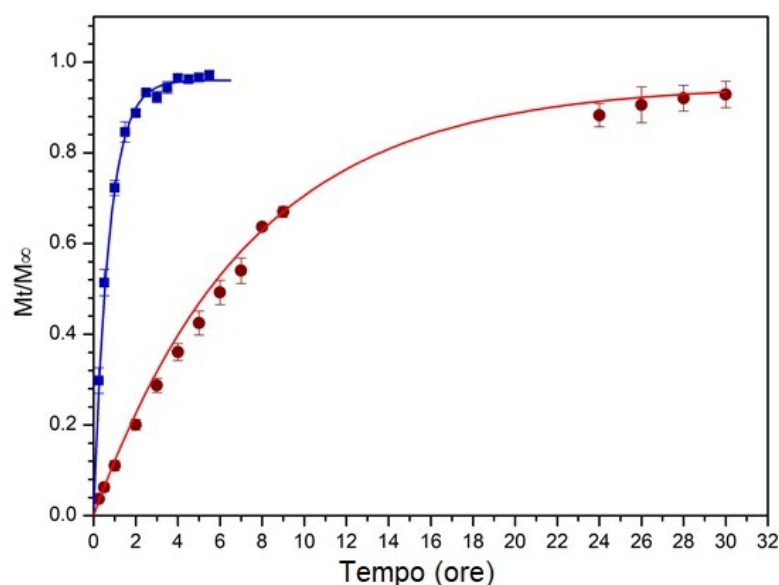


Figura 62. Frazione della dose di CPX rilasciata dal nanocomposito BioQ-CPX in funzione del tempo; Metodo: (■) dialisi; (●) cella di Franz. Media $\pm$ SE (n=3). Viene riportato il fitting con la cinetica del Primo Ordine (linee continue).

Dai risultati è possibile notare che, nonostante sia necessario che il nanocomposito richiami acqua per permettere all'antibiotico di solubilizzarsi e fuoriuscire dalla formulazione, già dai primi 30 minuti si riesce a quantificare il farmaco nel compartimento ricevente, il che suggerisce che la CPX sia uniformemente distribuita nel nanocomposito. Per studiarne la cinetica di rilascio sono stati applicati i modelli matematici riportati nella seguente **Tabella 33** considerando l'andamento dei punti sperimentali sia fino a 9 ore (corrispondenti a circa il 60% della dose rilasciata) che al completamento degli esperimenti (30 ore).

Tabella 33. Modelli matematici applicati per studiare il meccanismo di rilascio della CPX dal nanocomposito

Modelli matematici	Parametri dei fitting considerati		
	k	n	R^2
Ordine zero* $F = k_0 \times t$	0.079		0.99464
Primo ordine** $F = F_{max} \times (1 - e^{-k_1 \times t})$	0.13587		0.99767
Higuchi* $F = k_H \times t^{0.5}$	null		null
Korsmeyer-Peppas* $F = k_{KP} \times t^n$	0.1134	0.8280	0.99964
Korsmeyer-Peppas con T_{lag} * $F = k_{KP} \times (t - T_{lag})^n$	0.11131 ($T_{lag} = -0.031$)	0.8293	0.99959
* Fitting considerando i punti sperimentali fino a 9 ore ** Fitting considerando i punti sperimentali fino a 30 ore F= Frazione della dose (Mt/M∞) rilasciata al tempo t; F_{max} = Frazione della dose massima rilasciata al tempo t; k₁ = costante di rilascio del primo ordine, k_H = costante di rilascio di Higuchi; k_{KP} = costante di rilascio della cinetica Power Law; n è il parametro che indica il meccanismo di rilascio preponderante quando si applica la cinetica di Korsmeyer-Peppas.			

Dai risultati si evince che, quando viene considerato l'intero comportamento al rilascio (30 ore), il fitting con i modelli matematici menzionati evidenzia che la cinetica del primo ordine con F_{max} è il modello che descrive meglio il meccanismo di rilascio dell'antibiotico, facendo ipotizzare che il processo sembra essere primariamente governato dal gradiente di concentrazione della CPX. Ciò è probabilmente dovuto all'elevata solubilità in acqua del CPX che determina un'elevata concentrazione di farmaco nelle maglie della matrice di CTS. Tuttavia, considerando la prima parte del profilo di rilascio fino a 9 ore (**Figura 63**), il modello matematico che si adatta meglio è quello di Korsmeyer-Peppas avente il valore di "n" pari a 0.8280 che descrive meccanismi di rilascio di tipo anomalo. Questo risultato suggerisce che il rilascio della CPX sia governato da un processo non Fickiano dovuto alla compartecipazione sia di fenomeni diffusivi che di swelling nei quali, sia la velocità di diffusione del solvente che la variazione conformazionale della struttura matriciale del nanocomposito danno un contributo paragonabile (Siepmann & Siepmann, 2008). Poiché lo scheletro del nanocomposito è composto principalmente da CTS in cui la CPX è uniformemente distribuita, il suo rilascio potrebbe essere modulato dal rigonfiamento della matrice e quindi dalla velocità di ingresso del solvente. Infatti, farmaci incorporati in sistemi matriciali a base di Chitosano sono solitamente caratterizzati da profili a rilascio prolungato la cui velocità è determinata dal valore di pH del mezzo di dissoluzione, risultando più veloce a pH acidi rispetto valori neutri od alcalini (Oungbho & Müller, 1997). In conclusione, è possibile affermare che l'antibiotico viene rilasciato dal nanocomposito secondo un duplice meccanismo. Nelle prime fasi, la matrice comincia ad assorbire acqua dall'ambiente circostante fino a che il suo grado di swelling non si stabilizza, in questa fase il meccanismo di rilascio è ben descritto da una cinetica Power law. Successivamente il contributo diffusivo prevale.

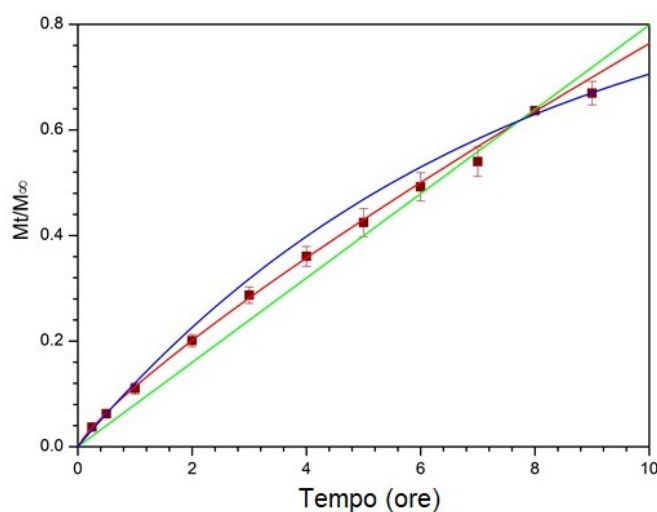


Figura 63. Frazione della dose di CPX rilasciata dal nanocomposito BioQ-CPX in funzione del tempo fino a 9 ore di esperimento e fitting con le equazioni cinetiche: primo ordine con $F_{\max}$ (curva blu), ordine zero (curva verde) e Korsmeyer-Peppas (curva rossa); media $\pm$ SE (n = 3).

Per eseguire gli studi di rilascio della QRC contenuta all'interno delle NLC, è stato messo a punto un differente setting sperimentale. Il presupposto di tale setting è che il nanocomposito, dopo l'applicazione *in vivo*, possa rilasciare simultaneamente sia l'antibiotico che le NLC cariche di QRC sulle mucose e/o nei tessuti con cui entra in intimo contatto. Tuttavia, la QRC è una molecola prevalentemente lipofila con una forte affinità verso i lipidi che costituiscono le NLC, e quindi risulta improbabile che avvenga il suo rilascio dalle nanoparticelle lipidiche verso l'ambiente acquoso. È plausibile, invece, che siano le NLC a diffondere dal nanocomposito e che queste, interagendo con i domini lipofili dei tessuti biologici, si ripartiscano nei tessuti rilasciando lì la QRC. Pertanto, per simulare tali condizioni, è stato messo a punto un modello bicompartimentale che utilizza un sistema Transwell, avente una membrana microporosa inerte con cut-off di 0.45 μm (per consentire la diffusione delle nanoparticelle) quale compartimento donatore, opportunamente modificato per essere immerso all'interno di un becker contenente 1-ottanolo come fluido ricevente. La scelta di questo specifico solvente lipofilo è duplice: da una parte è in grado di solubilizzare integralmente tutti i componenti della fase lipidica, compresa la QRC, e dall'altro è comunemente utilizzato nei test di rilascio *in vitro* per simulare le componenti lipidiche delle mucose e dei tessuti. Per promuovere lo swelling del campione BioQ-CPX nel compartimento donatore, questo è stato imbibito con 0.2 mL di tampone citrato pH 5.5, all'inizio di ogni esperimento. I risultati sono stati riportati come frazione della dose di QRC rilasciata in funzione del tempo, poiché è l'unico componente delle nanoparticelle rilevabile dalle analisi quantitative (**Figura 64**). È necessario sottolineare che durante tutta la durata degli esperimenti il volume totale del medium donatore e ricevente non variava, così come non erano visibili eventuali fenomeni di miscibilità tra di essi.

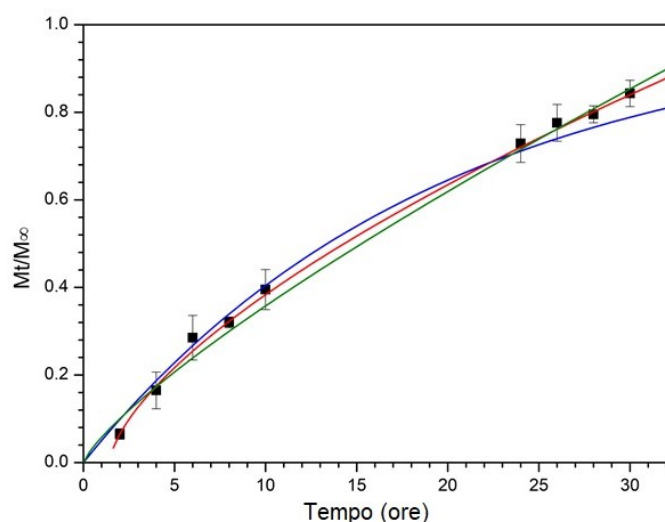


Figura 64. Frazione della dose di QRC rilasciata dal nanocomposito BioQ-CPX in funzione del tempo ed e fitting con le equazioni cinetiche: Primo ordine (curva blu), Korsmeyer-Peppas (curva verde) e Korsmeyer-Peppas con lag time (curva rossa); media $\pm$ SE (n = 3).

Per lo studio del meccanismo di rilascio delle NLC e conseguenzialmente della QRC, sono stati applicati gli stessi modelli matematici già osservati per lo studio cinetico della CPX, considerando in questo caso tutti i punti sperimentali (fino a 30 ore). I risultati sono riportati nella seguente **Tabella 34**.

Tabella 34. modelli matematici applicati per studiare il meccanismo di rilascio della QRC dal nanocomposito BioQ-CPX

Modelli matematici	Parametri dei fitting considerati		
	k	n	R^2
Ordine zero $F = k_0 \times t$	0.02997		0.96113
Primo ordine $F = F_{max} \times (1 - e^{-k_1 \times t})$	0.05179		0.98912
Higuchi $F = k_H \times t^{0.5}$	null		null
Korsmeyer-Peppas $F = k_{KP} \times t^n$	0.0578	0.79146	0.99021
Korsmeyer-Peppas con T_{lag} $F = k_{KP} \times (t - T_{lag})^n$	0.0947 ($T_{lag} = 1.440$)	0.6509	0.99934

F= Frazione della dose rilasciata al tempo t; F_{max} = Frazione della dose massima rilasciata al tempo t; k_1 = costante di rilascio del primo ordine, k_H = costante di rilascio di Higuchi; k_{KP} = costante di rilascio della cinetica Power Law; n è il parametro che indica il meccanismo di rilascio preponderante quando si applica la cinetica di Korsmeyer-Peppas.

Anche in questo caso si è osservato che il modello migliore per descrivere il rilascio della QRC è quello di Korsmeyer-Peppas, confermando l'influenza della matrice polimerica del

nanocomposito sul processo di liberazione dell'attivo, come già osservato per l'antibiotico. In particolare, aggiungendo anche il parametro di *lag time* nel modello di Korsmeyer-Peppas si apprezza un aumento nel coefficiente di correlazione. Il valore “*n*” ottenuto, pari a 0.6509, suggerisce un trasporto anomalo non Fickiano governato sia dal rigonfiamento che dalla diffusione, come già osservato per CPX. Tuttavia, a differenza della CPX che pur intrappolata nelle maglie del polimero era prontamente disponibile a solubilizzarsi e diffondere, il parametro di *lag time* evidenzia che le nanoparticelle lipofile, intrappolate tra le maglie del polimero, devono attendere che quest'ultimo richiami acqua e rigonfi per poter diffondere verso il compartimento accettore.

La capacità di QRC e CPX contenute nel nanocomposito di raggiungere il circolo sistemico e/o accumularsi nei tessuti bersaglio, è stata valutata *ex vivo* eseguendo degli studi di permeazione/accumulo in mucosa buccale porcina, usata quale modello poiché condivide con la mucosa umana alcune caratteristiche quali: morfologia, assenza di cheratinizzazione, spessore e contenuto lipidico (Marxen et al., 2016). Inoltre, grazie alla sua composizione, la mucosa buccale suina potrebbe essere utilizzata anche per mimare il tessuto dell'alveolo.

Quindi, gli esperimenti sono stati condotti utilizzando una cella a diffusione verticale di tipo Franz, caricando nel compartimento donatore BioQ-CPX imbibito in tampone citrato pH 5.5 per favorirne lo swelling e mantenere stabile la QRC per tutta la durata degli esperimenti. Il compartimento ricevente, invece, è stato riempito con tampone citrato pH 5.5 addizionato di β -CD (3% p/v), NAC (0.002% p/v) e acido acetico glaciale (0.1 v/v) per essere nelle condizioni in cui per entrambi gli attivi possano sussistere le condizioni *sink* e sia prevenuta la loro degradazione. Infatti, una bassa solubilità e/o stabilità degli attivi potrebbe compromettere gli esperimenti di permeazione, producendo risultati non veritieri. Poiché il nanocomposito mira a mantenere nei tessuti circostanti il sito di applicazione sia un ambiente asettico che con un basso contenuto di radicali liberi grazie al rilascio prolungato di entrambi gli attivi, la loro capacità di penetrare e accumularsi nella mucosa buccale suina è stata valutata a diversi intervalli di tempo (da 1 a 6 h; **Figura 65**).

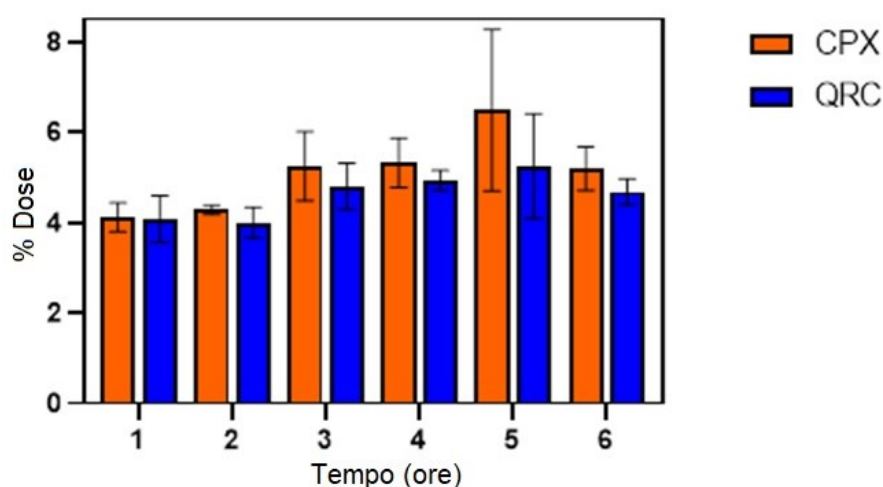


Figura 65. Percentuale della dose di CPX (arancione) e QRC (blu) accumulatasi in mucosa buccale porcina a differenti tempi; media $\pm$ SE (n = 6).

Dai risultati è possibile osservare come il nanocomposito sia in grado di favorire la ripartizione degli attivi nella mucosa, raggiungendo già dopo la prima ora di applicazione, un intrappolamento in mucosa di circa il 4% della dose applicata sia per QRC che per CPX. I due attivi hanno raggiunto il loro massimo di accumulo dopo le 5 ore (circa il 5% della dose), suggerendo una possibile saturazione della membrana nelle condizioni sperimentali selezionate (ad esempio, superficie di contatto, spessore della membrana). Tuttavia, non è stato possibile rilevare né QRC né CPX nel compartimento ricevente a qualsiasi tempo sperimentale considerato, indice di una attitudine all'accumulo in membrana piuttosto che ad una permeazione della stessa. Tali risultati si adattano perfettamente alle caratteristiche desiderate del nanocomposito, che potrebbe così essere efficacemente applicato sul tessuto lesa ed esercitare effetti locoregionali, grazie all'accumulo delle sostanze funzionali nei domini lipidici tissutali.

A causa della nota suscettibilità alla degradazione del QRC, sono state condotte ulteriori caratterizzazioni del nanocomposito, per verificare che durante le fasi di preparazione, che contemplano l'utilizzo di soluzioni acquose, alte temperature ed ultrasuoni, non abbiano in alcun modo intaccato le proprietà antiossidanti del flavonoide. A tale scopo, è stata valutata l'attività antiossidante di BioQ-CPX, utilizzando BioNLC-CPX come controllo negativo e la sola QRC come positivo, mediante il test di DPPH. I risultati sono stati riportati come percentuale di DPPH residua (RCD%) in funzione del tempo (**Figura 66**).

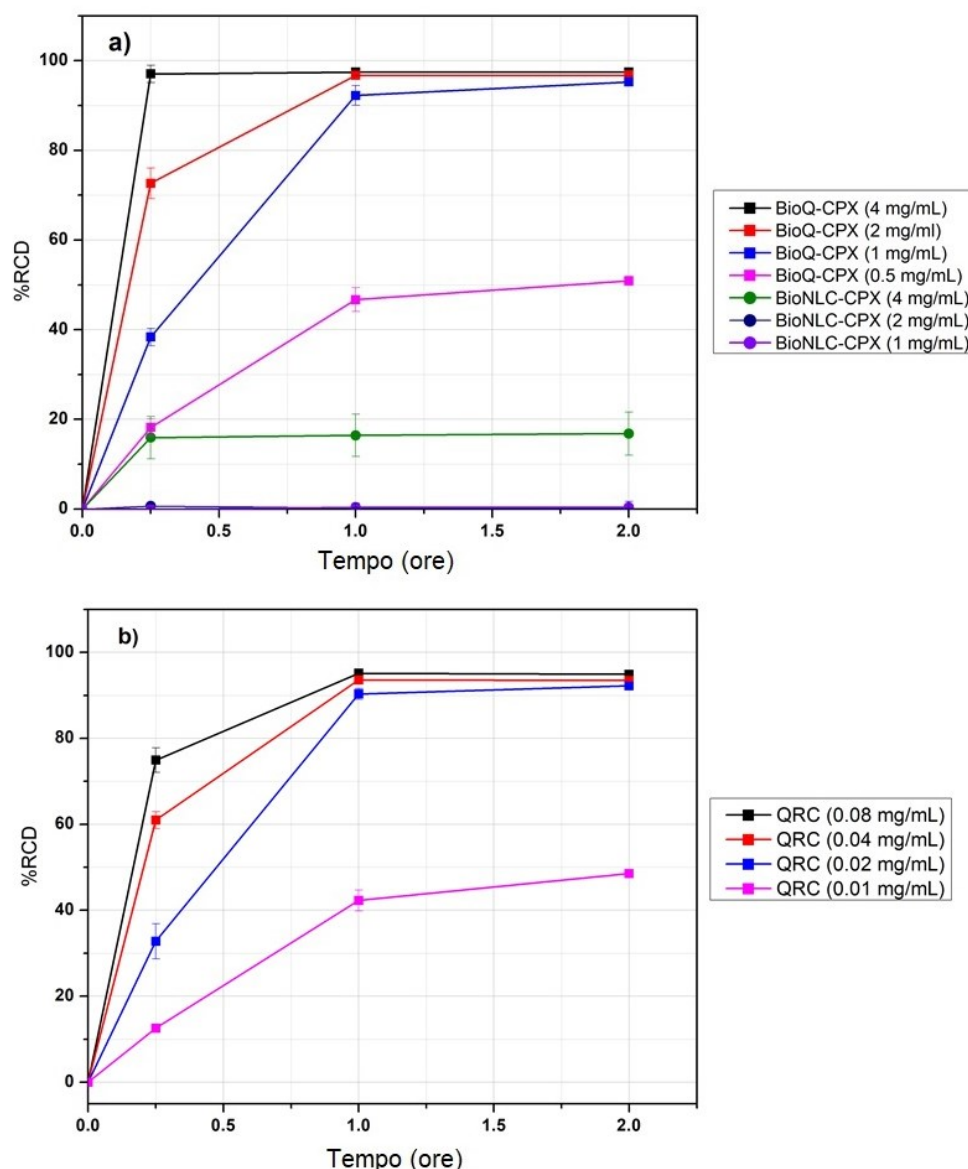


Figura 66. Percentuale di DPPH residua (%RCD) in funzione del tempo: **A)** BioQ-CPX a 4, 2, 1 e 0.5 mg/mL (quadrati) e BioNLC-CPX a 4, 2 e 1 mg/mL (cerchi); **B)** QRC pura a 0.08, 0.04, 0.02 e 0.01 mg/mL; Media $\pm$ SE (n = 3).

Sorprendentemente, i risultati hanno evidenziato che già il campione BioNLC-CPX possiede una debole attività antiossidante (%RCD = 16%) alla concentrazione più alta analizzata, probabilmente correlata alla presenza della NAC, LIM e GA nella formulazione, mentre nessuna evidente attività antiossidante è stata osservata a concentrazioni inferiori. Come previsto, la presenza di QRC all'interno delle NLC conferisce a BioQ-CPX un forte potere antiossidante dipendente dalla concentrazione di campione adoperato. Infatti, la dispersione contenente 4 mg/mL di BioQ-CPX è stata in grado di ridurre l'intera quantità di DPPH disponibile entro 15 minuti, mentre le dispersioni 2 mg/mL e 1 mg/mL, allo stesso time point, hanno raggiunto rispettivamente il 73 e il 38% di %RCD. Inoltre, tutte le concentrazioni testate al di sopra di 0.5 mg/mL hanno raggiunto il 100% di RCD entro 2 ore. Per la concentrazione più bassa di BioQ-CPX invece la %RCD osservata è stata del 18% a 15 min, raggiungendo il valore massimo (circa 50%RCD) alle 2 ore. Di contro, analizzando

una soluzione di QRC libera, alle stesse concentrazioni di quella presente nei nanocompositi, si evince che tutte le soluzioni raggiungono un massimo di attività dopo un'ora e che questa è del 90-95% di RCD per le soluzioni più concentrate e del 42% di RCD per la soluzione 0.01 mg/mL. Tuttavia, è possibile notare che dopo 15 minuti le proprietà antiossidanti di BioQ-CPX sono superiori rispetto al controllo positivo, questo suggerisce che da una parte non si sono verificati fenomeni di degradazione della QRC nel nanocomposito durante le fasi di preparazione e dall'altra che la presenza di altri componenti come il GA, la NAC e il LIM contribuiscono a fornire un effetto sinergico alle proprietà *scavenger* della QRC.

4.3.5 Valutazione delle proprietà antimicrobiche del nanocomposito

Le proprietà antimicrobiche del nanocomposito, che consente la co-somministrazione di CPX e QRC, sono state studiate mediante saggi microbiologici. Bisogna sottolineare che solo la quantità di principio attivo rilasciata dal sistema sarà in grado di esercitare attività antimicrobica. È noto, inoltre, che la CPX, essendo un antibiotico appartenente alla classe dei fluorochinoloni, è attivo contro batteri Gram-positivi come lo *Staphylococcus aureus* che sono microorganismi commensali della microflora del cavo orale (Murdoch et al., 2004). In pazienti anziani o affetti patologie parodontali, tali microrganismi tendono a prevalere su altri microbi (Friedlander, 2010). Inoltre, è stato riportato come batteri Gram-positivi presenti nelle tasche perimplantari più profonde svolgono un ruolo importante nel fallimento degli impianti dentali osteointegrati; fallimento che viene anche aggravato dall'elevata capacità degli stafilococchi di formare biofilm sui dispositivi medici (Song et al., 2013). Queste evidenze sottolineano la pericolosità degli stafilococchi negli ambienti ospedalieri, poiché ad essi è associata la diffusione delle infezioni orali nosocomiali (Rokadiya & Malden, 2008). Uno studio riportato da McCormack riporta che le specie di *Staphylococcus aureus* maggiormente isolate dalla cavità orale sono per il 90% ceppi meticillina-sensibili (MSSA), contro il 10% rappresentato da quelli meticillina-resistenti (MRSA) (McCormack et al., 2015). Il cavo orale rappresenta quindi un serbatoio di stafilococchi in grado di determinare infezioni crociate con successiva infezione di altre sedi anatomiche, specie se interessate da interventi chirurgici. Date queste premesse, il ceppo patogeno di *Staphylococcus aureus* MSSA ATCC 25923 è stato scelto come modello di batterio Gram-positivo, è stato quindi mantenuto in condizione di crescita planctonica e quindi sottoposto a trattamento con i campioni BioQ-CPX, BioQ e la sola matrice di CTS senza attivi (**Figura 67**).

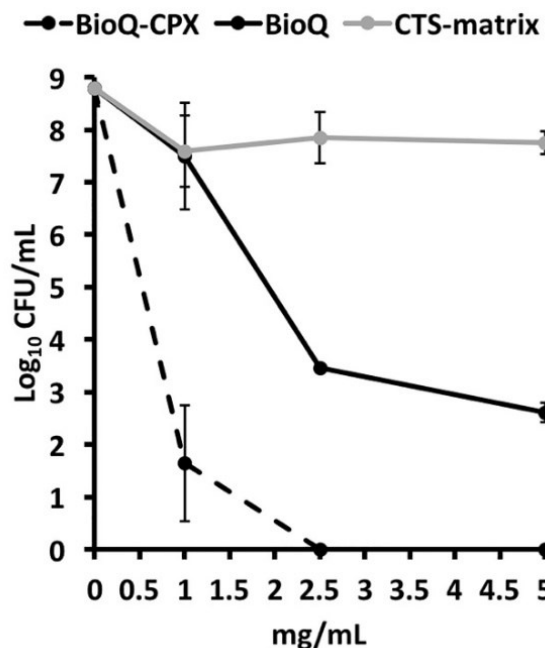


Figura 67. Attività antimicrobica di BioQ-CPX, BioQ e della matrice di CTS contro *S. aureus* ATCC 25923 cresciuto come cellule planctoniche in funzione delle concentrazioni applicate; media $\pm$ SE (n=3).

I risultati, espressi come unità formanti colonie in scala logaritmica (Log_{10} CFU/mL), hanno mostrato che la concentrazione di 1 mg/mL del nanocomposito completo (BioQ-CPX) è già sufficiente per ottenere una drastica riduzione della curva logaritmica di circa 7 unità. Un aumento della dose di BioQ-CPX fino a 2.5 mg/mL ha determinato un effetto letale del 100%. Per di più, la concentrazione più alta di BioQ (5 mg/mL), sebbene sia priva di antibiotico, ha comportato una riduzione di 6 unità logaritmiche, anche se non è riuscita a sopprimere completamente la proliferazione batterica. Una interpretazione dei risultati ottenuti può consistere nel fatto che i composti polifenolici possiedono una loro proprietà antibatterica intrinseca sia contro batteri Gram-positivi che -negativi quando somministrate da sole. Infatti, per fare un esempio, la QRC ha dimostrato possedere una concentrazione minima inibente la crescita microbica (MIC) compresa tra 0.1 e 0.6 mg/mL (Sanhueza et al., 2017), in linea con le concentrazioni valutate in questo studio (circa 0.1 mg/mL quella più alta sia per BioQ-CPX che per BioQ). Tuttavia, l'effetto letale di BioQ potrebbe dipendere dal veicolo ovvero dal lento rilascio di QRC dalle nanoparticelle lipidiche, migliorando quindi il suo targeting a livello cellulare. Pertanto, l'elevata efficacia del nanocomposito completo BioQ-CPX, rispetto a BioQ, potrebbe dipendere da un effetto sinergico tra QRC e CPX. Da un lato, la QRC può agire: i) influenzando la struttura della membrana citoplasmatica, portando alla perdita della sua integrità, aumentandone la permeabilità e dissipando il potenziale di membrana; ii) interferendo con la sintesi dello strato di peptidoglicano; iii) inibendo la sintesi dell'acido nucleico; iv) alterando i sistemi di trasporto cellulari (Xie et al., 2014). D'altra parte, utilizzando una tale formulazione, l'ingresso di CPX all'interno del citosol batterico aumenterebbe, facilitando l'azione del fluorochinolone a questo livello (cioè compromissione della replicazione del DNA), e consentendo potenzialmente la diminuzione del dosaggio dell'antibiotico, grazie all'effetto sinergico di composti naturali e sintetici.

Vale la pena ricordare che, sebbene la quantità più alta di CPX utilizzata (presente in 0.1 mg/mL di BioQ-CPX) sia da sola in grado di bloccare la crescita batterica, la sua somministrazione tal quale non servirebbe allo scopo di questo lavoro, che si basa sul design di un Drug Delivery System in grado di modulare la liberazione del farmaco nel tempo nel sito target, rappresentato dalla cavità alveolare, contestualmente all'installazione di un impianto dentale.

Infine, dai risultati è possibile osservare che anche la sola matrice di CTS, a basse dosi, ha determinato una diminuzione, seppur debole, di CFU/mL, agendo come batteriostatico. Infatti, il Chitosano possiede di per sé una debole proprietà antibatterica, il cui principale meccanismo si basa sulla sua natura poli-cationica che ne determina il legame con i gruppi carichi negativamente presenti sulla superficie della cellula batterica, compromettendone l'integrità strutturale. Inoltre, è stato dimostrato che il Chitosano può aderire al DNA batterico ostacolandone la replicazione cellulare (Nagy et al., 2011). Tuttavia, se si aumenta la concentrazione di Chitosano si assiste ad un comportamento inverso. Infatti, le molecole di polisaccaride possono rivestire la superficie cellulare batterica prevenendo la fuoriuscita di componenti cellulari e formando un guscio di repulsione tra le cellule, tale da preservarle dai fenomeni di agglutinazione e favorendone la sopravvivenza (Lim & Hudson, 2004). Per sostenere ulteriormente l'applicabilità di BioQ-CPX per il mantenimento delle condizioni di asepsi dei tessuti circostanti l'impianto, è stata valutata la capacità di questo nanocomposito di prevenire le infezioni contro ceppi di *Staphylococcus aureus* formanti biofilm, poiché quest'ultimo rappresenta il maggiore problema per i pazienti sottoposti a procedure chirurgiche odontoiatriche. A tal proposito, la maggior parte dei batteri presenta la capacità innata di colonizzare una vasta gamma di superfici con conseguente formazione di biofilm, che è un aspetto di estrema importanza per la salute umana, in particolare quando i biofilm contaminano strumenti che devono essere sterili, come apparecchiature per l'igiene dentale e dispositivi medici (Harrison et al., 2004). Inoltre, le cellule del biofilm sono circondate e protette da una sostanza polimerica extracellulare (EPS) che nel complesso fornisce stabilità alla comunità microbica e funge da protezione contro la maggior parte delle sostanze battericide, come è stato evidenziato anche dai risultati di questa ricerca, dove il solo antibiotico CPX non è stato in grado di inibire totalmente la formazione di biofilm di *Staphylococcus aureus* (**Figura 68**)

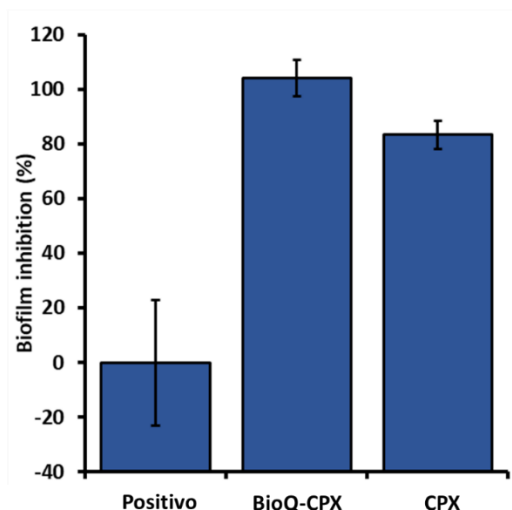


Figura 68. Attività di inibizione della formazione di biofilm da parte di BioQ-CPX e CPX (come riferimento) in cellule di *S. aureus* formanti biofilm. Media $\pm$ SE (n=3).

Di contro, il campione BioQ-CPX sembra inibire completamente la crescita del biofilm, probabilmente grazie all'azione sinergica della QRC presente nel nanocomposito. A supporto di questi risultati è stata investigata anche la capacità del nanocomposito di eradicare un biofilm preformato (**Figura 69**).

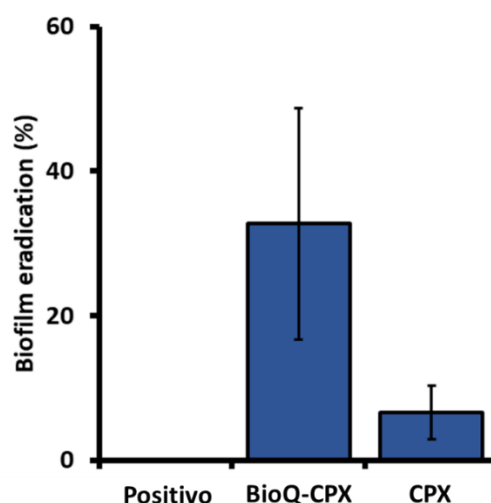


Figura 69. Attività di eradicazione di biofilm preformati da parte di BioQ-CPX e CPX (come riferimento) in cellule di *S. aureus* formanti biofilm. Media $\pm$ SE (n=3).

I risultati evidenziano che la sola CPX ha una bassa (circa 15%) abilità di eradicazione del biofilm preformato, mentre il nanocomposito BioQ-CPX, a parità di contenuto in antibiotico, aumenta di circa quattro volte la percentuale di biofilm eradicato. Tale risultato è supportato da alcuni dati di letteratura che riportano che la QRC può agire come *anti-quorum sensing* (il sistema di comunicazione cellula-cellula dietro la regolazione di importanti geni che codificano per fattori di virulenza, formazione di biofilm e resistenza agli antibiotici) contro il ceppo Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa*, interferendo con gli eventi di coordinamento che si verificano all'interno della comunità microbica regolandone la densità

di popolazione (Paczkowski et al., 2017). In un altro studio si sottolinea la capacità della QRC nel ridurre la produzione di EPS da parte di *S. epidermidis*, l'idrofobicità della superficie cellulare (cioè un fattore importante su cui si basa l'adesione cellulare), e l'*up-regulation* del gene *icaR* codificante per il repressore trascrizionale del locus *ica* (responsabile dell'adesione cellula-cellula), determinando la *down-regulation* di quest'ultima e riducendo la formazione di biofilm (Mu et al., 2021). Pertanto, sebbene gli esperimenti condotti su un singolo ceppo batterico non permettono di poter affermare con certezza le proprietà ad ampio spettro del nanocomposito, i promettenti risultati consentono di ipotizzare che la presenza nel nanocomposito di nanoparticelle lipidiche contenenti QRC potrebbe supportare un'attività multitarget contro altri ceppi batterici, anche se questo aspetto deve essere ulteriormente dimostrato. Indipendentemente da ciò, l'approccio tecnologico che combina QRC, incapsulata nelle NLC, e la CPX, uniformemente dispersa nella matrice di CTS, si completa in un nanocomposito che rilascia con successo le sostanze attive e previene la formazione di biofilm nell'ambiente circostante l'impianto dentale e/o si dimostra un ottimo strumento per rendere asettico il sito di applicazione della formulazione.

4.3.6 Stabilità del nanocomposito BioQ-CPX

Al termine delle caratterizzazioni tecnologiche e microbiologiche sono stati condotti ulteriori studi per valutare le proprietà stabilizzanti del nanocomposito nei confronti dei principi attivi in esso incapsulati.

Una prima analisi ha riguardato la valutazione della capacità fotoprotettiva del nanocomposito nei confronti della QRC in seguito ad esposizione luminosa, utilizzando la spettroscopia elettronica di risonanza paramagnetica (EPR). La spettroscopia EPR è una tecnica impiegata per rilevare e studiare molecole o materiali paramagnetici che contengono nella loro struttura elettroni spaiati (es. sostanze antiossidanti). Con questa tecnica è possibile ottenere informazioni sulle interazioni tra i nuclei atomici vicini all'elettrone spaiato, fornendo così informazioni sulla struttura, mediante il calcolo dei parametri restituiti dallo spettro EPR come: ampiezza picco-picco (Hpp), larghezza di linea (ΔB_{pp}) e fattore G. In particolare, l'ampiezza Hpp aumenta proporzionalmente all'aumentare della concentrazione del centro paramagnetico del campione, i fattori ΔB_{pp} e G dipendono dalla struttura molecolare del campione e dalle interazioni magnetiche nelle unità chimiche. Preliminarmente, il centro paramagnetico della QRC è stato caratterizzato prima e dopo l'esposizione ai raggi UV. Lo spettro EPR del QRC non irradiato (**Figura 70**-Linea continua) ha mostrato un singolo picco; l'ampiezza Hpp singoletto è stata calcolata sommando in valore assoluto il massimo e il minimo del picco, normalizzati alla massa, e corrispondente a 0.054 u.a., mentre il ΔB_{pp} corrispondente alla larghezza del singolo picco è risultata pari a 19 G. Il fattore G del picco è stato calcolato utilizzando la seguente equazione:

$$G = \frac{h * v}{\mu B * B}$$

dove h = costante di Planck, v = frequenza delle microonde, μB = Magnetone di Bohr e B = campo magnetico, ed è risultato pari a 2000.80. Lo spettro EPR ottenuto dopo 20 minuti di irraggiamento UV della QRC, utilizzando una lampada 50 W, ha mostrato un singoletto (**Figura 70**-Linea tratteggiata). Il ΔB_{pp} e il fattore G sono stati calcolati e corrispondevano allo stesso valore della QRC non irradiata. Il valore Hpp normalizzato alla massa è risultato uguale a 1.018 u.a. Questi risultati indicano che la radiazione UV ha causato un aumento del

segnale dello stesso centro paramagnetico con conseguente aumento del valore di H_{pp} , ma non è stata evidenziata alcuna creazione di nuovi centri paramagnetici sulla molecola, indicando pertanto che non si sono formate nuove specie chimiche.

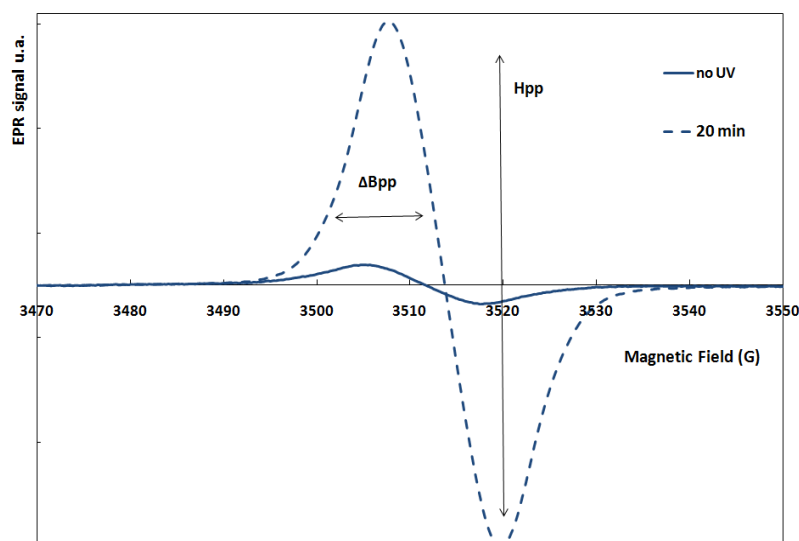


Figura 70. Spettri EPR di QRC non irradiati (**linea continua**) e dopo irraggiamento UV (50 W) per 20 min (**linea tratteggiata**) riportati in termini di parametri H_{pp} e ΔB_{pp} .

Successivamente, nello stesso modo sopradescritto sono stati registrati gli spettri EPR del nanocomposito BioQ-CPX irradiato e non irradiato UV (**Figura 71**). Entrambi gli spettri EPR hanno mostrato un singoletto; il ΔB_{pp} e il fattore G di entrambi i segnali sono stati calcolati e corrispondevano allo stesso valore della QRC pura, confermando che il centro paramagnetico della QRC non è stato modificato durante la preparazione dei nanocompositi. Il basso valore di H_{pp} di entrambi i picchi era probabilmente correlato alla quantità di QRC nel nanocomposito ($\approx 2,1\%$) piuttosto che a una riduzione della concentrazione dei centri paramagnetici.

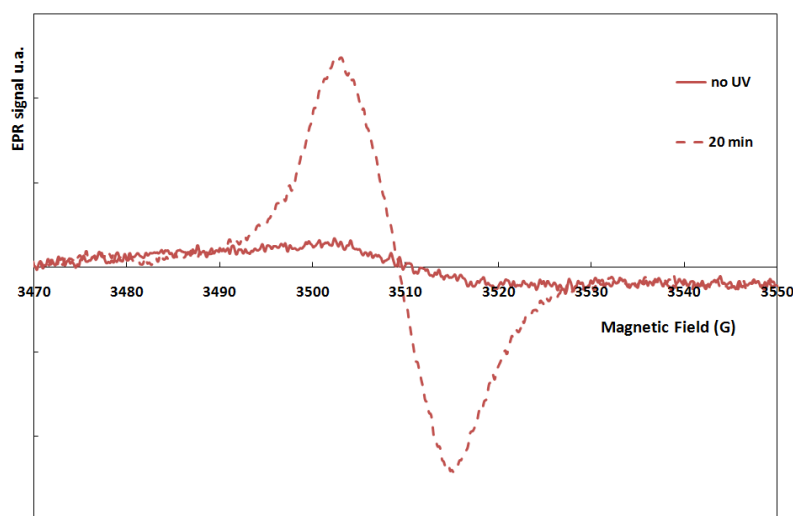


Figura 71. Spettri EPR di BioQ-CPX non irradiati (**linea continua**) e dopo irraggiamento UV (50 W) per 20 min (**linea tratteggiata**) riportati in termini di parametri H_{pp} e ΔB_{pp} .

Per valutare la validità del nanocomposito di preservare l'integrità strutturale della QRC in seguito a costante irradiazione luminosa, sono stati condotti ulteriori esperimenti sia sulla sostanza pura che sul campione BioQ-CPX. I campioni sono stati sottoposti ad irradiazione UV nel tempo e gli spettri EPR sono stati acquisiti ogni 5 minuti durante l'esposizione. La **Figura 72** mostra la relazione tra Hpp normalizzato alla massa di QRC ed il tempo di esposizione ai raggi UV rispettivamente di lampade da 25 W e 50 W. Dopo 5 min di irradiazione, i valori di intensità di Hpp ottenuti irradiando la QRC pura, utilizzando una lampada da 25 W o 50 W, non erano significativamente differenti con un andamento lineare crescente fino a 25 min di esposizione, e con una pendenza maggiore quando la QRC veniva esposta alla lampada da 50 W. Tuttavia, in entrambi i casi si raggiunge un plateau, che indica che la concentrazione dei centri paramagnetici disponibili non aumenta più dopo un certo tempo di esposizione agli UV, ovvero che la quantità di QRC disponibile per l'ossidazione (attività antiossidante) si è esaurita. Nelle stesse condizioni, l'intensità del segnale EPR di BioQ-CPX ha mostrato un andamento crescente, con una pendenza maggiore per il campione irradiato da una lampada da 50 W, come già visto negli esperimenti condotti sulla QRC da sola. Tuttavia, in questo caso, non è stato osservato alcun plateau fino a 60 minuti, evidenziando il progressivo aumento della concentrazione di centri paramagnetici, il che significa che la QRC caricata nel nanocomposito possiede ancora proprietà antiossidanti.

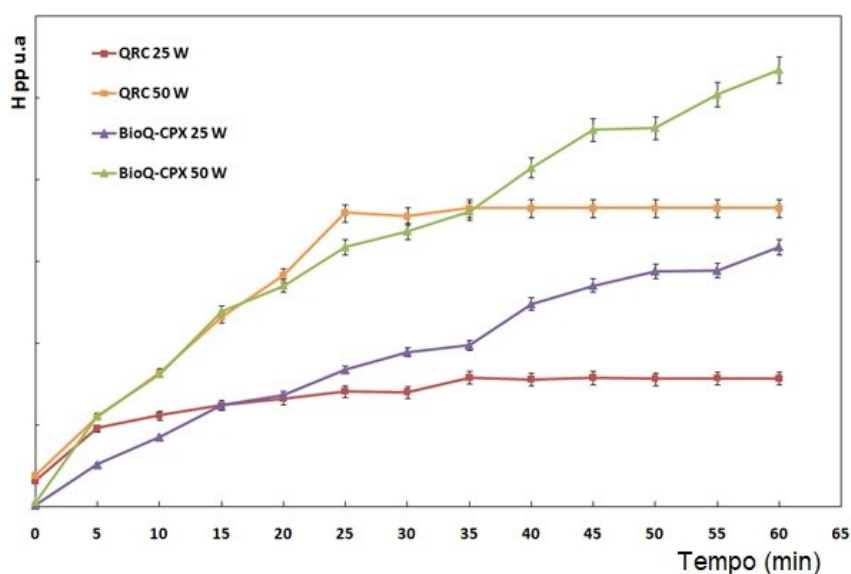


Figura 72. Valori Hpp in funzione del tempo di irradiazione UV (lampade da 25W e 50W) per QRC pura (**quadrati**) e nanocomposito BioQ-CPX (**triangoli**); media $\pm$ SE (n = 3)

Di conseguenza, questi risultati suggeriscono validità della strategia di incapsulare la QRC all'interno di un sistema nanocomposito per proteggerla dalla fotodegradazione.

Infine, è stata studiata la capacità del nanocomposito nel prevenire la degradazione dei principi attivi quando conservata a temperatura ambiente e a sottoposta alla luce naturale, monitorando per nove mesi il contenuto di QRC e CPX (**Figura 73**).

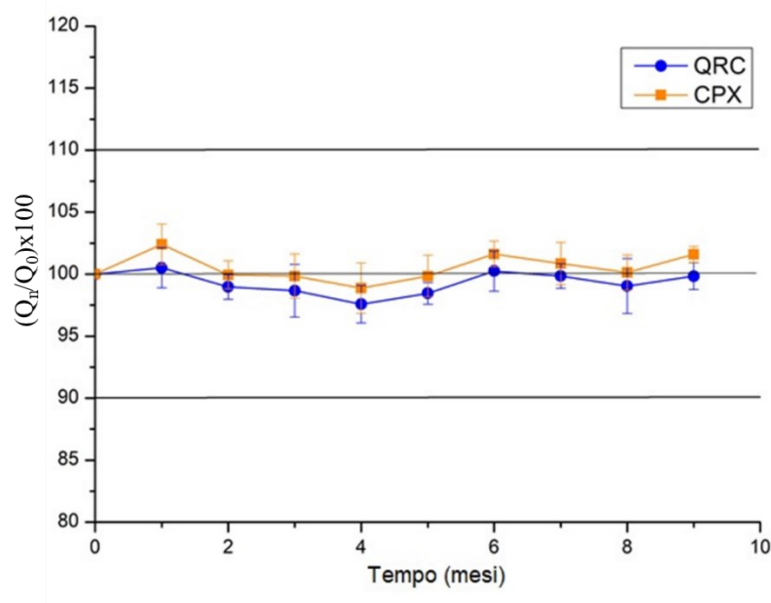


Figura 73. Percentuale residua del contenuto di CPX (■) e QRC (●) nel BioQ-CPX in funzione del tempo (mesi); media $\pm$ SE (n = 9).

I risultati evidenziano che il contenuto percentuale di entrambi gli attivi nel nanocomposito è compreso tra il 95 e il 105% per tutto l'intervallo di tempo considerato, confermando l'efficacia della formulazione nel preservare la stabilità chimica di QRC e CPX nel tempo. Questi dati di stabilità, insieme a quelli ottenuti in precedenza (es. studi di igroscopicità), permettono di concludere che il materiale proposto è un valido *carrier* per le sostanze funzionali considerate e si mantiene stabile per periodi prolungati.

4.4. Promozione dell'assorbimento sublinguale del Resveratrolo e realizzazione di microparticelle polimeriche mediante Spray Drying per la preparazione di mini-tablets sublinguali fast-dissolving

4.4.1. Valutazione della permeabilità sublinguale del RSV e utilizzo di *permeation enhancers* chimici

Il Resveratrolo (RSV) è una fitoalessina polifenolica appartenente alla famiglia degli stilbeni e generalmente presente in numerose fonti alimentari come l'uva rossa o le bacche. Grazie alla sua struttura molecolare è in grado di legare differenti biomolecole e di espletare, pertanto, un ampio spettro di effetti benefici (Gambini et al., 2015). Tuttavia, nonostante il suo elevato potenziale come molecola bioattiva utile nel trattamento/prevenzione di numerose patologie, il RSV è caratterizzato da proprietà chimico-fisiche sfavorevoli come elevata lipofilia (LogP = 3.1; PubChem), bassa solubilità in acqua (≈ 0.05 mg/mL) ed instabilità chimica se sottoposto a radiazioni UV, pH alcalini ed elevate temperature. Queste, insieme all'elevato metabolismo di primo passaggio epatico, determinano una bassa biodisponibilità a seguito di somministrazione orale (L. Almeida et al., 2009; Zupančič et al., 2015). Pertanto, è essenziale trovare nuove strategie di somministrazione per beneficiare del potenziale terapeutico di RSV. In particolare, la mucosa sublinguale potrebbe essere un'interessante via di somministrazione alternativa in quanto consente l'assorbimento diretto nella circolazione sistemica, bypassando il metabolismo di primo passaggio epatico ed aumentando così la biodisponibilità. La mucosa sublinguale è un tessuto sottile, non cheratinizzato, caratterizzato da un'elevata area superficiale (26.5 ± 4.2 cm² se si considera la somma della superficie ventrale della lingua con il pavimento buccale) e da un ampio afflusso di sangue che potrebbe assicurare un rapido effetto del farmaco ed alte concentrazioni plasmatiche (Alali et al., 2021). Per questo motivo sono stati condotti studi *ex vivo* per verificare l'attitudine del RSV ad attraversare la mucosa sublinguale. Come già enunciato nei precedenti capitoli, una strategia ampiamente utilizzata per valutare la permeabilità di un principio attivo attraverso una membrana/tessuto biologico prevede l'uso di un modello a due compartimenti aperto quale le celle di diffusione verticali di tipo Franz. Per il loro utilizzo è essenziale selezionare accuratamente i fluidi da utilizzare quale accettore e donatore. A tal proposito, precedenti studi hanno confermato la possibilità di utilizzare il tampone citrato pH 5.5 per stabilizzare il RSV e le β -ciclodestrine (β -CD) al 3% (p/v) per promuoverne la solubilità (Angellotti et al., 2020). Tuttavia, dispersioni di β -CD in tampone citrato a queste concentrazioni tendono nel tempo a precipitare se non mantenute sotto costante agitazione e, pertanto non risultano idonee ad essere impiegate quale fluido donatore, mentre si prestano bene quale fluido accettore nelle celle di Franz. Di conseguenza, quale *medium* alternativo in grado di solubilizzare bene il RSV e di mantenerlo stabile per tutta la durata degli esperimenti, è stata proposta una miscela di tampone citrato a pH 5.5 e PEG200, poiché è ben documentata l'elevata solubilità del RSV nei PEG (Robinson et al., 2014). L'impiego di una miscela tampone citrato pH 5.5 e PEG 200 80:20 (v/v) permette di ottenere soluzioni di RSV molto concentrate (1 mg/mL), necessarie per garantire e mantenere il gradiente di concentrazione necessario a supportare il processo di permeazione nel tempo. Per validare l'utilizzo della miscela proposta, sono stati condotti studi di stabilità del RSV in assenza o in presenza di N-acetilcisteina (NAC), impiegata quale documentato antiossidante con significative capacità di protezione dei polifenoli (vedi paragrafo 4.3.1).

Per valutare l'eventuale formazione di prodotti di degradazione, i campioni provenienti dagli studi di stabilità sono stati analizzati sia mediante spettrofotometria UV-Vis che a mezzo di HPLC-DAD. Come riportato in **Figura 74**, il RSV rimane stabile in entrambi i *media* per tutto il tempo considerato (6 h) e, di conseguenza, la miscela senza NAC è stata selezionata come liquido donatore per gli studi di permeazione *ex vivo*.

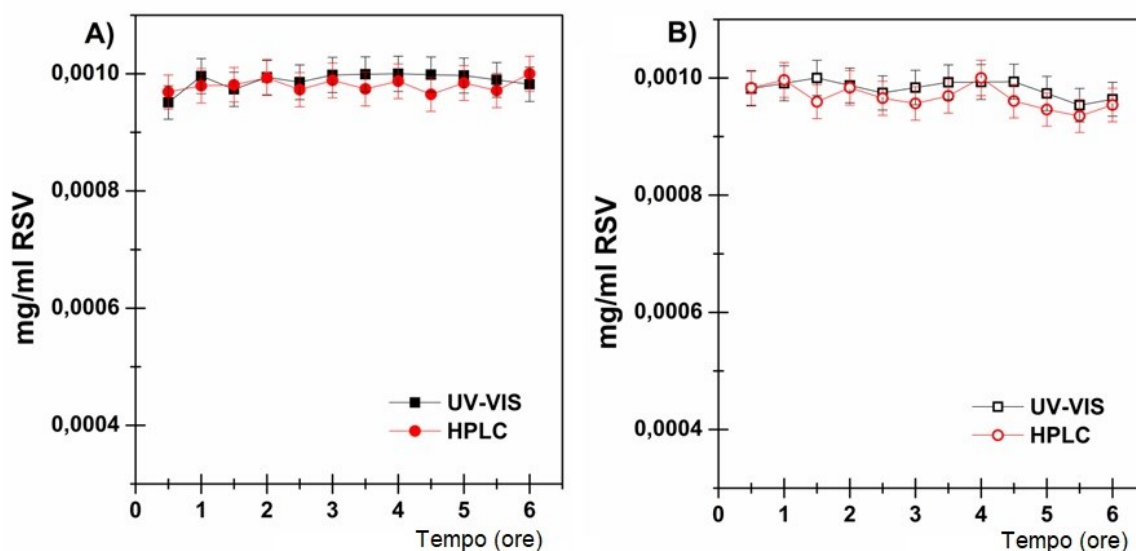


Figura 74. Concentrazione del RSV in tampone citrato pH 5.5 e PEG200 80:20 (v/v) in assenza (pannello A) e in presenza (pannello B) di N-Acetilcisteina, nel tempo, condotti mediante analisi UV-VIS e HPLC. Media $\pm$ SE (n=3)

Una volta selezionati gli opportuni solventi per entrambi i compartimenti della cella di Franz si è proceduto ad investigare sulla permeabilità del RSV da solo ed in presenza di *chemical permeation enhancer* (CPE). A tal fine sono stati selezionati sei molecole, appartenenti a classi diverse e impiegate in rapporto 5:1 (p/p) con il RSV. I CPE sono largamente utilizzati poiché capaci di modificare temporaneamente la struttura idrolipidica di mucose e tessuti, favorendo in questo modo la permeabilità delle sostanze funzionali (Hassan et al., 2009). I CPE selezionati per questi esperimenti sono: il Sodio Dodecilsolfato (SDS), il Sodio Deidrocolato (SDC), il Transcutol[®] (T), la Lisina monocloridrato (LYS), l'Urea (U) e il Mentolo (M).

Il Sodio dodecilsolfato (SDS) (**Figura 75**) è un tensioattivo anionico comunemente utilizzato nell'industria cosmetica e farmaceutica per promuovere la solubilità e l'assorbimento di sostanze funzionali attraverso la pelle o le mucose gastrointestinali. È costituito da una coda idrofoba a 12 atomi di carbonio esterificata con un gruppo solfato idrofilo e si presenta come una polvere bianca cristallina molto solubile sia in acqua che in etanolo. Il suo possibile meccanismo da *enhancer* è dovuto alla capacità di alterare la struttura dei lipidi extracellulari (Sandri et al., 2020).

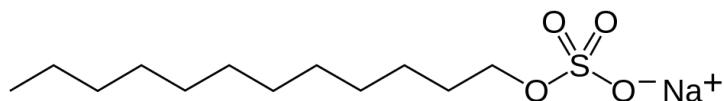


Figura 75. Struttura chimica del Sodio dodecilsolfato

Il Sodio deidrocolato (SDC) (**Figura 76**) appartiene alla classe dei sali/acidi biliari, molecole anfifiliche costituite da una struttura a base steroidea, poiché sintetizzati a partire dal colesterolo. Grazie alla loro elevata biocompatibilità sono utilizzati come *enhancer* per la somministrazione di farmaci attraverso molteplici vie di somministrazione. Il meccanismo d'azione dell'SDC è molteplice ed è legato alla capacità di solubilizzare le proteine di membrana, di interagire con la componente lipidica delle membrane e di formare micelle inverse che aumentano reversibilmente la fluidità delle membrane apicali e basolaterali (Moghimipour et al., 2015).

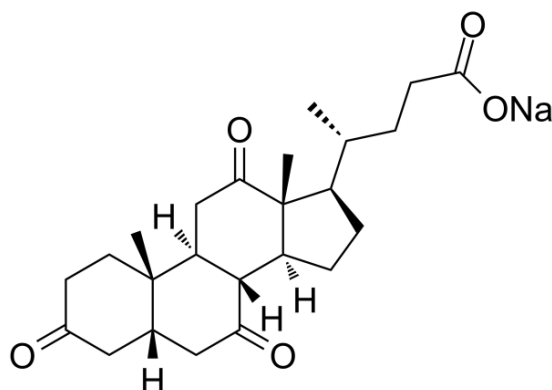


Figura 76. Struttura chimica del Sodio deidrocolato

Il Transcutol® (T) (**Figura 77**) anche noto come etere monoetilico di glicole dietilenico è un liquido limpido caratterizzato da bassa viscosità, stabilità a pH 4-9 e odore gradevole. Agisce come *enhancer* aumentando la solubilità del farmaco all'interno delle membrane biologiche mediante modulazione del coefficiente di partizione degli attivi piuttosto che col diretto aumento della permeabilità (Osborne & Musakhanian, 2018).

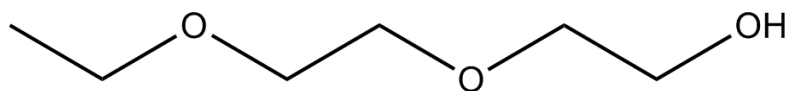


Figura 77. Struttura chimica del Transcutol®

La Lisina monoclorigrato (LYS) (**Figura 78**) è un aminoacido cationico che appartiene ai venti aminoacidi essenziali ed è quindi una molecola biocompatibile, sicura e non tossica. Il suo meccanismo *enhancer* è dovuto principalmente all'instaurarsi di interazioni ioniche con i gruppi carichi delle mucose. Inoltre, la LYS potrebbe sfruttare le proteine trasportatrici degli aminoacidi e di conseguenza favorire la permeazione delle sostanze attive attraverso gli strati epiteliali (Morales & Brayden, 2017).

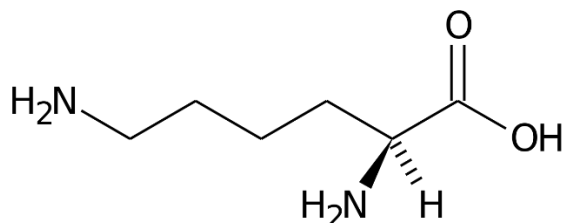


Figura 78. Struttura chimica della lisina

L'Urea (U) (**Figura 79**) è un composto organico biocompatibile che si presenta come un solido cristallino incolore. Numerosi studi ne hanno descritto la capacità di *enhancer* legata al suo potere altamente idratante (capacità di richiamare e trattenere l'acqua). Inoltre, l'urea è anche in grado di aumentare la fluidità del doppio strato fosfolipidico senza modificare l'integrità dei domini proteici di membrana (Dodla & Velmurugan, 2013).

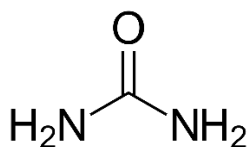


Figura 79. Struttura chimica dell'urea

Infine, il Mentolo (M) (**Figura 80**) appartiene alla famiglia dei terpeni, sostanze comunemente conosciute come efficaci *enhancer*. Il meccanismo di azione dei terpeni è principalmente legato alla loro struttura chimica e alle loro proprietà fisico-chimiche. In particolare, il mentolo è in grado di aumentare l'interazione con le funzioni lipofile delle membrane ed è utile anche come agente aromatizzante, aumentando così la compliance dei pazienti (Ahad et al., 2015).

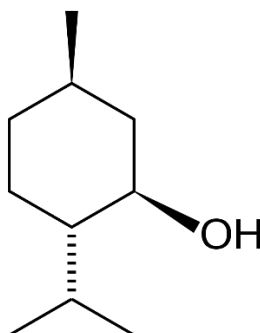


Figura 80. Struttura chimica del mentolo

I dati dei test di permeazione sono riportati graficamente come quantità di RSV permeata per unità di superficie permeata in funzione del tempo (**Figura 81**), mentre i dati di accumulo in mucosa sono riportati come quantità di RSV in membrana al termine del test (**Figura 82**).

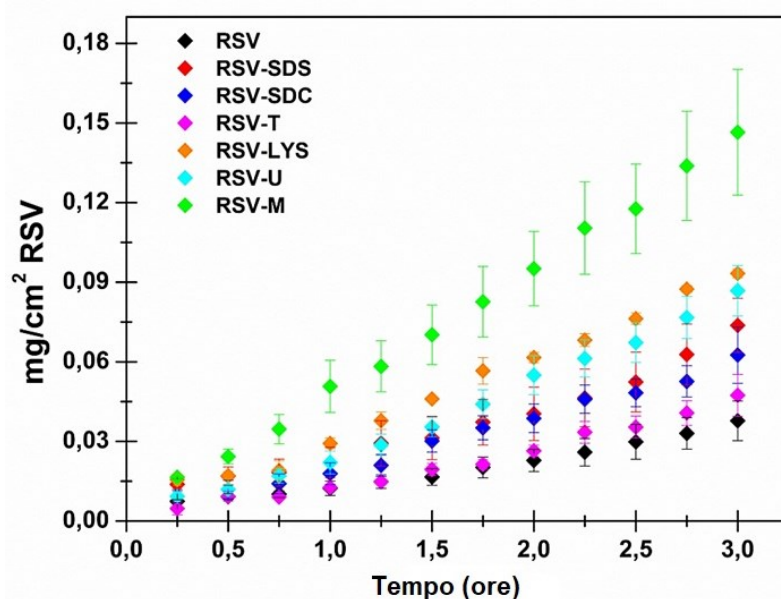


Figura 81. Studi di permeazione sublinguale *ex vivo* in assenza e in presenza di diversi CPE: mg/cm² di RSV permeati in funzione del tempo (ore) dopo somministrazione di una soluzione di solo RSV (nero) e in presenza di SDS (rosso), SDC (blu), Transcutol® (rosa), Lisina Monocloridrato (arancione), Urea (azzurro) e Mentolo (verde) in rapporto 5.1 (p/p) con il RSV. Media $\pm$ SE (n=6)

Tutti i dati sperimentali sono stati inoltre ulteriormente elaborati per calcolare i parametri farmacocinetici riportati in **Tabella 35**.

Tabella 35. Parametri biofarmaceutici (J_s , K_p , t_{lag} , De e $Ac \pm SE$) calcolati prendendo in considerazione il profilo di permeazione/accumulo del RSV in assenza ed in presenza dei CPE.

Campione	J_s (mg/cm ² · h ⁻¹) = K_p (cm/h) *	t_{lag} (min)	De (mg/cm ²) = Ac (cm)*
RSV	0.01376 $\pm$ 0.00311	19 min	0.02271 $\pm$ 0.00554
RSV+T	0.01829 $\pm$ 0.00347	29 min	0.03086 $\pm$ 0.00883
RSV+SDC	0.02139 $\pm$ 0.00401	11 min	0.08435 $\pm$ 0.00922
RSV+SDS	0.02718 $\pm$ 0.00286	26 min	0.04108 $\pm$ 0.00510
RSV+U	0.03226 $\pm$ 0.00220	22 min	0.03203 $\pm$ 0.00622
RSV+LYS	0.03247 $\pm$ 0.00067	5 min	0.03384 $\pm$ 0.01013
RSV+M	0.04780 $\pm$ 0.00896	-	0.03472 $\pm$ 0.00553
* $J_s=K_p$ e $De=Ac$ perché $C_d=1$ mg/ml			

Com'è possibile osservare tutti gli *enhancer* promuovono la permeazione del RSV attraverso la mucosa secondo il seguente ordine di "efficacia": RSV < RSV+T < RSV+SDC < RSV+SDS < RSV+U < RSV+LYS < RSV+M. Nel dettaglio, le soluzioni contenenti il T mostravano il più basso valore di flusso (0.01826 mg/cm² h⁻¹), mentre quando si utilizzava il M il flusso aumenta di circa 4 volte rispetto a quello ottenuto caricando una soluzione di

solo RSV (0.04780 vs 0.01376 mg/cm²h⁻¹ rispettivamente). Anche LYS e U mostrano comunque significative proprietà *enhancer*, tra di loro comparabili.

Gli *enhancers* scelti sono in grado anche di incrementare l'accumulo tissutale del RSV (**Figura 82**), sebbene in questo caso i risultati migliori siano stati ottenuti con l'SDC, il quale è in grado di quadruplicare la quantità di RSV ritenuta all'interno della mucosa sublinguale rispetto a quella intrappolata a seguito di valutazione della soluzione controllo di solo RSV. Tutti gli altri *enhancers* considerati, tenendo presente i valori di errore standard, danno invece risultati tra di loro comparabili.

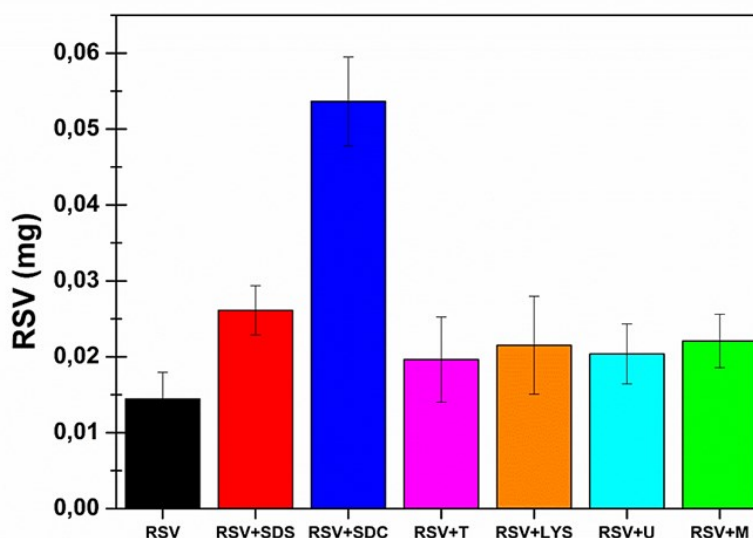


Figura 82. Quantità di RSV (mg) ritenuti in membrana al termine dei test di permeazione *ex vivo* dopo somministrazione nel compartimento donatore di soluzioni di RSV in assenza (nero) o in presenza di SDS (rosso), SDC (blu), transcutol® (rosa), lisina (arancione), urea (azzurro) e mentolo (verde). Media $\pm$ SE (n=6)

I parametri biofarmaceutici calcolati riflettono, ovviamente, i dati sperimentali già discussi e riportati in forma grafica. Tuttavia, è necessario fare alcune osservazioni sui valori di *lag time*. In primis va sottolineato che il termine *lag time* generalmente indica il tempo necessario affinché l'attivo arrivi al compartimento donatore. In questo contesto sperimentale, tuttavia, questo termine viene usato in modo improprio poiché, anche ai primissimi time points, è rilevabile e detectabile una seppur minima quantità di RSV. Con il termine *lag time*, in questo caso, viene indicato, infatti, il tempo necessario affinché il sistema raggiunga il cosiddetto “stato stazionario”. A tal proposito è possibile osservare che all'aumentare del flusso di RSV in presenza degli *enhancers* utilizzati, diminuisce proporzionalmente il valore di *lag time* fino ad osservare, nel caso di M, il più alto valore di flusso e l'assenza di *lag time*. Tuttavia, l'SDC rappresenta l'eccezione nel seguire questa proporzionalità inversa tra i due parametri. I risultati sono comunque tra di loro estremamente coerenti: è infatti possibile supporre che i migliori *permeation enhancers* modifichino più velocemente e in maniera più significativa il tessuto consentendo il raggiungimento dello steady state in tempi minori. Osservando i valori di RSV accumulato in membrana, è da osservare che l'SDC produce il più elevato accumulo, pertanto è ipotizzabile che l'SDC, viste le sue dimensioni molecolari, possieda un differente

meccanismo di *enhancement*, che in questo contesto determina una maggiore affinità del RSV per la membrana, rendendola un reservoir di attivo, ma non dà un significativo contributo alla permeazione.

4.4.2 Preparazione delle microparticelle cariche di RSV tramite Spray Drying

Vista la intrinseca capacità del RSV di permeare la mucosa sublinguale ed accumularvisi, e visto che è possibile aumentarne la permeabilità usando opportuni permeation/penetration *enhancers*, al fine di proteggere e rendere somministrabile il RSV, questo è stato intrappolato all'interno di un sistema matriciale sotto forma di microparticelle polimeriche ottenute mediante l'utilizzo della tecnica dello Spray Drying. L'incapsulazione del RSV all'interno di microparticelle risponde alle necessità di migliorarne la solubilità e ritardarne la degradazione, rendendolo idoneo alla somministrazione per via sublinguale. Inoltre, poiché un opportuno sistema *carrier* per veicolare gli attivi attraverso le mucose del cavo orale dovrebbe essere maneggevole ma, al contempo, resistente e stabile, dotato di opportune proprietà di mucoadesione ed in grado di rilasciare le sostanze incapsulate in maniera prestabilita e riproducibile, l'ottenimento di una buona polvere può rivelarsi lo step intermedio per la formulazione di un *Adhesive Drug Delivery System* (ADDS) sottoforma di mini-tablets sublinguali. L'identificazione e la messa a punto di strategie tecnologiche innovative volte ad aumentare la biodisponibilità del RSV potrebbe avere un ruolo chiave nel renderlo un efficace coadiuvante al trattamento convenzionale dell'osteonecrosi della mascella, come è stato provato da studi *in vitro* ed *in vivo* (Movahedian Attar et al., 2020; Murgia et al., 2019).

Il fattore chiave nella produzione di appropriate formulazioni solide sublinguali è partire da una polvere omogenea; quindi, la tecnica di atomizzazione mediante Spray Drying si sposa perfettamente con questo obiettivo. A tal fine sono state preparate quattro diverse polveri variando il rapporto in peso tra gli eccipienti ma mantenendo fissa la percentuale di RSV (15% p/p), come riportato nel paragrafo **3.2.4.4, Tabella 10**. In particolare, gli eccipienti utilizzati sono stati il PVP K90, il PEG 200, il sorbitolo ed il glicole propilenico. Il componente principale delle formulazioni proposte è il PVP K90, già ampiamente discusso nel paragrafo **4.1.3** per le sue proprietà mucoadesive, la sua abilità nel creare strutture matriciali, la possibilità di essere soggetto a compressione diretta così come la capacità di stabilizzare le forme solide delle molecole bioattive nello stato amorfo. Per promuovere la solubilizzazione del RSV nell'ambiente buccale, è stato scelto il PEG 200 come ulteriore polimero da aggiungere alla formulazione. I PEG (**Figura 83**) sono caratterizzati da elevata flessibilità strutturale (senza alcun impedimento sterico), biocompatibilità ed elevata capacità di idratazione. Inoltre, i PEG sono polimeri biodegradabili usati come solubilizzanti/stabilizzanti nonché per le loro capacità di aumentare la biodisponibilità dei farmaci grazie al loro consolidato profilo di sicurezza, tanto da essere stati approvati dalla FDA. In questo caso è stato scelto il PEG 200, liquido a temperatura e pressione ambiente, per un auspicabile duplice effetto in termini sia di incremento della solubilità del RSV, come riportato in letteratura e come precedentemente osservato sperimentalmente, sia per la sua capacità mucoadesiva che si somma a quella del PVP K90 (D'souza & Shegokar, 2016; Roy et al., 2012).

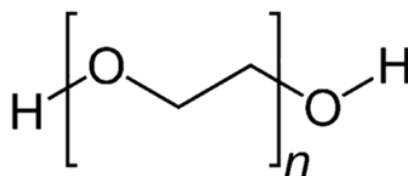


Figura 83. Struttura chimica del Polietilenglicole

Una caratteristica fondamentale delle mini-tablets sublinguali è la rapida disintegrazione una volta a contatto con la saliva. Per questo motivo è significativo il ruolo dell'agente disintegrante che, in questo lavoro, è il sorbitolo. Il sorbitolo (**Figura 84**) è l'alditolo del glucosio, una molecola idrofila in grado di attrarre e trattenere acqua, determinando così la rapida disgregazione delle forme di dosaggio nel sito di applicazione, anche in presenza di scarse quantità di fluido, favorendo in questo modo un'elevata concentrazione *in situ* dell'attivo. Trova largo impiego nell'industria alimentare per il suo potere dolcificante (circa il 60% del potere edulcorante del saccarosio) e per il suo ruolo di stabilizzante e di agente lievitante. Le sue interessanti proprietà lo rendono molto utile anche in campo farmaceutico per la produzione di mini-tablets sublinguali a rapida disintegrazione e per conferire caratteristiche organolettiche gradevoli alle formulazioni destinate alla somministrazione sulle mucose del cavo orale (Dinge & Nagarsenker, 2008).

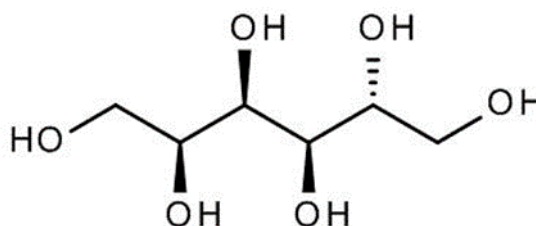


Figura 84. Struttura chimica del Sorbitolo

Infine, la formulazione RSV-D è stata ulteriormente addizionata di glicole propilenico o 1,2-propandiolo (**Figura 85**). Si tratta di un liquido inodore, incolore e viscoso, caratterizzato da sapore dolciastro, elevata igroscopicità e miscibilità con diversi solventi. Trova largo impiego in campo alimentare, cosmetico e farmaceutico come additivo, plasticizzante, umettante e solubilizzante. In questo contesto, è stato selezionato in quanto può agire come co-solvente per aumentare la solubilità del RSV in sinergia con il PEG200 (Barel et al., 2014).

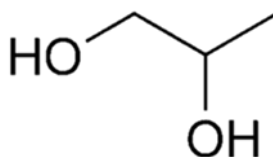


Figura 85. struttura chimica del glicole propilenico

Il razionale adottato nella modulazione della composizione quali-quantitativa delle polveri preparate è di più semplice comprensione se si prendono in considerazione i risultati ottenuti in ordine temporale: la formulazione RSV-A è considerata la composizione base; RSV-B è

caratterizzata dalla maggiore quantità di sorbitolo a discapito del PVP K90, al fine di massimizzare la velocità di disgregazione del ADDS; RSV-C possiede la maggiore quantità di PEG200 necessaria per promuovere la creazione di un microambiente nel sito di applicazione nel quale il RSV è molto solubile; infine RSV-D include il glicole propilenico, al fine di valutare se la presenza di due co-solventi migliorasse le performance della formulazione risultante. I parametri operativi da attenzionare durante il processo di Spray Drying sono fondamentali per ottenere un prodotto valido, secco, facilmente lavorabile e riproducibile. In particolare, la temperatura di inlet è stata impostata a 110°C per favorire la completa evaporazione del solvente durante il processo, poiché nonostante l'etanolo puro evapora a circa 78°C quest'ultimo può contenere tracce di acqua. Infatti, essendo un solvente molto igroscopico può assorbire l'umidità ambientale durante la preparazione dei campioni. Inoltre, nel caso delle polveri contenenti la LYS quest'ultima essendo poco solubile in etanolo viene aggiunta come soluzione acquosa. Il flusso di soluzione è stato impostato a 100 mL/h poiché a velocità superiori si osservavano goccioline di solvente nel ciclone con conseguente ottenimento di polveri umide. A seguito del processo di Spray Drying le quattro diverse composizioni hanno prodotto polveri aventi caratteristiche differenti. In particolare, RSV-A (**Figura 86-A**) e RSV-B risultano polveri soffici, leggere e voluminose mentre dalle composizioni RSV-C (**Figura 86-B**) e RSV-D si ottengono polveri molto fini e dense.

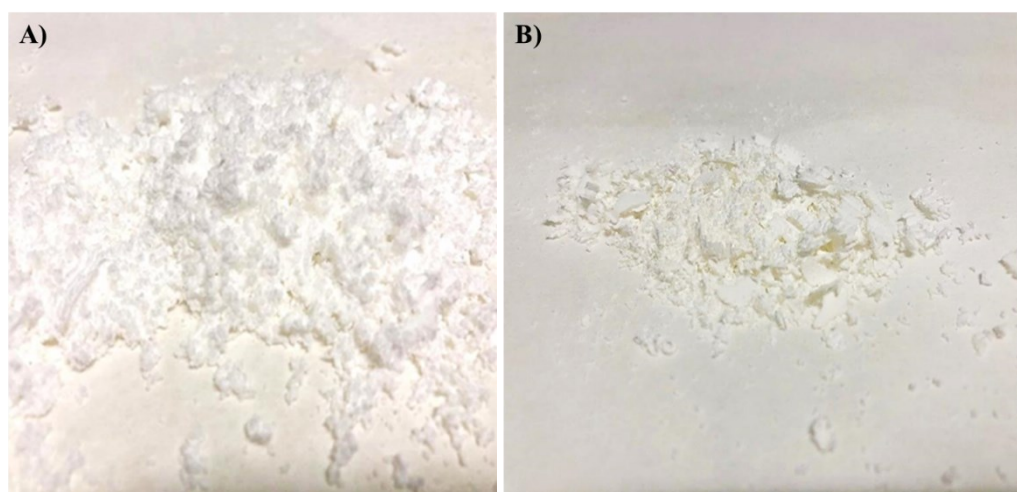


Figura 86. Aspetto delle polveri ottenute mediante *Spray Drying*: **A)** formulazione RSV-A e **B)** RSV-C.

Per validare il metodo di preparazione, ciascuna polvere è stata immediatamente caratterizzata in termini di resa %, Drug loading % (DL%) e Loading Efficacy % (LE%) (**Tabella 36**).

Tabella 36. Caratterizzazione delle polveri ottenute tramite *Spray Drying*: resa percentuale, DL% e LE%. I risultati sono espressi come media $\pm$ SE di 3 lotti

formulazione	Resa %	DL%	LE%
RSV-A	76.0 $\pm$ 2.06 %	16.54 $\pm$ 1.06 %	110.29 $\pm$ 7.09 %
RSV-B	82.0 $\pm$ 1.58 %	11.06 $\pm$ 0.67 %	73.71 $\pm$ 4.50 %
RSV-C	64.4 $\pm$ 1.95 %	15.41 $\pm$ 0.44 %	102.73 $\pm$ 2.95 %
RSV-D	67.6 $\pm$ 2.12 %	15.67 $\pm$ 0.33 %	102.44 $\pm$ 2.22 %

I risultati riportati in tabella evidenziano subito l'importante dato della resa del prodotto, la quale è mediamente di circa il 70% (p/p), indice che parametri strumentali sono stati ottimizzati. Infatti, secondo quanto riportato in letteratura, uno dei maggiori svantaggi della tecnica di *Spray Drying* è la bassa resa (20-70%) dovuta alla perdita di prodotto sulle pareti della camera di essiccazione e alla scarsa capacità del ciclone di separare particelle fini inferiori a 2 μ m (Sosnik & Seremeta, 2015). Inoltre, i risultati ottenuti in termini di DL% e LE% confermano la riproducibilità del metodo di preparazione e l'omogeneità di ciascun campione (errore standard molto piccolo). È importante puntualizzare che le analisi quantitative del RSV sono state condotte mediante HPLC-DAD poiché tale metodo ha permesso di dimostrare che, nonostante il carattere termolabile del RSV e l'esposizione alla temperatura di 110°C necessaria per il processo di *Spray Drying*, il RSV non ha subito alcuna degradazione. Infatti, nei cromatogrammi (dati non riportati) si evince l'assenza di alterazioni (es. cambiamenti di forma del picco o di tempo di ritenzione) e/o formazione di prodotti di degradazione valutati nel range di 200-700 nm (C. G. Silva et al., 2013).

Le polveri ottenute sono state, quindi, compattate al fine di ottenere delle mini-tablets sublinguali (Figura 87), risultate omogenee in termini di peso e quantità di attivo, confermando la riproducibilità del metodo di preparazione (Tabella 37).



Figura 87. Aspetto delle mini-tablets sublinguali cariche di Resveratrolo

Tabella 37. Caratterizzazione delle mini-tablets sublinguali cariche di RSV in termini di peso e contenuto di RSV. I dati sono espressi come media $\pm$ SE (n=6)

Mini-tablets	Peso (mg)	Contenuto di RSV (mg)
RSV-A	29.96 $\pm$ 0.38	4.96 $\pm$ 0.06
RSV-B	30.60 $\pm$ 0.47	3.28 $\pm$ 0.05
RSV-C	30.59 $\pm$ 0.12	4.71 $\pm$ 0.02
RSV-D	30.82 $\pm$ 0.40	4.74 $\pm$ 0.06

È stata, quindi, valutata l'efficacia delle mini-tablets sublinguali così ottenute studiando il profilo di permeazione sublinguale e l'accumulo tissutale del RSV quando esse venivano poste nel compartimento donatore delle celle di Franz. Gli studi *ex vivo* sono stati condotti in analogia a quelli già discussi per la valutazione dei CPE ponendo, però, nel compartimento donatore un ridotto volume di tampone citrato pH 5.5 (300 μ L) al fine di mimare le condizioni in vivo. Inoltre, poiché non va dimenticata la bassissima solubilità in ambiente acquoso di RSV, la concentrazione dello stesso nel fluido donatore è stata valutata sperimentalmente alla fine di ogni esperimento di permeazione. Ciò ha permesso, da un lato di valutare se a seguito di incapsulazione all'interno delle microparticelle polimeriche, fosse aumentata la solubilità del RSV, e dall'altro di calcolare correttamente i parametri K_p e A_c , in quanto essi sono normalizzati alla concentrazione di attivo nel compartimento donatore. In aggiunta, al termine di ciascun esperimento di permeazione, le mini-tablets sono state sottoposte a analisi visiva e tattile. Come previsto, al variare dei rapporti in peso tra i vari eccipienti delle quattro polveri preparate, sono stati ottenuti differenti risultati. In particolare, le mini-tablets di RSV-A hanno assorbito una quota di acqua senza però disgregarsi, ma diventando gommose, simili alle gomme da masticare; le mini-tablets di RSV-B si mostravano completamente disintegrate e tale fenomeno è avvenuto già quando nel compartimento donatore è stato caricato il medium acquoso (esse contengono la più alta quantità di sorbitolo), in ultimo, le mini-tablets di RSV-C e RSV-D sono risultate solo parzialmente disintegrate ed i residui di materiale solido erano estremamente friabili al tatto. I risultati dei test di permeazione ed accumulo sono mostrati graficamente in **Figura 88** (nel pannello A è riportato il profilo di permeazione del RSV; nel pannello B il coefficiente di permeabilità K_p ; nel pannello C il coefficiente di accumulo A_c) mentre i parametri biofarmaceutici ad essi connessi sono riportati in **Tabella 38**.

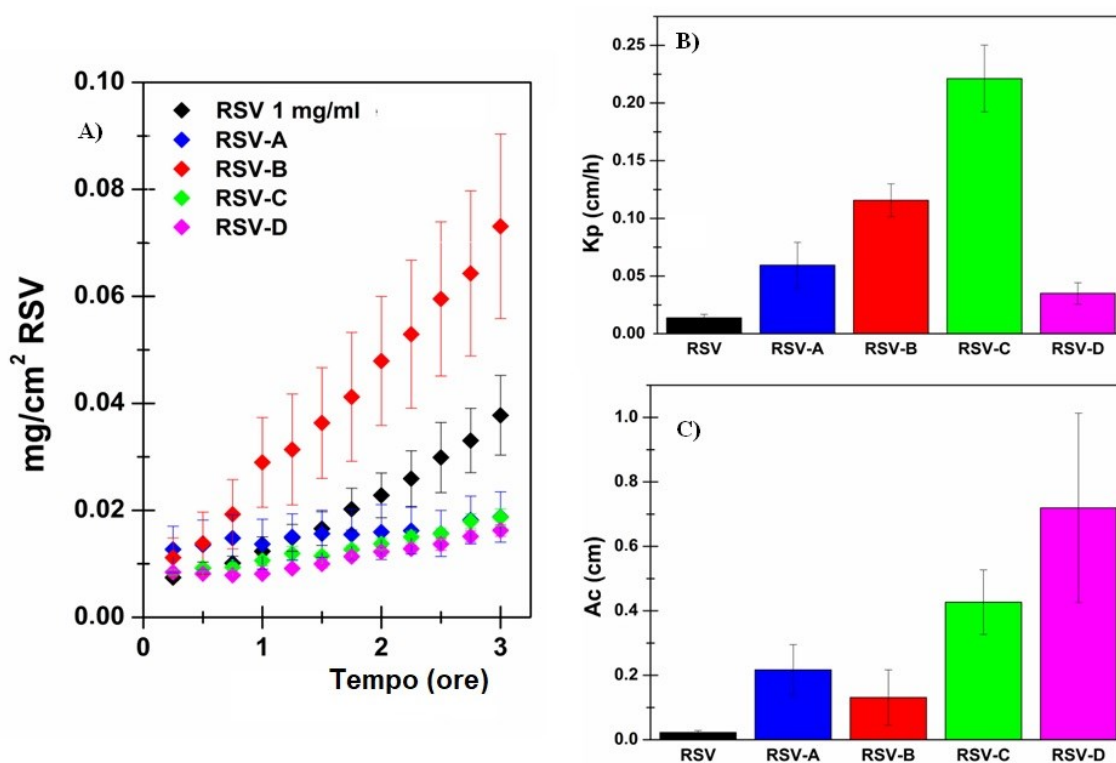


Figura 88. A) Profili di permeazione del RSV (mg/cm^2) permeato in funzione del tempo (ore) dalle mini-tablets sublinguali; B) Coefficiente di Permeabilità (K_p) e C) accumulo (A_c), determinati dopo l'applicazione di: una soluzione RSV 1 mg/ml (nero), mini-tablet RSV-A (blu), mini-tablet RSV-B (rossa), mini-tablet RSV-C (verde) e mini-tablet RSV-D (rosa); media $\pm$ SE ($n = 6$)

Tabella 38. Parametri biofarmaceutici (J_s , K_p , t_{lag} , De , A_c e concentrazione di RSV nel compartimento donatore) calcolati prendendo in considerazione il profilo di permeazione/accumulo del RSV. Media $\pm$ SE ($n = 6$)

Campioni	J_s ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$)	K_p (cm/h)	t_{lag} (min)	De ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	A_c (cm)	$[\text{RSV}]_{\text{DONOR}}$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
RSV	13.76 ± 3.11	0.01376 ± 0.00311	19	22.71 ± 5.54	0.02271 ± 0.00554	1 (STD)
RSV-A	1.95 ± 0.64	0.05944 ± 0.01981	NO	7.12 ± 1.58	0.21702 ± 0.07829	32.74 ± 4.60
RSV-B	22.26 ± 4.78	0.11566 ± 0.01422	NO	25.19 ± 9.36	0.13087 ± 0.08584	192.44 ± 37.40
RSV-C	3.70 ± 0.35	0.22115 ± 0.02894	NO	7.13 ± 1.07	0.42688 ± 0.09983	16.71 ± 2.17
RSV-D	3.95 ± 0.55	0.03502 ± 0.00932	NO	81.18 ± 5.22	0.71939 ± 0.29361	112.85 ± 16.76

Innanzitutto, è possibile sottolineare che tutte le formulazioni proposte risultano in grado di promuovere la permeazione sublinguale e l'accumulo tissutale del RSV, seppur con delle importanti differenze. Inoltre, tutte le formulazioni comportano il raggiungimento dello steady state immediatamente come evidenziato dalla completa assenza del fenomeno del *lag time*. In accordo con quanto visivamente osservato, la formulazione RSV-B, che è l'unica in grado di disintegrarsi completamente, determina la più alta concentrazione di RSV nel compartimento donatore ($192.44 \pm 37.40 \mu\text{g/mL}$), ben più alta della solubilità in acqua del RSV ($50 \mu\text{g/mL}$). La formulazione in oggetto si conferma, quindi, come *solubility enhancer* dello stilbene. Ancora più rilevante è il valore di flusso ottenuto applicando la mini-tablet di RSV-B che è il più alto tra tutte le formulazioni valutate ($22.26 \pm 4.78 \mu\text{g/cm}^2 \text{h}^{-1}$), e che, ancora più importante, è di 1.6 volte superiore a quello ottenuto somministrando una soluzione di RSV alla concentrazione di 1 mg/mL : questo dato è estremamente significativo se si considera che la concentrazione di RSV nel compartimento donatore (forza motrice dei fenomeni di permeazione) somministrando la mini-tablet RSV-B è di circa 5 volte inferiore rispetto alla soluzione di RSV di riferimento. Coerentemente con quanto visivamente osservato alla fine degli esperimenti, RSV-C e RSV-D hanno mostrato valori di flusso simili, mentre RSV-A determina il flusso più basso, pari a $1.95 \pm 0.64 \mu\text{g/cm}^2 \text{h}^{-1}$. Tuttavia, per una valutazione più accurata, poiché i valori di concentrazione di RSV registrati alla fine di ogni esperimento erano diversi al variare della formulazione applicata, si è preferito considerare i parametri di K_p e A_c , i quali sono indipendenti dalla concentrazione del donatore. Analizzando questi valori, è evidente che tutte e quattro le formulazioni proposte sono in grado di agire sia come *enhancer* di permeazione che di penetrazione, poiché incrementano sia i valori di K_p che di A_c rispetto a quelli ottenuti analizzando la soluzione di RSV di riferimento. In particolare, RSV-B e RSV-C determinano i valori di K_p più elevati; $0.11566 \pm 0.01422 \text{ cm/h}$ e $0.22115 \pm 0.02894 \text{ cm/h}$, rispettivamente contro $0.01376 \pm 0.00311 \text{ cm/h}$ della soluzione di RSV. Questi risultati sono particolarmente soddisfacenti, soprattutto se confrontati con quelli ottenuti utilizzando i CPE poiché, in questo caso si ottiene un incremento di almeno un ordine di grandezza. I risultati fin qui ottenuti hanno validato la possibilità di promuovere con un innovativo approccio tecnologico, la permeazione sublinguale di RSV. Il quadro dei risultati ottenuti concorre a delineare la possibilità di promuovere con tale approccio tecnologico, da un lato, una buona compliance del paziente, e dall'altro di garantire un buon flusso di RSV nel circolo sistemico e quindi il potenziale successo terapeutico. Infatti, i dati sperimentali ottenuti possono tradursi, *in vivo*, in una pronta disgregazione delle mini-tablets nel fluido salivare, con conseguente creazione di una soluzione altamente concentrata di RSV al livello di tutta la superficie ventrale della lingua e del pavimento buccale, che è sicuramente più estesa di quella valutabile *ex vivo* [circa 26.5 cm^2 in vivo (Collins & Dawes, 2016)] e di conseguenza un rapido e massivo assorbimento del RSV a livello plasmatico.

Con l'obiettivo di trarre vantaggio sia da tale innovativo approccio tecnologico orientato al design di formulazione aventi intrinseche proprietà di *permeation enhancer*, che da un approccio orientato all'impiego di efficienti CPE, sono state ulteriormente prodotte microparticelle polimeriche contenenti anche i CPE nella loro composizione. A tale scopo sono state selezionate le due formulazioni migliori (RSV-B ed RSV-C) ed i migliori CPE (M, LYS e U) al fine di preparare altre cinque polveri, da compattare per ottenere nuove

mini-tablets sublinguali. Le loro composizioni sono riportate nel paragrafo 3.2.4.4, **Tabella 11**.

La prima differenza significativa riscontrata tra le polveri ottenute mediante Spray Drying contenenti i CPE e le loro corrispondenti senza CPE è l'aspetto. Infatti, la presenza degli *enhancer* chimici, anche in piccola quantità (1–3% p/p), le ha rese più coese e compatte. Le caratteristiche delle nuove polveri e delle rispettive mini-tablets ottenute sono state valutate in analogia a quanto precedentemente descritto ed i risultati sono riportati in **Tabella 39**. Anche in questo caso è stato validato il metodo di preparazione e ne è stata confermata la riproducibilità.

Tabella 39. Caratterizzazione delle polveri ottenute dal processo spray-drying contenenti i CPE (resa %, DL% e LE%) e delle corrispondenti mini-tablets sublinguali (peso e contenuto di RSV). Media $\pm$ SE (n=6)

Campioni	Polveri ottenute per spray-drying			Mini-tablets	
	Resa%	DL%	LE%	Peso (mg)	RSV (mg)
RSV-B/M-3	73.2 $\pm$ 1.56	13.40 $\pm$ 0.34	89.33 $\pm$ 2.27	30.43 $\pm$ 0.60	4.08 $\pm$ 0.08
RSV-B/LYS-3	74.8 $\pm$ 2.21	15.15 $\pm$ 1.41	101.02 $\pm$ 9.39	31.18 $\pm$ 1.07	4.72 $\pm$ 0.16
RSV-B/U-3	75.4 $\pm$ 1.74	15.03 $\pm$ 0.76	100.22 $\pm$ 5.07	30.20 $\pm$ 0.38	4.58 $\pm$ 0.06
RSV-B/U-1	83.2 $\pm$ 1.22	11.02 $\pm$ 1.33	73.47 $\pm$ 8.87	29.11 $\pm$ 0.31	4.41 $\pm$ 0.05
RSV-C/LYS-3	73.2 $\pm$ 1.63	15.75 $\pm$ 1.70	105.00 $\pm$ 11.33	31.38 $\pm$ 0.60	4.75 $\pm$ 0.09

È stata, quindi, nuovamente valutata l'efficacia delle mini-tablets sublinguali così ottenute studiando il profilo di permeazione sublinguale e l'accumulo tissutale del RSV quando esse venivano poste nel compartimento donatore delle celle di Franz (**Figura 89**).

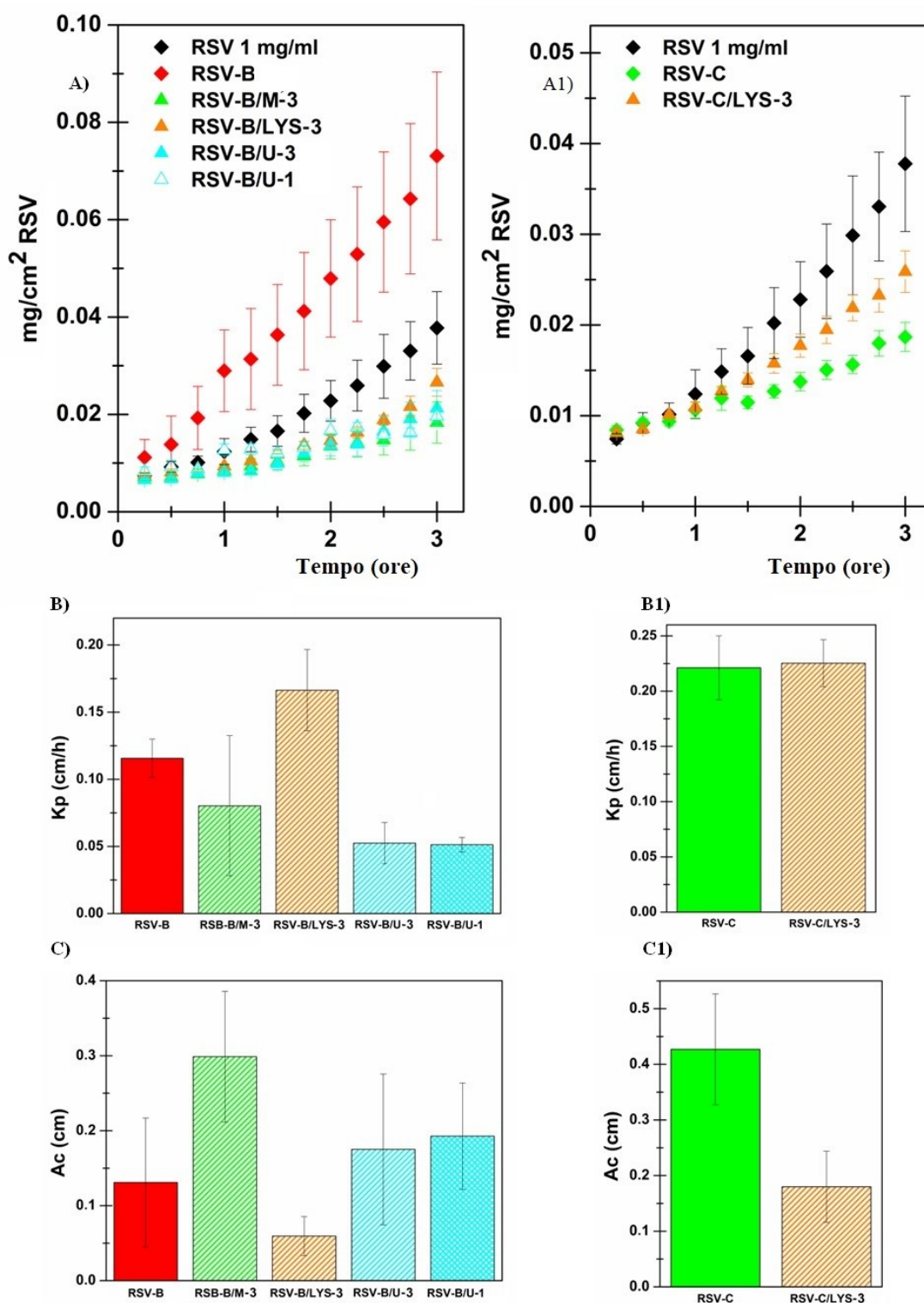


Figura 89. A) e A1) Profilo di permeazione del RSV (mg/cm^2) permeato in funzione del tempo (ore) dalle mini-tablets; B) e B1) Coefficiente di permeabilità (K_p); C) e C1) Accumulo (A_c), calcolati dopo la somministrazione di: soluzione RSV 1 mg/ml (nero), mini-tablet RSV-B paragonata a RSV-B caricata con CPE (A, B, C), mini-tablet RSV-C paragonata a RSV-C caricata con CPE (A1, B1, C1); media $\pm$ SE (n= 6)

Non sorprende che le variazioni osservate in termini di aspetto delle polveri abbiano determinato comportamenti diversi in termini di disintegrazione e permeazione. In particolare, le mini-tablets contenenti i CPE mostrano solo una parziale disgregazione al

termine dei test di permeazione. Ciò ha comportato concentrazioni di RSV nel compartimento donatore inferiori a quelle osservate ad esempio per RSV-B, con conseguenti valori di flusso, K_p e Ac inferiori o, al più, inalterati (**Figura 89** e **Tabella 40**) rispetto a quelli delle corrispondenti formulazione prive di *enhancer* chimici.

Tabella 40. Parametri biofarmaceutici (J_s , K_p , t_{lag} , De , Ac e concentrazione di RSV nel compartimento donatore) calcolati prendendo in considerazione il profilo di permeazione/accumulo del RSV dopo l'aggiunta dei CPE nelle mini-tablets. Media $\pm$ SE (n= 6)

Campion i	J_s ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot$ h^{-1})	K_p (cm/h)	De ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Ac (cm)	$[\text{RSV}]_{\text{DONOR}}$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
RSV- B/M-3	3.84 $\pm$ 1.6 1	0.08023 $\pm$ 0.0522 5	14.28 $\pm$ 3.2 1	0.29870 $\pm$ 0.0872 1	0.04782 $\pm$ 0.00656
RSV- B/LYS-3	7.96 $\pm$ 1.0 0	0.16635 $\pm$ 0.0302 2	2.84 $\pm$ 1.00	0.05941 $\pm$ 0.0258 6	0.047894 $\pm$ 0.0082 5
RSV- B/U-3	7.17 $\pm$ 1.7 7	0.05240 $\pm$ 0.0153 6	23.94 $\pm$ 6.7 8	0.17504 $\pm$ 0.1006 1	0.13676 $\pm$ 0.04163
RSV- B/U-1	3.82 $\pm$ 0.1 8	0.05127 $\pm$ 0.0054 7	14.36 $\pm$ 4.9 1	0.19267 $\pm$ 0.0710 4	0.07455 $\pm$ 0.00835
RSV- C/LYS-3	7.40 $\pm$ 0.9 6	0.22531 $\pm$ 0.0212 3	5.90 $\pm$ 2.16	0.17979 $\pm$ 0.0639 6	0.03283 $\pm$ 0.00444

L'apparente ridotta efficacia dei CPE quando inseriti nelle formulazioni, piuttosto che quando usati in soluzione insieme al RSV, potrebbe essere dovuto a diversi fattori. Pertanto sono state formulate le seguenti considerazioni: il M è una molecola lipofila ed insolubile nelle soluzioni acquose ed è pertanto plausibile che, alle condizioni sperimentali adottate, non si sia solubilizzato, rendendo nullo il suo contributo o addirittura aumentando presumibilmente la lipofilia della polvere prodotta con conseguente riduzione della sua capacità di disgregazione; la scarsa efficacia della LYS è probabilmente legata alla sua dissociazione pH-dipendente; infine, gli infruttuosi risultati ottenuti dalla mini-tablet contenente U potrebbero essere giustificati dalle elevate forze di coesione tra le microparticelle della polvere ottenuta, dovute alle proprietà umettanti dell'urea che richiamando acqua agisce da legante. È comunque opportuno osservare che tutte le formulazioni contenenti i CPE sono state in grado di migliorare la permeabilità sublinguale del RSV puro in soluzione, ma la loro presenza ha influito negativamente sulle ottime prestazioni delle formulazioni prive di CPE.

Questi risultati, sfortunatamente, precludono la possibilità di sfruttare congiuntamente le comprovate proprietà dei CPE e l'innovativo metodo dello Spray Drying.

In conclusione, la composizione capace di fornire i migliori risultati in termini di parametri biofarmaceutici è RSV-B (**Figura 90**).

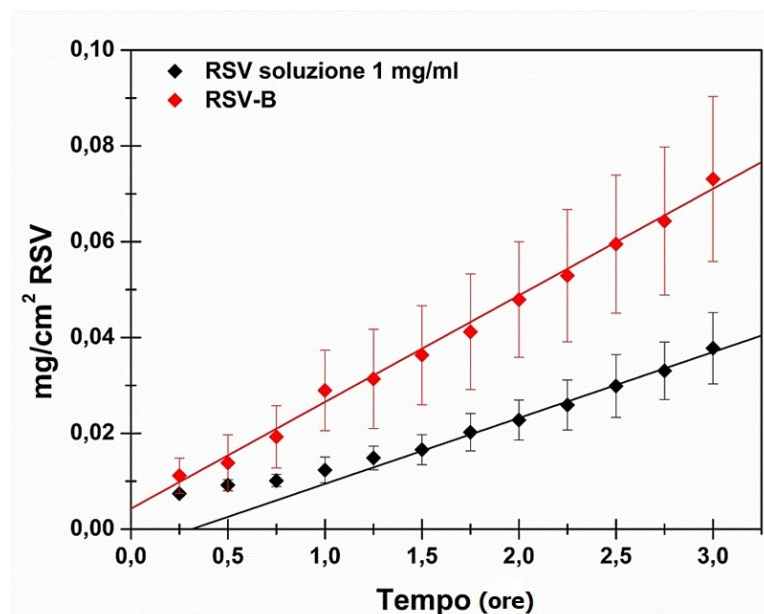


Figura 90. profile di permeazione del RSV (mg/cm^2) in funzione del tempo (ore) dopo somministrazione di una soluzione a 1 mg/ml (nero) e mini-tablet RSV-B (rosso)

Pertanto, la formulazione RSV-B sottoforma di mini-tablet è stata sottoposta a ulteriori caratterizzazioni mirate e valutare alcune caratteristiche della polvere ottenuta mediante Spray Drying ed a validare secondo i requisiti di farmacopea le mini-tablets sublinguali.

In particolare, una prima parte di caratterizzazione ha riguardato la valutazione della morfologia della polvere mediante microscopia SEM, analisi FTIR in modalità ATR e analisi XRD. Le immagini ottenute mediante SEM (**Figura 91**) sono state acquisite su diverse porzioni della polvere ed a vari ingrandimenti. Come è possibile osservare, il campione RSV-B è omogeneo ed è costituito da microparticelle di dimensioni comprese tra 15 e 20 μm , legate tra di loro da una struttura a ragnatela, probabilmente dovuto alla presenza del PVP K90.

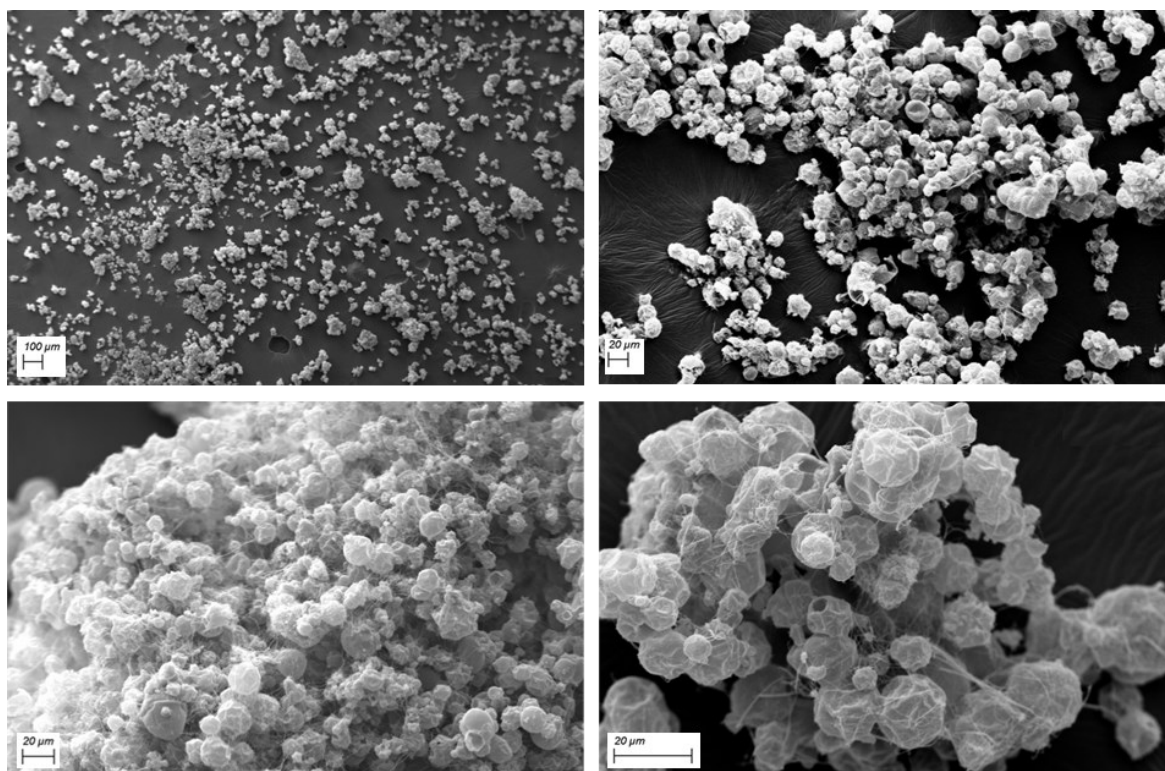


Figura 91. Morfologia delle microparticelle di RSV-B ottenute per spray-drying analizzata mediante SEM a diversi ingrandimenti. Barre di ingrandimento 100 e 20 μm .

Gli spettri FTIR sono stati acquisiti per valutare il verificarsi di eventuali interazioni tra il RSV e gli eccipienti. Come è possibile osservare in **Figura 92**, la massiva presenza del PVP K90 nasconde buona parte dei picchi caratteristici del RSV. Tuttavia, analizzando l'intervallo compreso tra 1550 e 1620 cm^{-1} è possibile notare la presenza di picchi caratteristici del RSV che non mostrano nessun chemical shift. Inoltre, a 1650 cm^{-1} è possibile osservare la somma matematica dei picchi di RSV e PVP K90, la quale conferma ulteriormente che non si verificano interazioni chimiche tra il RSV ed il principale polimero impiegato.

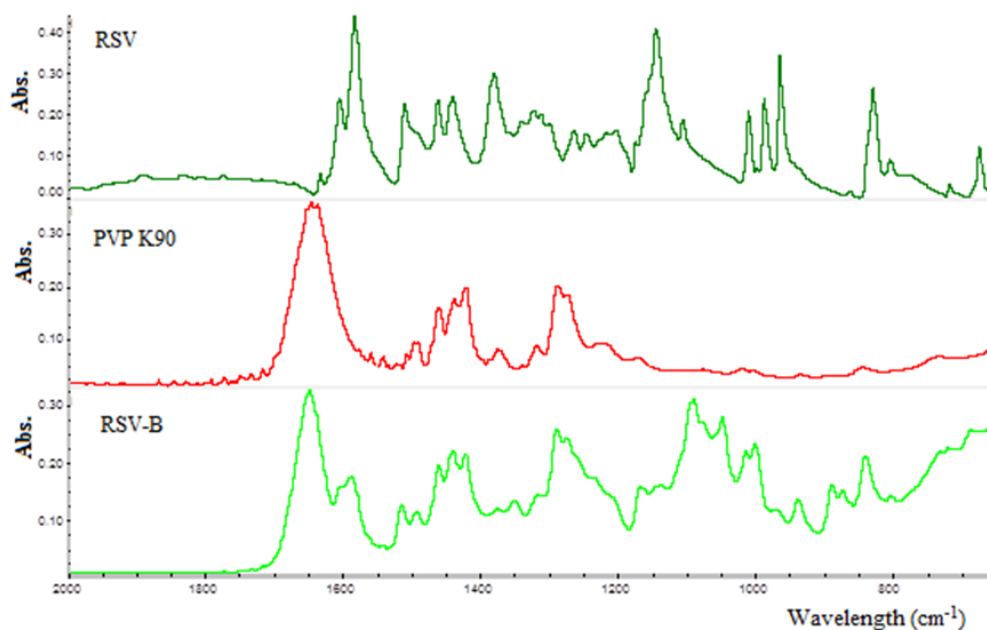


Figura 92. spettri FTIR in modalità ATR del RSV puro (nero), PVP K90 (rosso) e microparticelle RSV-B (verde)

Una importante caratterizzazione eseguita sulla polvere RSV-B è stata finalizzata alla valutazione dello stato fisico dell'RSV (cristallino o amorfo) all'interno delle microparticelle polimeriche, mediante analisi XRD. Da un punto di vista biofarmaceutico, lo stato amorfo di un principio attivo allo stato solido è una caratteristica cruciale per migliorare la sua solubilità e la sua velocità di solubilizzazione, soprattutto quando si tratta di molecole scarsamente idrosolubili come il RSV, poiché ciò può contribuire ad aumentare la permeabilità della molecola ai tessuti biologici. Tuttavia, da un punto di vista termodinamico, una forma amorfa non è stabile e potrebbe facilmente convertirsi nella sua forma cristallina, quindi, è fondamentale anche valutare la sua stabilità nel tempo. In **Figura 93** sono riportati i diffrattogrammi ottenuti sia dall'analisi del RSV puro che della polvere RSV-B fresca e dopo 6 mesi di conservazione.

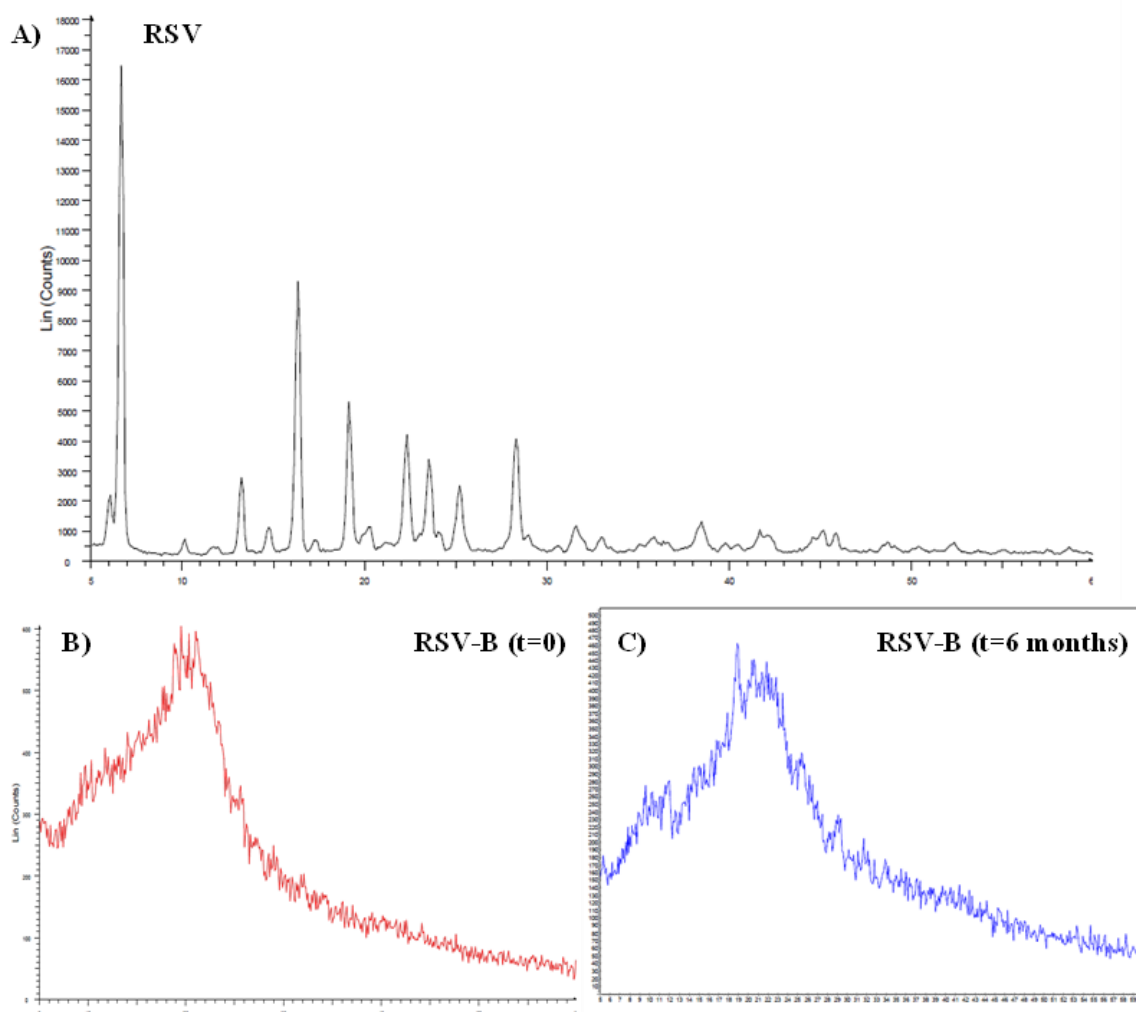


Figura 93. Diffratogrammi ottenuti dall'analisi di **A)** RSV puro, **B)** RSV-B immediatamente dopo la preparazione, **C)** RSV-B dopo 6 mesi dalla preparazione.

Come è possibile osservare, nel pannello A si apprezzano i picchi del RSV in forma cristallina, che spariscono quando questo è incorporato all'interno delle microparticelle polimeriche (pannello B). Questo indica la completa amorfizzazione del RSV a seguito di Spray Drying. Inoltre, il pannello C mostra che dopo 6 mesi di conservazione a temperatura ambiente ed al buio il RSV rimane in forma amorfa. Ciò è probabilmente dovuto all'efficacia del PVP K90 nel prevenirne la ri-cristallizzazione grazie alla formazione di una struttura matriciale disordinata in grado di migliorare la stabilità fisica della forma amorfa (Kurakula & Rao, 2020; Sfondrini et al., 2012). Questi risultati sono particolarmente interessanti e soddisfacenti, oltre ad essere perfettamente coerenti con quanto già osservato in termini di incremento della solubilità e della permeabilità del RSV a seguito della applicazione delle mini-tablets di RSV-B.

La seconda parte delle caratterizzazioni riguarda le caratteristiche delle mini-tablets di RSV-B, valutate in termini di disintegrazione e dissoluzione. Nel primo caso è stato misurato il tempo di disintegrazione (DT) che è un parametro chiave nel design di una formulazione sublinguale a rapida disintegrazione.

In generale, infatti, le formulazioni a rapida disintegrazione per applicazione oromucosale dovrebbero essere caratterizzate da un DT inferiore a 30 secondi (Okuda et al., 2009; Vanbillemonet et al., 2020). In questo caso, il DT è stato valutato con due metodi diversi. Il primo, in accordo con la F.U. XI ed., consiste nell'utilizzo di un grande volume di liquido (900 mL) a $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (Alali et al., 2021). In queste condizioni sperimentali, il DT è risultato pari a 4.06 ± 0.39 secondi e, quindi, ben al di sotto dei valori considerati limite di accettabilità. Inoltre, a supporto di questo risultato è stato condotto un esperimento di disintegrazione visivo, acquisendo numerose fotografie del processo di disintegrazione nonché dei video girati sia a velocità normale che in modalità slow motion. Questo tipo di test è stato eseguito ponendo la mini-tablet di RSV-B all'interno di un crogiolo di vetro e bagnandola con 1 mL di tampone citrato a pH 5.5 preriscaldato a $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Infatti, l'uso di un volume così piccolo è stato ritenuto più rappresentativo in quanto mima meglio le condizioni *in vivo* riscontrabili dopo somministrazione sublinguale (la mini-tablet sarà a contatto con un piccolo volume di saliva). Questo test conferma ulteriormente la quasi immediata e completa disgregazione della mini-tablet di RSV-B. Tuttavia, poiché il processo di disintegrazione è molto veloce, con questo metodo è difficile attribuire un punto temporale (sec) a tutte le immagini proposte. Tuttavia, va considerato che l'intero esperimento ha richiesto non più di 8 secondi per portare alla completa disintegrazione della minitabulet (**Figura 94**). In ogni caso, quindi, la formulazione soddisfa i criteri necessari per una forma di dosaggio sublinguale a rapida disintegrazione ($\text{DT} < 30 \text{ s}$).

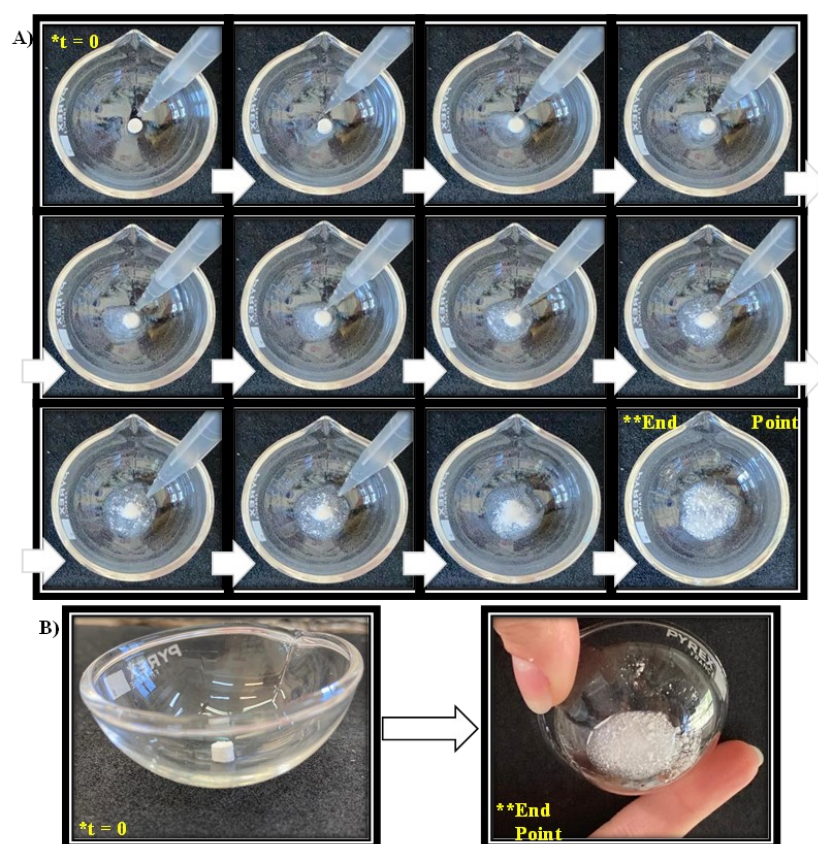


Figura 94. Test di disintegrazione visivo: A) sequenza di fotografie; B) aspetto della mini-tablet prima ed al termine dell'esperimento

Infine, è stata valutata la velocità dissoluzione del RSV dalla mini-tablet. Gli studi sono stati condotti secondo quanto riportato in letteratura, considerando accettabili formulazioni che determinano il rilascio di almeno l'80% della dose in 15 minuti (Kalný et al., 2021; Vanbillemont et al., 2020). I risultati sono stati riportati in **Figura 95** come percentuale della dose di RSV rilasciata nel tempo.

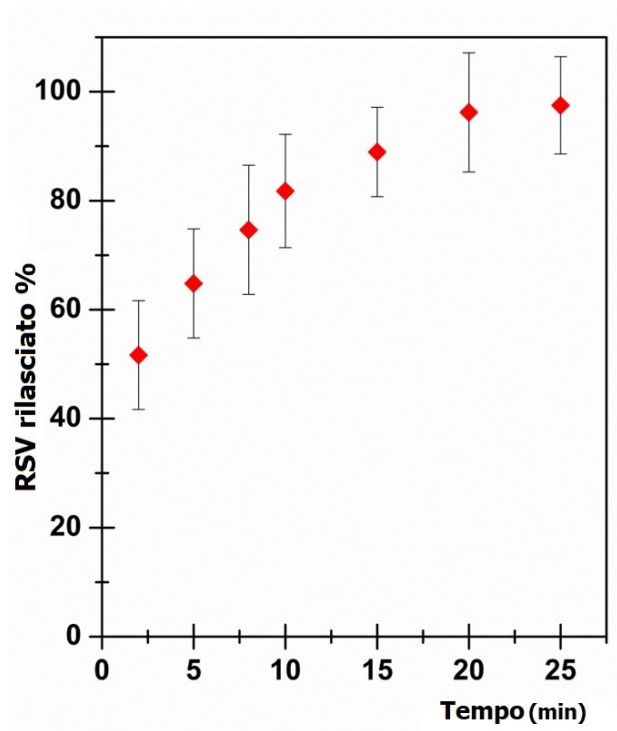


Figura 95. profilo di dissoluzione del RSV espresso come percentuale della dose rilasciata in funzione del tempo (min). Media $\pm$ SE (n=6)

Come è possibile osservare, dopo 15 min è stato rilasciato l' $88.94 \pm 8.19\%$ della dose di RSV, confermando così la validità della formulazione proposta. Inoltre, dopo 25 minuti il rilascio va a completezza. Per concludere, i risultati ottenuti dalle caratterizzazioni eseguite sulla polvere e sulle mini-tablets di RSV-B validano tali *carrier* microparticellari e le corrispondenti mini-tablets quali efficaci forme di dosaggio sublinguali a rapida disgregazione per la somministrazione del RSV, poiché soddisfano tutti i criteri di *drug delivery* sublinguale e mostrano nel contempo spiccate qualità di *permeation enhancement*.

4.5 Realizzazione di NLC cariche di Resveratrolo come promettente delivery platform

4.5.1 Preparazione e caratterizzazione della miscela lipidica

I molteplici motivi per cui è fondamentale trovare strategie innovative ed efficienti per la veicolazione del RSV sono stati già ampiamente discussi e risiedono nelle sue intrinseche caratteristiche chimico-fisiche e farmacocinetiche sfavorevoli che limitano enormemente il suo indubbio potenziale terapeutico. Come già osservato, l'incapsulamento del RSV in sistemi micro- e nanometrici può rappresentare una strategia vincente. Inoltre, per massimizzare le proprietà rigenerative nei confronti dei tessuti lesi del cavo orale o per il trattamento topico delle lesioni pre-cancerose buccali, l'impiego di carrier lipidici nanostrutturati (NLC) per veicolare il RSV potrebbe rivelarsi una promettente strategia. Infatti, come precedentemente osservato per la curcumina e la quercetina, le NLC possono risultare efficienti *carrier* per i polifenoli, in grado di preservarne l'integrità strutturale, favorendone l'interazione con le strutture lipidiche dei tessuti. Come già discusso, la prima tappa fondamentale per la realizzazione di NLC cariche di RSV è l'individuazione della miscela lipidica da utilizzare. La natura chimica del principio attivo infatti influenza decisamente la scelta dei lipidi costituenti i nanocarriers. Poiché le NLC sono costituite da almeno due lipidi di cui uno liquido e uno solido, si è proceduto alla scelta di tali componenti. Il miglior lipide liquido è stato selezionato conducendo prove di solubilità del RSV (al 5% p/p) in 3 differenti eccipienti lipidici liquidi: l'isopropil palmitato (IP), il trigliceride capril/caprico (TCC) ed il Labrasol® (LB). I primi due sono già stati precedentemente descritti in quanto già presi in considerazione per la realizzazione delle NLC cariche di CUR e QRC. Per questo lavoro è stato preso in considerazione anche il TCC (**Figura 96**), un triestere sintetico di derivazione vegetale molto stabile ai fenomeni di degradazione ossidativa poiché costituito da acidi grassi saturi. Viene comunemente utilizzato in ambito cosmetico per le sue proprietà occlusive che contribuiscono ad aumentare l'idratazione cutanea; inoltre, uno studio pubblicato nel 2019 ne ha evidenziato interessanti proprietà antimicrobiche (Dobler et al., 2019).

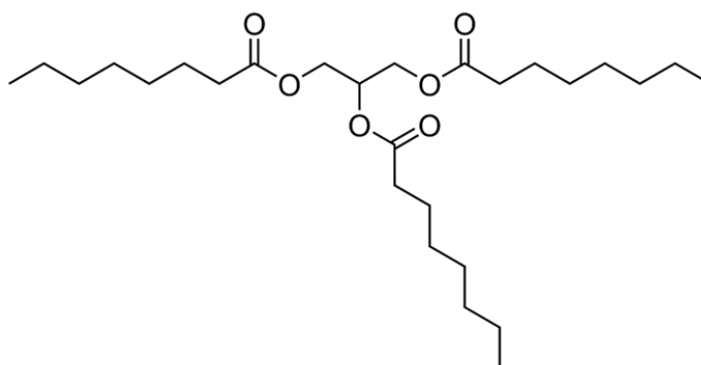


Figura 96. Struttura chimica del trigliceride capril/caprico

Per la scelta dell'eccipiente lipidico liquido è stata operata una solubilizzazione a caldo, inoltre, poiché i processi di solubilizzazione possono essere tempo dipendenti, non è stato fissato un limite di tempo, ma si è proceduto fino alla completa solubilizzazione dell'attivo o fino al manifestarsi di variazioni evidenti (es. imbrunimento della dispersione). L'unico

eccipiente in grado di solubilizzare completamente e rapidamente la quantità desiderata di RSV è risultato il LB che, per questo motivo, è stato scelto come componente liquida della miscela lipidica. Nonostante il RSV abbia un alto coefficiente di ripartizione, indice della sua natura prettamente lipofila, la presenza nella sua struttura di funzioni ossidriliche fa sì che esso abbia maggiore affinità verso lipidi anfifilici. In seguito, è stato condotto uno studio di screening volto a scegliere il principale componente lipidico solido. A tal fine sono state condotte prove di miscibilità a caldo e a freddo del LB con tre eccipienti lipidici solidi appartenenti a classi chimiche differenti, quali la Stearina, Il Cetil palmitato e il GMS scelti poiché comunemente usati in ambito cosmetico/farmaceutico e caratterizzati da una comprovata sicurezza per l'uomo. Il GMS è stato precedentemente descritto ed utilizzato per la realizzazione delle NLC cariche di QRC. La Stearina appartiene alla classe dei trigliceridi e si ottiene per esterificazione di tre molecole di acido stearico con una di glicerolo (**Figura 97-A**). Viene comunemente impiegato per la realizzazione di creme dermatologiche grazie alle sue proprietà occlusive. Infine, il Cetil palmitato è un estere a lunga catena ottenuto per esterificazione tra l'acido esadecanoico e l'esadecanolo (**Figura 97-B**) anch'esso utilizzato come eccipiente cosmetico e farmaceutico, ma anche come componente di nanoparticelle lipidiche (Izza et al., 2021; Teeranachaideekul et al., 2007).

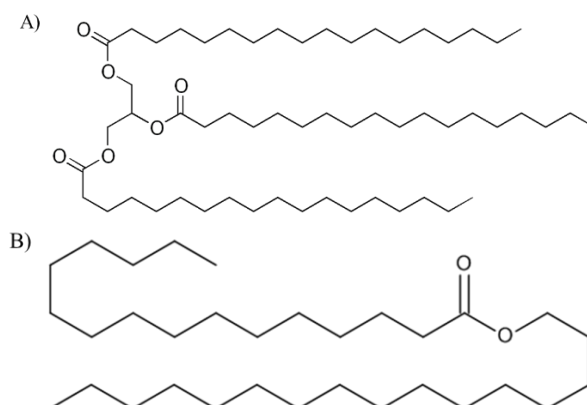


Figura 97. Struttura chimica della stearina (A) e del Cetilpalmitato (B).

È stato osservato che, durante la fase di miscelazione a caldo, la Stearina non era in grado di formare una miscela omogenea con il LB in nessun rapporto in peso preso in considerazione. Di contro, il Cetil palmitato mostrava una buona miscibilità a caldo con LB, ma una volta raffreddate, le miscele erano caratterizzate da una evidente separazione di fase. Per tali motivi sia la Stearina che il Cetil palmitato stati scartati. Il GMS, già noto per la sua miscibilità con il LB, è risultato, comunque, l'unico lipide solido completamente miscibile sia a caldo che in seguito a raffreddamento e pertanto è stato scelto come principale componente solida per la preparazione delle NLC. Inoltre, poiché è già emersa la possibilità di inserire efficacemente anche l'acido glicirretico (GA) nella miscela di LB e GMS, questo è stato inserito in percentuale fissa alla luce delle sue molteplici proprietà, coadiuvanti quelle del RSV. Selezionati i componenti della miscela lipidica, sono stati valutati differenti rapporti in peso tra di essi, con l'obiettivo di ottenere una miscela lipidica ottimale, come precedentemente illustrato.

Sono stati, dunque, ottenuti i seguenti risultati. il MIX-A è identificabile come la prima prova, e risulta in grado di solubilizzare il RSV costituendo una miscela omogenea a caldo, ma disomogenea dopo raffreddamento, con presenza di chiazze ed evidente separazione di fase dovuta probabilmente all'elevata quantità di GMS. Riducendo, quindi il GMS a vantaggio di LB (MIX-B) si ottiene una miscela limpida ed uniforme a caldo che rimane omogenea anche dopo raffreddamento. Questa ha, tuttavia, consistenza molto cerosa e pertanto risulta difficilmente lavorabile. Per migliorare la miscela e valutare la possibilità di incrementare il RSV da incapsulare è stato formulato il MIX-C, che contiene il 10% (p/p) di RSV a discapito di LB e GMS. Tuttavia, la quantità di LB evidentemente troppo bassa comporta l'incapacità della miscela ottenuta di solubilizzare completamente il RSV. Pertanto, nel MIX-D è stato mantenuto elevato il quantitativo di RSV (10% p/p), aumentando però il contenuto di LB. Sebbene in questo modo il RSV si solubilizzi completamente con ottenimento di una miscela omogenea sia a caldo che a freddo, la stessa risulta eccessivamente cerosa e facile al rammollimento. Da quanto osservato a seguito della preparazione dei MIX-B, MIX-C e MIX-D appare evidente che per aumentare la percentuale di RSV da incapsulare è indispensabile aumentare anche la quantità di LB, tuttavia, poiché un eccesso di LB rende la miscela lipidica troppo cerosa è necessario scegliere un valore di compromesso. Inoltre, i risultati ottenuti con il MIX-A indicano che elevate percentuali di GMS causano disomogeneità e pertanto anche in questo caso andrà scelto un valore di compromesso. Tali compromessi sono stati efficientemente raggiunti con la preparazione del MIX-E. Tale miscela risulta omogenea a caldo e a freddo, e si presenta bianca, liscia, solida a temperatura ambiente e facilmente lavorabile. Per tali motivi è stata considerata la migliore. Inoltre, al fine di conferire ulteriori proprietà di *permeation enhancer* alle NLC, al MIX-E è stato ulteriormente aggiunto il mentolo, molecola di natura terpenica, lipidica e pertanto facilmente miscelabile con gli altri componenti lipidici e già valutata come efficace *permeation enhancer* del RSV. Il mentolo è stato aggiunto al 2%, a discapito del LB, ed il risultante MIX-F ha mantenuto le caratteristiche di omogeneità sia a caldo (**Figura 98-A**) che a freddo (**Figura 98-B**), il colore bianco, la texture liscia e la consistenza poco cerosa e facilmente lavorabile (**Figura 98-C**) ed è pertanto stata scelta quale miscela lipidica da impiegare per la realizzazione delle NLC.

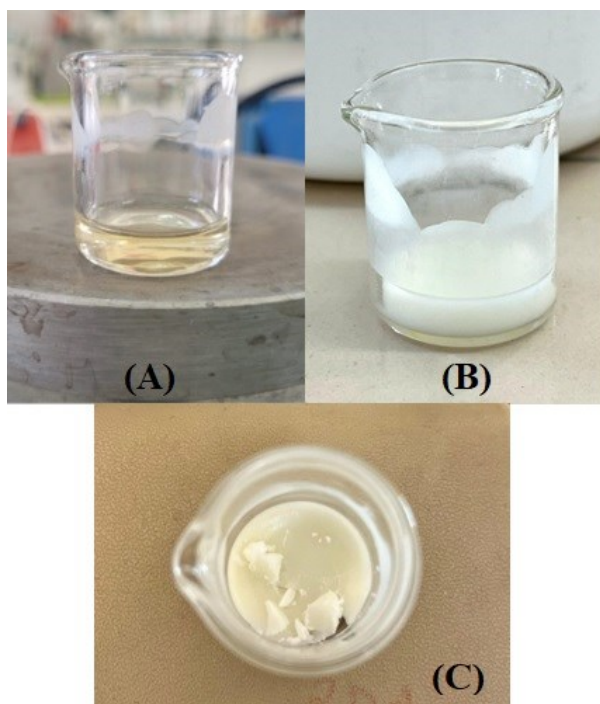


Figura 98. Aspetto della miscela lipidica MIX-F fusa (A) e dopo solidificazione (B, C)

Prima di procedere con la realizzazione delle NLC è, tuttavia, necessario caratterizzare la miscela lipidica di partenza in quanto le sole valutazioni visive (aspetto e consistenza) sono puramente indicative. Per questo motivo si è scelto di prendere in considerazione 3 parametri importanti quali: la quantità di RSV presente all'interno della miscela, la temperatura di rammollimento della stessa e la valutazione dello stato fisico dell'attivo incorporato. Come già discusso, l'analisi quantitativa dell'attivo è un dato sperimentale di estrema importanza quando si parla di polifenoli, in quanto si tratta di una classe di composti notoriamente termolabile. La determinazione quantitativa del RSV dà, inoltre, informazioni sulla riproducibilità del metodo di preparazione (confronto del contenuto di RSV in diversi lotti di miscela lipidica aventi stessa composizione) e sull'omogeneità del campione (confronto del contenuto di RSV in diverse aliquote dallo stesso lotto di miscela lipidica). Nella fattispecie, la quantità di RSV presente nel MIX-F è risultata pari al 4.56 ± 0.04 % (p/p), rispetto ad un valore teorico del 5.00% (p/p). Da questo dato è possibile dedurre che, nonostante l'utilizzo di elevate temperature, non si assiste ad una significativa degradazione del RSV e pertanto il metodo di preparazione della miscela è validato. Inoltre, alla luce del valore estremamente piccolo di errore standard è evidente l'omogeneità e la riproducibilità del metodo di preparazione. Il range di temperatura di rammollimento della miscela lipidica è stato valutato sperimentalmente e confrontato con i punti di fusione dei singoli componenti, presi dalla letteratura e riportati in **Tabella 41**.

Tabella 41. Punto di fusione dei singoli componenti della miscela lipidica e del MIX-F

Campione	Punto di fusione (°C)
*Labrasol®	N.A.
*GMS	58-62
*GA	296
*Mentolo	42.4
*RSV	257
**MIX-F	57-61

**EPA database; **sperimentale*

Il MIX-F, in quanto miscela di varie sostanze lipidiche, non ha un punto di fusione definito ma è caratterizzato da un range di temperatura entro il quale comincia a rammollire ed infine fondere completamente. L'intervallo di rammollimento osservato, compreso tra $58 \pm 1^\circ\text{C}$ e $60 \pm 1^\circ\text{C}$ è prossimo al punto di fusione del componente in maggiore percentuale, ovvero il GMS, il quale è a sua volta caratterizzato da un range di temperatura di rammollimento e non da un punto di fusione ben definito poiché costituito da una miscela di gliceridi. Poiché la temperatura di fusione del MIX-F è di almeno 30°C superiore alla temperatura ambientale, la miscela resterà solida e facilmente lavorabile e le NLC successivamente prodotte potranno mantenersi solide e stabili senza ricorrere a sistemi di refrigerazione, abbattendo così i costi di manipolazione e stoccaggio. Inoltre, è interessante osservare che il range di temperatura di rammollimento della miscela risulta nettamente inferiore al punto di fusione di alcuni componenti singoli, quali il GA e il RSV, di per sé estremamente elevati ($> 200^\circ\text{C}$), fenomeno già osservato per la preparazione di miscele lipidiche cariche di sostanze funzionali come la Curcumina e la Quercetina. Questi risultati suggeriscono l'interazione tra tutti i componenti della miscela lipidica con formazione di una struttura presumibilmente amorfa e quindi idonea per la preparazione di NLC. Inoltre, i dati ottenuti suggeriscono che possa essere avvenuta la completa amorfizzazione del RSV incorporato e ciò potrebbe riflettersi positivamente sull'efficacia del nuovo sistema di veicolazione. Per confermare questa supposizione, sono stati quindi condotti studi di diffrazione ai raggi X. Le analisi effettuate sul MIX-F e sulla miscela Blank restituiscono due diffrattogrammi sovrapponibili (**Figura 99-B e C**) suggerendo la completa amorfizzazione del RSV. Questa ipotesi viene confermata osservando il diffrattogramma del RSV puro, il quale mostra evidenti picchi caratteristici della sua struttura cristallina (**Figura 99-A**). In particolare, è possibile individuare un picco a $6,6 \theta$ assente nel MIX-F (**Figura 99-D**) a conferma dello stato amorfo del RSV all'interno della miscela. Inoltre, ripetendo le analisi sul MIX-F, dopo che quest'ultimo è stato conservato per 30 giorni a 4°C , non si assiste a nessuna variazione nel suo diffrattogramma (**Figura 99-C**), confermando le proprietà della miscela di prevenire fenomeni di ri-cristallizzazione del RSV nel tempo. Alla luce dei risultati fin qui ottenuti la miscela lipidica prodotta risponde a tutti i requisiti preliminari idonei per la preparazione delle NLC.

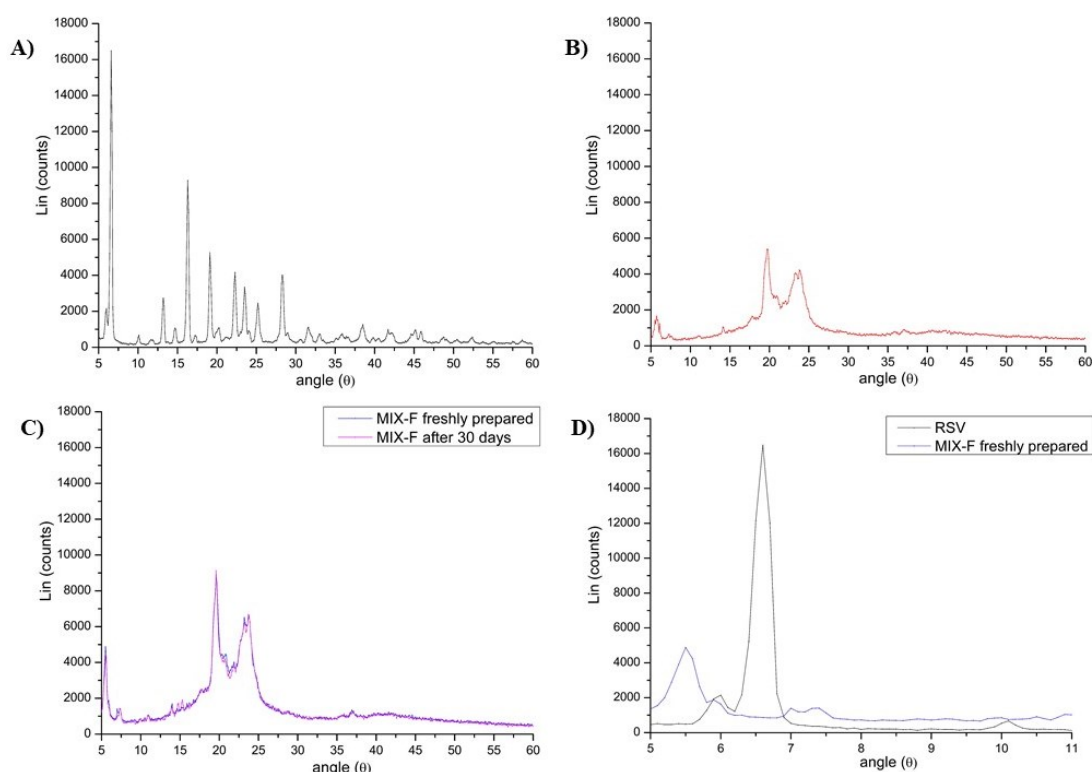


Figura 99. diffattogrammi ottenuti dall'analisi di MIX-F (Blu) fresco e dopo 30 giorni dalla preparazione (viola), miscela Blank (rosso) e RSV puro (nero). Panel **A**) RSV puro; panel **B**) la miscela Blank; panel **C**) diffattogrammi di MIX-7 fresco e dopo conservazione a confronto; panel **D**) sezione dei diffattogrammi di MIX-7 e di RSV puro a confronto.

4.5.2 Preparazione e caratterizzazione di NLC cariche di RSV

Sulla base della esperienza consolidata con precedenti lavori, anche per la preparazione delle NLC cariche di RSV è stata utilizzata la tecnica top-down ad alta energia basata sull'omogenizzazione seguita da sonicazione ad alta frequenza. Un importante parametro considerato per questo lavoro è la quantità di fase dispersa utilizzata. In particolare, sono state condotte diverse prove impiegando 100, 200 o 300 mg di MIX-F per valutare la possibilità di scale up della preparazione con conseguente abbattimento dei tempi e dei costi di preparazione, nonché l'ottenimento di una dispersione contenente una quantità maggiore di nanoparticelle e, quindi, di conseguenza di sostanza funzionale. Per quanto riguarda la fase disperdente, sulla base di precedenti studi, è stato scelto il tampone citrato a pH 5.5. Tutte le prove sono state condotte utilizzandone un volume pari a 40 mL, per favorire la completa immersione della punta del sonificatore al fine di promuovere un'uniforme distribuzione degli ultrasuoni tale da permettere l'ottenimento di una nanoemulsione omogenea senza perdita di materiale. Alla fase disperdente è stato aggiunto il Pluronic F-127 all'1% (p/v) quale tensioattivo essenziale per garantire la formazione di una nanoemulsione prima e, successivamente, stabilizzare le nanoparticelle una volta ottenute. Gli ulteriori parametri di processo sono analoghi a quanto già discusso per la preparazione delle NLC cariche di altri polifenoli ed in particolare la procedura è articolata in 3 step: omogeneizzazione con formazione di una microemulsione (**Figura 100-A**), sonicazione ad

alta frequenza a caldo con formazione di una nanoemulsione (**Figura 100-B**), sonicazione ad alta frequenza in bagno di ghiaccio e sale con conseguente solidificazione delle NLC (**Figura 100-C**).

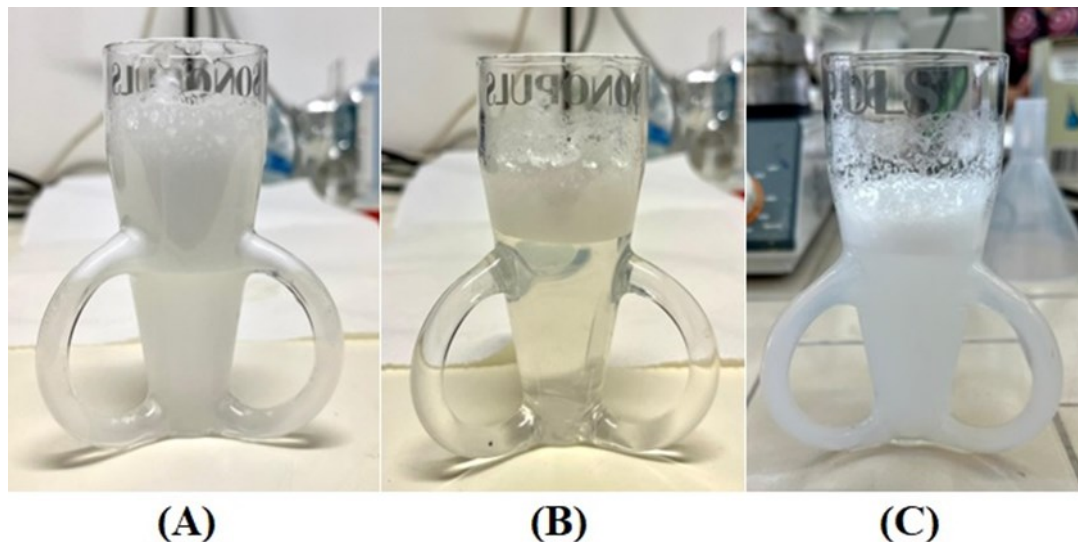


Figura 100. I tre step della preparazione delle NLC cariche di RSV: (A) Microemulsione a caldo, (B) nanoemulsione a caldo (C) dispersione di NLC a seguito di raffreddamento

Per determinare quale fosse la migliore dispersione di NLC, sono state condotte due differenti caratterizzazioni, la prima basata sulla valutazione quantitativa dell'attivo e la seconda di tipo dimensionale mediante misure di Dinamic light scattering (DLS). Analogamente a quanto già riportato, la determinazione del contenuto di RSV ha necessitato di una procedura multistep basata in primis sulla quantificazione dell'attivo complessivamente presente nella dispersione (quantità presente dentro le NLC + quantità presente in fase dispersa) ed espressa in termini di DR% e, in seguito, sulla determinazione indiretta dei parametri di DL% e LE% previa misurazione della quantità di attivo non incapsulato. Tutti i risultati sono mostrati in **Tabella 42** e dimostrano come l'impiego di quantità crescenti di fase lipidica non modifichi in maniera significativa la DR%, che si mantiene sempre al di sopra del 90%, indice della stabilità dell'attivo e di accettabilità della tecnica di preparazione. Inoltre, la quota maggiore di RSV in dispersione si trova effettivamente incapsulata all'interno delle NLC ($LE\% > 95\%$) ed, osservando l'elevata riproducibilità intra-batch e inter-batch (bassi valori di errore standard) è ulteriormente possibile confermare che il RSV è effettivamente affine ai componenti della matrice lipidica con i quali forma una soluzione (solida o liquida a seconda della temperatura) e che partendo da una miscela lipidica estremamente uniforme, anche il prodotto finale risulta omogeneo in termini di quantità di attivo.

Tabella 42. Valutazione quantitativa del RSV espressa in termini di DR%, DL% e LE%. Media $\pm$ SE (n=3)

Dispersioni	MIX-F (mg)	DR%	DL%	LE%
NLC-F1	100	99.12 $\pm$ 1.65	4.48 $\pm$ 0.01	99.21 $\pm$ 0.14
NLC-F2	200	95.69 $\pm$ 0.35	4.72 $\pm$ 0.01	99.01 $\pm$ 0.22
NLC-F3	300	96.82 $\pm$ 1.34	4.20 $\pm$ 0.01	95.17 $\pm$ 0.25

Si è quindi proceduto alla caratterizzazione dimensionale delle NLC ed alla valutazione della loro polidispersità mediante studi di DLS. Anche in questo caso, i risultati (**Tabella 43**) sono stati riportati in termini di Intensity e non di Z-average a causa della presenza delle micelle di tensioattivo (diametro medio 16.26 ± 4.32 nm) che vengono rilevate come una seconda popolazione falsando il dato restituito come Z-Average.

Tabella 43. Dimensione (nm) delle NLC e PDI. Media $\pm$ SE

Campione	Intensity (nm)	PDI
NLC-F1	101.17 $\pm$ 6.68	0.279 $\pm$ 0.001
NLC-F2	126.10 $\pm$ 8.30	0.337 $\pm$ 0.033
NLC-F3	162.86 $\pm$ 3.12	0.267 $\pm$ 0.010

Com'è possibile osservare, il diametro medio delle NLC aumenta proporzionalmente alla quantità di fase dispersa adoperata per la loro preparazione (**Figura 101**). Tuttavia, tutte e tre le preparazioni hanno dimensioni nanometriche e accettabili per il drug delivery (<500 nm). Va inoltre sottolineato il valore ottenuto in termini di indice di polidispersità (PDI) che risulta sempre accettabile (PDI < 0.4), sebbene sia certamente sovrastimato a causa della presenza delle micelle di tensioattivo che rendono sicuramente la dispersione nel suo complesso più polidispersa.

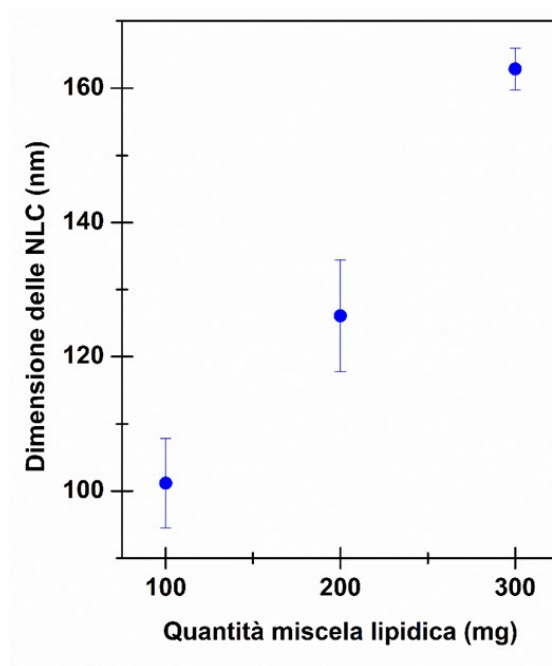


Figura 101. relazione tra quantità di miscela lipidica (mg) utilizzata per la preparazione delle NLC e il rispettivo diametro medio (nm)

Sulla base dei risultati fin qui ottenuti, la dispersione NLC-F3 è stata scelta come quella su cui focalizzare i successivi studi. Questa decisione è frutto di alcune osservazioni. In primis, i valori di DR%, DL% e LE% sembrano non risentire dell'utilizzo di una maggiore quantità di fase lipofila interna, e tale incremento, sebbene determini un aumento delle dimensioni delle particelle, comporta comunque l'ottenimento di NLC di dimensioni e PDI accettabili. Inoltre, a parità di volume di dispersione preparata è così possibile ottenere una dispersione caratterizzata da una maggiore concentrazione di NLC, e quindi di RSV. Sono quindi ridotti i tempi e i costi di preparazione.

Scelta la formulazione migliore, è stata valutata la possibilità di conservarla sotto forma di polvere essiccata a mezzo di un processo di freeze drying. Durante l'ideazione di una forma di dosaggio è fondamentale valutarne la stabilità durante le fasi di stoccaggio, sia in termini di integrità del sistema *carrier* che in termini di stabilità alla degradazione dei principi attivi in esso incapsulati. Poiché la dispersione di NLC è acquosa, questa può essere soggetta a fenomeni di instabilità chimica, fisica e microbiologica. La conversione di una formulazione liquida in una polvere da ri-disperdere al bisogno è una metodica estremamente vantaggiosa, poiché consente contemporaneamente un abbattimento dei costi di stoccaggio e un allungamento dei tempi di conservazione. Una delle metodiche più utilizzate per l'allontanamento dell'acqua da una dispersione nanoparticellare preformata è certamente la tecnica del freeze drying, che prevede il congelamento della dispersione ottenuta e l'allontanamento dell'acqua mediante sublimazione a basse temperature e in condizioni di vuoto spinto. Tale processo risulta estremamente vantaggioso per il trattamento di sostanze termolabili e consente l'ottenimento di una polvere secca, altamente porosa, igroscopica e facilmente ridispersibile. Tuttavia, durante le fasi di congelamento si formano aghi di ghiaccio che possono rompere o deformare le nanoparticelle. Per superare questo problema è possibile utilizzare opportuni crioprotettori.

Inoltre, l'adsorbimento del crioprotettore sulla superficie delle NLC fa sì che durante la fase di congelamento l'effetto sterico impedisca alle nanoparticelle di interagire tra di loro, minimizzando l'accrescimento delle dimensioni particellari dopo ri-dispersione. In questo lavoro sono stati scelti 4 crioprotettori di origine naturale, caratterizzati da numerose funzioni ossidriliche e, di conseguenza, in grado di formare legami ad idrogeno con le molecole d'acqua. In particolare sono stati selezionati due disaccaridi e due polialcoli. Il saccarosio (α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fruttofuranoside) (**Figura 102**) è un disaccaride formato da una molecola di α -D-glucosio, in forma piranosica, ed una di β -D-fruttosio, in forma furanosica, uniti da un legame α -(1 $\rightarrow$ 2) glicosidico. A causa della sua struttura chimica è uno zucchero non riducente e, pertanto, chimicamente poco reattivo. È una molecola naturale che a temperatura ambiente e pressione atmosferica si presenta sotto forma di solido cristallino incolore/bianco e inodore. Trova largo impiego in campo alimentare e farmaceutico come edulcorante (resta il dolcificante più utilizzato sia in ambito domestico che industriale nonostante la recente concorrenza dei dolcificanti ipocalorici).

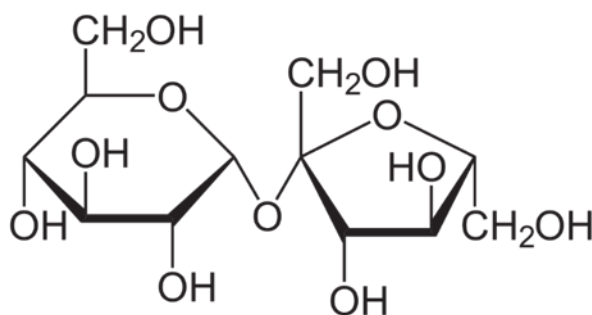


Figura 102. struttura chimica del saccarosio

Il trealosio e il sorbitolo, che sono rispettivamente un disaccaride ed un polialcol, sono già stati descritti precedentemente, mentre il mannitolo (**Figura 103**), isomero del sorbitolo, è un alditolo chirale con 6 funzioni ossidriliche. È una molecola naturale utilizzata come edulcorante anche per soggetti diabetici in quanto scarsamente assorbito a livello intestinale. Dal punto di vista farmacologico è inquadrato quale diuretico osmotico, utilizzato come anti-edematoso, lassativo, nel trattamento del glaucoma e per ridurre la pressione intracranica (Shawkat et al., 2012).

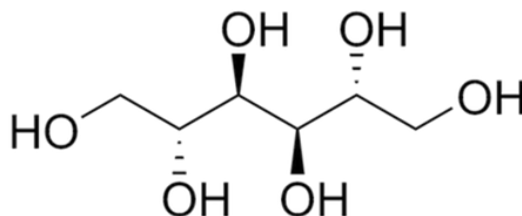


Figura 103. struttura chimica del mannitolo

Per studiare al meglio l'effetto dei quattro crioprotettori presentati, questi sono stati aggiunti alla dispersione fresca di NLC a diverse concentrazioni, valutando nello specifico 3 rapporti in peso tra le NLC e ciascun crioprotettore: 1:3, 1:8 e 1:13. I campioni di NLC in assenza (NLC-Blank) e in presenza dei crioprotettori sono stati essiccati mediante freeze drying e le risultanti polveri sono state ridisperse con acqua distillata. L'efficacia dei crioprotettori è

stata valutata sia visivamente che sperimentalmente sottoponendo i campioni ridispersi a misure di DLS. è stato possibile osservare che, di per sé, la dispersione di NLC non è in grado di ridispersersi completamente e, nonostante l'ausilio di ultrasuoni o agitazione, rimangono visibili ad occhio nudo grosse particelle sospese che nel tempo tendono a sedimentare. L'aggiunta dei crioprotettori migliora sicuramente la situazione; infatti, le nanoparticelle, una volta ridisperse, non hanno tendenza a sedimentare nell'immediato. Tuttavia, si osservano differenze importanti tra i diversi crioprotettori già in termini di disperdibilità. Volendo stilare una classifica in ordine crescente di velocità di ridispersione e aspetto finale della dispersione risultante, si trovano nei gradini più bassi i campioni contenenti mannitolo, seguiti da quelli addizionati di trealosio e sorbitolo, mentre i migliori risultati sono ottenuti con il saccarosio. In particolare, per i campioni contenenti mannitolo il processo di dispersione risulta estremamente lungo e difficoltoso e restano visibili alcune grosse particelle sospese. In presenza di trealosio si ottiene, con qualche difficoltà, una dispersione caratterizzata da visibili “nuvolette” di fase dispersa. Il sorbitolo velocizza i tempi di dispersione, ma l'aspetto finale è identico a quello dei campioni contenenti trealosio e quindi ancora una volta caratterizzato da “nuvolette”. Infine, il saccarosio consente una ridispersione del campione quasi immediata a contatto con l'acqua, senza la necessità di applicare una vigorosa agitazione per mezzo di ultrasuoni o vortex, e garantisce l'ottenimento di una dispersione con aspetto finale paragonabile a quello delle NLC fresche. A supporto e conferma dell'analisi visiva si possono osservare i dati di DLS, riportati in **Tabella 44**.

Tabella 44. dimensione (nm) e PDI delle NLC fresche (NLC-F3) e dopo liofilizzazione, in assenza (NLC-Blank) e in presenza dei 4 crioprotettori (CP) ciascuno in tre differenti rapporti in peso

Campione	Crioprotettore	NLC:CP ratio	Intensity (nm)	PDI
NLC-F3	N.A.	-	162.86 ± 3.12	0.267 ± 0.010
NLC-Blank	NO	-	624.65 ± 54.75	0.541 ± 0.139
NLC-T (A)	Trealosio	1:3	640.25 ± 124.35	0.516 ± 0.055
NLC-T (B)		1:8	519.30 ± 222.10	0.644 ± 0.059
NLC-T (C)		1:13	577.10 ± 7.70	0.625 ± 0.063
NLC-So (A)	Sorbitolo	1:3	372.55 ± 72.85	0.479 ± 0.029
NLC-So (B)		1:8	566.05 ± 108.55	0.553 ± 0.026
NLC-So (C)		1:13	588.20 ± 32.70	0.549 ± 0.046
NLC-M (A)	Mannitolo	1:3	1442.50 ± 502.50	0.888 ± 0.112
NLC-M (B)		1:8	603.90 ± 2.00	0.662 ± 0.014
NLC-M (C)		1:13	759.00 ± 258.00	0.698 ± 0.106
NLC-Sa (A)	Saccarosio	1:3	403.40 ± 12.30	0.513 ± 0.055
NLC-Sa (B)		1:8	340.35 ± 57.35	0.247 ± 0.078
NLC-Sa (C)		1:13	331.40 ± 43.00	0.507 ± 0.025

Come indicato dalle analisi visive preliminari, i campioni aventi mannitolo risultano addirittura peggiori del controllo (senza crioprotettore) e quelli con trealosio o sorbitolo non mostrano evidenti miglieorie rispetto il campione NLC-Blank. Le caratteristiche migliorano una volta aggiunto il saccarosio, con risultati dipendenti dalla concentrazione di tale crioprotettore. In definitiva è stata fatta una scelta di compromesso: il campione da utilizzare per i successivi studi di rilascio è NLC-Sa (B) ovvero quello in cui le NLC ed il saccarosio sono in rapporto in peso pari a 1:8. È opportuno precisare che, nonostante la presenza del crioprotettore, a seguito del processo di freeze-drying, le nanoparticelle ottenute hanno dimensione di circa il doppio rispetto le nanoparticelle fresche (162.86 vs 340.35 nm per le NLC fresche e ridisperse rispettivamente) mentre il valore di PDI resta pressoché invariato. Poiché comunque la dimensione delle NLC liofilizzate resta accettabile (< 500 nm) e considerando che non si osservano variazioni rilevanti in termini di DR%, DL% e LE% rispetto al campione fresco (**Tabella 45**), il campione NLC-Sa (B) è stato scelto per condurre gli studi successivi volti alla valutazione del profilo di rilascio del RSV dalle nanoparticelle ed allo studio della cinetica che governa tale fenomeno.

Tabella 45. Confronto tra i parametri di DR%, DL% e LE% calcolati per la dispersione fresca e dopo freeze-drying

Campione	DR%	DL%	LE%
NLC-F3	96.82 ± 1.34	4.20 ± 0.01	95.17 ± 0.25
NLC-Sa (B)	95.81 ± 1.61	4.22 ± 0.02	96.57 ± 0.25

4.5.3 Studi di rilascio in vitro del RSV e valutazione della cinetica di rilascio

Una efficiente sistema di veicolazione per essere tale deve essere in grado, dopo somministrazione, di rilasciare l'attivo in esso incapsulato, poiché esso deve entrare in contatto con l'organo bersaglio e svolgere la sua azione farmacologica. I test di rilascio sono saggi puramente tecnologici che forniscono informazioni sulle capacità di un sistema *carrier* di controllare la velocità di rilascio dell'attivo. I risultati dei test di rilascio sono spesso metodo-dipendenti e quindi il meccanismo di rilascio può variare in funzione delle condizioni sperimentali (es. setting sperimentale, solvente ecc.). Quindi, nonostante si cerchi di mimare il più possibile le condizioni *in vivo*, spesso, al fine di ottenere delle informazioni più accurate circa il meccanismo di rilascio degli attivi da una formulazione, i parametri operativi possono essere forzati al limite del fisiologico. In questo lavoro è stata studiata la capacità delle NLC di rilasciare il RSV in ambienti chimicamente differenti in modo da utilizzare i risultati ottenuti come *proof of concept* della validità del DDS prodotto quale innovativa ed efficiente piattaforma per la somministrazione ed il rilascio del RSV. L'utilizzo di un solvente acquoso come liquido accettore può dare informazioni sulla capacità del *carrier* di rilasciare l'attivo nei fluidi fisiologici, mentre l'impiego di solventi lipofili può simulare un accumulo nei tessuti biologici. Alla luce delle differenze riscontrate nelle dimensioni delle nanoparticelle prima e dopo freeze drying, gli studi di rilascio sono stati condotti su tre diversi campioni: le NLC-F3 appena preparate, le stesse con l'aggiunta del saccarosio in rapporto 1:8 (NLC-Sa) e infine queste ultime ridisperse dopo essere state sottoposte al processo di freeze drying (NLC-Sa-R).

Per i test di rilascio eseguiti con fluido accettore idrofilo è stato scelto il metodo del sacchetto per dialisi. Aliquote di ciascun campione, dopo opportuna diluizione con tampone citrato pH 5.5, sono state inserite nel compartimento donatore costituito da una *bag* per dialisi avente una membrana in cellulosa rigenerata (inerte ai componenti delle formulazioni) con un cut-off tale da impedire il passaggio delle NLC ma in grado di consentire l'attraversamento del RSV libero. Al fine di garantire l'esistenza di un opportuno gradiente di concentrazione quale forza motrice essenziale per assistere al fenomeno di rilascio (condizioni *sink*), è stato necessario scegliere accuratamente il solvente da utilizzare come fluido accettore, nonché valutare preventivamente la concentrazione di RSV presente nella dispersione nanoparticellare introdotta nel compartimento donatore. Sono stati impiegati due differenti fluidi accettori idrofili: il tampone citrato pH 5.5 o lo stesso addizionato di β -CD allo 0.1% (p/v), scelte per la loro ben nota capacità di aumentare la solubilità del RSV in acqua (Angellotti et al., 2020). La scelta di impiegare i due differenti fluidi accettori acquosi risiede nel duplice obiettivo di voler indagare, in generale, la capacità delle NLC di rilasciare il RSV in ambiente acquoso ed in particolare la possibilità che la velocità di tale cinetica di rilascio venga influenzata dalla presenza di "agenti sequestrati" del RSV, quali potrebbero essere, in vivo, le proteine plasmatiche. I risultati sono riportati come frazione della dose rilasciata in funzione del tempo, sia per gli esperimenti condotti in solo tampone citrato (**Figura 104**) che per quelli condotti in presenza di β -CD (**Figura 105**).

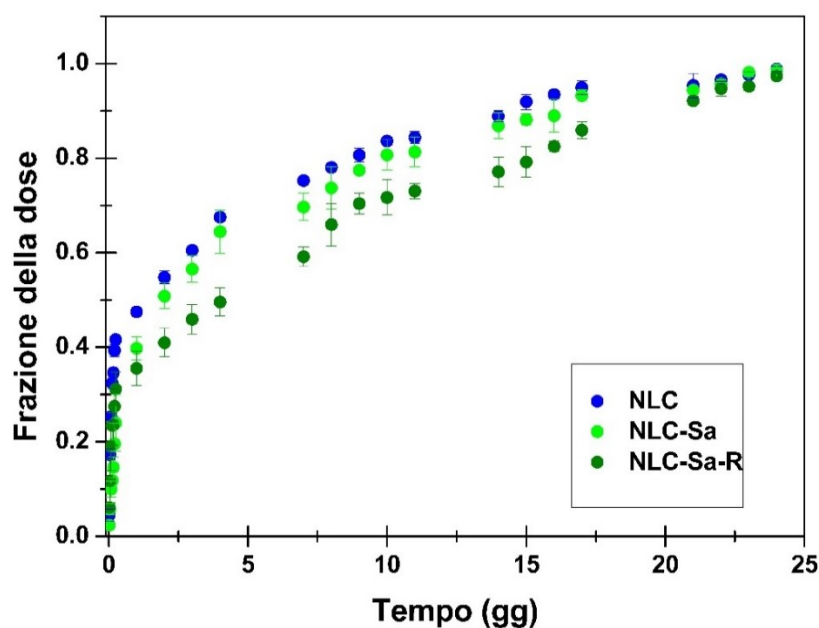


Figura 104. Frazione della dose di RSV rilasciata in funzione del tempo, utilizzando come fluido accettore il tampone citrato pH 5.5. Il compartimento donatore (*bag* per dialisi) è stato caricato con: dispersione di NLC fresche (blu), dispersione di NLC fresche addizionata di saccarosio (verde chiaro) e dispersione di NLC dopo freeze drying (verde scuro).

Come si evince dal grafico, l'andamento dei punti sperimentali è simile in tutti e tre i casi, indice che né la presenza di saccarosio in fase disperdente, né il processo di freeze drying e successiva ridispersione alterano il meccanismo di rilascio. Si tratta, comunque, di un

rilascio lento e controllato che arriva a completezza dopo 24 giorni. L'unica differenza visibile riguarda le NLC sottoposte a freeze drying e ridisperse che rilasciano l'attivo più lentamente, probabilmente a causa del loro diametro maggiore che determina una minore superficie specifica di contatto attraverso la quale il RSV può essere rilasciato.

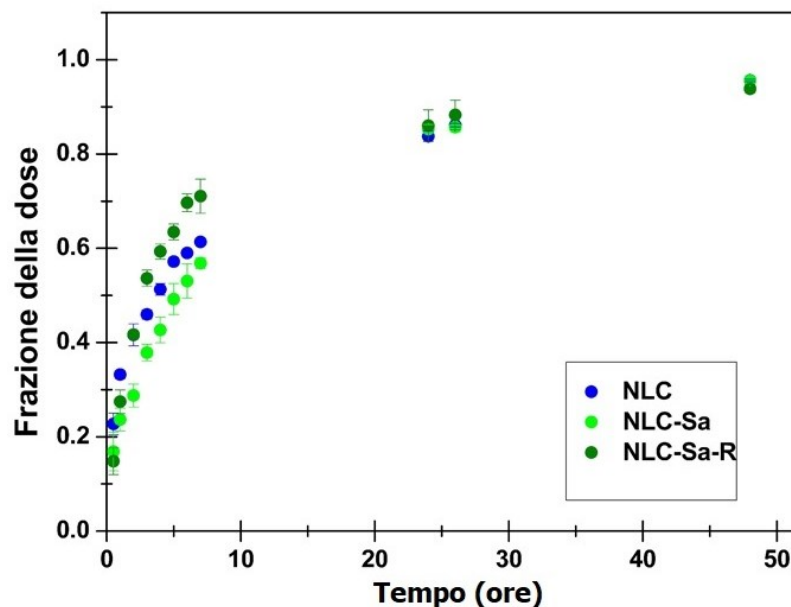


Figura 105. Frazione della dose di RSV rilasciata in funzione del tempo, utilizzando come fluido accettore il tampone citrato pH 5.5 addizionato di β -CD allo 0.1% p/v. Il compartimento donatore (bag per dialisi) è stato caricato con: dispersione di NLC fresche (blu), dispersione di NLC fresche addizionata di saccarosio (verde chiaro) e dispersione di NLC dopo freeze drying (verde scuro).

Come appare evidente, l'aggiunta delle β -CD velocizza il rilascio del RSV che arriva a completezza dopo circa 48 h, con raggiungimento del plateau dopo 24-26 h di esperimento. Anche in questo caso il comportamento dei tre campioni analizzati risulta simile.

Per i test di rilascio in fluido accettore lipofilo è stato scelto il metodo del Transwell modificato, selezionando dei pozzetti transwell aventi cut-off pari a $0.45\ \mu\text{m}$. In questo modo è possibile osservare il passaggio non solo del RSV, ma delle NLC nella loro interezza, dato più rappresentativo di quanto potrebbe accadere in vivo ponendo le NLC a contatto con un tessuto biologico target (es. mucosa del cavo orale). Anche in questo caso sono stati proposti due differenti fluidi accettori: l'1-ottanolo e il miristato di isopropile, scelti come fluidi modello ampiamente usati in letteratura per mimare i tessuti biologici (Abouelmagd et al., 2015; Uhljar et al., 2021). Tuttavia, il miristato di isopropile è stato scartato poiché interferiva nelle analisi spettrofotometriche e si è proceduto esclusivamente con l'1-ottanolo. Al fine di garantire l'esistenza di un opportuno gradiente di concentrazione quale forza motrice essenziale per assistere al fenomeno del rilascio dell'attivo, è stata utilizzata una concentrazione di NLC corrispondente ad una quantità di RSV pari a $0.38\ \text{mg/mL}$. I risultati, riportati come frazione della dose rilasciata in funzione del tempo, sono riportati in **Figura 106**.

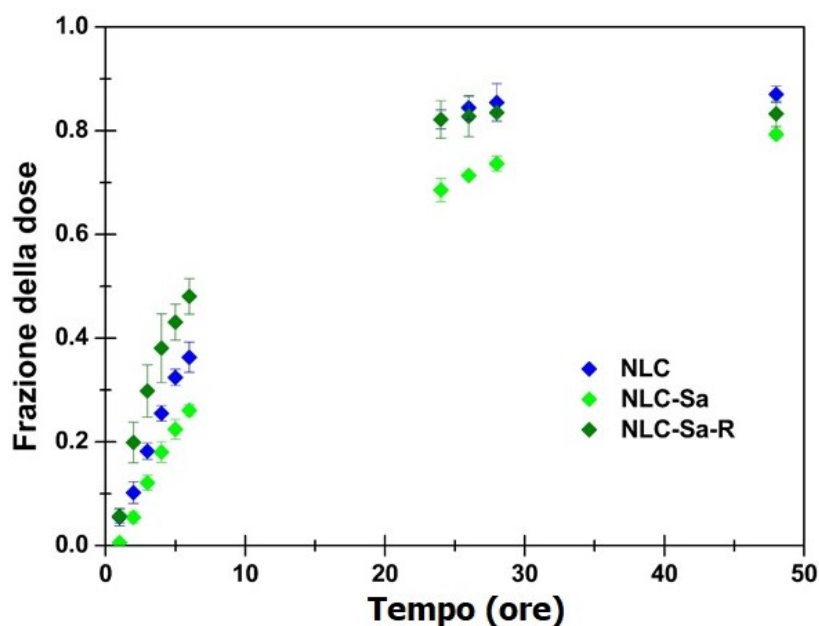


Figura 106. Frazione della dose di RSV rilasciata in funzione del tempo, utilizzando come fluido accettore. Il compartimento donatore (sistema Transwell modificato) è stato caricato con: dispersione di NLC fresche (blu), dispersione di NLC fresche addizionata di saccarosio (verde chiaro) e dispersione di NLC dopo freeze drying (verde scuro).

Anche in questo caso non vi sono grandi differenze nell'andamento delle curve di rilascio del RSV dai diversi campioni, seppur la velocità di fuoriuscita varia nelle prime ore di esperimento, con successivo raggiungimento del plateau dopo circa 28 h. Il campione di NLC fresco contenente il saccarosio in fase disperdente mostra la minore velocità di rilascio, poiché probabilmente il disaccaride disposto sulla superficie delle nanoparticelle fresche crea un guscio idrofilo che ne rallenta la diffusione verso il mezzo accettore lipofilo.

4.5.4 Elaborazione cinetica delle curve di rilascio del RSV dalle NLC

I dati sperimentali ottenuti dagli studi di rilascio in vitro sono stati utilizzati per individuare il meccanismo con cui le NLC libero il RSV. L'elaborazione cinetica è stata effettuata eseguendo uno studio di fitting dei dati sperimentali con alcuni modelli matematici già notoriamente applicati per descrivere il processo di liberazione di un farmaco da un Drug Delivery System.

L'elaborazione matematica è stata condotta utilizzando il software Origin Pro 8.5 e l'estensione DDSolver per Microsoft Excel, impostando la frazione della dose (M_t/M_∞) come variabile dipendente ed il tempo come variabile indipendente. La bontà del fitting è stata valutata sia osservando i valori di R^2 che valutando graficamente il best fitting (Y. Zhang et al., 2010). Tra le equazioni cinetiche considerate si ritrovano: Ordine Zero, Primo Ordine, Higuchi, Hixon-Crowell, Baker-Lonsdale e Korsmeyer-Peppas.

4.5.4.1 Ordine Zero

L'equazione che descrive la cinetica di ordine zero è la seguente:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_0 \cdot t \quad (1)$$

ma può essere opportunamente modificata tenendo conto del fenomeno del *lag time*.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_0 \cdot (t - T_{lag}) \quad (2)$$

La scelta di valutare il fitting anche tenendo conto del fenomeno di *lag time* è motivata da quanto osservabile dalle curve sperimentali ottenute. Nella fattispecie, in tutti i casi, più che un *lag time* è possibile osservare un fenomeno simile al *burst effect*. Questo può essere legato anche all'esistenza di una quota, seppur minima, di RSV presente in forma libera in dispersione, che determina un rilascio iniziale più consistente che, poi, rallenta, anche in relazione alla riduzione progressiva del RSV residuo. L'inserimento del parametro T_{lag} in equazione consente di valutare contemporaneamente fenomeni effettivi di *lag time* ($T_{lag} > 0$), ma anche fenomeni di *burst effect* ($T_{lag} < 0$) sia per quanto riguarda la cinetica di ordine zero che per tutte le altre cinetiche studiate.

Generalmente per l'elaborazione cinetica dei dati di rilascio sono presi in considerazione i punti sperimentali ottenuti fino al raggiungimento del plateau o comunque fino ad un rilascio di attivo pari ad almeno il 60% della dose somministrata. Tuttavia, in questo caso, sono stati presi in considerazione i punti sperimentali ottenuti entro le prime 6-7 ore di esperimento poiché, sebbene sia chiaro che una cinetica di ordine zero non è adattabile al sistema in esame, tale modello potrebbe descrivere un'iniziale cinetica di pseudo ordine zero. I risultati delle elaborazioni matematiche condotti sono riportati in **tabella 46, 47 e 48**.

Tabella 46. Parametri di fitting relativi alla cinetica di ordine zero per i test di rilascio in vitro in tampone citrato pH 5.5 valutando i punti sperimentali fino a 6 ore

<i>Tampone Citrato</i>		NLC	NLC-Sa	NLC-Sa-R
(1)	6 h	$k = 0.066 \pm 0.003$ $R^2 = 0.82946$	$k = 0.051 \pm 0.003$ $R^2 = 0.94947$	$k = 0.029 \pm 0.001$ $R^2 = 0.96763$
(2)	6 h	$k = 0.052 \pm 0.007$ $t_{lag} = -1.50 \pm 0.85$ $R^2 = 0.89870$	$k = 0.045 \pm 0.003$ $t_{lag} = -0.39 \pm 0.05$ $R^2 = 0.97025$	$k = 0.033 \pm 0.001$ $t_{lag} = 0.27 \pm 0.06$ $R^2 = 0.99802$

Tabella 47. Parametri di fitting relativi alla cinetica di ordine zero per i test di rilascio in vitro in tampone citrato pH 5.5 addizionato di β -CD (0.1% p/v) valutando i punti sperimentali fino a 7 ore

<i>Tampone Citrato 0.1% β-CD</i>		NLC	NLC-Sa	NLC-Sa-R
(1)	7 h	<i>Null</i>	$k = 0.087 \pm 0.006$ $R^2 = 0.55293$	<i>null</i>
(2)	7 h	$k = 0.038 \pm 0.007$ $t_{lag} = -9.59 \pm 2.78$ $R^2 = 0.80396$	$k = 0.055 \pm 0.003$ $t_{lag} = -3.49 \pm 0.450$ $R^2 = 0.98101$	$k = 0.078 \pm 0.010$ $t_{lag} = -3.25 \pm 0.76$ $R^2 = 0.90384$

Tabella 48. Parametri di fitting relativi alla cinetica di ordine zero per i test di rilascio in vitro in 1-ottanolo valutando i punti sperimentali fino a 6 ore

<i>1-Ottanolo</i>		NLC	NLC-Sa	NLC-Sa-R
(1)	6 h	$k = 0.062 \pm 0.005$ $R^2 = 0.98830$	$k = 0.043 \pm 0.003$ $R^2 = 0.94660$	$k = 0.087 \pm 0.010$ $R^2 = 0.95440$
(2)	6 h	$k = 0.065 \pm 0.001$ $t_{lag} = 0.23 \pm 0.22$ $R^2 = 0.99150$	$k = 0.053 \pm 0.003$ $t_{lag} = 0.83 \pm 0.13$ $R^2 = 0.99090$	$k = 0.083 \pm 0.003$ $t_{lag} = -0.21 \pm 0.35$ $R^2 = 0.95740$

Dai risultati ottenuti è possibile affermare che la cinetica di ordine zero non è idonea per descrivere il meccanismo di rilascio delle NLC in studio.

4.5.4.2 Primo ordine

L'equazione che descrive la cinetica del primo ordine è la seguente:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t}) \quad (3)$$

Ma può essere opportunamente modificata tenendo conto del fenomeno del *lag time*.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 \cdot \left[1 - e^{-k_1 \cdot (t - T_{lag})} \right] \quad (4)$$

Alla luce del fatto che gli esperimenti condotti in 1-ottanolo non vanno a completezza, ma raggiungono un plateau in corrispondenza di una F_{max} misurabile, questa è stata considerata modificando le equazioni cinetiche del primo ordine come segue:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = F_{max} \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t}) \quad (5)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = F_{max} \cdot [1 - e^{-k_1 \cdot (t - T_{lag})}] \quad (6)$$

Per lo studio di fitting sono stati presi in considerazione diversi end point sperimentali, in relazione ai risultati ottenuti in termini di curve di rilascio precedentemente mostrate:

- Per gli esperimenti condotti in ambiente acquoso in presenza di β -CD e quelli condotti in 1-ottanolo sono stati presi in considerazione sia i punti sperimentali fino a 26-28 h (raggiungimento del plateau) che tutti i punti sperimentali fino a 48 h (per studiare la cinetica nella sua completezza);
- Per gli esperimenti condotti in solo tampone citrato pH 5.5 sono stati presi in considerazione tutti i punti sperimentali fino a 24 gg poiché non è mai identificabile un plateau.

Tali considerazioni saranno valide anche per l'applicazione degli altri modelli matematici considerati. I risultati dell'elaborazione cinetica dei test di rilascio con fluido accettore idrofilo sono mostrati in **Tabella 49** e **50**, quelli relativi allo studio di rilascio in mezzo accettore lipofilo sono invece riportati in **Tabella 51**.

Tabella 49. Parametri di fitting relativi alla cinetica di primo ordine per i test di rilascio in vitro in tampone citrato pH 5.5 valutando i punti sperimentali fino a 24 giorni

Tampone Citrato		NLC	NLC-Sa	NLC-Sa-R
(3)	24 g	$k = 1.808 \pm 0.538$ $R^2 = 0.62881$	$k = 0.166 \pm 0.005$ $R^2 = 0.99303$	$k = 0.131 \pm 0.009$ $R^2 = 0.96714$
(4)	24 g	$k = 0.155 \pm 0.013$ $t_{lag} = -2.366 \pm 0.338$ $R^2 = 0.96305$	$k = 0.162 \pm 0.004$ $t_{lag} = -0.247 \pm 0.088$ $R^2 = 0.99478$	$k = 0.122 \pm 0.006$ $t_{lag} = -0.862 \pm 0.200$ $R^2 = 0.98930$

Tabella 50. Parametri di fitting relativi alla cinetica di primo ordine per i test di rilascio in vitro in tampone citrato pH 5.5 addizionato di β -CD (0.1% p/v) valutando i punti sperimentali fino a 26 e 48 ore

Tampone Citrato 0.1% β-CD		NLC	NLC-Sa	NLC-Sa-R
(3)	26 h	$k = 0.151 \pm 0.009$ $R^2 = 0.63674$	$k = 0.106 \pm 0.012$ $R^2 = 0.87575$	$k = 0.240 \pm 0.013$ $R^2 = 0.088414$
	48 h	$k = 0.151 \pm 0.009$ $R^2 = 0.87948$	$k = 0.101 \pm 0.012$ $R^2 = 0.91686$	$k = 0.240 \pm 0.015$ $R^2 = 0.94788$
(4)	26 h	$k = 0.063 \pm 0.008$ $t_{lag} = -7.767 \pm 1.684$ $R^2 = 0.94834$	$k = 0.070 \pm 0.004$ $t_{lag} = -3.576 \pm 0.645$ $R^2 = 0.98257$	$k = 0.172 \pm 0.019$ $t_{lag} = -0.980 \pm 0.373$ $R^2 = 0.94651$
	48 h	$k = 0.058 \pm 0.006$ $t_{lag} = -8.752 \pm 1.502$ $R^2 = 0.98359$	$k = 0.064 \pm 0.004$ $t_{lag} = -4.322 \pm 0.742$ $R^2 = 0.98723$	$k = 0.172 \pm 0.027$ $t_{lag} = -0.990 \pm 0.523$ $R^2 = 0.96506$

Tabella 51. Parametri di fitting relativi alla cinetica di primo ordine per i test di rilascio in vitro in 1-ottanolo valutando i punti sperimentali fino a 28 e 48 ore

<i>1-Ottanolo</i>		NLC	NLC-Sa	NLC-Sa-R
(3)	28 h	$k = 7.2 \cdot 10^{-4} \pm 7 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.9975$	$k = 4.810^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.99500$	$k = 9.8 \cdot 10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-4}$ $R^2 = 0.94620$
	48 h	$k = 7.0 \cdot 10^{-4} \pm 7 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.98890$	$k = 4.6 \cdot 10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.98460$	$k = 9.6 \cdot 10^{-4} \pm 2.1 \cdot 10^{-4}$ $R^2 = 0.92220$
(4)	28 h	$k = 7.4 \cdot 10^{-4} \pm 6 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = 0.186 \pm 0.001$ $R^2 = 0.99780$	$k = 5.0 \cdot 10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = 0.450 \pm 0.002$ $R^2 = 0.99690$	$k = 7.8 \cdot 10^{-4} \pm 1.2 \cdot 10^{-4}$ $t_{lag} = -1.159 \pm 0.001$ $R^2 = 0.96110$
	48 h	$k = 7.1 \cdot 10^{-4} \pm 6 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = 0.052 \pm 0.054$ $R^2 = 0.98890$	$k = 4.7 \cdot 10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = 0.205 \pm 0.204$ $R^2 = 0.98490$	$k = 7.1 \cdot 10^{-4} \pm 1.1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = -1.568 \pm 0.099$ $R^2 = 0.94150$
(5)	28 h	$k = 0.093 \pm 0.005$ $F_{max} = 0.870 \pm 0.016$ $R^2 = 0.98746$	$k = 0.082 \pm 0.008$ $F_{max} = 0.793 \pm 0.008$ $R^2 = 0.98677$	$k = 0.146 \pm 0.001$ $F_{max} = 0.833 \pm 0.025$ $R^2 = 0.99187$
	48 h	$k = 0.093 \pm 0.005$ $F_{max} = 0.870 \pm 0.016$ $R^2 = 0.99146$	$k = 0.081 \pm 0.007$ $F_{max} = 0.793 \pm 0.008$ $R^2 = 0.98705$	$k = 0.146 \pm 0.013$ $F_{max} = 0.833 \pm 0.025$ $R^2 = 0.99195$
(6)	28 h	$k = 0.109 \pm 0.006$ $F_{max} = 0.870 \pm 0.016$ $t_{lag} = 0.687 \pm 0.158$ $R^2 = 0.99548$	$k = 0.092 \pm 0.001$ $F_{max} = 0.793 \pm 0.008$ $t_{lag} = 0.936 \pm 0.032$ $R^2 = 0.99984$	$k = 0.177 \pm 0.010$ $F_{max} = 0.833 \pm 0.025$ $t_{lag} = 0.601 \pm 0.083$ $R^2 = 0.99855$
	48 h	$k = 0.109 \pm 0.006$ $F_{max} = 0.870 \pm 0.016$ $t_{lag} = 0.690 \pm 0.150$ $R^2 = 0.99698$	$k = 0.092 \pm 0.001$ $F_{max} = 0.793 \pm 0.008$ $t_{lag} = 0.936 \pm 0.032$ $R^2 = 0.99983$	$k = 0.177 \pm 0.009$ $F_{max} = 0.833 \pm 0.025$ $t_{lag} = 0.601 \pm 0.078$ $R^2 = 0.99859$

Dai risultati ottenuti si osserva che la cinetica di primo ordine non è adatta a descrivere le curve di rilascio del RSV in fluidi acquosi. Tuttavia, quando si tiene conto sia del fenomeno del *lag time* che dell' F_{max} , tale cinetica descrive molto bene le curve di rilascio del RSV in fluido accettore lipofilo, come riportato graficamente in **Figura 107**.

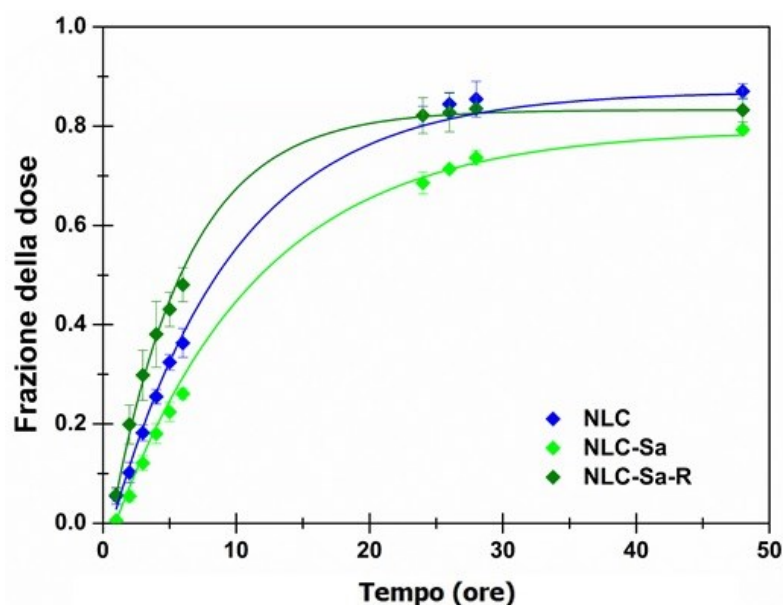


Figura 107. Profilo di rilascio del RSV in tampone 1-ottanolo riportato come frazione della dose rilasciata in funzione del tempo. È messo in evidenza il fitting con il modello del Primo ordine con *lag time* ed $F_{\max}$.

4.5.4.3 Higuchi

Il modello di Higuchi è stato considerato per valutare se le nanoparticelle si comportassero come sistemi matriciali inerti. L'equazione che descrive la cinetica di Higuchi può essere scritta tenendo conto o meno del fenomeno del *lag time*:

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = k_H \cdot t^{0.5} \quad (7)$$

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = k_H \cdot (t - T_{lag})^{0.5} \quad (8)$$

Tuttavia, come riportato dai risultati ottenuti (**Tabella 52, 53 e 54**) questo modello non risulta idoneo a descrivere il meccanismo di rilascio del RSV, né in fluido accettore idrofilo né in ambiente lipofilo.

Tabella 52. Parametri di fitting relativi alla cinetica di Higuchi per i test di rilascio in vitro in tampone citrato pH 5.5 valutando i punti sperimentali fino a 4 e 24 giorni

Tampone Citrato		NLC	NLC-Sa	NLC-Sa-R
(7)	24 g	$k = 0.224 \pm 0.010$ $R^2 = 0.61968$	$k = 0.210 \pm 0.004$ $R^2 = 0.92706$	$k = 0.202 \pm 0.002$ $R^2 = 0.98013$
(8)	24 g	$k = 0.201 \pm 0.001$ $t_{lag} = -3.242 \pm 0.760$ $R^2 = 0.88933$	$k = 0.210 \pm 0.004$ $t_{lag} = -0.029 \pm 0.113$ $R^2 = 0.92394$	$k = 0.201 \pm 0.002$ $t_{lag} = -0.201 \pm 0.099$ $R^2 = 0.98413$

Tabella 53. Parametri di fitting relativi alla cinetica di Higuchi per i test di rilascio in vitro in tampone citrato pH 5.5 addizionato di β -CD (0.1% p/v) valutando i punti sperimentali fino a 26 e 48 h

Tampone Citrato 0.1% β-CD		NLC	NLC-Sa	NLC-Sa-R
(7)	26 h	Null	$k = 0.178 \pm 0.005$ $R^2 = 0.91968$	$k = 0.257 \pm 0.018$ $R^2 = 0.47482$
	48 h	Null	$k = 0.144 \pm 0.005$ $R^2 = 0.76296$	$k = 0.160 \pm 0.017$ $R^2 = 0.19041$
(8)	26 h	$k = 0.147 \pm 0.009$ $t_{lag} = -9.641 \pm 1.978$ $R^2 = 0.90983$	$k = 0.166 \pm 0.005$ $t_{lag} = -2.326 \pm 0.843$ $R^2 = 0.96329$	$k = 0.199 \pm 0.025$ $t_{lag} = -2.629 \pm 1.430$ $R^2 = 0.70826$
	48 h	$k = 0.121 \pm 0.005$ $t_{lag} = -17.133 \pm 2.585$ $R^2 = 0.94388$	$k = 0.130 \pm 0.006$ $t_{lag} = -8.784 \pm 3.550$ $R^2 = 0.88910$	$k = 0.126 \pm 0.011$ $t_{lag} = -10.880 \pm 3.330$ $R^2 = 0.83860$

Tabella 54. Parametri di fitting relativi alla cinetica di Higuchi per i test di rilascio in vitro in 1-ottanolo valutando i punti sperimentali fino a 28 e 48 h

1-Ottanolo		NLC	NLC-Sa	NLC-Sa-R
(7)	28 h	$k = 0.156 \pm 0.006$ $R^2 = 0.95030$	$k = 0.128 \pm 0.004$ $R^2 = 0.90860$	$k = 0.166 \pm 0.009$ $R^2 = 0.95960$
	48 h	$k = 0.146 \pm 0.005$ $R^2 = 0.92930$	$k = 0.124 \pm 0.003$ $R^2 = 0.92140$	$k = 0.151 \pm 0.007$ $R^2 = 0.87870$
(8)	28 h	$k = 0.171 \pm 0.005$ $t_{lag} = 1.659 \pm 0.134$ $R^2 = 0.99510$	$k = 0.145 \pm 0.001$ $t_{lag} = 2.306 \pm 0.379$ $R^2 = 0.99500$	$k = 0.169 \pm 0.005$ $t_{lag} = 0.386 \pm 0.005$ $R^2 = 0.96310$
	48 h	$k = 0.153 \pm 0.003$ $t_{lag} = 1.089 \pm 0.004$ $R^2 = 0.94750$	$k = 0.134 \pm 0.001$ $t_{lag} = 2.000 \pm 0.001$ $R^2 = 0.97370$	$k = 0.148 \pm 0.002$ $t_{lag} = -0.575 \pm 0.010$ $R^2 = 0.88090$

4.5.4.4 Baker-Lonsdale

Il modello di Baker-Lonsdale è una derivazione della cinetica di Higuchi che si applica per lo studio di rilascio degli attivi da matrici sferiche inerti. È, pertanto, uno dei modelli più utilizzati per la valutazione cinetica del rilascio da sistemi micro- e nano-particellari (Baker & Sanders, 1986) e l'equazione che lo descrive è la seguente:

$$\frac{3}{2} \cdot \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{\frac{2}{3}} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = k_{BL} \cdot t \quad (9)$$

Questa può essere modificata come segue per includere fenomeni di lag time:

$$\frac{3}{2} \cdot \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{\frac{2}{3}} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = k_{BL} \cdot (t - T_{lag}) \quad (10)$$

Tuttavia, analogamente al modello di Higuchi, la cinetica di Baker-Lonsdale non risulta in nessun caso idonea a descrivere il meccanismo di rilascio del RSV dalle NLC (**Tabella 55, 56 e 57**).

Tabella 55. Parametri di fitting relativi alla cinetica di Baker-Lonsdale per i test di rilascio in vitro in tampone citrato pH 5.5 valutando i punti sperimentali fino a 24 giorni

<i>Tampone Citrato</i>		NLC	NLC-Sa	NLC-Sa-R
(9)	24 g	$k = 2.1 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.85420$	$k = 2 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.98690$	$k = 1.5 \cdot 10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.94180$
	24 g	$k = 2 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = -0.651 \pm 0.001$ $R^2 = 0.94800$	$k = 1.9 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = -0.204 \pm 0.280$ $R^2 = 0.98700$	$k = 1.3 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = -0.437 \pm 0.180$ $R^2 = 0.97790$

Tabella 56. Parametri di fitting relativi alla cinetica di Baker-Lonsdale per i test di rilascio in vitro in tampone citrato pH 5.5 addizionato di β -CD (0.1% p/v) valutando i punti sperimentali fino a 26 e 48 h

<i>Tampone Citrato 0.1% β-CD</i>		NLC	NLC-Sa	NLC-Sa-R
(9)	26 h	$k = 1.3 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.92450$	$k = 1 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.99510$	$k = 1.7 \cdot 10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.92140$
	48 h	$k = 1 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.90720$	$k = 1 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.99420$	$k = 1 \cdot 10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.79390$
(10)	26 h	$k = 1.1 \cdot 10^{-4} \pm 3 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = -1.004 \pm 0.232$ $R^2 = 0.96700$	$k = 1 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = -0.030 \pm 0.228$ $R^2 = 0.99510$	$k = 1.9 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = 0.188 \pm 0.102$ $R^2 = 0.92900$
	48 h	$k = 1 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = -1.125 \pm 0.262$ $R^2 = 0.97290$	$k = 1 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = -0.048 \pm 0.224$ $R^2 = 0.99430$	$k = 1 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = -1.367 \pm 0.529$ $R^2 = 0.85450$

Tabella 57. Parametri di fitting relativi alla cinetica di Baker-Lonsdale per i test di rilascio in vitro in 1-ottanolo valutando i punti sperimentali fino a 28 e 48 h

<i>1-Ottanolo</i>		NLC	NLC-Sa	NLC-Sa-R
(9)	28 h	$k = 6 \cdot 10^{-5} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.89340$	$k = 4 \cdot 10^{-5} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.85960$	$k = 7 \cdot 10^{-5} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.95420$
	48 h	$k = 6 \cdot 10^{-5} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.91100$	$k = 4 \cdot 10^{-5} \pm 2 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.88950$	$k = 7 \cdot 10^{-5} \pm 2 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.94440$
(10)	28 h	$k = 8 \cdot 10^{-5} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = 2.087 \pm 0.387$ $R^2 = 0.98570$	$k = 5 \cdot 10^{-5} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = 2.709 \pm 0.090$ $R^2 = 0.98940$	$k = 9 \cdot 10^{-5} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = 1.067 \pm 0.003$ $R^2 = 0.99600$
	48 h	$k = 8 \cdot 10^{-5} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = 2.040 \pm 0.343$ $R^2 = 0.98040$	$k = 5 \cdot 10^{-5} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = 2.652 \pm 0.111$ $R^2 = 0.98610$	$k = 8 \cdot 10^{-5} \pm 2 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = 0.908 \pm 0.055$ $R^2 = 0.97110$

4.5.4.5 Hixson-Crowell

L'equazione che descrive la cinetica di Hixson-Crowell è la seguente:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 \cdot [1 - (1 - K_{hc} \cdot t)^3] \quad (11)$$

ma può essere opportunamente modificata tenendo conto di fenomeni di lag time:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 \cdot \left\{ 1 - [1 - K_{hc} \cdot (t - T_{lag})]^3 \right\} \quad (12)$$

Tale cinetica descrive il rilascio di attivo che avviene in piani paralleli alla superficie della formulazione e tiene conto di una riduzione graduale della superficie nel tempo, ma con mantenimento della forma geometrica. Quando viene utilizzato questo modello si presume che il rilascio del farmaco sia limitato dalla velocità di dissoluzione dell'intero sistema e non dalla diffusione dell'attivo attraverso la matrice (Hixson & Crowell, 1931). Anche questo modello, però, non è idoneo a descrivere il rilascio del RSV dalle NLC in nessun caso (Tabella 58, 59 e 60).

Tabella 58. Parametri di fitting relativi alla cinetica di Hixson-Crowell per i test di rilascio in vitro in tampone citrato pH 5.5 valutando i punti sperimentali fino a 24 giorni

<i>Tampone Citrato</i>		NLC	NLC-Sa	NLC-Sa-R
(11)	24 g	k = 0.056 ± 0.007 R ² = 0.59389	k = 0.043 ± 0.001 R ² = 0.98505	k = 0.031 ± 0.002 R ² = 0.95725
(12)	24 g	k = 0.034 ± 0.003 t _{lag} = 0.120 ± 0.010 R ² = 0.95243	k = 0.042 ± 0.002 t _{lag} = 0.0150 ± 0.007 R ² = 0.98692	k = 0.027 ± 0.001 t _{lag} = 0.040 ± 0.008 R ² = 0.98114

Tabella 59. Parametri di fitting relativi alla cinetica di Hixson-Crowell per i test di rilascio in vitro in tampone citrato pH 5.5 addizionato di β-CD (0.1% p/v) valutando i punti sperimentali fino a 26 e 48 h

<i>Tampone Citrato 0.1% β-CD</i>		NLC	NLC-Sa	NLC-Sa-R
(11)	26 h	k = 0.045 ± 0.003 R ² = 0.49112	k = 0.037 ± 0.060 R ² = 0.73342	k = 0.061 ± 0.005 R ² = 0.51923
	48 h	k = 0.031 ± 0.003 R ² = 0.14769	k = 0.024 ± 0.003 R ² = 0.81635	k = 0.030 ± 0.004 R ² = 0.0362
(12)	26 h	k = 0.013 ± 0.002 t _{lag} = -16.644 ± 2.743 R ² = 0.92214	k = 0.016 ± 0.001 t _{lag} = -6.570 ± 1.270 R ² = 0.96225	k = 0.044 ± 0.006 t _{lag} = -1.702 ± 0.550 R ² = 0.92352
	48 h	k = 0.011 ± 0.001 t _{lag} = -16.779 ± 2.793 R ² = 0.97062	k = 0.013 ± 0.001 t _{lag} = -9.035 ± 2.082 R ² = 0.95771	k = 0.022 ± 0.006 t _{lag} = -5.708 ± 2.289 R ² = 0.90797

Tabella 60. Parametri di fitting relativi alla cinetica di Hixson-Crowell per i test di rilascio in vitro in 1-ottanolo valutando i punti sperimentali fino a 28 e 48 h

<i>1-Ottanolo</i>		NLC	NLC-Sa	NLC-Sa-R
(11)	28 h	$k = 1.9 \cdot 10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.98520$	$k = 1.3 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.99170$	$k = 3.0 \cdot 10^{-4} \pm 9 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.86820$
	48 h	$k = 1.9 \cdot 10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.97160$	$k = 1.3 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.96670$	$k = 2.4 \cdot 10^{-4} \pm 4 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.84290$
(12)	28 h	$k = 1.8 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = -0.749 \pm 0.148$ $R^2 = 0.99020$	$k = 1.3 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = -0.164 \pm 0.270$ $R^2 = 0.9919$	$k = 1.7 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = -3.166 \pm 0.516$ $R^2 = 0.93600$
	48 h	$k = 1.8 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = -0.839 \pm 0.077$ $R^2 = 0.97640$	$k = 1.2 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = -0.617 \pm 0.275$ $R^2 = 0.96860$	$k = 1.6 \cdot 10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-5}$ $t_{lag} = -3.485 \pm 0.003$ $R^2 = 0.91100$

4.5.4.6 Korsmeyer-Peppas (Power Law)

Si tratta di un modello semiempirico utilizzato per descrivere il rilascio di farmaci da un sistema matriciale quando non è nota la cinetica, oppure quando sono coinvolti più meccanismi di rilascio. L'equazione che descrive la cinetica di Korsmeyer-Peppas è la seguente:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{KP} \cdot t^n \quad (13)$$

Ma può essere opportunamente modificata per includere fenomeni di lag time:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{KP} \cdot (t - T_{lag})^n \quad (14)$$

I risultati ottenuti applicando questo modello sono riportati in **Tabella 61, 62 e 63**.

Tabella 61. Parametri di fitting relativi alla cinetica di Korsmeyer-Peppas (Power Law) per i test di rilascio in vitro in tampone citrato pH 5.5 valutando i punti sperimentali fino a 24 giorni

<i>Tampone Citrato</i>		NLC	NLC-Sa	NLC-Sa-R
(13)	24 g	$k = 0.490 \pm 0.01$ $n = 0.222 \pm 0.007$ $R^2 = 0.98720$	$k = 0.368 \pm 0.020$ $n = 0.313 \pm 0.018$ $R^2 = 0.98435$	$k = 0.315 \pm 0.011$ $n = 0.354 \pm 0.012$ $R^2 = 0.99618$
	24 g	$k = 0.513 \pm 0.007$ $t_{lag} = 0.037 \pm 0.004$ $n = 0.205 \pm 0.001$ $R^2 = 0.99469$	$k = 0.453 \pm 0.012$ $t_{lag} = 0.158 \pm 0.015$ $n = 0.245 \pm 0.009$ $R^2 = 0.99734$	$k = 0.333 \pm 0.014$ $t_{lag} = 0.014 \pm 0.004$ $n = 0.335 \pm 0.001$ $R^2 = 0.99656$

Tabella 62. Parametri di fitting relativi alla cinetica di Korsmeyer-Peppas (Power Law) per i test di rilascio in vitro in tampone citrato pH 5.5 addizionato di β -CD (0.1% p/v) valutando i punti sperimentali fino a 26 e 48 ore

<i>Tampone Citrato 0.1% β-CD</i>		NLC	NLC-Sa	NLC-Sa-R
(13)	26 h	$k = 0.372 \pm 0.007$ $n = 0.259 \pm 0.009$ $R^2 = 0.98834$	$k = 0.264 \pm 0.013$ $n = 0.366 \pm 0.016$ $R^2 = 0.98933$	$k = 0.347 \pm 0.021$ $n = 0.321 \pm 0.037$ $R^2 = 0.87204$
	48 h	$k = 0.388 \pm 0.007$ $n = 0.235 \pm 0.005$ $R^2 = 0.99249$	$k = 0.315 \pm 0.026$ $n = 0.290 \pm 0.023$ $R^2 = 0.96738$	$k = 0.374 \pm 0.023$ $n = 0.243 \pm 0.020$ $R^2 = 0.93502$
(14)	26 h	$k = 0.395 \pm 0.017$ $t_{lag} = 0.520 \pm 0.293$ $n = 0.240 \pm 0.016$ $R^2 = 0.97566$	$k = 0.344 \pm 0.070$ $t_{lag} = 1.512 \pm 0.863$ $n = 0.288 \pm 0.064$ $R^2 = 0.92034$	$k = 0.528 \pm 0.070$ $t_{lag} = 1.764 \pm 0.342$ $n = 0.163 \pm 0.068$ $R^2 = 0.78983$
	48 h	$k = 0.437 \pm 0.084$ $t_{lag} = 1.437 \pm 2.279$ $n = 0.205 \pm 0.051$ $R^2 = 0.91111$	$k = 0.539 \pm 0.272$ $t_{lag} = 5.427 \pm 4.294$ $n = 0.153 \pm 0.135$ $R^2 = 0.62946$	$k = 0.440 \pm 0.022$ $t_{lag} = 0.942 \pm 0.110$ $n = 0.201 \pm 0.016$ $R^2 = 0.95874$

Tabella 63. Parametri di fitting relativi alla cinetica di Korsmeyer-Peppas (Power Law) per i test di rilascio in vitro in 1-ottanolo valutando i punti sperimentali fino a 28 e 48 h

<i>1-Ottanolo</i>		NLC	NLC-Sa	NLC-Sa-R
(13)	28 h	$k = 0.099 \pm 0.011$ $n = 0.659 \pm 0.025$ $R^2 = 0.98830$	$k = 0.057 \pm 0.008$ $n = 0.775 \pm 0.036$ $R^2 = 0.98990$	$k = 0.177 \pm 0.032$ $n = 0.481 \pm 0.046$ $R^2 = 0.96090$
	48 h	$k = 0.134 \pm 0.012$ $n = 0.529 \pm 0.002$ $R^2 = 0.93110$	$k = 0.086 \pm 0.008$ $n = 0.614 \pm 0.021$ $R^2 = 0.94340$	$k = 0.206 \pm 0.031$ $n = 0.404 \pm 0.034$ $R^2 = 0.91370$
(14)	28 h	$k = 0.134 \pm 0.011$ $t_{lag} = 0.872 \pm 0.001$ $n = 0.571 \pm 0.016$ $R^2 = 0.99470$	$k = 0.112 \pm 0.011$ $t_{lag} = 1.740 \pm 0.001$ $n = 0.580 \pm 0.026$ $R^2 = 0.99960$	$k = 0.242 \pm 0.042$ $t_{lag} = 0.980 \pm 0.001$ $n = 0.386 \pm 0.045$ $R^2 = 0.9932$
	48 h	$k = 0.221 \pm 0.015$ $t_{lag} = 1.910 \pm 0.001$ $n = 0.394 \pm 0.012$ $R^2 = 0.96330$	$k = 0.174 \pm 0.012$ $t_{lag} = 2.500 \pm 0.005$ $n = 0.425 \pm 0.001$ $R^2 = 0.97850$	$k = 0.326 \pm 0.043$ $t_{lag} = 1.865 \pm 0.001$ $n = 0.276 \pm 0.001$ $R^2 = 0.97090$

Com'è possibile osservare, tale modello non risulta idoneo a descrivere il rilascio di RSV in 1-ottanolo, ma, quando si considera anche il fenomeno del lag time, tale modello aderisce bene alle curve sperimentali ottenute in ambiente idrofilo, sia in presenza che in assenza di β -CD (Figura 108 e 109).

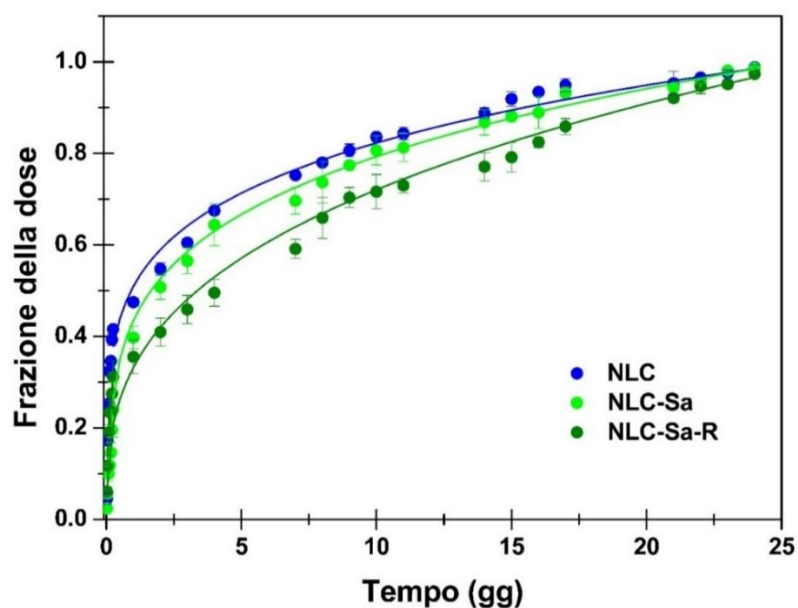


Figura 108. Profilo di rilascio del RSV in tampone citrato riportato come frazione della dose rilasciata in funzione del tempo. È messo in evidenza il fitting con il modello di Korsmeyer-Peppas.

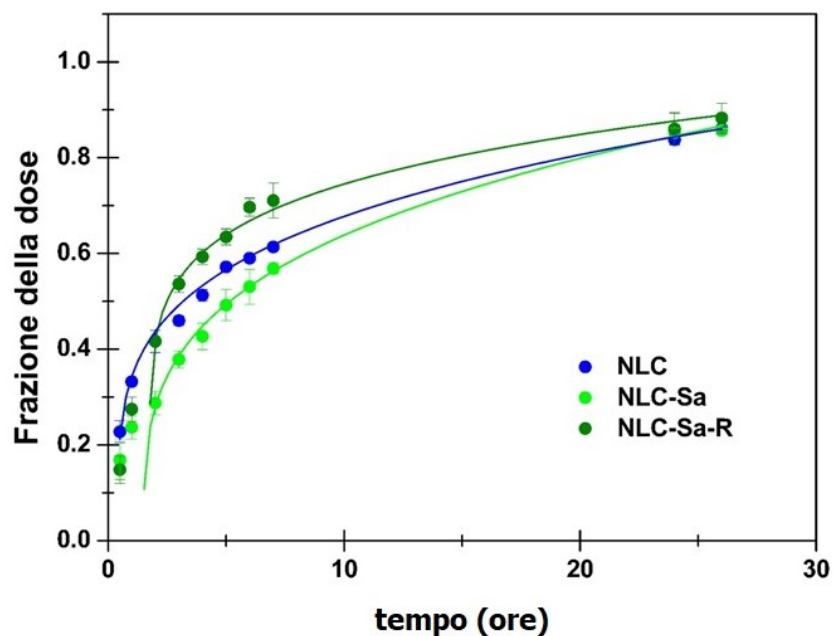


Figura 109. Profilo di rilascio del RSV in tampone citrato pH 5.5 addizionato di β -CD riportato come frazione della dose rilasciata in funzione del tempo. È messo in evidenza il fitting con il modello di Korsmeyer-Peppas fino a 26 h

In entrambi i casi si ottengono valori sperimentali di n compresi tra 0.200 e 0.350. Sebbene questi siano anomali per la cinetica di Kosmeyer-Peppas, recenti studi hanno messo in evidenza bassi valori del coefficiente n (< 0.5) per descrivere un comportamento complessivo non-Fickiano, attribuibile a nanoparticelle che presentano una barriera distintiva (es. superficie rivestita, superficie lipofila) che offre un ostacolo in grado di determinare una limitazione all'ingresso del solvente e, quindi, al rilascio dell'attivo.

4.5.5 Considerazioni generali sul meccanismo di rilascio del RSV dalle NLC

In conclusione, gli esperimenti condotti in entrambi i fluidi accettori idrofili sono ben descritti dalla cinetica di Kosmeyer-Peppas quando si considera anche il fenomeno del *lag time*, e sono caratterizzati dall'ottenimento di valori di esponente n inferiori a 0.5. Questi risultati possono essere attribuibili ad un comportamento complessivamente di tipo non-Fickiano presumibilmente dovuto alla natura lipofila dei componenti delle NLC che costituiscono una barriera nei confronti del solvente con conseguente limitazione al rilascio del RSV.

Per quanto riguarda, invece, gli studi condotti con un liquido accettore lipofilo, questi sono ben descritti da una cinetica del primo ordine, quando si tengono in considerazione i fenomeni del *lag time* e dell' F_{MAX} . Infatti, è ipotizzabile che non si verifichi un effettivo rilascio del RSV dai nanosistemi all'1-ottanolo, bensì che avvenga la diffusione delle NLC dal mezzo donatore acquoso al mezzo accettore lipofilo, per il quale sono più affini. Questo processo è verosimilmente dipendente dalla concentrazione delle NLC nel donatore e, pertanto, ben descritto dal modello cinetico del primo ordine. Inoltre, è bene precisare che i valori di *lag time* ottenuti sono positivi ed effettivamente è verosimile che le NLC impieghino un certo tempo per diffondere all'interno del mezzo acquoso e raggiungere il medium lipofilo.

Complessivamente è inoltre possibile affermare che il meccanismo di rilascio del RSV è totalmente indipendente dalla presenza o meno del crioprotettore e dal processo di freeze drying e successiva ridispersione, così come è evidente che la cinetica di rilascio dell'attivo cambi in funzione della tipologia di fluido accettore considerato e di setting sperimentale. I risultati ottenuti, dunque, da una parte confermano l'effettiva bontà delle NLC proposte come drug delivery platform per il rilascio del RSV in differenti ambienti e, dall'altra, avvalorano la possibilità di deidratare le dispersioni di NLC riducendo i costi di stoccaggio ed aumentandone la stabilità, in quanto è evidente che, sebbene dopo dispersione i campioni siano diversi dagli "originali" in termini di dimensione particellare, questa non influenza in alcun modo la cinetica di rilascio dell'attivo.

4.5.6 Valutazione biologica delle NLC cariche di RSV

Al fine di effettuare un primo saggio la compatibilità delle NLC cariche di RSV con sistemi cellulari, e confrontarlo con il RSV puro, sono stati condotti studi di citotossicità *in vitro* su cellule fibroblastiche murine di tipo BALB/3-T3. Le cellule sono state testate con una dispersione fresca di NLC-F3 opportunamente diluita al fine di ottenere crescenti concentrazioni di RSV comprese tra 2.5 e 50 μ M. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti dal trattamento con una soluzione di RSV puro alle medesime concentrazioni e con la fase disperdente acquosa delle NLC (alle medesime diluizioni campione NLC-F3), quest'ultima utilizzata come controllo negativo, per valutare eventuali effetti citotossici del

tensioattivo. Il trattamento è stato condotto per 24 ore al termine del quale si è valutata la vitalità cellulare mediante MTT test (**Figura 110**).

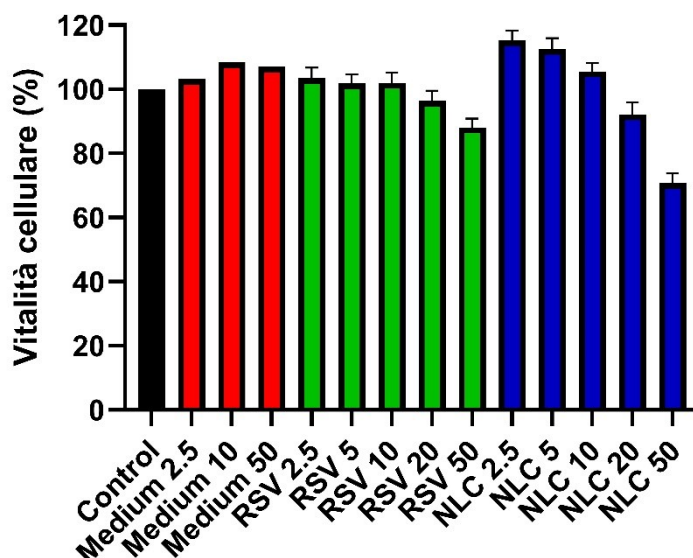


Figura 110: Vitalità percentuale delle cellule BALB-3-T3 dopo 24 ore di trattamento con differenti concentrazioni del campione NLC-F3 (**blu**), soluzione di RSV (**verde**) ed il mezzo disperdente acquoso (**rosso**) rispetto alle cellule non trattate (nero). I risultati sono riportati come media $\pm$ SE (n=3).

I risultati dimostrano che la quantità di Pluronic F-127 utilizzata per la preparazione delle nanoparticelle non è in alcun modo citotossica per le cellule confermando quanto già noto in letteratura circa la sua atossicità (Megha et al., 2022). Per il RSV libero si osserva un effetto dose dipendente. Aumentando la concentrazione dell'attivo, infatti, si riduce la vitalità cellulare pur mantenendosi sempre al di sopra dell'80%, non mostrando quindi un effetto citotossico anche alla dose più alta testata. Tale comportamento è in linea con la natura polifenolica del RSV che, possiede un duplice effetto sulla proliferazione cellulare. Infatti, secondo quanto riportato in letteratura i polifenoli mostrano a basse dosi effetti proliferativi in diverse linee cellulari, mentre ad alte dosi cominciano a manifestarsi effetti antiproliferativi ed antitumorali (Kaleci & Koyuturk, 2020; Niedzwiecki et al., 2016; Peltz et al., 2012). Prevedibilmente, lo stesso pattern è osservabile anche nelle cellule testate con le nanoparticelle lipidiche. Tuttavia, in questo caso, alle concentrazioni più basse (2.5 e 10 μ M) si assiste ad un moderato effetto proliferativo, se confrontato alle cellule non trattate, e solo alla dose più alta (50 μ M) si comincia ad osservare una certa tossicità (Vitalità cellulare $\approx$ 70%). Questi risultati possono essere giustificati sia con la capacità delle NLC di veicolare meglio il RSV all'interno delle cellule, che ad un effetto sinergico determinato dalla presenza del GA nella composizione lipidica delle nanoparticelle (Hung et al., 2017). In conclusione, questi risultati evidenziano le potenzialità delle NLC cariche di RSV in medicina rigenerativa.

5. Conclusioni

Il lavoro svolto durante gli anni del dottorato si articola nell'ambito della medicina rigenerativa personalizzata per il trattamento delle affezioni e delle complicazioni post-operatorie a carico dei tessuti molli e duri del cavo orale. In tali evenienze è di fondamentale importanza ottenere una rapida remissione della sintomatologia, favorendo la rigenerazione del tessuto lesa e prevenendo le complicazioni infettive mediante una terapia mirata, efficace e localizzata. Nella recente letteratura si trova proposto l'utilizzo di sostanze di origine vegetale, quali i Polifenoli, caratterizzati da comprovate proprietà terapeutiche benefiche (es. antiossidanti, antinfiammatorie, antitumorali, antibatteriche), capacità di stimolazione dei processi di rigenerazione tissutale, e soprattutto, effetti collaterali trascurabili. Pertanto, per rendere somministrabili ed efficaci tali molecole nell'ambito della medicina rigenerativa la ricerca è stata incentrata sulla progettazione di *drug delivery platform* o *carrier*, in grado di incorporare efficacemente Curcumina, Quercetina o Resveratrolo, preservarne l'integrità strutturale e funzionale e controllarne il rilascio al sito target. I Drug Delivery Systems (DDSs) sviluppati sono classificabili in funzione delle loro dimensioni in: macroscopici (scaffold polimerici), micrometrici (microparticelle polimeriche) e nanometrici (nanoparticelle lipidiche). Tali sistemi innovativi sono stati progettati, da un lato, per promuovere la stabilità e la biodisponibilità dei principi attivi, e dall'altro, per poter disporre di una formulazione in grado di controllare il rilascio degli stessi nel sito di applicazione, in modo da favorire i processi riparativi e contestualmente mantenere l'asepsi dell'ambiente circostante. È per quest'ultima finalità che alcuni DDSs sono stati anche caricati di farmaci antibiotici convenzionalmente impiegati nel cavo orale, quali Metronidazolo e Ciprofloxacina, ottenendo così dei sistemi nanocompositi multifunzionali in grado di rilasciare contestualmente nel sito di applicazione gli agenti chemioterapici e i polifenoli antiinfiammatori. Grazie inoltre all'utilizzo di polimeri biocompatibili e bioerodibili, quali l'acido ialuronico e il chitosano, gli innovativi DDSs realizzati sottoforma di spugne porose possono agevolmente adattarsi al sito chirurgico ed essere inseriti nella cavità post-estrattiva contestualmente all'applicazione dell'impianto dentale, favorendone l'osteointegrazione.

A seguito dello svolgimento del periodo di ricerca all'estero svolto presso i laboratori dell'Università delle Tecnologie di Varsavia, sono state inoltre sviluppate differenti tipologie di scaffold a base di policaprolattone (PCL) e beta-tricalcio fosfato contenenti Curcumina mediante l'utilizzo di stampanti 3D.

Le attività di ricerca svolte hanno apportato un avanzamento della conoscenza nel campo del Drug Delivery ed a ritenere possibile l'applicazione dei composti naturali polifenolici, quali la Curcumina, Quercetina e Resveratrolo nel campo del trattamento di patologie del cavo orale se opportunamente formulati. Le tecnologie farmaceutiche proposte possono infatti modificare favorevolmente l'approccio convenzionale al trattamento farmacologico e possono contribuire alla realizzazione di terapie medico-chirurgiche innovative, migliorando non solo la guarigione dei pazienti ma anche la loro qualità di vita.

6. Bibliografia

- Abouelmagd, S. A., Sun, B., Chang, A. C., Ku, Y. J., & Yeo, Y. (2015). Release Kinetics Study of Poorly Water-Soluble Drugs from Nanoparticles: Are We Doing It Right? *Molecular Pharmaceutics*, 12(3), 997. <https://doi.org/10.1021/mp500817h>
- Ahad, A., Aqil, M., & Ali, A. (2015). The application of anethole, menthone, and eugenol in transdermal penetration of valsartan: Enhancement and mechanistic investigation. *Pharmaceutical Biology*, 54(6), 1042–1051. <http://doi.org/10.3109/13880209.2015.1100639>,
- Alali, A. S., Aldawsari, M. F., Alalaiwe, A., Almutairy, B. K., Al-Shdefat, R., Walbi, I. A., & Fayed, M. H. (2021). Exploitation of Design-of-Experiment Approach for Design and Optimization of Fast-Disintegrating Tablets for Sublingual Delivery of Sildenafil Citrate with Enhanced Bioavailability Using Fluid-Bed Granulation Technique. *Pharmaceutics* 2021, Vol. 13, Page 870, 13(6), 870. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060870>
- Alamanda, M., Denthumdas, S. K., Wadgave, U., Pharne, P. M., Patil, S. J., Kondreddi, S., Deshpande, P., & Koppikar, R. S. (2016). Comparative Evaluation of Ciprofloxacin Levels in GCF and Plasma of Chronic Periodontitis Patients: Quasi Experimental Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 10(6), ZC47–ZC50. <https://doi.org/10.7860/jcdr/2016/18446.7987>
- Albanese, A., Licata, M. E., Polizzi, B., & Campisi, G. (2013). Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. *Immunity & Ageing: I & A*, 10(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-10-23>
- AlDhalaan, N. A., BaQais, A., & Al-Omar, A. (2020). Medication-related Osteonecrosis of the Jaw: A Review. *Cureus*, 12(2). <https://doi.org/10.7759/cureus.6944>
- Alexis, F., Pridgen, E. M., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2010). Nanoparticle technologies for cancer therapy. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 197(197), 55–86. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3_2
- Almeida, A. F., Borge, G. I. A., Piskula, M., Tudose, A., Tudoreanu, L., Valentová, K., Williamson, G., & Santos, C. N. (2018). Bioavailability of Quercetin in Humans with a Focus on Interindividual Variation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 714–731. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12342>
- Almeida, L., Vaz-da-Silva, M., Falcão, A., Soares, E., Costa, R., Loureiro, A. I., Fernandes-Lopes, C., Rocha, J. F., Nunes, T., Wright, L., & Soares-da-Silva, P. (2009). Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(S1), S7–S15. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800177>
- Álvarez-Martínez, F. J., Barrajón-Catalán, E., Encinar, J. A., Rodríguez-Díaz, J. C., & Micol, V. (2020). Antimicrobial Capacity of Plant Polyphenols against Gram-positive Bacteria: A Comprehensive Review. *Current Medicinal Chemistry*, 27(15), 2576–2606. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181008115650>
- Amarillas-Escobar, E. D., Toranzo-Fernández, J. M., Martínez-Rider, R., Noyola-Frías, M. A., Hidalgo-Hurtado, J. A., Serna, V. M. F., Gordillo-Moscoso, A., & Pozos-Guillén, A. J. (2010). Use of therapeutic laser after surgical removal of impacted lower third molars. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 68(2), 319–324. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2009.07.037>
- Anand David, A. V., Arulmoli, R., & Parasuraman, S. (2016). Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacognosy Reviews*, 10(20), 84. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.194044>

- Anastasilakis, A. D., Pepe, J., Napoli, N., Palermo, A., Magopoulos, C., Khan, A. A., Zillikens, M. C., & Body, J. J. (2022). Osteonecrosis of the Jaw and Antiresorptive Agents in Benign and Malignant Diseases: A Critical Review Organized by the ECTS. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 107(5), 1441–1460. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab888>
- Angellotti, G., Murgia, D., Presentato, A., D'Oca, M. C., Scarpaci, A. G., Alduina, R., Raimondi, M. V., & De Caro, V. (2020). Antibacterial PEGylated Solid Lipid Microparticles for Cosmeceutical Purpose: Formulation, Characterization, and Efficacy Evaluation. *Materials* 2020, Vol. 13, Page 2073, 13(9), 2073. <https://doi.org/10.3390/ma13092073>
- Attari, F., Zahmatkesh, M., Aligholi, H., Mehr, S. E., Sharifzadeh, M., Gorji, A., Mokhtari, T., Khaksarian, M., & Hassanzadeh, G. (2015). Curcumin as a double-edged sword for stem cells: dose, time and cell type-specific responses to curcumin. *Daru : Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 23(1), 2703–2706. <https://doi.org/10.1186/S40199-015-0115-8>
- Baker, R. W., & Sanders, L. M. (1986). Controlled Release Delivery Systems. *Synthetic Membranes: Science, Engineering and Applications*, 581–624. https://doi.org/10.1007/978-94-009-4712-2_20
- Barel, A. O., Paye, M., & Maibach, H. I. (Eds.). (2014). *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. <https://doi.org/10.1201/b16716>
- Bigdeli, A. K., Lyer, S., Detsch, R., Boccaccini, A. R., Beier, J. P., Kneser, U., Horch, R. E., & Arkudas, A. (2013). Nanotechnologies in tissue engineering. *Nanotechnology Reviews*, 2(4), 411–425. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2013-0015>
- Bigucci, F., Luppi, B., Musenga, A., Zecchi, V., & Cerchiara, T. (2008). Chitosan Salts Coated with Stearic Acid as Colon-Specific Delivery Systems for Vancomycin. *Drug Delivery*, 15(5), 289–293. <https://doi.org/10.1080/10717540802006468>
- Bitar, K. N., & Zakhem, E. (2014). Design Strategies of Biodegradable Scaffolds for Tissue Regeneration. *Biomedical Engineering and Computational Biology*, 6(6), 13. <https://doi.org/10.4137/becb.s10961>
- Bottino, M. C., Arthur, R. A., Waeiss, R. A., Kamocki, K., Gregson, K. S., & Gregory, R. L. (2014). Biodegradable nanofibrous drug delivery systems: effects of metronidazole and ciprofloxacin on periodontopathogens and commensal oral bacteria. *Clinical Oral Investigations*, 18(9), 2151–2158. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1201-x>
- Božič, M., Elschner, T., Tkaučič, D., Bračič, M., Hribernik, S., Stana Kleinschek, K., & Kargl, R. (2018). Effect of different surface active polysaccharide derivatives on the formation of ethyl cellulose particles by the emulsion-solvent evaporation method. *Cellulose*, 25(12), 6901–6922. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2062-2/>
- Bule, M., Abdurahman, A., Nikfar, S., Abdollahi, M., & Amini, M. (2019). Antidiabetic effect of quercetin: A systematic review and meta-analysis of animal studies. *Food and Chemical Toxicology*, 125, 494–502. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.037>
- Carroll, R. E., Benya, R. v., Turgeon, D. K., Vareed, S., Neuman, M., Rodriguez, L., Kakarala, M., Carpenter, P. M., McLaren, C., Meyskens, F. L., & Brenner, D. E. (2011). Phase IIa clinical trial of curcumin for the prevention of colorectal neoplasia. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 4(3), 354–364. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.capr-10-0098>
- Casale, M., Moffa, A., Vella, P., Sabatino, L., Capuano, F., Salvinelli, B., Lopez, M. A., Carinci, F., & Salvinelli, F. (2016). Hyaluronic acid: Perspectives in dentistry. A systematic review. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 29(4), 572–582. <https://doi.org/10.1177/0394632016652906>
- Catalgol, B., Batirel, S., Taga, Y., & Ozer, N. K. (2012). Resveratrol: French paradox revisited. *Frontiers in Pharmacology*, 3 JUL, 141. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00141/bibtex>

- Chan, B. P., & Leong, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal* 2008 17:4, 17(4), 467–479. <https://doi.org/10.1007/S00586-008-0745-3>
- Chang, W., Tsai, C., Yang, J., Hsu, Y., Shih, L., Chiu, H., Bau, D., & Tsai, F. (2021). Resveratrol inhibited the metastatic behaviors of cisplatin-resistant human oral cancer cells via phosphorylation of ERK/p-38 and suppression of MMP-2/9. *Journal of Food Biochemistry*, 45(6). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13666>
- Chen, D. C., Avansino, J. R., Agopian, V. G., Hoagland, V. D., Woolman, J. D., Pan, S., Ratner, B. D., & Stelzner, M. (2006). Comparison of Polyester Scaffolds for Bioengineered Intestinal Mucosa. *Cells Tissues Organs*, 184(3–4), 154–165. <https://doi.org/10.1159/000099622>
- Chen, J., Jiang, Q. D., Chai, Y. P., Zhang, H., Peng, P., & Yang, X. X. (2016). Natural Terpenes as Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery. *Molecules* 2016, Vol. 21, Page 1709, 21(12), 1709. <https://doi.org/10.3390/molecules21121709>
- Chiantia, S., Giannola, L. I., & Cordone, L. (2005). Lipid phase transition in saccharide-coated cholate-containing liposomes: coupling to the surrounding matrix. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 21(9), 4108–4116. <https://doi.org/10.1021/la046974c>
- Choi, Y. H., Han, D. H., Kim, S. woo, Kim, M. J., Sung, H. H., Jeon, H. G., Jeong, B. C., Seo, S. il, Jeon, S. S., Lee, H. M., & Choi, H. Y. (2019). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the role of curcumin in prostate cancer patients with intermittent androgen deprivation. *The Prostate*, 79(6), 614–621. <https://doi.org/10.1002/pros.23766>
- Colica, C., Milanović, M., Milić, N., Aiello, V., de Lorenzo, A., & Abenavoli, L. (2018). A systematic review on natural antioxidant properties of resveratrol. In *Natural Product Communications* (Vol. 13, Issue 9). <https://doi.org/10.1177/1934578x1801300923>
- Collins, L. M. C., & Dawes, C. (2016). The Surface Area of the Adult Human Mouth and Thickness of the Salivary Film Covering the Teeth and Oral Mucosa. *Journal of Dental Research*, 66(8), 1300–1302. <http://doi.org/10.1177/00220345870660080201>.
- Colunga Biancatelli, R. M. L., Berrill, M., Catravas, J. D., & Marik, P. E. (2020). Quercetin and Vitamin C: An Experimental, Synergistic Therapy for the Prevention and Treatment of SARS-CoV-2 Related Disease (COVID-19). *Frontiers in Immunology*, 11, 1451. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01451/bibtex>
- Cutrim, C. S., & Cortez, M. A. S. (2018). A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 71(3), 564–578. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12515>
- Da Costa, D. C. F., Fialho, E., & Silva, J. L. (2017). Cancer chemoprevention by resveratrol: The P53 tumor suppressor protein as a promising molecular target. In *Molecules* (Vol. 22, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/molecules22061014>
- Dall'Acqua, S., Miolo, G., Innocenti, G., & Caffieri, S. (2012). The Photodegradation of Quercetin: Relation to Oxidation. *Molecules*, 17(8), 8898–8907. <https://doi.org/10.3390/molecules17088898>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018a). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018b). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* 2018, Vol. 10, Page 57, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>

- Darekar, A., Bele, M., Wagh, M., Nawale, V., & Saudagar, R. (2019). A review on Nanocomposite Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(2-s), 529–536. <https://doi.org/10.22270/jddt.v9i2-s.2475>
- De Caro, V., Giandalia, G., Siragusa, M. G., Sutura, F. M., & Giannola, L. I. (2012). New prospective in treatment of Parkinson's disease: Studies on permeation of ropinirole through buccal mucosa. *International Journal of Pharmaceutics*, 429(1–2), 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.03.022>
- De la Lastra, A., Martin, M. J., & Motilva, V. (1994). Antiulcer and Gastroprotective Effects of Quercetin: A Gross and Histologic Study. *Pharmacology*, 48(1), 56–62. <https://doi.org/10.1159/000139162>
- De La Lastra, C. A., & Villegas, I. (2005). Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(5), 405–430. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500022>
- De Lira Mota, K. S., Dias, G. E. N., Pinto, M. E. F., Luiz-Ferreira, Â., Monteiro Souza-Brito, A. R., Hiruma-Lima, C. A., Barbosa-Filho, J. M., & Batista, L. M. (2009). Flavonoids with Gastroprotective Activity. *Molecules*, 14(3), 979–1012. <https://doi.org/10.3390/molecules14030979>
- De Sá Coutinho, D., Pacheco, M. T., Frozza, R. L., & Bernardi, A. (2018). Anti-inflammatory effects of resveratrol: Mechanistic insights. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061812>
- De Silva, S. F., & Alcorn, J. (2019). Flaxseed Lignans as Important Dietary Polyphenols for Cancer Prevention and Treatment: Chemistry, Pharmacokinetics, and Molecular Targets. *Pharmaceutics*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/ph12020068>
- Desai, K. G. H., & Park, H. J. (2007). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361–1394. <http://doi.org/10.1081/drt-200063478>
- Devarakonda, B., Hill, R. A., & de Villiers, M. M. (2004). The effect of PAMAM dendrimer generation size and surface functional group on the aqueous solubility of nifedipine. *International Journal of Pharmaceutics*, 284(1–2), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.07.006>
- Di Prima, G., Bongiovì, F., Palumbo, F. S., Pitarresi, G., Licciardi, M., & Giammona, G. (2019). Mucoadhesive PEGylated inulin-based self-assembling nanoparticles: In vitro and ex vivo transcorneal permeation enhancement of corticosteroids. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 49. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.10.028>
- Di Prima, G., Librizzi, F., & Carrota, R. (2020). Light Scattering as an Easy Tool to Measure Vesicles Weight Concentration. *Membranes* 2020, Vol. 10, Page 222, 10(9), 222. <https://doi.org/10.3390/membranes10090222>
- Ding, Y., Yao, H., Yao, Y., Fai, L., & Zhang, Z. (2013). Protection of Dietary Polyphenols against Oral Cancer. *Nutrients*, 5(6), 2173–2191. <https://doi.org/10.3390/nu5062173>
- Dinge, A., & Nagarsenker, M. (2008). Formulation and evaluation of fast dissolving films for delivery of triclosan to the oral cavity. *AAPS PharmSciTech*, 9(2), 349–356. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9047-7>
- Do, A. V., Smith, R., Acri, T. M., Geary, S. M., & Salem, A. K. (2018). 3D printing technologies for 3D scaffold engineering. *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds: Materials, Technologies, and Applications*, 203–234. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100979-6.00009-4>
- Dobler, D., Schmidts, T., Wildenhain, S., Seewald, I., Merzhäuser, M., & Runkel, F. (2019). Impact of Selected Cosmetic Ingredients on Common Microorganisms of Healthy Human Skin. *Cosmetics* 2019, Vol. 6, Page 45, 6(3), 45. <https://doi.org/10.3390/cosmetics6030045>

- Dodd-Butera, T., & Broderick, M. (2014). Ciprofloxacin. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 966–968. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386454-3.00011-7>
- Dodla, S., & Velmurugan, S. (2013). buccal penetration enhancers-an overview. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 39–47. <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ajpcr/article/view/176>
- D'souza, A. A., & Shegokar, R. (2016). Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(9), 1257–1275. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182485>
- Du, Q.-H., Peng, C., & Zhang, H. (2013). Polydatin: A review of pharmacology and pharmacokinetics. *Pharmaceutical Biology*, 51(11), 1347–1354. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.792849>
- Dumoulin, E., & Bimbenet, J. J. (1998). Spray drying and quality changes. *The Properties of Water in Foods ISOPOW 6*, 209–232. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0311-4_10
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., Novellino, E., & Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2221–2243. <https://doi.org/10.1002/ptr.6419>
- El-Kamel, A. H., Ashri, L. Y., & Alsarra, I. A. (2007). Micromatrical metronidazole benzoate film as a local mucoadhesive delivery system for treatment of periodontal diseases. *AAPS PharmSciTech*, 8(3), E184–E194. <https://doi.org/10.1208/pt0803075>
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, 126(4), 677–689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>
- Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24(10), 851–874. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2004.07.005>
- Esposito Corcione, C., Gervaso, F., Scalera, F., Montagna, F., Sannino, A., & Maffezzoli, A. (2017). The feasibility of printing polylactic acid–nanohydroxyapatite composites using a low-cost fused deposition modeling 3D printer. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(13). <https://doi.org/10.1002/app.44656>
- Evans, M., Ratcliffe, I., & Williams, P. A. (2013). Emulsion stabilisation using polysaccharide–protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(4), 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.04.004>
- Fan, Y., Marioli, M., & Zhang, K. (2021). Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 192, 113642. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113642>
- Favia, G., Tempesta, A., Limongelli, L., Crincoli, V., & Maiorano, E. (2018). Medication-related osteonecrosis of the jaw: Surgical or non-surgical treatment? *Oral Diseases*, 24(1–2), 238–242. <https://doi.org/10.1111/odi.12764>
- Fazeli, N., Arefian, E., Irani, S., Ardeshirylajimi, A., & Seyedjafari, E. (2021). 3D-Printed PCL Scaffolds Coated with Nanobioceramics Enhance Osteogenic Differentiation of Stem Cells. *ACS Omega*, 6(51), 35284–35296. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c04015>
- Feldman, D. (2016). Polymer nanocomposites in medicine. *Journal of Macromolecular Science*, volume 53. 53(1), 55–62. <http://doi.org/10.1080/10601325.2016.1110459>
- Fernandes, I. A., Vieira Armond, A. C., & Moreira Falci, S. G. (2019). The Effectiveness of the Cold Therapy (cryotherapy) in the Management of Inflammatory Parameters after Removal of Mandibular Third Molars: A Meta-Analysis. *International Archives of Otorhinolaryngology*, 23(2), 221–228. <https://doi.org/10.1055/S-0039-1677755>
- Friedlander, A. H. (2010). Oral Cavity Staphylococci Are a Potential Source of Prosthetic Joint Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 50(12), 1682–1683. <https://doi.org/10.1086/653003>

- Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K. M., Gomez-Cabrera, M. C., Vina, J., & Borras, C. (2015). Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/837042>
- García-Mediavilla, V., Crespo, I., Collado, P. S., Esteller, A., Sánchez-Campos, S., Tuñón, M. J., & González-Gallego, J. (2007). The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *European Journal of Pharmacology*, 557(2–3), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.014>
- Ge, B., Yang, D., Wu, X., Zhu, J., Wei, W., & Yang, B. (2017). Cytoprotective effects of glycyrrhetic acid liposome against cyclophosphamide-induced cystitis through inhibiting inflammatory stress. *International Immunopharmacology*, 54, 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.11.010>
- Ge, Y., Feng, K., Liu, X., Zhu, Z., Chen, H., Chang, Y., Sun, Z., Wang, H., Zhang, J., Yu, D., & Mao, Y. (2020). Quercetin inhibits macrophage polarization through the p-38 α / β signalling pathway and regulates OPG/RANKL balance in a mouse skull model. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(5), 3203–3216. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14995>
- Gerhardt, L. C., & Boccaccini, A. R. (2010). Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials* 2010, Vol. 3, Pages 3867–3910, 3(7), 3867–3910. <https://doi.org/10.3390/ma3073867>
- Ghasemiyeh, P., & Mohammadi-Samani, S. (2018). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 13(4), 288–303. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.235156>
- Ghezzi, M., Pescina, S., Padula, C., Santi, P., del Favero, E., Cantù, L., & Nicoli, S. (2021). Polymeric micelles in drug delivery: An insight of the techniques for their characterization and assessment in biorelevant conditions. *Journal of Controlled Release*, 332, 312–336. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.02.031>
- Givony, S. (2020). Oral squamous cell carcinoma (OSCC) an overview. *Journal of Medical Sciences*, 8(13).
- Grayson, S. M., & Fréchet, J. M. J. (2001). Convergent dendrons and dendrimers: From synthesis to applications. *Chemical Reviews*, 101(12), 3819–3867. <https://doi.org/10.1021/cr990116h/>
- Gu, J., Cheng, W. P., Liu, J., Lo, S. Y., Smith, D., Qu, X., & Yang, Z. (2008). pH-triggered reversible “stealth” polycationic micelles. *Biomacromolecules*, 9(1), 255–262. <https://doi.org/10.1021/bm701084w>
- Gu, X. L., Zhu, X., Kong, X. Z., & Tan, Y. (2010). Comparisons of simple and complex coacervations for preparation of sprayable insect sex pheromone microcapsules and release control of the encapsulated pheromone molecule. *Journal of Microencapsulation*, 27(4), 355–364. <https://doi.org/10.3109/02652040903221532>
- Guadalupe, E., Ramos, D., Shelke, N. B., James, R., Gibney, C., & Kumbar, S. G. (2015). Bioactive polymeric nanofiber matrices for skin regeneration. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(16). <https://doi.org/10.1002/app.41879>
- Guarino, V., Causa, F., & Ambrosio, L. (2014). Bioactive scaffolds for bone and ligament tissue. *Expert Review of Medical Devices*, 4(3), 405–418. <https://doi.org/10.1586/17434440.4.3.405>
- Gupta, S. C., Patchva, S., & Aggarwal, B. B. (2013). Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. *The AAPS Journal*, 15(1), 195. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9432-8>

- Han, S. S., Li, Z. Y., Zhu, J. Y., Han, K., Zeng, Z. Y., Hong, W., Li, W. X., Jia, H. Z., Liu, Y., Zhuo, R. X., & Zhang, X. Z. (2015). Dual-pH Sensitive Charge-Reversal Polypeptide Micelles for Tumor-Triggered Targeting Uptake and Nuclear Drug Delivery. *Small*, 11(21), 2543–2554. <https://doi.org/10.1002/sml.201402865>
- Hancock, B. C., & Parks, M. (2000). What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharmaceutical Research*, 17(4), 397–404. <https://doi.org/10.1023/a:1007516718048>
- Harmer, M. P., Chan, H. M., & Miller, G. A. (1992). Unique Opportunities for Microstructural Engineering with Duplex and Laminar Ceramic Composites. *Journal of the American Ceramic Society*, 75(7), 1715–1728. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1992.tb07188.x>
- Harrison, J., Ceri, H., Strem-Ick, C. A., Turner, R. J., Harrison, J. J., Ceri, H., Stremick, C. A., & Turner, R. J. (2004). Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environmental Microbiology*, 6(12), 1220–1227. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00656.x>
- Hashemzaei, M., Far, A. D., Yari, A., Heravi, R. E., Tabrizian, K., Taghdisi, S. M., Sadegh, S. E., Tsarouhas, K., Kouretas, D., Tzanakakis, G., Nikitovic, D., Anisimov, N. Y., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., & Rezaee, R. (2017). Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncology Reports*, 38(2), 819–828. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5766>
- Hashidzume, A., Takashima, Y., Yamaguchi, H., & Harada, A. (2017). Cyclodextrin. *Comprehensive Supramolecular Chemistry II*, 269–316. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.13829-6>
- Hassan, N., Ahad, A., Ali, M., & Ali, J. (2009). Chemical permeation enhancers for transbuccal drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(1), 97–112. <https://doi.org/10.1517/17425240903338758>
- He, J., Yang, X., Liu, F., Li, D., Zheng, B., Abdullah, A. O., & Liu, Y. (2020). The Impact of Curcumin on Bone Osteogenic Promotion of MC3T3 Cells under High Glucose Conditions and Enhanced Bone Formation in Diabetic Mice. *Coatings 2020*, Vol. 10, Page 258, 10(3), 258. <https://doi.org/10.3390/coatings10030258>
- Higuchi, T. (1961). Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(10), 874–875. <https://doi.org/10.1002/jps.2600501018>
- Hixson, A. W., & Crowell, J. H. (1931). Dependence of Reaction Velocity upon surface and Agitation: I—Theoretical Consideration. *Industrial and Engineering Chemistry*, 23(8), 923–931. <https://doi.org/10.1021/ie50260a018/>
- Holm, J., & Hansen, S. I. (2020). Characterization of soluble folate receptors (folate binding proteins) in humans. Biological roles and clinical potentials in infection and malignancy. *Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*, 1868(10). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140466>
- Hung, C. F., Hsiao, C. Y., Hsieh, W. H., Li, H. J., Tsai, Y. J., Lin, C. N., Chang, H. H., & Wu, N. L. (2017). 18 β -glycyrrhetic acid derivative promotes proliferation, migration and aquaporin-3 expression in human dermal fibroblasts. *PLoS ONE*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182981>
- Indira Priyadarsini, K. (2013). Chemical and Structural Features Influencing the Biological Activity of Curcumin. *Current Pharmaceutical Design*, 19(11), 2093–2100. <https://doi.org/10.2174/1381612811319110010>
- Islam, N., & Ferro, V. (2016). Recent advances in chitosan-based nanoparticulate pulmonary drug delivery. *Nanoscale*, 8(30), 14341–14358. <https://doi.org/10.1039/c6nr03256g>
- Izza, N., Suga, K., Okamoto, Y., Watanabe, N., Bui, T. T., Wibisono, Y., Fadila, C. R., & Umakoshi, H. (2021). Systematic Characterization of Nanostructured Lipid Carriers from Cetyl

- Palmitate/Caprylic Triglyceride/Tween 80 Mixtures in an Aqueous Environment. *Langmuir*, 37(14), 4284–4293. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00270/>
- Jain, S., Krishna Meka, S. R., & Chatterjee, K. (2016). Curcumin eluting nanofibers augment osteogenesis toward phytochemical based bone tissue engineering. *Biomedical Materials* (Bristol, England), 11(5). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/11/5/055007>
- Janiszewska, E., & Witrowa-Rajchert, D. (2007). Effect of spray drying parameters on rosemary aroma microencapsulation. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57(3[A]), 41–43. www.pan.olsztyn.pl/journal/
- Jerjes, W., Upile, T., Petrie, A., Riskalla, A., Hamdoon, Z., Vourvachis, M., Karavidas, K., Jay, A., Sandison, A., Thomas, G. J., Kalavrezos, N., & Hopper, C. (2010). Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head & Neck Oncology*, 2(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1758-3284-2-9>
- Joshi, D., Garg, T., Goyal, A. K., & Rath, G. (2016). Advanced drug delivery approaches against periodontitis. *Drug Delivery*, 23(2), 363–377. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.935531>
- Juarez-Enriquez, E., Olivas, G. I., Zamudio-Flores, P. B., Ortega-Rivas, E., Perez-Vega, S., & Sepulveda, D. R. (2017). Effect of water content on the flowability of hygroscopic powders. *Journal of Food Engineering*, 205, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.024>
- Jurasekova, Z., Domingo, C., Garcia-Ramos, J. v., & Sanchez-Cortes, S. (2014). Effect of pH on the chemical modification of quercetin and structurally related flavonoids characterized by optical (UV-visible and Raman) spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(25), 12802–12811. <https://doi.org/10.1039/c4cp00864b>
- K, B., & P, C. (2018). Lipid nano particulate drug delivery: An overview of the emerging trend. *The Pharma Innovation Journal*, 7(7), 779–789.
- Kadari, A., Pooja, D., Gora, R. H., Gudem, S., Kolapalli, V. R. M., Kulhari, H., & Sistla, R. (2018). Design of multifunctional peptide collaborated and docetaxel loaded lipid nanoparticles for anti glioma therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 132, 168–179. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.09.012>
- Kaleci, B., & Koyuturk, M. (2020). Efficacy of resveratrol in the wound healing process by reducing oxidative stress and promoting fibroblast cell proliferation and migration. *Dermatologic Therapy*, 33(6). <https://doi.org/10.1111/dth.14357>
- Kalný, M., Grof, Z., & Štěpánek, F. (2021). Microstructure based simulation of the disintegration and dissolution of immediate release pharmaceutical tablets. *Powder Technology*, 377, 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.08.093>
- Kamrani, P., & Sadiq, N. M. (2022). Anatomy, Head and Neck, Oral Cavity (Mouth). *StatPearls*. PMID: 31424855.
- Karapataki, S., Hugoson, A., & Kugelberg, C. F. (2000). Healing following GTR treatment of bone defects distal to mandibular 2nd molars after surgical removal of impacted 3rd molars. *Journal of Clinical Periodontology*, 27(5), 325–332. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2000.027005325.x>
- Karthikeyan, A., Senthil, N., & Min, T. (2020). Nanocurcumin: A Promising Candidate for Therapeutic Applications. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 487. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00487/bibtext>
- Kaşıkcı, M., & Bağdatlıoğlu, N. (2016). Bioavailability of Quercetin. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 4, 146–151. <https://doi.org/10.12944/crnfsj>
- Kharat, M., Du, Z., Zhang, G., & McClements, D. J. (2017). Physical and Chemical Stability of Curcumin in Aqueous Solutions and Emulsions: Impact of pH, Temperature, and Molecular

- Environment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(8), 1525–1532. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04815/>
- Kim, Y. J., Bae, Y. C., Suh, K. T., & Jung, J. S. (2006). Quercetin, a flavonoid, inhibits proliferation and increases osteogenic differentiation in human adipose stromal cells. *Biochemical Pharmacology*, 72(10), 1268–1278. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.08.021>
- King, R. E., Bomser, J. A., & Min, D. B. (2006). Bioactivity of Resveratrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(3), 65–70. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00001.x>
- Kohli, A. G., Kierstead, P. H., Venditto, V. J., Walsh, C. L., & Szoka, F. C. (2014). Designer lipids for drug delivery: From heads to tails. *Journal of Controlled Release*, 190, 274–287. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.047>
- Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N. A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 15(1), 25–35. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9)
- Kowalczyk, P., Trzaskowska, P., Łojarczyk, I., Podgórski, R., & Ciach, T. (2019). Production of 3D printed polylactide scaffolds with surface grafted hydrogel coatings. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 179, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.069>
- Kulac, M., Aktas, C., Tulubas, F., Uygur, R., Kanter, M., Erboga, M., Ceber, M., Topcu, B., & Ozen, O. A. (2013). The effects of topical treatment with curcumin on burn wound healing in rats. *Journal of Molecular Histology*, 44(1), 83–90. <https://doi.org/10.1007/S10735-012-9452-9>
- Kulkarni, U., Mahalingam, R., Pather, I., Li, X., & Jasti, B. (2010). Porcine buccal mucosa as in vitro model: effect of biological and experimental variables. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(3), 1265–1277. <https://doi.org/10.1002/jps.21907>
- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24, e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>
- Kurakula, M., & Rao, G. S. N. K. (2020). Pharmaceutical assessment of polyvinylpyrrolidone (PVP): As excipient from conventional to controlled delivery systems with a spotlight on COVID-19 inhibition. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60, 102046. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102046>
- Kuriakose, M. A., Ramdas, K., Dey, B., Iyer, S., Rajan, G., Elango, K. K., Suresh, A., Ravindran, D., Kumar, R. R., Prathiba, R., Ramachandran, S., Kumar, N. A., Thomas, G., Somanathan, T., Ravindran, H. K., Ranganathan, K., Katakam, S. B., Parashuram, S., Jayaprakash, V., & Pillai, M. R. (2016). A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Phase IIB Trial of Curcumin in Oral Leukoplakia. *Cancer Prevention Research*, 9(8), 683–691. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.capr-15-0390>
- Kurien, B. T., Singh, A., Matsumoto, H., & Scofield, R. H. (2007). Improving the solubility and pharmacological efficacy of curcumin by heat treatment. *Assay and Drug Development Technologies*, 5(4), 567–576. <https://doi.org/10.1089/adt.2007.064>
- Kuroshima, S., Sasaki, M., Murata, H., & Sawase, T. (2019). Medication-related osteonecrosis of the jaw-like lesions in rodents: A comprehensive systematic review and meta-analysis. *Gerodontology*, 36(4), 313–324. <https://doi.org/10.1111/ger.12416>
- Kuroshima, S., Sasaki, M., & Sawase, T. (2019). Medication-related osteonecrosis of the jaw: A literature review. *Journal of Oral Biosciences*, 61(2), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.job.2019.03.005>
- Laracuenta, M. L., Yu, M. H., & McHugh, K. J. (2020). Zero-order drug delivery: State of the art and future prospects. *Journal of Controlled Release*, 327, 834–856. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.09.020>

- Latruffe, N., Menzel, M., Delmas, D., Buchet, R., & Lançon, A. (2014). Compared Binding Properties between Resveratrol and Other Polyphenols to Plasmatic Albumin: Consequences for the Health Protecting Effect of Dietary Plant Microcomponents. *Molecules*, 19(11), 17066. <https://doi.org/10.3390/molecules191117066>
- Law, J. X., Liao, L. L., Aminuddin, B. S., & Ruszymah, B. H. I. (2016). Tissue-engineered trachea: A review. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 91, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2016.10.012>
- Li, J., Zhang, C. X., Liu, Y. M., Chen, K. L., & Chen, G. (2017). A comparative study of anti-aging properties and mechanism: Resveratrol and caloric restriction. *Oncotarget*, 8(39). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20084>
- Li, Q., Cai, T., Huang, Y., Xia, X., Cole, S. P. C., & Cai, Y. (2017). A Review of the Structure, Preparation, and Application of NLCs, PNPs, and PLNs. *Nanomaterials*, 7(6). <https://doi.org/10.3390/nano7060122>
- Li, Y., Gao, G. H., & Lee, D. S. (2013). Stimulus-Sensitive Polymeric Nanoparticles and Their Applications as Drug and Gene Carriers. *Advanced Healthcare Materials*, 2(3), 388–417. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200313>
- Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M., Wang, S., Liu, H., & Yin, Y. (2016). Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*, 8(3), 167. <https://doi.org/10.3390/nu8030167>
- Lim, S. H., & Hudson, S. M. (2004). Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. *Carbohydrate Research*, 339(2), 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.10.024>
- Liu, D., Zhao, X., Zeng, X., Dan, H., & Chen, Q. (2016). Non-Invasive Techniques for Detection and Diagnosis of Oral Potentially Malignant Disorders. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 238(2), 165–177. <https://doi.org/10.1620/tjem.238.165>
- Liu, P., Chen, G., & Zhang, J. (2022). A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 1372, 27(4), 1372. <https://doi.org/10.3390/molecules27041372>
- Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 19(6), 485–502. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437>
- Ma, Z. F., & Zhang, H. (2017). Phytochemical Constituents, Health Benefits, and Industrial Applications of Grape Seeds: A Mini-Review. *Antioxidants*, 6(3). <https://doi.org/10.3390/antiox6030071>
- Maggi-Capeyron, M. F., Ceballos, P., Cristol, J. P., Delbosc, S., le Doucen, C., Pons, M., Léger, C. L., & Descomps, B. (2001). Wine phenolic antioxidants inhibit AP-1 transcriptional activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5646–5652. <https://doi.org/10.1021/jf010595x>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Markowicz-Piasecka, M., & Mikiciuk-Olasik, E. (2016). Dendrimers in drug delivery. *Nanobiomaterials in Drug Delivery: Applications of Nanobiomaterials*, 39–74. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-42866-8.00002-2>
- Martillanes, S., Rocha-Pimienta, J., Cabrera-Bañegil, M., Martín-Vertedor, D., Delgado-Adámez, J., Martillanes, S., Rocha-Pimienta, J., Cabrera-Bañegil, M., Martín-Vertedor, D., & Delgado-Adámez, J. (2017). Application of Phenolic Compounds for Food Preservation: Food Additive and Active Packaging. *Phenolic Compounds - Biological Activity*. <https://doi.org/10.5772/66885>

- Marxen, E., Axelsen, M. C., Pedersen, A. M. L., & Jacobsen, J. (2016). Effect of cryoprotectants for maintaining drug permeability barriers in porcine buccal mucosa. *International Journal of Pharmaceutics*, 511(1), 599–605. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.014>
- Mathesius, U. (2018). Flavonoid Functions in Plants and Their Interactions with Other Organisms. *Plants*, 7(2), 30. <https://doi.org/10.3390/plants7020030>
- McCormack, M. G., Smith, A. J., Akram, A. N., Jackson, M., Robertson, D., & Edwards, G. (2015). *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: An overlooked source of carriage and infection? *American Journal of Infection Control*, 43(1), 35–37. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2014.09.015>
- Megha, K. B., Swathi, S., Joseph, X., Vandana, U., & Mohanan, P. V. (2022). Cytocompatibility of Pluronic F-127 on adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells (A549 cells). *Environmental Science and Pollution Research*, 29(47), 71124–71135. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20925-4/>
- Mendes, A. I., Silva, A. C., Catita, J. A. M., Cerqueira, F., Gabriel, C., & Lopes, C. M. (2013). Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: improving antifungal activity. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 111, 755–763. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.05.041>
- Mlcek, J., Jurikova, T., Skrovankova, S., & Sochor, J. (2016). Quercetin and Its Anti-Allergic Immune Response. *Molecules*, 21(5), 623. <https://doi.org/10.3390/molecules21050623>
- Moghimipour, E., Ameri, A., & Handali, S. (2015). Absorption-Enhancing Effects of Bile Salts. *Molecules* 2015, Vol. 20, Pages 14451–14473, 20(8), 14451–14473. <https://doi.org/10.3390/molecules200814451>
- Mondal, S., Ghosh, S., & Moulik, S. P. (2016). Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 158, 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.004>
- Morales, J. O., & Brayden, D. J. (2017). Buccal delivery of small molecules and biologics: of mucoadhesive polymers, films, and nanoparticles. *Current Opinion in Pharmacology*, 36, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.07.011>
- Movahedian Attar, B., Razavi, S. M., Daneshmand, M., & Davoudi, A. (2020). Protective effects of resveratrol against osteonecrosis at the extraction site in bisphosphonate-treated rats. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 49(11), 1518–1522. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2020.02.019>
- Mu, Y., Zeng, H., & Chen, W. (2021). Quercetin Inhibits Biofilm Formation by Decreasing the Production of EPS and Altering the Composition of EPS in *Staphylococcus epidermidis*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 251. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.631058/bibtex>
- Mukherjee, S., Kar, S. K., Mukherjee, S., & Kar, S. K. (2021). Curcuminoids: The Novel Molecules of Nature. *Herbs and Spices - New Processing Technologies*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99201>
- Munin, A., & Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics*, 3(4), 793. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3040793>
- Murdoch, F. E., Sammons, R. L., & Chapple, I. L. C. (2004). Isolation and characterization of subgingival staphylococci from periodontitis patients and controls. *Oral Diseases*, 10(3), 155–162. <https://doi.org/10.1046/j.1601-0825.2003.01000.x>
- Murgia, D., Mauceri, R., Campisi, G., & De Caro, V. (2019). Advance on resveratrol application in bone regeneration: Progress and perspectives for use in oral and maxillofacial surgery. *Biomolecules*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/biom9030094>
- Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C. I., & Martínez-Bustos, F. (2009). Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for

- encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 91(3), 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.09.035>
- Nagy, A., Harrison, A., Sabbani, S., Munson, R. S., Dutta, P. K., & Waldman, W. J. (2011). Silver nanoparticles embedded in zeolite membranes: release of silver ions and mechanism of antibacterial action. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 1833. <https://doi.org/10.2147/ijn.s24019>
- Napiórkowska, A., & Kurek, M. (2022). Coacervation as a Novel Method of Microencapsulation of Essential Oils—A Review. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 5142, 27(16), 5142. <https://doi.org/10.3390/molecules27165142>
- Niedzwiecki, A., Roomi, M. W., Kalinovsky, T., & Rath, M. (2016). Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations. *Nutrients* 2016, Vol. 8, Page 552, 8(9), 552. <https://doi.org/10.3390/nu8090552>
- Nijdam, J. J., & Langrish, T. A. G. (2006). The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. *Journal of Food Engineering*, 77(4), 919–925. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.08.020>
- Nikolova, M. P., & Chavali, M. S. (2019). Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioactive Materials*, 4, 271–292. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.005>
- Noyes, A. A., & Whitney, W. R. (1897). The rate of solution of solid substances in their own solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 19(12), 930–934. <https://doi.org/10.1021/ja02086a003/>
- Nugraheni, P. S., Soeriyadi, A. H., Sediawan, W. B., Ustadi, & Budhijanto, W. (2019). Influence of salt addition and freezing-thawing on particle size and zeta potential of nano-chitosan. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 278(1), 012052. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/278/1/012052>
- Okuda, Y., Irisawa, Y., Okimoto, K., Osawa, T., & Yamashita, S. (2009). A new formulation for orally disintegrating tablets using a suspension spray-coating method. *International Journal of Pharmaceutics*, 382(1–2), 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.08.010>
- Oluwole, O., Fernando, W. B., Lumanlan, J., Ademuyiwa, O., & Jayasena, V. (2022). Role of phenolic acid, tannins, stilbenes, lignans and flavonoids in human health – a review. *International Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15936>
- Omanović-Mikličanin, E., Badnjević, A., Kazlagić, A., & Hajlovac, M. (2020). Nanocomposites: a brief review. *Health and Technology*, 10(1), 51–59. <https://doi.org/10.1007/s12553-019-00380-x>
- Osborne, D. W., & Musakhanian, J. (2018). Skin Penetration and Permeation Properties of Transcutol®—Neat or Diluted Mixtures. *AAPS PharmSciTech*, 19(8), 3512–3533. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1196-8/>
- Oungbho, K., & Müller, B. W. (1997). Chitosan sponges as sustained release drug carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 156(2), 229–237. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00201-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00201-9)
- Owen, S. C., Chan, D. P. Y., & Shoichet, M. S. (2012). Polymeric micelle stability. *Nano Today*, 7(1), 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2012.01.002>
- Ozbolat, I. T., Chen, H., & Yu, Y. (2014). Development of ‘Multi-arm Bioprinter’ for hybrid biofabrication of tissue engineering constructs. *Robotics and Computer-Integrated Manufacturing*, 30(3), 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.rcim.2013.10.005>
- Pabon, H. J. J. (1964). A synthesis of curcumin and related compounds. *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas*, 83(4), 379–386. <https://doi.org/10.1002/recl.19640830407>
- Paczkowski, J. E., Mukherjee, S., McCready, A. R., Cong, J. P., Aquino, C. J., Kim, H., Henke, B. R., Smith, C. D., & Bassler, B. L. (2017). Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa*

- virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 292(10), 4064–4076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.770552>
- Panahi, Y., Hosseini, M. S., Khalili, N., Naimi, E., Simental-Mendía, L. E., Majeed, M., & Sahebkar, A. (2016). Effects of curcumin on serum cytokine concentrations in subjects with metabolic syndrome: A post-hoc analysis of a randomized controlled trial. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 82, 578–582. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.037>
- Parisi, O. I., Puoci, F., Restuccia, D., Farina, G., Iemma, F., & Picci, N. (2014). Polyphenols and Their Formulations: Different Strategies to Overcome the Drawbacks Associated with Their Poor Stability and Bioavailability. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 1, 29–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00004-9>
- Passarelli, P. C., Pagnoni, S., Piccirillo, G. B., Desantis, V., Benegiamo, M., Liguori, A., Papa, R., Papi, P., Pompa, G., & D'Addona, A. (2020). Reasons for Tooth Extractions and Related Risk Factors in Adult Patients: A Cohort Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/ijerph17072575>
- Peltz, L., Gomez, J., Marquez, M., Alencastro, F., Atashpanjeh, N., Quang, T., Bach, T., & Zhao, Y. (2012). Resveratrol Exerts Dosage and Duration Dependent Effect on Human Mesenchymal Stem Cell Development. *PLoS ONE*, 7(5), 37162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037162>
- Peppas, N. A., & Sahlin, J. J. (1989). A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics*, 57(2), 169–172. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90306-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90306-2)
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., Jimenez, R., Santos-Buelga, C., & Osuna, A. (2009). Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacological Reports*, 61(1), 67–75. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70008-8](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70008-8)
- Perioli, L., Ambroggi, V., Angelici, F., Ricci, M., Giovagnoli, S., Capuccella, M., & Rossi, C. (2004). Development of mucoadhesive patches for buccal administration of ibuprofen. *Journal of Controlled Release*, 99(1), 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.06.005>
- Politis, C., Schoenaers, J., Jacobs, R., & Agbaje, J. O. (2016). Wound Healing Problems in the Mouth. *Frontiers in Physiology*, 7(NOV), 507. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00507>
- Prakasam, A., Elavarasu, Ss., & Natarajan, R. (2012). Antibiotics in the management of aggressive periodontitis. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 4(Suppl 2), 252. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.100226>
- Presentato, A., Piacenza, E., Scurria, A., Albanese, L., Zabini, F., Meneguzzo, F., Nuzzo, D., Pagliaro, M., Martino, D. C., Alduina, R., & Ciriminna, R. (2020). A New Water-Soluble Bactericidal Agent for the Treatment of Infections Caused by Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Strains. *Antibiotics*, 9(9), 586. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090586>
- Proniuk, S., Dixon, S. E., & Blanchard, J. (2001). Investigation of the utility of an in vitro release test for optimizing semisolid dosage forms. *Pharmaceutical Development and Technology*, 6(3), 469–476. <https://doi.org/10.1081/pdt-100002255>
- Puri, A., Loomis, K., Smith, B., Lee, J. H., Yavlovich, A., Heldman, E., & Blumenthal, R. (2009). Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 26(6), 523–580. <https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v26.i6.10>
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Hartmann-Schmidlin, S., Kähkönen, M., Heinonen, M., Määtä-Riihinen, K., & Oksman-Caldentey, K. M. (2005). Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), 991–1000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02547.x>

- Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Doelker, E., & Fessi, H. (1998). Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharmaceutical Research*, 15(7), 1056–1062. <https://doi.org/10.1023/a:1011934328471>
- Rafieian, S., Mirzadeh, H., Mahdavi, H., & Masoumi, M. E. (2019). A review on nanocomposite hydrogels and their biomedical applications. *Science and Engineering of Composite Materials*, 26(1), 154–174. <https://doi.org/10.1515/secm-2017-0161>
- Reineccius, G. A. (2007). The Spray Drying of Food Flavors. <http://Dx.Doi.Org/10.1081/DRT-120038731>, 22(6), 1289–1324. <https://doi.org/10.1081/drt-120038731>
- Rezaei, A., & Mohammadi, M. R. (2013). In vitro study of hydroxyapatite/polycaprolactone (HA/PCL) nanocomposite synthesized by an in situ sol–gel process. *Materials Science and Engineering: C*, 33(1), 390–396. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.09.004>
- Rigano, D., Formisano, C., Basile, A., Lavitola, A., Senatore, F., Rosselli, S., & Bruno, M. (2007). Antibacterial activity of flavonoids and phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*. *Phytotherapy Research*, 21(4), 395–397. <https://doi.org/10.1002/ptr.2061>
- Rivera, C. (2015). Essentials of oral cancer. In *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* (Vol. 8, Issue 9). PMID: 26617944.
- Rivière, C., Pawlus, A. D., & Mérillon, J. M. (2012). Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural Product Reports*, 29(11), 1317–1333. <https://doi.org/10.1039/c2np20049j>
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866–2887. <https://doi.org/10.1021/jf026182t/>
- Robinson, K., Mock, C., & Liang, D. (2014). Pre-formulation studies of resveratrol. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41(9), 1464–1469. <https://doi.org/10.3109/03639045.2014.958753>
- Rodríguez-García, C., Sánchez-Quesada, C., Toledo, E., Delgado-Rodríguez, M., & Gaforio, J. J. (2019). Naturally Lignan-Rich Foods: A Dietary Tool for Health Promotion? *Molecules*, 24(5). <https://doi.org/10.3390/molecules24050917>
- Rohindra, D. R., Nand, A. v., & Khurma, J. R. (2004). Swelling properties of chitosan hydrogels. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, 22(1), 32–35. <https://doi.org/10.1071/sp04005>
- Rokadiya, S., & Malden, N. J. (2008). An implant periapical lesion leading to acute osteomyelitis with isolation of *Staphylococcus aureus*. *British Dental Journal* 2008 205:9, 205(9), 489–491. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2008.935>
- Roy, S., Pal, K., Anis, A., Pramanik, K., & Prabhakar, B. (2012). Polymers in Mucoadhesive Drug-Delivery Systems: A Brief Note. *Designed Monomers and Polymers*, 12(6), 483–495. <https://doi.org/10.1163/138577209x12478283327236>
- Ruivo, J., Francisco, C., Oliveira, R., & Figueiras, A. (2015). The main potentialities of resveratrol for drug delivery systems. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51(3), 499–513. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502015000300002>
- Sadeghi, N., Deckers, R., Ozbakir, B., Akthar, S., Kok, R. J., Lammers, T., & Storm, G. (2018). Influence of cholesterol inclusion on the doxorubicin release characteristics of lysolipid-based thermosensitive liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 548(2), 778–782. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.002>
- Salerno, A., & Netti, P. A. (2021). Review on Computer-Aided Design and Manufacturing of Drug Delivery Scaffolds for Cell Guidance and Tissue Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 519. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.682133/bibtex>

- Sandri, G., Ruggeri, M., Rossi, S., Bonferoni, M. C., Vigani, B., & Ferrari, F. (2020). (Trans)buccal drug delivery. *Nanotechnology for Oral Drug Delivery: From Concept to Applications*, 225–250. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818038-9.00013-2>
- Sanhueza, L., Melo, R., Montero, R., Maisey, K., Mendoza, L., & Wilkens, M. (2017). Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLOS ONE*, 12(2), 0172273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172273>
- Sareethammanuwat, M., Boonyuen, S., & Arpornmaeklong, P. (2021). Effects of beta-tricalcium phosphate nanoparticles on the properties of a thermosensitive chitosan/collagen hydrogel and controlled release of quercetin. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 109(7), 1147–1159. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37107>
- Scioli Montoto, S., Muraca, G., & Ruiz, M. E. (2020). Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 319. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.587997/bibtex>
- Selvamani, V. (2019). Stability Studies on Nanomaterials Used in Drugs. *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery: Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery*, 425–444. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814031-4.00015-5>
- Selvamuthukumar, S., & Velmurugan, R. (2012). Nanostructured Lipid Carriers: A potential drug carrier for cancer chemotherapy. *Lipids in Health and Disease*, 11(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1476-511x-11-159/>
- Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A. M., & Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53 Suppl 2(SUPPL. 2), S310-29. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900039>
- Sfondrini, M. F., Fraticelli, D., Barbati, M., Scribante, A., & Gandini, P. (2012). Effetti di un nuovo preparato farmaceutico sulla guarigione di lesioni aftosiche in pazienti di età pediatrica. *Dental Cadmos*, 80(6), 334–339. <https://doi.org/10.1016/j.cadmos.2011.11.008>
- Shawkat, H., Westwood, M. M., & Mortimer, A. (2012). Mannitol: a review of its clinical uses. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, 12(2), 82–85. <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkr063>
- Shen, L., & Ji, H. F. (2012). The pharmacology of curcumin: is it the degradation products? *Trends in Molecular Medicine*, 18(3), 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.01.004>
- Shen, T., Wang, X. N., & Lou, H. X. (2009). Natural stilbenes: an overview. *Natural Product Reports*, 26(7), 916–935. <https://doi.org/10.1039/b905960a>
- Shibahara, T. (2019). Antiresorptive Agent-Related Osteonecrosis of the Jaw (ARONJ): A Twist of Fate in the Bone. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 247(2), 75–86. <https://doi.org/10.1620/tjem.247.75>
- Siepmann, J., & Siepmann, F. (2008). Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 364(2), 328–343. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.09.004>
- Silva, C. G., Monteiro, J., Marques, R. R. N., Silva, A. M. T., Martínez, C., Canle L., M., & Faria, J. L. (2013). Photochemical and photocatalytic degradation of trans-resveratrol. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 12(4), 638–644. <https://doi.org/10.1039/c2pp25239b>
- Simões, S. M. N., Figueiras, A. R., Veiga, F., Concheiro, A., & Alvarez-Lorenzo, C. (2015). Polymeric micelles for oral drug administration enabling locoregional and systemic treatments. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12(2), 297–318. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.960841>
- Singh, Y., Meher, J. G., Raval, K., Khan, F. A., Chaurasia, M., Jain, N. K., & Chourasia, M. K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of*

- Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society, 252, 28–49. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>
- Siqueira, L., Passador, F. R., Costa, M. M., Lobo, A. O., & Sousa, E. (2015). Influence of the addition of β -TCP on the morphology, thermal properties and cell viability of poly (lactic acid) fibers obtained by electrospinning. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 52, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.055>
- Son, H. E., Kim, E. J., & Jang, W. G. (2018). Curcumin induces osteoblast differentiation through mild-endoplasmic reticulum stress-mediated such as BMP2 on osteoblast cells. *Life Sciences*, 193, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.008>
- Song, Z., Borgwardt, L., Høiby, N., Wu, H., Sørensen, T. S., & Borgwardt, A. (2013). Prosthesis Infections after Orthopedic Joint Replacement: The Possible Role of Bacterial Biofilms. *Orthopedic Reviews*, 5(2), 65–71. <https://doi.org/10.4081/or.2013.e14>
- Sosnik, A., & Seremeta, K. P. (2015). Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 223, 40–54. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.05.003>
- Srinivas, K., King, J. W., Howard, L. R., & Monrad, J. K. (2010). Solubility and solution thermodynamic properties of quercetin and quercetin dihydrate in subcritical water. *Journal of Food Engineering*, 100(2), 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.04.001>
- Stevanović, M., Maksin, T., Petković, J., Filipi, M., & Uskoković, D. (2009). An innovative, quick and convenient labeling method for the investigation of pharmacological behavior and the metabolism of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres. *Nanotechnology*, 20(33), 335102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/33/335102>
- Šturm, L., & Ulrih, N. P. (2021). Basic Methods for Preparation of Liposomes and Studying Their Interactions with Different Compounds, with the Emphasis on Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126547>
- Sudhakar, K., Ji, S. min, Kummara, M. R., & Han, S. S. (2022). Recent Progress on Hyaluronan-Based Products for Wound Healing Applications. *Pharmaceutics*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102235>
- Sultankulov, B., Berillo, D., Sultankulova, K., Tokay, T., & Saparov, A. (2019). Progress in the Development of Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Biomolecules* 2019, Vol. 9, Page 470, 9(9), 470. <https://doi.org/10.3390/biom9090470>
- Takahashi, A., & Ohnishi, T. (2004). The significance of the study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the Exposed Facility on the International Space Station. *Uchu Seibutsu Kagaku*, 18(4), 255–260. <https://doi.org/10.2187/bss.18.255>
- Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., & Nasirpour, A. (2013). Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.03.002>
- Teeranachaideekul, V., Souto, E. B., Junyaprasert, V. B., & Müller, R. H. (2007). Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q(10) - development, physicochemical characterization and in vitro release studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 67(1), 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.01.015>
- Timilsena, Y. P., Akanbi, T. O., Khalid, N., Adhikari, B., & Barrow, C. J. (2019). Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 1276–1286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.144>

- Togashi, N., Shiraishi, A., Nishizaka, M., Matsuoka, K., Endo, K., Hamashima, H., & Inoue, Y. (2007). Antibacterial Activity of Long-Chain Fatty Alcohols against *Staphylococcus aureus*. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 12(2), 139. <https://doi.org/10.3390/12020139>
- Toma, A. I., Fuller, J. M., Willett, N. J., & Goudy, S. L. (2021). Oral wound healing models and emerging regenerative therapies. *Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 236, 17–34. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.06.003>
- Tomoda, K., Yabuki, N., Terada, H., & Makino, K. (2014). Application of polymeric nanoparticles prepared by an antisolvent diffusion with preferential solvation for iontophoretic transdermal drug delivery. *Colloid and Polymer Science*, 292(12), 3195–3203. <https://doi.org/10.1007/s00396-014-3342-5>
- Tønnesen, H. H., Másson, M., & Loftsson, T. (2002). Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 244(1–2), 127–135. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00323-x](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00323-x)
- Tonon, R. v., Brabet, C., & Hubinger, M. D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 88(3), 411–418. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.02.029>
- Tripathy, S., Verma, D. K., Thakur, M., Patel, A. R., Srivastav, P. P., Singh, S., Gupta, A. K., Chávez-González, M. L., Aguilar, C. N., Chakravorty, N., Verma, H. K., & Utama, G. L. (2021). Curcumin Extraction, Isolation, Quantification and Its Application in Functional Foods: A Review With a Focus on Immune Enhancement Activities and COVID-19. *Frontiers in Nutrition*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.747956/full>
- Troiano, G., Laino, L., Cicciù, M., Cervino, G., Fiorillo, L., D'amico, C., Zhurakivska, K., & lo Muzio, L. (2018). Comparison of Two Routes of Administration of Dexamethasone to Reduce the Postoperative Sequelae After Third Molar Surgery: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Open Dentistry Journal*, 12(1), 181–188. <https://doi.org/10.2174/1874210601812010181>
- Udenigwe, C. C., Ramprasath, V. R., Aluko, R. E., & Jones, P. J. H. (2008). Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutrition Reviews*, 66(8). <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2008.00076.x>
- Uhljar, L. É., Kan, S. Y., Radacsi, N., Koutsos, V., Szabó-Révész, P., & Ambrus, R. (2021). In Vitro Drug Release, Permeability, and Structural Test of Ciprofloxacin-Loaded Nanofibers. *Pharmaceutics* 2021, Vol. 13, Page 556, 13(4), 556. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040556>
- Unagolla, J. M., & Jayasuriya, A. C. (2018). Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 114, 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.12.012>
- Uzawa, K., Amelio, A. L., Kasamatsu, A., Saito, T., Kita, A., Fukamachi, M., Sawai, Y., Toeda, Y., Eizuka, K., Hayashi, F., Kato-Kase, I., Sunohara, M., Iyoda, M., Koike, K., Nakashima, D., Ogawara, K., Endo-Sakamoto, Y., Shiiba, M., Takiguchi, Y., Tanzawa, H. (2019). Resveratrol Targets Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor Expression to Overcome Cetuximab-Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Scientific Reports*, 9(1), 12179. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48717-w>
- Vanbillemont, B., Everaert, H., & de Beer, T. (2020). New advances in the characterization of lyophilised orally disintegrating tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, 579, 119153. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119153>

- Varela, P., Manuel, J., Gmez, I., Diz-Dios, P., de Melo, N. S., & Seoane, J. (2012). Timing of Oral Cancer Diagnosis: Implications for Prognosis and Survival. In *Oral Cancer*. InTech. <https://doi.org/10.5772/30591>
- Varshosaz, J., Eskandari, S., & Tabakhian, M. (2010). Production and optimization of valproic acid nanostructured lipid carriers by the Taguchi design. *Pharmaceutical Development and Technology*, 15(1), 89–96. <https://doi.org/10.3109/10837450903013568>
- Walle, T., Browning, A. M., Steed, L. L., Reed, S. G., & Walle, U. K. (2005). Flavonoid Glucosides Are Hydrolyzed and Thus Activated in the Oral Cavity in Humans. *The Journal of Nutrition*, 135(1), 48–52. <https://doi.org/10.1093/jn/135.1.48>
- Wang, C., Huang, W., Zhou, Y., He, L., He, Z., Chen, Z., He, X., Tian, S., Liao, J., Lu, B., Wei, Y., & Wang, M. (2020). 3D printing of bone tissue engineering scaffolds. *Bioactive Materials*, 5(1), 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.01.004>
- Wang, J., Wang, C., & Bu, G. (2018). Curcumin inhibits the growth of liver cancer stem cells through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(4), 3650. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.5805>
- Wang, T. yang, Li, Q., & Bi, K. shun. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 12. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>
- Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., Yang, J., & Gao, Y. (2016). The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 21–38. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.004>
- Wang, W., & Yeung, K. W. K. (2017). Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*, 2(4), 224–247. <https://doi.org/10.1016/J.bioactmat.2017.05.007>
- Wang, Y., Li, P., Tran, T. T. D., Zhang, J., & Kong, L. (2016). Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomaterials*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/nano6020026>
- Wu, W., Li, R., Li, X., He, J., Jiang, S., Liu, S., & Yang, J. (2015). Quercetin as an Antiviral Agent Inhibits Influenza A Virus (IAV) Entry. *Viruses*, 8(1), 6. <https://doi.org/10.3390/v8010006>
- Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., & Ren, L. (2014). Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. *Current Medicinal Chemistry*, 22(1), 132–149. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140916113443>
- Xu, D., Hu, M. J., Wang, Y. Q., & Cui, Y. L. (2019). Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061123>
- Yao, Q., Wei, B., Guo, Y., Jin, C., Du, X., Yan, C., Yan, J., Hu, W., Xu, Y., Zhou, Z., Wang, Y., & Wang, L. (2015). Design, construction and mechanical testing of digital 3D anatomical data-based PCL–HA bone tissue engineering scaffold. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5360-8/>
- Yashima, M., Sakai, A., Kamiyama, T., & Hoshikawa, A. (2003). Crystal structure analysis of β -tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ by neutron powder diffraction. *Journal of Solid State Chemistry*, 175(2), 272–277. [https://doi.org/10.1016/S0022-4596\(03\)00279-2](https://doi.org/10.1016/S0022-4596(03)00279-2)
- Yen, Y. H., Pu, C. M., Liu, C. W., Chen, Y. C., Chen, Y. C., Liang, C. J., Hsieh, J. H., Huang, H. F., & Chen, Y. L. (2018). Curcumin accelerates cutaneous wound healing via multiple biological actions: The involvement of $\text{TNF-}\alpha$, MMP-9, α -SMA, and collagen. *International Wound Journal*, 15(4), 605–617. <https://doi.org/10.1111/iwj.12904>

- Yeung, A. W. K., Tzvetkov, N. T., Balacheva, A. A., Georgieva, M. G., Gan, R. Y., Jozwik, A., Pyzel, B., Horbańczuk, J. O., Novellino, E., Durazzo, A., Lucarini, M., Camilli, E., Souto, E. B., Atanasov, A. G., & Santini, A. (2020). Lignans: Quantitative Analysis of the Research Literature. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 37. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00037/bibtex>
- Yuldasheva, G. A., Ilin, A. I., & Zhidomirov, G. M. (2018). Effect of α -dextrin nanoparticles on the structure of iodine complexes with polypeptides and alkali metal halogenides, and on the mechanisms of their anti-human immunodeficiency virus and anticancer activity. *Design and Development of New Nanocarriers*, 637–685. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813627-0.00017-x>
- Zein, I., Hutmacher, D. W., Tan, K. C., & Teoh, S. H. (2002). Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 23(4), 1169–1185. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(01\)00232-0](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(01)00232-0)
- Zhang, B., Seong, B., Nguyen, V. D., & Byun, D. (2016). 3D printing of high-resolution PLA-based structures by hybrid electrohydrodynamic and fused deposition modeling techniques. *JMiMi*, 26(2), 025015. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/26/2/025015>
- Zhang, J., Wang, Q., & Wang, A. (2010). In situ generation of sodium alginate/hydroxyapatite nanocomposite beads as drug-controlled release matrices. *Acta Biomaterialia*, 6(2), 445–454. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.07.001>
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., & Xie, S. (2010). DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *The AAPS Journal*, 12(3), 263. <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9185-1>
- Zhou, C., & Lin, Y. (2014). Osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells promoted by quercetin. *Cell Proliferation*. <https://doi.org/10.1111/cpr.12097>
- Zielinska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Nagasamy Venkatesh, D., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, 25(16). <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>
- Zupančič, Š., Lavrič, Z., & Kristl, J. (2015). Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 93, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.04.002>

7. Prodotti scientifici nel triennio del Dottorato

Elenco Pubblicazioni attinenti al progetto

- Murgia D., **Angellotti G.**, Conigliaro A., Carfi Pavia F., D'Agostino F., Contardi M., Mauceri R., Alessandro R., Campisi G., De Caro V. *Development of a Multifunctional Bioerodible Nanocomposite Containing Metronidazole and Curcumin to Apply on L-PRF Clot to Promote Tissue Regeneration in Dentistry. Biomedicines (MDPI)* 2020, 8(10), 425;
- **Angellotti G.**, Murgia D., Campisi G., De Caro V. *Quercetin-Based Nanocomposites as a Tool to Improve Dental Disease Management. Biomedicines (MDPI)* 2020, 8(11), 504
- Di Prima G., **Angellotti G.**, Scarpaci A.G., Murgia D., D'Agostino F., De Caro V., *Improvement of Resveratrol Permeation through Sublingual Mucosa: Chemical Permeation Enhancers versus Spray Drying Technique to Obtain Fast-Disintegrating Sublingual Mini-Tablets. Pharmaceutics (MDPI)* 2021, 13(9), 1370;
- **Angellotti G.**, Presentato A, Murgia D, Di Prima G, D'Agostino F., Scarpaci A.G., D'Oca M.C., Alduina R., Campisi G., De Caro V.; *Lipid Nanocarriers-Loaded Nanocomposite as a Suitable Platform to Release Antibacterial and Antioxidant Agents for Immediate Dental Implant Placement Restorative Treatment. Pharmaceutics (MDPI)* 2021; 13(12):2072.
- **Angellotti G.**, Di Prima G., Belfiore E., Campisi G., De Caro, V. *Chemopreventive and Anticancer role of Resveratrol against Oral Squamous Cell Carcinoma. Pharmaceutics (MDPI)* Accepted for publication on 10/01/2023.

Elenco altre Pubblicazioni

- **Angellotti G.**, Murgia D., Presentato A., D'Oca M.C., Scarpaci A.G., Alduina R., Raimondi M.V., De Caro V. *Antibacterial PEGylated Solid Lipid Microparticles for Cosmeceutical Purpose: Formulation, Characterization, and Efficacy Evaluation. Materials (MDPI)* 2020, 13, 2073;
- **Angellotti G.**, Di Prima G., Scarpaci A.G., D'Agostino F., Campisi G., De Caro V. *Spray-Dried Cytisine-Loaded Matrices: Development of Transbuccal Sustained-Release Tablets as a Promising Tool in Smoking Cessation Therapy. Pharmaceutics (MDPI)* 2022; 14, 1583;
- Di Prima G., Scurria A., **Angellotti G.**, Belfiore E., Pagliaro M., Meneguzzo F, De Caro V., Ciriminna R. *Grapefruit IntegroPectin isolation via spray drying and via freeze drying: a comparison Sustainable Chemistry and Pharmacy (Elsevier)* 2022; 29, 100816;
- Di Prima G., Belfiore E., Migliore M., Scarpaci A.G., **Angellotti G.**, Restivo I., Allegra M., Arizza V., De Caro V. *Green Extraction of Polyphenols from Waste Bentonite to Produce Functional Antioxidant Excipients for Cosmetic and Pharmaceutical Purposes: A Waste-to-Market Approach. Antioxidants (MDPI)* 2022; 11(12), 2493.
- De Caro V., **Angellotti G.**, D'Agostino F., Di Prima G. *Buccal thin film as potent permeation enhancers for Cytisine transbuccal delivery. Membranes (MDPI)* 2022; 12(11), 1169.

Comunicazioni a congressi e workshop (poster):

- Di Prima G., Scurria A., **Angellotti G.**, Belfiore E., Pagliaro M., Meneguzzo F., De Caro V., Ciriminna R. *Freeze drying versus Spray drying to obtain Grapefruit IntegroPectin powder*. Workshop “Polysaccharides in drug delivery – on the road to innovation”, Università degli Studi di Roma La Sapienza (Roma, Italia), 27-28 ottobre 2022;
- Di Prima G., Belfiore E., Migliore M., Scarpaci A., G., **Angellotti G.**, De Caro V. *The New Life of Exhausted Bentonite From The Grape Processing Industry: From Waste To Precious Resource To Produce Novel Raw Materials Enriched In Polyphenols*. 15th World Congress on Polyphenols Applications 2022, ADEIT “Fundaciòn Universitat” (Valenzia, Spagna), 28-30 Settembre 2022.