



**Università
degli Studi
di Palermo**

AREA RICERCA E TRASFERIMENTO TECNOLOGICO
SETTORE DOTTORATI E CONTRATTI PER LA RICERCA
U. O. DOTTORATI DI RICERCA

Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)
Settore Scientifico Disciplinare CHEM-05/A

SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI SISTEMI NANOSTRUTTURATI PER LA NANOMEDICINA

IL DOTTORE
GIUSEPPE CINÀ

IL COORDINATORE
PROF.SSA GIOVANNA PITARRESI

IL TUTOR
PROF.SSA SERENA RIELA

CICLO XXXVIII
2025

*Non importa quanto difficile sia la via
o quanto alta la montagna.
Basta che tu impari a fidarti.
Della corda. Del tuo compagno.
Di te stesso. Della fiamma che hai dentro.
E allora sali
con movimenti fluidi e leggeri
in una danza verticale.*

F. Vidoto

Sintesi e caratterizzazione di sistemi nanostrutturati per la nanomedicina

Riassunto

Nel corso del presente lavoro di tesi sono state sviluppate e caratterizzate diverse tipologie di sistemi nanostrutturati per applicazioni in nanomedicina, con particolare attenzione al contributo della chimica dei materiali nell'ambito delle scienze della vita.

In una prima parte sono stati realizzati sistemi a base di halloysite (HNTs) utilizzati come *carrier* per molecole di origine naturale, quali estratti idroalcolici ad attività antitumorale e antibatterica, e per il caricamento e rilascio di oli ozonizzati mediante differenti argille minerali e gel tissotropici a base di Laponite® (Lap). Successivamente sono stati sviluppati sistemi per il *drug carrier* e/o *delivery* di molecole di origine sintetica ad attività antitumorale e antibiotica.

In particolare, sono stati sintetizzati e caratterizzati: (i) sistemi a base di HNTs e acidi peptido nucleici (PNA) per il trasporto di derivati dell'adenosina difosfato ribosio ciclico (cADPR); (ii) sistemi multicavità basati su HNTs e calix[5]arene per il rilascio controllato di un derivato stilbenico ad attività antitumorale, successivamente inseriti in gel di Lap per ottenere formulazioni iniettabili; (iii) idrogel Lap/farmaco contenenti acido flufenammico ad attività antinfiammatoria, con potenziali applicazioni topiche. Parallelamente sono stati sintetizzati nanomateriali fluorescenti a base di argille per applicazioni nel *biosensing*. In particolare: (i) un sistema a base di hectorite e fenantrolina per il riconoscimento selettivo dello ione Zn(II); (ii) materiali costituiti da HNTs e *carbon dots* (CDs) per il *biosensing* dello ione Fe(III); (iii) un sistema HNTs–NDI/PNA, basato su derivati naftalendiimidici (NDI), con proprietà fotofisiche modulabili e capacità di riconoscimento molecolare. Nella parte conclusiva del lavoro sono stati sviluppati nanocompositi polimerici per applicazioni biomediche e di *packaging* biomedicale, ottenuti combinando alginato o chitosano con HNTs funzionalizzati con *carbon dots*, anche tramite stampa 3D a estrusione semi-solida, per la realizzazione di film e *scaffold* destinati ad applicazioni nel campo della protezione e rigenerazione dei tessuti.

Nel complesso, i risultati ottenuti mostrano come la versatilità delle argille minerali, la possibilità di funzionalizzazione mirata e la loro integrazione con matrici biocompatibili permettano la progettazione di sistemi nanostrutturati multifunzionali, con prospettive concrete nei settori della nanomedicina, della diagnostica e del *packaging* biomedicale. In particolare, l'impiego combinato di modifiche covalenti e supramolecolari si è rivelato fondamentale per modulare le proprietà superficiali delle argille, e in modo speciale dell'halloysite, consentendo di ottenere nanomateriali versatili adatti a differenti contesti applicativi.

Sommario

<i>Introduzione</i>	3
 <i>Capitolo 1 - Sistemi nanostrutturati come carrier per molecole di origine naturale</i>	33
1.1. <i>Proprietà e limiti delle molecole di origine naturale</i>	33
1.2. <i>Le argille minerali</i>	35
1.2.1. <i>L'halloysite come sistema carrier</i>	35
1.2.2. <i>Caricamento, modelli di adsorbimento e cinetiche di rilascio</i>	37
1.2.3. <i>Le argille come carrier di molecole di origine naturale ed estratti</i>	40
1.3. <i>Nanocarriers a base di argille per il trasporto di oli essenziali</i>	49
1.3.1. <i>Sistemi carrier a confronto per la veicolazione di oli vegetali ozonizzati</i>	51
1.5. <i>Conclusioni</i>	62
1.6. <i>Sezione sperimentale</i>	63
1.6.1. <i>Materiali e metodi</i>	63
1.6.2. <i>Parte sperimentale sezione 1.2.3</i>	64
1.6.3. <i>Parte sperimentale sezione 1.3.1.</i>	66
<i>Appendice A</i>	68
<i>Bibliografia:</i>	71
 <i>Capitolo 2 - Sistemi nanostrutturati come carrier e/o delivery di molecole di origine sintetica</i>	75
2.1. <i>Drug Delivery System: definizione, progressi e sfide future</i>	75
2.2. <i>Un'alternativa ai tradizionali DDS: le argille minerali</i>	75
2.3. <i>L'halloysite come carrier e DDS per la cura di patologie neuronali</i>	77
2.3.1. <i>Halloysite e PNA: nuove frontiere per la cura di patologie neuronali</i>	79
2.3.2. <i>Sviluppo di nanomateriali per il trasporto simultaneo di PNA e IDP</i>	81
2.4. <i>L'halloysite come drug carrier e/o delivery system per le terapie antitumorali</i>	89
2.4.1. <i>Sistemi multicavità a base di halloysite: nuovi nanomateriali ad attività antitumorale</i> ..	92
2.5. <i>Idrogel per il drug carrier di molecole di origine sintetica</i>	103
2.5.1. <i>Idrogel di Laponite® e HNTs per la realizzazione di sistemi iniettabili ad attività antitumorale</i>	104
2.5.2. <i>Idrogel di Laponite® e complessi supramolecolari per applicazioni topiche</i>	107
2.6. <i>Conclusioni</i>	120
2.7. <i>Sezione sperimentale</i>	122
2.7.1. <i>Materiali e metodi</i>	122
2.7.2. <i>Parte sperimentale sezione 3.2.</i>	123
2.7.3. <i>Parte sperimentale sezione 4.1.</i>	125

2.7.4. Parte sperimentale sezione 5.1.....	127
2.7.5. Parte sperimentale sezione 5.2.....	128
Appendice A.....	130
Appendice B.....	131
Appendice C.....	132
Bibliografia:	133
 Capitolo 3 - Sistemi nanostrutturati fluorescenti per il biosensing	139
3.1. Il ruolo dei biosensori nella diagnostica avanzata e nella nanomedicina	139
3.1.1. Le nanobiotecnologie nel biosensing	140
3.2. La fluorescenza come strumento per il sensing.....	140
3.3. Biosensing di ioni metallici: Meccanismi on-off/off-on e proprietà	142
3.3.1. Sistemi fluorescenti per la chelazione di metalli: nuovi sviluppi	143
3.3.1.1. Sintesi e caratterizzazione del sensore a base di hectorite/fenantrolina	145
3.3.2. I carbon dots nel sensing: proprietà e nuovi sviluppi.....	153
3.3.2.1. Sintesi e caratterizzazione di nanomateriali a base di HNTs e CDs	156
3.3.3. Naftalendimmide (NDI): sistemi emergenti per il sensing fluorescente	173
3.3.3.1. Sintesi e caratterizzazione del nanomateriale HNTs-NDI	176
3.4. HNTs da ponte tra il riconoscimento molecolare e il sensing fluorescente	180
3.4.1. Sintesi dell'oligomero $H_2N-T(18)-Lys(3)-CONH_2$ (PNA)	182
3.5. Conclusioni	186
3.6. Sezione sperimentale	188
3.6.1. Materiali e metodi	188
3.6.2. Parte sperimentale sezione 3.3.1.1.	190
3.6.3. Parte sperimentale sezione 3.3.2.1.	191
3.6.4. Parte sperimentale sezione 3.3.3.1.	193
Appendice A.....	196
Appendice B.....	209
Bibliografia:	210
 Capitolo 4 - I sistemi nanostrutturati come filler di compositi biopolimerici	215
4.1. Classificazione e applicazioni dei biopolimeri nella scienza dei nanomateriali	215
4.1.1. Biopolimeri naturali.....	216
4.1.1.1. L'alginato.....	217
4.1.1.2. Il chitosano	218
4.1.2. Biopolimeri sintetici	219
4.1.2.1. L'alcol polivinilico	219

4.2. Il ruolo dei filler nei nanocompositi polimerici multifunzionali	220
4.2.1. Gli HNTs come filler in nanocompositi per applicazioni biomediche	221
4.2.2. Nanocompositi a base di HNTs per applicazioni nel packaging biomedicale	222
4.2.3. Sintesi di filler a base di halloysite per lo sviluppo di nanocompositi con diverse applicazioni.....	224
4.3. Biostampa 3D: principi, materiali e potenzialità nella medicina rigenerativa	241
4.3.1. Le argille minerali nella stampa 3D: prospettive e nuovi sviluppi	242
4.4. Conclusioni.....	265
4.5. Sezione sperimentale.....	267
4.5.1. Materiali e metodi.....	267
4.5.2. Parte sperimentale sezione 4.2.3.....	269
4.5.3. Parte sperimentale sezione 4.3.1.....	274
Appendice A	279
Appendice B	283
Bibliografia:	290
 Conclusioni generali	 297

Elenco acronimi e abbreviazioni

AEM = *Analytical Electron Microscopy*

AFM = *Atomic Force Microscopy*

AgNP = *Silver Nanoparticles*

AIBN = *2,2'-azobis(2-metilpropionitrile)*

Alg = *Alginato*

ANOVA = *Analysis of Variance*

APTES = *(3-amminopropil)trietossisilano*

ASTM = *American Society for Testing and Materials*

ATR = *Attenuated Total Reflectance*

AuNP = *Gold Nanoparticles*

BBB = *Blood-Brain Barrier*

Bent = *Bentonite*

BODIPY = *4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene*

CAD = *Computer-Aided Design*

cADPR = *Cyclic adenosine diphosphate-ribose*

CBs = *Cucurbiturils*

CD = *Cyclodextrin*

CDs = *Carbon Dots*

CLSM = *Confocal Laser Scanning Microscope*

CS = *Chitosane*

CUR = *Curcumine*

DAPI = *4',6-Diamidino-2-fenillindolo cloridrato*

DBDMH = *1,3-Dibromo-5,5-Dimethylhydantoin*

DDS = *Drug Delivery System*

DEM = *Double Exponential Model*

DIPEA = *N,N-Diisopropylethylamine*

DLS = *Dynamic Light Scattering*

DMA = *Dynamic Mechanical Analysis*

DOXO = *Doxorubicine*

DPPH = *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*

DSC = *Differential Scanning Calorimetry*

DTG = *Derivative Thermogravimetry*

EDX = *Energy-Dispersive X-ray spectroscopy or analysis*

EE = *Efficienza di caricamento*

Eg = *Energy Gap*

EOs = *Essential Oils*

FDA = *Food and Drug Administration*

FDM = *Fused Deposition Modeling*

FFA = *Flufenamic Acids*

FITC = *Fluorescein isothiocyanate*

FLQY = *Fluorescence Quantum Yield*

Fmoc = *9-fluorenylmethyloxycarbonyl*

FT-IR = *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

GPE = *Grape Pomace Extract*

HAADF = *High-angle annular dark-field*

HATU = *2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate*

HNTs = *Halloysite Nanotubes*

HRMS = *High-Resolution Mass Spectrometry*

HRTEM = *High-resolution transmission electron microscopy*

Ht = *Hectorite*

IDP = *Inosine Diphosphate*

IMP = *Inosine Monophosphate*

LAA = *L-(+)-Ascorbic acid*

Lap = *Laponite®*

LOD = *Limit of Detection*

MBHA = *4-Methylbenzhydramine resin*

MC = *Moisture Content*

MSNs = *Mesoporous Silica Nanoparticles (MSNs)*

MTX = *Methotrexate*

NaFF = *Flufenamic Acids Sodium Salt*

NDI = *Naphthalene Diimide*

NMR = *Nuclear Magnetic Resonance*

NSAID = *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*

PBAT = *Polybutylene Adipate Terephthalate*

PCA = *Polychloroalkanes*

PDA = *Polydopamine*

PDI = *Polydispersity Index*

PEG = *Polyethylene Glycol*

PETG = *Polyethylene Terephthalate Glycol*

PGA = *Polyglycolic Acid*

Phe = *1,10-phenanthroline*

PL = *Photoluminescence*

PLA = *Polylactic acid*

Plg = *Palygorskite*

PLGA = *Poly(lactic-co-glycolic acid)*

PNA = *Peptide Nucleic Acid*

PNIPAAm = *Poly(N-isopropylacrylamide)*

POM = *Polarized Optical Microscopy*

PS9 = *Sepiolite PS9*

PVA = *Poly(vinyl alcohol)*

PVP = *Polyvinylpyrrolidone*

QY = *Quantum Yield*

RH = *Relative Humidity*

RITC = *Rhodamine B Isothiocyanate*

SEM = *Scanning Electron Microscope*

Sep = *Sepiolite*

STEM = *Scanning Transmission Electron Microscopy*

TEA = *Triethylamine*

TEM = *Transmission Electron Microscope*

TFA = *Trifluoroacetic acid*

TGA = *Thermogravimetric Analysis*

WVTR = *Water Vapor Permeability*

XEDSm = *Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy*

XPS = *X-ray Photoelectron Spectroscopy*

XRD = *X-ray Diffraction*

XRF = *X-ray fluorescence*

Introduzione

***Sistemi nanostrutturati per la nanomedicina:
Le argille minerali***

Introduzione

- Dalla storia alla scienza moderna: l'evoluzione della nanomedicina

La medicina è la scienza e la pratica che si occupa della salute e del benessere degli esseri umani, con l'obiettivo di diagnosticare, trattare, curare, monitorare e prevenire delle malattie. La maggior parte delle persone associa la nanomedicina alle sole formulazioni farmaceutiche che vengono utilizzate per i trattamenti terapeutici e a volte anche per la diagnosi. Tuttavia, questo campo copre un ambito di ricerca e sviluppo molto più ampio e variegato. Tra i vari ambiti della medicina, la nanomedicina si differenzia da altri tipi di medicina in quanto implica lo sviluppo e l'applicazione di materiali e tecnologie di dimensioni su scala nanometrica e rappresenta quindi un campo interdisciplinare in cui nanoscienza, nano ingegneria e nanotecnologia interagiscono con le scienze della vita.¹

Il significato del termine "nano" deriva dal greco "*nanos*", termine che veniva utilizzato per indicare una persona di bassa statura o un oggetto molto piccolo. È infatti noto che prima dell'era della nanotecnologia moderna le civiltà antiche utilizzassero già oggetti dalle dimensioni nanometriche sfruttando addirittura i loro processi. Nell'antico Egitto, ad esempio, era pratica comune tingere i capelli di nero con una tinta composta da calce, ossido di piombo e acqua, che portava alla formazione di nanoparticelle di solfuro di piombo (PbS).² Altro esempio noto è rappresentato dalla Coppa di Licurgo (IV secolo d.C.), un calice romano dalle particolari proprietà ottiche che cambia colore a seconda della posizione da cui proviene la luce. Analisi recenti hanno dimostrato che questo effetto è dovuto alla presenza di nanoparticelle di oro (AuNP) e argento (AgNP) con dimensioni comprese tra i 50 e 100 nm, responsabili del cambio di colore attraverso un effetto tipico e caratteristico della scala nanometrica.³

Nell'era moderna, il sogno di poter riuscire a manipolare la materia su scala nanometrica fu espresso per la prima volta dal fisico Richard Feynman nel 1959, durante un discorso intitolato "*There's plenty of room at the bottom. An invitation to enter a new field of physics*", durante il quale ipotizzò che nel futuro si sarebbero potuti costruire dispositivi di varia natura modificando direttamente la disposizione degli atomi nella materia. Qualche anno dopo fu coniato il termine "nanotecnologia" da Eric Drexler, e solo negli anni 2000, la National Nanotechnology Initiative (NNI) definì questa come: "lo studio e il controllo della materia di dimensioni nanometriche, comprese tra 1 e 100 nm, dimensioni alle quali avvengono fenomeni capaci di conferire ai materiali proprietà fisiche, chimiche e biologiche uniche e completamente diverse da quelle del materiale bulk".⁴

Dati i rilevanti progressi e il numero di brevetti riguardo l'utilizzo dei sistemi nanostrutturati, in particolare per la somministrazione di farmaci a bassa solubilità, rapida eliminazione e con diversi effetti collaterali, la National Science Foundation, prevede che quasi la metà dei farmaci futuri siano costituiti da nanomateriali. Grazie alle loro proprietà questi sono ampiamente utilizzati per la diagnostica, per la somministrazione di farmaci attraverso la barriera ematoencefalica, e per il trattamento di numerose malattie neurodegenerative e tumorali.^{5,6}

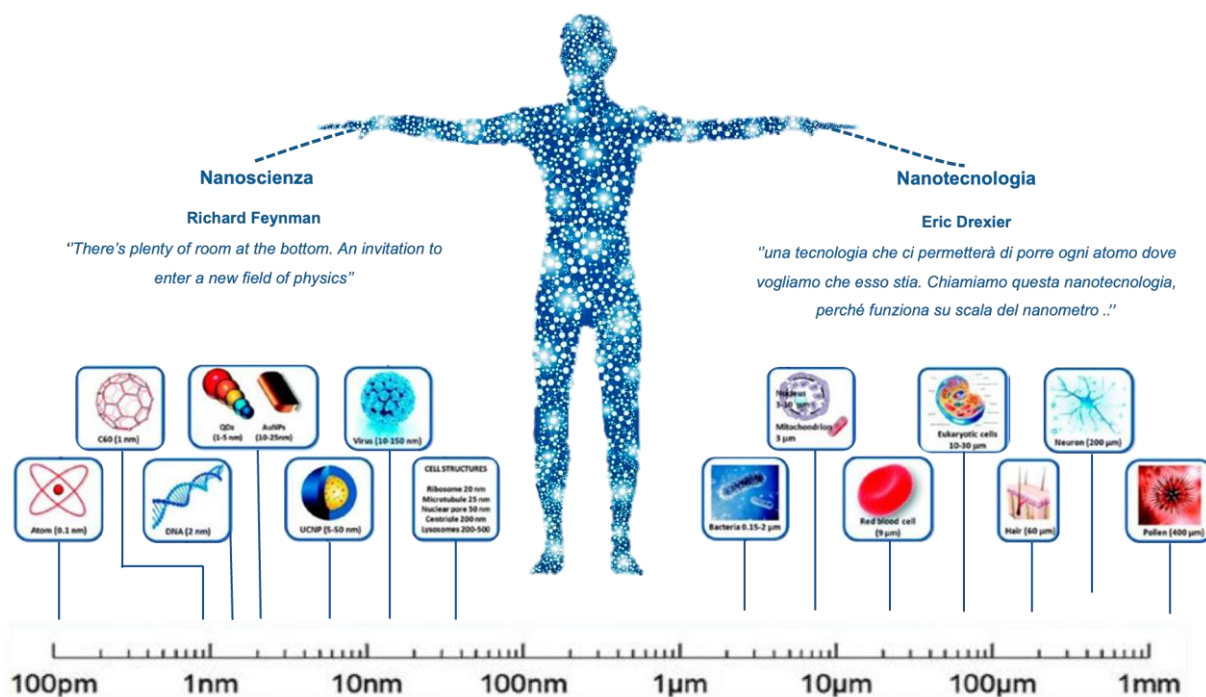


Figura 1. Rappresentazione schematica delle dimensioni relative di strutture atomiche, molecolari, biologiche e cellulari.

Attualmente i nanomateriali vengono classificati in tre categorie in base alla loro composizione: biologici, organici e inorganici.⁷ I nanomateriali biologici si suddividono in tre ulteriori categorie a seconda della loro composizione primaria, e si distinguono in proteine, polisaccaridi o acidi nucleici.⁸ Quelli di tipo organico includono i liposomi, i dendrimeri, materiali polimerici e micelle.⁹ Infine, ritroviamo quelli inorganici, che includono nanomateriali a base di carbonio, nanoparticelle di silice, nanomateriali a base di calcio, nanoparticelle d'oro, quantum dots, e le argille minerali.¹⁰ Questi nanomateriali rispetto ai precedenti sono facili da manipolare e possono essere facilmente impiegati in applicazioni come il *biosensing*, il trasporto di diverse molecole biologicamente attive e farmaci, per l'*imaging* e per la diagnostica.¹¹

In questo contesto, le argille hanno assunto un ruolo di primaria importanza in ambito biomedico, grazie all'abbondanza delle risorse minerali e alle loro proprietà uniche di dispersione, intercalazione, struttura e adsorbimento. Il loro utilizzo e le loro proprietà hanno portato alla nascita di una nuova branca, definita per la prima volta nel 2025, come

“Mineralogia Medica”,¹² intesa come lo studio della relazione tra le argille minerali e la salute umana. In particolare, questa nuova disciplina ha lo scopo di definire e descrivere come le argille minerali interagiscono con le cellule, tessuti e organi.¹²

- *Le argille minerali*

Le argille minerali, fillosilicati abbondanti in natura, sono nanomateriali inorganici composti da elementi quali ossigeno, silicio, alluminio o magnesio, ma sono anche presenti elementi quali ferro, calcio, sodio o potassio, che ne diversificano le loro proprietà intrinseche. Questi minerali argillosi sono utilizzati dall'uomo da migliaia di anni e ampiamente utilizzati per la produzione di ceramiche, medicinali, porcellane, pigmenti minerali e materiali da costruzione. Esempi del loro utilizzo nell'antichità sono rappresentati dai celebri reperti Maya ritrovati in Messico (**Figura 2a**) o quelli di Dunhuang, nella provincia cinese del Gansu (**Figura 2b**).¹³ Le argille minerali venivano inoltre impiegate come rimedi naturali. Esistono tracce dell'uso di tali sostanze a fini curativi già in epoca preistorica, come l'ocra mescolata con acqua e fango che veniva utilizzata per la pulizia della pelle e la guarigione delle ferite,¹⁴ o ancora, in Mesopotamia e nell'antico Egitto, le cosiddette “terre medicinali” (oggi identificate come argille) erano impiegate come agenti terapeutici per il trattamento delle ferite e il controllo delle emorragie. Cleopatra è anche nota per aver applicato fanghi del Mar Morto sul viso a scopo estetico, le terre nubiane venivano utilizzate dagli Egizi per le loro proprietà antinfiammatorie, e i fanghi erano impiegati anche nella mummificazione.¹⁵

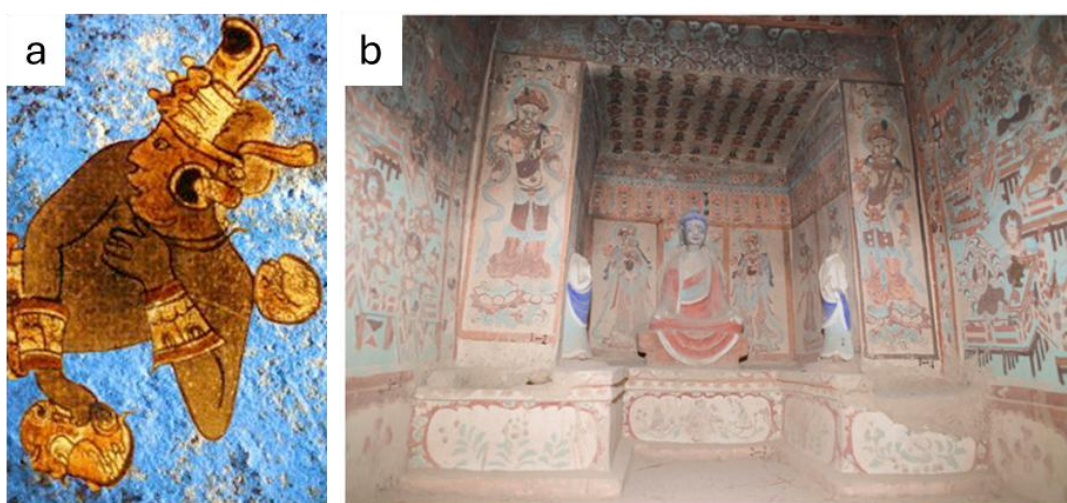


Figura 2. (a) Immagine dei ritrovamenti Maya in Messico e (b) dei ritrovamenti di Dunhuang nella provincia del Gansu.

In Cina, sia nell'antichità che in epoca moderna, le argille hanno svolto un ruolo importante nelle applicazioni mediche, come la disintossicazione, la diuresi, la regolazione del sangue, l'azione sedativa, come antidiarroici e antiemetici.¹²

Piu di mezzo secolo fa, inoltre, il geochimico Victor Moritz Goldschmidt e il fisico John Desmond Bernal, ipotizzarono che queste argille avessero avuto un ruolo importante nella sintesi prebiotica, grazie alle loro capacità di proteggere, assorbire e catalizzare la trasformazione di piccole molecole organiche.¹⁶ E quindi possibile affermare che le argille minerali abbiano svolto e continuino a svolgere un ruolo primario nello sviluppo della civiltà e della società come si osserva in **Figura 3**.

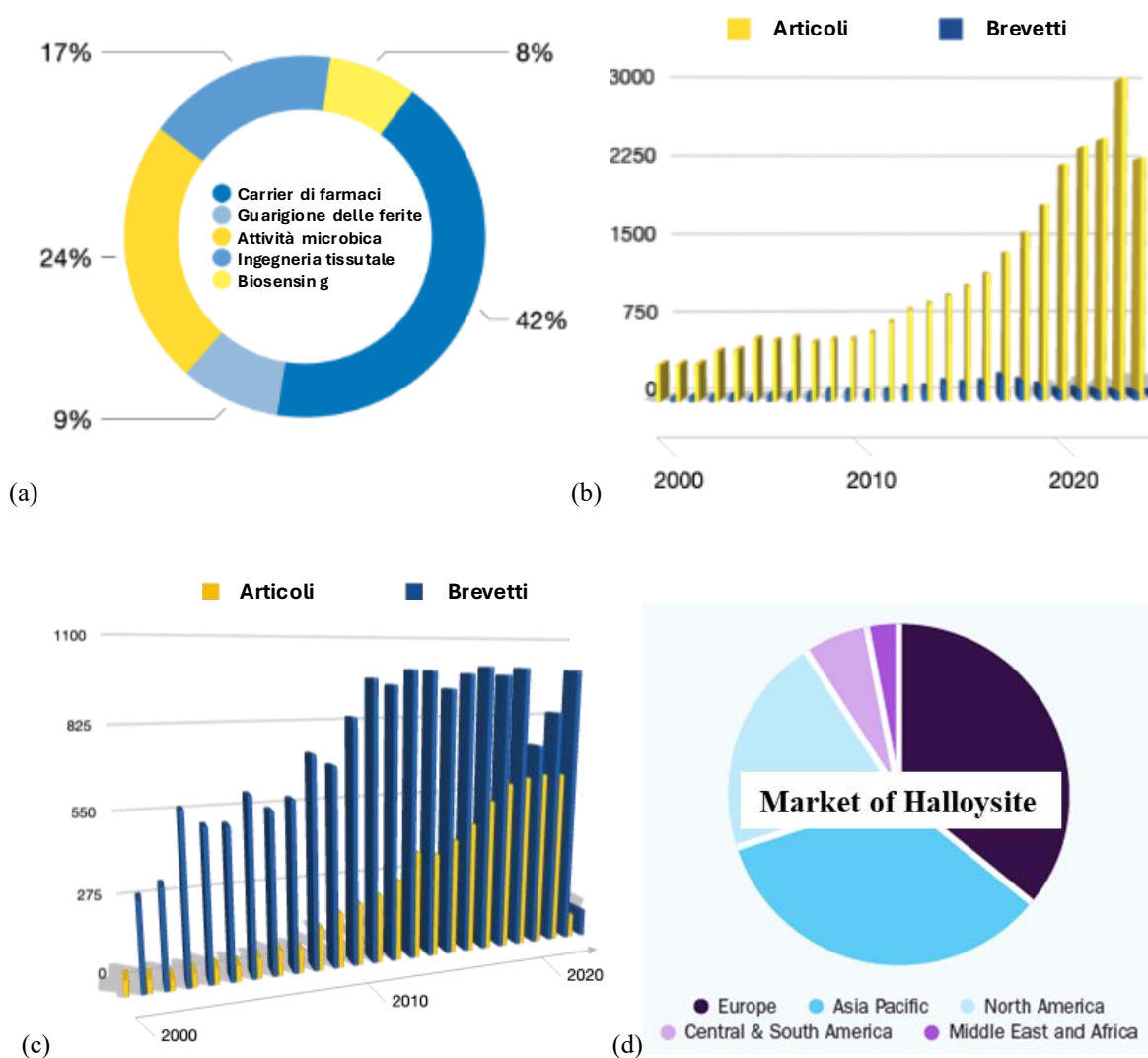


Figura 3. (a) grafico a torta che mostra le principali applicazioni delle argille in nanomedicina, sulla base dei dati Scopus aggiornati al 2025; istogramma per anno del (b) numero di articoli e brevetti di argille in nanomedicina, sulla base dei dati Scopus e Scifinder rispettivamente, aggiornati al 2025 – (c) numero di articoli e brevetti riguardo l'halloysite; (d) grafico a torta che mostra la suddivisione a livello mondiale del mercato dell'halloysite.

In **Figura 3a**, il grafico a torta sintetizza visivamente la pluralità di impieghi che le argille trovano oggi nell'ambito della mineralogia medica. La distribuzione dei diversi settori – dal *drug carrier* alla cura della pelle, dall'ingegneria tissutale all'attività antimicrobica, passando per il *biosensing* - mette in evidenza come questi materiali siano ormai parte integrante di molteplici strategie terapeutiche. Al di là delle proprietà, che verranno descritte a breve nel dettaglio, ciò che emerge con forza è la capacità delle argille di adattarsi a contesti biomedici eterogenei, contribuendo allo sviluppo di soluzioni efficaci, biocompatibili, sostenibili e soprattutto a basso costo. Questa versatilità conferma il ruolo centrale delle argille nella medicina contemporanea, non solo come nanomateriali funzionali, ma anche come piattaforme per la progettazione di dispositivi medici. A conferma del crescente interesse verso tali materiali, l'istogramma in **Figura 3b** mostra l'andamento del numero di articoli scientifici e brevetti pubblicati tra il 2000 e il 2025 relativi alle argille minerali. I dati evidenziano una tendenza complessivamente in crescita: le pubblicazioni scientifiche aumentano in modo più marcato e rimangono numericamente superiori ai brevetti; anche questi ultimi, tuttavia, mostrano un incremento costante, a testimonianza di un progressivo orientamento verso applicazioni biomediche concrete. Ovviamente questo andamento generale può variare a seconda dell'argilla che si considera, come ad esempio nel caso dell'halloysite, di cui parleremo in seguito, dove si osserva un andamento opposto rispetto al precedente (**Figura 3c**). In questo contesto, le argille quindi, si affermano come veri e propri materiali *green* del XXI secolo, unendo efficacia terapeutica, biocompatibilità e sostenibilità ambientale. Questo sviluppo è stato reso possibile anche grazie ai progressi nelle nanotecnologie, che hanno permesso di valorizzare e conoscere approfonditamente la struttura delle argille.

- ***Struttura e composizione***

Le argille minerali, come già detto, sono alluminosilicati idrati composti da ossidi di alluminio e silicio. Questi contengono anche numerosi cationi come Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{3+} . Per comprendere al meglio le proprietà che questi materiali possiedono e come queste possano essere sfruttate per il loro impiego, è necessario comprendere e conoscere le loro dimensioni e la loro struttura.¹⁷ Generalmente, dal punto di vista strutturale le argille minerali sono fillosilicati formati da strati tetraedrici (T) e ottaedrici (O) che si alternano formando dei foglietti. I primi sono costituiti da unità $[\text{SiO}_4]$ e i secondi consistono in unità $[\text{MO}_4(\text{OH})_2]$ dove M può essere un catione trivalente (come l' Al^{3+}) o bivalente (come il Mg^{2+}), rispettivamente ottaedricamente e trivalentemente coordinati (**Figura 4a**). La caratteristica che spiega e chiarisce l'architettura di queste argille risiede nel fatto che la ripetizione di queste strutture T

e O sono entrambe a simmetria esagonale. Queste strutture coincidono perfettamente tra loro e permettono all'ossigeno rivolto verso l'esterno di ciascun tetraedro di interagire con i gruppi ossidrilici dell'ottaedro, tramite formazione di legami a idrogeno.^{18,19}

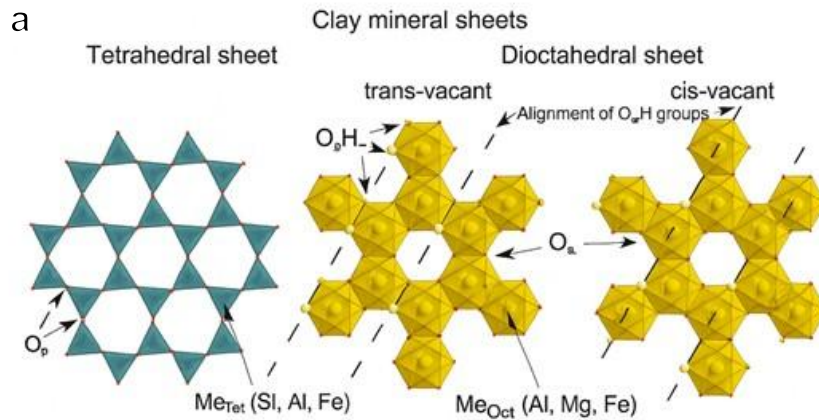


Figura 4. Struttura dei foglietti tetraedrici e ottaedrici delle argille (Tournassat *et al.*, 2015).²⁰

I foglietti tipicamente hanno uno spessore di circa 1 nm, mentre le dimensioni variano tra 1 e 1000 nm (**Figura 5**).

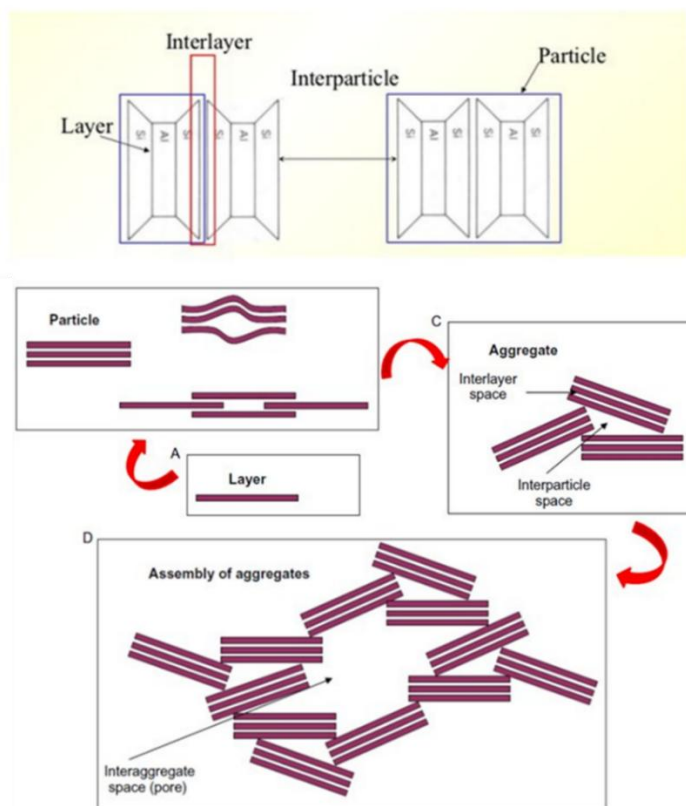


Figura 5. Diagramma che mostra (A) un singolo strato; (B) una particella costituita da strati impilati, in cui la traslazione e la deformazione degli strati possono dare origine a un poro lenticolare; (C) un aggregato, che evidenzia uno spazio interlamellare e uno spazio interparticellare; e (D) un insieme di aggregati, che racchiude uno spazio inter-aggregato (Bergaya and Lagaly, 2013).²¹

Inoltre, tra ogni strato T e O è presente uno spazio, chiamato spazio interlamellare, che può essere vuoto o possedere cationi alcalini e alcalini-terrosi idratati. Questi componenti sono noti come “unità strutturali” e la sovrapposizione di 5-10 strati paralleli produce quella che viene definita “particella di argilla” o “particella primaria”, il cui spessore tipicamente varia tra gli 8 e i 10 nm. Queste particelle a loro volta possono orientarsi casualmente tra loro per formare un aggregato, con relativo spessore interparticellare, le cui dimensioni variano tipicamente tra 0.1 e 10 μm . In base a come questi aggregati o strati si dispongono tra loro si originano argille a diversa morfologia, come strutture lamellari piatte, fibrose o tubulari.⁸

- *Classificazione, morfologia e proprietà*

Le argille minerali sono classificate in base alla stechiometria degli strati e la loro capacità di rigonfiamento. Questa classificazione è utile per comprendere maggiormente come scegliere e utilizzare il materiale ideale in base alla specifica applicazione. Come si osserva in **Figura 6**, a seconda della diversa disposizione degli strati T e O, si possono originare argille a diversa stechiometria, come ad esempio, una stechiometria 1:1 (T-O) che è tipica della kaolinite e dell'halloysite.

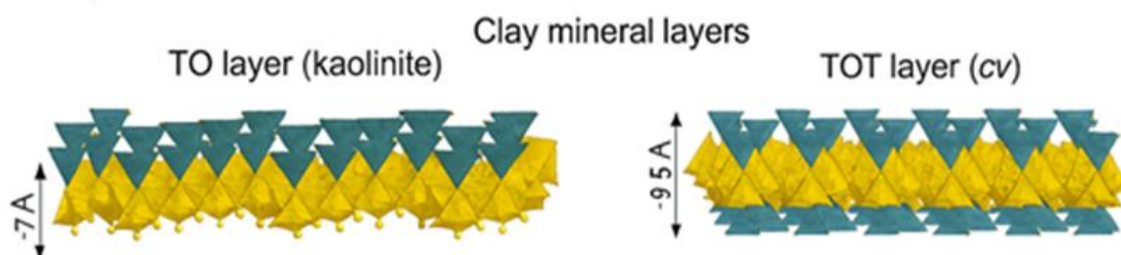


Figura 6. Strutture di tipo T-O e T-O-T per argille rispettivamente a stechiometria 1:1 e 2:1 (Tournassat *et al.*, 2015).²⁰

Queste strutture sono estremamente stabili grazie ai legami a idrogeno presenti che impediscono l'entrata di molecole di acqua e di altre sostanze tra lo spazio interlamellare, che risulta essere di 7 Å. Un'altra tipica stechiometria è la 2:1 (T-O-T), tipica dell'hectorite o della sepiolite. In questo caso lo spazio interlamellare varia tra i 9 e i 15 Å a seconda della quantità di acqua presente.²² Le argille con questa stechiometria, infatti, in condizioni secche possiedono cationi nello spazio interlamellare, che una volta a contatto con l'acqua possono idratarsi, producendo forze repulsive tra loro e causando un'espansione degli strati. Le loro formule strutturali ideali sono $\text{Si}_2\text{Al}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ per le argille con struttura T-O e $\text{Si}_4\text{Al}_2\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ per quelle con struttura T-O-T.²⁰ Esiste anche un ulteriore gruppo di fillosilicati, chiamato di tipo 2:1:1, che presenta

una struttura di base 2:1 con un interstrato costituito da un foglio contenente cationi Mg^{2+} o Fe^{2+} oppure Al^{3+} . Questo gruppo è rappresentato dalle cloriti. Poiché non avviene adsorbimento di acqua nello spazio interlamellare, tali argille sono considerati non espansibili.^{19,23} Da queste diverse caratteristiche strutturali ne scaturiscono morfologie differenti (**Figura 7**)

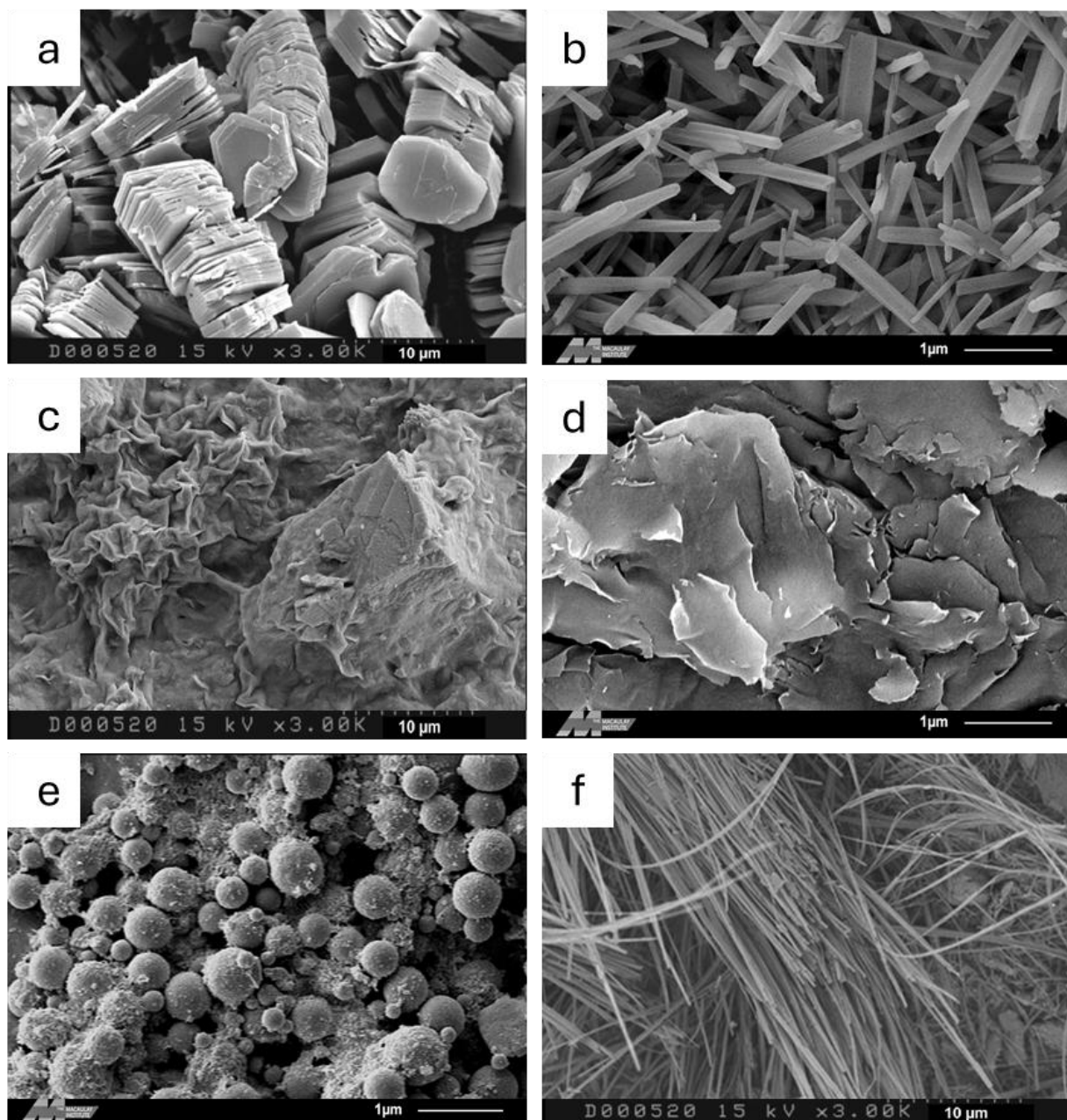


Figura 7. Morfologia delle diverse argille al SEM di (a) kaolinite, (b) halloysite, (c) bentonite, (d) hectorite, (e) Laponite® e (f) sepiolite.

In questa tesi sono state oggetto di studio argille a stechiometria 1:1 come l'halloysite e stechiometria 2:1 come l'hectorite, il suo analogo sintetico Laponite®, e la Sepiolite, che verranno ora descritte nel dettaglio.

- *Argille a stechiometria 1:1 – Il gruppo del kaolino*

Le argille a stechiometria di tipo 1:1 si raggruppano in due grandi famiglie (**Figura 8**): il kaolino e il serpentino. Quest'ultimo comprende fillosilicati a struttura triottaedrica, in cui l'ottaedro è completamente occupato da cationi come il magnesio. Tra i minerali principali figura il crisotilo, noto anche per la sua forma fibrosa di amianto. A differenza del serpentino, il gruppo del kaolino include fillosilicati diottaedrici. Di questa famiglia fanno parte la kaolinite, l'halloysite, la dickite e la nacrite.²⁴

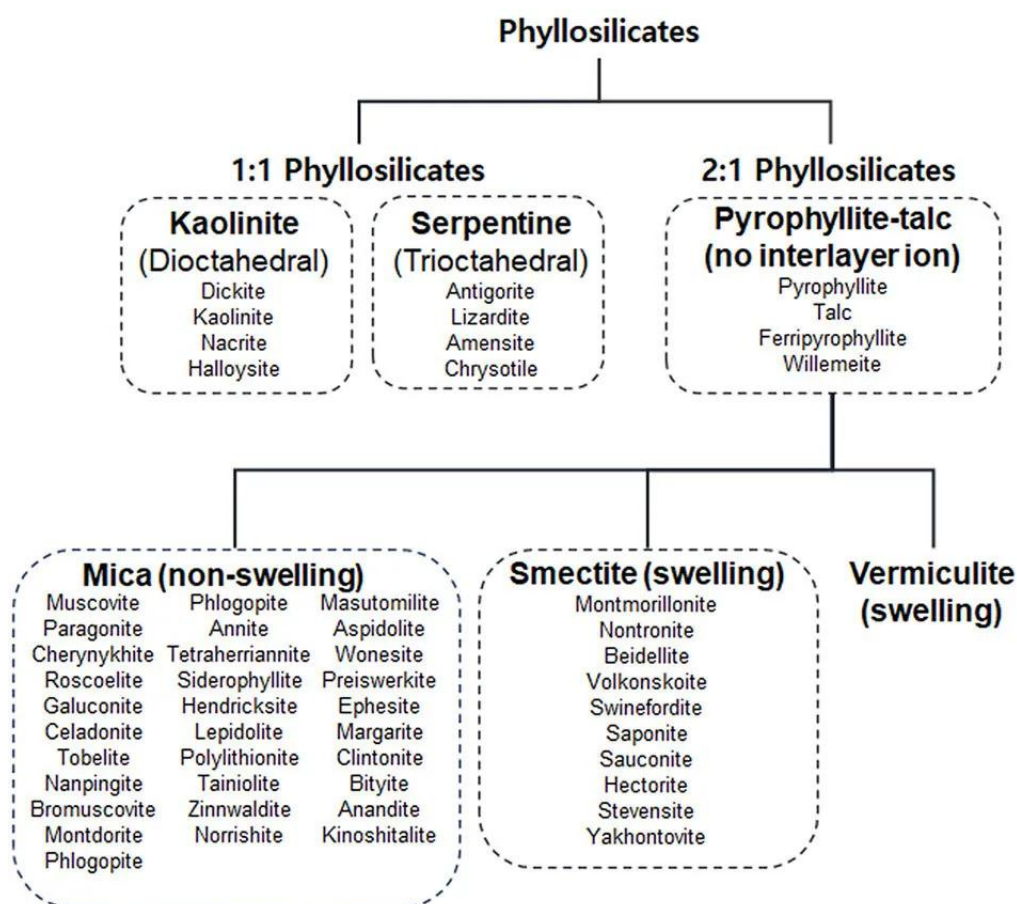


Figura 8. Classificazione dei gruppi di minerali argillosi (Velde, 1992).²⁵

- *L'halloysite*

L'halloysite deve il suo nome al geologo belga Jean-Baptiste Julien d'Omalius d'Halloy (1783-1875), figura pioneristica della geologia europea e fondatore delle scienze geologiche in Belgio. I suoi contributi alla geologia furono ampiamente riconosciuti, portandolo ad essere membro dell'Accademia Reale del Belgio, dell'Académie des Sciences di Parigi e di numerose altre società scientifiche europee. La sua meticolosa osservazione sul campo e la classificazione

sistematica delle rocce e dei minerali contribuirono in maniera decisiva alla formazione e al riconoscimento della geologia come una vera disciplina scientifica. Fu durante le sue indagini, condotte nella zona di Angleur (Liegi), che Omalius d'Halloy individuò per la prima volta un minerale argilloso diverso dalla kaolinite, a cui nel 1826, il chimico francese Pierre Berthier diede il nome di halloysite in onore del suo collega d'Halloy. Questo evento segnò l'inizio di quasi due secoli di dibattito scientifico sulla classificazione e la nomenclatura di questo minerale.^{26,27}

Per decenni il termine fu applicato a campioni con caratteristiche variabili, fino a quando Mehmel (1935) dimostrò che sotto il nome di halloysite erano stati raggruppati due minerali distinti: una fase idrata, contenente acqua debolmente legata e caratterizzata da un picco nei diagrammi di diffrazione ai raggi X di circa 10 Å, e una fase disidratata, priva di quest'acqua e con uno spazio tra i diversi strati di circa 7 Å.²⁸ Solo nel 1947, dopo un decennio di studi, denominazioni e dibattiti riguardo le due forme, MacEwan suggerì che le forme fossero semplicemente gli estremi, originati da diverse condizioni ambientali, di un unico materiale. Questa impostazione e classificazione fu poi ripresa e affinata da Brindley (1961) e Grim (1968), che introdussero le denominazioni oggi ampiamente accettate di halloysite-(10Å) e halloysite-(7Å), collegando esplicitamente il nome allo stato di idratazione.²⁹

Attualmente, il Comitato di Nomenclatura dell'Association Internationale Pour l'Étude des Argiles (AIPEA), associazione scientifica nata nel 1963 con l'obiettivo di promuovere la ricerca e la collaborazione scientifica nel campo delle argille, raccomanda l'uso esclusivo delle denominazioni introdotte da Brindley e Grim.³⁰ Dalla scoperta di Omalius d'Halloy nel XIX secolo fino alle applicazioni contemporanee in nanomedicina, l'halloysite rappresenta un esempio di come la ricerca storica, l'evoluzione della mineralogia e la scienza dei materiali possano intrecciarsi nel tempo.

L'halloysite ($\text{Si}_2\text{Al}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), è un'argilla minerale che presenta una struttura tubulare cava dalle dimensioni nanometriche, e che si origina per avvolgimento di 10-15 doppi-strati durante un processo definito di "kaolinizzazione". In passato l'halloysite veniva utilizzata per la produzione di ceramiche come alternativa alla kaolinite.³¹ Solo nel 1998 con una comunicazione ad un convegno e successivamente nel 2001 con la prima pubblicazione scientifica non in ambito geologico, essa venne considerata come "nanocontainer" per farmaci;³² dopo questa data sono stati presi in considerazione i suoi nuovi e innumerevoli impieghi derivanti dalla sua struttura e proprietà, che verranno discusse nel dettaglio più avanti.

- Struttura e proprietà

L'halloysite in natura si presenta tipicamente sotto forma di nanotubi, in seguito ad avvolgimento verso l'interno di diversi strati sovrapposti di kaolinite, ed è quindi comunemente indicata come nanotubi di halloysite (HNTs). La disposizione dei fogli genera una superficie esterna composta da gruppi silossanici (Si-O-Si) e un lume interno costituito da gruppi alluminolici (Al-OH).³³ Inoltre, il processo di arrotolamento provoca la rottura dei gruppi silossanici presenti sulla superficie esterna con conseguente formazione di gruppi silanolici (Si-OH).³⁴ La lunghezza degli HNTs varia tra 0.2 e 2.0 μm , il diametro esterno è compreso tra 50 e 100 nm, mentre il diametro del lume interno è di 10-30 nm (**Figura 9a e b**).

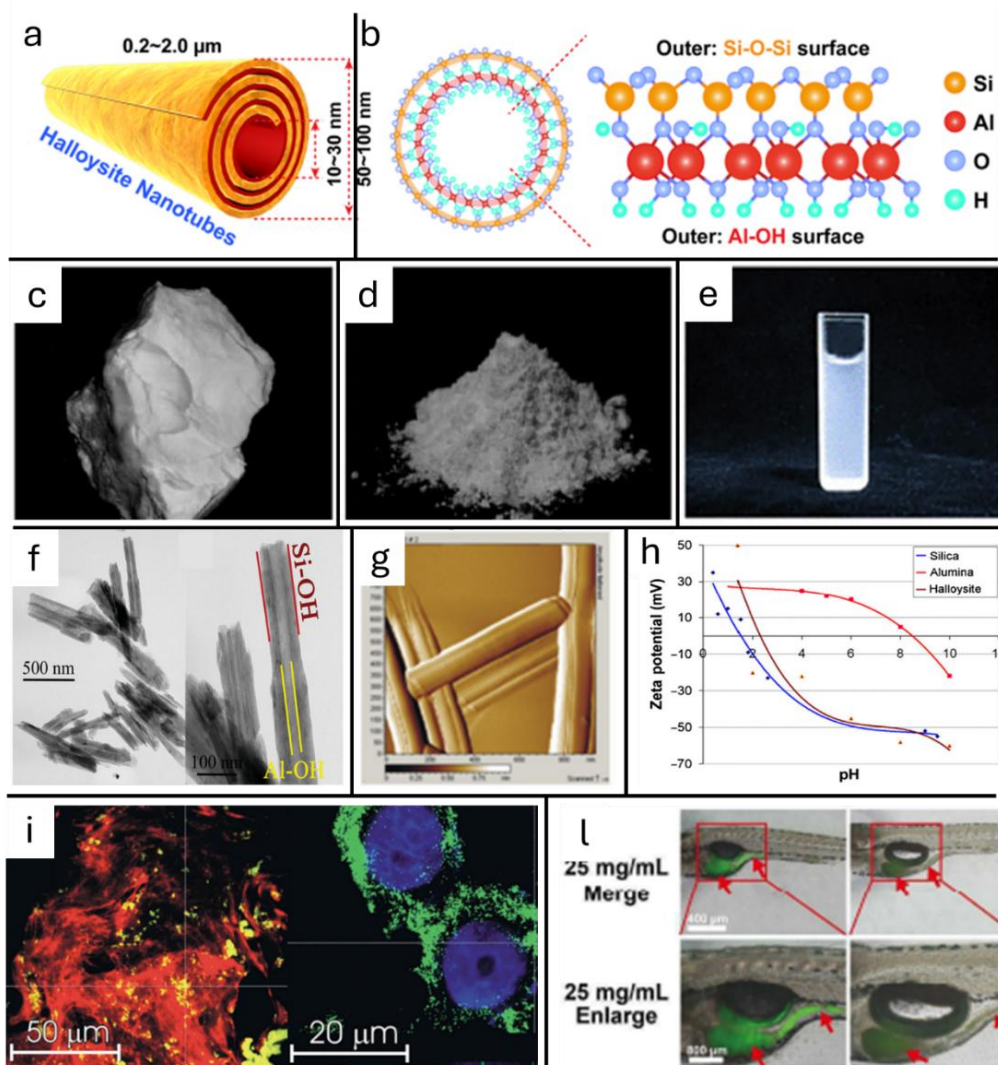


Figura 9. (a) Struttura e dimensioni degli HNTs; (b) composizione chimica delle superfici interna ed esterna degli HNTs (Feng *et al.*, 2024);¹² (c-e) immagine di come si mostra l'halloysite in polvere e la dispersione acquosa; (f-g) immagini TEM e AFM degli HNTs; (h) andamento del potenziale- ζ degli HNTs al variare del pH; (i) studio di internalizzazione *in vitro* degli HNTs (Abdullayev & Lvov, 2013)³⁵ e (l) accumulo ed eliminazione degli HNTs su *zebrafish* (Long *et al.*, 2018).³⁶

Visivamente gli HNTs si presentano come una polvere bianca che mostra, quando dispersa in acqua, proprietà colloidali stabili (**Figura 9c-e**).³⁷ Questa variabilità dipende dal tipo e dall'area geografica del giacimento da cui questa argilla viene estratta, con proprietà e caratteristiche uniformi all'interno dello stesso sito di estrazione. I campioni commerciali più diffusi presentano un diametro di circa 50 nm e una lunghezza di 0.5-2.0 μm (**Figura 9f-g**).³⁸

Date le dimensioni, gli HNTs hanno una superficie specifica di 50-70 cm^2/g , che può anche essere aumentata fino a 400 cm^2/g tramite l'esfoliazione con acidi.³⁹

La diversa composizione chimica delle sue superfici fa sì che i nanotubi di halloysite subiscano processi di ionizzazione opposti in ambiente acquoso, generando superfici interne ed esterne con carica opposta in un intervallo di pH compreso tra 3 e 8 (**Figura 9h**).⁴⁰ In particolare, la superficie esterna, data la ricca presenza di legami Si-O-Si, possiede un potenziale- ζ negativo compreso tra i -30 e -40 mV a pH 7.0; la superficie interna, costituita da gruppi Al-OH risulta avere una carica positiva. Allo stesso tempo i fogli tetraedrici di silicio-ossigeno sullo strato esterno rendono gli HNTs idrofobici, ma allo stesso tempo, questi, riescono a formare legami polari con gli atomi di ossigeno del mezzo acquoso, generando una affinità per i solventi polari.²⁸

- ***Gli HNTs in nanomedicina: biocompatibilità e applicazioni***

Le caratteristiche appena discusse conferiscono agli HNTs biocompatibilità, capacità di adesione cellulare, buona distribuzione *in vivo* e possibilità di incapsulare e caricare molecole di differente dimensione e caratteristiche. La biocompatibilità di queste argille oggi è stata già studiata a diversi livelli, così come il meccanismo di endocitosi tramite il quale gli HNTs riescono ad essere internalizzati dalle cellule (**Figura 9i**).⁴¹ Numerosi test *in vitro* e *in vivo*, su diverse linee cellulari e modelli animali, hanno mostrato una tossicità e genotossicità notevolmente più ridotta rispetto agli ampiamente conosciuti nanotubi di carbonio,⁴² aprendo così nuove strade e nuove frontiere sul loro utilizzo in campo medico.^{36,43}

Studi condotti su *zebrafish* (**Figura 9l**) hanno mostrato un accumulo nel tratto gastrointestinale, con successiva eliminazione senza accumuli rilevabili nel sistema circolatorio.³⁶ Risultati simili sono stati osservati in studi condotti su mammiferi, che hanno mostrato come gli HNTs, non causino irritazioni cutanee, infiammazioni o danni all'addome e all'apparato riproduttivo.⁴⁴ Grazie alla loro elevata stabilità chimica l'halloysite ha dimostrato inoltre, di essere sicura anche in un ambiente acido come quello dello stomaco fino ad una concentrazione di 5 mg/kg, oltre il quale inizia ad essere accumulato alluminio nel fegato. I dati ottenuti riguardo

l'epatotossicità suggeriscono che 3 g di HNTs al giorno possono essere consumati dall'uomo in totale sicurezza. Per quanto riguarda il sistema circolatorio, gli HNTs non essendo biodegradabili, non possono essere utilizzati direttamente per iniezioni dirette poiché la coagulazione dell'argilla potrebbe causare trombosi.⁴⁵

Attualmente, quindi, i metodi di somministrazione più appropriati per l'halloysite rimangono la somministrazione orale e l'applicazione topica, in applicazioni quali il *drug-carrier* per il rilascio controllato di farmaci, ad attività antibatterica, antiinfiammatoria o antitumorale, come biosensori per la rilevazione di biomolecole o ioni, nella cura delle ferite e nella realizzazione di impianti ossei (**Figura 10**).¹²

Nei capitoli che seguono verranno illustrate nel dettaglio le principali applicazioni degli HNTs in diversi settori della nanomedicina. Prima di andare nel dettaglio delle diverse applicazioni e dare uno sguardo ai nuovi sistemi nanostrutturati ottenuti nel corso di questo dottorato, è tuttavia necessario considerare le strategie di modifica e funzionalizzazione possibili per questi nanomateriali, al fine di adattarne le caratteristiche alle specifiche esigenze di ciascuna applicazione considerata.

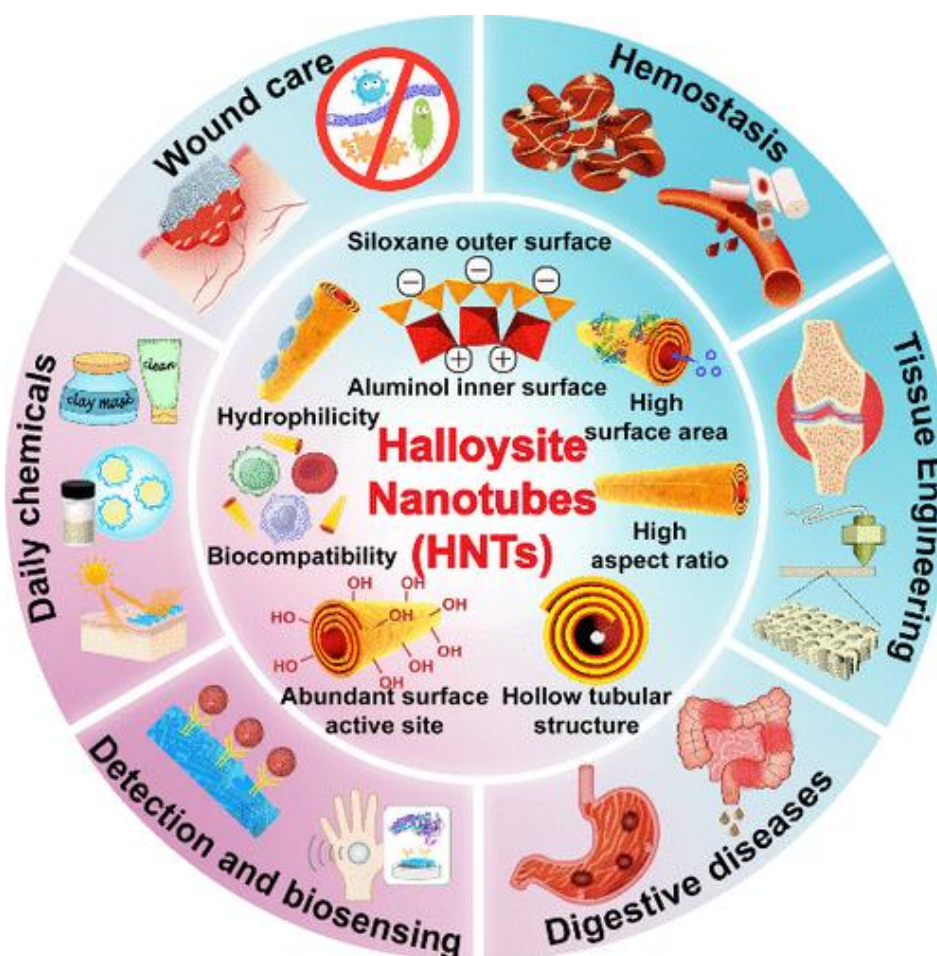


Figura 10. Schematizzazione di tutte le possibili applicazioni degli HNTs in applicazioni mediche/biomediche (Liu *et al.*, 2024).¹²

- *Funzionalizzazione dell'halloysite*

La modifica degli HNTs può essere realizzata attraverso diverse tecniche e strategie che, nell'ultimo decennio, hanno consentito di aumentare i campi di applicazione. Infatti, l'introduzione di molecole organiche o inorganiche ha permesso di conferire nuove caratteristiche, tipicamente assenti nelle argille, come proprietà fotoluminescenti, fototermiche, elettriche e specifiche attività biologiche. Tali modifiche, applicate singolarmente o in combinazione, hanno portato allo sviluppo di numerosi sistemi nanostrutturati multifunzionali.⁴⁶ In generale, gli approcci di modifica si classificano in tre categorie principali: modifiche supramolecolari, modifiche covalenti e puntuali.^{47,48}

- *Modifica supramolecolare*

La modifica supramolecolare dell'halloysite rappresenta una strategia relativamente semplice ed efficace che sfruttando le interazioni non covalenti tra i gruppi funzionali presenti sulle due superfici dell'argilla e del principio attivo. Tali interazioni possono essere di natura diversa: (i) interazioni elettrostatiche, (ii) interazioni idrofobiche, (iii) legami a idrogeno e (iv) forze di Van der Waals.^{49,47} I legami a idrogeno e le forze di Van der Waals sono favoriti dalla presenza di gruppi silanolici e alluminolici, distribuiti sulle superfici esterna e interna del nanotubo. Questa strategia, ad esempio, introduce una maggiore stabilità termica di enzimi o proteine, e una migliore interazione con matrici polimeriche.^{50,51} Le interazioni elettrostatiche si basano sulla peculiare eterogeneità di carica delle due superfici. Questa caratteristica consente una funzionalizzazione selettiva, dove specie anioniche possono essere confinate nel lume e specie cationiche legarsi alla superficie esterna. Questo tipo di modifica, inoltre, permette di regolarne il potenziale- ζ , la stabilità colloidale, l'affinità per solventi polari o apolari e la dispersibilità in diversi mezzi o matrici polimeriche.⁵²⁻⁵⁴ Le interazioni idrofobiche, invece, sfruttano ambienti meno polari come le cavità interne o eventuali spazi interlamellari dell'argilla, i quali risultano più idrofobi rispetto al mezzo acquoso circostante.⁵⁵⁻⁵⁷

Sebbene singolarmente queste interazioni non covalenti siano energeticamente deboli, la loro cooperatività può determinare un'elevata affinità tra la superficie dell'argilla e la molecola ospite. Inoltre, tali modifiche sono generalmente reversibili e fortemente dipendenti da parametri come pH, forza ionica e natura del mezzo, conferendo all'halloysite una notevole versatilità in diversi campi di applicazione.⁵⁸ Nel campo della nanomedicina, le modifiche supramolecolari si sono infatti rivelate fondamentali per la realizzazione di nanomateriali

multifunzionali con applicazioni che spaziano dal rilascio controllato di farmaci al trasporto mirato di molecole bioattive, dalla costruzione di scaffold per ingegneria tissutale allo sviluppo di superfici e sistemi ad attività antimicrobica.^{37,59} Recentemente, ad esempio, è stata indagata in modo sistematico l'interazione supramolecolare tra diversi PNA che possiedono cariche differenti o neutre e l'halloysite (**Figura 11a**).⁶⁰ Comprendere le modalità di interazione tra molecole cariche e le superfici degli HNTs (**Figura 11b**) è fondamentale per progettare e sviluppare materiali a base di halloysite per il rilascio intracellulare di PNA e di altre molecole biologicamente attive.⁶¹

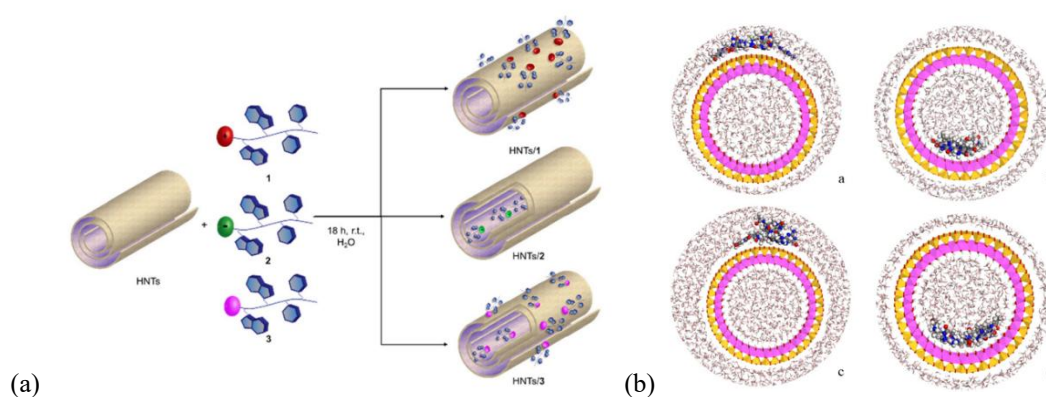


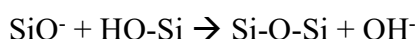
Figura 11. (A) Interazione supramolecolare tra le diverse superfici degli HNTs e PNA aventi diverse cariche e (B) studi teorici riguardo la loro possibile disposizione sulla superficie interna ed esterna del nanotubo (Falanga *et al.*, 2024).⁶⁰

I risultati hanno evidenziato che i PNA, in funzione della loro carica, interagiscono in maniera diversa con le superfici degli HNTs e che la loro carica influenza anche le cinetiche di rilascio a pH fisiologico.⁶² Il facile ottenimento dei nanomateriali HNTs/principio attivo risulta essere un approccio di sintesi semplice, scalabile e compatibile con processi *green*.

- **Modifica covalente**

La modifica covalente dell'halloysite consente di ottenere nanomateriali con proprietà aggiuntive rispetto alla sola argilla, mediante l'introduzione di legami covalenti tra i gruppi funzionali introdotti in quest'ultima e le molecole che si desiderano legare.⁴⁷ L'halloysite come già detto presenta alcuni gruppi silanolic (Si-OH),⁶³ che pur possedendo funzionalità ossidriliche, non hanno propensione a reagire da nucleofili come i comuni alcoli (R-OH), essendo il contesto strutturalmente differente. Infatti, l'atomo di ossigeno dell'ossidrile è legato in un caso al silicio e nell'altro al carbonio; il primo è molto meno elettronegativo del secondo (valore di elettronegatività Si (1.90), C (2.55))⁶⁴ e questo rende il legame *Si-O* molto più

polarizzato verso l'ossigeno rispetto al legame R-CH₂-O-H. Inoltre, il silicio non possiede orbitali π disponibili o a energia adatta con cui l'ossigeno possa delocalizzare la carica negativa;⁶⁵ l'ossigeno in Si-OH, quindi, ha una densità elettronica più alta già nello stato neutro rispetto all'ossigeno in R-CH₂-OH. Conseguentemente la perdita di un protone da Si-OH è più "labile" rispetto ad un alcol e questo risulta essere un acido più forte di un ROH (ad esempio Et₃Si-OH, pK_a = 13.6; Et₃COH, pK_a = 19).⁶⁶ Per questo motivo tende a reagire non attraverso le classiche reazioni di sostituzione nucleofila su centri carboniosi, come farebbe un alcol, ma piuttosto tramite reazioni di condensazione nucleofila con altri gruppi silanolic, ⁶⁷ formando legami Si-O-Si molto stabili:



Le modifiche covalenti sull'hallowysite quindi, non coinvolgono direttamente i gruppi Si-OH come nucleofili, ma questi vengono prima soggetti ad una reazione sol-gel partendo da precursori alcossisilanolici, che portano alla formazione di HNTs-organosilano,⁶⁸ il quale possiede generalmente delle funzionalità che possono successivamente essere ulteriormente modificate con comuni reazioni organiche.^{69,70} Gli organo silani comunemente utilizzati sono riportati in **Figura 12**.

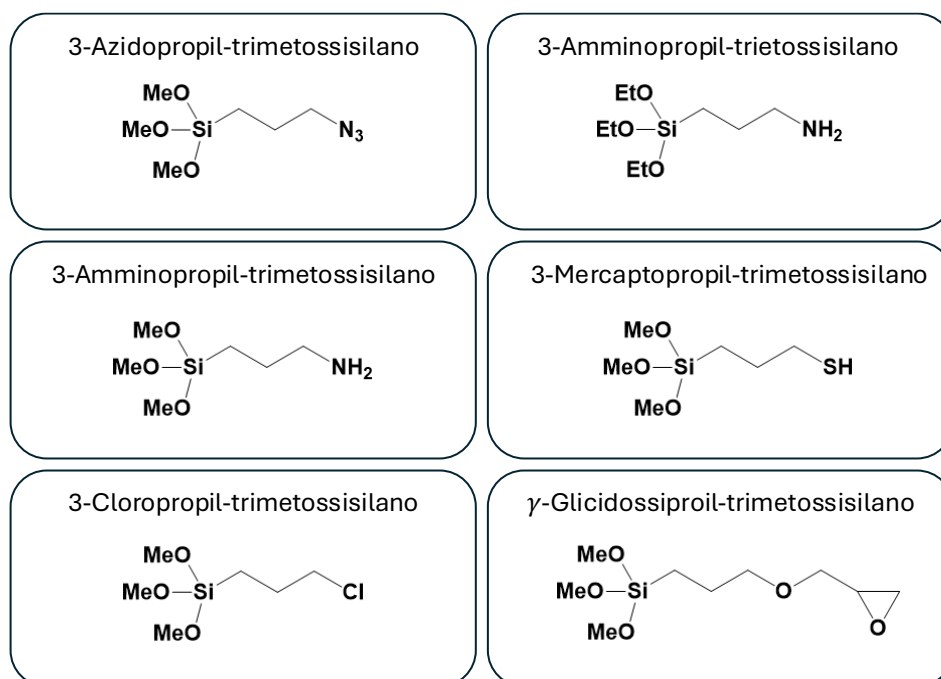


Figura 12. Organosilani comunemente utilizzati per le modifiche della superficie esterna dell'hallowysite.

Tra gli organosilani più utilizzati vi è il 3-aminopropil-trietossisilano (APTES). Questo è stato utilizzato per aumentare il carico di aspirina sugli HNTs e sfruttato per le interazioni

elettrostatiche tra i gruppi $-NH_2$ del nanomateriale e alcuni farmaci.⁷¹ Inoltre, i gruppi amminici introdotti sulla superficie esterna dell'halloysite hanno permesso di legare polimeri o piccole molecole organiche tramite condensazione amidica. Ad esempio legando un polimero sensibile alla temperatura, come il PNIPAAm, è stato ottenuto un nanosistema che consente il rilascio mirato del farmaco a temperature superiori a 32 °C.⁷² Lo stesso tipo di funzionalizzazione è stato utilizzato per legare covalentemente l'acido tartarico usato come precursore per l'ottenimento di carbon dots.⁷³ Questa strategia di tipo *bottom-up* ha permesso la sintesi diretta di nanoparticelle fluorescenti, ottenendo un nanomateriale utile per il trasporto di materiale genico, tracciabile e antiossidante.⁷⁴ Cambiando organosilano, in particolare utilizzandone uno avente un gruppo funzionale azido terminale sono stati ottenuti dei nanomateriali sensibili al pH, contenenti gruppi triazolici, con applicazioni nel *drug carrier* e nella catalisi. Le proprietà del triazolo hanno migliorato la solubilità e la citotossicità selettiva dei principi attivi, sottolineando ancora una volta l'importanza della modifica covalente effettuata.^{75,76} Inoltre, altri nanomateriali, sono stati ottenuti introducendo un gruppo tiolico sulla superficie esterna degli HNTs. Questi sistemi, ad esempio, sono stati usati per legare la cisteamina su HNTs-SH tramite un legame disolfuro e in seguito, la curcumina tramite formazione della base di Schiff.⁷⁷ Lo stesso gruppo tiolico è stato usato, per legare covalentemente derivati della ciclodestrina, tramite reazione tiolo-ene, consentendo la veicolazione singola o simultanea di molecole attive da un sistema multicavità.⁷⁸

- *Modifica sito-specifica*

La modifica sito-specifica, introdotta da Riela *et al.* nel 2022, è una nuova strategia di funzionalizzazione che ha permesso di rivestire selettivamente determinate porzioni dei nanotubi. In particolare, gli autori hanno descritto una strategia sintetica innovativa per ottenere un *coating* di polidopamina (PDA) confinato unicamente su determinate porzioni della superficie esterna degli HNTs. Per far ciò, gli HNTs sono stati precedentemente modificati con nanoparticelle di ZnO che hanno funto da siti basici per la rapida polimerizzazione della dopamina a pH neutro (**Figura 13a**) Questa polimerizzazione, avvenuta solo in corrispondenza delle nanoparticelle di ZnO offre numerosi vantaggi, tra cui condizioni di reazione blande, senza necessità di soluzioni molto basiche. Il rivestimento di PDA ottenuto (ca. 1 nm) ha portato all'ottenimento di un nanomateriale (HNTs@PDA), capace di assorbire nel vicino infrarosso (NIR) e con una buona conversione fototermica, potenzialmente utile per una terapia fototermica del tumore. Inoltre, la presenza di gruppi catecolici e amminici sui rivestimenti di PDA ha consentito una seconda funzionalizzazione per l'ottenimento di un *nanocarrier*

multifunzionale (**Figura 13b**). Questo lavoro ha rappresentato il primo esempio di modifica sito-specifica dell'halloysite, espandendo significativamente le strategie di modifica disponibili per lo sviluppo di nanomateriali a base di halloysite.

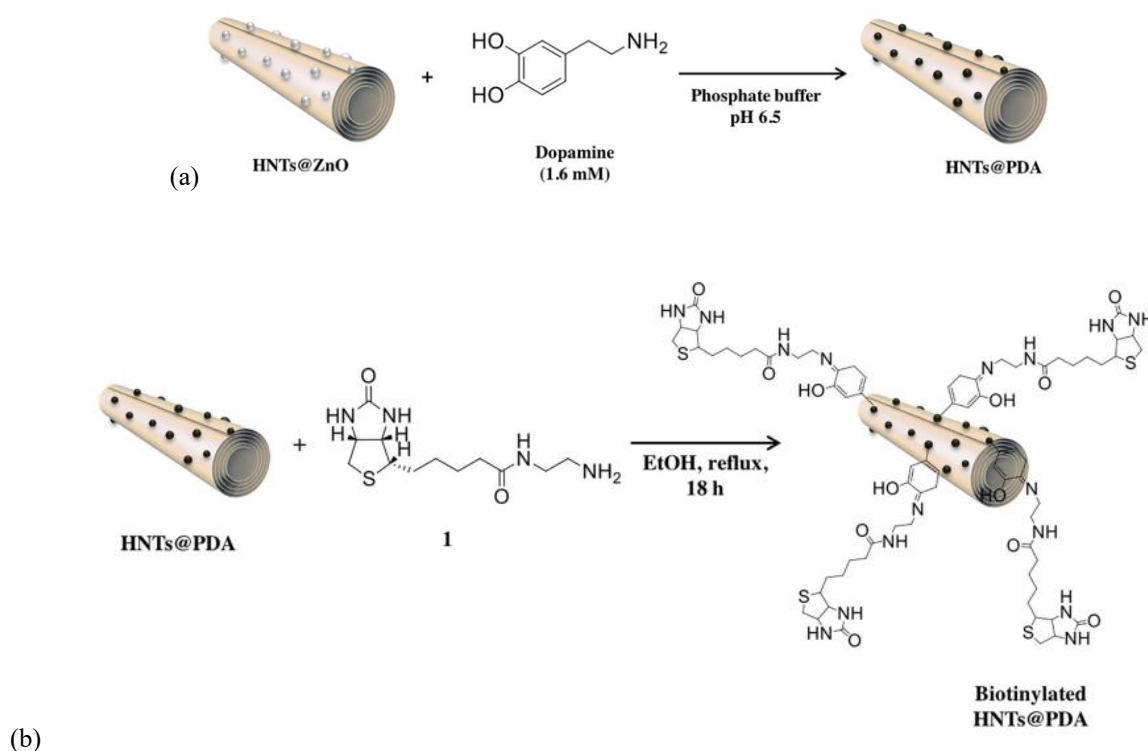


Figura 13. Rappresentazione schematica della sintesi (a) degli HNTs@PDA e (b) del nanomateriale HNTs@PDA biotinilato (Riela *et al.*, 2022).⁴⁸

Le modifiche fino ad ora viste, possono essere applicate ed utilizzate per la modifica di tutte le altre argille, a stechiometria 1:1 ma anche a stechiometria 2:1, come quelle che verranno presentate a breve e diverse dall'halloysite. Questo permette di ottenere nanomateriali multifunzionali, coniugando le proprietà intrinseche di ciascuna argilla, o famiglie di argille, a quelle apportate dalle modifiche descritte.

- *Argille a stechiometria 2:1 – Il gruppo delle smectiti*

Le argille a stechiometria 2:1 si raggruppano a seconda della composizione dello strato ottaedrico interposto tra i due strati tetraedrici. A seconda del tipo e del grado di occupazione dei siti ottaedrici si dividono in minerali diottaedrici, in cui due siti su tre sono occupati (tipicamente da Al^{3+}), e triottaedrici, in cui tutti e tre i siti sono riempiti, solitamente (solitamente da Mg^{2+} o Fe^{2+}). Tra le argille 2:1 più diffuse e utilizzate, vi sono le smectiti, di cui fanno parte la bentonite, la montmorillonite e l'hectorite.²⁴

- *L'hectorite e il suo analogo sintetico: la Laponite®*

L'hectorite è un fillosilicato di magnesio e litio di tipo triottaedrico con formula $\text{Na}_{0.3}\text{Mg}_{2.7}\text{Li}_{0.3}\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ e caratterizzata da una forma a dischetto. La sua struttura è composta da strati di tipo Si-O-Mg(Li)-O-Si separati da cationi idratati come sodio o litio nello spazio interstiziale. Ogni strato, spesso circa 0.96 nm, è costituito da due fogli tetraedrici di silicio (Si-O-Si) che racchiudono un foglio ottaedrico di magnesio e litio (Mg-O-Li). Questa composizione conferisce una carica negativa sulla superficie basale e una carica positiva sul bordo. Quest'argilla, inoltre, possiede ottime capacità di scambio cationico, permettendo un suo rigonfiamento e una disposizione definita "House of cards", tra i vari bordi e superfici. Per via di queste caratteristiche l'hectorite può formare idrogel con buone proprietà reologiche e tissotropiche. Tradizionalmente questa argilla veniva impiegata come adsorbente, catalizzatore o additivo reologico. Solo recentemente ha trovato applicazioni, viste le sue innumerevoli proprietà, in chimica, diagnostica, medicina e ingegneria tissutale.⁷⁹ L'hectorite è uno dei minerali argillosi più facilmente sintetizzabile mediante processi idrotermali, al punto che La Laponite®, una forma sintetica dell'hectorite, è prodotta su scala industriale dalla Laporte Industries e ampiamente utilizzata.

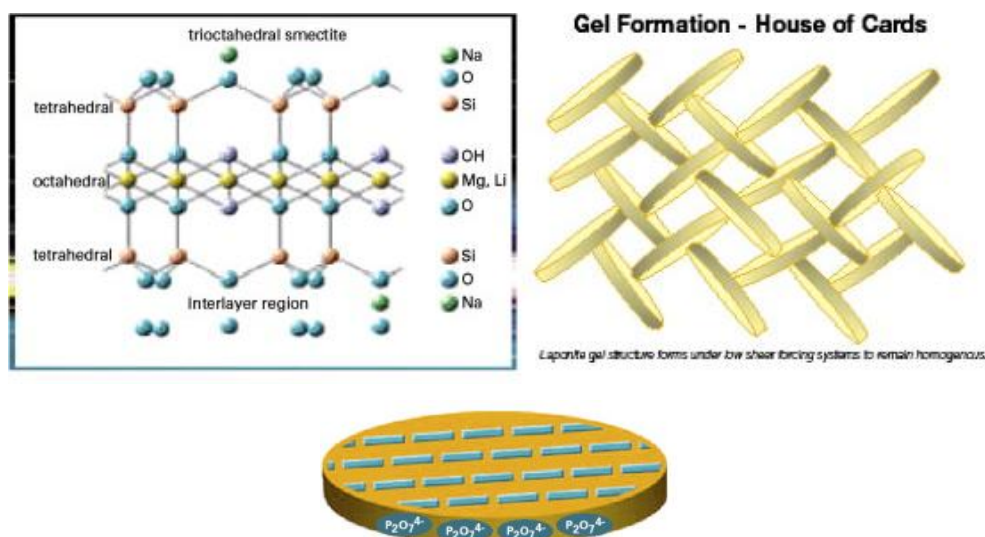


Figura 14. Struttura delle singole particelle di Laponite® e rappresentazione schematica della struttura a *House of Cards* del gel di Laponite® (Cummins, 2007).⁸⁰

I metodi di sintesi permettono di ottenere particelle discoidali con uno spessore di 1 nm e diametri compresi tra i 25 e 30 nm. La Laponite®, analogamente al suo analogo naturale, per via delle cariche presenti, forma idrogel trasparenti in acqua anche a basse concentrazioni, tipicamente più resistenti a quelli formati dall'hectorite, per via dell'assenza di impurezze naturalmente presenti in quest'ultima come ad esempio il ferro. Questa ha trovato innumerevoli

applicazioni in quanto agisce come agente reologico e filmogeno. Esistono diverse varianti di questa argilla sintetica, in base alla purezza che possiedono, e come nel caso della Laponite® XLG adatte a scopi biomedici. Inoltre, la sua degradazione in condizioni acide provoca il rilascio di silice acquosa ($\text{Si}(\text{OH})_4$), ioni sodio, magnesio e litio, riducendone i livelli di tossicità e ampliandone il suo potenziale.⁸¹

- *La sepiolite: un'argilla fibrosa*

Infine, merita una menzione un fillosilicato a struttura modulata, come la sepiolite ($\text{Si}_{12}\text{O}_{30}\text{Mg}_8(\text{OH})_4(\text{OH}_2)_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$). Sebbene classificata come fillosilicato 2:1, questo minerale non presenta una struttura planare continua, ma piuttosto una disposizione a strisce o canali dovuta all'interruzione periodica dei fogli ottaedrici. La sepiolite possiede delle dimensioni dei canali di $10.6 \text{ \AA} \times 3.7 \text{ \AA}$. La composizione e l'aspetto di questa argilla fibrosa può variare notevolmente in base al deposito naturale, ma la lunghezza di queste fibre è generalmente compresa tra 1 e 2 μm , sebbene in alcune situazioni possa essere significativamente maggiore.⁸² La sepiolite è caratterizzata da proprietà superficiali notevoli, come un'elevata area superficiale specifica, una forte capacità di scambio ionico e numerosi siti di adsorbimento superficiale, dovuti all'abbondanza di gruppi silanologici superficiali e alla presenza di canali strutturali naturali. Queste proprietà permettono a questo minerale, simili ad aghi di dimensioni micrometriche, di formare legami a idrogeno e di assemblarsi con matrici polimeriche, rendendole utili per formulazioni farmaceutiche.⁸³

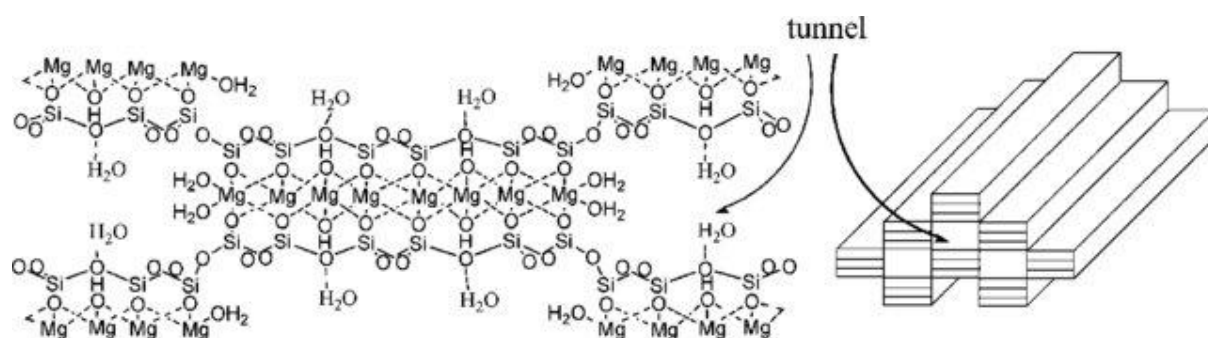


Figura 15. Struttura cristallina e struttura fibrosa della sepiolite (Chen *et al.*, 2007).⁸⁴

- *Caratterizzazione dei nanomateriali*

In questo paragrafo verranno analizzate le tecniche di caratterizzazione comunemente adoperate per la caratterizzazione delle argille minerali. Tali tecniche saranno affrontate nello

specifico per la caratterizzazione dell'halloysite ma considerazioni analoghe possono essere fatte per le altre argille che incontreremo nei vari capitoli di questa tesi.

Il successo dell'avvenuta modifica delle argille viene verificato tipicamente tramite due tecniche che sono la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) e l'analisi termogravimetrica (TGA). Ad esempio, gli spettri FT-IR degli HNTs mostrano bande caratteristiche legate alle vibrazioni di stretching dei gruppi -OH (silanolic e alluminolici - 3622 e 3693 cm^{-1}), alle vibrazioni di bending e stretching delle molecole d'acqua interstiziali (1640 e 3450 cm^{-1}) e, nell'intervallo 1115–400 cm^{-1} , alle vibrazioni di stretching dei legami Si-O, Si-O-Si e Al-O-H.^{85,86} La modifica degli HNTs comporta la comparsa di ulteriori picchi nello spettro che possono quindi essere facilmente identificati (**Figura 16a**).⁸⁷

Tramite TGA è possibile calcolare la percentuale di caricamento di ogni nanomateriale ottenuto, confrontando la perdita di peso percentuale a 800 ° del nanomateriale e degli HNTs non modificati, così come per le altre argille.⁸⁸ Tipicamente, il termogramma dell'halloysite (**Figura 16b**) è caratterizzato da tre perdite in peso dovute alla perdita delle molecole d'acqua di cristallizzazione (≈ 250 °C), alla perdita delle molecole d'acqua fra gli strati (≈ 480 °C) e alla deidrossilazione dell'allumina (≈ 680 °C). In seguito a modifica degli HNTs vi sono delle perdite comprese fra 200 e 400 °C, attribuibili alla degradazione delle porzioni organiche introdotte.⁸⁹ Da questa misura inoltre è possibile studiare la stabilità termica del nanomateriale, oppure dalla derivata (DTG) stimare la posizione delle molecole sulle due diverse superfici interna ed esterna.⁹⁰

Altre informazioni utili riguardanti la struttura cristallina e la composizione mineralogica delle argille minerali, e nel caso specifico dell'halloysite, possono essere ottenute mediante la tecnica di diffrazione a raggi X (*X-Ray Diffraction*, XRD). Come mostrato in **Figura 16c** per gli HNTs si osservano i picchi caratteristici a 11,9° (001 – distintivo dell'impilamento multistrato delle pareti), 20,1° (020, 110), 24,7° (002) e nell'intervallo 35,0–40,0° (003, 130).²⁶ La modifica degli HNTs può determinare variazioni nei pattern XRD, come spostamenti o cambiamenti di intensità dei picchi, indicativi di alterazioni nella struttura cristallina e nell'impilamento degli strati.⁹¹

La morfologia delle argille minerali (**Figura 16d-e**) può essere studiata tramite svariate tecniche, quali la microscopia elettronica a scansione (SEM), la microscopia elettronica a trasmissione classica (TEM) e ad alta risoluzione (HRTEM), che tipicamente vengono abbinate ad un'analisi a raggi X a dispersione di energia (EDX).^{97,85} Queste tecniche sono indispensabili per comprenderne, oltre alla morfologia, la struttura e l'organizzazione del nanomateriale sintetizzato.

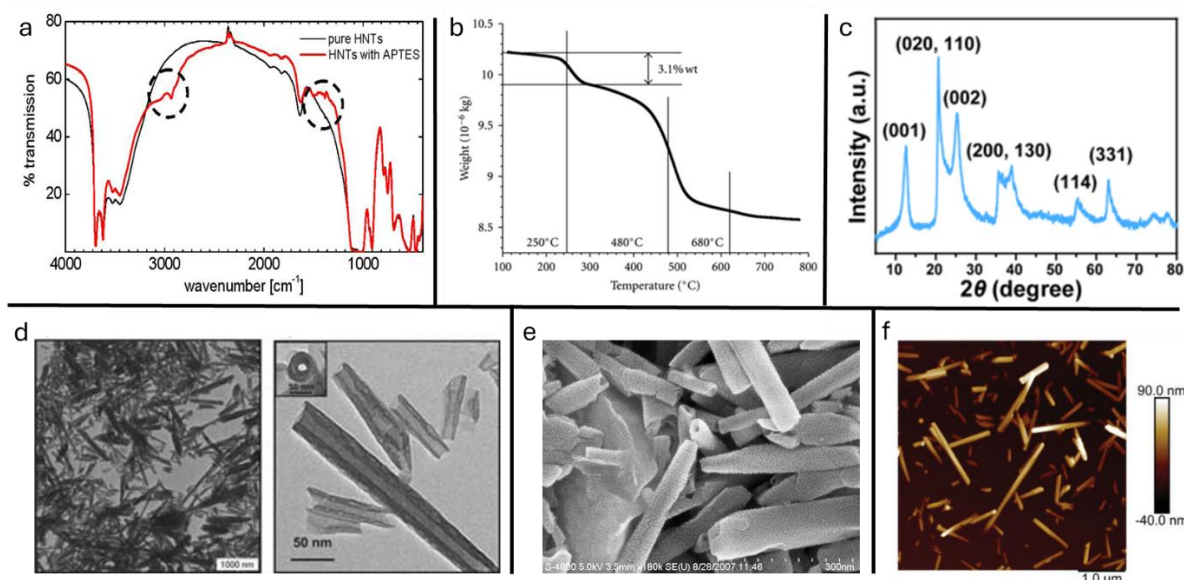


Figura 16. Confronto dello spettro FT-IR (a), del termogramma (b) e dello spettro XRD (c) di HNTs non modificati e modificati (immagini da Li *et al.*, 2013⁹², Ibrahim *et al.*, 2012⁹³, Feng *et al.*, 2022⁸⁶); Morfologia al TEM (d), SEM (e) e AFM (f) dell'halloysite (immagini da Veerabadran *et al.*, 2009⁹⁴, Ghone *et al.*, 2008⁹⁵, Lvov *et al.*, 2016⁹⁶).

Per gli HNTs, ad esempio, l'analisi statistica del diametro esterno ed interno è una misura importante in seguito alla modifica delle superfici interne ed esterne.^{98,99} Inoltre, l'introduzione di farmaci o altre molecole organiche, così come la loro disposizione sui nanotubi di halloysite, può essere verificata dalla mappatura elementare estrapolata dall'analisi EDX.¹⁰⁰ Infine, un'ulteriore analisi morfologica utilizzata è la microscopia a forza atomica (AFM, **Figura 16f**).¹⁰⁰ La caratterizzazione colloidale dei nanomateriali viene condotta mediante Dynamic Light Scattering (DLS) e misure di potenziale- ζ . Il DLS consente di ricavare informazioni sulla mobilità delle particelle in dispersione e di stimarne il coefficiente di diffusione traslazionale medio, che dipende da dimensione, forma, stato di idratazione, viscosità del solvente e fenomeni di aggregazione.⁶⁰ In particolare, applicando l'equazione di Stokes–Einstein è possibile calcolare il diametro idrodinamico equivalente, parametro che rappresenta un indice utile per monitorare variazioni dimensionali e processi di aggregazione tra particelle.¹⁰¹ Complementare a queste informazioni è la misura del potenziale- ζ , che riflette la carica superficiale delle particelle e fornisce indicazioni sulla stabilità colloidale della sospensione.¹⁰² Queste caratterizzazioni, insieme, sono essenziali per ottimizzarne l'impiego delle argille minerali come *carrier*, dove anche piccole variazioni nella struttura o nelle proprietà superficiali possono influenzare significativamente l'efficienza del rilascio e l'interazione con i tessuti biologici.

- I nanocompositi

I nanocompositi polimerici sono ampiamente riconosciuti per la loro capacità di migliorare le proprietà meccaniche, termiche e funzionali dei nanomateriali, mantenendo al contempo le caratteristiche del polimero stesso.¹⁰³ In questo contesto lo sviluppo di nanocompositi contenenti HNTs, e tutte le altre argille minerali viste, sta suscitando un crescente interesse per via del loro potenziale in campo biomedico (**Figura 17**).¹⁰⁴

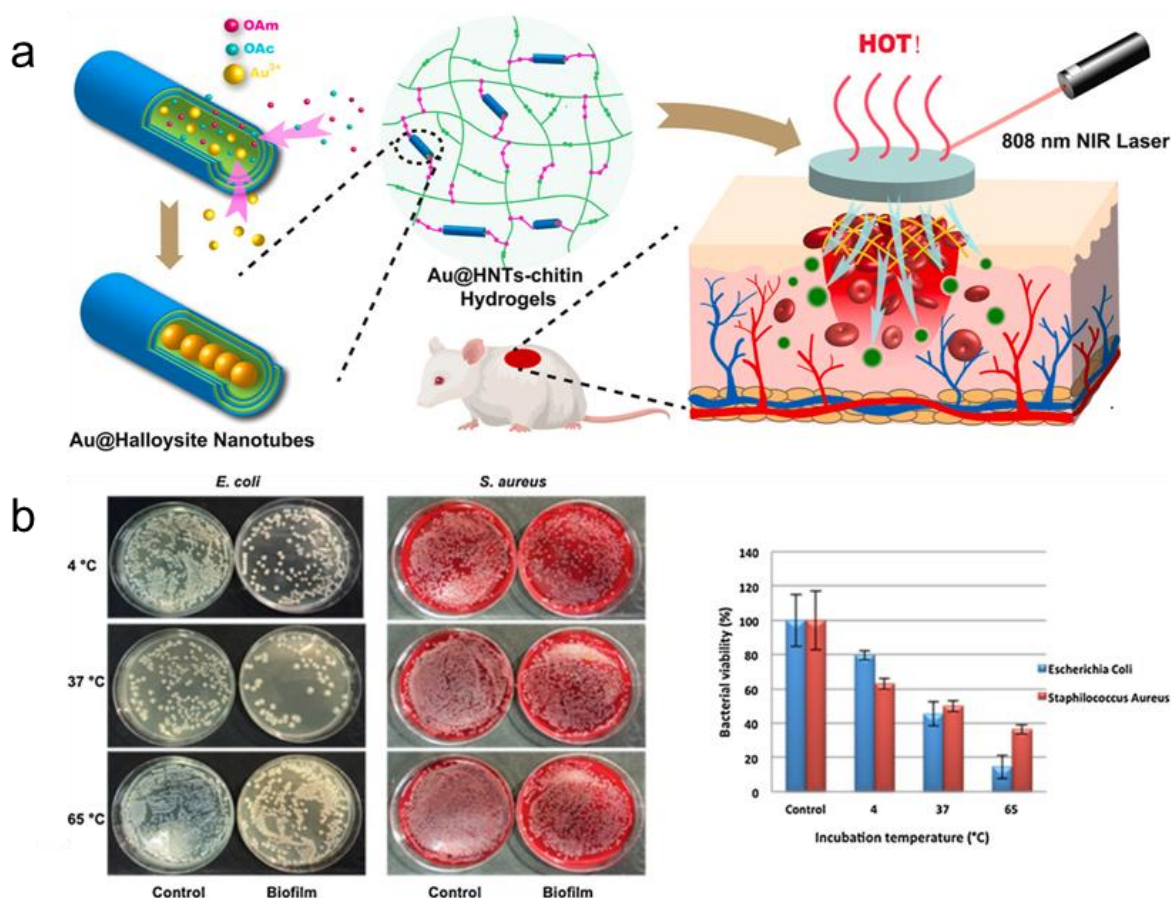


Figura 17. (a) Schema che illustra il processo di preparazione e l'applicazione dell'idrogel Au@HNTs-chitosano (Zhao *et al.*, 2023)¹¹¹ e (b) attività antibatterica e vitalità dei film pectina/HNTs/CB[6]/PO contro *E. coli* e *S. aureus* a diversa temperatura (Biddeci *et al.*, 2016)¹¹².

Uno dei principali ostacoli nella produzione dei nanocompositi, infatti, è ottenere una dispersione omogenea del *nanofiller* all'interno della matrice, a causa della tendenza intrinseca delle nanoparticelle di aggregare fra loro,¹⁰⁵ come nel caso dei nanotubi di carbonio o dell'ossido di grafene.¹⁰⁶ Le argille minerali al contrario per via della loro natura chimica, presentano una distribuzione più uniforme all'interno delle matrici polimeriche. Questo rende le argille nanomateriali ideali alla preparazione di nanocompositi polimerici attraverso diverse metodologie, tra cui la miscelazione in soluzione, l'elettrospinning, la polimerizzazione *in situ*,

la gelificazione, il crosslinking fisico o chimico e la stampa 3D sia di solidi che di semisolidi. La scelta del metodo dipende dalla natura del polimero e dall'applicazione finale prevista, poiché ogni tecnica influenza la dispersione e la disposizione dell'argilla nel nanocomposito.^{107, 103}

Attualmente i nanocompositi a base di argille minerali trovano applicazione in quattro settori, che includono, il rilascio di farmaci, l'ingegneria tissutale, la guarigione delle ferite e il packaging biomedicale (**Figura 17a-b**). Tra questi sicuramente un'attenzione rilevante è stata data all'incapsulamento e rilascio di farmaci, soprattutto di natura idrofobica, che difficilmente riescono ad essere dispersi all'interno di matrici polimeriche naturali e biocompatibili.^{108, 109} In questo caso le possibili modifiche precedentemente viste consentono di distribuire uniformemente il farmaco nel polimero e allo stesso tempo prolungarne il rilascio, in quanto il farmaco dovrà prima essere rilasciato dall'argilla e poi diffondere attraverso il polimero.¹¹⁰ Sfruttando tutte queste proprietà, oltre alla loro biocompatibilità, le argille rappresentano un nanomateriale estremamente versatile per la produzione di nanocompositi biomedicali.¹⁰³

- *Conclusioni*

In conclusione, le modifiche supramolecolari e covalenti delle argille, e in particolare dell'halloysite, nonché il loro utilizzo per l'ottenimento di nanocompositi, rappresentano una strategia efficace per la progettazione di nanomateriali multifunzionali con proprietà uniche e adatte a contesti biomedici. La possibilità di funzionalizzare la loro superficie consente di migliorarne la biocompatibilità e l'interazione con sistemi biologici, oltre a conferire diverse funzioni come il trasporto e il rilascio controllato di farmaci e molecole biologicamente attive, attività antiossidanti, antibatteriche e spettroscopiche utili per l'*imaging* e terapie antitumorali. Queste peculiarità delineano il loro ruolo crescente come piattaforme versatili, sostenibili e biocompatibili per lo sviluppo di nuove soluzioni in nanomedicina.

Nei capitoli successivi saranno analizzate le principali applicazioni delle argille minerali, con particolare attenzione all'halloysite, nel campo della nanomedicina e dei materiali funzionali. Inizialmente verranno presentati i risultati relativi allo sviluppo di sistemi *carrier* per il trasporto di molecole di origine naturale, come estratti idroalcolici e oli vegetali ed essenziali. Si passerà poi alla sintesi di nuovi sistemi di drug *carrier* e/o delivery basati su halloysite e alla valutazione degli idrogel di Laponite® come piattaforma alternativa. A seguire, saranno illustrate le strategie di modifica covalente per l'ottenimento di nanomateriali ibridi fluorescenti con applicazioni nel *sensing* e nella teranostica. Infine, l'attenzione sarà rivolta ai nanocompositi a base di halloysite e polimeri naturali e sintetici, progettati per applicazioni che spaziano dal *food packaging* alla guarigione delle ferite.

Bibliografia:

1. Fan, D., *et al.*, *Signal Transduction and Targeted Therapy* (2023) **8** (1), 293
2. Walter, P., *et al.*, *Nano Letters* (2006) **6** (10), 2215
3. Barber, D. J., and Freestone, I. C., *Archaeometry* (1990) **32** (1), 33
4. Booker, R. D., *Nanotechnology For Dummies*. Wiley: 2011
5. Raj, B., *Current Drug Delivery* (2011) **8** (3), 227
6. Nanotechnology Task Force. FDA Science & Research. Available at: www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/Nanotechnology/NanotechnologyTaskForce/default.htm. (2025)
7. Su, H., *et al.*, *Journal of Applied Toxicology* (2018) **38** (1), 3
8. Park, W., *et al.*, *Progress in Materials Science* (2020) **114**, 100686
9. Su, S., and Kang, P. M., In *Nanomaterials*, (2020), Vol. 10
10. Taylor-Pashow, K. M., *et al.*, *Chemical Communications* (2010) **46** (32), 5832
11. Wu, Q., *et al.*, *Advanced Science* (2023) **10** (25), 2300672
12. Feng, Y., *et al.*, *ACS Nano* (2024) **18** (31), 20001
13. Gomes, C. d. S. F., and Silva, J. B. P., *Applied Clay Science* (2007) **36** (1), 4
14. Moraes, J. D. D., *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics* (2017) **534** (1), 213
15. Carretero, M. I., *Applied Clay Science* (2002) **21** (3), 155
16. Ferris, J. P., *Elements* (2005) **1** (3), 145
17. Bianchi, E., *et al.*, *Pharmaceutics*, (2022), Vol. 14
18. Bergaya, F., *et al.*, *Rubber-Clay Nanocomposites*, (2011), pp 1
19. Mohammed, B., and El-Kaber, H., *International Journal of Recent Technology and Applied Science (IJORTAS)* (2022) **4** (2)
20. Tournassat, C., *et al.*, *Developments in Clay Science*, Tournassat, C., *et al.*, (eds.) Elsevier(2015), Vol. 6, pp 5
21. Bergaya, F., and Lagaly, G., *Developments in Clay Science*, Bergaya, F., *et al.*, (eds.) Elsevier(2006), Vol. 1, pp 1
22. García-Villén, F., *et al.*, *Pharmaceutics*, (2021), Vol. 13
23. Wang, P., *et al.*, *Crystals*, (2024), Vol. 14
24. Haldar, S. K., *Introduction to Mineralogy and Petrology (Second Edition)*, Haldar, S. K., (ed.) Elsevier, Oxford, (2020), pp 109
25. Spears, D. A., *Clay Minerals* (1993) **28** (1), 161
26. Joussein, E., *et al.*, *Clay Minerals* (2005) **40** (4), 383
27. Omalius d'Halloy, J.-B.-J. d., and Gérard, D., *Mémoires pour servir à la description géologique des Pays-Bas, de la France et de quelques contrées voisines*, par J. J. d'Omalius d'Halloy. Namur, Imprimerie de D. Gerard, Marché de l'Ange, n°891. 1828: Namur, 1828
28. Tari, G., *et al.*, *Journal of Colloid and Interface Science* (1999) **210** (2), 360
29. MacEwan, D. M. C., *Mineralogical Magazine and Journal of the Mineralogical Society* (1947) **28** (196), 36
30. Guggenheim, S., *et al.*, *Clay Minerals* (2006) **41** (4), 863
31. Du, M., *et al.*, *Polymer International* (2010) **59** (5), 574
32. R. Price, B. G., Y. Lvov, R., *Journal of microencapsulation* (2001) **18** (6), 713
33. Joussein, E., *et al.*, *Clay minerals* (2005) **40** (4), 383
34. Yuan, P., *et al.*, *The Journal of Physical Chemistry C* (2008) **112** (40), 15742
35. Abdullayev, E., and Lvov, Y., *Journal of Materials Chemistry B* (2013) **1** (23), 2894
36. Long, Z., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* (2018) **6** (44), 7204
37. Massaro, M., *et al.*, *Antibiotics*, (2022), Vol. 11
38. Glotov, A., *et al.*, *Chemical Society Reviews* (2021) **50** (16), 9240
39. Abdullayev, E., *et al.*, *ACS Nano* (2012) **6** (8), 7216
40. Vergaro, V., *et al.*, *Biomacromolecules* (2010) **11** (3), 820
41. Biddeci, G., *et al.*, *Int J Nanomedicine* (2021) **16**, 4755
42. Rozhina, E., *et al.*, *Applied Clay Science* (2021) **205**, 106041
43. Fakhru'llina, G. I., *et al.*, *Environmental Science: Nano* (2015) **2** (1), 54
44. Stavitskaya, A., *et al.*, *Materials*, (2021), Vol. 14
45. Wang, X., *et al.*, *Environmental Toxicology* (2018) **33** (6), 623
46. Massaro, M., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* (2017) **5** (16), 2867
47. Massaro, M., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* (2018) **6** (21), 3415
48. Alfieri, M. L., *et al.*, *Journal of Colloid and Interface Science* (2022) **606**, 1779
49. Kamel, R., *et al.*, *AAPS PharmSciTech* (2025) **26** (5), 167
50. Massaro, M., *et al.*, *Journal of Colloid and Interface Science* (2018) **524**, 156
51. Lun, H., *et al.*, *RSC Advances* (2014) **4** (83), 44197
52. Cavallaro, G., *et al.*, *The Journal of Physical Chemistry C* (2012) **116** (41), 21932
53. Cavallaro, G., *et al.*, *Langmuir* (2011) **27** (3), 1158
54. Fizir, M., *et al.*, *Journal of Colloid and Interface Science* (2017) **505**, 476
55. Aguzzi, C., *et al.*, *Applied Clay Science* (2007) **36** (1), 22

56. Massaro, M., *et al.*, *RSC Advances* (2016) **6** (91), 87935
57. Massaro, M., *et al.*, *Pharmaceutics*, (2024), Vol. 16
58. Geng, W.-C., *et al.*, *Chemical Science* (2024) **15** (21), 7811
59. Stavitskaya, A., *et al.*, *Nanomaterials*, (2019), Vol. 9
60. Falanga, A. P., *et al.*, *Journal of Colloid and Interface Science* (2024) **663**, 9
61. Tipa, C., *et al.*, *Nanomaterials*, (2022), Vol. 12
62. Cardano, F., *et al.*, *ACS Applied Nano Materials* (2025) **8** (24), 12775
63. Massaro, M., *et al.*, *Molecules*, (2020), Vol. 25
64. Allred, A. L., and Rochow, E. G., *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* (1958) **5** (4), 269
65. Weinhold, F., and West, R., *Organometallics* (2011) **30** (21), 5815
66. Lickiss, P. D., *Advances in Inorganic Chemistry*, Sykes, A. G., (ed.) Academic Press(1995), Vol. 42, pp 147
67. Władyczyn, A., and John, L., *Inorganic Chemistry* (2024) **63** (20), 9145
68. Ciriminna, R., *et al.*, *Chemical Reviews* (2013) **113** (8), 6592
69. Senyel, M., and Dike, A. S., *Polymer Bulletin* (2024) **81** (11), 9851
70. Massaro, M., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* (2025) **13** (31), 9407
71. Tan, D., *et al.*, *Microporous and Mesoporous Materials* (2013) **179**, 89
72. Cavallaro, G., *et al.*, *The Journal of Physical Chemistry C* (2015) **119** (16), 8944
73. Massaro, M., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry C* (2018) **6** (27), 7377
74. Massaro, M., *et al.*, *Journal of Colloid and Interface Science* (2019) **552**, 236
75. Massaro, M., *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics* (2015) **478** (2), 476
76. Riela, S., *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics* (2014) **475** (1), 613
77. Massaro, M., *et al.*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2016) **140**, 505
78. Massaro, M., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* (2015) **3** (19), 4074
79. Zhang, J., *et al.*, *Applied Clay Science* (2019) **177**, 114
80. Cummins, H. Z., *Journal of Non-Crystalline Solids* (2007) **353** (41), 3891
81. Nomicisio, C., *et al.*, *Pharmaceutics*, (2023), Vol. 15
82. Cao, L., *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics* (2022) **625**, 122097
83. Kim, M. H., *et al.*, *Clays and Clay Minerals* (2016) **64** (2), 115
84. Chen, H., *et al.*, *Materials Science and Engineering: A* (2007) **445-446**, 725
85. Gualtieri, A. F., *et al.*, *Applied Clay Science* (2025) **276**, 107917
86. Feng, Y., *et al.*, *Advanced Healthcare Materials* (2023) **12** (1), 2202265
87. Massaro, M., *et al.*, *International Journal of Molecular Sciences*, (2024), Vol. 25
88. Yuan, P., *et al.*, *The Journal of Physical Chemistry C* (2008) **112** (40), 15742
89. Lisuzzo, L., *et al.*, *Journal of Colloid and Interface Science* (2022) **608**, 424
90. Duce, C., *et al.*, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* (2015) **121** (3), 1011
91. Bao, Z., *et al.*, *Polymers*, (2024), Vol. 16
92. Li, X., *et al.*, *Polyurethane Coatings Reinforced by Halloysite Nanotubes*. In *Coatings*, (2013), Vol. 3, pp 16
93. Ibrahim, E. E., *et al.*, *Journal of Nanomaterials* (2012) **2012** (1), 793084
94. Veerabadrán, N. G., *et al.*, *Macromolecular Rapid Communications* (2009) **30** (2), 99
95. Ghone, N., *et al.*, *Tubule Clay Nanoreactor for Template Synthesis of Silver Nanoparticles*. 2008
96. Lvov, Y., *et al.*, *Advanced Materials* (2016) **28** (6), 1227
97. Kogure, T., Chapter 5 - *Developments in Clay Science*, Yuan, P., *et al.*, (eds.) Elsevier(2016), Vol. 7, pp 92
98. Liu, H., *et al.*, *Journal of Materials Science* (2019) **54** (1), 693
99. Fizir, M., *et al.*, *Microchimica Acta* (2018) **185** (8), 389
100. Gray-Wannell, N., *et al.*, *Clay Minerals* (2023) **58** (4), 395
101. Lisuzzo, L., *et al.*, *Ceramics International* (2019) **45** (2, Part B), 2858
102. Prinz Setter, O., and Segal, E., *Nanoscale* (2020) **12** (46), 23444
103. Wong, L. W., and Tan, J. B. L., *Journal of Manufacturing Processes* (2024) **118**, 76
104. Danyliuk, N., *et al.*, *Journal of Molecular Liquids* (2020) **309**, 113077
105. Fu, S., *et al.*, *Nano Materials Science* (2019) **1** (1), 2
106. Zubkiewicz, A., *et al.*, *Materials*, (2020), Vol. 13
107. Zhang, Y., *et al.*, *Applied Clay Science* (2016) **119**, 8
108. Haroosh, H. J., *et al.*, *Materials*, (2021), Vol. 14
109. Abdulmalik, S., *et al.*, *Bioactive Materials* (2023) **25**, 42
110. Cinà, G., *et al.*, *International Journal of Biological Macromolecules* (2024) **277**, 134375
111. Zhao, P., *et al.*, *Bioactive Materials* (2023) **20**, 355
112. Biddeci, G., *et al.*, *Carbohydrate Polymers* (2016) **152**, 548

Capitolo 1

*Sistemi nanostrutturati come carrier per molecole di
origine naturale*

Capitolo 1

Sistemi nanostrutturati come carrier per molecole di origine naturale

1.1. Proprietà e limiti delle molecole di origine naturale

Dallo scorso secolo i sistemi nanostrutturati hanno suscitato notevole interesse in campo medico data possibilità di sviluppare *carrier* capaci di incapsulare efficacemente farmaci, estratti, oli essenziali e altre molecole biologicamente attive, al fine di proteggere, preservare a garantire un lento rilascio di queste. L'impiego di sistemi *carrier* rappresenta oggi una strategia chiave per migliorare la veicolazione e la stabilità di moltissimi composti di origine naturale, sempre più considerati come alternativa ai farmaci di sintesi,¹ e ampiamente richiesti in campo biomedico poiché generalmente non tossici e privi di effetti collaterali significativi.² I progressi nella ricerca sulle piante naturali e il rapido sviluppo dei sistemi *carrier* offrono nuove soluzioni a problematiche che riguardano l'utilizzo di questi nuove molecole bioattive. Un sistema di questo tipo potrebbe infatti prevenire efficacemente la degradazione di queste molecole, migliorandone così stabilità e biodisponibilità.

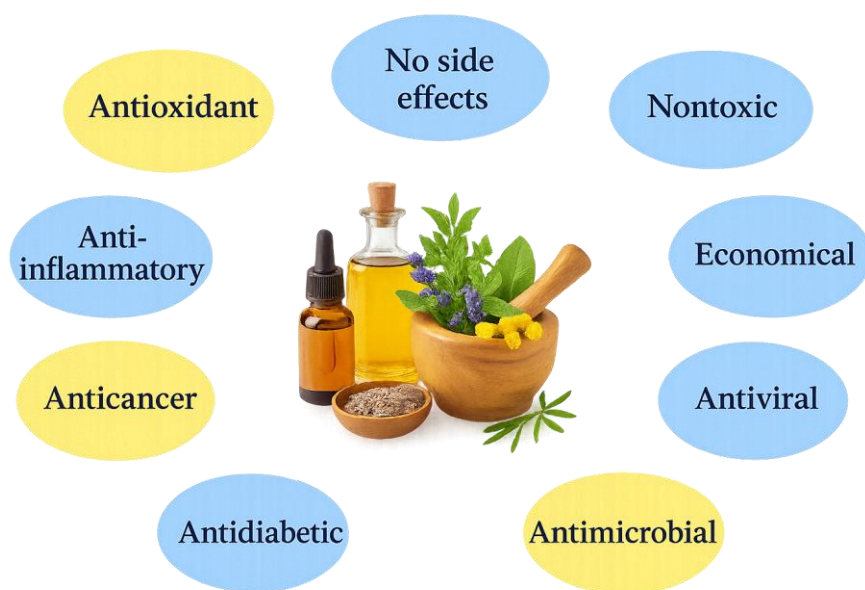


Figura 1. Rappresentazione schematica delle principali proprietà delle molecole di origine naturale.

Le piante medicinali possono essere ottenute da diverse parti della pianta — radici, steli, corteccia, foglie, fiori, frutti o semi — e forniscono estratti ricchi di metaboliti secondari quali alcaloidi, flavonoidi, terpeni, saponine, steroidi e glicosidi.³ Tra gli esempi più noti si

annoverano *Trachyspermum ammi* (ajwain),⁴ *Cuminum cyminum* L. (cumino),⁵ *Coriandrum sativum* L. (coriandolo),⁶ *Cinnamomum zeylanicum* (cannella)⁷ e molti altri. Ciascuno di questi estratti possiede proprietà peculiari che possono essere sfruttate nella prevenzione o nella cura di specifiche patologie, conferendo loro attività di grande interesse come quella antitumorale, antimicrobica, antiossidante e antibatterica (**Figura 1**).⁸ Nonostante l'elevato potenziale terapeutico, gli estratti naturali sono frequentemente soggetti a processi di degradazione chimica (ossigeno e pH), fisico-chimica (calore, luce e umidità) e biologica (azione enzimatica), che ne compromettono la stabilità, la biodisponibilità e, di conseguenza, l'efficacia applicativa.^{9,10} Oltre agli estratti di origine naturale, e alle singole molecole che compongono questi, negli ultimi anni è cresciuto l'interesse verso l'utilizzo e l'impiego di numerosi oli vegetali ed essenziali (EOs).¹¹ In particolare, questi ultimi sono composti da una miscela oleosa con una composizione chimica molto complessa e che comprende principalmente componenti volatili come idrocarburi (inclusi monoterpeni, sesquiterpeni, diterpeni e fenilpropanoidi), e ancora, derivati contenenti ossigeno (inclusi alcoli, esteri, aldeidi, chetoni, fenoli ed eteri).^{12,13} Gli oli essenziali, analogamente agli estratti, mostrano molteplici proprietà farmacologiche, tra cui attività antibatterica,¹⁴ antiinfiammatoria,¹⁵ antitumorale¹⁶ e antiossidante,¹⁷ e oggi sono largamente utilizzati in medicina, cosmetica, alimentazione e agricoltura.¹⁸ Tuttavia, gli oli essenziali presentano alcune limitazioni che ne ostacolano il loro sviluppo e applicazione, tra cui la marcata idrofobicità, volatilità, instabilità chimica e odore intenso.¹⁹

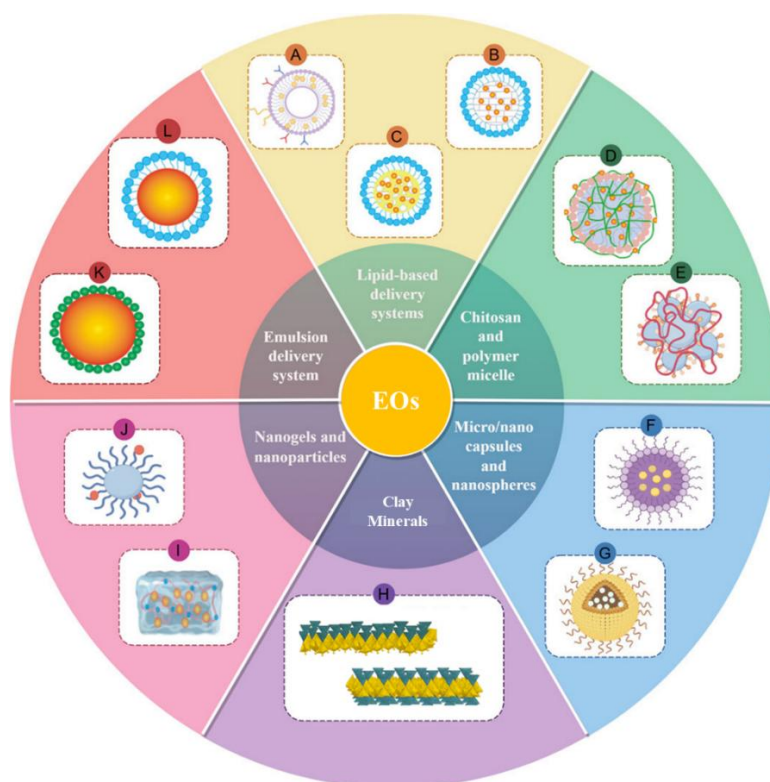


Figura 2. Suddivisione dei diversi sistemi *carrier* per oli essenziali (EOs) (Immagine da Wang et al., 2025)¹¹

Queste caratteristiche rappresentano sfide significative per quanto riguarda la loro somministrazione e utilizzo. Ad oggi, numerosi sono i *carrier* presi in considerazione per la veicolazione sia degli estratti naturali che degli oli essenziali (**Figura 2**); tra questi le argille minerali, grazie alle loro peculiari proprietà di stabilizzazione, protezione e rilascio controllato delle molecole bioattive.¹¹

1.2. Le argille minerali

Tra la vasta gamma di materiali utilizzati, le argille minerali rappresentano una classe particolarmente interessante di *carrier* poiché ampiamente disponibili, a basso costo, non tossici e caratterizzati, come precedentemente descritto, da proprietà uniche. Negli Stati Uniti, le argille minerali sono comunemente utilizzate come eccipienti in prodotti farmaceutici commercializzati e sono elencati nella *Inactive Ingredient Database*.²⁰ Le diverse molecole biologicamente attive di origine naturale possono essere incapsulate nelle argille per modulare la velocità, la durata e il sito di rilascio.²¹ Numerosi materiali polimerici sono stati ampiamente studiati con lo stesso obiettivo, ma spesso le loro proprietà devono essere migliorate attraverso l'aggiunta di *filler* inorganici, tra cui, ancora una volta, le argille minerali.²² Ad esempio in uno studio è stato analizzato il caricamento di un olio essenziale di rosmarino sia in polimeri di pectina sia in nanotubi di halloysite, e i risultati ottenuti hanno evidenziato un rilascio più lento dall'argilla piuttosto che dal polimero.²³ Altri studi hanno riportato come l'adsorbimento di oli essenziali su argille generi nanomateriali ad attività antibatterica,²⁴ come nel caso di una montmorillonite caricata con oli essenziali di timolo o carvacolo.^{25,26} La maggior parte della ricerca medica sulle argille si è concentrata sulla kaolinite, l'halloysite, la montmorillonite e la sepiolite.²⁷ Tuttavia, tra tutte queste, gli HNTs si distinguono e si confermano, grazie alle loro peculiari proprietà già descritte, come sistemi *carrier* emergenti di grande interesse.²⁸

1.2.1. L'halloysite come sistema carrier

Il crescente interesse della comunità scientifica verso l'impiego dei nanotubi di halloysite come *carrier* risulta chiaro se si confrontano le pubblicazioni riguardanti l'halloysite come sistemi *carrier* per farmaci degli ultimi due decenni (**Figura 3a**). Uno dei principali vantaggi legato all'uso di questa argilla è dovuto alla presenza di un lume vuoto. Questo fa sì che gli HNTs

siano eccellenti *nanocontainers* per l'incapsulamento di innumerevoli specie chimiche come macromolecole, inclusi farmaci, DNA, proteine e altre sostanze biologicamente attive.^{28,29} Oltre a molecole di natura organica il lume dell'halloysite si presta per il caricamento di nanoparticelle metalliche di Au, Cu o Ce.³⁰ Generalmente gli HNTs non trattati raggiungono una capacità di caricamento tra il 2 e il 10% in peso,³¹ e una volta caricate le sostanze possono essere rilasciate in mezzi acquosi in intervalli di tempo che raggiungono anche le 72 ore.²⁹

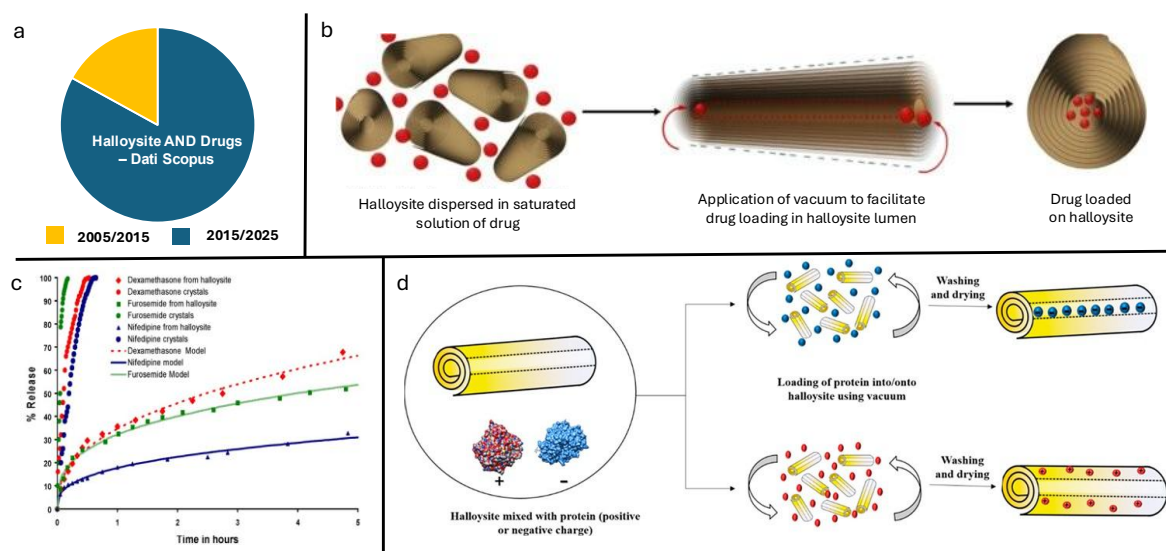


Figura 3. (a) Diagramma a torta riguardo le pubblicazioni di HNTs come *carrier* negli ultimi due decenni sulla base dei dati Scopus aggiornati al 2025; (b) schematizzazione della procedura di caricamento delle molecole in HNTs (immagine da Yendluri *et al.*, 2017);³² (c) confronto tra la dissoluzione di furosemide, nifedipina e desametasone e loro rilascio dagli HNTs (immagine da Veerabadran *et al.*, 2007);³³ (d) schematizzazione dell'interazione di diverse proteine con le diverse superfici dell'halloysite (immagine da Tully *et al.*, 2016).³⁴

Farmaci in polvere come furosemide, nifedipina e desametasone possono dissolversi in acqua in 10-15 minuti, ma il caricamento in halloysite ne ha esteso il rilascio fino a 10-15 ore (**Figura 3c**). Pertanto, l'incapsulamento in halloysite ha aumentato i tempi di rilascio di oltre 50 volte.³³ Un altro studio condotto ha dimostrato che, quando i farmaci vengono rilasciati dagli HNTs, la durata del rilascio può essere prolungata fino a 100 volte rispetto al farmaco utilizzato da solo o con altri *carrier*.³⁵ Oltre alle interazioni utili per il confinamento di diverse molecole nel lume degli HNTs, è possibile sfruttare le interazioni elettrostatiche che possono instaurarsi tra le superfici delle argille e le molecole da caricare, riuscendo a indirizzare il loro sito di assorbimento. In questo contesto, ad esempio, Lvov *et al.*, hanno riportato l'immobilizzazione di laccasi, glucosio ossidasi, lipasi e pepsina sulla superficie interna o esterna dei nanotubi, dimostrando come l'interazione tra le molecole, grazie alla loro natura, e gli HNTs sia un fattore chiave per l'ottenimento di nanomateriali con specifiche applicazioni (**Figura 3d**).³⁴

Inoltre, oltre all'immobilizzazione di farmaci e molecole biologicamente attive nel lume, possono essere utilizzati alcuni sali organici o tensioattivi anionici per rendere la cavità notevolmente più idrofobica.³⁶ Ad esempio, il caricamento del sale sodico di dioctilsolfosuccinato ha permesso di usare gli HNTs come *carrier* per la stabilizzazione di emulsioni olio in acqua.³⁷ Al contrario emulsioni inverse (acqua in olio) sono state preparate utilizzando tensioattivi cationici adsorbiti selettivamente sulla superficie esterna degli HNTs.³⁸

Grazie alle possibilità appena descritte e alla loro biocompatibilità, gli HNTs hanno dato origine a una nuova categoria di *nanocarrier*, utilizzabili per il rilascio mirato e controllato di innumerevoli specie chimiche.³⁹

1.2.2. Caricamento, modelli di adsorbimento e cinetiche di rilascio

Per effettuare il caricamento, tipicamente, l'halloysite viene mescolata con una soluzione satura del composto selezionato. I solventi utilizzati devono avere bassa viscosità, fornire elevata solubilità per l'agente da caricare e bagnare bene le pareti dell'halloysite (solitamente acqua, acetone, metanolo).^{40,30} Un altro metodo prevede la dispersione dell'halloysite in uno dei solventi prima citati in cui la molecola da caricare non è solubile, e a questa dispersione in rapporto 5:1 o 10:1, viene aggiunta una soluzione sovrassatura della molecola di interesse, preparata in un solvente miscibile con il primo e in cui la molecola è solubile.^{41,42} Successivamente la dispersione viene sottoposta a dei cicli di vuoto, di circa 3-5 minuti, che devono essere ripetuti 1-3 volte al fine di ottimizzare il caricamento. Durante questa fase si assiste a un leggero sfrigolio che indica la fuoriuscita dell'aria dai tubi. Quando il vuoto viene rotto, la soluzione penetra nel lume e il composto all'interno del tubo.^{43,44}

Dopo il caricamento i nanotubi vengono brevemente lavati, filtrando o centrifugando, per rimuovere l'eccesso di molecola e posti a seccare a temperature dipendenti dalla natura della molecola caricata (**Figura 3b**). L'efficienza di incapsulamento (EE %) e la capacità di caricamento (CC %) della molecola di interesse nel nanomateriale ottenuto, vengono determinati secondo le seguenti equazioni, in seguito ad analisi UV-vis e/o analisi termogravimetrica:

$$EE \% = \frac{\text{Massa del farmaco caricato nell'argilla}}{\text{Massa totale di farmaco aggiunto}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$CC \% = \frac{\text{Massa del farmaco caricato nell'argilla}}{\text{Massa del nanomateriale sintetizzato}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

A tal proposito, la capacità di adsorbimento delle molecole sugli HNTs rappresenta uno studio preliminare importantissimo per valutare il potenziale applicativo del nanomateriale e al contempo per descrivere e comprendere le interazioni tra l'halloysite e le molecole di interesse. Spesso queste possiedono differenti proprietà chimico-fisiche che possono influenzare notevolmente il loro adsorbimento sui nanomateriali utilizzati.⁴⁵ Sono stati sviluppati numerosi modelli matematici utili per studiare questo fenomeno; tra questi, nel caso specifico dell'adsorbimento sui nanotubi di halloysite, i più comunemente utilizzati sono quelli di Langmuir, Freundlich e Hill (**Tabella 1**).⁴⁶

Tabella 1. Modelli di isoterme di adsorbimento.

Modello di adsorbimento	Equazione
Langmuir	$Q_e = \frac{K_L Q_m C_e}{1 + K_L C_e}$
Freundlich	$Q_e = K_F C_e^{1/n}$
Hill	$Q_e = \frac{Q_m (K_H C_e)^n}{1 + (K_H C_e)^n}$

Il modello di Langmuir assume un adsorbimento monostrato su un materiale strutturalmente omogeneo e uniforme, i cui siti di adsorbimento sono energeticamente equivalenti. Una volta che un sito è occupato, non può avvenire un ulteriore adsorbimento in quel sito, e quando tutti questi risultano saturi si raggiunge l'adsorbimento massimo.^{47,48} Al contrario, il modello di Freundlich è utilizzato per descrivere sia l'adsorbimento su superfici energeticamente eterogenee, che l'adsorbimento multistrato. Con questo modello è quindi possibile studiare l'adsorbimento su due diverse superfici del nanomateriale.⁴⁸ Infine, la capacità di adsorbimento di diverse molecole, ma su un substrato omogeneo, può essere descritta dal modello isotermico di Hill.⁴⁹ Questo modello presuppone che l'adsorbimento sia un fenomeno cooperativo in cui l'interazione tra il ligando e un sito del substrato può influenzare diversi siti dello stesso

substrato.²⁸ Una volta caricate, le molecole saranno poi rilasciate, e generalmente i profili di rilascio di queste dai nanomateriali possono essere descritti attraverso diversi modelli cinetici, come riassunto in **Tabella 2**.

In questi modelli, “ F_t ” indica la frazione di molecola rilasciata al tempo t , “ k ” è la costante cinetica di rilascio caratteristica di ciascuna equazione e “ t ” rappresenta il tempo del rilascio.²⁸ La cinetica di rilascio di ordine zero si riferisce a un processo in cui la molecola viene rilasciata da un substrato a velocità costante,⁵⁰ al contrario, la cinetica di primo ordine è dipendente dalla concentrazione.^{51,52} Pertanto, con il passare del tempo e la diminuzione della concentrazione della molecola nel nanomateriale, anche la velocità di rilascio diminuisce. Il modello di Higuchi è un modello con il quale si descrive una cinetica di rilascio regolata da una diffusione di tipo fickiana, quale potrebbe essere un rilascio dal lume degli HNTs. In questo caso la quantità di molecola rilasciata cresce con la radice quadrata del tempo.⁵³

Tabella 2. Equazioni e modelli cinetici.

Modelli cinetici	Equazione
Cinetica di ordine zero	$F_t = kt$
Cinetica di primo ordine	$F_t = M_{\infty}(1 - e^{-kt})$
Modello quadratico di Higuchi	$F_t = kt^{1/2}$
Modello Korsmeyer–Peppas	$F_t = kt^n$
DEM	$F_t = F_e'(1 - e^{-k't}) + F_e''(1 - e^{-k''t})$

I processi di rilascio però possono essere leggermente più complessi e coinvolgere meccanismi multipli. In questo caso il modello Korsmeyer-Peppas, anche indicato come Power Fit, è particolarmente utile per studiare il comportamento del rilascio.⁵⁴ Il termine n è l'esponente caratteristico di diffusione, che dipende dal meccanismo di rilascio e dalla geometria del nanomateriale. In condizioni di diffusione fickiana, n assume valori < di 0.5. Se invece prevale una diffusione di tipo non fickiana (anomala), n assume valori compresi tra quello tipico della diffusione e quello corrispondente al rilassamento delle catene polimeriche ($n < 1$).⁵⁵ Infine, il modello DEM (*Double Exponential Model*), viene utilizzato per descrivere un meccanismo di

rilascio costituito da due fenomeni paralleli, caratterizzati da due diverse costanti cinetiche, che coinvolgono specie adsorbite su diverse superfici del nanomateriale.^{56,57} In conclusione, la scelta del modello cinetico più appropriato dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche del nanomateriale e dal tipo di interazione con la molecola rilasciata, rendendo spesso necessario un approccio comparativo per descrivere in maniera completa i complessi meccanismi di rilascio dai nanosistemi a base di argille.

1.2.3. Le argille come carrier di molecole di origine naturale ed estratti

Gli estratti idroalcolici o alcolici di origine vegetale rappresentano una delle strategie più diffuse per valorizzare i composti bioattivi naturali, in particolare polifenoli e flavonoidi, noti per le loro proprietà antiossidanti e antitumorali.^{58,59} Tuttavia, la loro applicazione è spesso limitata da problemi di biodisponibilità e mancanza di studi clinici approfonditi. In questo contesto, recenti ricerche hanno evidenziato il potenziale nutraceutico dell'estratto di vinaccia d'uva (*Grape Pomace Extract*, GPE),^{60,61} derivato dal sottoprodotto della vinificazione.⁶² In particolare, uno studio su un estratto ottenuto da *Vitis vinifera* cv. *Verdicchio*, ha dimostrato una selettiva citotossicità verso cellule di carcinoma gastrico, attribuibile alla capacità del GPE di modulare diversi *pathway* di segnalazione coinvolti nella progressione tumorale.⁶³ Accanto agli estratti naturali come la vinaccia, anche singole molecole bioattive di origine vegetale trovano ampio impiego in ambito biomedico e cosmetico.⁶⁴ Tra queste, l'acido L-ascorbico (LAA), comunemente noto come vitamina C, è largamente utilizzato nelle formulazioni dermocosmetiche per le sue proprietà antiossidanti, *anti-aging*, cicatrizzanti, foto protettive e depigmentanti.^{65,66} Tuttavia, l'estratto di vinaccia, trattandosi di un estratto metanolico, difficilmente può essere somministrato direttamente per via della sua scarsa solubilità in acqua, rendendo indispensabile l'utilizzo di un *carrier* per il suo trasporto e rilascio. Allo stesso modo, nonostante l'importanza del LAA nelle applicazioni biomediche, il suo impiego in diverse formulazioni è stato spesso limitato a causa di diverse problematiche, quali pH elevato, presenza di ossigeno e di ioni metallici.⁶⁷ Questi limiti potrebbero essere superati ricorrendo all'utilizzo, ancora una volta, di sistemi nanostrutturati naturali come le argille minerali. Alla luce di queste evidenze, si è resa necessaria la sintesi di nuovi sistemi *carrier* capaci di trasportare gli estratti di origine naturale appena presentati, sfruttando le interazioni supramolecolari tra due diverse argille, l'halloysite e la bentonite, e gli estratti di interesse. In particolare, è stata affrontata la sintesi di un nanomateriale a base di halloysite non modificata per il caricamento e rilascio di GPE ad attività antitumorale e il caricamento di LAA in un

sistema strutturalmente e chimicamente diverso dal precedente, precisamente una bentonite purificata. Dopo la caratterizzazione chimico-fisica dei nanomateriali, è stata valutata l'attività antiossidante di questi.

- *Sintesi e caratterizzazione dei nanomateriali*

Il caricamento dell'estratto di vinaccia sugli HNTs è stato pensato sulla base delle proprietà chimico-fisiche che gli HNTs possiedono e i diversi componenti della vinaccia (**Figura 4a**).⁶³ In particolare l'interazione HNTs/estratto può avvenire tramite attrazioni elettrostatiche, effetti idrofobici e legami a idrogeno che si instaurano tra i gruppi Al-OH presenti sulla superficie interna degli HNTs e gli atomi di ossigeno dei componenti dell'estratto (**Appendice A Tabella A1 e A2**).⁶⁸ Sulla base di questo, la vinaccia è stata caricata negli HNTs adottando una procedura già riportata in letteratura.⁶⁹ Dopo il caricamento, al fine di valutare la quantità di estratto caricato sono state effettuate delle UV-vis, sulle acqua di lavaggio, da cui è stato possibile determinare una percentuale di caricamento pari a circa il 2.1 %p/p, con un'efficienza di incapsulamento di circa il 20%.

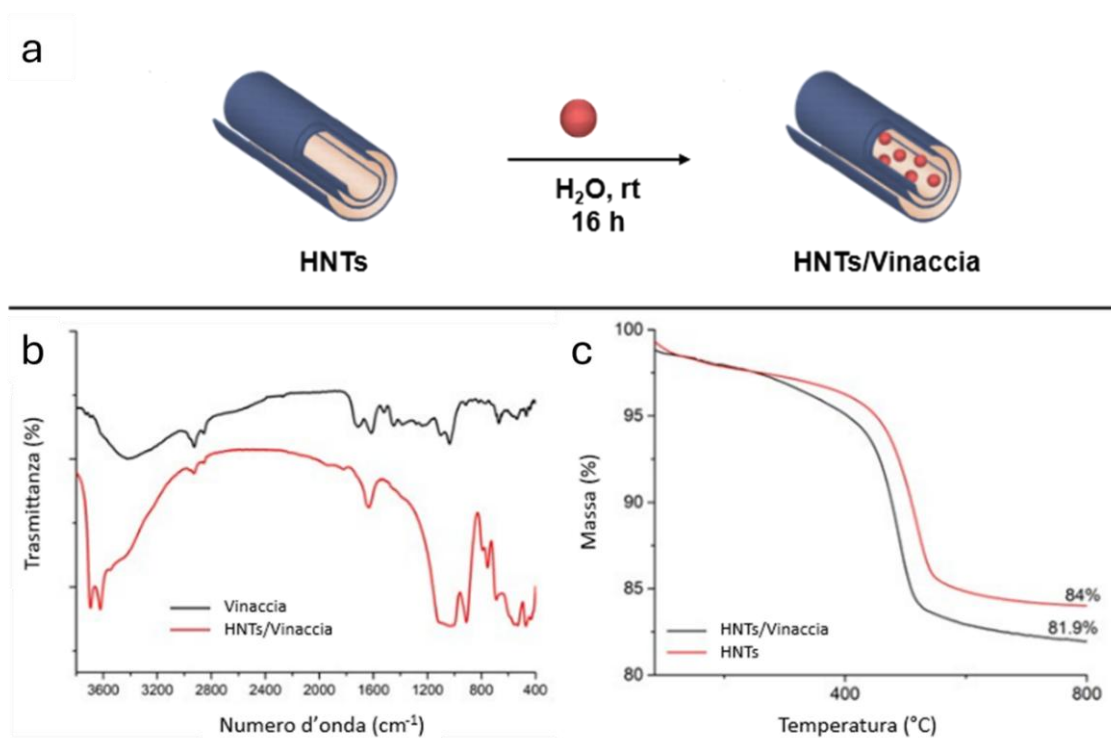


Figura 4. (a) schema rappresentativo della sintesi del nanomateriale HNTs/Vinaccia; (b) FT-IR di HNTs/Vinaccia e Vinaccia; (c) TGA del nanomateriale e di HNTs usato come confronto.

Il successo del caricamento è stato inoltre verificato mediante spettroscopia FT-IR e analisi termogravimetrica (TGA). Lo spettro FT-IR (**Figura 4b**) del nanomateriale HNTs/Vinaccia mostra le tipiche bande vibrazionali degli HNTs, in particolare le bande a 3622 e 3493 cm^{-1} corrispondenti rispettivamente alle vibrazioni di *stretching* dei gruppi ossidrilici delle superfici esterna e interna, e le bande a 3484 e 1645 cm^{-1} attribuite alle vibrazioni di *stretching* del legame O-H dell'acqua adsorbita. Oltre a queste, sono presenti ulteriori bande riconducibili al vinaccia, a conferma dell'avvenuto caricamento. In particolare, sono chiaramente osservabili le bande relative alle vibrazioni di *stretching* asimmetrico e simmetrico dei gruppi metilenici (C-H) intorno a 2900 e 2850 cm^{-1} , insieme alla banda nella regione 1500-1200 cm^{-1} attribuibile ai gruppi funzionali dei costituenti dell'estratto. Dal confronto dei termogrammi ottenuti (**Figura 4c**), aumentando la temperatura da 100 °C fino a circa 600 °C in atmosfera ossidante, risulta che gli HNTs non modificati e il nanomateriale HNTs/Vinaccia presentano una diversa stabilità termica. In entrambi i casi si osserva una perdita di peso trascurabile tra la temperatura ambiente e 100 °C, dovuta alla rimozione dell'acqua fisicamente adsorbita (questo passaggio non è mostrato in figura). Gli HNTs mostrano una buona stabilità fino a circa 400 °C, dopodiché tra 400 e 600 °C subiscono un improvviso calo di peso fino a raggiungere un valore stabile pari a circa l'84% della massa iniziale. In accordo con quanto riportato in letteratura in questo intervallo si verifica una progressiva deidrossilazione dei gruppi Al-OH strutturali degli HNTs fino alla completa modificazione strutturale, intorno a 550-600 °C.⁷⁰ Il nanomateriale HNTs/Vinaccia, a causa della presenza dell'estratto, inizia a degradarsi prima rispetto agli HNTs,⁷¹ a partire da ~300 °C, con una perdita di peso progressiva fino a circa 350 °C, raggiungendo infine una massa stabile pari a circa l'82%. Anche in questo, la quantità di vinaccia caricata negli HNTs è risultata essere di circa il 2.1 %p/p, in accordo con i risultati dell'analisi UV-vis. L'analisi morfologia del nanomateriale (**Figura 5**) è stata condotta tramite microscopia a trasmissione e scansione elettronica (HAADF-STEM) accoppiata spettroscopia a dispersione di energia (EDX).

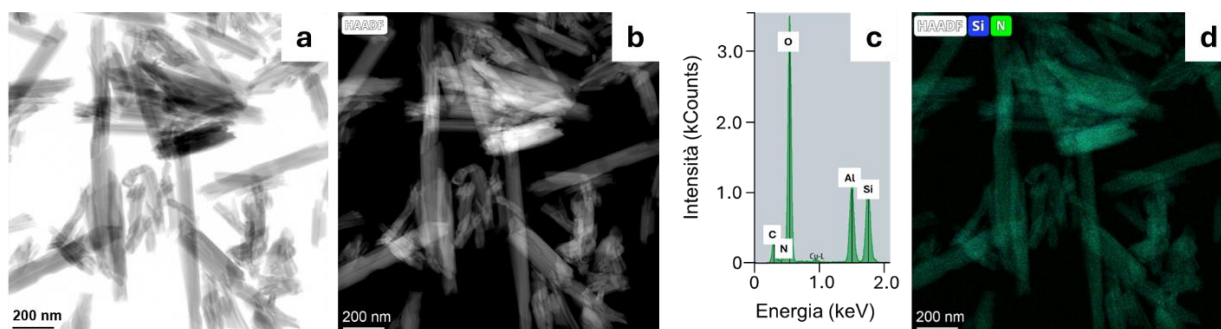


Figura 5. (a-b) immagini HAADF-STEM a campo chiaro e campo scuro, (c) analisi EDX e (d) mappatura elementare estrapolata da analisi EDX del nanomateriale HNTs/Vinaccia.

Le immagini ottenute (**Figura 5a-b**) mostrano la tipica struttura tubulare cava degli HNTs, con una leggera aggregazione tra i nanotubi, dovuta probabilmente alla modifica con l'estratto idroalcolico di Vinaccia. In **Figura 5d** è invece riportata la mappatura elementare estrapolata dall'analisi EDX (**Figura 5c**) che evidenzia il successo dell'avvenuta modifica, vista la distribuzione omogenea dell'N su tutti gli HNTs. Le caratterizzazioni chimico-fisico e morfologiche fino ad ora fatte sul nanomateriale HNTs/Vinaccia, dimostrano una buona interazione tra l'estratto e l'argilla, che potrebbe risultare strategico per l'ottenimento di un nuovo sistema *carrier* per la somministrazione della Vinaccia.

Come precedentemente accennato, un'altra argilla, ovvero la bentonite, è stata presa in considerazione per il caricamento di una diversa molecola di origine naturale. Al contrario dell'halloysite però, la bentonite non è un'argilla pura, ma una miscela di argille diottaedriche di cui il principale componente è la montmorillonite. Prima di essere utilizzata per applicazioni farmaceutiche o biomediche è necessario quindi purificare quest'argilla, sottoponendola a un processo di purificazione in acqua distillata volto a rimuovere le impurità residue, in particolare quelle a base di ferro. In seguito a purificazione la composizione chimica dei principali ossidi è stata determinata mediante analisi XRF ed è riportata in **Tabella 3**. Sulla base di questi risultati è stata stimata la formula mineralogica dell'argilla, calcolata secondo la stechiometria della composizione rappresentativa, che risulta essere la seguente:



Tabella 3. Composizione chimica in percentuale di ossidi della bentonite purificata.

Sample	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	Na ₂ O	MgO	CaO	TiO ₂	K ₂ O	MnO	LOI ¹
Bent	48.86	19.05	9.42	2.81	2.26	1.71	0.82	0.21	0.07	12.68

¹LOI (*loss on ignition*) - perdita dopo calcinazione.

Al fine di valutarne la sicurezza e l'idoneità all'impiego in ambito biomedico e cosmetico, la bentonite purificata è stata sottoposta a test *in vivo* per verificarne i potenziali effetti irritanti e tossici. Sono stati quindi effettuati test di irritabilità oftalmica e test di tossicità dermica acuta ma in entrambi i casi non sono state osservate lesioni cutanee né segni clinici riconducibili a effetti tossici, confermandone la sicurezza per applicazioni topiche e cosmetiche. Una volta verificata la non tossicità del *carrier*, la bentonite è stata caricata con acido L-ascorbico (LAA)

ponendo a contatto una dispersione dell'argilla con una soluzione acquosa concentrata di LAA. Dopo il *work-up*, tramite analisi UV-vis, il contenuto finale di LAA nel nanomateriale è risultato pari a circa $450 \pm 50 \text{ mg g}^{-1}$ di Bent.

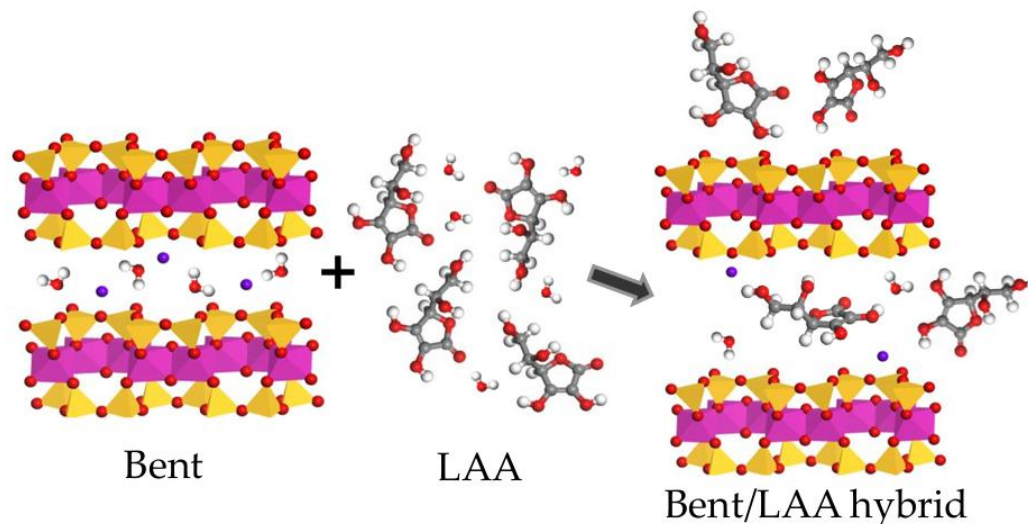


Figura 6. Rappresentazione schematica del caricamento di LAA in Bent per la sintesi di Bent/LAA.

Il nanocomposito Bent/LAA, come il sistema precedente a base di halloysite, è stato caratterizzato mediante spettroscopia FT-IR e analisi termogravimetrica (TGA/DTG), al fine di evidenziare le interazioni tra argilla e farmaco e valutarne la stabilità termica. Gli spettri FT-IR di LAA, Bent e del nanomateriale Bent/LAA sono riportati in **Figura 7**. Nello spettro della Bent sono presenti le caratteristiche bande vibrazionali di *stretching* e *bending* di questa argilla, come quelle dei gruppi ossidrilici (-OH) strutturali tipici delle smectiti diottaedriche e delle molecole d'acqua adsorbite o intercalate nella Bent (rispettivamente a ca. 3622 e 3408 cm^{-1}). La banda a 1637 cm^{-1} può essere attribuita alla vibrazione di *bending* dell'acqua. L'intensa banda a circa 985 cm^{-1} corrisponde alle vibrazioni di *stretching* Si-O del foglio tetraedrico e il segnale intorno a 1456 cm^{-1} è dovuto alla vibrazione di *stretching* dell'anione carbonato (CO_3^{2-}) presente nel campione grezzo. Lo spettro di LAA mostra quattro bande a 3521 , 3402 , 3303 e 3201 cm^{-1} associate alle vibrazioni di *stretching* dei gruppi ossidrilici -OH; intorno a 3001 e 2914 cm^{-1} compaiono le vibrazioni di *stretching* associate ai gruppi metilici e metilenici (-CH- e -CH₂-); un segnale a 1753 cm^{-1} è stato assegnato alla vibrazione gruppo carbonilico (-C=O) e l'intensa banda a 1650 cm^{-1} deriva dalle vibrazioni di *stretching* del legame C=C. Altre bande vibrazionali sono osservabili nella regione $1500\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$, sono attribuibili alle vibrazioni di *bending* del legame C-H dei gruppi metilenici e metilici. Nello spettro FT-IR del nanomateriale

Bent/LAA si osservano i tipici segnali dell'argilla e quelli appena descritti di LAA. I cambiamenti osservati verso numeri d'onda inferiori suggeriscono deboli interazioni tra LAA e l'argilla.

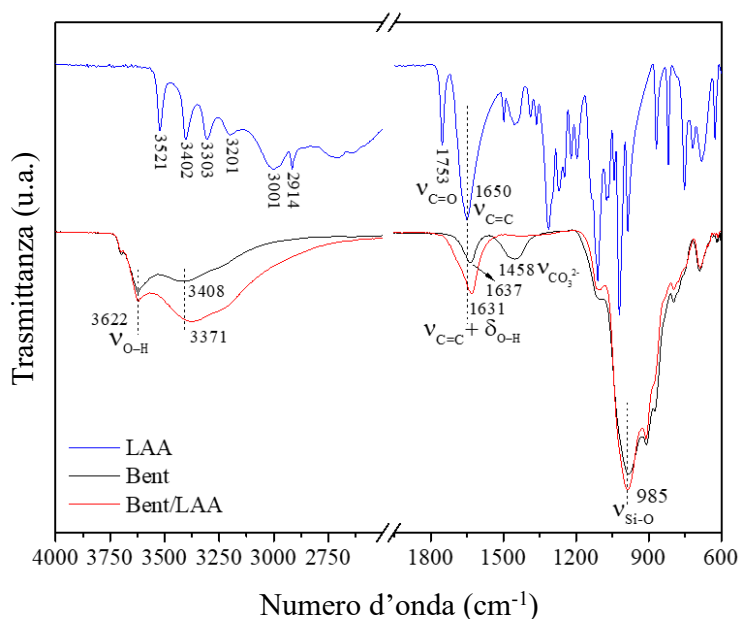


Figura 7. Spettri FTIR dei campioni LAA, Bent e del composito Bent/LAA registrati in modalità ATR.

In **Figura 8** è riportata la TGA e la DTG di Bent, LAA e del nanomateriale. Per la Bent sono stati osservati tre principali perdite di peso, la prima intorno a 85 °C, attribuita alla disidratazione dell'acqua adsorbita e interstiziale; una seconda e una terza, a 484 e 671 °C, rispettivamente dovuti alla prima e seconda deidrossilazione dell'argilla. Inoltre, le analisi condotte su LAA hanno evidenziato la stabilità del solido anidro fino a 180 °C, oltre la quale inizia a decomporre in tre fasi attribuibili rispettivamente a reazioni di disidratazione e decarbossilazione, decarbossilazione e decarbonilazione della molecola organica e infine, un processo carbonizzazione (**Figura 8a**).

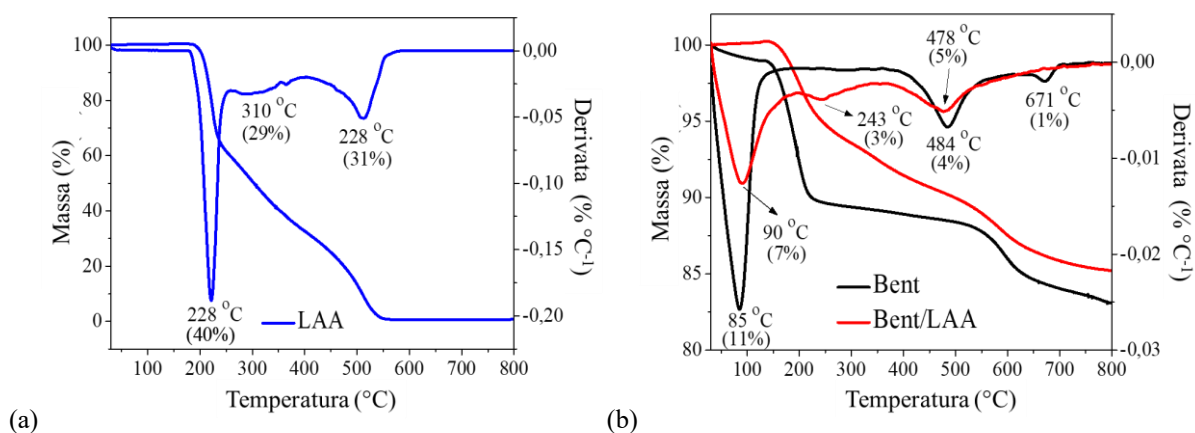


Figura 8. Termogrammi (TGA/DTG) di (a) LAA e (b) Bent/LAA con Bent usata per confronto.

Osservando il termogramma di Bent/LAA, e la sua derivata, è possibile osservare una perdita tra 196 e 250 °C nella TGA, che conferma il successo del caricamento della molecola nell'argilla, e uno spostamento a temperature inferiori nella DTG, che suggerisce ancora una volta una possibile interazione tra i due componenti (**Figura 8b**).

- ***Valutazione dell'attività antiossidante di HNTs/vinaccia e Bent/LAA***

Viste le proprietà degli estratti caricati, sono state valutate le attività antiossidanti dei due nanomateriali sintetizzati. Questa proprietà è stata valutata studiando la reazione tra questi e il radicale 2,2-difenil-1-picrilidrazile (DPPH), caratterizzato da un tipico assorbimento a 513 nm. La reazione tra un composto antiossidante e il radicale comporta una decolorazione della soluzione, che passa dal violetto al giallo.⁷² L'attività antiossidante della vinaccia in metanolo è stata determinata riportando la percentuale di inibizione in funzione delle concentrazioni di diverse soluzioni standard di vinaccia (da 4 a 44 µg mL⁻¹). Come previsto, la vinaccia ha mostrato una buona attività antiossidante, che aumenta all'aumentare della concentrazione (IC₅₀ = 11.1 µg mL⁻¹), mentre l'halloysite pura non ha mostrato alcuna attività di *scavenging* radicalico. Ripetendo lo stesso esperimento in presenza di concentrazioni crescenti del nanomateriale HNTs/Vinaccia (**Figura 9**), si sono ottenuti risultati simili (IC₅₀ = 0.3 mg mL⁻¹), corrispondenti a una concentrazione di vinaccia nel nanomateriale HNTs/Vinaccia pari a 6.5 µg mL⁻¹), indicando come la vinaccia mantenga le sue proprietà antiossidanti una volta caricata negli HNTs.

Utilizzando lo stesso saggio colorimetrico, sul nanomateriale Bent/LAA, i risultati hanno evidenziato la marcata attività antiossidante di LAA (IC₅₀ = 11.24 µg mL⁻¹) (**Figura 10a**), che risulta essere preservata quando questa molecola viene caricata sull'argilla (**Figura 10b**). L'attività antiossidante di LAA deriva dalla presenza di un gruppo enediolico nella sua struttura (C2 e C3 in **Figura 11**).⁷³ Il nanomateriale Bent/LAA mostra, al contrario della Bent che non possiede alcuna attività antiossidante, un IC₅₀ pari a 2.5 mg mL⁻¹.

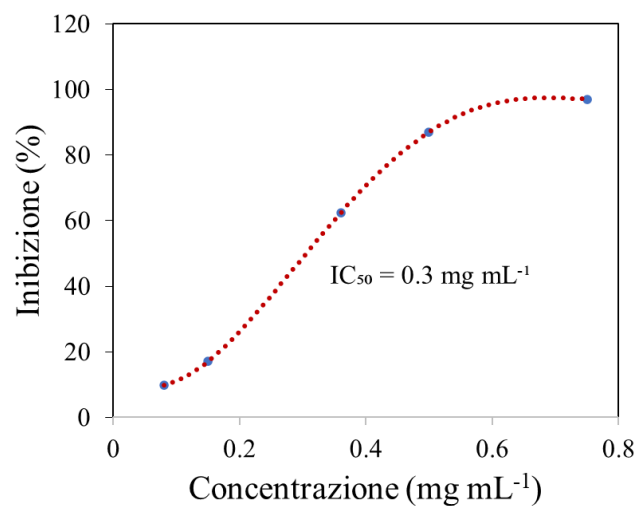


Figura 9. Capacità antiossidante del nanomateriale HNTs/Vinaccia e valore di IC_{50} .

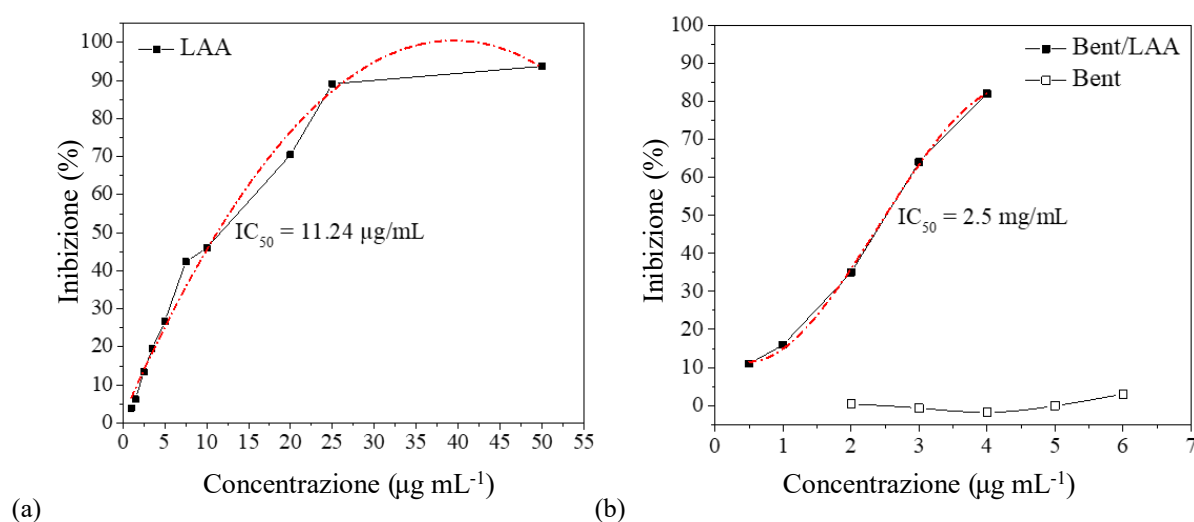


Figura 10. Capacità antiossidante di (a)LAA e (b) del nanomateriale Bent/LAA con Bent per confronto, e valori di IC_{50} per ciascun campione.

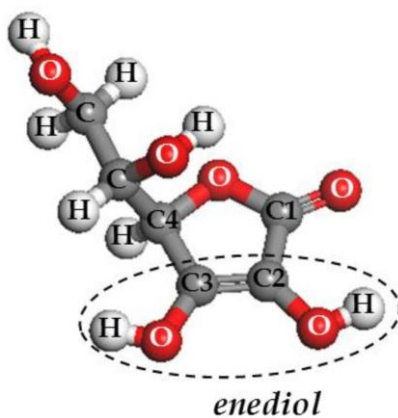


Figura 11. Struttura molecolare dell'acido L-ascorbico. Il gruppo enediolico (C2 e C3), responsabile dell'attività antiossidante, è evidenziato con una linea tratteggiata.

La minore attività antiossidante osservata per il nanomateriale è probabilmente dovuta all'incorporazione della molecola nell'argilla, che per via delle interazioni supramolecolari, rimane in parte confinata all'interno della struttura, al contrario della vinaccia che per via della complessità dell'estratto e della natura delle interazioni, può essere facilmente rilasciata nel mezzo in cui viene dispersa.

- *Cinetiche di rilascio della Vinaccia dal nanomateriale*

Al fine di valutare le prestazioni del nanomateriale ottenuto in vista di future applicazioni, e stimare i tempi di rilascio di questo estratto dall'halloysite, è stato studiato il suo rilascio cinetico dal nanomateriale HNTs/Vinaccia mediante il metodo della membrana da dialisi a pH 7.4, per simulare le condizioni fisiologiche, e pH 3.0, per riprodurre l'ambiente gastrico. I dati cinetici (**Figura 12**) sono stati analizzati mediante diversi modelli matematici, il modello del primo ordine e il modello Power Fit, al fine di ottenere informazioni sulla modalità di rilascio. I risultati ottenuti hanno mostrato che i rilasci della Vinaccia dal nanomateriale seguono entrambi il modello Power Fit, sia a pH 3.0 ($k = 19.4 \pm 6.1 \text{ min}^{-1}$, $n = 0.34 \pm 0.08$, $R^2 = 0.8628$) sia a pH 7.4 ($k = 40.3 \pm 4.9 \text{ min}^{-1}$, $n = 0.13 \pm 0.02$, $R^2 = 0.9280$), indicando un processo di diffusione dal lume degli HNTs.

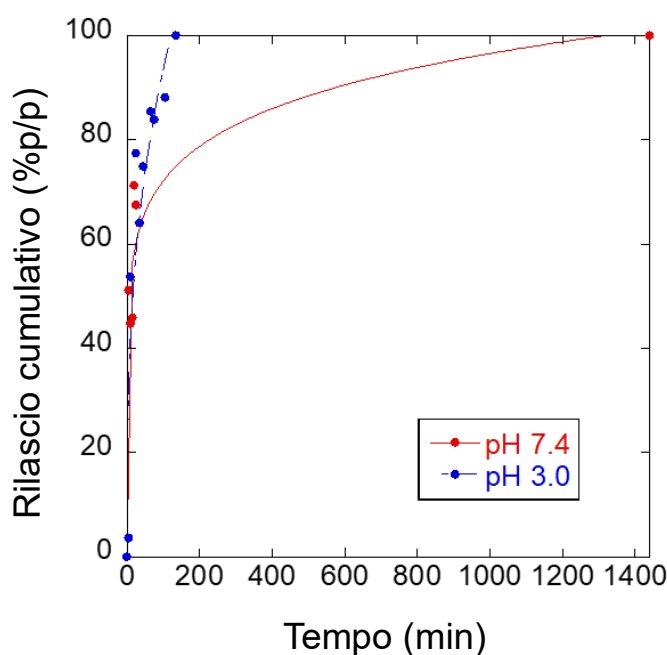


Figura 12. Percentuale di Vinaccia rilasciata in funzione del tempo da HNTs/Vinaccia a 37 °C, a pH 3 o 7.4.

Poiché il valore di n risulta inferiore a 0.45 il rilascio osservato corrisponde a una diffusione di tipo fickiano. Come è possibile osservare, il rilascio della vinaccia dal nanomateriale HNTs/Vinaccia è risultato molto rapido, raggiungendo il 100% in peso delle molecole rilasciate dopo circa 130 minuti a pH 3.0, mentre è stato più lento a pH 7.4, dove il rilascio totale della vinaccia è stato raggiunto solo dopo 24 ore.

I risultati ottenuti sottolineano l'importanza nell'utilizzo delle argille minerali, in particolare degli HNTs e della Bent, per il trasporto, il rilascio e protezione degli estratti naturali oggetto di studio. In tutti i casi il caricamento sulle argille ha permesso di superare i principali limiti legati al loro uso, come la loro scarsa solubilità in acqua. Questo pone le basi per l'utilizzo di questi sistemi per il caricamento di molecole e miscele di molecole molto più lipofile rispetto a quelle adesso viste, come potrebbe essere un olio di origine vegetale e/o oli essenziali. A tal fine nel prossimo paragrafo verrà mostrato lo sviluppo di sistemi *carrier* a base di argille e di altri innovativi sistemi nanostrutturati utili per il trasporto e la somministrazione di diversi oli.

1.3. *Nanocarriers a base di argille per il trasporto di oli essenziali*

Negli ultimi anni l'interesse scientifico verso gli EOs è cresciuto notevolmente grazie alle loro riconosciute proprietà antibatteriche, antinfiammatorie e antiossidanti.²⁷ Nonostante il loro elevato potenziale applicativo gli EOs presentano alcune limitazioni che ne ostacolano lo sviluppo e l'impiego diretto, tra cui marcata idrofobicità, volatilità, instabilità chimica e un odore intenso.⁷⁴ Queste caratteristiche rendono complessa la loro incorporazione e la gestione controllata all'interno di matrici o dispositivi biomedicali, rappresentando dunque una sfida rilevante nella progettazione di sistemi *carrier* adeguati.⁷⁵ Un sistema *carrier* efficace consente alle molecole di olio essenziale di essere adsorbite nella propria struttura assicurando un effetto di rilascio prolungato.⁷⁶ È quindi evidente la necessità di identificare o sviluppare un sistema *carrier* idoneo per gli oli essenziali capace di ridurre la velocità di volatilizzazione e, al contempo, potenziarne l'attività antimicrobica. In questo contesto, ancora una volta le argille minerali rappresentano una promettente alternativa ai più comuni e conosciuti *carrier* (**Figura 13**).⁷⁵ Numero studi infatti hanno dimostrato l'efficacia delle argille come *carrier* per gli EOs, come ad esempio uno studio condotto da Zhang *et al.*, che hanno caricato carvacrolo in nanotubi di halloysite, ottenendo un sistema a rilascio prolungato e con una marcata attività antimicrobia.⁷⁷ Uno studio condotto da Rathnayake *et al.*, ha mostrato come dei film di chitosano contenenti HNTs caricati con olio essenziale di basilico, migliorino l'attività

antimicrobica dell'olio essenziale,⁷⁸ in accordo con degli studi condotti da Chen *et al.*, che hanno caricato olio di cannella sulla stessa argilla per poi disperdere questo nanomateriale all'interno di una matrice di PBAT.⁷⁹

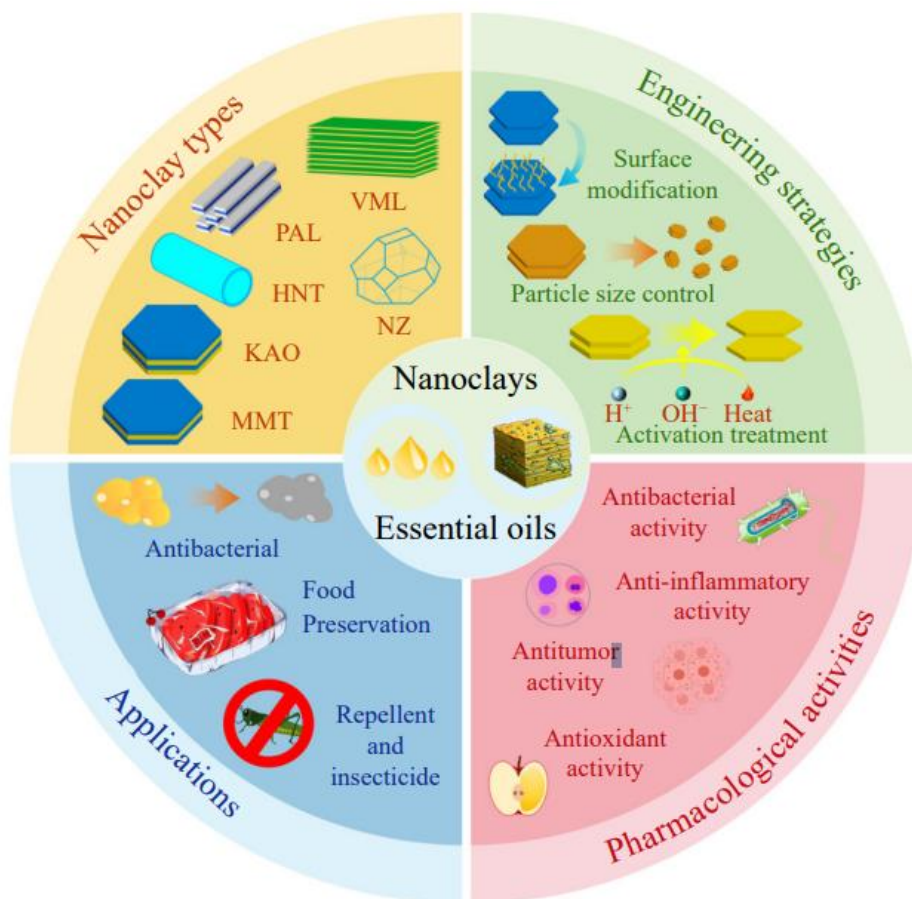


Figura 13. Schema rappresentativo delle argille minerali come *nanocarrier* per oli essenziali (EOs) e delle attività farmacologiche degli EOs (Pengfei *et al.*, 2024).⁸⁰

Oltre all'halloysite anche altre argille sono state utilizzate come sistemi *carrier*, mostrando anch'esse buoni risultati. Berraaouan *et al.*, hanno utilizzato ad esempio montmorillonite modificata per adsorbire l'olio essenziale di rosmarino, riuscendo ad ottenere un *carrier* per questo senza comprometterne l'attività antiossidante.⁸¹ Altri studi hanno visto l'utilizzo della bentonite e Laponite® (Lap), in un caso per l'incorporazione di nerolidolo in bentoniti naturali e modificate,⁸² e nel secondo caso oli essenziali di lavanda e rosmarino.⁸³ Entrambi gli studi hanno evidenziato l'importanza di questi sistemi nanostrutturati nel preservare l'attività antimicrobica e/o antiossidante degli oli essenziali.

1.3.1. Sistemi carrier a confronto per la veicolazione di oli vegetali ozonizzati

Recentemente, tra tutti gli oli essenziali e oli vegetali visti come esempi, gli oli vegetali ozonizzati (Oz) stanno attirando una notevole attenzione per le potenzialità che questi potrebbero avere in campo biomedico, grazie alla loro attività antibatterica, antifungina, antinfiammatoria e cicatrizzante.⁸⁴ L'ozonizzazione consiste nella reazione controllata dell'ozono con i doppi legami insaturi degli acidi grassi presenti negli oli, dando origine a ozonidi, perossidi, aldeidi e altri composti ossigenati stabili, responsabili dell'efficacia terapeutica del prodotto finale.⁸⁵ Queste sostanze rilasciando ossigeno attivo e specie reattive in quantità moderate, sono in grado di stimolare la rigenerazione dei tessuti e di favorire la risoluzione dei processi infiammatori, motivo per cui gli oli ozonizzati trovano applicazione in formulazioni topiche per la cura di ferite, ulcere e infezioni cutanee.⁸⁶⁻⁸⁹

Tuttavia, gli oli ozonizzati posseggono una marcata lipofilia, e questa caratteristica limita la loro dispersione uniforme in matrici idrofile e ne riduce la biodisponibilità. Per superare tale limitazione, l'integrazione degli Oz in sistemi *carrier* nanostrutturati a base di argille minerali rappresenta un approccio particolarmente promettente. L'incorporazione in tali matrici potrebbe permettere una migliore biodisponibilità e un rilascio graduale e localizzato, con un potenziale incremento dell'efficacia terapeutica in ambito biomedico.

Per questo motivo, nel corso di questo dottorato sono stati sviluppati e messi a punto diversi sistemi *carrier* a base di argille minerali, finalizzati al caricamento di oli ozonizzati. Come vedremo a breve, l'esplorazione dei diversi sistemi ha riguardato in un primo momento diverse argille, per poi focalizzarsi sull'halloysite, per poi passare a sistemi più complessi come gli idrogel tissotropici a base di Laponite®, per finire a sistemi notevolmente più complessi in cui le argille sono state utilizzate come *filler* all'interno di *Solid Lipid Nanoparticles*.

- Sviluppo di carrier a base di argille e Oz

Al fine di selezionare i materiali più idonei per applicazioni in campo biomedico, è stata condotta una valutazione comparativa di differenti argille minerali, quali l'halloysite, l'hectorite (Ht), la bentonite (Bent), la sepiolite (Sep) e la paligorskite (Plg), analizzandone le caratteristiche chimico-fisiche. L'obiettivo di questa indagine è stato quello di identificare le argille in grado di garantire una migliore capacità di caricamento dell'olio ozonizzato in

nanomateriali con proprietà compatibili per le loro future applicazioni. Per far questo è stata utilizzata la comune procedura precedentemente descritta per il caricamento degli estratti.

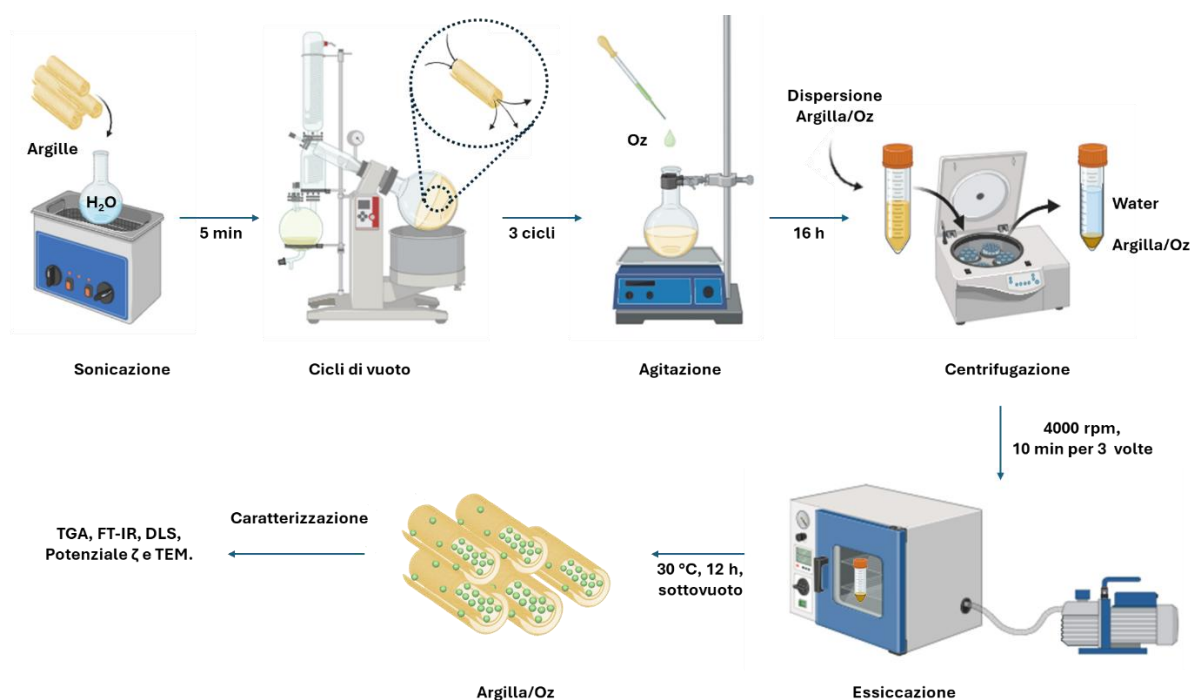


Figura 14. Rappresentazione schematica della sintesi dei nanomateriali Argilla/Oz.

Le dispersioni delle diverse argille, ottenute sonicando, sono state soggette a tre cicli di vuoto al fine di eliminare l'aria intrappolata all'interno del lume, nel caso dell'halloysite, o tra gli strati o canali, nel caso delle altre argille. In seguito, è stato aggiunto l'olio ozonizzato sotto agitazione e le dispersioni lasciate ad agitare per 16 h a temperatura ambiente (**Figura 14**).

Al termine di questo tempo, le dispersioni sono state centrifugate e lavate molte con acqua, e poste in stufa da vuoto per una notte. I nanomateriali ottenuti, nello specifico indicati come HNTs/Oz, Ht/Oz, Bent/Oz, Sep/Oz e Plg/Oz, sono stati caratterizzati tramite TGA, FT-IR, DLS, Potenziale- ζ e microscopia TEM. Il successo di ciascuna sintesi è stato verificato mediante l'analisi termogravimetrica e spettroscopia FT-IR.

Dalla TGA, analizzando il residuo fisso a 800 °C e comparandolo con quello dell'argilla non modificata, è stata stimata la percentuale di caricamento dell'olio ozonizzato su ciascuna argilla, riportata in **Tabella 4**.

Tabella 4. Percentuali di caricamento (%p/p) ottenuto dalla TGA di ciascun nanomateriale Argilla/Oz

Nanomateriale	Percentuale di caricamento (%p/p)
HNTs/Oz	6.8
Ht/Oz	9.9
Bent/Oz	35.8
Sep/Oz	19.6
Plg/Oz	16.3

In **Figura 15** sono mostrate le curve TGA dei nanomateriali Argilla/Oz (linee continue) e delle corrispettive argille (linee tratteggiate). Come è possibile osservare, oltre alla tipica perdita di massa compresa tra 400 e 550 °C, comune a tutte le argille, ed attribuibile all'espulsione dell'acqua interlamellare, sono presenti ulteriori perdite in peso tra 250 e 350 °C, dovute alla degradazione e volatilizzazione della componente organica. I valori calcolati mostrano un comportamento fortemente dipendente dalla composizione e morfologia di ciascun materiale.

In particolare, il caricamento più elevato è stato osservato per la bentonite, seguita dalla sepiolite e palygorskite, mentre l'hectorite e l'halloysite hanno mostrato valori inferiori. Queste differenze possono essere ricondotte alla diversa morfologia e area superficiale delle argille impiegate. La bentonite, costituita da strati lamellari espandibili con elevata capacità di intercalazione, consente l'inclusione di un'elevata quantità di molecole organiche tra le sue lamelle, giustificando il valore di caricamento più alto osservato.⁹⁰

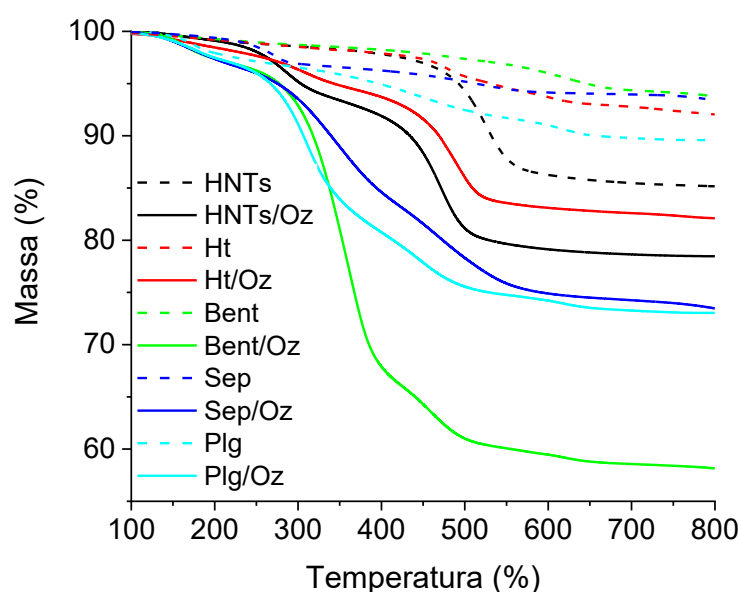


Figura 15. Analisi termogravimetrica dei nanomateriali Argilla/Oz con corrispettive argille non modificate.

Al contrario, le argille fibrose come sepiolite e palygorskite, pur non presentando una struttura intercalante, possiedono canali e cavità in grado di adsorbire efficacemente molecole lipofile come l'olio ozonizzato,⁹¹ determinando valori intermedi di caricamento. L'hectorite, appartenente alla famiglia delle smectiti ma con un minor grado di espandibilità, e l'halloysite, caratterizzata da una morfologia nanotubolare cava, mostrano invece un caricamento più contenuto. Nel complesso, i risultati evidenziano come la struttura e la composizione dell'argilla influenzino in modo decisivo il caricamento dell'olio ozonizzato. In **Figura 16** è riportato lo spettro FT-IR del nanomateriale Bent/Oz, selezionato come rappresentativo poiché, essendo quello con maggiore grado di caricamento, presenta bande di intensità più elevata. Oltre ai picchi tipici della bentonite, assegnabili sulla base dei dati di letteratura,⁹² lo spettro mostra una serie di segnali attribuibili alla presenza della componente organica derivante dall'olio ozonizzato. Nel nanomateriale Bent/Oz si osservano due bande a 2926 e 2848 cm^{-1} , corrispondenti allo *stretching* dei gruppi metilenici ($-\text{CH}_2$) e metilici ($-\text{CH}_3$). È inoltre presente un debole segnale a 3002 cm^{-1} , riconducibile allo *stretching* del legame C-H olefinico ($\text{C}=\text{C}$). Si evidenzia anche una banda a circa 1469 cm^{-1} , attribuibile alla vibrazione di *bending* dei gruppi metilenici delle catene alifatiche degli acidi grassi.⁹³ Infine, si rileva una banda intensa a 1739 cm^{-1} , associata allo *stretching* del legame carbonilico ($\text{C}=\text{O}$), e due segnali nel range 1375–1165 cm^{-1} ,⁹⁴ riconducibili rispettivamente allo *stretching* del legame C-O e a un ulteriore contributo C-O tipico dell'isomero trans degli ozonidi formati durante il processo di ozonizzazione.⁹⁵

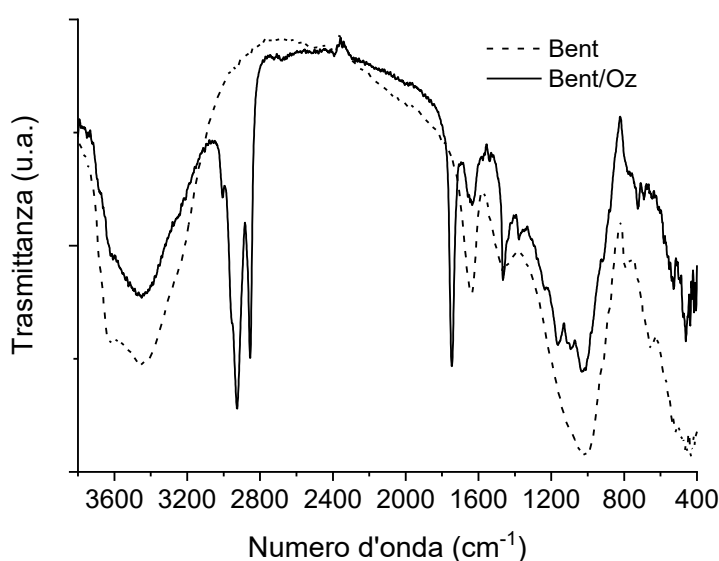


Figura 16. Spettro FT-IR della bentonite e del nanomateriale Bent/Oz.

Tutti gli altri nanomateriali, i cui spettri FT-IR sono riportati in **Appendice A Figura A1**, mostrano le stesse bande caratteristiche osservate per la Bent/Oz, oltre ai segnali specifici relativi alla struttura dell'argilla utilizzata,⁹⁶ a conferma del successo della procedura sintetica adottata. Per valutare il comportamento colloidale dei nanomateriali caricati con l'olio ozonizzato, sono state effettuate misure di *Dynamic Light Scattering* (DLS), potenziale- ζ e indice di polidispersione (PDI) (**Tabella 5**).

Tabella 5. Valori di DLS, Potenziale- ζ e PDI dei nanomateriali argilla/Oz (0.1 mg mL⁻¹) con relative deviazioni standard.

Nanomateriali	Diametro idrodinamico medio (nm)	Potenziale- ζ (mV)	PDI
HNTs/Oz	713 $\pm$ 25	-20.1 $\pm$ 0.4	0.4
Ht/Oz	1666 $\pm$ 278	-30.9 $\pm$ 3.3	>1.0
Bent/Oz	2709 $\pm$ 181	-22.1 $\pm$ 0.3	>1.0
Sep/Oz	3386 $\pm$ 25	-14.2 $\pm$ 0.8	>1.0
Plg/Oz	5436 $\pm$ 578	-10.1 $\pm$ 2.1	>1.0

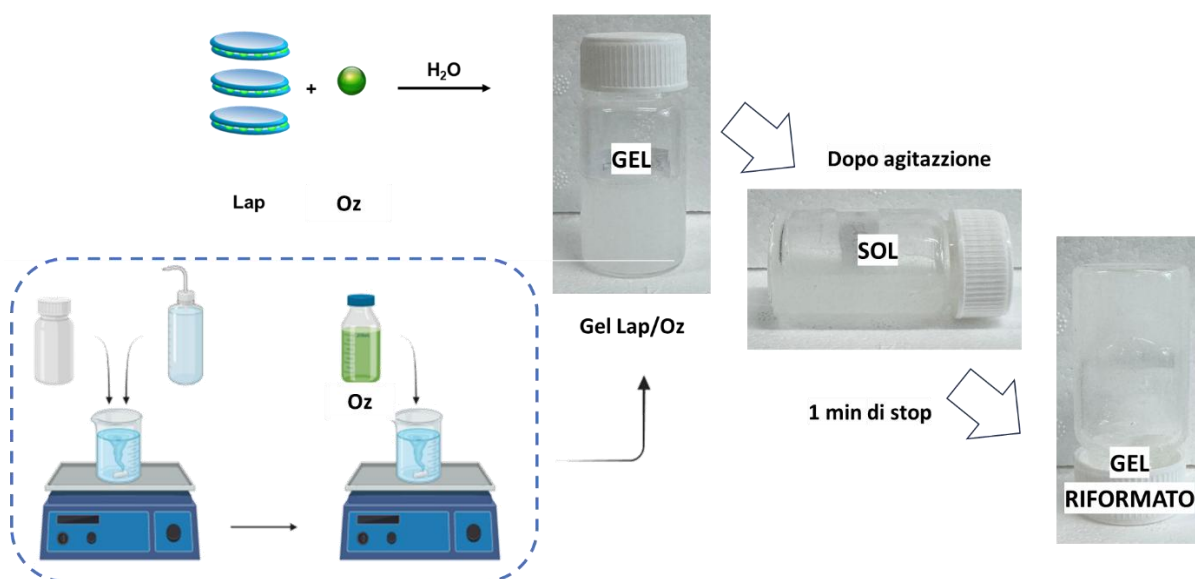
I risultati mostrano una chiara correlazione tra il comportamento colloidale e la natura fisico-chimica delle diverse argille. Il campione a base di halloysite (HNTs/Oz) presenta dimensioni contenute, rispetto agli altri sistemi, e un PDI pari a 0.4, indicativo di una mobilità acquosa e dispersione migliore in fase acquosa rispetto alle altre argille in esame. Sebbene il suo potenziale- ζ non sia il più negativo tra i campioni analizzati, la maggior mobilità del sistema e la limitata tendenza all'aggregazione ne evidenziano il comportamento migliore in acqua. I campioni a base di hectorite, bentonite, sepiolite e palygorskite mostrano invece valori di PDI maggiori di 1, oltre il quale il valore non possiede più un significato fisico, e dimensioni idrodinamiche significativamente superiori (**Tabella 5**). Pur presentando in alcuni casi potenziali- ζ più negativi, tali materiali risultano meno stabili in dispersione, probabilmente a causa della maggiore quantità di olio adsorbito e delle differenze strutturali e superficiali che promuovono la formazione di aggregati.

Nel complesso i risultati evidenziano che l'halloysite rappresenta il *carrier* più promettente per applicazioni biomedicali in ambiente acquoso, grazie alla migliore stabilità colloidale, dimensione e minore grado di agglomerazione, parametri che ne fanno il sistema più idoneo per la progettazione di formulazioni a base di oli ozonizzati. Tra i sistemi appena descritti, uno in particolare, quello a base di hectorite, potrebbe però rappresentare e portare all'ottenimento di un altro sistema *carrier*, ed in particolare di un idrogel. Come descritto nell'introduzione di

questo lavoro di tesi, l'hectorite, possiede delle proprietà chimico-fisiche e una morfologia, che le permettono di disporsi in acqua a formare idrogel con proprietà tissotropiche. Tuttavia, una volta modificata, ed in particolare, quando caricata con l'olio ozonizzato, questa perde le proprietà gelificanti che possiede. Per investigare questo altro tipo di sistema, è stata quindi presa in considerazione l'introduzione dell'olio ozonizzato durante la formazione del gel stesso.

- Sviluppo di gel tissotropici per l'incapsulamento e rilascio di Oz

Al fine di ottenere un gel con proprietà tissotropiche, è stata messa a punto una procedura sperimentale per l'ottenimento di questo. Sono state innanzitutto investigate le capacità gelificanti di quattro diverse argille quali, la Laponite[®] di cui sono già ben note le capacità gelificanti, ed in seguito Hectorite, Sepiolite e Bentonite, argille naturali e dunque molto più economiche rispetto alla prima. Conoscendo quindi le proprietà gelificanti della Lap, che sono state discusse nella parte introduttiva, siamo partiti da questa argilla per mettere a punto la procedura sperimentale per l'ottenimento dei gel. Per il loro ottenimento è risultato necessario effettuare l'aggiunta dei materiali di partenza secondo lo **Schema 1**. Nello specifico l'introduzione dell'olio ozonizzato deve obbligatoriamente seguire alla dispersione dell'argilla in acqua tramite agitazione al fine di avere un prodotto omogeneo. Inoltre, nel primo step, l'argilla deve essere addizionata all'acqua sotto agitazione.



Schema 1. Rappresentazione schematica dei gel a base di Laponite e Oz.

Il processo inverso porta alla formazione di grumi influenzando poi sulla dispersione dell'olio. Stabilita la procedura, sono state valutate diverse percentuali in peso di Lap per l'ottenimento di gel capaci di rompersi e riformarsi in breve tempo. Sono stati preparati dei Gel di Lap al 1.0, 2.0 e 3.0 %p/p in acqua (**Figura 17**).

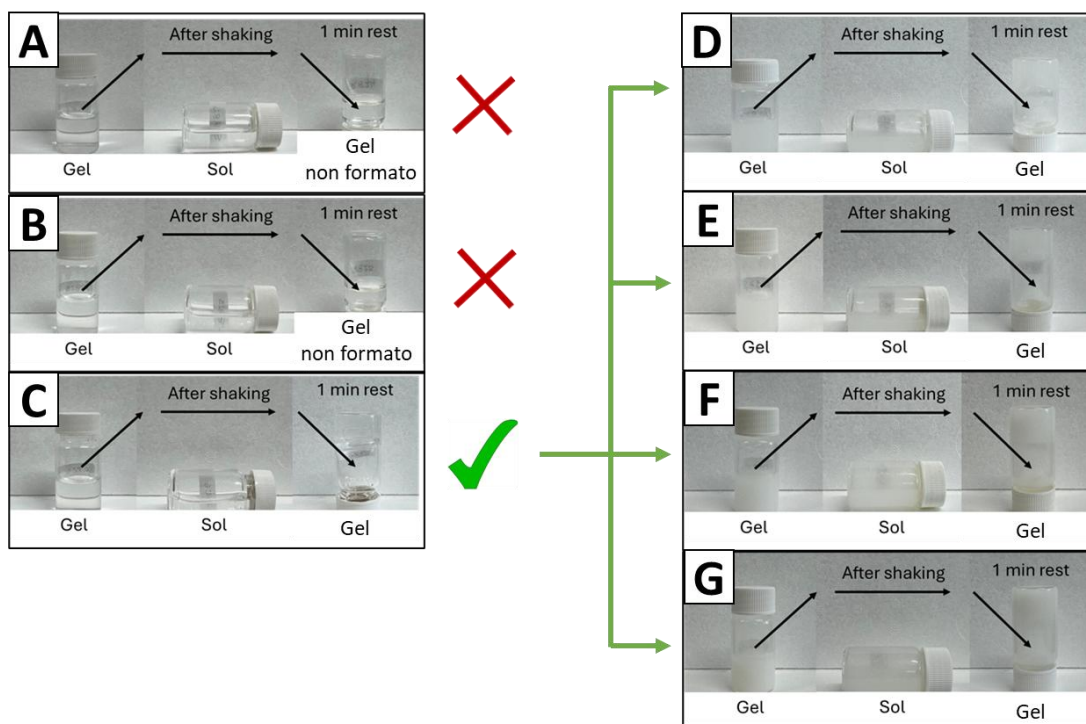


Figura 17. Rottura e riformazione del gel di (A) Lap al 1.0 %p/p, (B) Lap al 2.0 %p/p, (C) Lap al 3.0 %p/p, (D-F) Lap al 3.0 %p/p con Oz al 0.5, 1.0, 2.5 e 5.0 %p/p.

Tuttavia, come è possibile osservare, solo il 3.0 %p/p di Lap ha portato all'ottenimento di un gel con le proprietà ricercate. Il gel inoltre è risultato essere molto stabile agli ultrasuoni.

Questo gel è stato quindi scelto come modello per l'incapsulamento al suo interno di olio ozonizzato. Sono stati preparati dei gel a diversa concentrazione di Oz (0.5, 1.0, 2.5 e 5.0 %p/p). Per ogni gel a diversa concentrazione di Oz è stato necessario allungare il tempo di agitazione, proporzionalmente alla quantità di olio usato al fine di avere un sistema omogeneo. Anche in questo caso i gel Lap/Oz ottenuti sono risultati stabili agli ultrasuoni e hanno mostrato le stesse capacità tissotropiche mostrate dal gel di sola Lap.

Una volta messa a punto la procedura per i gel di Lap, è stata utilizzata l'Ht. Visti i risultati ottenuti con la Lap, per l'Hectorite si è partiti dal 3.0 %p/p di argilla. Tuttavia, come è possibile osservare in **Figura 18** questa percentuale in peso ha portato all'ottenimento di un gel che ha uno scarso tempo di rigelificazione in seguito a rottura meccanica, e che quindi non risulterebbe molto utili in fase di applicazione del prodotto. È stata quindi aumentata la percentuale di Ht

fino al 4.0 %p/p ottenendo già a questa concentrazione un gel con proprietà interessanti e utili ai nostri scopi. In questa fase non conoscendo ancora la risposta dell'argilla e della sua capacità di formare gel in presenza di una matrice oleosa, sono stati ripreparati i due diversi gel a diversa concentrazione in presenza di Oz al 1.0 %p/p, per l'ottenimento di gel Ht/Oz **Figura 18C-D**.

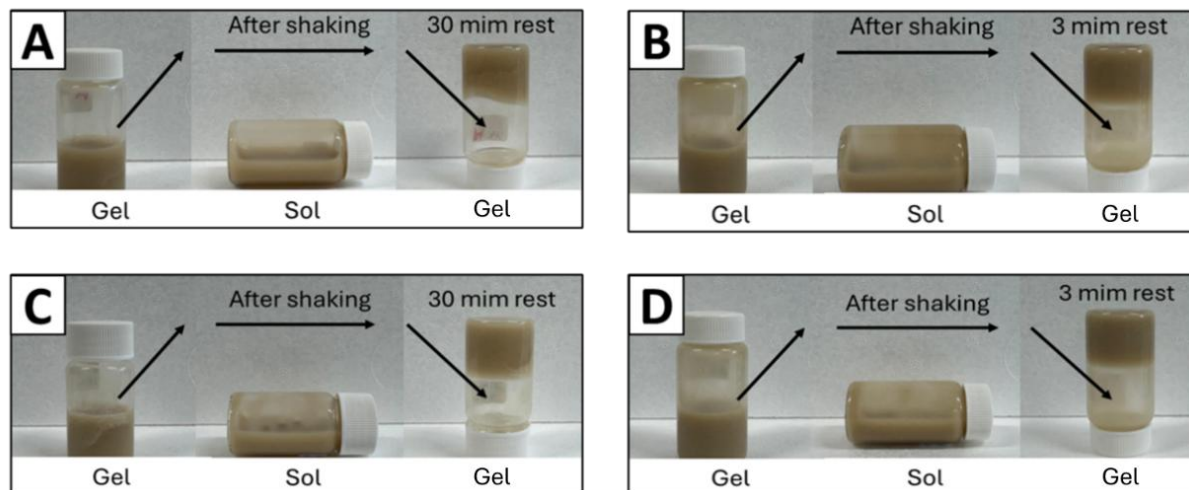


Figura 18. Rottura e riformazione del gel di (A) Ht al 3.0% p/p, (B) Ht al 4.0% p/p, (C) Ht al 3.0% p/p con Oz al 1.0% p/p e (D) Ht al 4.0 %p/p con Oz al 1.0 %p/p.

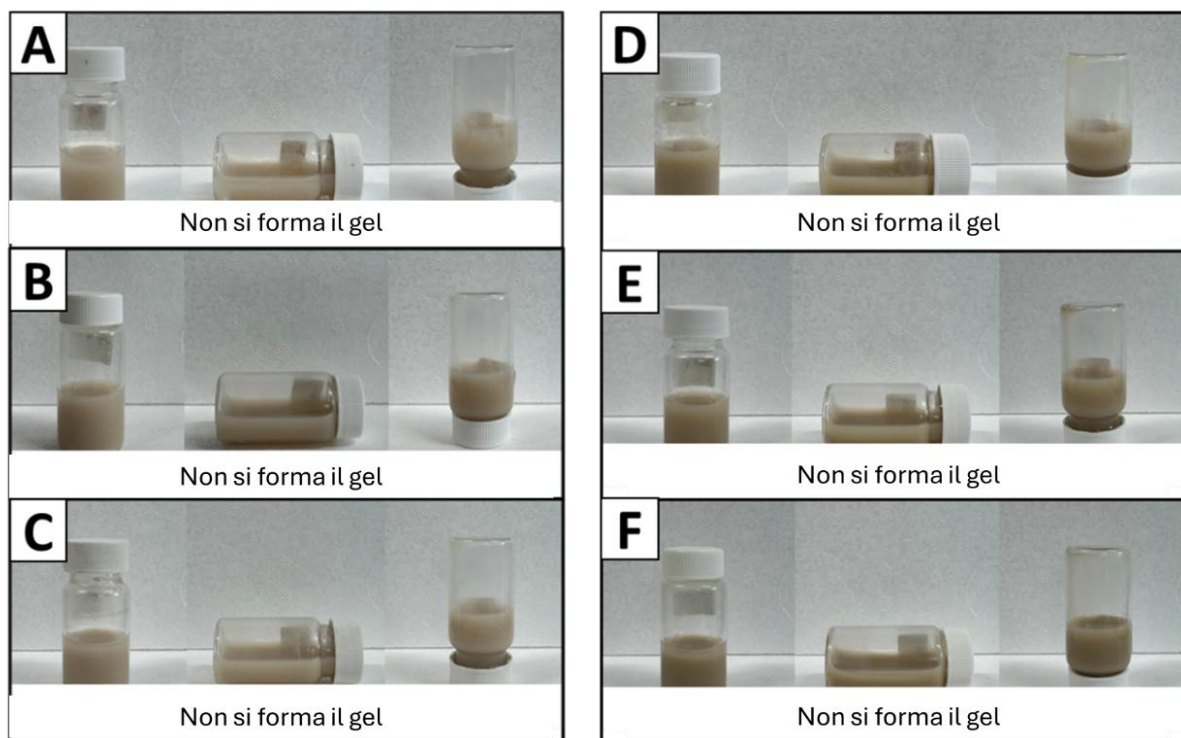


Figura 19. Prove di gelificazione di (A-C) gel di Sep al 3.0, 4.0 e 5.0 %p/p; (D-F) gel di Bent al 3.0, 4.0 e 5.0 %p/p.

La presenza di Oz in queste concentrazioni non ha influenzato in alcun modo le proprietà tissotropiche del gel. Inoltre, i tempi di rigelificazione potrebbero essere ulteriormente abbattuti aumentando la quantità di hectorite utilizzata fino ad ora, in modo da portare ad una rigelificazione immediata a seguito di rottura. Le stesse prove sono state effettuate con altre due argille, la Sep **Figure 19a-c**, e la Bent, **Figure 19d-f**, che non hanno però portato in nessun caso alla formazione di gel con la metodica utilizzata e messa a punto per i precedenti gel. In questo caso la concentrazione di argilla è stata aumentata fino al 5.0 %p/p, non ottenendo comunque nessun risultato. Visti i risultati ottenuti fino ad ora sono stati scelti i gel di Laponite® come modello per ulteriori studi.

- *Proprietà reologiche dei gel Lap/Oz*

Le proprietà reologiche dei gel di Lap e Lap/Oz sono state studiate a temperatura ambiente. In particolare, è stata valutata la variazione del modulo elastico (G') e del modulo viscoso (G'') in funzione della deformazione percentuale (γ). I gel scelti come modello per lo studio, ovvero quello di Lap e Lap/Oz al 0.5 e 5.0 %p/p, hanno tutti mostrato un comportamento viscoelastico, caratteristico dei gel tissotropici (**Figura 20**).

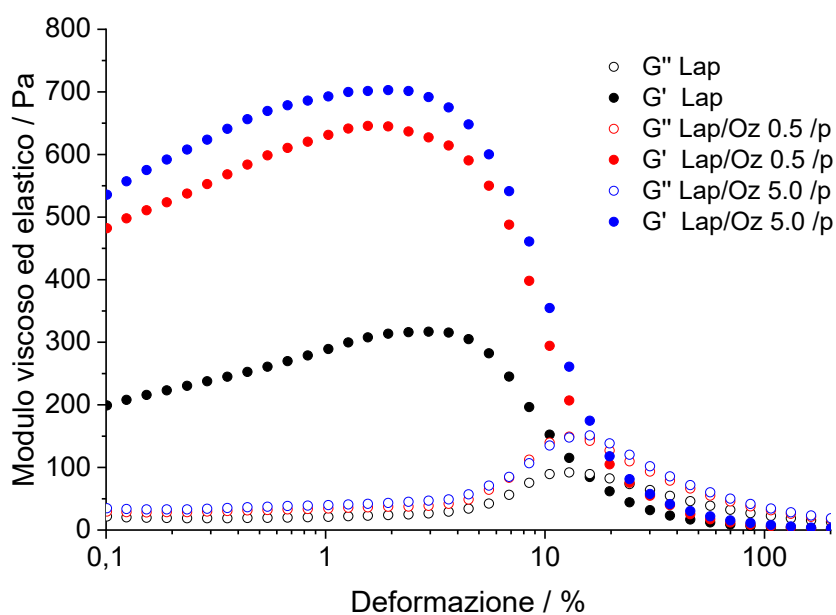


Figura 20. Misure reologiche di Lap, Lap/Oz 0.5 % p/p e Lap/Oz 5.0 % p/p

In particolare, a bassi valori di γ è stato osservato un comportamento di tipo solido ($G' > G''$), viceversa, a valori più elevati di γ l'andamento dei moduli ha mostrato un comportamento simile a quello dei liquidi ($G' < G''$). Un'ulteriore informazione, utile ad avere una misura della resistenza dei gel, può essere ricavata dai punti di incrocio di G' e G'' . Come è possibile osservare i due moduli si incrociano ad un valore γ di 16.0 % per quanto riguarda il gel di Lap, e ad un valore γ di 20.0 % per quanto riguarda il gel Lap/Oz, suggerendo una maggiore resistenza meccanica per i gel contenenti Oz. Ancora, anche se tutti i sistemi, con e senza Oz, si comportano come materiali gelatinosi, l'introduzione di una piccola quantità di Oz (0.5 % p/p) rafforza le proprietà reologiche del gel come è possibile osservare dai valori di G' più elevati. Questo valore aumenta in presenza di una più alta concentrazione di Oz all'interno del gel (5.0 % p/p), evidenziando come la presenza di questo migliori le proprietà meccaniche dei gel di Lap.

- Cinetica di rilascio dell'olio ozonizzato dal gel Lap/Oz

È stato inoltre studiata la cinetica di rilascio di Oz dal gel di Lap/Oz in due simulanti a due diversi pH, 5.5 e 7.0, al fine di mimare due diversi pH della pelle. Data la composizione del gel e tenuta in considerazione la natura lipidica di Oz, per effettuare il rilascio di questo in ambiente acquoso è stato messo a punto un nuovo metodo. La retta di taratura è stata costruita tramite l'utilizzo di gel Lap/Oz a diverse concentrazioni in Oz. Una quantità nota di mezzo di mezzo di rilascio è stata posta a contatto per un tempo pari a 72h, dopo il quale un volume noto di questo è stato letto all'UV-vis. Per il rilascio, sono stati usati diversi gel Lap/Oz alla stessa concentrazione di Oz (5.0 %p/p). Anche in questo caso, è stata posta una quantità nota di mezzo di rilascio e a tempi prestabiliti questo è stato prelevato dalle diverse *vials* e letto all'UV-vis. Il rilascio è stato seguito per 48h. I due rilasci a pH 5.5 e 7.0 sono stati condotti a 25 °C. In **Figura 21** sono riportati i due diversi profili cinetici di rilascio di Oz dal gel Lap/Oz. Come è possibile osservare Oz viene rilasciato dal gel Lap/Oz in modo lento e costante nell'arco delle 48 h in entrambi i mezzi di rilascio. A pH 5.5 (**Figura 21a**) i dati ottenuti dalla regressione non lineare seguono un modello cinetico del primo ordine, evidenziano un rilascio lento e costante nel tempo ($M_{\infty} = 46.2 \pm 1.2$; $k_1 = 0.090 \pm 0.006$; $R^2 = 0.9916$), che è possibile osservare anche a pH 7.0 (**Figura 21b**) utilizzando lo stesso modello matematico per l'analisi dei dati ($M_{\infty} = 61.4 \pm 3.3$; $k_1 = 0.05 \pm 0.007$; $R^2 = 0.9951$).

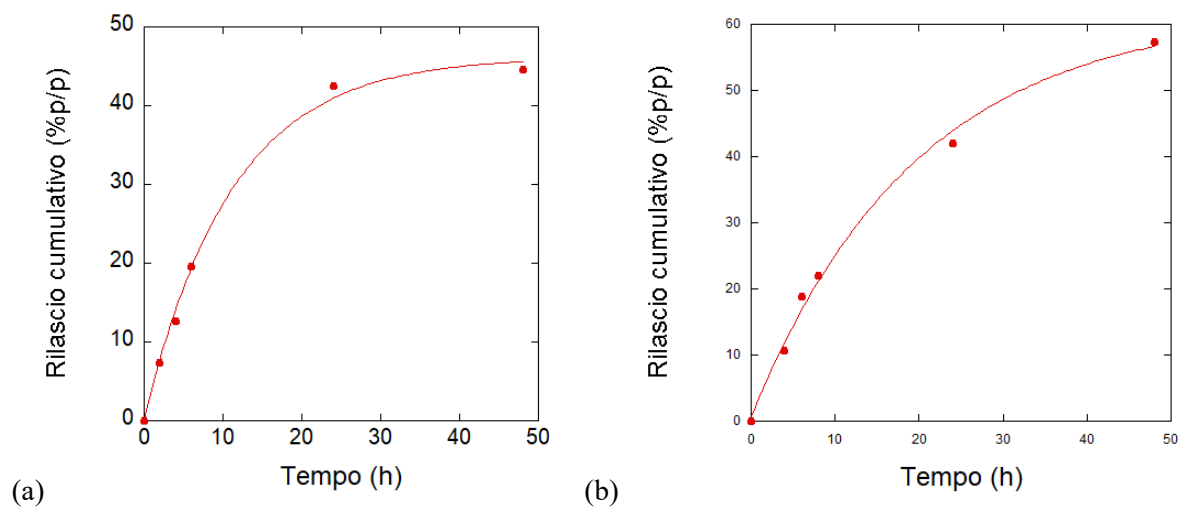


Figure 21. Rilascio cumulativo di Oz da gel Lap/Oz (a) a pH 5.5 e (b) pH 7.0.

Nel complesso, i risultati ottenuti mostrano che i gel a base di Laponite® rappresentano un sistema promettente per l'incapsulamento e il rilascio controllato di olio ozonizzato. L'introduzione dell'olio non compromette le caratteristiche tissotropiche del materiale, anzi ne migliora la consistenza e la resistenza.

1.5. Conclusioni

In questo capitolo, dedicato ai sistemi nanostrutturati come *carrier* per molecole di origine naturale, è stata approfondita la capacità delle argille minerali di caricare e rilasciare composti bioattivi naturali di diversa composizione chimica, mettendo in luce come la loro morfologia e composizione influenzino le proprietà di caricamento, stabilità e rilascio. L'halloysite si è dimostrata un nanomateriale particolarmente adatto per il caricamento dell'estratto di vinaccia, consentendo di preservarne l'attività antiossidante e di regolarne il rilascio in funzione del pH, aprendo la strada a futuri test *in vitro* e *in vivo*, attualmente limitati dalla sua scarsa solubilità. In un approccio complementare, la bentonite è stata impiegata per il caricamento di una singola molecola antiossidante, l'acido L-ascorbico, composto idrofilo e facilmente ossidabile ma dalle innumerevoli proprietà interessanti per applicazioni biomediche. Questa argilla si è mostrata in grado di caricare quantità significative di LAA mantenendone l'attività antiossidante. Inoltre, l'interazione tra la molecola e la Bent, confermata dalle analisi spettroscopiche e termogravimetriche, suggerisce un'interazione superficiale e un parziale confinamento negli strati interlamellari dell'argilla. L'estensione di questo studio agli oli ozonizzati, ha consentito di confrontare differenti tipologie di argille, evidenziando il ruolo decisivo della struttura dell'argilla sulle proprietà del nanomateriale finale. La bentonite ha mostrato la maggiore capacità di caricamento, mentre le argille fibrose come sepiolite e palygorskite hanno offerto valori intermedi dovuti alla presenza di canali e cavità superficiali. L'halloysite, pur presentando un contenuto inferiore di olio, possiede una stabilità maggiore in acqua, dimostrandosi il sistema più adatto per potenziali applicazioni in ambiente biologico. I risultati ottenuti hanno infine ispirato la messa a punto di matrici più complesse rappresentate dai gel tissotropici a base di diverse argille, tra cui la Laponite®. L'incorporazione dell'olio ozonizzato in questi sistemi non ha compromesso la stabilità del gel, ma ne ha invece migliorato le proprietà reologiche, in un sistema finale capace di rilasciare l'olio in modo lento e costante nel tempo. Nel complesso, i risultati evidenziano come le argille minerali rappresentino piattaforme complementari all'interno di una strategia comune per la veicolazione di molecole naturali, ciascuna con un ruolo specifico legato alla propria struttura, aprendo la strada a future applicazioni in campo biomedico.

1.6. Sezione sperimentale

1.6.1. Materiali e metodi

Tutti i reagenti sono stati acquistati presso la Merck Life Science S.r.l. (Milano, Italia) e utilizzati senza ulteriori purificazioni. La Bent è stata fornita dal Centro di Ricerca per l'Industria Minerario-Metallurgica (CIPIMM – Cuba). LAA ($C_6H_8O_6$) di grado farmaceutico secondo la farmacopea degli Stati Uniti, è stato utilizzato tal quale e acquistato dall'industria farmaceutica cubana. Tutte le altre argille sono state fornite dalla Tolsa Group Inc. (Madrid, Spagna), ed infine, l'olio ozonizzato è stato gentilmente fornito dall'azienda Erbagil s.r.l. (Benevento, Italia).

Il campione di argilla purificato (Bent) è stato analizzato mediante spettrometria a fluorescenza a raggi X a dispersione di lunghezza d'onda (**XRF**), utilizzando uno spettrometro modello Axios Max (PANalytical, Almelo, Paesi Bassi) su sfere di vetro fuse. Per ottenere spettri ad alta risoluzione, sono stati impiegati otto cristalli dispersivi: LiF200, LiF220, PE002, Ge111, PX1, PX4a, PX5 e PX7. La composizione in forma ossidata è stata calcolata utilizzando il metodo dei parametri fondamentali.

L'analisi termogravimetrica (**TGA/DTG**) è stata eseguita utilizzando un analizzatore termico (Perkin Elmer STA 6000, Waltham, MA, USA), in atmosfera di azoto, con una velocità di riscaldamento di 10 °C/min nell'intervallo di temperatura compreso tra 30 e 800 °C. La sensibilità della termobilancia era di ± 1 µg. In ogni prova è stato utilizzato un campione solido di circa 15 mg.

Gli spettri **FT-IR** di Bent e Bent/LAA sono stati registrati utilizzando uno spettrometro (Perkin Elmer Two, Waltham, Massachusetts, Stati Uniti) dotato di accessorio UATR (Universal Attenuated Total Reflection). Le misure sono state effettuate nell'intervallo spettrale compreso tra 4000 e 400 cm^{-1} . La forza applicata a ciascun campione solido è stata pari all'85% del valore massimo, al fine di garantire un buon contatto tra il campione e il cristallo. Gli spettri FT-IR (KBr) di tutti gli altri nanomateriali sono stati registrati con uno spettrometro Agilent Technologies Cary 630.

L'analisi **DLS**, del **potenziale- ζ** e dell'indice di polidispersione (**PDI**) di tutti i materiali è stata eseguita con uno strumento Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Worcestershire, UK), dotato di un laser a 532 nm e con angolo di scattering fisso di 173°.

Le analisi **UV-vis** sono state realizzate con uno spettrometro Beckmann DU 650.

Le analisi **TEM** sono state effettuate con un microscopio a trasmissione ad altissima risoluzione FEI Titan G2 60–300 (FEI, Losanna, Svizzera), accoppiato a un sistema di

microscopia elettronica analitica (AEM) dotato di un rivelatore per spettroscopia a dispersione di energia dei raggi X (XEDS). Gli spettri AEM sono stati acquisiti in modalità microscopia elettronica a scansione in trasmissione (STEM) utilizzando un rivelatore di tipo *high-angle annular dark field* (HAADF). Le mappe elementari sono state inoltre ottenute tramite raggi X.

La **reologia** dei gel è stata studiata con un viscosimetro a velocità controllata (Thermo Scientific HAAKE, RotoVisco 1, Karlsruhe, Germania), equipaggiato con un sistema piatto/piatto zigrinato PP20S da Ø20 mm. La temperatura è stata mantenuta costante a 25 °C (± 0.5 °C) tramite un termostato.

1.6.2. Parte sperimentale sezione 1.2.3

- Purificazione della Bent

La bentonite grezza è stata sottoposta a un processo di purificazione durante il quale 50 g di argilla sono stati dispersi in 1 L di acqua distillata, tenuta sotto agitazione a 800 rpm per 1 h. Successivamente la dispersione è stata lasciata riposare per 30 min e il primo surnatante trasparente, che rappresentava più della metà del volume iniziale di acqua, è stato sottratto per decantazione. Il secondo strato conteneva la dispersione di argilla in acqua. La procedura di purificazione è stata ripetuta fino a quando non sono state osservate impurità ferrose sulla superficie del magnete dell'agitatore. Infine, la dispersione è stata centrifugata e il solido ottenuto è stato essiccato in stufa a 100 °C per 24 h e conservato a temperatura ambiente.

- Sintesi del nanomateriale Bent/LAA

Il nanomateriale Bent/LAA è stato ottenuto disperdendo 100 mg di Bent in 10 mL di una soluzione acquosa di LAA (9 mg mL^{-1}), e lasciati ad agitare per 24 h a temperatura ambiente. Successivamente, la dispersione è stata centrifugata per 10 min a 1000 rpm. Per evitare la fotodegradazione del farmaco, la dispersione di Bent/LAA, è stata rivestita con fogli di alluminio e al termine del processo, e dopo la centrifugazione, è stata osservata una completa trasparenza del surnatante, confermando così l'integrità del farmaco, che sarebbe stata accompagnata da una variazione di colore. Per garantire la stabilità del farmaco il nanomateriale è stato essiccato a 80 °C per 1 h su piastre di vetro. La concentrazione di LAA è stata determinata tramite spettroscopia UV-vis, misurando l'assorbanza a 243 nm. Dalla legge di Lambert-Beer e utilizzando una curva di calibrazione, la percentuale di caricamento è stata calcolata tramite l'**Eq. 2**.

- ***Sintesi del nanomateriale HNTs/Vinaccia***

La sintesi del nanomateriale HNTs/Vinaccia è stata effettuata disperdendo 100 mg di HNTs in 10 mL di acqua. 10 mg di Vinaccia sono stati solubilizzati in 1 mL di etanolo, e la soluzione aggiunta alla dispersione di HNTs, sotto agitazione. Questa è stata lasciata ad agitare per 16 ore a temperatura ambiente in un palloncino coperto con carta d'alluminio al fine di prevenire eventuali fotodegradazioni. Trascorso questo tempo il materiale è stato filtrato sottovuoto e lavato varie volte con acqua, per poi essere seccato in un essiccatore sottovuoto a temperatura ambiente in presenza di P₂O₅. Anche in questo caso la concentrazione di Vinaccia è stata determinata tramite misure UV-*vis* utilizzando l'Eq. 2.

- ***Attività antiossidante di HNTs/Vinaccia e Bent/LAA***

L'attività antiossidante del nanomateriale Bent/LAA e il nanomateriale HNTs/Vinaccia sono stati dispersi in metanolo a diverse concentrazioni. Successivamente, 1 mL di soluzione di DPPH (1.5 x 10⁻⁴ M) in metanolo, è stato aggiunto al campione in esame. La dispersione è stata agitata vigorosamente e lasciata al buio e a temperatura ambiente per 40 min. La percentuale di inibizione è stata calcolata secondo la seguente equazione:

$$I\% = \left[\frac{Abs_0 - Abs_s}{Abs_0} \right] \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

dove Abs₀ rappresenta l'assorbanza della soluzione di DPPH senza campione e Abs_s l'assorbanza del campione analizzato. Tracciando la percentuale di inibizione in funzione della concentrazione si ottengono le relative curve; a partire dall'equazione di ciascuna curva viene determinato il valore di IC₅₀. Un valore di IC₅₀ più basso corrisponde a una maggiore attività antiossidante.

- ***Rilascio della Vinaccia dal nanomateriale HNTs/Vinaccia***

Il rilascio cinetico della Vinaccia dal nanomateriale è stato effettuato ponendo 10 mg di ciascun nanomateriale in 1 mL di mezzo di rilascio (pH 3.0 o 7.4) all'interno di una membrana da dialisi sigillata (Medicell International Ltd, MWCO 12–14000 Da, diametro 21.5 mm). La membrana è stata quindi immersa in un pallone a fondo tondo contenente 9 mL dello stesso mezzo di rilascio, mantenuto a 37 °C sotto agitazione costante. A intervalli di tempo prestabiliti, 1 mL del mezzo è stato prelevato e analizzato mediante misure UV-*vis*. Per mantenere il volume costante, ciascun mL prelevato è stato sostituito con 1 mL di mezzo di rilascio fresco. La quantità totale di Vinaccia rilasciata (F_t) è stata calcolata secondo la seguente equazione:

$$F_t = V_m C_t + \sum_{i=0}^{t-1} V_a C_i \quad (\text{Eq. 4})$$

dove V_m e C_t sono rispettivamente il volume e la concentrazione della molecola al tempo t , mentre V_a è il volume del campione prelevato e C_i è la concentrazione di PB4 al tempo i ($i < t$).

1.6.3. Parte sperimentale sezione 1.3.1.

- Sintesi dei nanomateriali argilla/Oz

La sintesi dei nanomateriali HNTs/Oz, Ht/Oz, Bent/Oz, Sep/Oz e Plg/Oz, è stata effettuata disperdendo 0.5 g di ciascuna argilla in 20 mL di acqua. Dopo 15 minuti di sonicazione, 1.6 g di olio ozonizzato sono stati aggiunti alla dispersione sotto vigorosa agitazione, ed eseguiti 3 cicli di vuoto. La dispersione è stata lasciata ad agitare al buio per 16 h a temperatura ambiente e successivamente centrifugata per 10 minuti a 4000 rpm. In seguito a centrifugazione si osservano tre fasi. La fase acquosa ed oleosa viene rimossa e il nanomateriale ripreso più volte con acqua, sonicato e centrifugato, fino alla scomparsa della fase oleosa. La polvere viene posta in stufa sottovuoto a 30 °C per una notte.

- Preparazione dei gel tissotropici a base di argille e Oz

Tutti i gel ottenuti, con le diverse argille, sono stati preparati tramite la stessa procedura. Le quantità dei componenti sono state calcolate ed utilizzate sottraendo al peso finale di gel desiderato, delle quantità definite di argilla (1, 2, 3, 4 o 5 %p/p) e di olio ozonizzato (0.5, 1.0, 2.5 e 5.0 %p/p). Le argille sono state quindi disperse in una quantità d'acqua definita e poste sotto agitazione per 10 min. Dopo questo tempo, è stata aggiunto l'olio ozonizzato e il sistema lasciato ad agitare a 1600 rpm per 2 h, al fine di ottenere un gel omogeneo. I gel formati, sono stati lasciati a riposare per 15 minuti prima di effettuare il test di inversione della *vial*, e conservati a 4 °C.

- Rilasci di Oz dal gel Lap/Oz a diversi pH

Il rilascio di Oz è stato effettuato utilizzando il gel di Lap/Oz contenente il 5 %p/p di olio ozonizzato. In un primo momento è stata preparata una retta di taratura sfruttando i gel stessi. Nello specifico sono stati preparati dei gel di Lap (3.0 %p/p) con quantità note di Oz (0.2 – 5.0 %p/p) e fatti riposare 5 giorni al buio a 4 °C. Successivamente sono stati posti 5 mL di mezzo di rilascio (pH 5.5 e 7.0) sui gel, da ognuno di essi prelevati 0.5 mL dopo 72 h, e letti all'UV-*vis* a 266 nm. Dopo aver ottenuto le due rette di taratura sono stati preparati tanti gel Lap/Oz al 5 %p/p di olio ozonizzato, quanti punti del rilascio, e

ripetuta la procedura usata per la retta di taratura nei due mezzi a diverso pH. In questo caso 0.5 mL del mezzo sono stati letti all'UV-*vis* dopo 48 h. Tramite la legge di Lambert-Beer sono state calcolate le concentrazioni di olio rilasciato.

Appendice A

Tabella A1. Metaboliti identificati nel GPE mediante HPLC/MS/ESI/Q-TOF

	Compound	Rt (min)	ESI ⁺ [M] ⁺ or [M + H] ⁺ (m/z) (<i>Exp.</i>)	ESI ⁺ [M] ⁺ or [M + H] ⁺ (m/z) (<i>Teor.</i>)	Molecular formula	Metabolites classes
1	Tartaric acid	1.18	151.0217	151.0237	C ₄ H ₆ O ₆	Carboxylic acids
2	Valinol	1.33	104.1066	104.1070	C ₅ H ₁₃ NO	Peptides
3	Proltne	1.52	116.0707	116.0706	C ₅ H ₉ NO ₂	Peptides
4	Valtne	1.65	118.0823	118.0862	C ₅ H ₁₁ NO ₂	Peptides
5	Leuctne	1.78	132.1021	132.1019	C ₆ H ₁₃ NO ₂	Peptides
6	Phenylalanine	1.90	166.0844	166.0862	C ₉ H ₁₁ NO ₂	Peptides
7	dihomocitric acid	2.22	221.0652	221.0656	C ₈ H ₁₂ O ₇	Carboxylic acids
8	Trtpeptide	2.73	322.1787	322.1761	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ O ₄	Peptides
9	Amino-octanoic acid	2.99	160.1327	160.1332	C ₈ H ₁₇ NO ₂	Carboxylic acids
10	5-Phenylvaleric acid	3.16	179.1162	179.1067	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	Carboxylic acids
11	Dihydroresveratrol	3.71	231.1060	231.1016	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	Stilbenes
12	Malvidin glucoside	4.44	493.1331	493.1341	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	Anthocyanins
13	3,5-Dicaffeoylquinic acid	9.60	517.1327	517.1340	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Cinnamic acids
14	Peonidin acetylglucoside	12.06	505.1336	505.1341	C ₂₄ H ₂₅ O ₁₂	Anthocyanins
15	Malvidin acetylglucoside	12.18	535.1441	535.1446	C ₂₅ H ₂₇ O ₁₃	Anthocyanins
16	Cyanidin coumaroyl glucoside	13.23	595.1432	595.1446	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₃	Anthocyanins
17	Petunidin coumaroylglucoside	13.34	625.1543	625.1552	C ₃₁ H ₂₉ O ₁₄	Anthocyanins
18	3,5-Di-O-caffeoyl-4-O-coumaroylquinic acid	13.56	663.1699	663.1708	C ₃₄ H ₃₀ O ₁₄	Cinnamic acids
19	Peonidin coumaroylglucoside	13.96	609.1558	609.1603	C ₃₁ H ₂₉ O ₁₃	Anthocyanins
20	Malvidin coumaroylglucoside	14.02	639.1675	639.1708	C ₃₂ H ₃₁ O ₁₄	Anthocyanins
21	Tetradecadenoyl-homoserine lactone	15.85	308.2179	308.2220	C ₁₈ H ₂₉ NO ₃	Lipids
22	Dehydrophytosphingosine	22.63	316.2824	316.2846	C ₁₈ H ₃₇ NO ₃	Lipids
23	Phytosphingosine	24.84	318.2972	318.3003	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	Lipids
24	Sphinganine	26.20	302.3050	302.3053	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	Lipids
25	Hydroxyicosatrienoic acid Isomer I	32.24	323.2571	323.2581	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	Lipids
26	Hydroxyicosatrienoic acid Isomer II	32.56	323.2575	323.2581	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	Lipids
27	Hydroxyicosatrienoic acid Isomer III	33.04	323.2570	323.2581	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	Lipids

Tabella A2. Metaboliti identificati nel GPE mediante HPLC/MS/ESI/Q-TOF

	Compound	Rt (min)	ESI ⁺ [M – H] [–] (m/z) (<i>Exp.</i>)	ESI ⁺ [M – H] [–] (m/z) (<i>Teor.</i>)	Molecular formula	Metabolites classes
1	Gallie acid	2.02	169.0135	169.0143	C ₇ H ₆ O ₅	Phenolic acid
2	Aconitic acid	2.12	173.0110	173.0092	C ₆ H ₆ O ₆	Carboxylic acids
3	Isocitric acid	2.16	191.0215	191.0197	C ₆ H ₈ O ₇	Carboxylic acids
4	Succinic acid	2.17	117.0202	117.0193	C ₄ H ₆ O ₄	Carboxylic acids
5	Monoethylsuccinate	2.30	145.0517	145.0506	C ₈ H ₁₀ O ₄	Carboxylic acids
6	Malic acid	2.42	133.0147	133.0143	C ₄ H ₆ O ₅	Carboxylic acids
7	Citric acid	2.55	191.0218	191.0197	C ₆ H ₈ O ₇	Carboxylic acids
8	Caffaric acid	25.42	311.0432	311.0409	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	Cinnamic acids
9	Quercetin	27.53	301.0382	301.0384	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Flavonoid
10	Ursolic acid	28.21	455.3561	455.3531	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	Triterpentic acid
11	PI (18:4)	29.42	591.2610	591.2576	C ₂₇ H ₄₅ O ₁₂ P	Phospholipids
12	Stearic acid	30.99	283.2665	283.2643	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Fatty acid

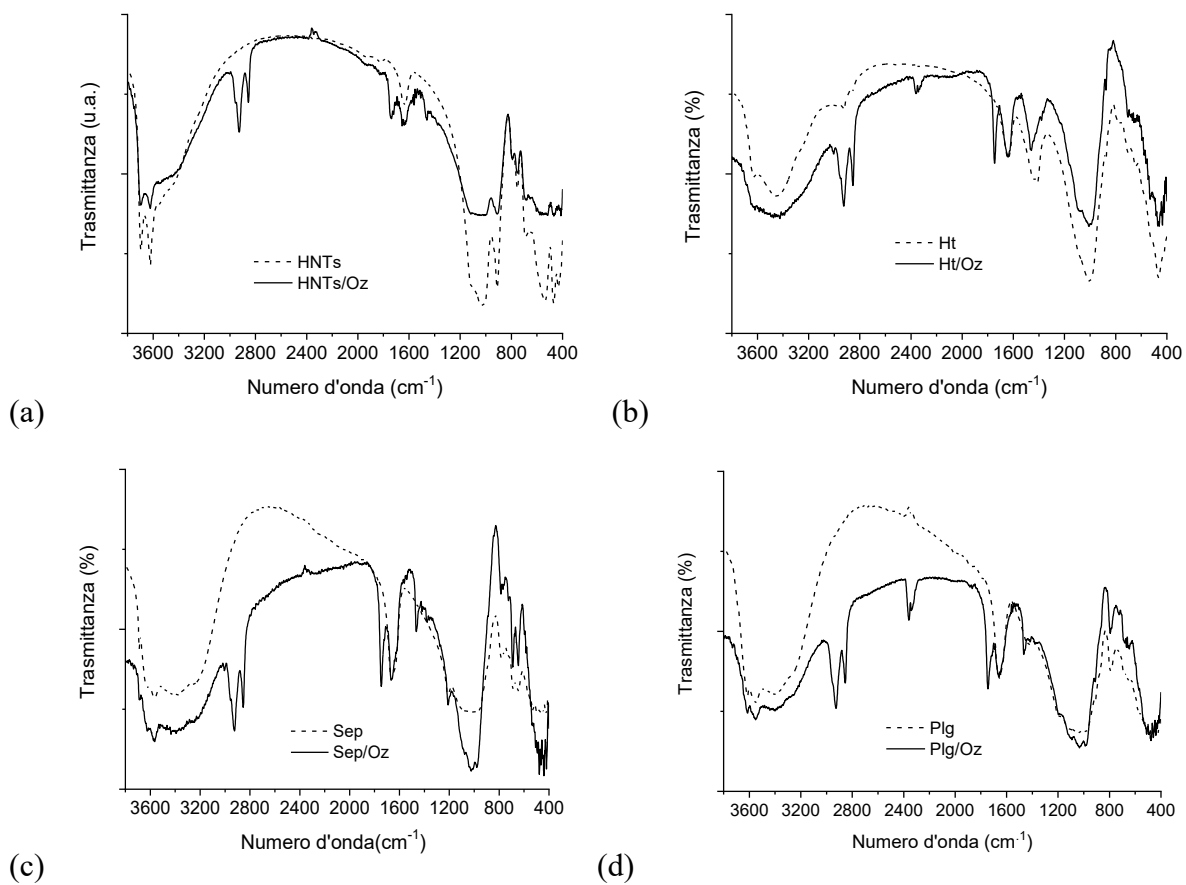


Figura A1. FT-IR di (a) HNTs/Oz, (b) Ht/Oz, (c) Sep/Oz e (d) Plg/Oz con spetti delle corrispondenti argille non modificate.

Bibliografia:

1. Rahman, H. S., *et al.*, *Int J Nanomedicine* (2020) **15**, 2439
2. George, P., *Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants - An overview*. Issue : 6, pp. 40
3. Namdeo, A. G., Chapter 20 - Cultivation of Medicinal and Aromatic Plants. In *Natural Products and Drug Discovery*, Mandal, S. C., *et al.*, (eds.) Elsevier(2018), pp 525
4. Hanif, M. A., *et al.*, *Technology* (2021) **5** (1), 1
5. Singh, N., *et al.*, *Phytotherapy Research* (2021) **35** (9), 5007
6. Mahleyuddin, N. N., *et al.*, *Molecules* (2021) **27** (1), 209
7. Christiany, C., *et al.*, *Eureka Herba Indonesia* (2021) **2** (1), 49
8. Dias, M. C., *et al.*, *Molecules* (2021) **26** (17), 5377
9. Rodriguez-Amaya, D. B., *Bioactive molecules in food*, Springer(2019), pp 867
10. Enaru, B., *et al.*, *Antioxidants* (2021) **10** (12), 1967
11. Yihan, W., *et al.*, *Frontiers in Pharmacology* (2025) **Volume 16 - 2025**
12. Żukowska, G., and Durczyńska, Z., *Journal of Ecological Engineering* (2024) **25** (2), 333
13. Mugao, L., *Int. J. Multidiscip. Res. Growth Eval* (2024) **5** (4), 169
14. Khwaza, V., and Aderibigbe, B. A., *Antibiotics* (2025) **14** (1), 68
15. Sidiropoulou, E., *et al.*, *Life* (2022) **12** (11), 1783
16. Yuseri, M. N., *et al.*, *Tropical Journal of Natural Product Research* (2025) **9** (7)
17. Walasek-Janusz, M., *et al.*, *Molecules* (2024) **29** (2), 435
18. de Sousa, D. P., *et al.*, *Biomolecules* (2023) **13** (7), 1144
19. Yamine, J., *et al.*, *Polymer Bulletin* (2024) **81** (5), 3837
20. Yendluri, R., *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics* (2017) **521** (1), 267
21. Aguzzi, C., *et al.*, *Applied Clay Science* (2007) **36** (1), 22
22. Kausar, A., *Polymer-Plastics Technology and Engineering* (2018) **57** (6), 548
23. Gorrasi, G., *Carbohydrate Polymers* (2015) **127**, 47
24. Massaro, M., *et al.*, *Antibiotics (Basel)* (2022) **11** (12)
25. Hammoudi, N., *et al.*, *Materials Technology* (2020) **35** (7), 383
26. Agougui, C., *et al.*, *Scientific Reports* (2022) **12** (1), 19814
27. Kaur, M., *et al.*, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (2025) **104**, 106447
28. Giuseppe, L., *et al.*, *Therapeutic Delivery* (2017) **8** (8), 633
29. Jiang, Z., *et al.*, *Small* (2024) **20** (2), 2306169
30. Feng, Y., *et al.*, *ACS Nano* (2024) **18** (31), 20001
31. Lvov, Y., *et al.*, *Advances in Colloid and Interface Science* (2014) **207**, 189
32. Yendluri, R., *et al.*, *Journal of Pharmaceutical Sciences* (2017) **106** (10), 3131
33. Veerabadrán, N. G., *et al.*, *Nano* (2007) **02** (02), 115
34. Tully, J., *et al.*, *Biomacromolecules* (2016) **17** (2), 615
35. Liu, M., *et al.*, *Progress in Polymer Science* (2014) **39** (8), 1498
36. Cavallaro, G., *et al.*, *The Journal of Physical Chemistry C* (2012) **116** (41), 21932
37. Owoseni, O., *et al.*, *Langmuir* (2014) **30** (45), 13533
38. Cavallaro, G., *et al.*, *Langmuir* (2015) **31** (27), 7472
39. Boraei, S. B. A., *et al.*, *Applied Clay Science* (2024) **253**, 107346
40. Lvov, Y. M., *et al.*, *ACS Nano* (2008) **2** (5), 814
41. Massaro, M., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* (2018) **6** (21), 3415
42. Abdullayev, E., and Lvov, Y., *Journal of Materials Chemistry* (2010) **20** (32), 6681
43. Abdullayev, E., *et al.*, *ACS Applied Materials & Interfaces* (2009) **1** (7), 1437
44. Lvov, Y., and Abdullayev, E., *Progress in Polymer Science* (2013) **38** (10), 1690
45. Kurczewska, J., *et al.*, *Applied Clay Science* (2018) **153**, 134
46. Ringot, D., *et al.*, *Bioresource Technology* (2007) **98** (9), 1812
47. Belkassa, K., *et al.*, *Journal of Hazardous Materials* (2021) **415**, 125656
48. Turk, T., *Mine Water and the Environment* (2017) **36** (2), 255
49. Ramanayaka, S., *et al.*, *Journal of Hazardous Materials* (2020) **384**, 121301
50. Bediako, E. G., *et al.*, *Heliyon* (2018) **4** (7), e00689
51. Husain, T., *et al.*, *Int J Nanomedicine* (2021) **16**, 1725
52. Gibaldi, M., and Feldman, S., *J Pharm Sci* (1967) **56** (10), 1238
53. Higuchi, T., *J Pharm Sci* (1963) **52**, 1145
54. Badrloo, M. A., *et al.*, *Industrial Crops and Products* (2024) **218**, 118939
55. Peppas, N. A., *Pharm Acta Helv* (1985) **60** (4), 110
56. Qiu, H., *et al.*, *Journal of Zhejiang University-SCIENCE A* (2009) **10** (5), 716

57. Massaro, M., *et al.*, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* (2017) **5** (4), 3346
58. Fernandez-Lopez, J., *et al.*, *Meat science* (2005) **69** (3), 371
59. Wang, J., and Jiang, Y.-F., *World journal of experimental medicine* (2012) **2** (3), 45
60. Micucci, M., *et al.*, *World J Gastrointest Oncol* (2024) **16** (9), 3798
61. Prata, C., *et al.*, *Nutrients* (2025) **17** (3), 583
62. Muhlack, R. A., *et al.*, *Waste Management* (2018) **72**, 99
63. Micucci, M., *et al.*, *Food Science & Nutrition* (2025) **13** (6), e70350
64. Ravetti, S., *et al.*, *Cosmetics* (2019) **6** (4), 58
65. Baschieri, A., *et al.*, *Antioxidants* (2019) **8** (2), 30
66. Hernández, D., *et al.*, *Pharmaceutics*, (2023), Vol. 15
67. Caritá, A. C., *et al.*, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (2020) **24**, 102117
68. Massaro, M., *et al.*, *Molecules* (2020) **25** (20), 4863
69. Massaro, M., *et al.*, *Applied Clay Science* (2022) **230**, 106719
70. Shevtsova, T., *et al.*, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* (2022) **641**, 128525
71. Duce, C., *et al.*, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* (2015) **121** (3), 1011
72. Gulcin, İ., and Alwasel, S. H., *Processes* (2023) **11** (8), 2248
73. Njus, D., *et al.*, *Free Radical Biology and Medicine* (2020) **159**, 37
74. Zafar, S., *et al.*, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (2024) **60**, 103314
75. Chen, H., *et al.*, *Chinese Journal of Natural Medicines* (2024) **22** (12), 1117
76. Berraaouan, D., *et al.*, *Polymers* (2023) **15** (4), 823
77. Zheng, H., *et al.*, *Food Packaging and Shelf Life* (2022) **34**, 100972
78. Chaudhary, N., *et al.*, *Antibiotics (Basel)* (2022) **11** (12)
79. Zhou, M., *et al.*, *Polymers (Basel)* (2025) **17** (9)
80. Chen, H., *et al.*, *Chin J Nat Med* (2024) **22** (12), 1117
81. Berraaouan, D., *et al.*, *Bioresources and Bioprocessing* (2025) **12** (1), 56
82. Oliveira, L. H., *et al.*, *Applied Clay Science* (2023) **245**, 107158
83. Ferreira, C. M., and da Silva, G. J., *Applied Clay Science* (2023) **238**, 106936
84. Ugazio, E., *et al.*, *Molecules*, (2020), Vol. 25
85. Kuczkowski, R. L., *Chemical Society Reviews* (1992) **21** (1), 79
86. Valacchi, G., *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics* (2013) **458** (1), 65
87. De Almeida, N. R., *et al.*, *Vegetable Oil: Properties, Uses and Benefits* (2016), 129
88. Harada, T., *Bulletin of the Chemical Society of Japan* (1934) **9** (4), 192
89. Zeng, J., and Lu, J., *International immunopharmacology* (2018) **56**, 235
90. Park, J. H., *et al.*, *J Pharm Investig* (2016) **46** (4), 363
91. Serratos, J. M., *Developments in Sedimentology*, Mortland, M. M., and Farmer, V. C., (eds.) Elsevier(1979), Vol. 27, pp 99
92. Ravindra Reddy, T., *et al.*, *J. Lasers Opt. Photonics* (2017) **4** (3)
93. Wang, R., *et al.*, *Sensors* (2009) **9**, 5655
94. Ugazio, E., *et al.*, *Molecules* (2020) **25** (2)
95. Georgiev, V., *et al.*, *Bulg. Chem. Commun* (2013) **45**, 203
96. Madejová, J., *Vibrational Spectroscopy* (2003) **31** (1), 1

Capitolo 2

Sistemi nanostrutturati come carrier e/o delivery di molecole di origine sintetica



Capitolo 2

Sistemi nanostrutturati come carrier e/o delivery di molecole di origine sintetica

2.1. Drug Delivery System: definizione, progressi e sfide future

I farmaci di sintesi hanno rivoluzionato la medicina moderna consentendo il trattamento efficace di numerose patologie. Tuttavia, le formulazioni convenzionali presentano limiti importanti: una volta somministrati, i farmaci si distribuiscono nell'organismo senza un controllo preciso e, a causa della loro bassa solubilità, richiedono spesso dosaggi elevati, con conseguente riduzione dell'efficacia terapeutica e aumento degli effetti collaterali.¹

Per superare questi ostacoli sono stati sviluppati i *Drug Delivery Systems* (DDS), ovvero sistemi capaci di immagazzinare e veicolare i farmaci verso specifici *terget*,² favorendo il raggiungimento del sito bersaglio e limitandone l'accumulo nei tessuti sani.³ Un aspetto cruciale è la possibilità di un rilascio controllato, che permette di modulare la velocità e la durata della somministrazione del principio attivo.⁴

In questo scenario, l'impiego dei nanomateriali ha segnato una vera rivoluzione: essi non solo permettono di migliorare la biodisponibilità dei farmaci, agendo come *carrier*, ma possono offrire anche un *targeting* mirato e un totale controllo del rilascio, aprendo la strada a soluzioni terapeutiche sempre più efficaci e personalizzate.^{4,5}

2.2. Un'alternativa ai tradizionali DDS: le argille minerali

Negli ultimi anni sono stati utilizzati diversi tipi di sistemi nanostrutturati come piattaforme per il caricamento e rilascio di farmaci, DNA e proteine (**Figura 1**).^{6,7} Tra i primi nanosistemi utilizzati e ampiamente studiati si annoverano: i liposomi, che hanno raggiunto applicazioni cliniche grazie alla loro capacità di incapsulare sia farmaci idrofili che idrofobici;⁸ le nanoparticelle polimeriche come quelle a base di PLGA o chitosano, utilizzate per il rilascio controllato di un farmaco da un sistema al tempo stesso biodegradabile;^{9,10} nanomateriali porosi, in particolare le *mesoporous silica nanoparticles* (MSNs), che offrono un'elevata area superficiale e porosità per l'incapsulamento;¹⁰ e tutte le strutture bidimensionali, come l'ossido di grafene, che combina proprietà elettroniche e superficiali arrivando a possedere una notevole capacità di interazione con biomolecole e tessuti.^{11,12}

Oltre ai nanomateriali in senso stretto, stanno emergendo anche sistemi nanostrutturati basati su idrogel,¹³ capaci di incorporare farmaci e biomolecole, rilasciando questi poi in base a degli

stimoli, come pH e temperatura.¹⁴ Oggi gli idrogel sono ampiamente studiati per il trattamento di tumori,¹⁵ in particolare quelli della pelle,¹⁴ infezioni, guarigione delle ferite e trovano anche applicazione nell'ingegneria tissutale.^{16,17} Questa grande versatilità è resa possibile grazie alle proprietà chimico-fisiche che questi possiedono e alla possibilità di essere utilizzati direttamente per il caricamento di farmaci o come sistemi di somministrazione in combinazione con altri nanomateriali dispersi al loro interno.¹⁸⁻²⁰

Un ultimo approccio, si basa sull'utilizzo di complessi supramolecolari, in grado di ospitare e rilasciare molecole bioattive grazie a interazioni non covalenti.²¹ Le ciclodestrine, ad esempio, formano complessi con farmaci idrofobici come la doxorubicina,²² il paclitaxel o la curcumina,^{23,24} migliorandone la solubilità in acqua e la biodisponibilità.²⁵ I cucurbituril, sono stati invece utilizzati per veicolare molecole antitumorali, antivirali e antiinfiammatorie, aumentando la stabilità del principio attivo e riducendone la tossicità.^{26,27} Allo stesso modo i calixareni e i pillareni sono impiegati come *scaffold* per complessi *host-guest* con piccoli farmaci o peptidi, con possibilità di rilascio controllato.^{28,29}

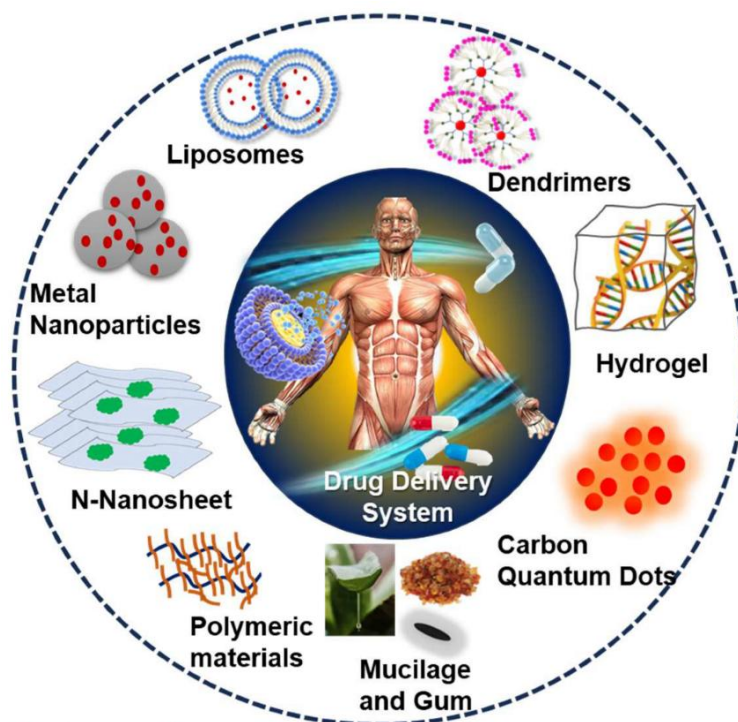


Figura 1. Rappresentazione delle diverse forme e strutture di nanomateriali usati come sistemi di *drug delivery* (Veerapandian *et al.*, 2023).³⁰

In questo contesto, le argille minerali si collocano come materiali estremamente promettenti, in grado di integrare molte delle strategie sopra descritte.³¹ Grazie alla loro natura, alla morfologia nanostrutturata e alla possibilità di essere modificate sia in maniera covalente sia mediante interazioni supramolecolari, come precedentemente descritto, esse possono essere adattate a differenti applicazioni che riguardano il *drug carrier* e/o *delivery*.³² Le argille, infatti, possono

comportarsi come *nanocarrier* inorganici,³³ possono essere disperse o inglobate all'interno di idrogel,³⁴ oppure possono essere funzionalizzate covalentemente con macrocicli creando sistemi multicavità da usare come sistemi per il trasporto e rilascio di farmaci, peptidi e biomolecole.³⁵⁻³⁷ Inoltre, le possibili modifiche, viste nell'introduzione, permettono facilmente di trasformare, in base al *target*, un sistema carrier in un sistema di *delivery*. Questa versatilità rende le argille non soltanto alternative competitive ai sistemi nanostrutturati più conosciuti, ma vere e proprie piattaforme trasversali, che possono essere utilizzate per la cura di diverse patologie.³⁸ Nei paragrafi seguenti verranno trattati i diversi usi delle argille, in particolare dell'*halloysite*, nel trattamento del cancro e per il trattamento di patologie neuronali.

2.3. *L'halloysite come carrier e DDS per la cura di patologie neuronali*

I disturbi cerebrali, come epilessia, schizofrenia, depressione, demenza e altri disturbi neurologici, mentali e da abuso di sostanze, rappresentano circa il 13% della prevalenza globale delle malattie, superando sia le patologie cardiovascolari che il cancro.³⁹ Il trattamento efficace di queste rappresenta una delle sfide irrisolte della ricerca, date le difficoltà legate alla necessità di attraversare la barriera ematoencefalica (BBB).⁴⁰ Oltre a questo aspetto, anche quando un farmaco riesce a penetrare la BBB, il suo accumulo nelle regioni cerebrali patologiche resta basso, motivo per cui è necessario utilizzare sistemi di rilascio efficaci.⁴¹

La tossicità degli HNTs per le cellule neuronali è stata testata in diversi studi. Gli HNTs non hanno mostrato effetti citotossici dopo 24 ore di esposizione in colture di cellule di glioma C6 a concentrazioni di 500 µg/mL.⁴² Nessuna citotossicità è stata riscontrata anche in colture primarie di cellule granulari del cervelletto ottenute da ratti *Sprague Dawley* di un giorno di vita,⁴³ e studi *in vitro* hanno dimostrato che gli HNTs possono essere assorbiti o aderire alla superficie delle cellule microgliali cerebrali, le cellule fagocitiche del cervello.⁴⁴

Sebbene i risultati sulla biocompatibilità degli HNTs con i tessuti neuronali siano incoraggianti, la maggior parte degli approcci attuali per il loro utilizzo come *carrier* di farmaci nel trattamento delle malattie cerebrali prevede la somministrazione orale. La capacità di questi *carrier* di penetrare le cellule endoteliali microvascolari cerebrali, elementi chiave della barriera ematoencefalica, è stata dimostrata da Saleh *et al.*⁴⁵ Un rilascio prolungato di rodamina isotiocianato, glutammato (neurotrasmettitore) e ionomicina (ionoforo Ca^{2+} utilizzato anche nel trattamento del cancro), ad esempio, è stato osservato in cellule endoteliali cerebrali primarie ottenute dalla corteccia cerebrale del ratto. Gli HNTs caricati con rodamina B, in seguito a internalizzazione cellulare, si sono concentrate intorno al nucleo, garantendo un maggiore assorbimento intracellulare rispetto al colorante puro, in un intervallo di 0.5–24 ore.⁴⁵

Recentemente è stata esplorata la somministrazione intranasale di sistemi a base di HNTs, come altra via per aumentare l'efficienza del *drug delivery* al sistema nervoso centrale, poiché in questo modo si riesce a bypassare la BBB.⁴⁶ Inoltre, i farmaci somministrati in questo modo evitano sia il metabolismo gastrointestinale ed epatico, sia la diluizione dovuta ai contenuti intestinali. In particolare, sono stati proposti gli HNTs come *carrier* per la somministrazione intranasale di zaleplon, un farmaco pirazolopirimidinico utilizzato per il trattamento dell'insonnia e che presenta una scarsa solubilità in acqua.⁴⁷ Il farmaco è stato caricato sui nanotubi, e la sua dissoluzione è risultata significativamente più lenta, rispetto al farmaco puro. Nei conigli, la biodisponibilità relativa dello zaleplon intranasale trasportato da HNTs è aumentata di 2.4 volte rispetto alle compresse orali di farmaco commerciale.⁴⁸

Un esempio significativo è rappresentato dal lavoro condotto da Lvov *et al.*, che hanno dimostrato come i nanotubi di halloysite caricati con diazepam o xilazina, farmaci dai noti e marcati effetti sul sistema nervoso centrale, siano in grado di permeare il cervello attraverso la somministrazione intranasale in modelli murini (**Figura 2a-b**).

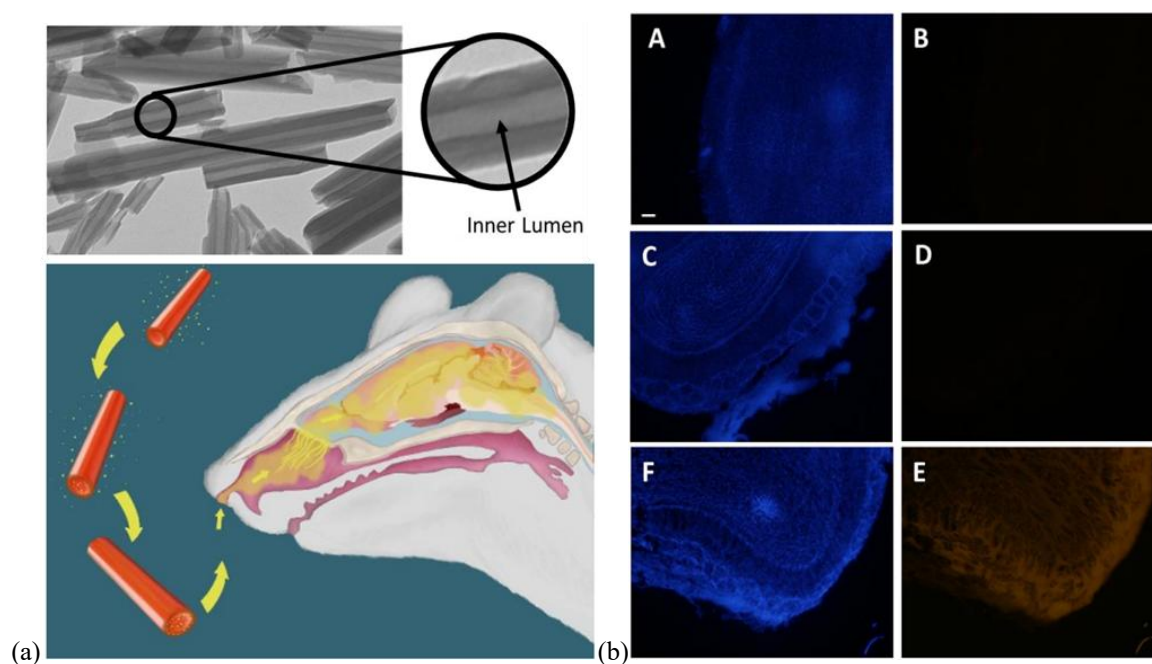


Figura 2. (a) Immagine TEM che mostra il lume interno dell'halloysite (10–20 nm) utilizzato per il caricamento dei farmaci e schema illustrativo delle vie di somministrazione intranasale dei composti al cervello; (b) Immagini rappresentative ottenute quattro ore dopo il trattamento. I pannelli in ciascuna riga si riferiscono allo stesso tessuto. La prima colonna mostra i nuclei colorati con DAPI, mentre la seconda colonna riporta le immagini acquisite con il filtro per il colorante RITC. I pannelli A e B rappresentano i topi trattati con HNTs non caricati; i pannelli C e D quelli trattati esclusivamente con RITC; i pannelli E e F i topi trattati con HNTs caricati con RITC (Lvov *et al.*, 2023).⁴⁹

In particolare, monitorando gli effetti farmacologici tramite test-vestibolo-motori e analisi comportamentali, è stato osservato che i topi trattati con il nanomateriale a base di HNTs presentavano enormi deficit rispetto ai controlli trattati con il farmaco libero o gli HNTs non

modificati. Questo approccio ha messo in evidenza la potenzialità degli HNTs come *carrier* non invasivi per la veicolazione di farmaci al sistema nervoso centrale, sfruttando la via olfattiva per bypassare la barriera ematoencefalica.⁵⁰

2.3.1. Halloysite e PNA: nuove frontiere per la cura di patologie neuronali

Negli ultimi anni, gli acidi peptido-nucleici (PNA), hanno attirato crescente attenzione per il loro potenziale nella prevenzione e nel trattamento delle malattie neurologiche, tra cui la malattia di Alzheimer, il Parkinson, la sclerosi multipla, l'ictus, le lesioni del midollo spinale e i traumi cranici.⁵¹ I PNA sono analoghi sintetici degli acidi nucleici in cui le unità di N-(2-amminoetil)glicina sostituiscono lo scheletro zucchero-fosfato,^{52,53} acquisendo diversi vantaggi rispetto al convenzionale RNA e DNA, tra cui una maggiore stabilità strutturale nei confronti della degradazione enzimatica.⁵⁴

Numerosi PNA e loro derivati hanno dimostrato proprietà neuroprotettive, migliorando le funzioni cognitive, riducendo la neuroinfiammazione e preservando l'integrità della BBB.⁵⁵ In particolare, è stato recentemente evidenziato da Hoyer-Kimura *et al.* che un PNA specifico (PNA5) supporta processi cruciali quali la migrazione neuronale, la guida degli assoni e la sinaptogenesi, fondamentali per il mantenimento delle corrette funzioni cerebrali. Ulteriori studi sono in corso per indagarne l'impiego anche in disturbi quali il dolore infiammatorio associato a malattie neurodegenerative e il deterioramento cognitivo vascolare.⁵⁶

I PNA si distinguono per la relativa semplicità di sintesi, che avviene attraverso metodiche consolidate di sintesi peptidica in fase solida (**Figura 3**) e permette di ottenere sequenze altamente specifiche per determinati *target*,^{57,58} nonostante ciò, il loro impiego rimane limitato da criticità intrinseche, in particolare la scarsa solubilità in acqua, che ne riduce l'efficacia applicativa in contesti biologici complessi.⁵⁹

Per superare questi limiti, negli ultimi anni il gruppo di Riela *et al.* ha studiato sistematicamente lo sviluppo di sistemi a base di halloysite per il *drug carrier* e *delivery* di PNA.⁶⁰ Un primo lavoro ha riguardato l'interazione tra HNTs e PNA utilizzando tetrameri con cariche diverse (positiva, neutra e negativa) scelti come modelli. Lo studio ha dimostrato come la carica influenzi il posizionamento dei PNA sulle superfici interna ed esterna dei nanotubi e ne determini il profilo di rilascio a pH fisiologico, fornendo basi razionali per la progettazione di *nanocarrier* supramolecolari personalizzati e più efficaci per potenziali applicazioni tumorali.⁶⁰

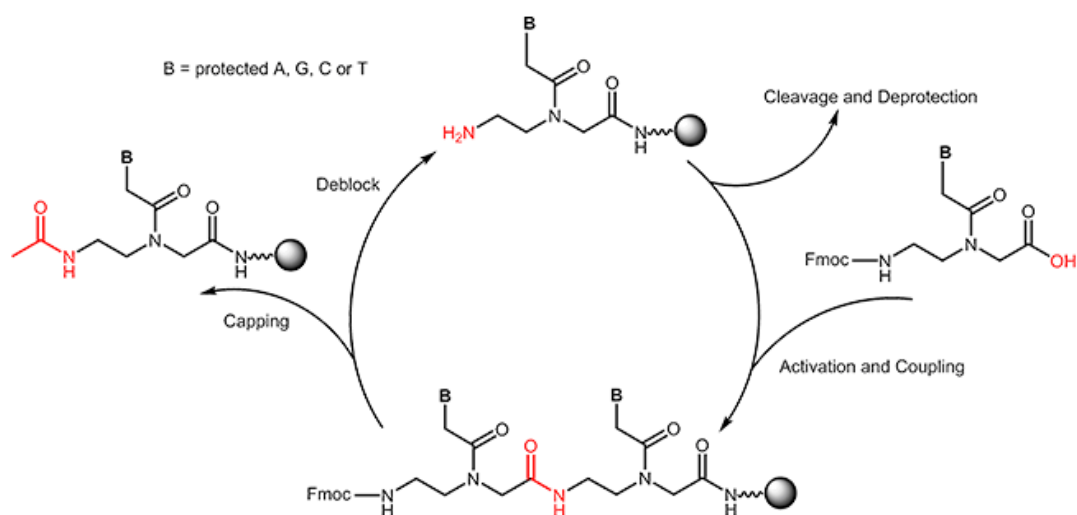


Figura 3. Rappresentazione schematica della sintesi in fase solida di PNA.

Nel 2024, lo stesso gruppo, sempre tramite interazioni supramolecolari, ha utilizzato sequenze di PNA molto più lunghe e complesse (*12-mer*) rispetto ai tetrameri precedenti, con l'obiettivo di veicolare molecole antisense più vicine a un reale contesto terapeutico. I test biologici condotti su cellule MCF-7 hanno mostrato che, a differenza dei PNA liberi, incapaci di attraversare la membrana cellulare, i complessi HNTs/PNA venivano internalizzati efficacemente e risultavano attivi nel silenziamento dell'espressione genica della neuroglobina.⁶¹ Alla luce di questi risultati, che hanno evidenziato come il caricamento negli HNTs non compromettesse l'attività dei PNA ma ne rendesse possibile l'azione intracellulare, è stata successivamente esplorata la possibilità di legare covalentemente questi all'argilla. In questo caso, Riela *et al.* hanno descritto per la prima volta una strategia sintetica per legare covalentemente un tetramero di PNA sulla superficie esterna di HNTs opportunamente modificati (**Figura 4**).⁶²

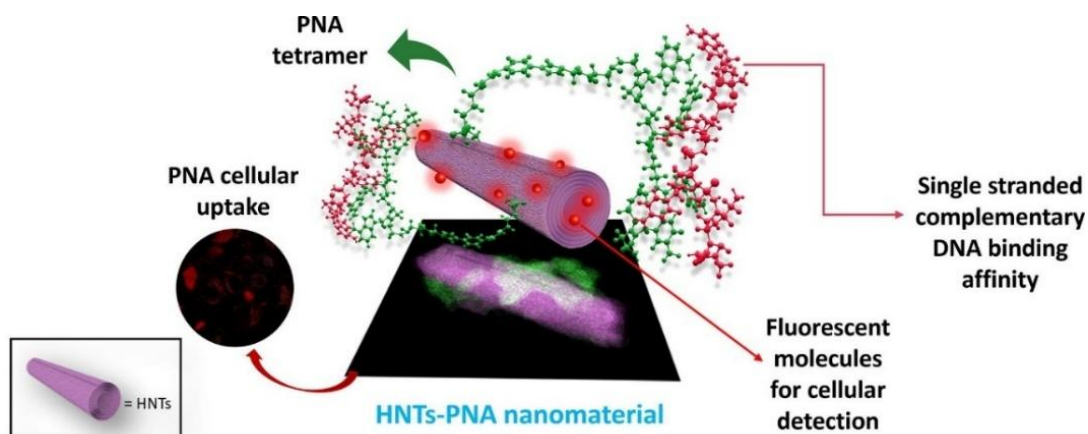


Figura 4. Struttura e proprietà del nanomateriale HNTs-PNA ottenuto legando covalentemente il PNA alla superficie esterna di HNTs modificati (Riela *et al.*).⁶²

Il PNA è stato funzionalizzato introducendo un triplo legame terminale e successivamente coniugato agli HNTs recanti gruppi azido terminali tramite reazione di *click chemistry*. Il nanomateriale così ottenuto (HNTs-PNA) ha mantenuto la capacità di riconoscere DNA a singolo filamento complementare e, una volta marcato con una sonda fluorescente, è stato testato su diverse linee cellulari (hTERT, MCF-7 e HL-60R), mostrando una chiara internalizzazione e localizzazione di esso a livello perinucleare.⁶²

2.3.2. Sviluppo di nanomateriali per il trasporto simultaneo di PNA e IDP

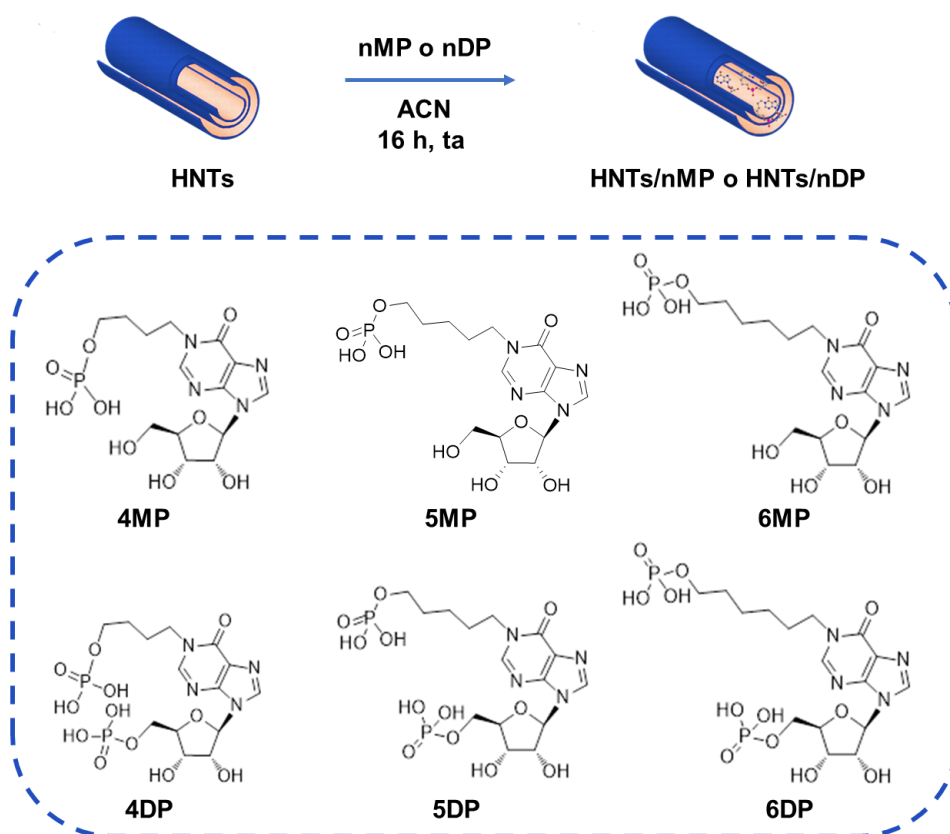
Recentemente è stato sviluppato un PNA specifico per il promotore del gene Bcl-2, un protooncogene iperespresso in molte patologie e associato alla resistenza all'apoptosi.⁶³ Questo PNA si lega alla sequenza bersaglio formando complessi stabili con il DNA che impediscono l'accesso dei fattori trascrizionali, riducendo così l'espressione di Bcl-2 e rendendo le cellule più sensibili alla morte programmata.⁶⁴⁻⁶⁶ Parallelamente, grande interesse è rivolto ai messaggeri secondari nucleotidici implicati nell'omeostasi del calcio intracellulare, in particolare il cADPR (adenosina difosfato ribosio ciclico),⁶⁷ che regola il rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico attraverso il recettore della rianodina.⁶⁸ La sua instabilità chimica ha limitato gli studi, favorendo lo sviluppo di analoghi più stabili come l'IDP (inosina difosfato),^{69,70} capace di mantenere l'attività biologica e resistere all'idrolisi, permettendo di modulare i segnali neuronali mediati dal calcio.⁷¹ La combinazione tra PNA anti-Bcl-2 e analoghi stabili del cADPR, apre prospettive promettenti per applicazioni su cellule neuronali e per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche nelle patologie cerebrali caratterizzate da disregolazione del calcio e resistenza all'apoptosi.^{64,70} L'impiego degli HNTs come *carrier* risulta strategico perché il loro lume cavo e la possibili modifiche permettono di aumentare la stabilità e l'internalizzazione cellulare dei PNA,^{60,62} oltre a proteggere molecole sensibili come i derivati del cADPR dall'idrolisi,⁷² e a consentirne un rilascio controllato e mirato nelle cellule neuronali.

Al fine di migliorare la somministrazione e l'internalizzazione cellulare degli analoghi dell'adenosina mono- e difosfato (IDP e IMP), per la loro potenziale applicazione su cellule neuronali, sono stati sviluppati sistemi basati su HNTs utilizzando diversi derivati monofosfato (nMP) e difosfato (nDP) che si differenziano per la lunghezza della catena alchilica (n) che collega l'inosina al fosfato. Inizialmente, è stato effettuato il loro caricamento su HNTs non

modificati, al fine di valutare come queste diverse molecole, potessero interagire diversamente con gli HNTs sulla base delle possibili interazioni elettrostatiche e legami a idrogeno.

- **Sintesi e caratterizzazione dei nanomateriali HNTs/nMP e HNTs/nDP**

Utilizzando una strategia comune per il caricamento di molecole organiche sugli HNTs, ad una dispersione di HNTs in ACN sono state aggiunte soluzioni acquose di nMP o nDP, ottenendo i nanomateriali HNTs/nMP e HNTs/nDP (**Schema 1**). Il caricamento di ogni nanomateriale è stato determinato tramite TGA, e ha mostrato valori compresi tra l'1.7 e il 2.7 %p/p (tabella in **Figura 5a**), non evidenziando marcate differenze passando dal mono al difosfato o al variare della lunghezza della catena alchilica.



Schema 1. Rappresentazione schematica del caricamento delle molecole negli HNTs e lo struttura chimica.

Vista la poca influenza della catena alchilica, le caratterizzazioni effettuate utilizzando diverse tecniche, sono state effettuate esclusivamente sui nanomateriali HNTs/6MP e HNTs/6DP scelti come modello. Il successo della sintesi è stato confermato tramite misure di TGA e FT-IR, mentre tramite DLS e potenziale- ζ sono state investigate le proprietà colloidali. In **Figura 5a** è riportata l'analisi termogravimetrica (linea continua) e la DTG (linea tratteggiata) dei nanomateriali HNTs/nMP e HNTs/nDP rispetto agli HNTs. Le TGA e le DTG di tutti gli altri

nanomateriali sono riportati in **Appendice A Figura A1**. La TGA mostra la tipica perdita di peso compresa tra 450 e 550 °C dovuta all'espulsione delle molecole di acqua presenti negli strati interni degli HNTs,⁷³ e un'ulteriore perdita nell'intervallo 200-300 °C, attribuita alla degradazione delle molecole organiche, evidenziata maggiormente dalla presenza dei due picchi presenti nella DTG a conferma dell'avvenuto caricamento. Conclusioni simili possono essere fatte osservando lo spettro FT-IR (**Figura 5b**). Negli spettri FT-IR degli HNTs, è possibile osservare delle bande intorno a 3602 e 3690 cm⁻¹ attribuibili rispettivamente alle vibrazioni di *stretching* O-H dei caratteristici gruppi silanolici e alluminolici dell'halloysite; la banda allargata a 1640 cm⁻¹ è relativa alla vibrazione di *bending* H-O-H dell'acqua legata a idrogeno nella struttura della halloysite, associata alla banda di *stretching* a 3550 cm⁻¹.⁷⁴ Nei nanomateriali HNTs/nMP e HNTs/nDP, a ulteriore conferma dell'avvenuto caricamento si osservano delle bande comprese tra 2850 e 2960 cm⁻¹, attribuibili alle vibrazioni di *stretching* C-H dei gruppi metilici (-CH₃) e metilenici (-CH₂-).

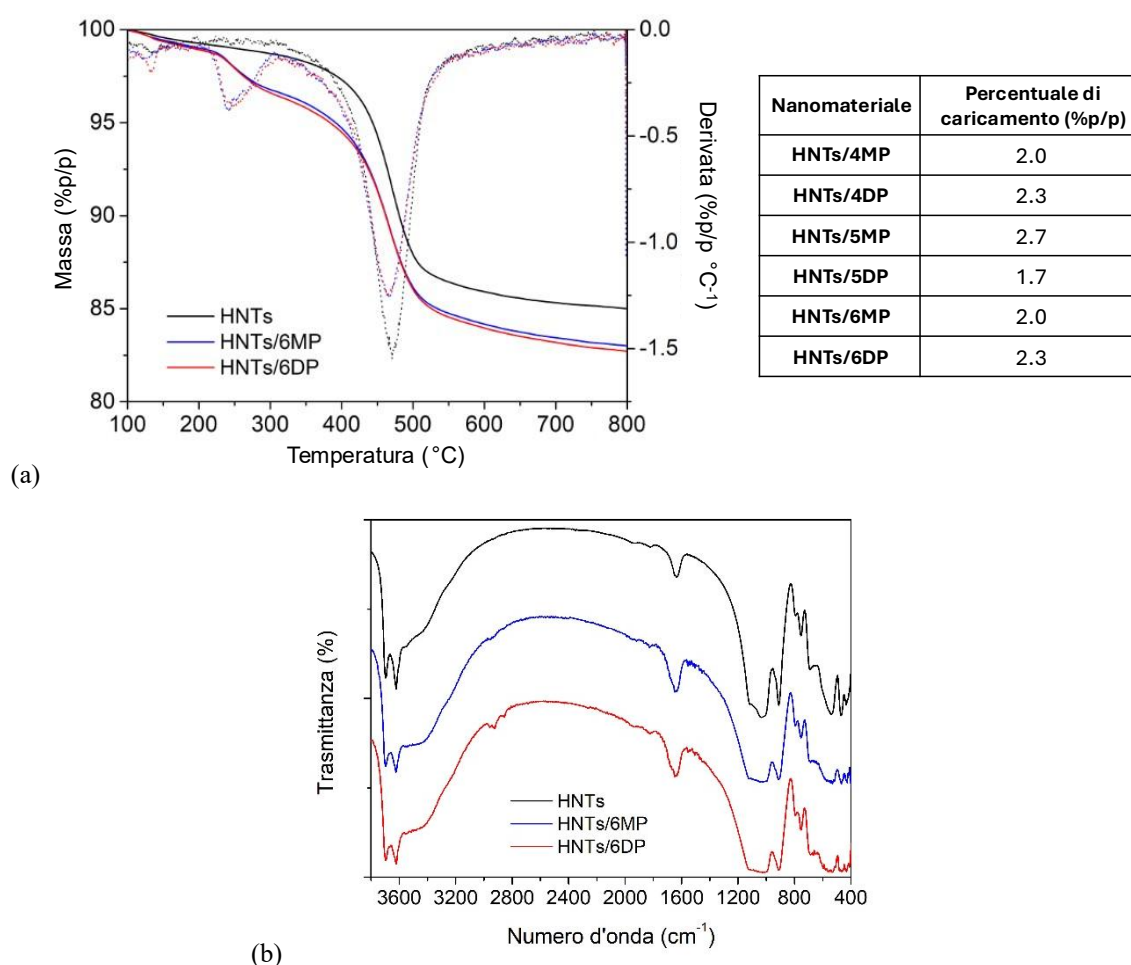


Figura 5. (a) TGA dei nanomateriali HNTs/6MP e HNTs/6DP confrontate con gli HNTs e tabella delle percentuali di caricamento di tutti i nanomateriali ottenuti; (b) Spettri FT-IR dei nanomateriali HNTs/6MP e HNTs/6DP confrontati con gli HNTs.

Le misure di *Dynamic Light Scattering* effettuate hanno evidenziato come in seguito al caricamento supramolecolare delle molecole organiche negli HNTs, il raggio idrodinamico dell'halloysite non ha subito variazioni significative (**Tabella 1**). Il mantenimento di questo, in seguito a modifica, conferma che le molecole organiche sono state caricate esclusivamente all'interno del lume degli HNTs, come suggerito anche dalle misure di potenziale- ζ , che hanno mostrato dei valori uguali a quelli dell'halloysite non modificata (**Tabella 1**). Infine, i valori PDI ottenuti indicano che i nanomateriali sono uniformi in termini di dimensione e mettono in evidenza l'assenza di fenomeni di aggregazione, che sono tipicamente osservati quando le modifiche interessano la superficie esterna degli HNTs.

Tabella 1. Valori di DLS, potenziale- ζ e PDI dei nanomateriali HNTs, HNTs/6MP e HNTs/6DP, con relative deviazioni standard.

Nanomateriali	Diametro idrodinamico apparente (nm)	Potenziale- ζ (mV)	PDI
HNTs	320 ± 16	-18.0 ± 1.0	0.30
HNTs/6MP	332 ± 39	-18.2 ± 1.0	0.29
HNTs/6DP	327 ± 11	-18.7 ± 1.0	0.31

Inoltre, sul nanomateriale HNTs/6DP, scelto come modello, è stata condotta un'analisi morfologica tramite HAADF-STEM e analisi EDX. Dalle immagini ottenute (**Figura 6a-b**), si può osservare la tipica struttura degli HNTs, che dopo il caricamento della molecola 6DP negli HNTs risulta essersi preservata non evidenziando la presenza di grandi aggregati, in accordo con le misure DLS. La **Figura 6c** mostra la mappatura elementare, estrapolata dall'analisi EDX, che rivela una presenza uniforme di fosforo su tutto il nanomateriale, dovuta alla presenza del fosfato nella molecola organica.

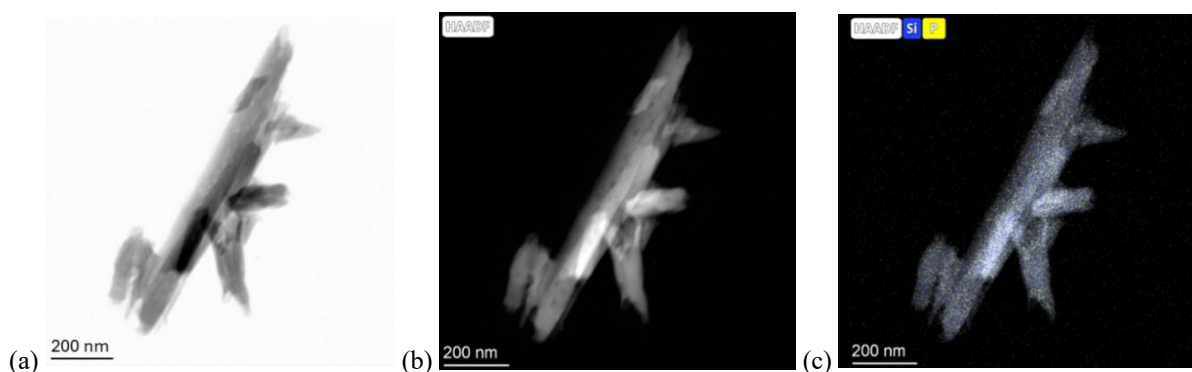


Figura 6. (a-b) Immagine HAADF/STEM del nanomateriale HNTs/6DP; (c) HAADF/STEM del nanomateriale HNTs/6DP con mappatura elementare.

- **Cinetiche di rilascio di 6MP e 6DP dai nanomateriali HNTs/6MP o 6DP**

Per valutare un possibile uso di questi sistemi come *carrier*, è stato effettuato il rilascio cinetico delle molecole, 6MP e 6DP, dai nanomateriali HNTs/6MP e HNTs/6DP utilizzando il metodo della membrana da dialisi. I rilasci, al fine di mimare le condizioni fisiologiche, sono stati effettuati a pH 7.4 e a 37 °C.

I dati cinetici ottenuti sono riportati in **Figura 7**, come è possibile osservare, il rilascio di 6MP dal nanomateriale HNTs/6MP è stato molto rapido raggiungendo il 100 %p/p di molecole rilasciate dopo circa 200 min, al contrario del 6DP che è stato rilasciato completamente dal nanomateriale HNTs/6DP in 24 h. Le diverse cinetiche di rilascio tra 6MP e 6DP potrebbero essere dovute alla differente struttura chimica delle due molecole; in particolare la presenza del difosfato potrebbe rallentare il rilascio di 6DP dal materiale HNTs/6DP a causa di un'interazione elettrostatica maggiore con il lume positivamente carico degli HNTs. I dati cinetici sono stati analizzati con diversi modelli (primo ordine, Power-Fit/Korsmeyer-Peppas, DEM e un modello misto zero+primo ordine).

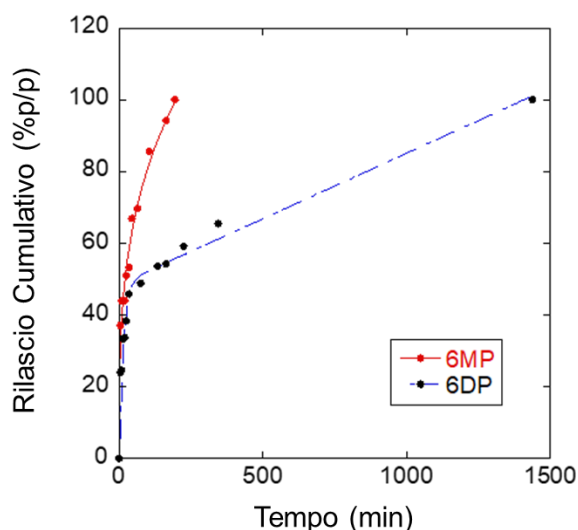


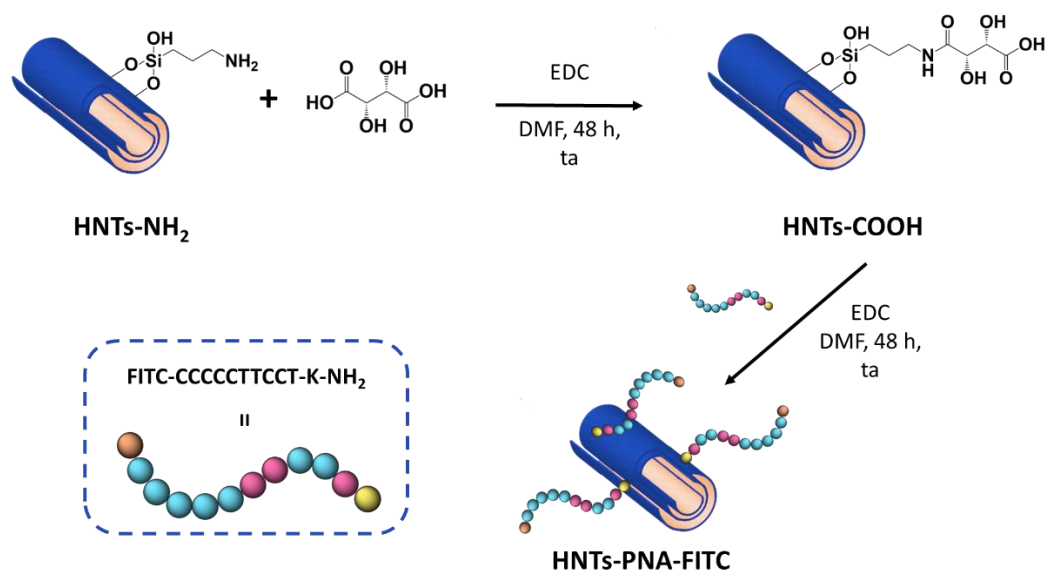
Figura 7. Rilascio cinetico di 6MP e 6DP dai nanomateriali HNTs/6MP e HNTs/6DP a pH = 7.4, 37 °C.

Per HNTs/6MP, il modello migliore risulta essere il Power-Fit (Korsmeyer-Peppas), con $k_1 = 19.1 \pm 3.2 \text{ min}^{-1}$; $n = 0.31 \pm 0.02$; $R^2 = 0.9848$, coerente con un rilascio governato prevalentemente dalla diffusione dal lume degli HNTs. Il valore dell'esponente $n = 0.31$ (< 0.5) indica un trasporto quasi-fickiano nelle prime fasi. Per HNTs/6DP, invece, la combinazione zero+primo risulta essere la migliore ($k_1 = 3.6 \pm 0.3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$; $k_2 = 7.1 \pm 0.9 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$; $M_\infty = 48.6 \pm 1.9$; $R^2 = 0.9798$), indicando una fase iniziale a velocità quasi costante seguita da una diffusione dipendente dalla quantità residua, e confermando come la presenza del mono- o

difosfato, e le interazioni tra loro e gli HNTs influenzano in modo significativo una potenziale applicazione di questi nanomateriali. Visti gli interessanti risultati ottenuti, è stata effettuata la sintesi di un sistema più complesso, basato su HNTs funzionalizzati, finalizzato al *co-delivery* di PNA e di IDP.

- Sintesi e caratterizzazione del nanomateriale HNTs-PNA-FITC/5DP

Al fine di incrementare la potenziale attività e specificità dei nanomateriali HNTs/nDP e MP, sfruttando le modifiche covalenti della superficie esterna degli HNTs, questa è stata modificata selettivamente attraverso la formazione di un legame covalente con un PNA. Il PNA utilizzato (CCCCCTTCCT-K-NH₂) è stato sintetizzato presso i laboratori della Prof.ssa Oliviero del Dipartimento di Farmacia dell'Università Federico II, utilizzando la sintesi in fase solida, e purificato tramite HPLC-MS.⁶³ In seguito, al fine di poter effettuare degli studi riguardo la sua possibile internalizzazione una volta legato agli HNTs, l'estremità N-terminale è stata derivatizzata con fluoresceina isotiocianato (FITC). Una volta sintetizzato il PNA, questo è stato legato a degli HNTs modificati. Nello specifico una prima modifica è stata effettuata utilizzando degli HNTs recanti dei gruppi amminici sulla superficie esterna (HNTs-NH₂),⁷⁵ che sono stati utilizzati per legare covalentemente l'acido tartarico, tramite una condensazione ammidica e in presenza di EDC,⁷⁶ al fine di ottenere il nanomateriale HNTs-COOH. Questo materiale, in un secondo *step*, è stato quindi impiegato per legare covalentemente il PNA, sfruttando ancora una volta la formazione di un legame ammidico tra il gruppo carbossilico presente sul nanomateriale HNTs-COOH e il gruppo amminico di una lisina terminale del PNA (Schema 2).



Schema 2. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale HNTs-PNA-FITC.

Il successo della sintesi è stato confermato dall'analisi termogravimetrica, che ancora una volta, analizzando il residuo fisso a 800 °C, ha fornito la percentuale di caricamento di ciascun nanomateriale ottenuto (**Figura 8**). In particolare, per il nanomateriale HNTs-COOH è stata stimata una percentuale di caricamento del 3.8 %p/p, corrispondente a un grado di funzionalizzazione di 2.5 mmol g⁻¹; questo se confrontato con il nanomateriale HNTs-NH₂, caratterizzato da una percentuale di caricamento del 3.0 %p/p corrispondente a un grado di funzionalizzazione di 5.1 mmol g⁻¹, mostra un rapporto stechiometrico di 1:2, evidenziando la funzionalizzazione incompleta del nanomateriale e la presenza di gruppi amminici ancora liberi in HNTs-COOH.⁷⁷ Infine, per il nanomateriale HNTs-PNA-FITC, è stata stimata una percentuale di caricamento dell'1.1 %p/p, corrispondente a un grado di funzionalizzazione del $3.2 \cdot 10^{-3}$ mmol g⁻¹.

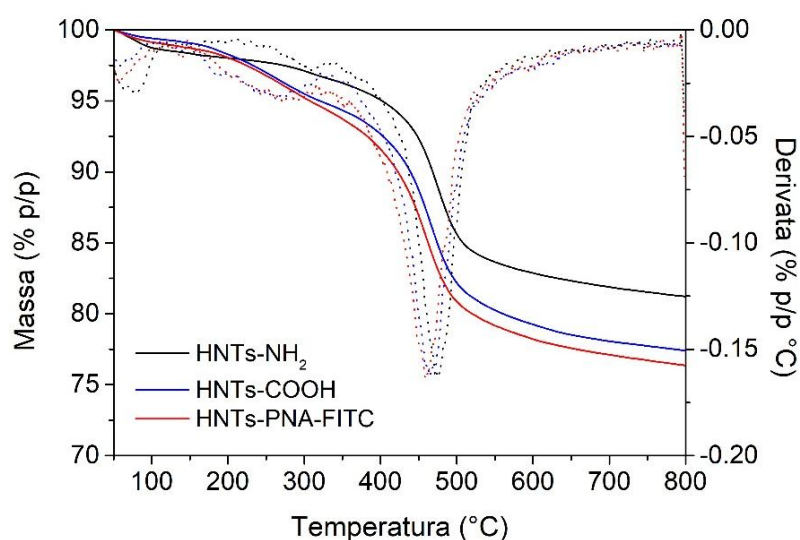


Figura 8. TGA (linea continua) e derivate (linea tratteggiata) dei nanomateriali HNTs-NH₂, HNTs-COOH e HNTs-PNA-FITC.

Dalle misure di DLS e potenziale- ζ , la funzionalizzazione covalente con il PNA, varia molto le proprietà colloidali dell'halloysite. La presenza del PNA, infatti, provoca un incremento marcato del diametro idrodinamico medio passando dagli HNTs (320 ± 16 nm) al nanomateriale HNTs-PNA-FITC (861 ± 29 nm), accompagnato da uno spostamento del potenziale- ζ da -18.0 mV a -11.7 mV, in accordo con i risultati ottenuti per sistemi simili.⁶² Queste variazioni, oltre a confermare ulteriormente la presenza di una molecola organica sulla superficie esterna dei nanotubi, suggeriscono la possibile formazione di aggregati. In effetti, la morfologia del nanomateriale HNTs-PNA-FITC (osservata mediante HAADF-STEM; **Figura 9A-B**) ha evidenziato la formazione di agglomerati e strutture più complesse rispetto agli HNTs non modificati, confermando l'ipotesi fatta sulla base delle misure DLS. La mappatura elementare

(**Figura 9C**), estrapolata dall'analisi EDX (**Figura 9D**), rivela una distribuzione uniforme degli atomi di azoto (N) lungo tutti i nanotubi.

Inoltre, acquisendo immagini da due diverse aree (**Appendice A, Figura A2**), l'analisi EDX ha messo in evidenza una percentuale maggiore di carbonio (C) e azoto (N) sulla superficie esterna (Area1) rispetto a quella interna (Area2) degli HNTs, confermando il successo della procedura sintetica adottata.

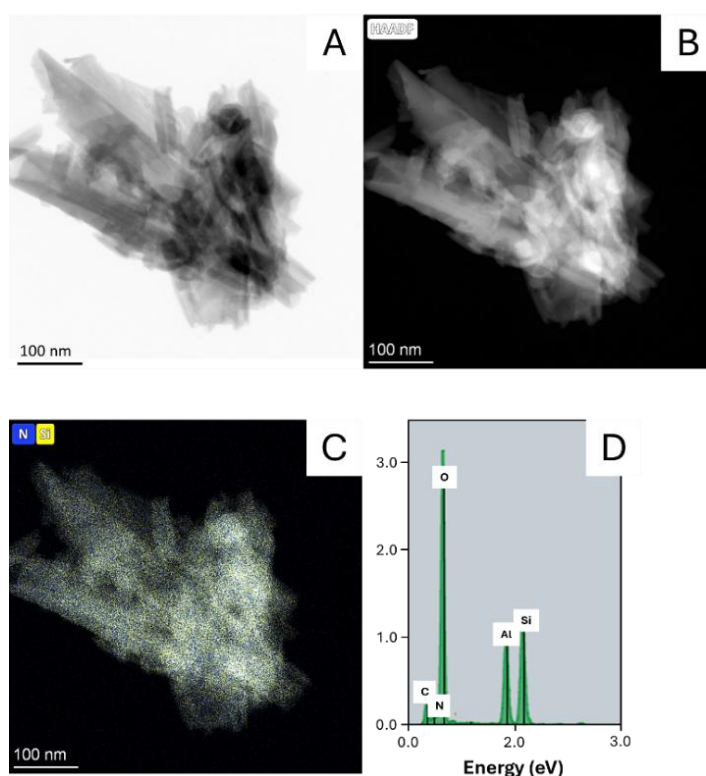


Figura 9. (A-B) Immagini HAADF-STEM del nanomateriale HNTs-PNA-FITC, (C) Mappatura elementare del nanomateriale HNTs-PNA-FITC estrapolata dall'analisi EDX, (D) Spettri EDX del nanomateriale HNTs-PNA-FITC.

- **Loading e rilascio di IDP dal nanomateriale a base di HNTs e PNA**

Una volta sintetizzato e caratterizzato il nanomateriale HNTs-PNA-FITC, esso è stato utilizzato come *carrier* per una delle molecole che ha attualmente mostrato la migliore attività *in vitro* su cellule neuronali corticali, ossia l'inosina ciclica difosfato con catena alchilica C-5 (5DP).⁷⁸ La molecola è stata caricata aggiungendo una soluzione acquosa di 5DP a una dispersione del nanomateriale HNTs-PNA-FITC in ACN. Dall'analisi termogravimetrica del nanomateriale ottenuto, denominato HNTs-PNA-FITC/5DP, è stata stimata una percentuale di caricamento di 5DP pari all'1.5 %p/p (**Appendice A, Figura A3**). Il valore ottenuto è molto vicino alla percentuale di caricamento ottenuta utilizzando HNTs non modificati, indicando che la

presenza di PNA, legato alla superficie esterna del nanomateriale HNTs-PNA-FITC, non ha avuto alcun significativo effetto sul caricamento della molecola organica negli HNTs.

I dati cinetici ottenuti dal rilascio del 5DP, utilizzando il metodo precedentemente descritto per HNTs/6MP o 6DP, dal nanomateriale HNTs-PNA/5DP sono riportati in **Figura 10**. La molecola 5DP è stata rilasciata dal nanomateriale HNTs-PNA-FITC/5DP in 24 h. Anche in questo caso, i dati cinetici sono stati analizzati mediante diversi modelli matematici (primo ordine, Power Fit e DEM). Ancora una volta, il rilascio delle molecole 5DP dal nanomateriale HNTs-PNA-FITC/5DP viene meglio descritto dal modello di primo ordine ($k = 0.0088 \pm 0.0008 \text{ min}^{-1}$, $R^2 = 0.9819$) indicando una diffusione della molecola dal lume degli HNTs.

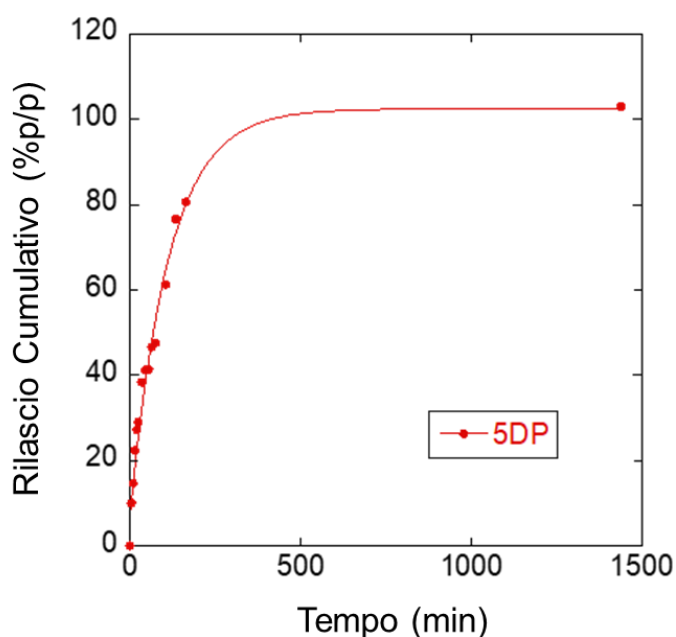


Figura 10. Rilascio cinetico del 5DP dal nanomateriale HNTs-PNA-FITC/5DP a pH = 7.4 e 37 °C.

Alla luce dei risultati ottenuti, sono in corso studi biologici sui nanomateriali HNTs/nMP, HNTs/nDP e HNTs-PNA-FITC/5DP per valutare la citotossicità di questi, e il reale blocco dell'espressione di Bcl-2 ad attività antiapoptotica.

2.4. L'halloysite come drug carrier e/o delivery system per le terapie antitumorali

Il cancro è un'altra delle malattie più letali che provoca un tasso di mortalità allarmante in tutto il mondo.⁷⁹ Diventa sempre più importante affrontare questa patologia con terapie efficaci a causa della sua elevata letalità. I trattamenti convenzionali comprendono chemioterapia,

radioterapia e chirurgia.⁸⁰ La chemioterapia, grazie all'uso di farmaci antitumorali, svolge un ruolo indispensabile nella lotta contro i tumori.⁸¹

Tuttavia, come precedentemente accennato, i farmaci soffrono di innumerevoli svantaggi e problematiche, e la radioterapia e la chirurgia rappresentano trattamenti locali che rendono estremamente difficile l'eradicazione completa delle cellule tumorali.^{82,83} Negli ultimi 10 anni, gli HNTs sono stati oggetto di un numero crescente di studi come componenti delle terapie oncologiche,⁸⁴ che spaziano dal rilascio controllato e mirato di farmaci,⁸⁵ alla veicolazione di geni,⁸⁶ PNA e siRNA,^{60,87} fino al loro impiego per la cattura delle cellule tumorali.⁸⁸

In **Tabella 2**, si riportano solo alcuni degli innumerevoli studi presenti in letteratura riguardante nanomateriali chemioterapici a base di halloysite. Come è possibile osservare tra le numerose molecole ad attività antitumorale, quelle più frequentemente utilizzate sono la doxorubicina (DOXO) e la curcumina (CUR).

Ad esempio, Yang *et al.*, riportano il caricamento della DOXO in HNTs precedentemente modificati con oligosaccaridi di chitina (HNTs-g-COS) per il trattamento del carcinoma mammario. La scelta degli oligomeri piuttosto che della chitina ad alto peso molecolare è stata presa per via di precedenti studi che avevano evidenziato delle limitazioni riguardo l'efficienza di caricamento della DOXO, e inoltre la modifica effettuata ha permesso di modificare il potenziale- ζ del nanomateriale, migliorandone la compatibilità. Il sistema HNTs-g-COS/DOXO ha mostrato un forte effetto apoptotico sulle cellule MCF-7, grazie a sovrapproduzione di ROS e danni mitocondriali, con accumulo sia a livello citoplasmatico che nucleare, al contrario della DOXO libera che mostrato degli effetti nettamente inferiori.⁸⁹

Sempre per lo stesso scopo, Wu *et al.* nel 2018, ha proposto una modifica degli HNTs con catene di polietilenglicole (PEG), successivamente modificate con acido folico (HNTs-PEG-FA) e caricato con DOXO, per il *targeting* attivo delle cellule tumorali. Il sistema HNTs-PEG-FA/DOXO ha indotto apoptosi e inibito la proliferazione delle sole cellule MCF-7 che esprimono i recettori dell'acido folico (FR+), con un rilascio fino a 35 ore e maggiore produzione di ROS, rispetto alla DOXO libera.⁹⁰

Analogamente a questo, Riela *et al.*, nel 2022, hanno modificato covalentemente la superficie esterna degli HNTs, ottenendo un nanomateriale per il *targeting* attivo su linee cellulari tumorali, da sfruttare per la somministrazione di un noto antitumorale, il metotressato (MTX).

Tabella 2. Riepilogo dei lavori in letteratura sui farmaci antitumorali caricati negli HNTs.⁸⁴

Anti-Cancer Drug	Cancer Type	HNTs Modification	Therapeutic Effect
Doxorubicin	Breast cancer	HNTs surface-modified with folic acid (FA) through PEG linker	Inhibited proliferation and induced death of MFC-7 cells
	Tumors with overexpression of FA receptor	HNTs conjugated with magnetic particles (Fe ₃ O ₄) and FA	Enhanced toxicity to HeLa cells
	Breast cancer	HNTs grafted with chitosan oligosaccharide (COS)	Inhibited proliferation and induced death of MFC-7 cells
	Acute myeloid leukemia	Loading HNTs with gold nanorods (GNRs) and conjugating them with FA via reaction. with bovine serum albumin (BSA).	Inhibited proliferation and induced death of MFC-7 cells, decreased drug toxicity
	Cervical cancer, Colon cancer, Hepatocellular carcinoma	HNTs immobilized with drug-loaded liposomes surface-modified with E-selectin	Increased number of MCF7 and COLO 205 cells captured
Curcumin	Lung cancer, Prostate cancer, Melanoma	HNTs coated by thermal spraying of DOX loaded HNTs ethanol dispersion and conjugated with anti-EpCAM antibody	Enhanced toxicity to HeLa cells
	Breast cancer, Acute myeloid leukemia	Microwave-assisted synthesis of HNTs conjugated with curcumin- HNTs modified with 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES) or 3- Glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) by electrospraying	Enhanced toxicity to SUM 149, MCF-7, and MDA-MB-231 breast cancer cell lines also to HL60 and HL 60R myeloid leukemia cell lines
Resveratrol	Breast cancer	HNTs were coated with polyelectrolytes (PAH or PRM and PSS or DXS) using LbL method	Restrained proliferation and induced death of MFC-7 cells
Methotrexate	Osteosarcoma	no further modifications	Induced apoptosis and significantly inhibited proliferation of cancer cells

L'MTX è stato prima caricato nel lume degli HNTs sfruttando le interazioni supramolecolari e poi legato covalentemente tramite la formazione di un legame ammidico a degli HNTs precedentemente modificati con l'APTES. Questo è stato poi ulteriormente caricato con MTX, ottenendo un sistema profarmaco (**Figura 11**). I test biologici condotti sulle linee cellulari di leucemia mieloide acuta HL-60 e sulla loro variante *multidrug-resistant* HL-60R hanno mostrato come il legame covalente e il sistema profarmaco a base di HNTs ed MTX migliorano significativamente la citotossicità rispetto al solo caricamento supramolecolare. Inoltre, un'ulteriore modifica covalente per l'introduzione di biotina ha portato all'ottenimento di un sistema che ha mostrato un incremento dell'attività antiproliferativa fino a 7 volte rispetto ai sistemi non biotinilati.⁹¹

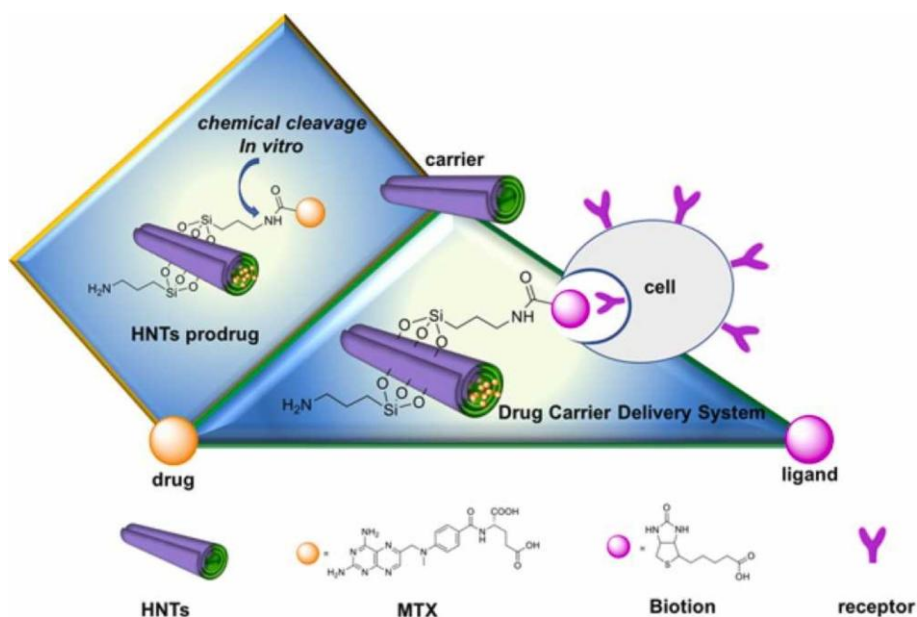


Figura 11. Struttura e modifiche degli HNTs per l'ottenimento di un *Drug Delivery System* per il rilascio di MTX (Riela *et al.*).⁹¹

2.4.1. Sistemi multicavità a base di halloysite: nuovi nanomateriali ad attività antitumorale

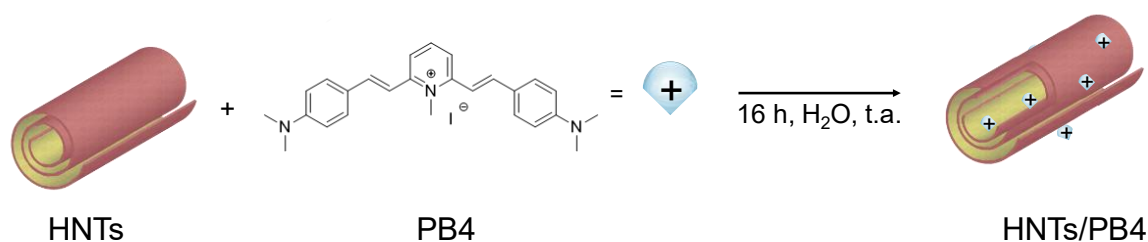
Nonostante i molti vantaggi, la veicolazione di molecole altamente idrofobiche tramite gli HNTs rimane una sfida. Spesso, infatti, i nanomateriali ottenuti non sono più facilmente disperdibili in acqua a causa dell'elevata idrofobicità apportata dalla presenza della molecola organica, provocando fenomeni di aggregazione di questi nanomateriali con conseguente diminuzione dell'effetto terapeutico. Per superare questo limite, si sta prendendo in considerazione la funzionalizzazione della superficie esterna degli HNTs con diverse strutture macrocicliche, al fine di ottenere strutture multicavità che permettono di caricare molecole sia nel lume dell'halloysite sia su queste strutture legate esternamente.^{92,93} Tra le diverse strutture

fino ad oggi studiate come le ciclodestrine e i calixareni, in particolare i calix[5]areni, hanno dimostrato proprietà promettenti per il caricamento di diverse molecole.⁹⁴ La loro capacità di interagire con molecole altamente idrofobiche tramite la formazione di interazioni π - π , li rende infatti ottimi candidati per il trasporto e il rilascio di farmaci.^{94,95} Tuttavia, nonostante siano presenti in letteratura numerosi esempi di sistemi ibridi multicavità, e nonostante siano stati fatti enormi progressi in questo campo, attualmente sono ancora molti i limiti che questi possiedono. I sistemi già studiati infatti spesso hanno una bassa efficienza di caricamento, un rilascio della molecola in condizioni fisiologiche non controllato, a cui si aggiungono scarsa stabilità colloidale e la loro tendenza ad aggregare. A tal proposito, è stato quindi sviluppato un nuovo sistema ibrido multicavità, il primo esempio di modifica covalente dell'halloysite con un calix[5]arene, al fine di aprire la strada a una nuova classe di nanomateriali progettati per migliorare l'incapsulamento, la dispersione e il rilascio controllato di composti altamente idrofobici. Per far questo è stato utilizzato come farmaco modello il sale E,E-[2,6-di-(p-dimetilammino)stirile]-1-metilpiridinio (PB4), un composto aromatico planare dotato di una carica positiva sull'anello piridinico, e caratterizzato da un'elevata idrofobicità.⁹⁶ Questo inoltre ha mostrato avere un'attività antiproliferativa, esclusivamente *in vitro* vista la sua scarsa solubilità, contro cellule di carcinoma mammario MCF-7, linee tumorali polmonari A549 e H226 e cellule di adenocarcinoma colon-rettale CaCo2.⁹⁷

Al fine di valutare l'importanza della funzionalizzazione covalente degli HNTs con il calix[5]arene, risulta essenziale sviluppare e caratterizzare un nanomateriale da utilizzare come confronto, ovvero un sistema meno complesso (HNTs/PB4) in cui il caricamento di PB4 su HNTs non modificati è stato effettuato sfruttando le sole interazioni supramolecolari tra i due componenti.

- *Sintesi e caratterizzazione del sistema HNTs/PB4*

Al fine di ottenere il nanomateriale HNTs/PB4, utilizzando la procedura già ampiamente discussa per il caricamento dell'halloysite,²⁴ ad una dispersione acquosa di HNTs è stata aggiunta una soluzione satura di PB4 in ACN. Data la bassissima solubilità di PB4, è possibile ipotizzare che questa interagisca con gli HNTs sia tramite effetti idrofobici, sia tramite interazioni di natura elettrostatica (**Schema 3**). Dopo il *work-up*, tramite TGA, è stata stimata la percentuale di caricamento di PB4 nel nanomateriale HNTs/PB4 che è risultata essere dell'1.4 %p/p, con un'efficienza di caricamento del 28%.



Schema 3. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale HNTs/PB4.

Al fine di valutare l'interazione tra PB4 e le diverse superfici degli HNTs, viste le molteplici interazioni coinvolte, è stata effettuata un'isoterma di adsorbimento, che come visto, a seconda del modello matematico, è utile per descrivere e indicare il tipo e il numero di superfici coinvolte in questi processi di adsorbimento. Riportando la quantità di PB4 adsorbita (Q_e , mol g^{-1}) in funzione della concentrazione di PB4 in soluzione all'equilibrio (C_e , mol L^{-1}), è stato possibile osservare un aumento della quantità di molecole adsorbite all'aumentare della concentrazione all'equilibrio (**Figura 12**).

I dati ottenuti sono quindi stati analizzati con due diversi modelli, quello di Langmuir e Freundlich, e i risultati ottenuti (**Tabella 3**) mostrano come effettivamente il secondo modello si adatti meglio. L'isoterma di Freundlich, tipicamente, come già detto, indica un adsorbimento eterogeneo e multimolecolare,⁹⁸ suggerendo che PB4 interagisca con entrambe le superfici dell'halloysite. Inoltre, il valore n osservato indica un adsorbimento favorevole di tipo fisico della molecola sugli HNTs.⁹⁹

Tabella 3. Parametri ottenuti dai modelli di isoterma di Langmuir e Freundlich per l'assorbimento di PB4 su HNTs.

Langmuir			Freundlich		
Q_m (10^{-5} mol g^{-1})	K_L (10^5 L mol $^{-1}$)	R^2	K_F (10^{-4} mol g^{-1} (mol L^{-1}) $^{1/n}$)	n	R^2
7 ± 1	1.4 ± 0.9	0.8623	9 ± 3	3.7 ± 0.4	0.9825

Dopo aver compreso il tipo di interazione, il nanomateriale HNTs/PB4 è stato caratterizzato tramite diverse tecniche quali, l'FT-IR e la TGA per confermare il successo della sintesi, misure di DLS e potenziale- ζ , per determinarne le proprietà colloidali, e misure TEM/EDX per studiarne la morfologia. Il termogramma di HNTs/PB4 (**Figura 12**) possiede la tipica perdita in peso dell'halloysite a ca. 300-550 $^{\circ}C$,¹⁰⁰ in cui ricade probabilmente anche la perdita in peso dovuta alla decomposizione organica di PB4. Confrontando il valore del residuo fisso a 800 $^{\circ}C$ del nanomateriale rispetto alla sola halloysite, è stato possibile determinare la percentuale di caricamento precedentemente discussa.

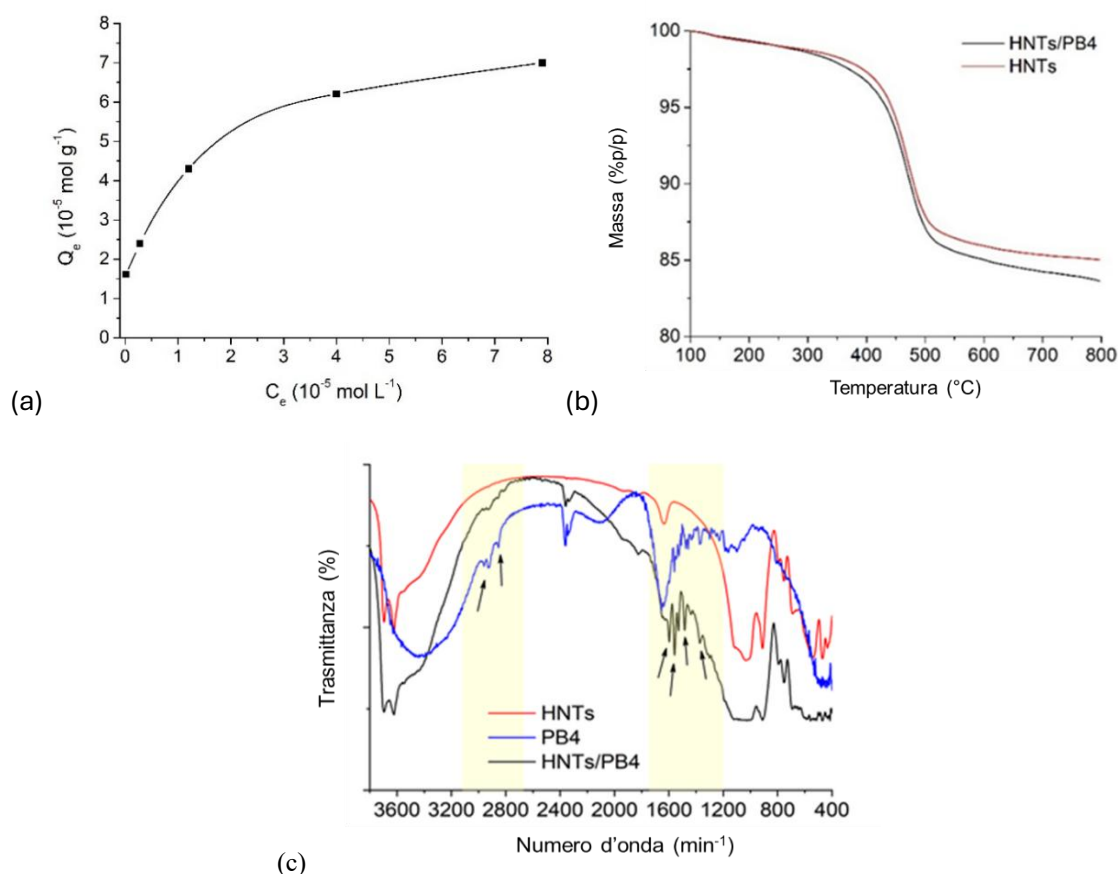


Figura 12. (a) Isotherma di adsorbimento di PB4 su HNTs in acqua a 25 °C; (b) curve termogravimetriche di HNTs e del nanomateriale HNTs/PB4; (c) spettri FT-IR di HNTs, PB4 e del nanomateriale HNTs/PB4.

Come la TGA, anche la spettroscopia FT-IR ha confermato ulteriormente il caricamento di PB4 nel nanomateriale. In **Figura 12** sono riportati gli spettri FT-IR del nanomateriale e dei singoli componenti (HNTs e PB4). Oltre alle tipiche bande dell'halloysite,⁷⁵ nello spettro del nanomateriale si osservano chiaramente altre bande vibrazionali di *stretching* e *bending*, riconducibili alle ammine terziarie e alifatiche ($1370\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}$) e le bande di *stretching* del doppio legame C=C ($1620\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$) degli anelli aromatici di PB4.

L'analisi DLS, che si basano sulla determinazione del coefficiente medio di diffusione traslazionale (D), sono state utilizzate per indagare le proprietà strutturali e la mobilità del nanomateriale HNTs/PB4 in ambiente acquoso. Questo parametro, come noto, tiene conto non solo delle dimensioni e della forma delle particelle, ma anche del loro grado di idratazione e della presenza di eventuali fenomeni di aggregazione. I risultati, in effetti, hanno mostrato un valore di D pari a $4.9 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, significativamente inferiore rispetto a quello misurato per gli HNTs non modificati ($1.6 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$). Questo valore e questa diminuzione sono indicativi di una diffusione più lenta, riconducibile alla presenza di specie idrofobiche legate alla superficie esterna dei nanotubi, e che favoriscono fenomeni di aggregazione in acqua.

Questo comportamento è stato ulteriormente supportato dal valore del PDI pari a 1.0, valore che riflette una distribuzione dimensionale molto ampia e coerente con la formazione di aggregati in soluzione acquosa.¹⁰¹ Le misure di potenziale- ζ hanno fornito ulteriori informazioni sulla superficie del nanomateriale e sono risultati in linea con le misure di DLS. In particolare, il nanomateriale HNTs/PB4 ha mostrato un potenziale- ζ di ca. -5.5 ± 1.0 mV, sensibilmente più positivo rispetto a quello degli HNTs non modificati (-18.0 ± 1.0 mV). Questo valore suggerisce una parziale neutralizzazione delle tipiche cariche negative presenti sulla superficie esterna dei nanotubi, attribuibile all'interazione con le molecole di PB4 e in accordo con le caratterizzazioni precedenti.

Dall'analisi morfologica del nanomateriale, effettuata tramite HAADF-STEM, è stato osservato (**Figura 13A e 13B**) come la struttura dei nanotubi rimane sostanzialmente uguale anche dopo il caricamento del farmaco, anche se vi è un certo grado di aggregazione tra questi, data la presenza di PB4, come osservato dalla mappatura elementare estrapolata dall'analisi EDX (**Figura 13C**).

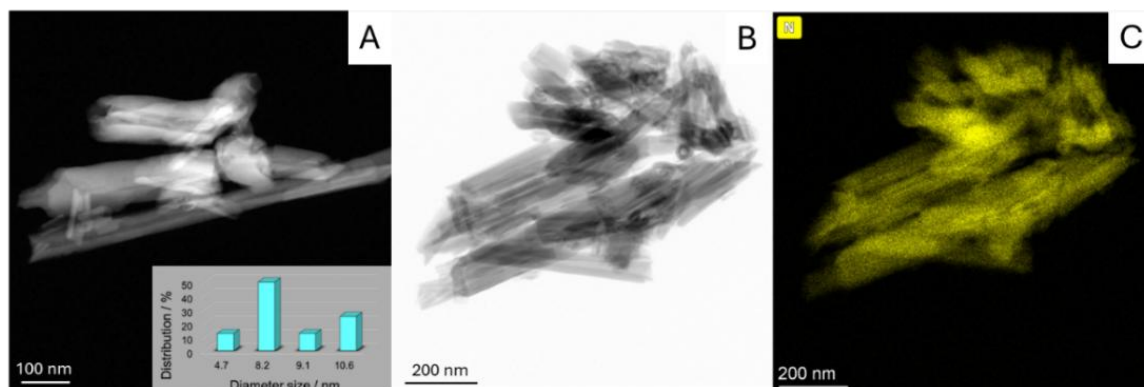


Figura 13. (A-B) Immagini HAADF/STEM del nanomateriale HNTs/PB4; (C) HAADF/STEM del nanomateriale HNTs/PB4 con mappatura elementare. L'inserto mostra la distribuzione del diametro degli HNTs/PB4 (n = 20).

Oltre a queste evidenze, dalle immagini è stato possibile osservare un'ulteriore evidenza del caricamento della molecola, in quanto il lume dei tubi non risulta più completamente visibile e presenta un diametro ridotto rispetto a quello degli HNTs non modificati (da 14.9 a 8.5 nm) (**Appendice B, Figura B1**). Una volta caratterizzato il nanomateriale HNTs/PB4, e aver determinato l'efficienza di caricamento del farmaco, le proprietà colloidali e morfologiche, si è proceduto con la modifica covalente della superficie esterna degli HNTs, al fine di ottenere il sistema multicavità desiderato.

- Sintesi e caratterizzazione del sistema HNTs-Calix/PB4

Questo sistema più complesso è stato sviluppato caricando PB4 su un nanomateriale ottenuto tramite il legame covalente del propargil-calix[5]arene (5-Propargil-11,17,23,29-tetrakis(1,1-dimetiletil)-31,32,33,34,35-penta(4-metilpenti-loossi)cali[5]arene) su degli HNTs opportunamente modificati con gruppi azido, ottenendo il nanomateriale HNTs-Calix/PB4. Nello specifico la sintesi del propargil-calix[5]arene, effettuata dal Prof.re Pappalardo presso i suoi laboratori del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Catania, è stata realizzata a partire dal derivato amminico NH₂-Calix[5] (**Figura 14**), ottenuto mediante una sequenza di passaggi sintetici che ha visto la reazione iniziale tra il p-terz-butilfenolo e la formaldeide.^{102,103}

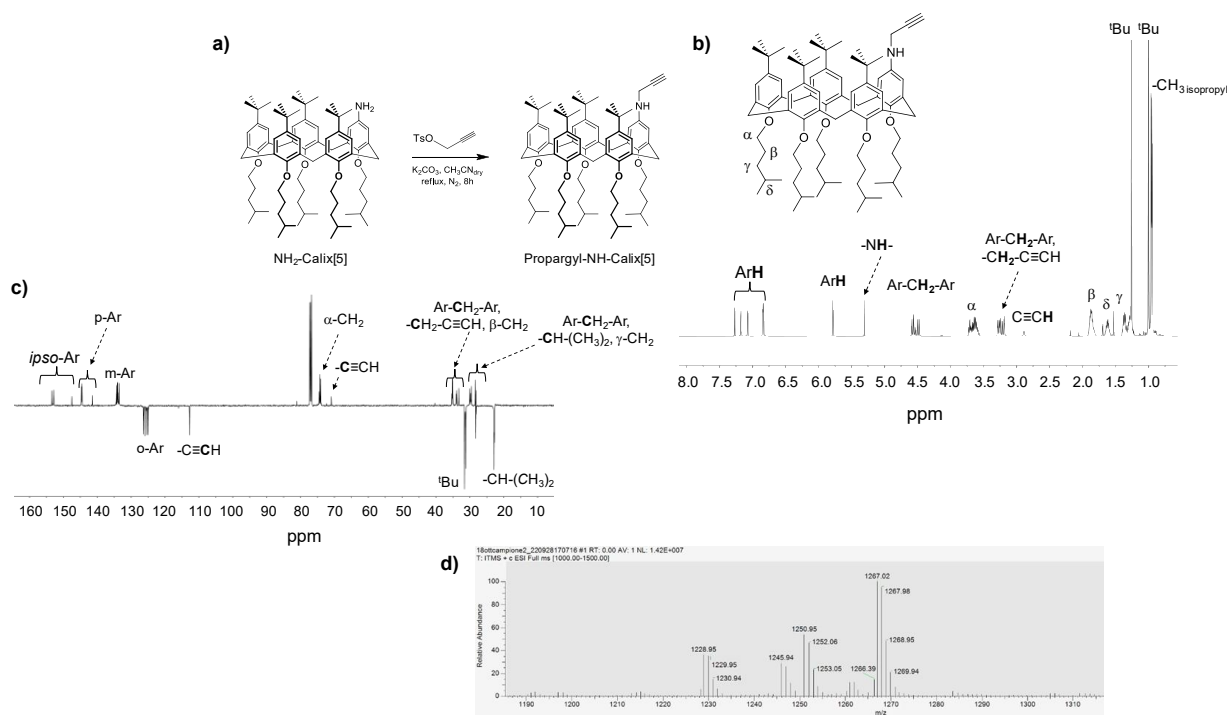
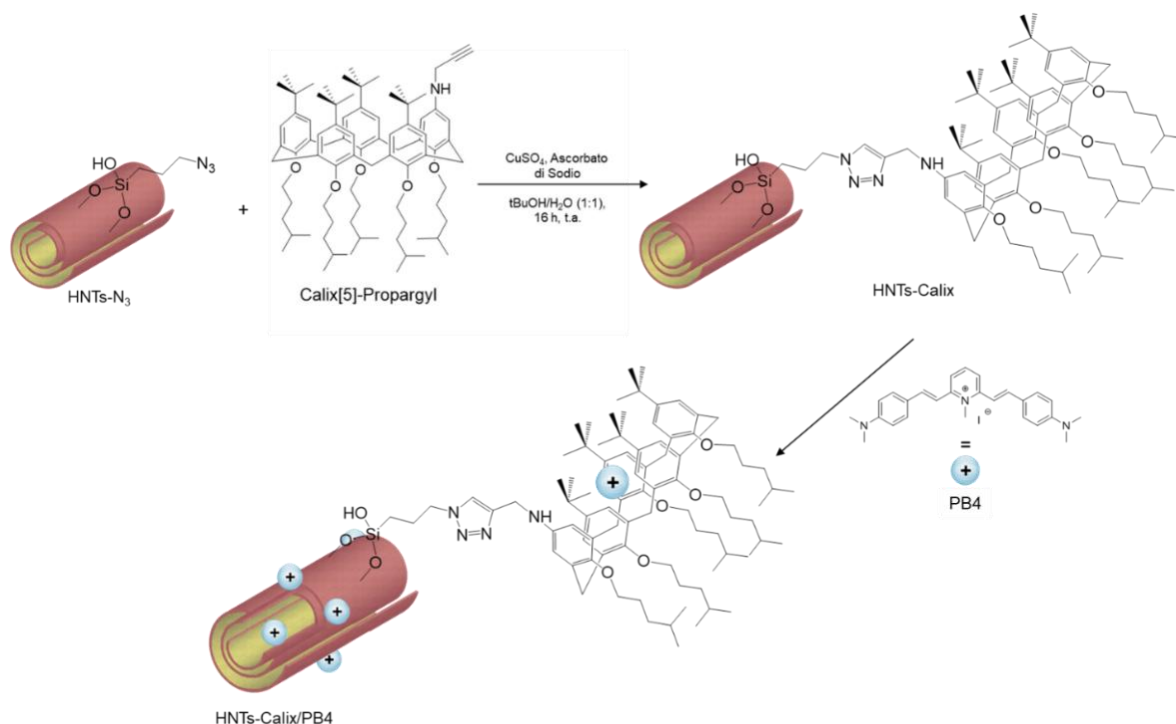


Figura 14. (a) Rappresentazione schematica della sintesi del Propargil-NH-Calix[5]; (b) e (c) spettri ¹H e ¹³C NMR del Propargil-NH-Calix[5] registrati in CDCl₃; (d) spettro ESI-MS del Propargil-NH-Calix[5] in CH₃OH/H₂O (4:1, v/v).

Ottenuto il derivato Propargil-NH-Calix[5] questo è stato legato covalentemente a degli HNTs precedentemente modificati con gruppi azido (HNTs-N₃), tramite una reazione di cicloaddizione 1,3-dipolare azide-alchino (Meldal-Sharpless-Huisgen) (**Schema 4**). La reazione è stata condotta in microonde, a 100 °C per 10 min ed in presenza di CuSO₄ e acido ascorbico come catalizzatori, utilizzando una miscela H₂O/t-BuOH (1:1) come solvente. In seguito all'introduzione di questa nuova porzione organica sulla superficie esterna degli HNT-N₃, è stata determinata la percentuale di caricamento tramite TGA, che è risultata essere del 4.1

%p/p. Successivamente è stato eseguito il caricamento di PB4, sul nanomateriale HNTs-Calix ottenuto, tramite la stessa metodologia precedentemente usata per l'ottenimento del sistema HNTs/PB4. In questo caso il caricamento del farmaco ha però raggiunto il 4.7 %p/p con un'efficienza di caricamento del 96 %, in linea con quanto riportato in letteratura riguardo il caricamento di molecole su sistemi simili.²⁴



Schema 4. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale HNTs-Calix/PB4.

Le caratterizzazioni effettuate sui sistemi così ottenuti, diversamente dal precedente sistema HNTs/PB4, rispecchiano e confermano la presenza del macrociclo sulla superficie esterna del nanomateriale HNTs-Calix. Le curve TGA e DTG (**Figura 15a**) mostrano infatti, oltre alla tipica perdita in peso dell'halloysite, la comparsa di un ampio segnale a ca. 350 °C del nanomateriale HNTs-Calix/PB4, e che risulta diverso da quello osservato per il nanomateriale HNTs-Calix.¹⁰⁴ Allo stesso modo lo spettro FT-IR (**Figura 15b**) mostra, oltre alle bande vibrazionali tipiche del calixarene introdotto, i tipici segnali di PB4, confermando ed evidenziando il successo del caricamento del farmaco nel *nanocarrier*.

Infine, lo studio riguardo le proprietà colloidali del nanomateriale, tramite DLS e potenziale- ζ , ha evidenziato un aumento del diametro medio del nanomateriale passando dal sistema HNTs-Calix al sistema HNTs-Calix/PB4 (ca. 1000 nm per il primo e superiori a 2000 nm per il secondo), suggerendo che PB4 interagisce non solo con le cavità del calixarene ma anche con le superfici degli HNTs, come osservato per il sistema HNTs/PB4. Coerentemente con quanto precedentemente osservato, il valore di potenziale- ζ del sistema HNTs-Calix/PB4 è risultato

essere più positivo (-9.0 mV) rispetto a quello del nanomateriale HNTs-Calix (-15.0 mV), evidenziando ancora una volta una parziale neutralizzazione delle cariche superficiali degli HNTs.

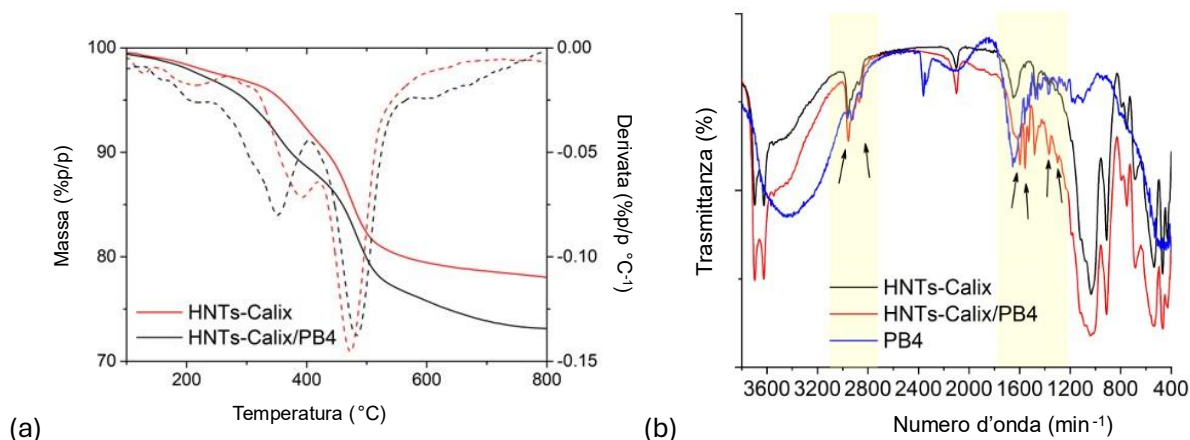


Figura 15. (a) TGA e DTG e (b) spettro FT-IR dei nanomateriali HNTs-Calix e HNTs-Calix/PB4.

- *Proprietà fotofisiche dei nanomateriali HNTs/PB4 e HNTs-Calix/PB4*

Dopo aver caratterizzato dal punto di vista chimico, morfologico e colloidale i nanomateriali sintetizzati, è stato investigato il comportamento fotofisico di questi. È infatti noto che i derivati stilbenici eteroaromatici con sostituenti dimetilamminici possiedono interessanti proprietà fotofisiche,¹⁰⁵ derivanti dal loro carattere *push-pull*, dovuto alla presenza nello scheletro di un forte accettore elettronico (il gruppo piridinico) e di un forte donatore (il gruppo dimetilanilिनico).¹⁰⁶ La fluorescenza di queste molecole rappresenta quindi un aspetto interessante per applicazioni antitumorali, poiché potrebbe essere sfruttata per il monitoraggio del sistema *carrier*. A tal fine sono stati registrati gli spettri UV-*vis* e di fluorescenza dei nanomateriali sia in dispersione, a due diversi pH, sia allo stato solido.

Gli spettri UV-*vis* delle dispersioni acquose di HNTs/PB4 e HNTs-Calix/PB4 (1 mg mL⁻¹) mostrano un assorbimento a ca. 500 nm (**Figura 16a**), rispetto allo spettro di PB4 che assorbe a 470 nm. Lo *shift* verso il rosso di 30 nm verosimilmente potrebbe essere attribuito al confinamento della molecola organica nei sistemi a base di HNTs, che forniscono un ambiente più apolare rispetto all'acqua.¹⁰⁷ In accordo con questi risultati, irradiando entrambe le dispersioni a 500 nm si osserva un'intensa emissione a ca. 630 nm, al contrario di quanto osservato per PB4 che emette a ca. 560 nm. Gli spettri dei nanomateriali registrati allo stato solido (**Figura 16b**) mostrano una banda di emissione a ca. 600 nm rispetto all'emissione osservata per PB4 a 660 nm. Contrariamente a quanto accade alla sola molecola, è quindi

possibile concludere che l'emissione di entrambi i nanomateriali non è influenzata dall'assenza di solvente.

Infine, variando il pH del mezzo e registrando gli spettri UV-*vis* delle dispersioni dei nanomateriali in HCl 1.0 N, è stato osservato uno spostamento batocromico della banda di assorbimento a ca. 350 nm ed emissione a ca. 490 nm (**Figura 16c**).

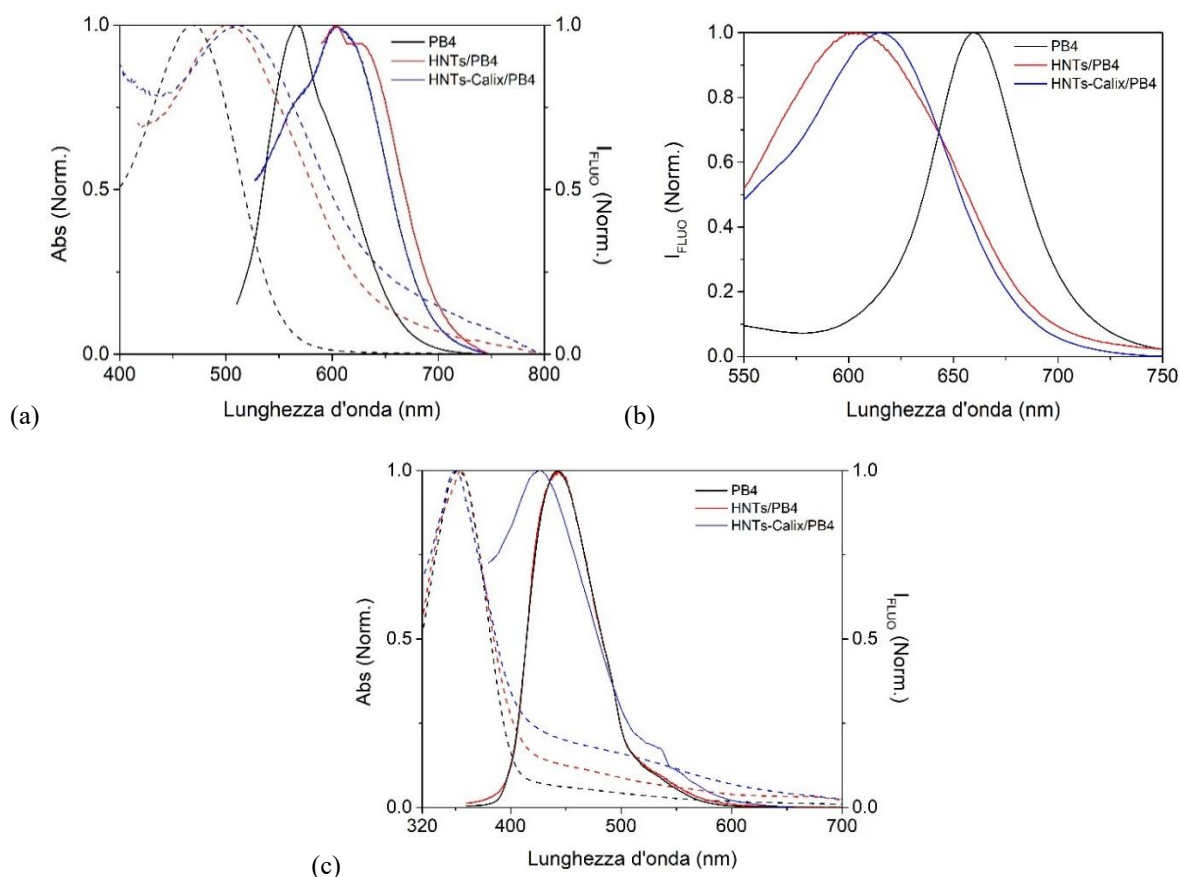


Figura 16. (a) Spettri UV-*vis* (linea tratteggiata) e di fluorescenza (linea continua) di PB4 (30 μ M), HNTs/PB4 (1 mg mL⁻¹) e HNTs-Calix/PB4 (1 mg mL⁻¹) in acqua (pH 7.0) a 25 °C; (b) spettri di fluorescenza allo stato solido di PB4, HNTs/PB4 e HNTs-Calix/PB4; (c) spettri UV-*vis* (linea tratteggiata) e fluorescenza (linea continua) di PB4 (30 μ M), HNTs/PB4 (1 mg mL⁻¹) e HNTs-Calix/PB4 (1 mg mL⁻¹) in HCl 1.0 N a 25 °C.

Lo spostamento verso il blu rispetto al pH neutro è attribuibile alla protonazione del gruppo dimetilamminico, che comporta la perdita del carattere *push-pull* del PB4 monocationico.¹⁰⁸ Gli spettri dei nanomateriali risultano essere molto simili a quelli di PB4, indicando che in ambiente acido l'influenza del *carrier* sulle proprietà spettroscopiche è trascurabile.

Inoltre, l'introduzione della molecola in un *carrier* potrebbe modificarne e modularne le proprietà ottiche, ad esempio modulando la resa quantica di fluorescenza (QY). A tal fine è stata calcolata la resa quantica di fluorescenza in acqua, sia di PB4 che dei nanomateriali, utilizzando come standard la fluoresceina che possiede una QY nota del 98 %. In acqua, la resa quantica di luminescenza del PB4, è di circa il 3 %, mentre aumenta rispettivamente a circa 8 % e 20 % nei casi in cui PB4 si trova caricato in HNTs/PB4 e HNTs-Calix/PB4. Tali risultati

confermano ulteriormente che lo sviluppo di *carrier* a base di halloysite, in particolare quelli multicavità come HNTs-Calix, rappresenta una strategia efficace per migliorare le proprietà chimico-fisiche della molecola.

- Cinetiche di rilascio di PB4 da HNT/PB4 e HNTs-Calix/PB4

Per valutare il potenziale dei nanomateriali ottenuti come *carrier* per farmaci ad attività antitumorale da poter usare in campo biomedico, è stata studiata la cinetica di rilascio di PB4 da HNTs/PB4 e HNTs-Cali/PB4, mediante il metodo della membrana da dialisi, a pH 1.0, per simulare un ambiente acido, e pH 7.0 a 37 °C, per mimare le condizioni fisiologiche. I risultati ottenuti (**Figura 17**) mostrano che il rilascio di PB4 da HNTs/PB4 risulta molto rapido in ambiente acido, raggiungendo la totalità del farmaco rilasciato dal *carrier* dopo circa 200 minuti (**Figura 17a**, linea rossa), al contrario di quanto osservato in condizioni neutre, dove dopo 24 ore solo una piccola quantità di farmaco viene rilasciata (**Figura 17b**, linea rossa). Questo può essere spiegato considerando che, a pH 1.0, PB4 risulta completamente protonato ($pK_a = 2.48$)¹⁰⁸ e gli HNTs si trovano al di sotto del loro punto isoelettrico ($pH = 6.5$) risultando anch'essi quasi completamente protonati.¹⁰⁹ Da questo ne derivano forti repulsioni elettrostatiche tra PB4 e la superficie positiva degli HNTs, che ne accelerano il rilascio della molecola.

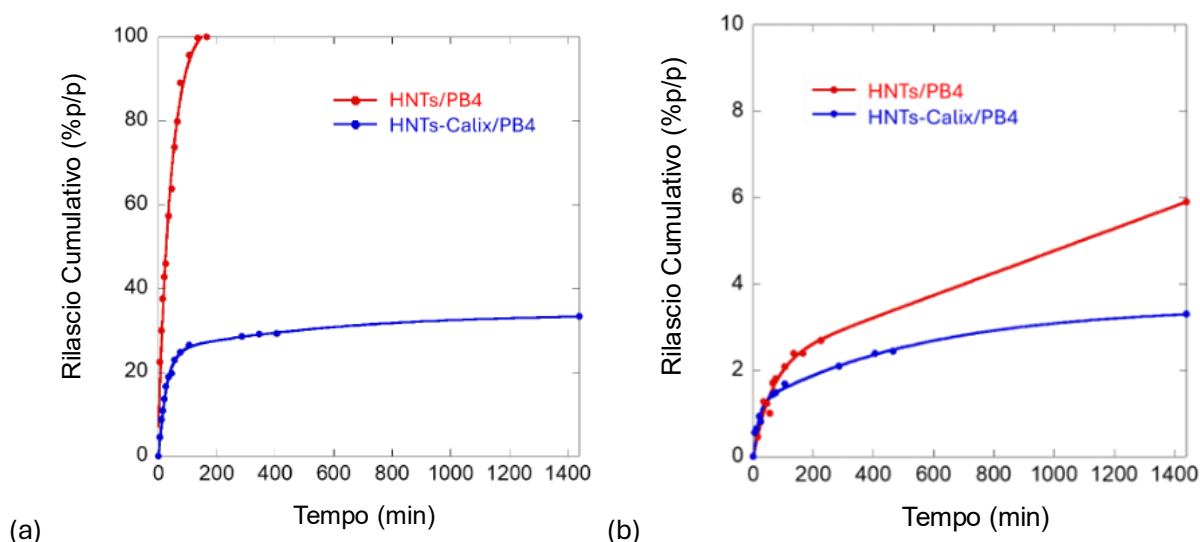


Figura 17. Rilascio cinetico di PB4 da HNTs/PB4 e HNTs-Calix/PB4 in (a) HCl 0.1 M, pH 1.0; (b) acqua a pH 7.0, a 37 °C.

Al contrario il rilascio di PB4 da HNTs-Calix/PB4 mostra un andamento più lento nelle stesse condizioni, poiché a pH 1.0 e dopo 24 ore, solo il 30 % della molecola caricata viene rilasciato (**Figura 17a** linea blu). Questo diverso comportamento, più lento e controllato, può essere

attribuito all'affinità di PB4 per la cavità del calix[5]arene.^{102,110} In condizioni neutre, entrambi i nanomateriali mostrano un rilascio molto limitato, pari a ca. il 5 % in 24 ore, in accordo con la bassa solubilità di PB4 in acqua (**Figura 17b**, linee rossa e blu).

Al fine di ottenere informazioni sul meccanismo di rilascio, i dati cinetici sono stati analizzati utilizzando diversi modelli matematici: il modello del primo ordine, il modello *Power-Fit* e il modello DEM. Come riportato in **Tabella 4**, il rilascio di PB4 da HNTs/PB4 a entrambi i pH segue il modello del primo ordine, indicando una diffusione della molecola dal *carrier*.

Tabella 4. Parametri cinetici per il rilascio di PB4 da HNTs/PB4 e HNTs-Calix/PB4 a pH 1.0 e pH 7.4.

Nanomateriali	pH	DEM			First order		Power Fit		
		k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)	R ²	k_1 (min ⁻¹)	R ²	k_F (min ⁻¹)	n	R ²
HNTs/PB4	1.0	n.a.	n.a.	/	0.026± 0.002	0.9806	12±1	0.42±0.03	0.9746
	7.0	n.a.	n.a.	/	0.0038 ± 0.0005	0.9473	0.26±0.03	0.43±0.02	0.9799
HNTs- Calix/PB4	1.0	0.038 ± 0.001	0.0017 ± 0.0006	0.9974	0.029 ± 0.002	0.9796	8±1	0.02±0.03	0.8765
	7.0	0.06 ± 0.01	0.0017 ± 0.0004	0.9888	0.013 ± 0.003	0.8792	0.38±0.03	0.30±0.01	0.9894

Diversamente, il rilascio da HNTs-Calix/PB4, in entrambe le condizioni di pH investigate, si adatta meglio al modello DEM, suggerendo una diffusione da superfici con differenti interazioni, cioè sia dalle superfici degli HNTs sia dalla cavità calix[5]arene. Questa ipotesi è supportata dal valore delle costanti cinetiche ottenute ($k_2 < k_1$), che evidenziano un rilascio più lento (k_2) di PB4 dalla cavità del calix[5]arene, dove le interazioni *host-guest* sono più forti, mentre il rilascio più veloce (k_1) è attribuibile al PB4 adsorbito sulle superfici degli HNTs.¹¹¹ In sintesi, la funzionalizzazione covalente degli HNTs con un calixarene, si è rivelata efficace nel modulare il profilo di rilascio di PB4, conferendo al nanomateriale una maggiore capacità di trattenere la molecola controllandone maggiormente il rilascio. Tuttavia, come noto, PB4 è scarsamente solubile in acqua e la sua presenza sulla superficie esterna degli HNTs in entrambi i nanomateriali sviluppati potrebbe limitarne l'effettivo utilizzo in campo biomedico. Come discusso in precedenza, infatti, entrambi i nanomateriali hanno mostrato una bassa diffusione in ambiente acquoso (come evidenziato dalle misure DLS). Inoltre, le misure turbidimetriche (**Figura 18**) hanno messo in evidenza che, rispetto agli HNTs non modificati,¹¹² entrambi i nanomateriali presentano una stabilità acquosa inferiore.

In quest'ottica, per una loro futura applicazione *in vitro* risulta essenziale incrementare la stabilità colloidale del sistema, traguardo che può essere raggiunto ad esempio, mediante l'impiego di idrogel all'interno dei quali i nanomateriali possono essere dispersi.

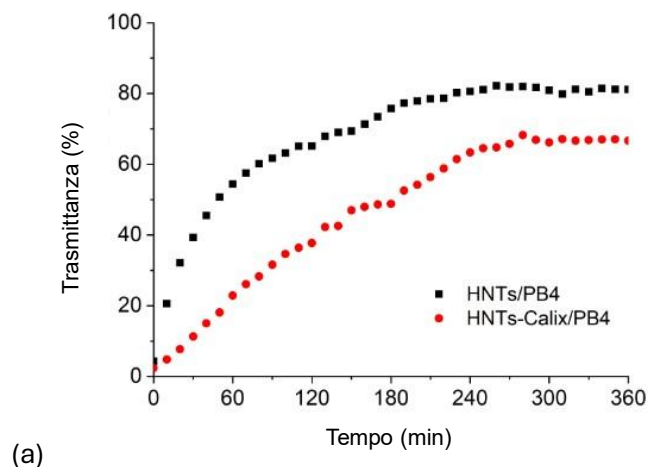


Figura 18. (a) Andamento della trasmittanza in funzione del tempo per dispersioni acquose di HNTs/PB4 e HNTs-Calix/PB4. La concentrazione dei nanomateriali è pari a 1 mg mL^{-1} in entrambi i casi.

2.5. Idrogel per il drug carrier di molecole di origine sintetica

Gli idrogel rappresentano una delle piattaforme più promettenti per il rilascio controllato di farmaci grazie alla loro elevata capacità di assorbire acqua,¹¹³ alla consistenza soffice e alla porosità che li rendono in grado di mimare i tessuti biologici.^{114,115} In particolare, gli idrogel supramolecolari a base inorganica hanno attirato grande interesse, poiché coniugano la reversibilità del processo sol-gel con la possibilità di modulare le proprietà del materiale in funzione dell'applicazione desiderata.¹¹⁶

Tra i sistemi più studiati, la Laponite® (Lap) è un'argilla sintetica appartenente al gruppo delle smectiti, capace di formare idrogel stabili e tissotropici in ambiente acquoso grazie all'autoassemblaggio dei suoi nanodischi attraverso meccanismi di aggregazione faccia-bordo.¹¹⁷ Questi idrogel si distinguono per la biocompatibilità e la biodegradabilità¹¹⁸ La Lap si è dimostrata un eccellente candidato per il *drug carrier* di diversi farmaci, l'itraconazolo, la ciprofloxacina e il desametasone.^{119,120}

Ad esempio, Wang *et al.*, hanno realizzato un sistema multifunzionale per autoassemblaggio di poli(N-vinilpirrolidone) (PVP) sulla superficie della Lap, e senza impiego di solventi organici (**Figura 19**). In questi sistemi il farmaco, nel caso specifico la DOXO, può essere caricato tramite interazioni elettrostatiche con la superficie della Lap. Inoltre, la presenza del PVP fa sì

che questi sistemi risultino sensibili al pH e alla temperatura, tanto che in condizioni fisiologiche, il sistema LAP/PVP/DOXO risulta essere stabile, mentre in condizioni acide, come quelle tipiche dei tumori solidi, in conseguenza alla protonazione delle catene del PVP, la DOXO viene facilmente rilasciata.¹²¹

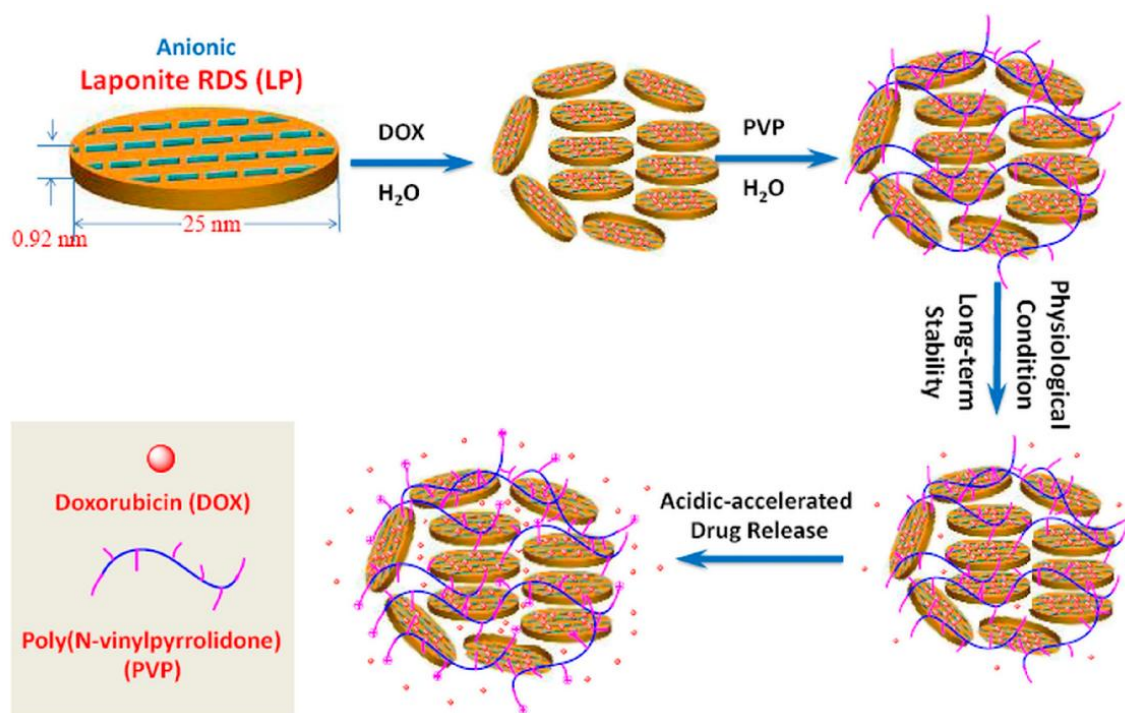


Figura 19. Rappresentazione schematica dello sviluppo dei nanocompositi LAP/PVP/DOXO (immagine di Wang *et al.*, 2016)¹²¹.

2.5.1. Idrogel di Laponite® e HNTs per la realizzazione di sistemi iniettabili ad attività antitumorale

Recentemente è stato dimostrato che l'introduzione di halloysite, modificata e non, come *filler* nella matrice di Lap consente di ottenere idrogel stabili, che mantengono le proprietà dei sistemi originali e al tempo stesso migliorano le prestazioni in termini di caricamento e rilascio dei principi attivi.¹²² Gli idrogel a base di Lap rappresentano sistemi di grande interesse per formulazioni iniettabili grazie alle loro peculiari proprietà reologiche. Essi mostrano un comportamento *shear-thinning*, che consente il passaggio attraverso un ago mediante una temporanea riduzione della viscosità,¹²³ seguito dal recupero immediato della consistenza gelatinosa una volta cessato lo sforzo.¹²⁴ Sulla base di questo, sono stati sviluppati dei gel a base di Lap al fine di migliorare la stabilità dei sistemi HNTs/PB4 e HNTs-Calix/PB4 precedentemente descritti, e migliorarne significativamente la stabilità al fine di ottenere una formulazione iniettabile ad attività antitumorale. Per testare il loro potenziale come sistemi di

drug delivery per il rilascio di agenti tumorali scarsamente solubili, sono stati effettuati dei test di vitalità cellulare *in vitro*.

- **Ottenimento dei gel Lap/HNTs/PB4 e Lap/HNTs-Calix/PB4**

I gel sono stati ottenuti seguendo una procedura già riportata in letteratura per la preparazione di idrogel tissotropici a base di Lap,¹¹² con una piccola modifica mirata all'introduzione e omogenea dispersione dei nanomateriali HNTs/PB4 e HNTs-Calix/PB4.

Le prove sperimentale condotte sui gel di Lap/HNTs/PB4 e Lap/HNTs-Calix/PB4 hanno mostrato come tali sistemi siano in grado di autoripararsi dopo sollecitazioni meccaniche (**Figura 20a e b**), un comportamento che conferma la loro natura tissotropica e che rappresenta una caratteristica fondamentale per il loro impiego. Questo comportamento è stato ulteriormente confermato dalla stabilità osservata sotto irradiazione a ultrasuoni, condizioni che simula stress esterni a cui un materiale destinato ad applicazioni biomediche potrebbe essere esposto.¹¹²

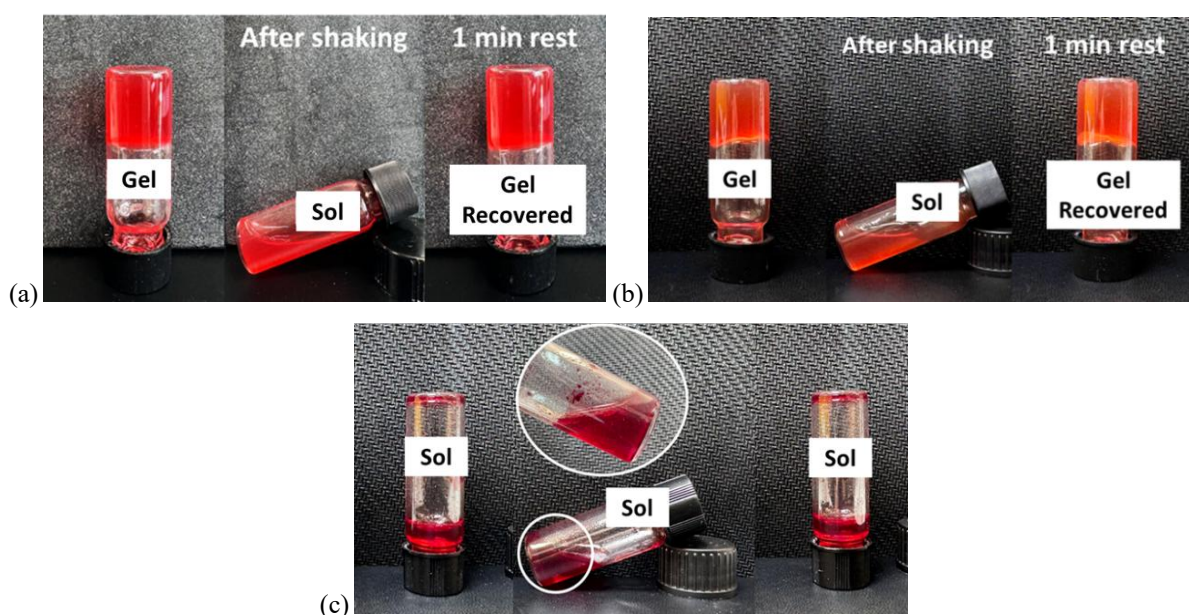


Figura 20. Immagini degli idrogel ottenuti in presenza di (a) HNTs/PB4; (b) HNTs-Calix/PB4 e (c) PB4 come *filler*.

Tramite la stessa procedura, ma utilizzando PB4 tal quale, senza un nanomateriale di supporto, non si è osservata la formazione di idrogel stabili (**Figura 20c**). Questi risultati sottolineano ancora una volta l'importanza degli HNTs e in questo caso del nanomateriale HNTs-Calix come *filler* per il caricamento e l'incorporazione di farmaci idrofobici all'interno di idrogel. Questi sistemi, infatti, non solo migliorano la dispersione di PB4 in ambiente acquoso, superando i

limiti derivanti dalla sua natura fortemente idrofobica, ma agiscono come veri e propri ponti fisici tra la molecola e la matrice polimerica idrofilica.

- ***Attività antiproliferativa dei nanomateriali su linee cellulari tumorali MCF-7***

Al fine di esplorare la possibilità di utilizzare gli idrogel sviluppati come sistemi ad attività antitumorale, ne sono stati valutati gli effetti antiproliferativi sulla linea cellulare tumorale MCF-7 mediante saggio MTS. Sia gli HNTs sia la Laponite® non hanno mostrato tossicità nell'intervallo di concentrazione investigato. I valori di IC₅₀ ottenuti sono riportati in **Tabella 5**. Come si può osservare, entrambi gli idrogel mostrano una promettente attività citotossica, con il sistema Lap/HNTs/PB4 più attivo rispetto a Lap/HNTs-Calix/PB4. In confronto alle molecole di PB4 libere, solubilizzate in DMSO, che hanno evidenziato un IC₅₀ inferiore a 5 µM, i risultati ottenuti sono da considerarsi incoraggianti, poiché mettono in luce la possibilità di veicolare il PB4 in mezzi acquosi, aprendo così la strada a futuri test *in vivo*.

Tabella 5. Valori di IC₅₀ degli idrogel a base di Laponite® sviluppati.

Nanomateriali	IC ₅₀ (µM)
Lap/HNTs/PB4	10.0
Lap/HNTs-Calix/PB4	21.0

La maggiore citotossicità osservata per il sistema Lap/HNTs/PB4 rispetto a Lap/HNTs-Calix/PB4 può essere attribuita alle differenti cinetiche di rilascio del PB4. Mentre gli HNTs funzionalizzati con calix[5]arene garantiscono interazioni *host-guest* più forti, che favoriscono l'incapsulamento e la stabilizzazione del PB4, queste stesse interazioni possono rallentare il rilascio nelle condizioni del saggio. Al contrario, il PB4 adsorbito sugli HNTs pristine risulta più prontamente disponibile, determinando una risposta citotossica più immediata. Tali risultati suggeriscono che i due sistemi offrano profili di rilascio complementari: la formulazione Lap/HNTs/PB4 assicura una disponibilità più rapida del farmaco, mentre Lap/HNTs-Calix/PB4 garantisce un rilascio più controllato e prolungato. Questa modulazione rappresenta un vantaggio strategico, potenzialmente sfruttabile in diversi contesti terapeutici.

2.5.2. Idrogel di Laponite® e complessi supramolecolari per applicazioni topiche

Negli ultimi anni gli idrogel a base di Lap hanno suscitato un crescente interesse anche per applicazioni topiche, non solo per formulazioni iniettabili, in particolare per la somministrazione di antiinfiammatori, antitumorali e antibiotici.^{125,126} Grazie alle loro proprietà questi sistemi sono molto adatti alla somministrazione cutanea poiché permettono un rilascio mirato direttamente nel sito di applicazione.¹¹⁸ Ad esempio, Javanshir *et al.* hanno sviluppato idrogel sensibili al pH a base di chitosano/Laponite/idrossiapatite caricati con ofloxacin, dimostrando l'elevata capacità del sistema di incapsulare il farmaco e rilasciarlo in modo controllato, sottolineandone il potenziale uso topico come antibatterico.¹²⁷ In ambito antinfiammatorio, Fraile *et al.* hanno studiato l'uso della Lap come *carrier* per il desametasone, mostrando come il farmaco possa essere caricato e trattenuto dal sistema tramite la formazione di legami a idrogeno, con successivo rilascio controllato in modelli di umor vitreo, aprendo prospettive per applicazioni oftalmologiche.¹²⁰ Sempre nello stesso ambito, Zhou *et al.* hanno proposto un gel di Laponite® contenente simvastatina, valutato per il trattamento topico del melanoma cutaneo, che ha evidenziato efficacia nel rilascio localizzato e nella riduzione dell'infiammazione.¹²⁸

L'impiego di complessi supramolecolari in formulazioni o sistemi nanostrutturati di *drug carrier*, si è dimostrata essere, come visto precedentemente una mossa vincente.^{21,129} Data la loro capacità di instaurare interazioni non covalenti altamente specifiche con molecole poco solubili questi sistemi supramolecolari possono essere utilizzati per ottenere sistemi innovativi per specifiche applicazioni in ambito medico.¹²⁹⁻¹³¹ A tal proposito, integrando questi negli idrogel a base di Laponite®, si riescono a combinare le proprietà dei gel con la selettività chimica dei macrocicli, generando sistemi ibridi multifunzionali.¹³² Ad esempio, Liao *et al.*, hanno riportato la realizzazione di un sistema ibrido basato sull'interazione *host-guest* tra la β -ciclodestrina (β -CD) e l'azobenzene in idrogel di Lap. In questo caso l'azobenzene ha mostrato riuscire ad inserirsi nella cavità della β -CD formando un complesso supramolecolare la cui stabilità è stata aumentata dal suo inserimento nel gel; l'isomerizzazione trans-cis indotta da radiazione UV rompe l'interazione *host-guest*, conferendo al gel un comportamento foto- e pH-responsivo, particolarmente utile per applicazioni topiche.¹³³

In un altro studio, Liu *et al.*, hanno sviluppato idrogel ottenuti dall'interazione elettrostatica tra un derivato cationico della β -CD complessato con ioni rame (II), e la Lap, la cui struttura altamente reticolata potrebbe essere utilizzata per il rilascio mirato di farmaci.¹³⁴ Infine, sempre il gruppo di Liu *et al.*, hanno introdotto nei gel di Lap, il cucurbit[7]uril (CB[7]), in grado di

complessare dicianostilbeni aromatici nella sua cavità tramite interazioni idrofobiche e forze di van der Waals, stabilizzati da legami a idrogeno con i gruppi carbonilici presenti sui bordi del macrociclo.¹³⁵ Queste caratteristiche rendono i CBs candidati ideali per lo sviluppo di idrogel funzionalizzati, nei quali l'inclusione di farmaci consente non solo di migliorarne la solubilità e la stabilità, ma anche di modulare le cinetiche di rilascio in funzione dell'ambiente fisiologico.

A seconda del numero di unità di glicolurile, i cucurbituril presentano differenti valori di solubilità in acqua,¹³⁶ motivo per cui il CB[7] (20–30 mM) è il più utilizzato, rispetto ad esempio al CB[6] che mostra una solubilità acquosa inferiore (0.018 mM).¹³⁷ Tuttavia, rispetto a quest'ultimo, il CB[6] risulta più economico (~100 €/g contro ~300 €/100 mg rispettivamente per CB[6] e CB[7]) e di più facile sintesi.¹³⁸

Alla luce di queste premesse, combinando le due possibilità appena descritte, è stato sviluppato un idrogel a base di Laponite® contenente un complesso supramolecolare CB[6] e acido flufenammico (FFA) (**Figura 21**), un antinfiammatorio non steroideo (NSAID) largamente utilizzato.

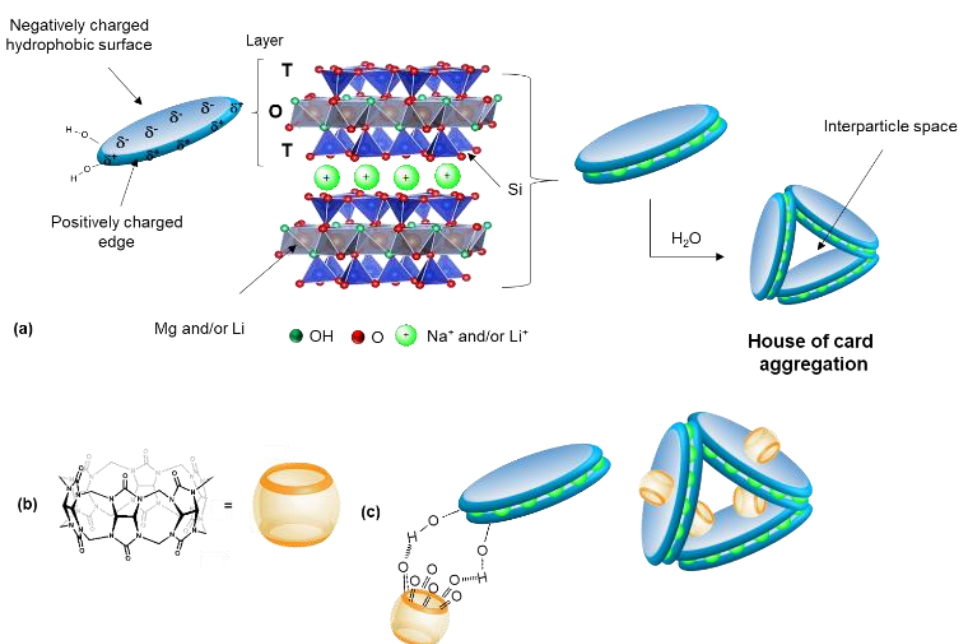


Figura 21. Rappresentazione schematica di (a) struttura della Lap, (b) struttura del CB[6]; (c) possibili modalità di interazione tra Lap e CB[6].

L'obiettivo è stato quello di combinare le proprietà reologiche e di rilascio prolungato tipiche degli idrogel di Lap con la capacità dei CBs di migliorare la stabilità e la biodisponibilità del FFA, così da ottenere un sistema innovativo ad uso topico.

- **Interazione supramolecolare tra l'FFA e i CBs**

In primo luogo, è stata valutata e studiata la formazione di due complessi supramolecolari, utilizzando come *guest* l'FFA e come *host* due diversi CBs, il CB[6] e il CB[7], al fine di identificare il miglior candidato per l'inserimento di esso all'interno dell'idrogel di Lap. L'interazione supramolecolare tra l'acido flufenammico e i due diversi *host* è stata investigata tramite una titolazione spettrofotometrica UV-*vis* in ambiente acquoso, mantenendo costante la concentrazione di *guest*. (**Figura 22**). In entrambi i casi l'aggiunta di CB[6] e CB[7] a soluzioni di FFA ha determinato un abbassamento del pH fino a un valore finale di 4.0. In **Figura 22a** e **b** sono riportati gli spettri UV-*vis* dell'FFA in funzione della concentrazione di CB[6] o CB[7]. Nel primo caso la formazione del complesso *host-guest* ha portato ad un aumento dell'assorbanza di FFA, riconducibile alla formazione di complessi a stechiometria 1:1 come suggerito dai risultati ottenuti analizzando il diagramma di Job riportato in **Figura 22c**.

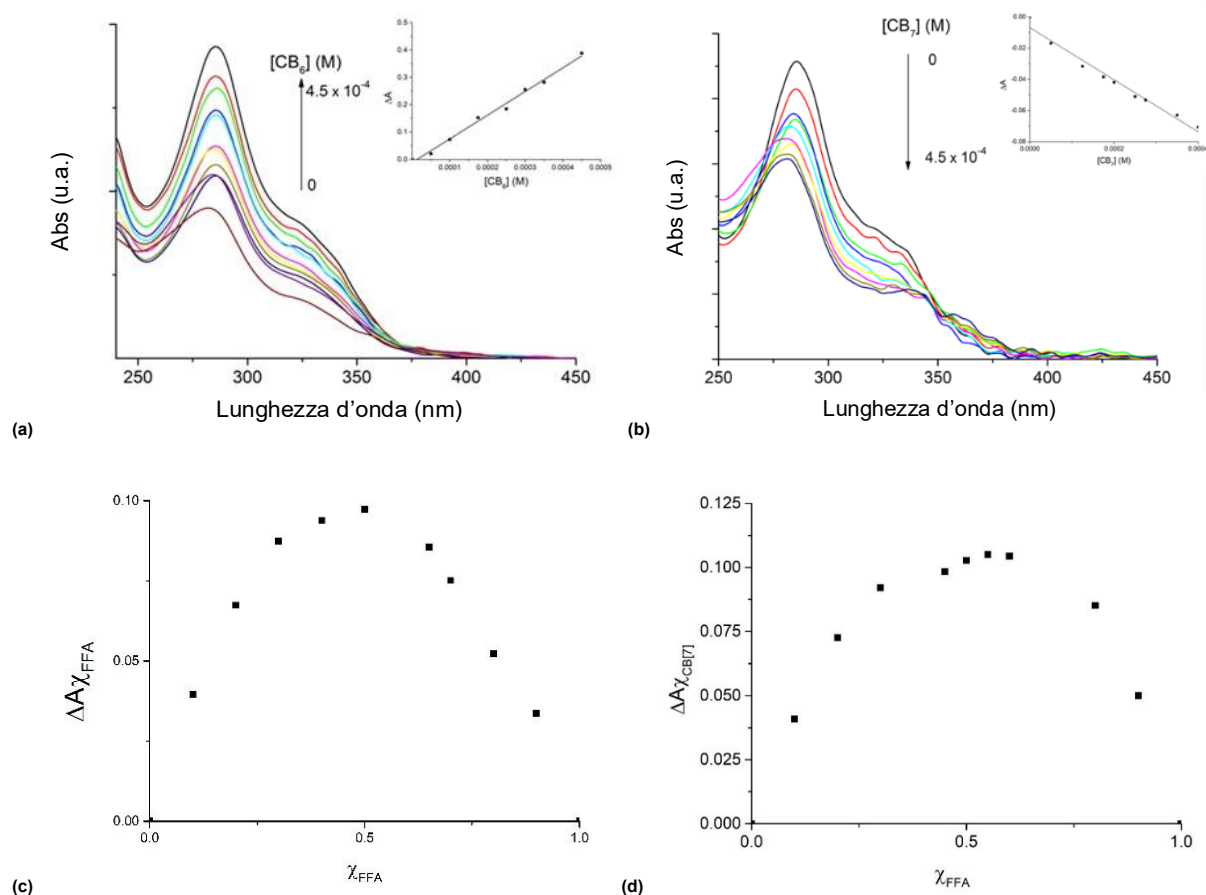


Figura 22. (a-b) Andamento degli spettri UV-*vis* di FFA (2 × 10⁻⁵ M) in funzione della concentrazione di (a) CB[6] e (b) CB[7] (intervallo 5 × 10⁻⁵ M - 4.5 × 10⁻⁴ M); (c) diagramma di Job relativo alla complessazione di FFA con CB[6] e (d) CB[7] in acqua a 25 °C.

Tuttavia, le condizioni sperimentali utilizzate e la leggera asimmetria del grafico non permettono di escludere la possibilità di una stechiometria diversa, come ad esempio di tipo 2:1 (CB[6]/FFA).¹³⁹ Al contrario nel caso di CB[7], all'aumentare della sua concentrazione, è stata osservata una diminuzione dell'assorbanza di FFA (**Figura 22b**) contestualmente alla formazione di un precipitato bianco. Nonostante, infatti, sia nota la maggiore solubilità del CB[7] rispetto al CB[6], i due sistemi mostrano un comportamento opposto, in cui il CB[6] aumenta la propria solubilità man mano che complessa l'FFA, e il CB[7] la diminuisce. Questo fenomeno potrebbe essere dovuto alla formazione di un complesso insolubile a stechiometria 1:2 (FFA/CB[7]/FFA) (**Figura 22d**). Questa ipotesi è stata confermata effettuando dei test di solubilità che consentono di valutare come la presenza dell'*host* influenzi la solubilità del farmaco o della molecola *guest*, mettendo in evidenza eventuali miglioramenti o peggioramenti della sua biodisponibilità. I diagrammi di fase ottenuti da tali misure permettono di classificare il tipo di interazione secondo modelli standard (es. tipo A o B), distinguendo tra complessi solubili e insolubili in funzione della concentrazione dell'*host*.¹⁴⁰ In **Figura 23a** si osserva come la solubilità di FFA aumenti progressivamente contestualmente all'aumento della concentrazione di CB[6], come evidenziato dal diagramma di fase di tipo A-L ottenuto, al contrario del CB[7], dal quale si ottiene un diagramma di fase di tipo B-I caratteristico della formazione di complessi insolubili in acqua.¹⁴¹ Alla luce dei risultati ottenuti dalle misure spettrofotometriche condotte sui due complessi, e che hanno evidenziato la scarsa solubilità del complesso CB[7]/FFA, è stato selezionato per la messa a punto del sistema il complesso CB[6]/FFA caratterizzato da una migliore solubilità. Al fine di confermare la stechiometria del complesso e per quantificarne la sua stabilità, è stata usata l'equazione di Benesi-Hildebrand che viene spesso utilizzata per studiare i complessi *host-guest*. Tramite la seguente equazione è stato possibile calcolare la costante di associazione (K) del complesso CB[6]/FFA:

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \epsilon K [Guest]} \times \frac{1}{[Host]} + \frac{1}{\Delta \epsilon} \quad (\text{Eq. 1})$$

dove ΔA rappresenta la differenza di assorbanza dell'FFA in presenza e in assenza di CB[6], $\Delta \epsilon$ è la differenza del coefficiente di assorbimento molare dell'FFA in presenza e assenza di CB[6], mentre $[Guest]$ e $[Host]$ indicano rispettivamente la concentrazione di FFA e CB[6]. La linearità del grafico ottenuto (**Figura 23b**), riportando $1/\Delta A$ in funzione di $1/[CB]$, ha confermato la stechiometria 1:1 del complesso. Inoltre, dal rapporto tra l'intercetta e il coefficiente angolare della retta, è stata calcolata la costante di associazione del complesso che è risultata essere pari a $K = 3341 \pm 299 \text{ M}^{-1}$. L'esperimento è stato inoltre ripetuto a diverse

temperature, al fine di calcolarne la stabilità a 25, 30 e 40 °C, e i risultati sono riportati in **Tabella 6**.

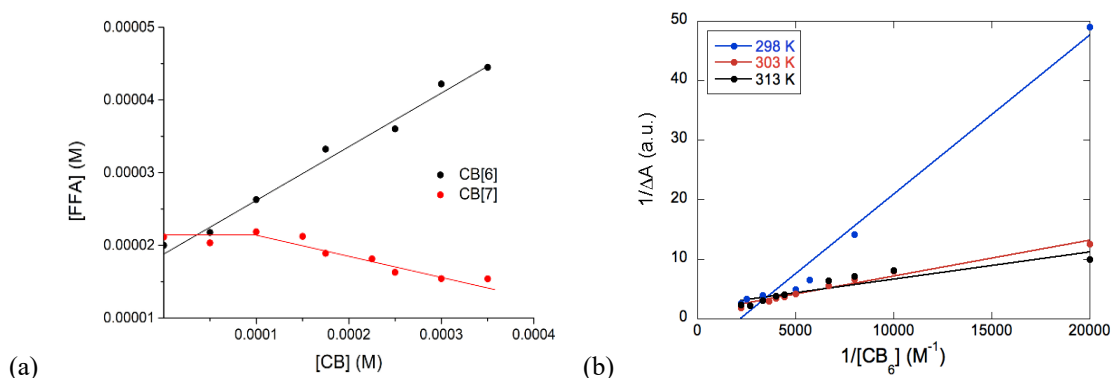


Figura 23. (a) Diagrammi di solubilità di fase di FFA in presenza di CB[6] e CB[7] e (b) grafico dei valori di $1/\Delta A$ in funzione della concentrazione di $1/\text{CB}[6]$ per la determinazione della costante di associazione (K) a diverse temperature.

Applicando l'equazione di vant'Hoff, (**Appendice C, Figura C1**) sono stati calcolati i parametri termodinamici, che rivestono un ruolo fondamentale poiché consentono di chiarire i meccanismi che governano la formazione dei complessi. Tramite questi parametri è possibile distinguere se la formazione del complesso è guidato da contributi entalpici, ovvero legami a idrogeno e interazioni di van der Waals, o entropici, quali effetti idrofobici e rilascio di molecole d'acqua.¹⁴²

Tabella 6. Parametri termodinamici per la formazione del complesso supramolecolare CB[6]/FFA a diverse temperature.

T / K	K / M ⁻¹	ΔG^0 / kJ mol ⁻¹	From Van't Hoff plot	
			ΔH^0 / kJ mol ⁻¹	ΔS^0 / kJ mol ⁻¹ K ⁻¹
			-64	-0.15
298	3341	-19.45		
303	2016	-18.55		
313	878	-17.05		

I valori ottenuti (**Tabella 6**) hanno evidenziato che la formazione del complesso CB[6]/FFA è un processo spontaneo ed esotermico, guidato quindi dall'entalpia,¹⁴³ come suggerito dai valori negativi di ΔG^0 e ΔH^0 . Per chiarire le interazioni supramolecolari tra FFA e CB[6], sono stati eseguiti studi di modellistica atomica. La struttura ottimizzata di FFA (**Figura 24a**) evidenzia una conformazione distorta con i due anelli aromatici non complanari tra loro; nel suo sale

sodico (NaFF), il catione Na^+ si coordina al gruppo carbossilato ed è stabilizzato da un legame a idrogeno intramolecolare (**Figura 24b e c**). Il sale sodico è stato utilizzato per il calcolo poiché a $\text{pH} = 4.0$, valore prossimo al pK_a della FFA (4.09), coesistono in soluzione sia la forma neutra sia quella deprotonata; usare il NaFF nei calcoli permette di riflettere questa distribuzione e modellare le interazioni ioniche reali con il CB[6]. Dal calcolo è emerso che il CB[6] presenta una cavità di circa $12.4 \text{ \AA}$ con i gruppi carbonilici orientati verso l'esterno; analogamente, anche i legami C–H guardano verso l'esterno, bilanciando le interazioni elettrostatiche con gli ossigeni carbonilici (**Figura 24d**).

Nel complesso di inclusione CB[6]/NaFF (**Figura 24e**), la porzione polare (Na-carbossilato) penetra nella cavità, mentre l'anello trifluorometilfenilico resta esterno. La cavità del CB[6] si adatta alla forma dell'*host*, assumendo una geometria leggermente ellissoidale, e il sistema viene stabilizzato da interazioni elettrostatiche e da legami a idrogeno.

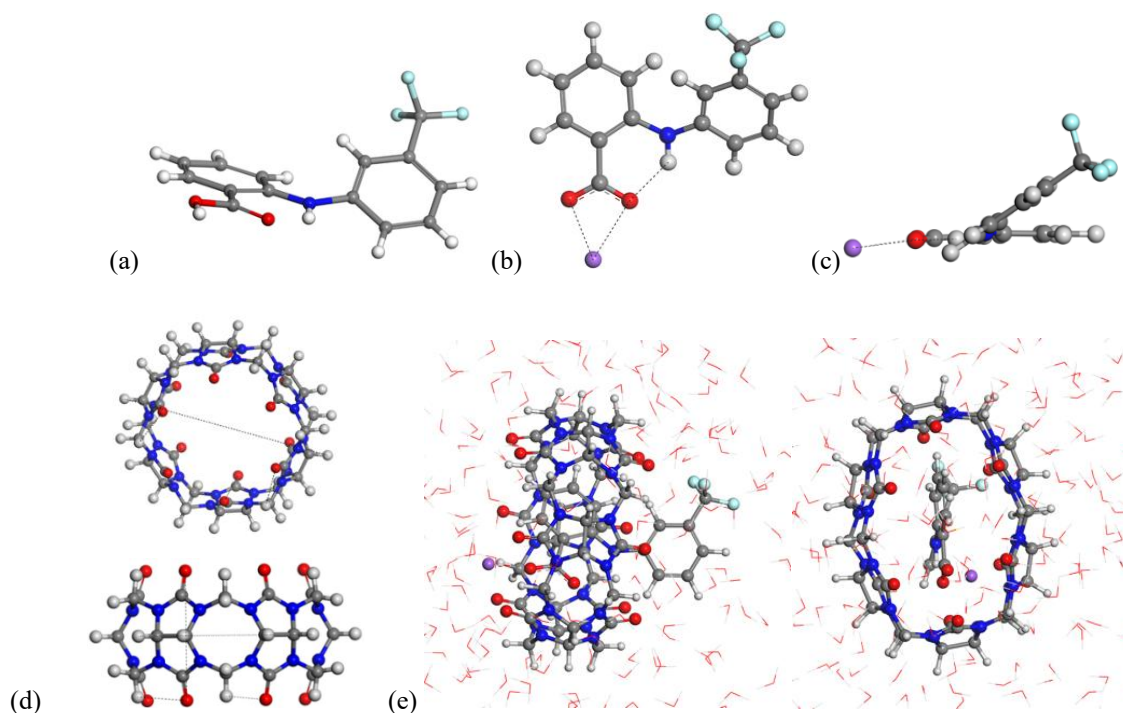


Figura 24. Struttura molecolare ottimizzata di (a) FFA, (b–c) NaFF, (d) CB[6] e complesso di inclusione CB[6]/NaFF completamente ottimizzato in presenza di 233 molecole d'acqua. Gli atomi di Na, H, C, N, O e F sono rappresentati rispettivamente in viola, bianco, grigio, blu, rosso e azzurro chiaro. Le principali interazioni non covalenti sono evidenziate con linee tratteggiate.

Oltre ai calcoli di modellistica atomica, il complesso CB[6]/FFA è stato studiato anche mediante spettroscopia ^1H -NMR (**Figura 25 e Figura 26**), la quale ha evidenziato che l'incapsulamento della FFA all'interno della cavità del CB[6] induce uno spostamento verso campi alti di tutti i protoni del CB[6] (**Figura 25a**).

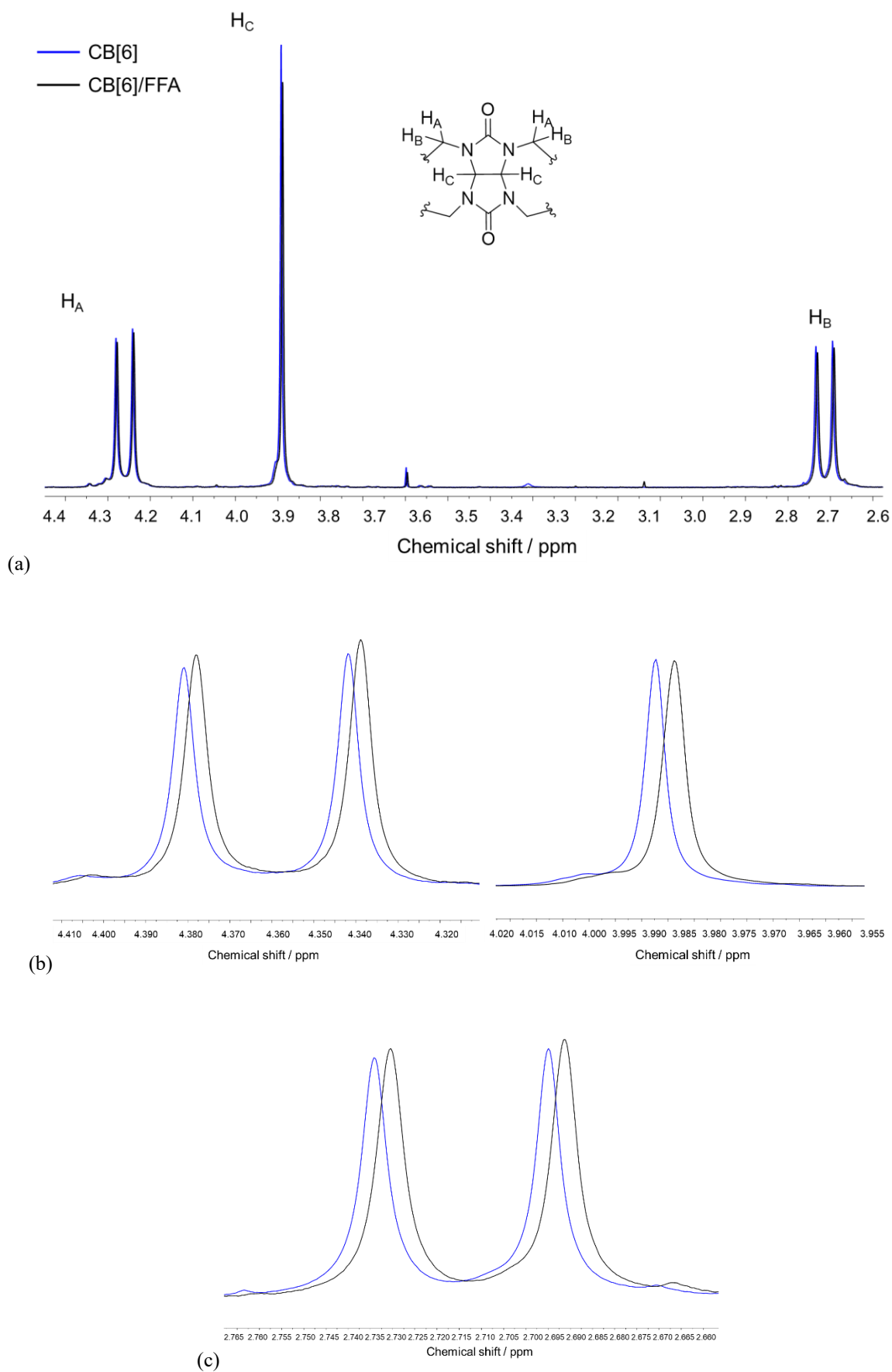


Figura 25. Spettri ^1H -NMR di (a-c) CB[6] e del complesso CB[6]/FFA in $\text{D}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$ (1:1).

Dai risultati ottenuti è stato possibile ipotizzare che non vi sia una preferenza di inclusione di un particolare anello aromatico della FFA nella cavità del CB[6], poiché sono stati osservati spostamenti di entità simile sia per i protoni appartenenti al frammento trifluorofenilico sia per quelli dell'acido benzoico (**Figura 26**). Risultati analoghi sono stati riportati per la complessazione della FFA nella cavità della β -ciclodestrina.¹⁴⁴

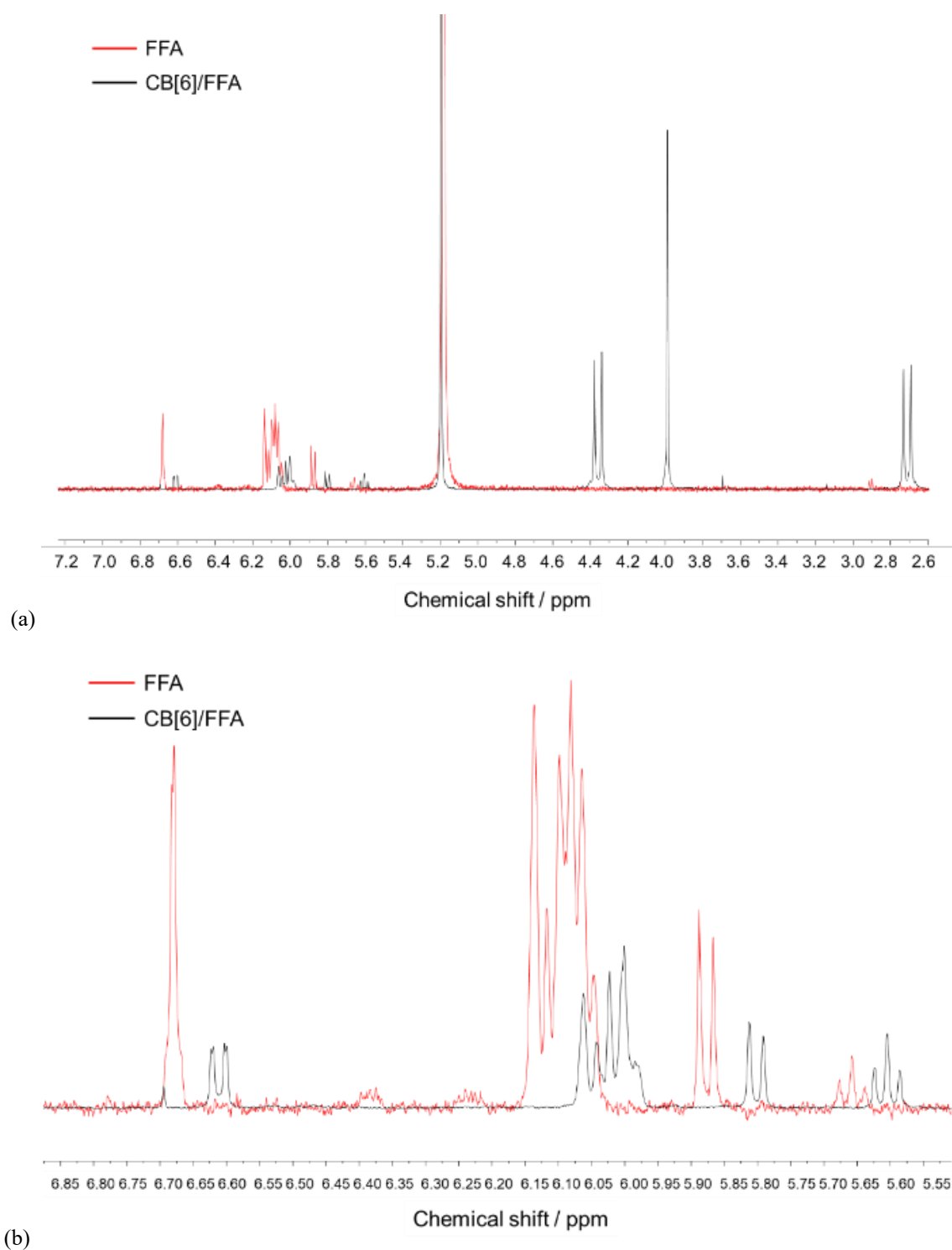


Figura 26. Spettri ^1H -NMR di FFA e del complesso CB[6]/FFA registrati in $\text{D}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$ (1:1).

L'insieme delle evidenze sperimentali e computazionali ha quindi confermato che il complesso CB[6]/FFA possiede buone caratteristiche di stabilità e solubilità in ambiente acquoso, risultando idoneo a essere integrato in matrici nanostrutturate. Per tradurre queste proprietà in un sistema di rilascio topico, il complesso è stato successivamente incorporato in un idrogel a base di Lap, scelto come piattaforma per valutarne le potenzialità applicative (**Figura 27a**).

- **Formazione del gel Lap/CB[6]/FFA e studio delle sue proprietà**

Per la preparazione del sistema Lap/CB[6]/FFA, ad una soluzione acquosa di CB[6]/FFA è stata aggiunta Lap in polvere, e la miscela è stata lasciata sotto agitazione fino alla formazione del gel.

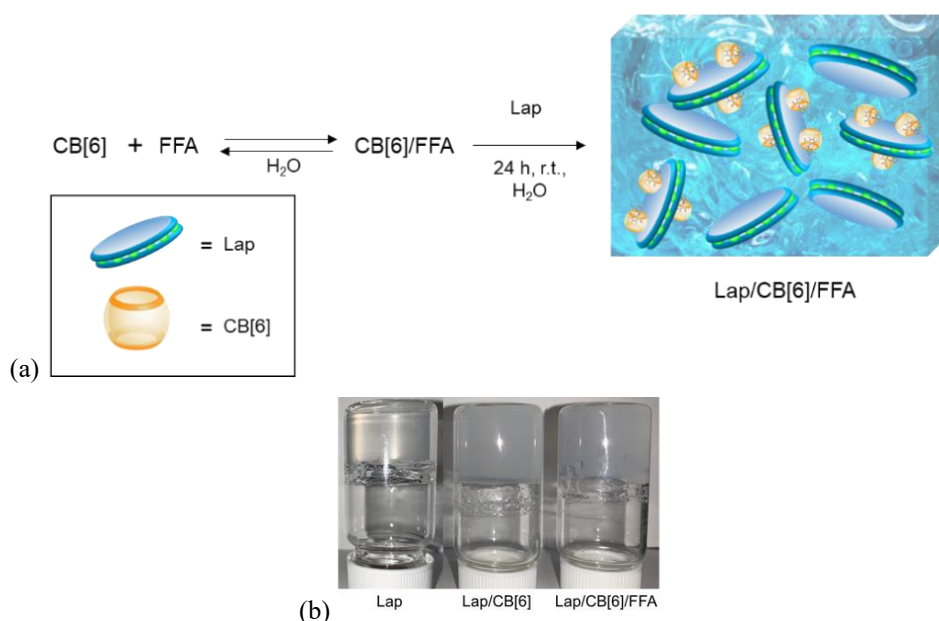


Figura 27. (a) Rappresentazione schematica della sintesi degli idrogel Lap/CB[6]/FFA; (b) immagini degli idrogel ottenuti.

Tipicamente le dispersioni acquose di Lap durante questo processo perdono progressivamente la loro mobilità fino a generare un gel trasparente, fenomeno attribuibile alla formazione della tipica struttura "house of cards".³⁴ L'aggiunta di CB[6] ha facilitato la formazione del gel, producendo dei gel opachi (**Figura 27b**), e lo stesso comportamento è stato osservato utilizzando il complesso CB[6]/FFA. Come osservato per sistemi simili, anche i gel Lap/CB[6] e Lap/CB[6]/FFA mostrano un comportamento tissotropico in seguito a rottura meccanica e irradiazione a ultrasuoni, suggerendo che l'introduzione di un macrociclo o di un complesso supramolecolare non produce significanti effetti sulla struttura reticolata del gel.³⁴

Per chiarire e studiare la natura e la modalità di interazione tra CB[6] e Lap, sono state effettuate delle misure di DLS e potenziale- ζ , utilizzando delle dispersioni acquose a concentrazioni di Lap superiori a quelle critiche di gelificazione, e applicando l'equazione di Stokes-Einstein per stimare il diametro idrodinamico apparente delle nanoparticelle (D). Questo è risultato essere pari a ca. 190 ± 2 nm per la Lap pura, con un indice di PDI di 0.240, e 360 nm e PDI di 0.399 per la miscela Lap/CB[6]. Questo lieve aumento può essere spiegato ipotizzando la presenza di molecole di CB[6] distribuite tra i nanodischetti di Lap, per via delle interazioni supramolecolari, quali legami a idrogeno e attrazione elettrostatiche, che vi sono tra le superfici cariche negativamente della Lap e i dipoli dei gruppi carbonilici dei CB[6]. I valori di potenziale- ζ ottenuti per il sistema Lap/CB[6] e Lap (rispettivamente -28.7 mV e -28.4 mV), inoltre, hanno permesso di escludere l'intercalazione del macrociclo negli interstrati dell'argilla dal momento che la carica superficiale complessiva di questa non viene influenzata.

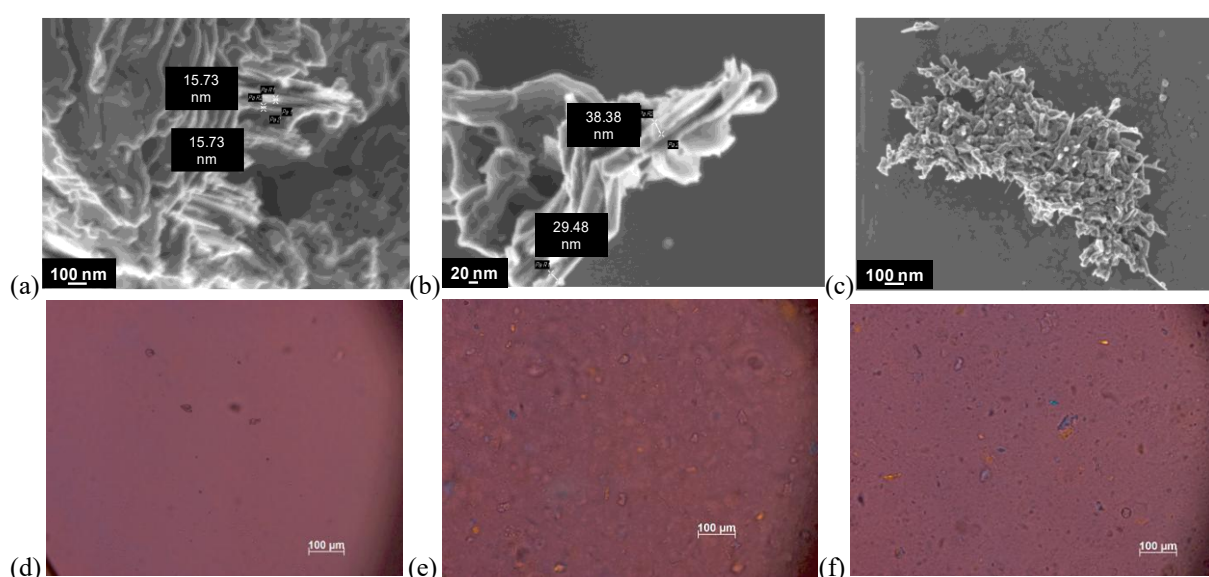


Figura 28. (b) curve di flusso degli idrogel Lap, Lap/CB[6] e Lap/CB[6]/FFA (valori medi; $n = 6$); immagini SEM di (c) Lap, (d) Lap/CB[6] e (e) Lap/FFA; immagini POM di (f) Lap, (g) Lap/CB[6] e (h) Lap/CB[6]/FFA.

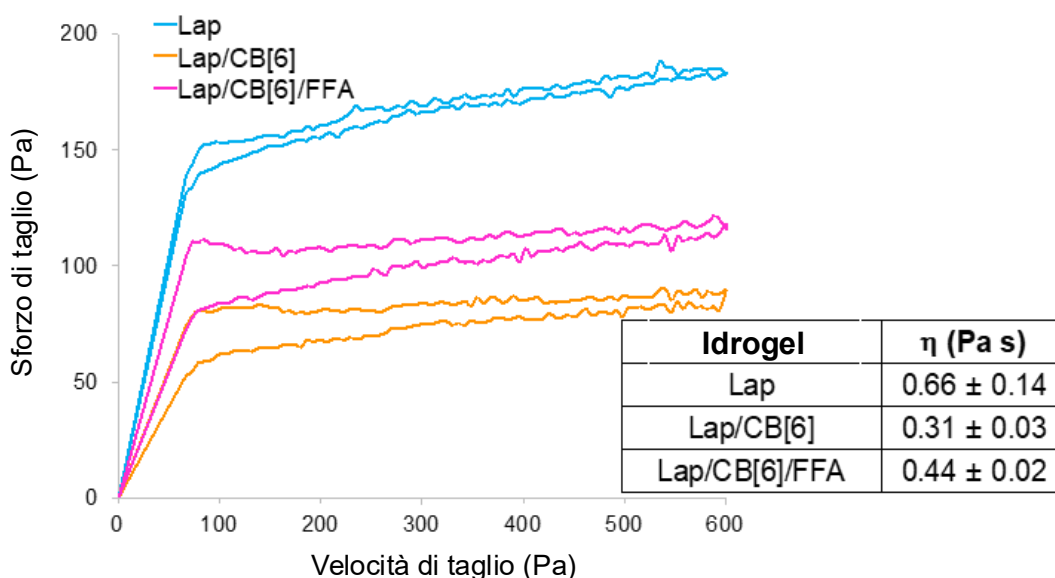
La morfologia degli idrogel è stata analizzata tramite SEM e microscopia ottica a polarizzazione (POM). Le immagini SEM del sistema Lap/CB[6]/FFA sono riportate in **Figura 28a-c** insieme a quelle della Lap e di un sistema utilizzato per confronto di Lap ed FFA (Lap/FFA)- Come è possibile osservare in **Figura 28a** l'idrogel di Lap (5 %p/p) possiede una struttura compatta e stratificata, in cui i nanodischi assumono una disposizione a blocchi; la stima della distanza interparticellare ha evidenziato uno spazio interparticellare medio tra i vari nanodischi di carica 16 nm, che è aumentata a 34 nm, in seguito all'introduzione del CB[6]. Anche se la morfologia

risulta essere uguale (**Figura 28b**), questo dato ottenuto, conferma la presenza dei CBs sulle facce dell'argilla, in accordo alle misure di DLS.

Al contrario la morfologia dell'idrogel ottenuto con il solo FFA mostra una struttura totalmente diversa da quella tipica della Lap e la presenza di aggregati attribuibili probabilmente alla precipitazione di molecole di FFA poco solubili. L'analisi delle immagini POM (**Figure 28d-f**) ha confermato quanto osservato al SEM, in quanto dopo l'introduzione di CB[6] e CB[6]/FFA, si osserva la presenza di spot uniformemente dispersi all'interno della matrice polimerica, al contrario di quanto osservato per Lap che risulta essere molto più omogenea.

- *Studi reologici e cinetici di rilascio per una potenziale applicazione topica*

Per valutare l'influenza dell'inclusione del complesso CB[6]/FFA sulle proprietà meccaniche e sulla stabilità strutturale degli idrogel, sono state condotte misure reologiche, che rappresentano un approccio fondamentale per caratterizzare il comportamento viscoelastico, la tissotropia e l'idoneità dei gel per potenziali applicazioni topiche. Le curve di flusso ottenute (velocità di taglio vs. sforzo di taglio) degli idrogel Lap/CB[6] e Lap/CB[6]/FFA, insieme a quella della Lap pura, sono riportate in **Figura 29a**. Tutti i campioni analizzati hanno mostrato una diminuzione della pendenza dello sforzo di taglio all'aumentare della velocità di taglio, comportamento caratteristico dei materiali pseudoplastici, con aree di isteresi tra le curve di salita e discesa dello shear rate, riconducibili a un comportamento tissotropico dovuto alla reversibile disgregazione della struttura *house of cards* tipica della Laponite®.



(a)

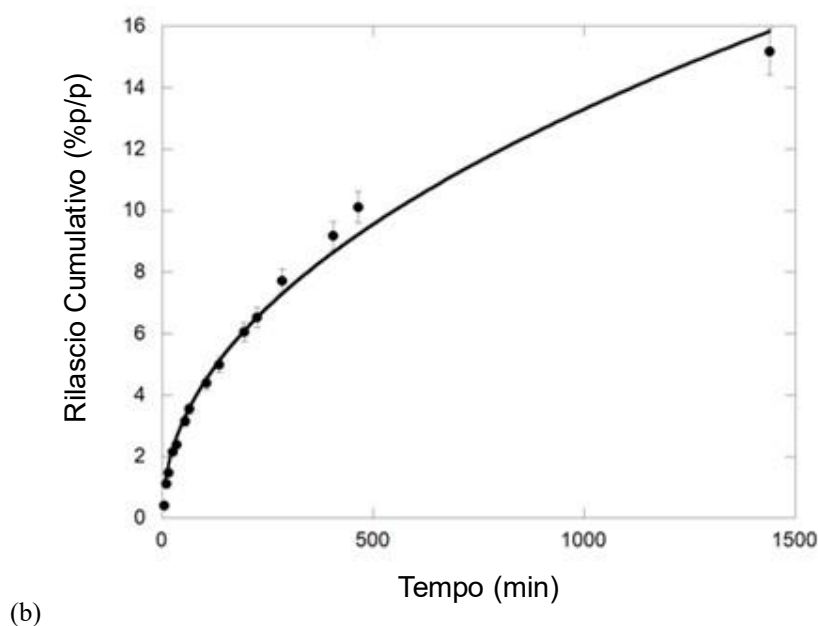


Figura 29. (a) curve di flusso degli idrogel Lap, Lap/CB[6] e Lap/CB[6]/FFA (valori medi; $n = 6$) e (b) cinetica di rilascio dell'FFA dall'idrogel Lap/CB[6]/FFA a 37 °C in tampone fosfato (50 mM, pH 5.0).

Inoltre, le viscosità apparenti, misurate dalle curve di flusso a 252 s^{-1} (**Figura 29a**), hanno evidenziato differenze interessanti tra i vari idrogel: l'inclusione dei *filler* CB[6] e CB[6]/FFA, infatti, in accordo con la loro posizione tra i nanodischi, ha determinato una riduzione della viscosità apparente rispetto alla Lap.

Infine, per verificare se l'idrogel Lap/CB[6]/FFA fosse in grado di indurre un rilascio controllato del farmaco, è stato studiato il rilascio di FFA dal gel a 37 °C in tampone fosfato (50 mM, pH 5.0) per simulare le condizioni fisiologiche della pelle umana. Per confronto, è stato preparato anche un idrogel Lap in presenza del solo FFA; tuttavia, in questo caso, a causa della scarsa solubilità della FFA in ambiente acquoso, è stato ottenuto un idrogel non omogeneo.

In **Figura 29b** è riportato il rilascio cumulativo di FFA dall'idrogel Lap/CB[6]/FFA in funzione del tempo. Come si può osservare, l'FFA viene rilasciato lentamente dal gel, raggiungendo circa il 15 %p/p della quantità totale caricata dopo 24 ore. Questo risultato è promettente poiché dimostra che l'idrogel sviluppato garantisce un rilascio lento e prolungato del farmaco nel tempo, caratteristica potenzialmente vantaggiosa per applicazioni terapeutiche. I dati cinetici sono stati analizzati tramite i modelli di primo ordine e Power fit al fine di comprendere meglio le modalità di rilascio dell'FFA dall'idrogel. L'adattamento matematico dei dati sperimentali ha mostrato che il rilascio è ben descritto dal modello Power fit ($k = 1.0 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$, $R^2 = 0.9956$), indicando una diffusione delle molecole di FFA attraverso la matrice dell'idrogel; il valore di n ottenuto (0.39 ± 0.02) conferma che il processo segue una cinetica diffusiva di tipo

fickiano. Il rilascio lento e sostenuto della FFA potrebbe essere dovuto al fatto che le molecole una volta rilasciate dalla cavità del CB[6], potrebbero interagire tramite legami a idrogeno e/o interazioni elettrostatiche con i bordi del CB[6] e con gli ioni Na^+ derivanti dalla Lap, per poi diffondere gradualmente attraverso la matrice dell'idrogel.

2.6. Conclusioni

In questo capitolo è stato messo in evidenza come le argille minerali, e in particolare l'halloysite, rappresenti un nanomateriale di grande interesse per il superamento dei limiti legati alle formulazioni classiche, spesso caratterizzate da scarsa solubilità, ridotta biodisponibilità e distribuzione non selettiva. I nuovi sistemi ottenuti per il rilascio controllato di nMP e nDP, hanno messo in evidenza come sia possibile modulare il rilascio di questi, dal lume degli HNTs, a seconda della presenza di un mono- o difosfato all'interno della loro struttura. La modifica effettuata sulla superficie esterna per legare covalentemente un PNA con un *target* specifico ha inoltre portato all'ottenimento di un nanomateriale, HNTs-PNA-FITC/5DP, che è in grado di veicolare simultaneamente due molecole biologicamente attive, sfruttando le due diverse superfici dell'argilla. I risultati ottenuti riguardo questi sistemi, aprono la strada allo sviluppo di nanomateriali utili per il *co-delivery* di diverse specie biologicamente attive su linee cellulari neuronali tumorali, in quanto l'attività sinergica che queste molecole possono avere, la specificità per determinati target, e il rilascio controllato delle molecole, risultano essere promettenti per una cura sempre più mirata ed efficace di patologie che colpiscono il sistema nervoso centrale.

Allo stesso modo, il sistema sviluppato per la veicolazione di PB4, rappresenta un ulteriore esempio di nanomateriale adatto per l'incapsulamento e il rilascio di agenti antitumorali idrofobici e positivamente carichi. Questo rappresenta il primo studio sulla funzionalizzazione covalente dei nanotubi di halloysite con unità di calix[5]arene, per l'ottenimento di un sistema multicavità che combina l'incapsulamento nel lume degli HNTs con il riconoscimento supramolecolare sulla superficie esterna. Sia HNTs/PB4 che HNTs-Calix/PB4, data la bassa stabilità in dispersione acquosa, sono stati con successo incorporati in idrogel tissotropici a base di Laponite®, i quali hanno mantenuto le loro proprietà caratteristiche anche in presenza del *filler*. I saggi di citotossicità hanno dimostrato che entrambi gli idrogel, Lap/HNTs/PB4 e Lap/HNTs-Calix/PB4 sono attivi contro le cellule di carcinoma mammario MCF-7, e la loro attività può essere ricondotta alle diverse cinetiche di rilascio del farmaco dai due diversi sistemi. La possibilità di modulare i profili di rilascio del farmaco attraverso una funzionalizzazione superficiale mirata apre la strada alla progettazione razionale di *carrier* specifici per determinate terapie. Questi risultati, quindi, pongono le basi per la progettazione di gel iniettabili a base di argille per la somministrazione di farmaci antitumorali scarsamente solubili.

Infine, il sistema a base di Lap e CB[6]/FFA sviluppato rappresenta un esempio di come le strategie supramolecolari possano essere sfruttate per la veicolazione di farmaci lipofili. Il

complesso CB[6]/FFA, una volta caratterizzato è stato incorporato in un idrogel di Lap, che ha mantenuto le sue proprietà tissotropiche risultando stabile anche a stimoli esterni; inoltre, la presenza del complesso supramolecolare ha variato la viscosità tipica degli idrogel di Lap, favorendo la dispersione del complesso stesso all'interno del gel e ampliando i campi di applicazione dell'intero sistema ad un suo potenziale uso topico. Infatti, gli esperimenti di rilascio in vitro, a temperatura e pH cutanei, hanno evidenziato un rilascio lento e sostenuto di FFA nell'arco di 24 ore, suggerendo un potenziale utilizzo di questo sistema per la somministrazione topica prolungata di farmaci antinfiammatori lipofili.

Complessivamente, i risultati presentati in questo capitolo dimostrano il ruolo strategico delle argille minerali, in particolare dell'halloysite e della Laponite®, come nanomateriali per lo sviluppo di sistemi di somministrazione innovativi. In particolare, gli HNTs si configurano come sistemi di *drug delivery* utili per la cura di diverse patologie tumorali, della pelle e no, oltre ad essere utili per la cura e il trattamento di patologie neurodegenerative.

2.7. Sezione sperimentale

2.7.1. Materiali e metodi

Tutti i reagenti sono stati acquistati presso la Merck e utilizzati senza ulteriori purificazioni, tranne che per l'acido flufenammico che è stato acquistato da TCI Chemicals; la Laponite® XLG è stata fornita dalla BYK (Wesel, Germania). Il PNA-FITC e cucurbit[6]urile (CB[6]) è stato sintetizzato secondo procedure riportate in letteratura.^{63,138}

Gli esperimenti di risonanza magnetica nucleare (**NMR**), sul Propargil-NH-Calix[5], sono stati condotti a 27 °C con uno spettrometro Varian UNITY Inova da 500 MHz (¹H a 499.88 MHz, ¹³C a 125.7 MHz), dotato di modulo a gradiente di campo pulsato (asse Z) e sonda di rilevazione inversa Varian da 5 mm (ID-PFG); quelli di FFA, CB[6] e CB[6]/FFA sono stati condotti con uno spettrometro Bruker a 400 MHz, utilizzando come solvente una miscela D₂O/CF₃CO₂D (1:1).

Le analisi di spettrometria di massa ad alta risoluzione (**HRMS**), sul Propargil-NH-Calix[5], sono state effettuate con uno spettrometro LTQ XL (ThermoFisher, San Jose, CA, USA), equipaggiato con sorgente H-ESI II, in modalità *full scan* (m/z 150–2000). Le misure sono state eseguite in modalità positiva, con tensione di *spray* di 3–3.5 kV, temperatura del capillare di 250 °C, tensione del capillare di 20 V e tubo lente a 120 V. La calibrazione esterna è stata effettuata con la soluzione standard Pierce LTQ ESI Positive Ion Calibration Solution (ThermoFisher). L'elaborazione dei dati è stata eseguita con il software FreeStyle, versione 1.6 SP1 (Thermo Fisher Scientific).

L'analisi **DLS**, del **potenziale- ζ** e dell'indice di polidispersione (**PDI**) di tutti i materiali è stata eseguita con uno strumento Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Worcestershire, UK), dotato di un laser a 532 nm e con angolo di scattering fisso di 173°.

Gli spettri **FT-IR** (KBr) sono stati registrati con uno spettrometro Agilent Technologies Cary 630.

Le **analisi termogravimetriche (TGA)** sono state condotte con uno strumento Perkin-Elmer TGA 7, equipaggiato con TAC 7/DX (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), applicando una rampa di riscaldamento di 10 °C/min nell'intervallo 50–800 °C, in atmosfera di azoto (60 mL/min).

Le immagini di microscopia a trasmissione elettronica (**TEM**) FEI Titan G2 60–300 (FEI, Losanna, Svizzera), in combinazione con microscopia elettronica analitica (AEM) mediante spettroscopia a dispersione di energia dei raggi X (XEDS). Gli spettri AEM sono stati acquisiti

in modalità STEM con rivelatore HAADF e sono state inoltre ottenute mappe elementari tramite raggi X.

Le immagini di microscopia elettronica a scansione (**SEM**) sono state ottenute con un GEMINI (FESEM) CARL Zeiss (Zeiss, Jena, Germania), dotato di microanalizzatore EDX (Oxford Instruments). I campioni sono stati essiccati a 40 °C per almeno 48 h, fissati su supporti standard in alluminio e rivestiti con carbonio. Le microfotografie testurali sono state acquisite a 3 kV, mentre le analisi EDX a 15 kV. In entrambi i casi è stato utilizzato un rivelatore a lente d'immersione (InLens, Zeiss).

Le misure di microscopia ottica polarizzata (**POM**) sono state eseguite colando i campioni tra due vetrini. Lo strumento utilizzato è stato un microscopio Zeiss Imager.A2 m (Carl Zeiss, Göttingen, Germania), equipaggiato con polarizzatori incrociati, un riscaldatore Zeiss AX10 e una fotocamera Photometrics AXIOCAM ICC1 collegata a un computer.

La **reologia** dei gel è stata studiata con un viscosimetro a velocità controllata (Thermo Scientific HAAKE, RotoVisco 1, Karlsruhe, Germania), equipaggiato con un sistema piatto/piatto zigrinato PP20S da Ø20 mm. La temperatura è stata mantenuta costante a 25 °C (± 0.5 °C) tramite un termostato. Le proprietà reologiche degli idrogel sono state valutate nell'intervallo di velocità di taglio compreso tra 70 e 600 s⁻¹. L'intervallo è stato scelto per simulare le sollecitazioni tipiche a cui questi sistemi possono essere sottoposti durante l'uso: 70–200 s⁻¹ (spalmatura sulla pelle), 100–200 s⁻¹ (miscelazione manuale) e 400–2000 s⁻¹ (estrazione dal contenitore). La caratterizzazione è stata eseguita dopo 48 h di rigonfiamento. I dati sono stati raccolti ed elaborati con il software HAAKE RheoWin. Per ciascun campione sono state effettuate sei repliche. La caratterizzazione ha incluso le curve di flusso e la viscosità apparente misurata a 252 s⁻¹.

Le analisi **UV-vis** sono state realizzate con uno spettrometro Beckmann DU 650.

Le misure di **fluorescenza**, condotte sia in soluzione sia allo stato solido, sono state effettuate con uno spettrofluorimetro JASCO FP8300. In soluzione le fenditure di eccitazione ed emissione erano impostate a 5 nm, con acquisizione degli spettri nell'intervallo 300–700 nm; allo stato solido le fenditure erano rispettivamente di 5 e 2.5 nm, mantenendo lo stesso intervallo di acquisizione.

2.7.2. Parte sperimentale sezione 3.2.

- Caricamento di PB4 negli HNTs e nei nanomateriali HNTs-Calix

Sono state preparate diverse dispersioni di HNTs (20 mg) in 1 mL di acetonitrile (ACN), in ciascuna delle quali sono stati aggiunti 0.2 mL di soluzioni acquose di nMP e nDP a diversa

concentrazione (6MP 8.4 mM; 6DP 8.0 mM; 5MP 7.8 mM; 5DP 14.2 mM; 4MP 5.2 mM; 4DP 2.4 mM). Le dispersioni ottenute sono state sottoposte a tre cicli di vuoto e successivamente agitate a temperatura ambiente per 16 ore. Dopo questo tempo, le polveri sono state accuratamente lavate con ACN in centrifuga per eliminare l'eccesso di nMP o nDP non legato e successivamente essiccate sottovuoto a 60 °C.

- ***Sintesi del nanomateriale HNTs-COOH***

In un pallone monocollo da 50 mL sono stati solubilizzati 0.65 g di acido tartarico (10 eq. rispetto alle moli dei gruppi NH₂ presenti su HNTs- NH₂) e 0.83 g di EDC (1 eq. rispetto alle moli dell'acido tartarico) in 30 mL di DMF anidra in atmosfera inerte. Dopo 10 minuti di agitazione, viene aggiunto 1.0 g di HNTs- NH₂. La dispersione è stata mantenuta in agitazione continua per 48 ore a temperatura ambiente e il nanomateriale ottenuto, al termine di questo tempo, filtrato e lavato sottovuoto con acqua; infine, il nanomateriale è stato posto in stufa a 60 °C per 24 ore.

- ***Sintesi del nanomateriale HNTs-PNA-FITC/5DP***

La sintesi del nanomateriale HNTs-PNA-FITC è stata effettuata disperdendo 50 mg di HNTs-COOH e 5 mg di EDC (1.3 eq. rispetto alle moli di acido tartarico in HNTs-COOH) in 3 mL di DMF anidra. La dispersione è stata fatta agitare per 10 minuti a temperatura ambiente e in atmosfera inerte. Passato questo tempo sono stati aggiunti 2 mL di DMF contenenti 130 nmoli di PNA-FITC, e questa dispersione è stata lasciata ad agitare per 48 ore a temperatura ambiente. Al termine della reazione il nanomateriale è stato filtrato e lavato con acqua per rimuovere tutti i reattivi in eccesso e lasciato ad asciugare sottovuoto a 25 °C. Il nanomateriale HNTs-PNA-FITC ottenuto è stato utilizzato per caricare il 5DP; questo è stato fatto aggiungendo 0.5 mL di una soluzione acquosa di 5DP (6.6 mM) a 2.5 mL di una dispersione del carrier HNTs-PNA-FITC in ACN. Dopo aver effettuato 3 cicli di vuoto, la dispersione è stata fatta agitare per 16 ore a temperatura ambiente. Infine, il nanomateriale è stato lavato centrifugando per rimuovere l'eccesso di molecola non caricata e fatto asciugare sottovuoto a 25 °C.

- ***Rilasci cinetici di 6MP e 6DP da HNTs/6MP o DP e del 5DP da HNTs-PNA-FITC/5DP***

Il rilascio cinetico delle molecole dai corrispettivi nanomateriali è stato effettuato ponendo 10 mg di ciascun nanomateriale in 1 mL di mezzo di rilascio (pH 7.0) all'interno di una membrana da dialisi sigillata (Medicell International Ltd, MWCO 12–14000 Da, diametro 21.5 mm). La membrana è stata quindi immersa in un pallone a fondo tondo contenente 9 mL dello stesso

mezzo di rilascio, mantenuto a 37 °C sotto agitazione costante. A intervalli di tempo prestabiliti, 1 mL del mezzo è stato prelevato e analizzato mediante misure UV-*vis*. Per mantenere il volume costante, ciascun mL prelevato è stato sostituito con 1 mL di mezzo di rilascio fresco. La quantità totale di 6MP, 6DP o 5DP rilasciata (F_t) è stata calcolata secondo la seguente equazione:

$$F_t = V_m C_t + \sum_{i=0}^{t-1} V_a C_i \quad (\text{Eq. 2})$$

dove V_m e C_t sono rispettivamente il volume e la concentrazione della molecola al tempo t , mentre V_a è il volume del campione prelevato e C_i è la concentrazione molecola al tempo i ($i < t$).

2.7.3. Parte sperimentale sezione 4.1.

- Sintesi del Propargil-NH-Calix[5]

A una soluzione di Calix[5]-NH₂ (0.080 g, 0.067 mmol) in CH₃CN anidro (20 mL) sono stati aggiunti, sotto agitazione, K₂CO₃ (0.037 g, 0.268 mmol) e propargil tosilato (0.017 g, 0.080 mmol). La soluzione è stata mantenuta sotto agitazione a riflusso, in atmosfera di azoto, per 8 h. Dopo aver verificato l'andamento della reazione tramite TLC (SiO₂, Esano/AcOEt 15:1, v/v, R_f = 0.70), osservando la scomparsa del materiale di partenza, la miscela di reazione è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente. Il residuo solido è stato disciolto in CH₂Cl₂ e la soluzione lavata con HCl 1 N (1×15 mL) e successivamente con H₂O (2×15 mL), quindi essiccata su Na₂SO₄. Il solvente è stato rimosso a pressione ridotta e il residuo purificato per cromatografia su colonna (SiO₂, Esano/AcOEt 40:1, v/v). Il prodotto ottenuto è stato trattato con CH₃CN, fornendo il prodotto desiderato Propargil-NH-Calix[5] come solido giallastro (0.040 g, 0.033 mmol), con una resa del 48%.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 0.99, 1.25 (s, rapporto 1:1, tBu, 36H), 0.93, 0.94 (d, J = 3.0 Hz, rapporto 1:2, CH(CH₃)₂, 30H), 1.21–1.38 (m, γ -CH₂, 10H), 1.56–1.65 (m, δ -CH(CH₃)₂, 5H), 1.79–1.91 (m, β -CH₂, 10H), 3.53–3.76 (m, α -CH₂, 10H), 2.87 (bs, C $\equiv$ C-H, 1H), 3.17 (s, CH₂-C $\equiv$ C, 2H), 3.19 e 4.47 (AX, J = 14 Hz, ArCH₂Ar, 4H), 3.24 e 4.53 (AX, J = 13 Hz, ArCH₂Ar, 2H), 3.26 e 4.56 (AX, J = 14 Hz, ArCH₂Ar, 2H), 5.29 (s, C₅-NH-Prop, 1H), 5.77 (s, ArH-C₅, 2H), 6.82 e 6.83 (ABq, J = 3 Hz, ArH, 4H), 7.06 e 7.16 (ABq, J = 3 Hz, ArH, 4H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ = 22.6, 22.7, 22.8 ($\times 2$), 22.85 [$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$], 28.13, 28.16, 28.2 ($\gamma\text{-CH}_2$), 28.3, 28.4, 28.6 [$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$], 28.7, 30.0 (ArCH_2Ar), 31.2, 31.6, 33.3, 33.9 (tBu), 34.0, 35.0, 35.2 ($\beta\text{-CH}_2$), 35.3 (NH-CH_2), 70.9 (C alchino), 74.0, 74.3, 74.5 ($\alpha\text{-CH}_2$), 112.7 (CH alchino), 125.0, 125.3, 125.5, 125.9, 126.4 (o-Ar), 133.5, 133.7, 133.9, 134.1, 134.3 (m-Ar), 141.4, 144.5, 144.6 (p-Ar), 147.5, 152.8, 153.4 (ipso-Ar).

ESI-MS: 1228 m/z = $[\text{M}]^+$; 1246 m/z = $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$; 1251 m/z = $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 1267 m/z = $[\text{M} + \text{K}]^+$.

- *Sintesi del nanomateriale HNTs-Calix*

In un pallone a fondo tondo da 10 mL sono stati introdotti 100 mg di HNTs- N_3 , 15 mg di Propargyl-NH-Calix[5] (0.012 mmol) e 4 mL di una miscela $\text{H}_2\text{O}/\text{tBuOH}$ (1:1). Alla dispersione ottenuta sono stati aggiunti 0.100 mL di una soluzione acquosa di CuSO_4 (1 M) e 1.0 mL di una soluzione acquosa di ascorbato di sodio (1 M). La miscela è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per circa 24 h. Successivamente, il solido è stato lavato più volte con metanolo ed essiccato a 60 °C per una notte.

- *Caricamento di PB4 negli HNTs e nei nanomateriali HNTs-Calix*

A una dispersione di HNTs o HNTs-Calix in H_2O (15 mL) sono stati aggiunti 3 mL di una soluzione di PB4 3.2 mM in ACN. La dispersione ottenuta è stata sonicata per 5 min e successivamente degassata per 3 cicli, e infine lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 16 h. Trascorso questo tempo, la polvere è stata lavata con acqua fino alla completa rimozione del PB4 non reagito e quindi essiccata sottovuoto a 60 °C.

- *Rilascio cinetico di PB4 da HNTs/PB4 e HNTs-Calix/PB4*

Per lo studio cinetico del rilascio di PB4 dagli HNTs e dal nanomateriale HNTs-Calix, 10 mg del campione corrispondente sono stati dispersi in 1 mL di mezzo di rilascio (HCl 0.1 M, pH 1.0 o H_2O , pH 7.0) e trasferiti in una membrana da dialisi sigillata (Medicell International Ltd, MWCO 12–14000 Da, diametro 21.5 mm). La membrana è stata quindi immersa in un pallone a fondo tondo contenente 9 mL dello stesso mezzo di rilascio, mantenuto a 37 °C sotto agitazione costante. A intervalli di tempo prestabiliti, 1 mL del mezzo è stato prelevato e analizzato mediante misure UV-vis. Per mantenere il volume costante, ciascun mL prelevato è stato sostituito con 1 mL di mezzo di rilascio fresco. La quantità totale di PB4 rilasciata (F_t) è stata calcolata tramite l'Eq. 2 precedentemente descritta.

- ***Isoterma di adsorbimento***

L'isoterma di adsorbimento degli HNTs è stata ottenuta pesando 3 mg di HNTs in presenza di una soluzione di PB4 con concentrazione compresa tra 5×10^{-6} e 1×10^{-4} M. I campioni sono stati agitati a 200 rpm per 12 h fino al raggiungimento dell'equilibrio a 25 °C. La capacità di adsorbimento all'equilibrio Q_e (mol g⁻¹) è stata calcolata mediante la seguente equazione:

$$Q_e = \frac{(C_0 - C_e) \cdot V}{M} \quad (\text{Eq. 3})$$

dove C_0 e C_e rappresentano rispettivamente le concentrazioni iniziale e all'equilibrio di PB4 (M), M è la massa di HNTs (g) e V è il volume della soluzione di PB4 (L).

2.7.4. Parte sperimentale sezione 5.1.

- ***Preparazione degli idrogel Lap/HNTs/PB4 e Lap/HNTs-Calix/PB4***

Gli idrogel sono stati preparati introducendo 3.7 mg di PB4, HNTs/PB4 o HNTs-Calix/PB4 e 980 µL di H₂O in *vials* a vite (diametro 1.0 cm). La miscela è stata dispersa per 2 min mediante ultrasuoni e mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente (1000 rpm per 5 min). Successivamente, 20 mg di Lap XLG sono stati aggiunti a ciascun *vials* sotto agitazione costante, e i campioni sono stati lasciati a temperatura ambiente per 24 h.

- ***Comportamento tissotropico e sonotropico***

Tutti gli idrogel ottenuti sono stati sottoposti a stimolo meccanico mediante barra magnetica di 6 mm di lunghezza e 2 mm di altezza (1000 rpm per 5 min). Inoltre, gli idrogel sono stati posti in un bagno a ultrasuoni per 5 min, con potenza di 200 W e frequenza di 45 kHz. Dopo 30 min a temperatura ambiente, i gel sono stati osservati per valutarne le proprietà tissotropiche e, mediante il test di inversione della provetta, sono stati classificati come tissotropici.

- ***Linee cellulari***

Le cellule di adenocarcinoma mammario MCF-7 sono state acquisite da ATCC (HTB-22, Rockville, MD) e coltivate in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; HyClone Europe Ltd., Cramlington, UK). Il terreno è stato integrato con il 10% di siero fetale bovino inattivato al calore, 2 mM di L-glutammmina, 100 U/mL di penicillina e 100 µg/mL di streptomycin (tutti i reagenti provenienti da HyClone Europe). Le cellule MCF-7 sono state mantenute in atmosfera

umidificata contenente 5% CO₂ a 37 °C e utilizzate, dopo tripsinizzazione, entro un ristretto intervallo di passaggi cellulari per gli esperimenti.

- ***Saggio di vitalità cellulare***

Le cellule MCF-7 sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti (5×10^3 cellule/pozzetto) e incubate *overnight* a 37 °C. Il terreno è stato quindi sostituito con terreno fresco completo contenente i diversi composti a varie concentrazioni. Dopo 72 h di trattamento, è stato aggiunto il colorante MTS (16 µL). Le piastre da 96 pozzetti sono state incubate per 2 h a 37 °C in atmosfera con 5% CO₂. La bioriduzione del reagente MTS è stata valutata misurando l'assorbanza a 490 nm con un lettore di micropiastre (iMark Microplate Reader; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA).

2.7.5. Parte sperimentale sezione 5.2.

- ***Misure spettrofotometriche***

Le soluzioni utilizzate per studiare le interazioni tra cucurbituril (CBs) e acido flufenammico (FFA) sono state preparate aggiungendo volumi crescenti di CBs a una soluzione acquosa di FFA in matraccio tarato. Per evitare la precipitazione di CB[6], è stata preparata una dispersione madre in MeOH (1×10^{-2} M), da cui, per diluizione, sono state ottenute le soluzioni acquose. In tutte le soluzioni la concentrazione di FFA è stata mantenuta costante a 2×10^{-5} M, mentre la concentrazione di CBs variava nell'intervallo $5 \times 10^{-5} - 4.5 \times 10^{-4}$ M. Le misure sono state eseguite a 25, 30 e 40 °C. Per la costruzione del diagramma di Job, soluzioni madri acquose di CBn e FFA (1×10^{-4} M) sono state miscelate in diversi rapporti, mantenendo costante la somma [CBn]+[FFA] e variando la frazione molare di FFA (χ_{FFA}) da 0 a 1.

- ***Preparazione degli idrogel***

Gli idrogel puri sono stati preparati pesando 500 mg di Lap e ~10 g di acqua in una *vial* campione con tappo a vite (diametro 2.5 cm). La miscela è stata inizialmente dispersa per 5 minuti mediante irradiazione a ultrasuoni e successivamente lasciata a temperatura ambiente fino alla formazione del gel.

Gli idrogel ibridi sono stati ottenuti pesando in una *vial* con tappo a vite (diametro 2.5 cm) 12.5 mg di CB[6], 5 mg di FFA e ~10 g di acqua. Alla soluzione così preparata sono stati aggiunti 500 mg di Lap. La dispersione è stata effettuata per 5 minuti mediante ultrasuoni e la miscela è stata lasciata a temperatura ambiente fino all'ottenimento del gel.

- ***Comportamento tissotropico e sonotropico***

Le fasi gel ottenute sono state sottoposte a due diversi stimoli esterni. Lo stimolo meccanico è stato applicato agitando il gel con una barretta magnetica (lunghezza 8 mm, altezza 3 mm) a 1000 rpm per 5 minuti. Il comportamento sonotropico è stato testato irradiando i campioni in un bagno a ultrasuoni per 5 minuti (200 W, 45 kHz). Successivamente, i materiali sono stati lasciati a temperatura ambiente per una notte. Quando i campioni risultavano stabili al test di inversione della provetta, i gel venivano classificati come tissotropici o sonotropici.

- ***Rilascio cinetico***

Il rilascio di FFA dall'idrogel Lap/CB[6]/FFA è stato studiato come segue: 10 g di idrogel sono stati preparati come descritto in precedenza e su di esso sono stati versati 10 mL di tampone fosfato (50 mM, pH 5.0). L'esperimento è stato condotto a 37 °C. A intervalli di tempo prestabiliti, 1 mL del mezzo di rilascio è stato prelevato e analizzato con misure UV-*vis*. Per mantenere il volume costante, ogni aliquota prelevata è stata sostituita con 1 mL di soluzione fresca. La quantità totale di farmaco rilasciata (F_t) è stata calcolata secondo l'equazione prima vista (**Eq. 2**).

Appendice A

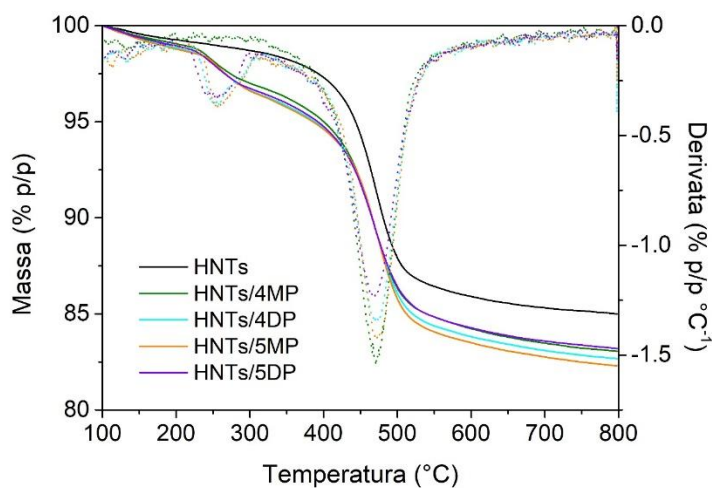


Figura A1. TGA dei nanomateriali HNTs/4MP o 4DP e HNTs/5MP o 5DP confrontate con gli HNTs non modificati.

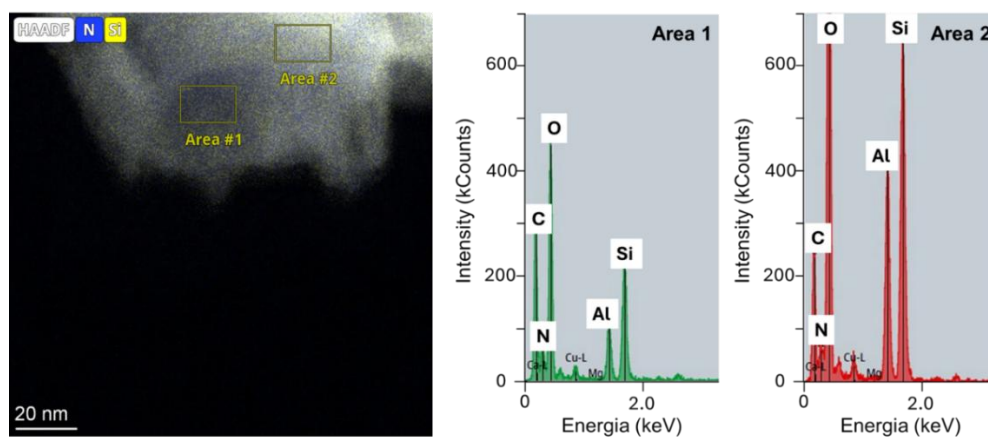


Figura A2. Immagine HAADF-STEM del nanomateriale HNTs-PNA-FITC con mappatura elementare del nanomateriale e spettri EDX del nanomateriale dell'area 1 e 2.

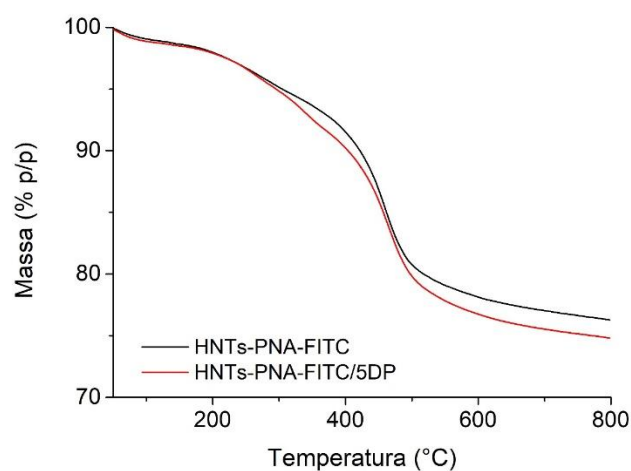


Figura A3. TGA dei nanomateriali HNTs-PNA-FITC e HNTs-PNA-FITC/5DP.

Appendice B

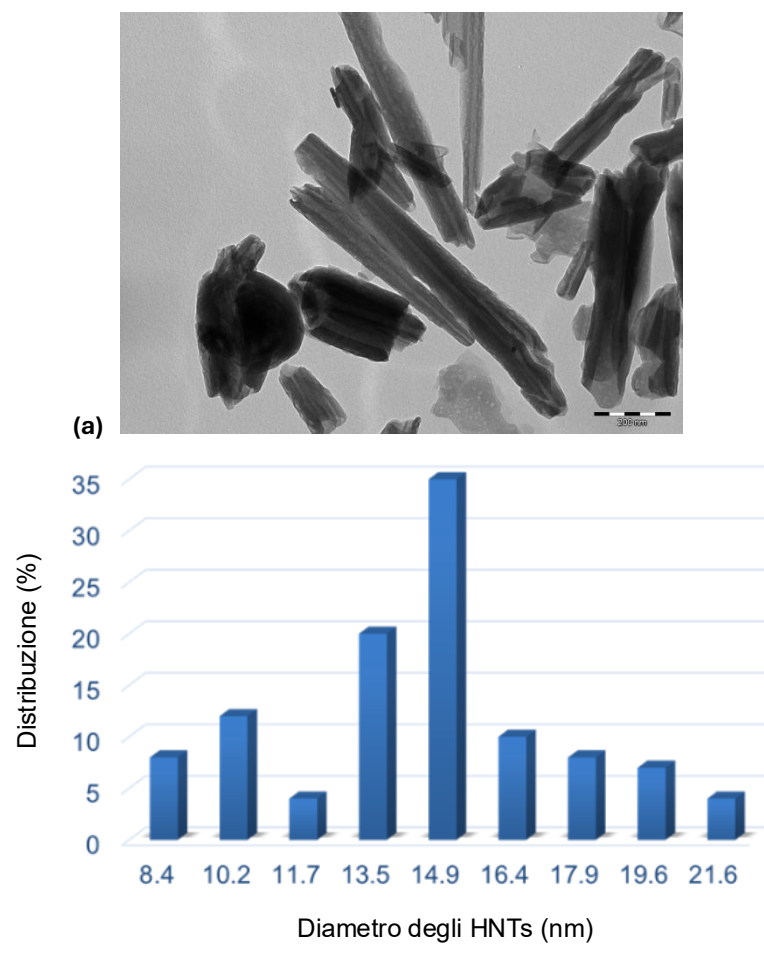


Figura B1. (a) Immagine TEM degli HNTs; (b) Distribuzione delle dimensioni del diametro degli HNTs (n=40).

Appendice C

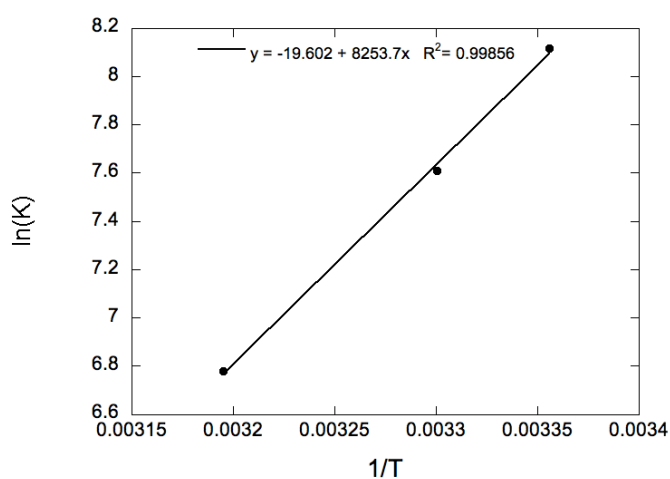
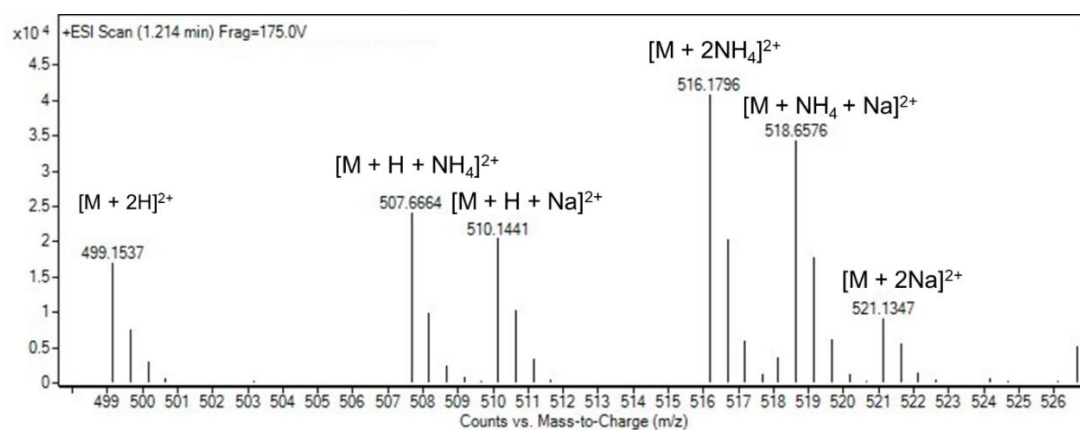
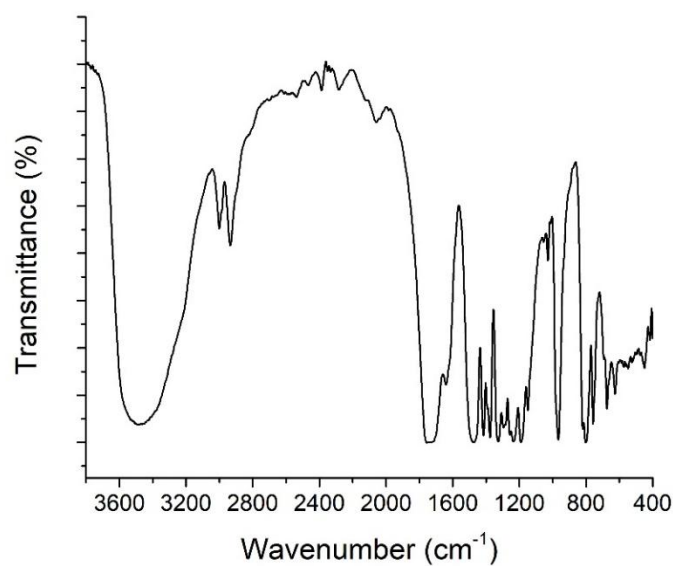


Figura C1. Grafico di Van't Hoff per la determinazione dei parametri termodinamici.



(a)



(b)

Figura C2. (a) ¹H-NMR (400 MHz, D₂O/CF₃CO₂D (1:1)) δ : 2,69–2,73 (d, 12H, $J = 16$ Hz); 3,99 (s, 12H); 4,34–4,38 (d, 12H, $J = 16$ Hz) e (b) ESI-MS: m/z 499,1537 (CB[6] + 2H)²⁺.

Bibliografia:

1. Losada-Barreiro, S., *et al.*, *Pharmaceutics*, (2024), Vol. 16
2. Adepu, S., and Ramakrishna, S., *Molecules* (2021) **26** (19), 5905
3. Liu, D., *et al.*, *Theranostics* (2016) **6** (9), 1306
4. Patra, J. K., *et al.*, *Journal of nanobiotechnology* (2018) **16** (1), 71
5. Din, F. U., *et al.*, *International journal of nanomedicine* (2017), 7291
6. Chandrakala, V., *et al.*, *Emergent Materials* (2022) **5** (6), 1593
7. Yusuf, A., *et al.*, *Polymers* (2023) **15** (7), 1596
8. Olusanya, T. O., *et al.*, *Molecules* (2018) **23** (4), 907
9. Mir, M., *et al.*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2017) **159**, 217
10. Prabakaran, M., *International journal of biological macromolecules* (2015) **72**, 1313
11. Kurapati, R., *et al.*, *Advanced Materials* (2016) **28** (29), 6052
12. Panwar, N., *et al.*, *Chemical reviews* (2019) **119** (16), 9559
13. Dreiss, C. A., *Current opinion in colloid & interface science* (2020) **48**, 1
14. Norouzi, M., *et al.*, *Drug discovery today* (2016) **21** (11), 1835
15. Sun, Z., *et al.*, *Molecular pharmaceutics* (2019) **17** (2), 373
16. Liu, H., *et al.*, *RSC advances* (2018) **8** (14), 7533
17. Jacob, S., *et al.*, *Pharmaceutics* (2021) **13** (3), 357
18. Basso, J., *et al.*, *Gels* (2018) **4** (3), 62
19. Ianchis, R., *et al.*, *Nanomaterials* (2017) **7** (12), 443
20. Kass, L. E., and Nguyen, J., *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* (2022) **14** (2), e1756
21. Webber, M. J., and Langer, R., *Chemical Society Reviews* (2017) **46** (21), 6600
22. Payamifar, S., *et al.*, *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* (2025), 100677
23. Velhal, K., *et al.*, *Polymers* (2022) **14** (15), 3162
24. Massaro, M., and Riela, S., *Journal of Functional Biomaterials* (2018) **9** (4), 61
25. Jacob, S., and Nair, A. B., *Drug development research* (2018) **79** (5), 201
26. Amin, M. C. I. M., *et al.*, *Expert opinion on drug delivery* (2015) **12** (7), 1149
27. Wang, Z., *et al.*, *Angewandte Chemie International Edition* (2022) **61** (38), e202206763
28. Zhou, Y., *et al.*, *Chinese Chemical Letters* (2015) **26** (7), 825
29. Hua, Y., *et al.*, *International Journal of Nanomedicine* (2020), 5873
30. Veerapandian, M., *et al.*, *Journal of Functional Biomaterials*, (2023), Vol. 14
31. Nomicisio, C., *et al.*, *Pharmaceutics* (2023) **15** (5), 1368
32. Massaro, M., *et al.*, *Journal of Functional Biomaterials*, (2018), Vol. 9
33. Wu, Q., *et al.*, *Advanced Science* (2023) **10** (25), 2300672
34. Massaro, M., *et al.*, *ACS medicinal chemistry letters* (2018) **10** (4), 419
35. Sonmez, B., *et al.*, *RSC Advances* (2014) **4** (108), 62895
36. Massaro, M., and Riela, S., *Journal of Functional Biomaterials*, (2018), Vol. 9
37. Massaro, M., *et al.*, *Applied Clay Science* (2024) **250**, 107271
38. Katti, K. S., *et al.*, *Materials Advances* (2022) **3** (20), 7484
39. Collins, P. Y., *et al.*, *Nature* (2011) **475** (7354), 27
40. Profaci, C. P., *et al.*, *Journal of Experimental Medicine* (2020) **217** (4), e20190062
41. Yun, Y. H., *et al.*, *Journal of Controlled Release* (2015) **219**, 2
42. Sánchez-Fernández, A., *et al.*, *Materials* (2014) **7** (12), 7770
43. Kırımlıoğlu, G. Y., *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics* (2015) **495** (2), 816
44. Persano, F., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* (2021) **9** (12), 2756
45. Saleh, M. Y., *et al.*, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (2020) **8**, 451
46. Domínguez, A., *et al.*, *Neurosci Discov* (2013) **1** (1), 3
47. Rosen, A. S., *et al.*, *Biopharmaceutics & drug disposition* (1999) **20** (3), 171
48. Latif, R., *et al.*, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (2020) **55**, 101375
49. Yanamadala, Y., *et al.*, *International Journal of Molecular Sciences*, (2023), Vol. 24
50. Yanamadala, Y., *et al.*, *International Journal of Molecular Sciences* (2023) **24** (11), 9648
51. Khalil, M., *et al.*, *Nature Reviews Neurology* (2018) **14** (10), 577
52. Shakeel, S., *et al.*, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology* (2006) **81** (6), 892
53. Nielsen, P. E., *Accounts of Chemical Research* (1999) **32** (7), 624
54. Singh, G., and Monga, V., *Bioorganic Chemistry* (2023) **141**, 106860
55. Andrea, P., and Giampaolo, G., *Current Medicinal Chemistry* (2005) **12** (22), 2561
56. Hoyer-Kimura, C., *et al.*, *Aging and disease* (2024) **15** (4), 1927
57. Zarrilli, F., *et al.*, *Molecules* (2017) **22** (7), 1144
58. Giordano, S., *et al.*, *Gels* (2025) **11** (5), 367

59. Quijano, E., *et al.*, *Yale J Biol Med* (2017) **90** (4), 583
60. Riela, S., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* (2023) **11** (28), 6685
61. Falanga, A. P., *et al.*, *Journal of Colloid and Interface Science* (2024) **663**, 9
62. Massaro, M., *et al.*, *Journal of colloid and interface science* (2022) **620**, 221
63. Falanga, A. P., *et al.*, *Bioconjugate Chemistry* (2019) **30** (3), 572
64. Falanga, A. P., *et al.*, *Heterotriplex-forming PNA in the targeting of the Bcl-2 P1 promoter in anticancer treatment*, (2021)
65. Falanga, A. P., *et al.*, *Synthesis, characterization and delivery of peptide nucleic acids targeting Bcl-2 gene promoter: a potential tool for cancer treatment*, (2022)
66. Falanga, A. P., *et al.*, *Heliyon* (2024) **10** (3)
67. Oliviero, G., *et al.*, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* (2005) **24** (5-7), 735
68. Galeone, A., *et al.*, *European Journal of Organic Chemistry* (2002) **2002** (24), 4234
69. Oliviero, G., *et al.*, *Nucleic Acids Symposium Series* (2008) **52** (1), 573
70. D'Errico, S., *et al.*, *Marine Drugs*, (2019), Vol. 17
71. Oliviero, G., *et al.*, *Tetrahedron* (2010) **66** (10), 1931
72. Hashizume, H., and Theng, B. K., *Clays and Clay Minerals* (2007) **55** (6), 599
73. Lisuzzo, L., *et al.*, *Polymers* (2020) **12** (8), 1766
74. Szczepanik, B., *et al.*, *Journal of Molecular Structure* (2015) **1084**, 16
75. Yuan, P., *et al.*, *The Journal of Physical Chemistry C* (2008) **112** (40), 15742
76. Cinà, G., *et al.*, *International Journal of Biological Macromolecules* (2024) **277**, 134375
77. Massaro, M., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry C* (2018) **6** (27), 7377
78. D'Errico, S., *et al.*, *Bioorganic Chemistry* (2021) **117**, 105401
79. Gianni, E., *et al.*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2020) **154**, 359
80. Siegel, R. L., *et al.*, *CA: a cancer journal for clinicians* (2022) **72** (1)
81. Wei, G., *et al.*, *Theranostics* (2021) **11** (13), 6370
82. Gutteridge, W. E., *British Medical Bulletin* (1985) **41** (2), 162
83. Gonçalves, G., *et al.*, *Advanced healthcare materials* (2013) **2** (8), 1072
84. Karewicz, A., *et al.*, *Materials*, (2021), Vol. 14
85. Guo, M., *et al.*, *Chinese journal of chemistry* (2012) **30** (9), 2115
86. Massaro, M., *et al.*, *Journal of Colloid and Interface Science* (2019) **552**, 236
87. Shi, Y.-F., *et al.*, *Nanoscale research letters* (2011) **6** (1), 608
88. Hughes, A. D., and King, M. R., *Langmuir* (2010) **26** (14), 12155
89. Yang, J., *et al.*, *ACS applied materials & interfaces* (2016) **8** (40), 26578
90. Wu, Y.-P., *et al.*, *ACS Applied Nano Materials* (2018) **1** (2), 595
91. Massaro, M., *et al.*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2022) **213**, 112385
92. Massaro, M., *et al.*, *Applied Clay Science* (2020) **184**, 105400
93. Massaro, M., *et al.*, *Nanomaterials*, (2021), Vol. 11
94. Garozzo, D., *et al.*, *Angewandte Chemie International Edition* (2005) **44** (31), 4892
95. Muley, S., *et al.*, *Advanced Therapeutics* (2024) **7** (10), 2400207
96. Fortuna, C. G., *et al.*, *Eur J Med Chem* (2012) **47** (1), 221
97. Bonomo, C., *et al.*, *Antibiotics* (2023) **12** (8), 1308
98. Vigdorowitsch, M., *et al.*, *Applied sciences* (2021) **11** (17), 8078
99. Gereli, G., *et al.*, *Journal of colloid and interface science* (2006) **299** (1), 155
100. Duce, C., *et al.*, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* (2015) **121** (3), 1011
101. Stetefeld, J., *et al.*, *Biophysical reviews* (2016) **8** (4), 409
102. Testa, C., *et al.*, *Current Organic Chemistry* (2024) **28** (17), 1380
103. Garozzo, D., *et al.*, *ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION* (2005) **44** (31), 4892
104. Lisuzzo, L., *et al.*, *Journal of Colloid and Interface Science* (2022) **608**, 424
105. Görner, H., and Gruen, H., *Journal of photochemistry* (1985) **28** (3), 329
106. Fromherz, P., and Heilemann, A., *The Journal of Physical Chemistry* (1992) **96** (17), 6864
107. Carlotti, B., *et al.*, *Physical Chemistry Chemical Physics* (2014) **16** (27), 13984
108. Benassi, E., *et al.*, *The Journal of Physical Chemistry A* (2015) **119** (2), 323
109. Bretti, C., *et al.*, *The Journal of Physical Chemistry C* (2016) **120** (14), 7849
110. Carpentier, R., *et al.*, *The Journal of Organic Chemistry* (2024) **90** (1), 682
111. Espindola, C., *et al.*, *Pharmaceutics* (2022) **14** (12), 2806
112. Mancuso, A., *et al.*, *Surfaces and Interfaces* (2025) **62**, 106207
113. Gomez-Florit, M., *et al.*, *Molecules* (2020) **25** (24), 5858
114. Vashist, A., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* (2014) **2** (2), 147
115. Li, J., and Mooney, D. J., *Nature Reviews Materials* (2016) **1** (12), 1
116. Omar, J., *et al.*, *Chemistry—An Asian Journal* (2022) **17** (9), e202200081
117. Jin, Y., *et al.*, *ACS applied materials & interfaces* (2017) **9** (20), 17456
118. Kiaee, G., *et al.*, *Advanced healthcare materials* (2022) **11** (7), 2102054
119. Hamilton, A., *et al.*, *Applied Clay Science* (2014) **87**, 129

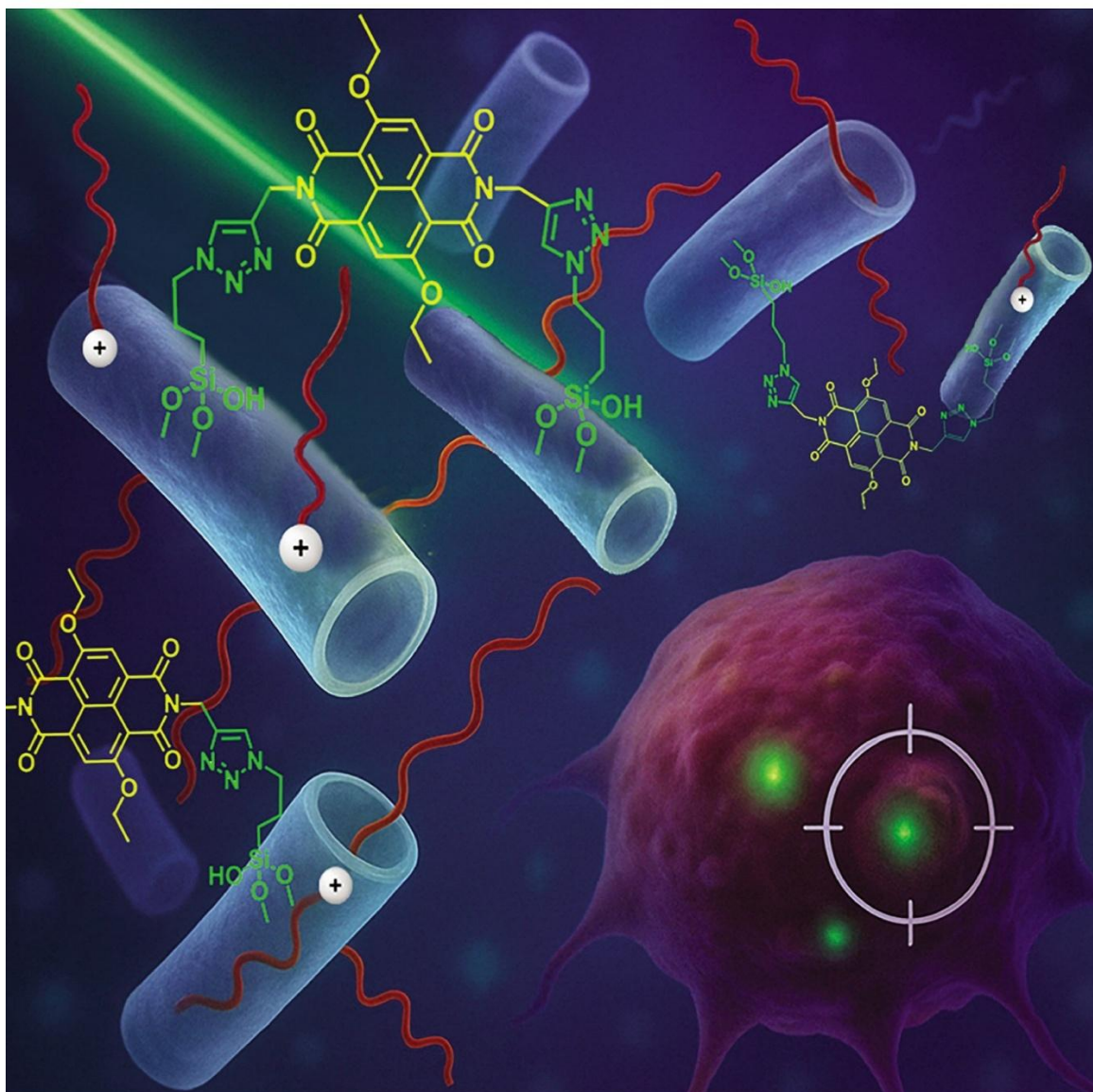
120. Fraile, J. M., *et al.*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2016) **108**, 83
121. Wang, J. e., *et al.*, *RSC Advances* (2016) **6** (38), 31816
122. Massaro, M., *et al.*, *ACS Medicinal Chemistry Letters* (2019) **10** (4), 419
123. Stealey, S. T., *et al.*, *Pharmaceutics (Basel)* (2023) **16** (6)
124. Brunchi, C.-E., and Morariu, S., *Molecules*, (2024), Vol. 29
125. Zhou, R., *et al.*, *J Tissue Viability* (2024) **33** (3), 487
126. Golafshan, N., *et al.*, *Carbohydrate polymers* (2017) **176**, 392
127. Heragh, B. K., *et al.*, *International Journal of Biological Macromolecules* (2021) **190**, 351
128. Suterio, N., *et al.*, *Applied Clay Science* (2022) **228**, 106651
129. Zhang, J., and Ma, P. X., *Advanced drug delivery reviews* (2013) **65** (9), 1215
130. Dong, R., *et al.*, *Advanced materials* (2015) **27** (3), 498
131. Cui, H., and Xu, B., *Chemical Society Reviews* (2017) **46** (21), 6430
132. Massaro, M., *et al.*, *ChemPlusChem* (2024) **89** (1), e202300370
133. Liao, X.-J., and Chen, G.-S., *Chinese Chemical Letters* (2016) **27** (4), 583
134. Yan, Y.-X., *et al.*, *ACS Applied Polymer Materials* (2020) **2** (12), 5641
135. Kong, J., *et al.*, *Nano Today* (2025) **65**, 102861
136. Lagona, J., *et al.*, *Angewandte Chemie International Edition* (2005) **44** (31), 4844
137. Lee, J. W., *et al.*, *Accounts of chemical research* (2003) **36** (8), 621
138. Kim, J., *et al.*, *Journal of the American Chemical Society* (2000) **122** (3), 540
139. Ulatowski, F., *et al.*, *The Journal of organic chemistry* (2016) **81** (5), 1746
140. Maestrelli, F., *et al.*, *Pharmaceutics*, (2022), Vol. 14
141. Haimhoffer, Á., *et al.*, *Scientia Pharmaceutica*, (2019), Vol. 87
142. Uria-Canseco, E., *et al.*, *The Journal of Chemical Thermodynamics* (2019) **129**, 55
143. Meo, P. L., *et al.*, *Tetrahedron* (2004) **60** (41), 9099
144. Floare, C. G., *et al.*, *Journal of Molecular Structure* (2013) **1044**, 72

Capitolo 3

Sistemi nanostrutturati fluorescenti per il biosensing

ACS **APPLIED**
NANO MATERIALS

June 20, 2025
Volume 8
Number 24
pubs.acs.org/acsanm



 ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

www.acs.org

Capitolo 3

Sistemi nanostrutturati fluorescenti per il biosensing

3.1. Il ruolo dei biosensori nella diagnostica avanzata e nella nanomedicina

I biosensori rappresentano strumenti centrali nella diagnostica moderna e nella nanomedicina, grazie alla capacità di rilevare specifiche specie chimiche con elevata sensibilità, selettività e rapidità,¹ superando i limiti dei metodi convenzionali spesso invasivi e dispendiosi.² Le applicazioni coprono un ampio spettro di ambiti patologici (**Figura 1**): in oncologia, malattie infettive, cardiovascolari, autoimmuni o respiratorie.^{3,4} Ulteriori applicazioni riguardano le patologie neurologiche, come Alzheimer e Parkinson, dove il rilevamento di biomarcatori o ioni specifici, consente diagnosi precoci e approcci terapeutici personalizzati.^{5,6}

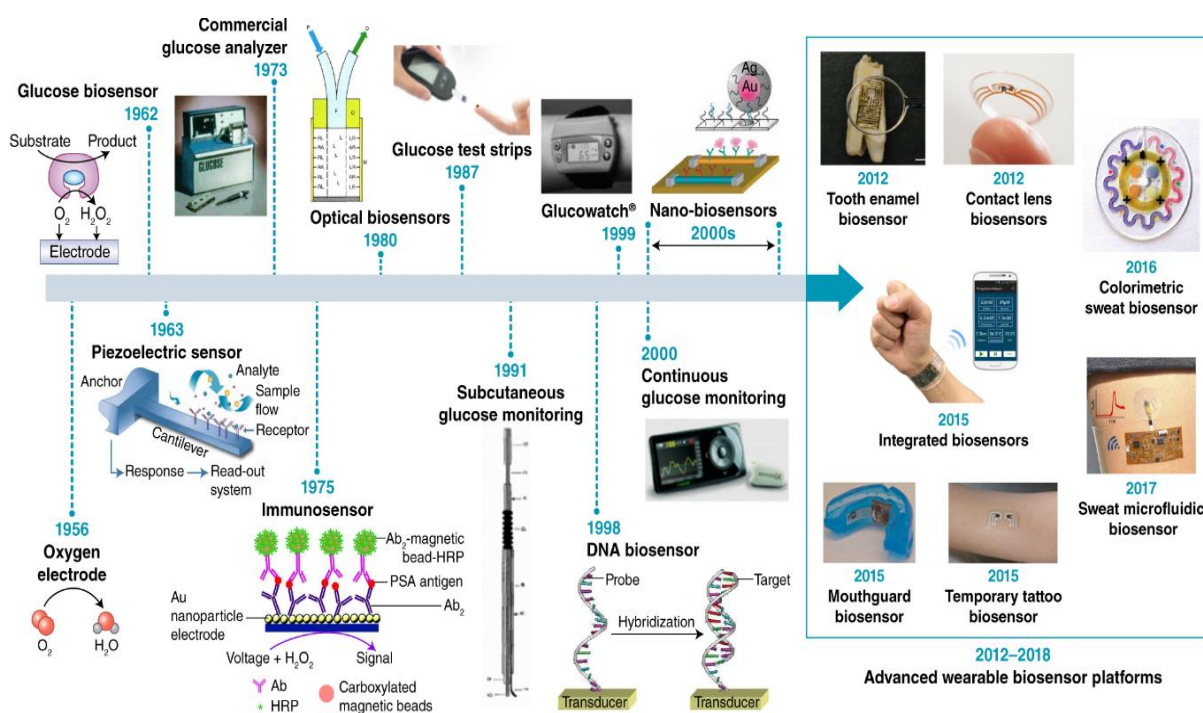


Figura 1. Sviluppo temporale dei biosensori e loro applicazioni in nanomedicina (Nammi e Neelapu, 2020).⁷

I biosensori, quando vengono combinati con i nanomateriali, non solo aumentano sensibilità e specificità diagnostica,⁸ ma si configurano come nanosistemi strategici per la nanomedicina, aprendo la strada a una cura personalizzata, al monitoraggio in tempo reale e allo sviluppo di terapie mirate.⁹ Per questo motivo, il *biosensing* si delinea come uno dei principali pilastri della medicina moderna, capace di garantire una diagnosi tempestiva, riduzione degli interventi invasivi, prevenzione e ottimizzazione delle strategie terapeutiche classiche.

3.1.1. Le nanobioteecnologie nel biosensing

L'applicazione delle nanobioteecnologie nel campo dei biosensori ha rappresentato una svolta decisiva, con un impatto profondo sia sulla progettazione che sulle prestazioni di questi dispositivi.¹⁰ Diversi nanomateriali,¹¹ nanotubi e *nanowires*, ad esempio, si sono affermati come componenti chiave poiché capaci di migliorare l'efficacia del riconoscimento.^{12,13} In particolare, le nanoparticelle metalliche, come quelle d'oro (AuNPs), hanno dimostrato un ruolo cruciale nel migliorare le prestazioni elettrochimiche dei biosensori.¹⁴ L'utilizzo dei nanomateriali ha così favorito lo sviluppo di dispositivi diagnostici e terapeutici avanzati.¹⁵ Parallelamente all'evoluzione dei materiali, anche le tipologie di biosensori si sono progressivamente diversificate. Dai primi sensori enzimatici,¹⁶ fino agli immunosensori e ai sensori a DNA basati sull'ibridazione di acidi nucleici,^{17,18} la gamma di dispositivi oggi disponibili testimonia la versatilità di questa tecnologia. A questi si aggiungono biosensori magnetici, termici e piezoelettrici, ciascuno caratterizzato da specifici principi di trasduzione e specifiche applicazioni (**Figura 2**).¹⁹

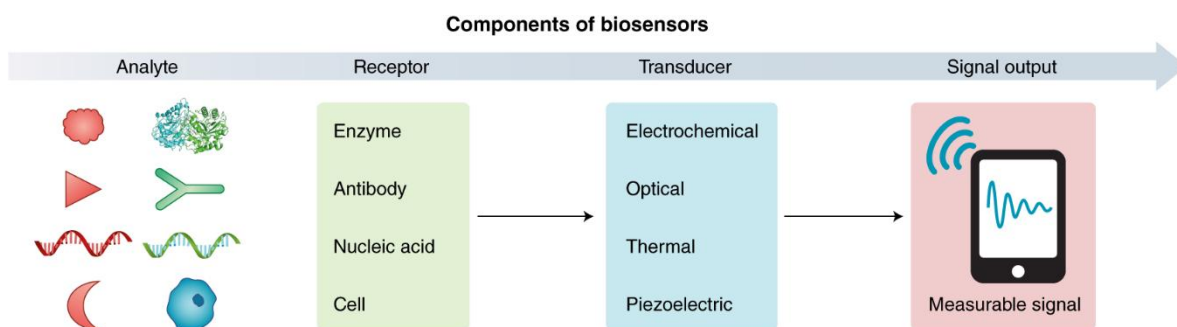


Figura 2. Schema di funzionamento di un biosensore e suoi principali componenti (Yarman *et al.*, 2020).²⁰

Tra tutti, un ruolo di particolare rilievo è rivestito dai biosensori ottici,²¹ che grazie all'impiego di sorgenti luminose e rivelatori avanzati permettono una trasduzione estremamente sensibile dei segnali biologici.²²

3.2. La fluorescenza come strumento per il sensing

Il campo del *sensing* fluorescente è esploso negli ultimi decenni, con un numero sempre crescente di sonde fluorescenti per l'*imaging* di composti bioattivi o ioni associati a malattie.^{23,24} Dal punto di vista strutturale, una sonda fluorescente generalmente è composta da tre elementi principali: l'unità di riconoscimento, il fluoroforo (responsabile dell'emissione

luminosa) e il *linker*.²⁵ Il fluoroforo rappresenta il cuore della sonda, e la scelta delle sue caratteristiche di eccitazione o emissione è cruciale a seconda dell'applicazione.²⁶

La maggior parte dei fluorofori attualmente in uso appartiene a due categorie: materiali fluorescenti inorganici o organici e piccole molecole organiche. I primi si basano normalmente su ioni di metalli del gruppo *d* o *f*, comprendendo anche elementi delle terre rare, come europio (Eu), terbio (Tb), samario (Sm), erbio (Er) e neodimio (Nd).^{27,28} In maniera complementare a questi sistemi, può essere impiegata una moltitudine di materiali fluorescenti organici come i *carbon dots* (CDs),²⁹ che vantano un'ampia gamma di strutture variabili e in grado di produrre lunghezze d'onda modulabili,³⁰ adatte praticamente a qualsiasi applicazione.³¹ Infine, tra le piccole molecole organiche più comunemente usate, troviamo le cianine ed emicianine, le rodamine, le cumarine, le naftalimmidi, i BODIPY e le ossazine (**Figura 3**).³²⁻³⁴

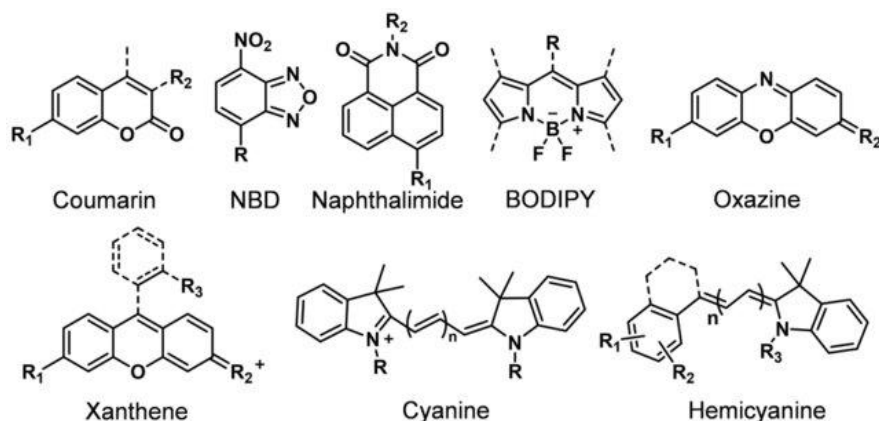


Figura 3. Principali classi di molecole organiche usate per il *biosensing* ottico a fluorescenza (Jiang *et al.*, 2023).³⁵

Due parametri sono particolarmente importanti per descrivere la bontà di un fluoroforo: la resa quantica (*Quantum Yield*, QY), definita come il rapporto tra il numero di fotoni emessi e quelli assorbiti, e la durata di vita della fluorescenza (*lifetime*), ossia il tempo medio in cui l'elettrone permane nello stato eccitato prima di tornare allo stato fondamentale.^{36,37} Inoltre, diversi fattori (**Figura 4**) possono influenzare le proprietà fluorescenti di questi materiali o molecole organiche tra cui: la polarità e la viscosità del solvente (con spostamento degli spettri verso lunghezze d'onda maggiori all'aumentare della polarità), la velocità di rilassamento del solvente (dipendente da temperatura e viscosità), i cambiamenti conformazionali della sonda, il pH e la temperatura.^{38,39}

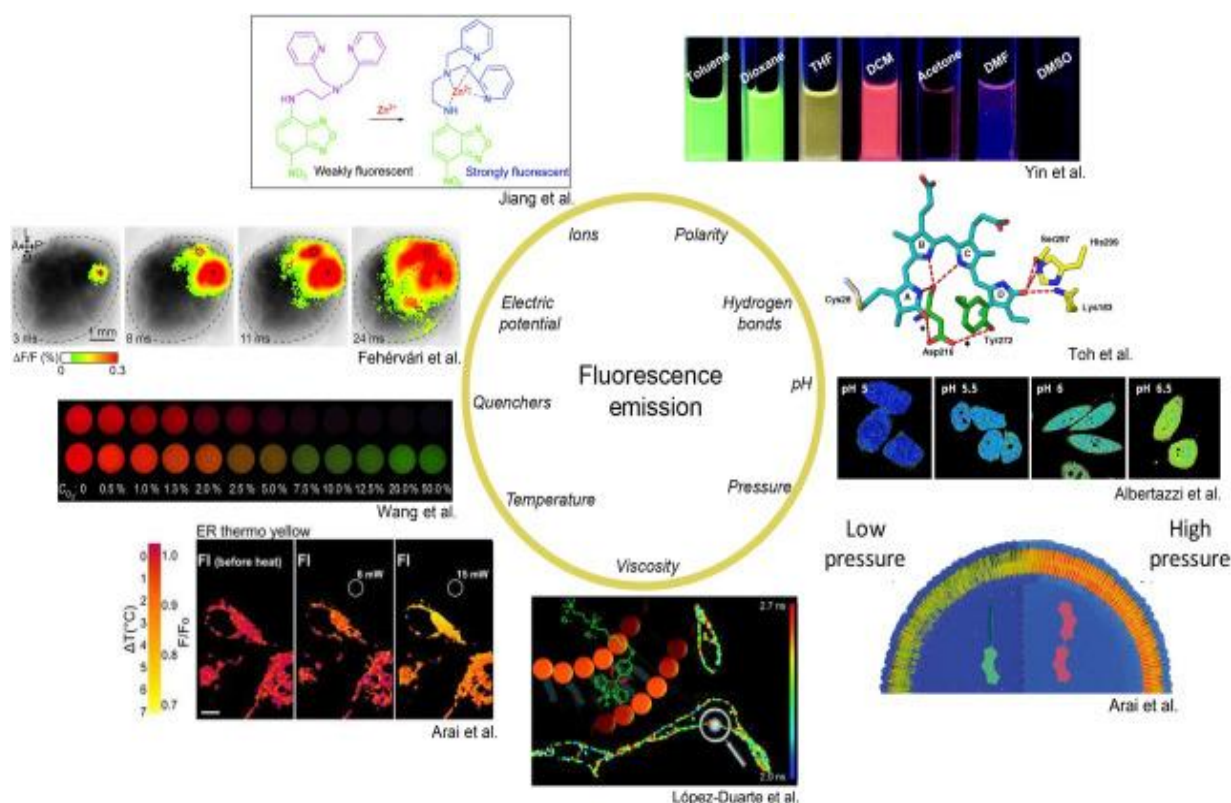


Figura 4. Principali fattori fisici e chimici che influenzano l’emissione di fluorescenza (Chandra *et al.*, 2020).⁴⁰

Grazie a questa grande variabilità, la fluorescenza si è affermata negli ultimi decenni come una tecnologia dirompente per il *sensing*, permettendo di visualizzare in tempo reale processi fisiologici e patologici dal livello subcellulare a quello sistemico, nel caso dei *bioimaging*, e offrendo strumenti avanzati per la diagnosi e il trattamento clinico, come nel caso ad esempio del *biosensing* di diversi ioni implicati nei diversi processi patologici, come vedremo ora nel dettaglio.³⁹

3.3. *Biosensing di ioni metallici: Meccanismi on-off/off-on e proprietà*

Il *sensing* fluorescente di ioni metallici in ambito biologico si basa principalmente su meccanismi di *quenching* (spegnimento della fluorescenza) e sui modelli “*on-off*” e “*off-on*”, in cui la presenza o l’assenza dell’analita induce rispettivamente la soppressione o l’attivazione dell’emissione di fluorescenza della molecola utilizzata come sensore.^{41,42} Questa strategia è ampiamente utilizzata per monitorare ioni essenziali o tossici come Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} e Cd^{2+} , spesso coinvolti in processi patologici o neurodegenerativi.^{43,44} L’efficacia delle sonde utilizzate a questo scopo dipendono però: dalla sua selettività, fondamentale per distinguere il metallo *target* in presenza di specie interferenti;⁴⁵ dalla stabilità foto-fisica, che ne garantisce

l'uso in ambienti biologici complessi; dall'efficienza di fluorescenza, necessaria per produrre segnali intensi e facilmente rilevabili anche a basse concentrazioni di ioni.⁴⁶ Inoltre, la progettazione dei sensori deve tener conto di parametri come la costante di legame, la reversibilità dell'interazione e la capacità di operare in condizioni fisiologiche.⁴⁴ In questo contesto, le sonde fluorescenti con meccanismo *on-off/off-on switching*, e che posseggono queste caratteristiche, rappresentano strumenti potenti per la diagnosi precoce e il monitoraggio in tempo reale di ioni metallici direttamente coinvolti nello sviluppo di malattie.⁴⁷

Tra i sistemi più studiati e utilizzati per il *sensing* di ioni metallici, come vedremo a breve, un ruolo importante è svolto dalle molecole organiche chelanti, 1,10-fenantrolina (Phe),⁴⁴ da nanomateriali a base di carbonio, come i CDs,^{48,49} e dalle naftalendiimmidi (NDI) e loro derivati.⁵⁰

3.3.1. Sistemi fluorescenti per la chelazione di metalli: nuovi sviluppi

Tra i numerosi ligandi fluorescenti utilizzati come sonde chelanti per il riconoscimento di ioni metallici, come prima accennato, un ruolo di particolare rilievo è rivestito dalla 1,10-fenantrolina (Phe) e dai suoi derivati.⁵¹ Questo composto rappresenta uno dei ligandi più utilizzati per via della sua planarità e rigidità strutturale, che le conferiscono eccellenti proprietà spettroscopiche come un'elevata resa quantica di fluorescenza, un alto coefficiente di estinzione molare e l'eccitazione nella regione del visibile.^{52,53} Sistemi fluorescenti basati sulla fenantrolina sono stati ampiamente utilizzati per il rilevamento di ioni Hg^{2+} , Fe^{2+} e Cu^{2+} , mostrando risultati promettenti in termini di sensibilità e selettività.⁵⁴⁻⁵⁶ Ad esempio, Kumar *et al.* hanno progettato un nuovo sensore fluorescente a base di fenantrolina-benzotiazolo per la rilevazione di Hg^{2+} in campioni biologici e ambientali, dimostrando un'elevata efficienza e specificità.⁵⁴ Fernandes *et al.* hanno sviluppato un sistema portatile basato sull'assorbimento spettroscopico per la determinazione di Fe^{2+} in acqua, utilizzando la formazione di un complesso con fenantrolina; il dispositivo ha mostrato un'elevata sensibilità ($2.5 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{L}$) e una risposta lineare nell'intervallo $25\text{--}1000 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{L}$.⁵⁷ Mula *et al.* hanno invece riportato un coniugato BODIPY-fenantrolina, con meccanismo *turn-off* altamente selettivo per lo ione Cu^{2+} , utilizzato con successo sia nell'*imaging* cellulare che nell'analisi di campioni di siero.⁵⁸ Tuttavia, l'uso diretto della fenantrolina e dei suoi derivati presenta alcune criticità, tra cui la scarsa solubilità in acqua, l'impossibile riutilizzo e la suscettibilità a fotodegradazione, che ne riducono l'utilizzo a lungo termine nei sistemi di *sensing*. Recentemente Nycz *et al.*, per

superare i problemi legati alla solubilità, hanno sintetizzato derivati stirilici idrosolubili di chinolina e 1,10-fenantrolina (**Figura 5**). Questi composti si sono rivelati efficaci sensori ottici per ioni metallici (Hg^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Ag^{+}) mediante risposte colorimetriche e fluorescenti.⁵⁹

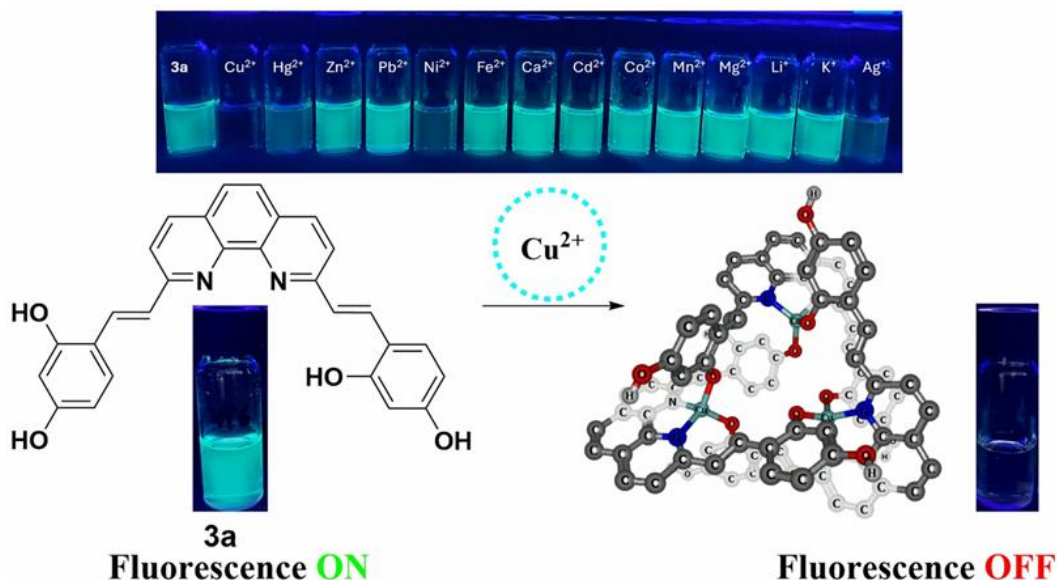
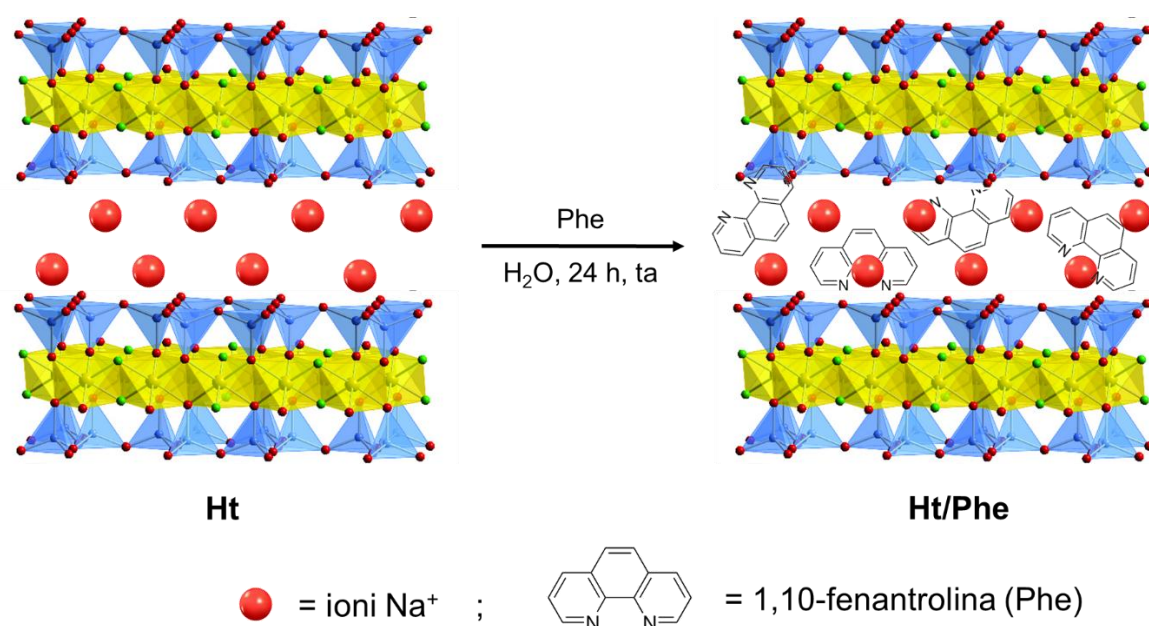


Figura 5. Funzionamento di un derivato della fenantrolina e meccanismo ON/OFF per la determinazione di Hg^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Ag^{+} (Nycz *et al.*, 2025).⁵⁹

Un ulteriore strategia per il superamento di tali problematiche, potrebbe essere rappresentato dall'utilizzo di nanomateriali, che si sono dimostrati piattaforme ideali per stabilizzare e riutilizzare ligandi fluorescenti. In particolare, le argille minerali, ancora una volta, potrebbero rappresentare un supporto versatile e sostenibile per lo sviluppo di nanostrutture ibride fluorescenti a base di fenantrolina. In questo contesto, abbiamo realizzato un nanomateriale a base di hectorite e fenantrolina (Ht/Phe) per lo sviluppo di un sensore fluorescente destinato al riconoscimento degli ioni Zn^{2+} in soluzione acquosa. Lo zinco, infatti, è coinvolto in diversi processi biologici: un suo eccesso nell'organismo è stato correlato a patologie neurodegenerative quali il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson,⁶⁰ mentre una sua carenza è associata a condizioni patologiche come l'alopecia.⁶¹ Pertanto, lo sviluppo di metodi selettivi e sensibili per la rilevazione di ioni Zn^{2+} in ambiente acquoso riveste grande importanza in campo biomedico. Il nanomateriale Ht/Phe è stato sintetizzato, caratterizzato e ne è stata valutata la capacità di funzionamento come sensore fluorescente per la rivelazione selettiva di Zn^{2+} mediante misure spettrofluorimetriche. I risultati ottenuti sono riportati nel paragrafo a seguire.

3.3.1.1. Sintesi e caratterizzazione del sensore a base di hectorite/fenantrolina

Al fine di ottenere il nanomateriale Ht/Phe, per prima cosa è stato effettuato uno studio riguardo l'interazione tra questi due componenti. L'interazione della fenantrolina con l'hectorite è stata studiata tramite due approcci: (i) calcoli di meccanica quantistica e (ii) analisi sperimentali di tipo chimico-fisico. In questa tesi verrà trattato esclusivamente lo studio chimico-fisico, mentre la parte teorica di tale lavoro è riportata in: *Hectorite/Phenanthroline-Based Nanomaterial as Fluorescent Sensor for Zn Ion Detection: A Theoretical and Experimental Study* (Viseras-Iborra, Riela *et al.*, *Nanomaterials*, **2024**, *14*, 880). Il caricamento della Phe nell'Ht è stato realizzato mediante un adsorbimento in fase acquosa. In particolare, una soluzione concentrata di Phe è stata aggiunta ad una dispersione di Ht, e dopo 24 ore di agitazione, tramite dei lavaggi con acqua è stato rimosso l'eccesso di Phe non adsorbita (**Schema 1**). Una volta ottenuto il nanomateriale Ht/Phe, tramite TGA, è stato determinato il contenuto di Phe, che è risultato essere del 9 %p/p, indicando un'efficiente interazione tra la molecola e l'argilla, interazioni che sono state confermate e valutate con diversi tipi di caratterizzazione, quali TGA, FT-IR, XRD e SEM.



Schema 1. Schema di sintesi per l'ottenimento del nanomateriale Ht/Phe

Osservando il termogramma (**Figura 6a**) è chiaramente visibile la differenza tra l'Ht non modificata e il nanomateriale poiché entrambi possiedono una perdita di massa significativa tra 300 e 700 °C, che può essere attribuita all'eliminazione dell'acqua adsorbita e quella di

idratazione che tipicamente possiedono le smectiti come l'hectorite; tuttavia, nel caso del nanomateriale Ht/Phe sono presenti ulteriori perdite di massa, attribuibili alla volatilizzazione e degradazione della frazione organica intercalata nella struttura lamellare dell'argilla, e che comporta un residuo fisso finale inferiore rispetto all'Ht (82 e 91 %p/p rispettivamente per Ht/Phe e Ht). La spettroscopia FT-IR (**Figura 6b**) ha fornito ulteriori prove della riuscita della sintesi. Accanto alle bande caratteristiche dell'hectorite, compaiono nuove bande vibrazionali attribuibili alla molecola organica. In particolare, sono chiaramente visibili, nell'intervallo $1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, le bande di *stretching* dei doppi legami C=N e C=C e una banda dovuta al *bending* del legame C-H a 735 cm^{-1} . Analogamente, le analisi spettroscopiche UV-vis e di fluorescenza (**Figura 6c**) hanno mostrato le transizioni elettroniche tipiche della fenantrolina. In particolare, sono state evidenziate delle bande di assorbimento a 225 e 260 nm, riconducibili alla transizione $\pi\text{-}\pi^*$ degli anelli aromatici, e una banda di emissione a 360 nm, associata allo stato eccitato di singoletto $\pi\text{-}\pi^*$.⁶²

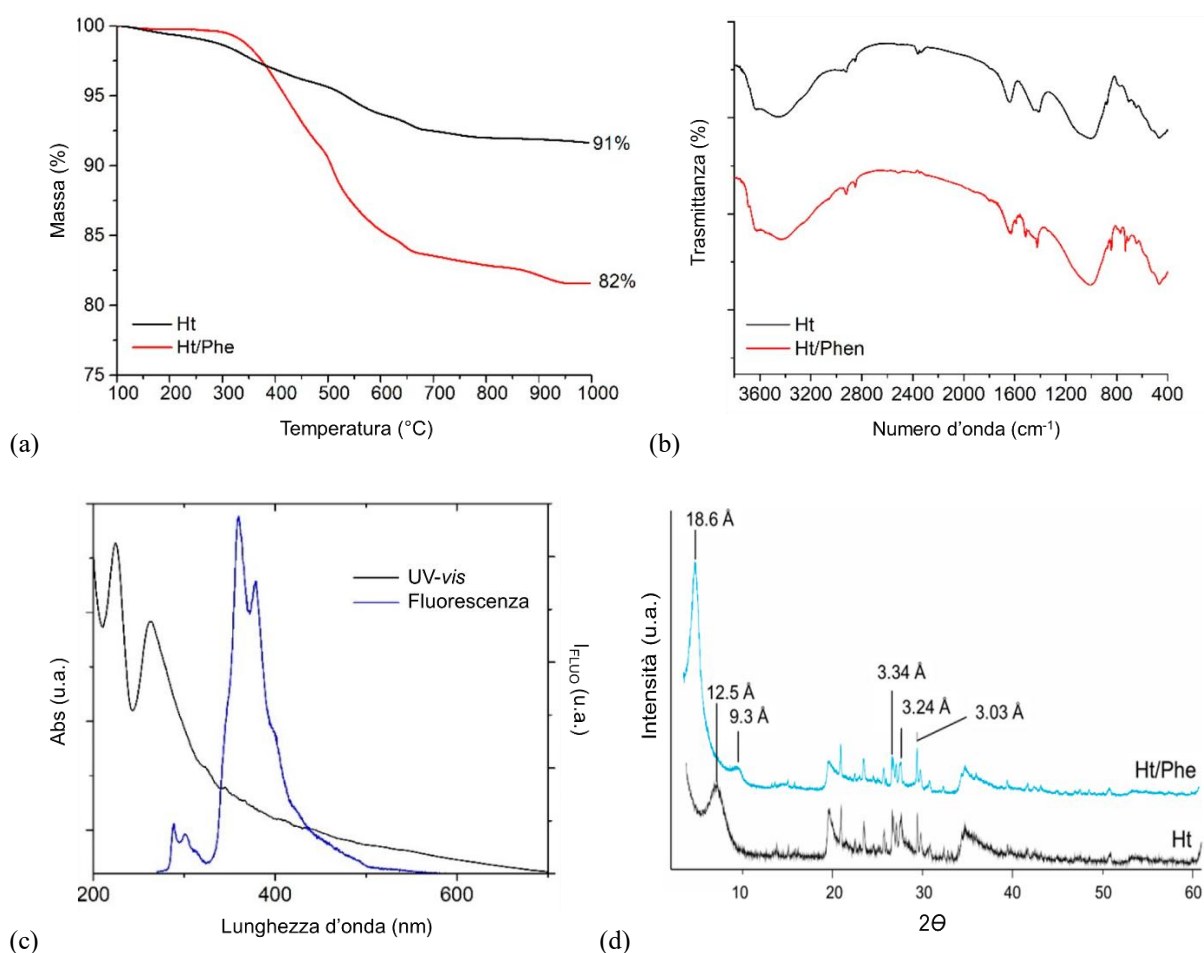


Figura 6. (a) Curve termogravimetriche, (b) spettri FT-IR, (c) spettri UV-vis e di fluorescenza e (d) diffrattogrammi XRD di Ht e del nanomateriale Ht/Phe.

Il fatto che queste transizioni siano osservabili anche dopo l'inserimento della Phe in Ht, suggerisce che la molecola organica conservi le proprietà fotofisiche anche all'interno dell'argilla, aprendo così la strada a potenziali applicazioni come sensore ottico. Una prova diretta dell'intercalazione è stata infine fornita dall'analisi XRD (**Figura 6d**), in cui è possibile osservare come lo spazio interlamellare dell'hectorite, in seguito ad introduzione della Phe, passi da 12.5 a 18.6 Å.

Infine, le immagini SEM (**Figura 7**) hanno mostrato come la tipica morfologia dell'hectorite venga mantenuta anche dopo il caricamento della Phe, in quanto la struttura compatta e lamellare dell'argilla non risulta compromessa. Ciò indica che l'intercalazione non altera la morfologia macroscopica del materiale, preservandone al contempo le proprietà strutturali originarie.⁶³

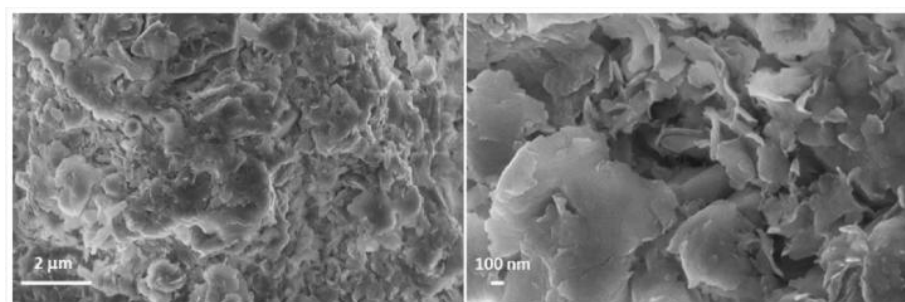
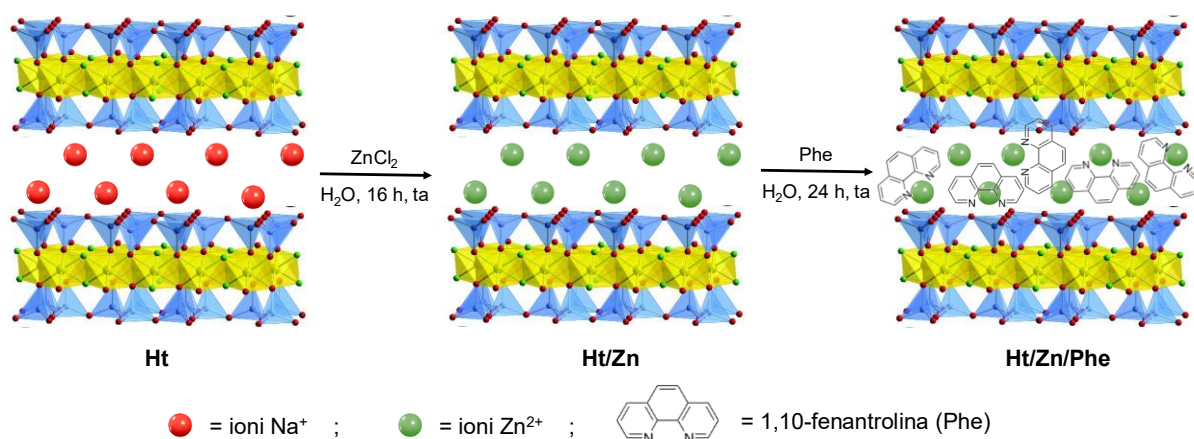


Figura 7. Immagine SEM del nanomateriale Ht/Phe.

Al fine di utilizzare questo nanomateriale per il *sensing* dello ione Zn^{2+} , è stata valutata e studiata la stabilità del complesso Ht/Zn/Phe (**Schema 2**). Per effettuare questo studio è stato sintetizzato un complesso allo stato solido in cui gli ioni Zn^{2+} sono stati caricati sull'hectorite tramite una reazione di scambio cationico, che tipicamente queste argille effettuano. L'hectorite è stata dispersa in una soluzione acquosa di ZnCl_2 (0.5 M), e la dispersione ottenuta è stata fatta agitare per una notte; il nanomateriale Ht/Zn, dopo essere stato lavato, ha mostrato una percentuale di caricamento, stimata tramite TGA, dell'1.3 %p/p. Successivamente sul nanomateriale Ht/Zn è stata caricata la fenantrolina, ottenendo un nanomateriale Ht/Zn/Phe finale con un contenuto di molecola organica pari al 12.7 %p/p.

Sul nanomateriale Ht/Zn/Phe sono state quindi effettuate le stesse caratterizzazioni del nanomateriale Ht/Phe, come ad esempio l'analisi FT-IR, che ha mostrato le stesse bande vibrazionali di *stretching* e *bending* dell'hectorite e della molecola organica.



Schema 2. Schema di sintesi per l'ottenimento del nanomateriale Ht/Zn/Phe.

A conferma dell'intercalazione degli ioni Zn^{2+} nella struttura lamellare dell'Ht, nelle misure XRD (**Figura 8**) si osserva una variazione nel picco relativo alla riflessione principale dell'argilla, che è passato da 12.5 Å in Ht a 15.3 Å per il nanomateriale Ht/Zn, evidenziando come l'aggiunta di ioni Zn^{2+} all'Ht comporti uno scambio con lo ione Na^+ aumentando di conseguenza lo spazio interlamellare. Quando al nanomateriale Ht/Zn è stata aggiunta la Phe, è stato osservato un comportamento simile a quello osservato per il nanomateriale Ht/Phe, in quanto il picco principale si è spostato a valori di 2θ più bassi (18 Å) e il picco di riflessione a ca. 9 Å, confermando ancora una volta dal punto di vista chimico-fisico la possibile interazione tra il nanomateriale Ht/Phe e gli ioni Zn^{2+} .

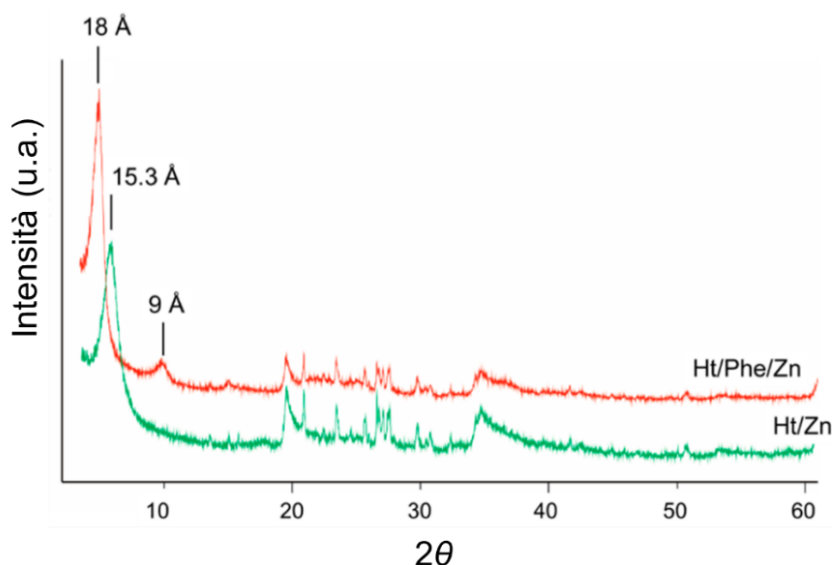
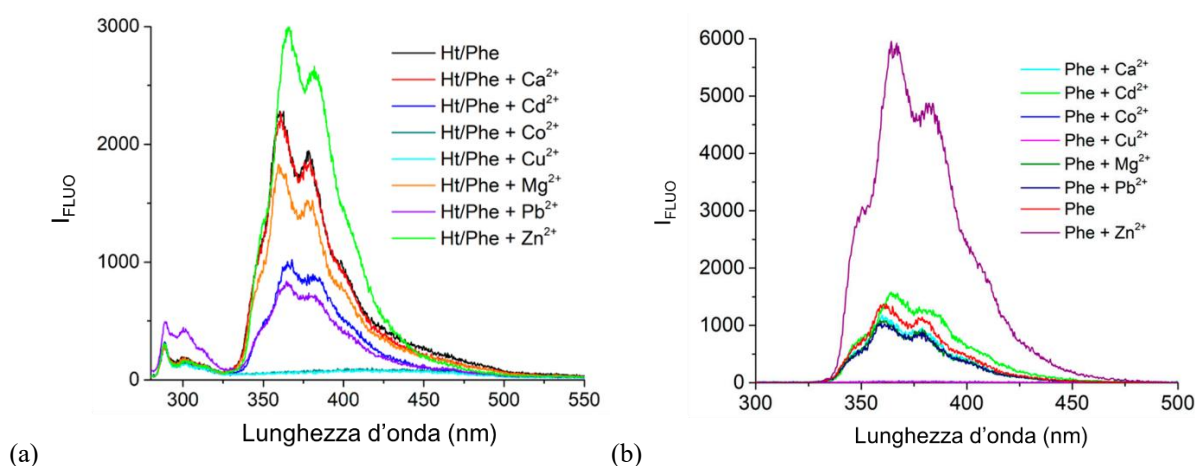


Figura 8. Spettro XRD del nanomateriale Ht/Phe/Zn a confronto con quello di Ht/Zn.

- **Risposta fluorescente e selettività di Ht/Phe nei confronti di Zn^{2+}**

Per validare la selettività della “sonda” Ht/Phe nei confronti degli ioni Zn^{2+} , è stato studiato il comportamento della fluorescenza del nanomateriale in presenza di diversi ioni metallici in soluzione acquosa (37.5 μM), ovvero Co^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} , eccitando alla lunghezza d’onda di 260 nm. Come riportato in **Figura 9a**, l’aggiunta di Co^{2+} e Cu^{2+} determina un *quenching* della fluorescenza della fenantrolina, mentre l’introduzione di Ca^{2+} e Mg^{2+} non modifica le proprietà emissive del materiale, evidenziando l’assenza di interazione significativa con questi due cationi. Al contrario, Pb^{2+} e Cd^{2+} causano una riduzione marcata dell’intensità di fluorescenza, ma senza causare alcuno spostamento della banda di emissione. Un comportamento nettamente diverso è stato osservato per lo Zn^{2+} : la sua introduzione comporta un incremento dell’intensità di fluorescenza del nanomateriale Ht/Phe, accompagnato da uno *shift* batocromico di circa 10 nm della banda di emissione, che passa da 360 a circa 370 nm. Questo risultato è di particolare interesse poiché indica che il nanomateriale non solo mantiene la capacità della fenantrolina libera di complessare lo Zn^{2+} (come riportato in **Figura 9b**), ma addirittura amplifica la risposta ottica, aprendo prospettive per l’impiego del materiale come sensore selettivo per questo metallo. Per approfondire ulteriormente la specificità del sistema, è stata valutata la risposta del nanomateriale Ht/Phe verso Zn^{2+} in presenza di altri ioni metallici potenzialmente competitivi. Per far questo, è stata aggiunta una soluzione contenente Zn^{2+} (37.5 μM) a dispersioni di Ht/Phe e altri cationi (barre blu in **Figura 9c**). I risultati mostrano chiaramente che, in quasi tutti i casi analizzati, l’aggiunta dello Zn^{2+} comporta un netto incremento dell’intensità di emissione (barre rosa), confermando che la presenza di altri metalli non ostacola il legame dello Zn^{2+} con il nanomateriale.



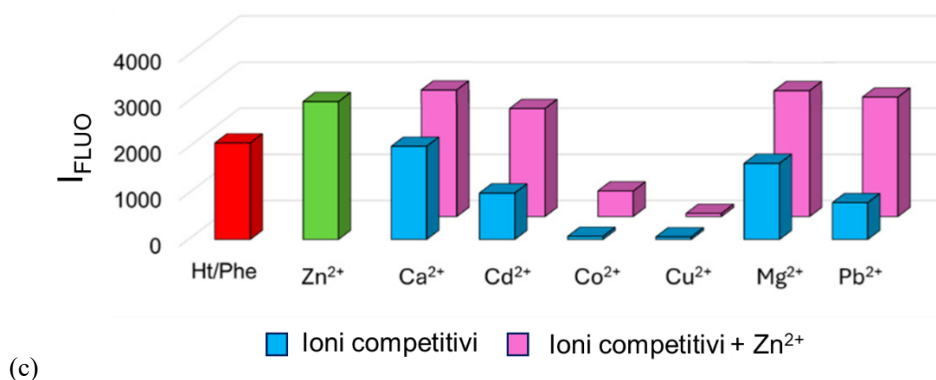


Figura 9. Variazioni negli spettri di emissione di fluorescenza ($\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$) di (a) Ht/Phe (0.05 mg mL^{-1}) e (b) Phe ($25 \text{ }\mu\text{M}$) in seguito all'aggiunta di diversi ioni metallici ($37.5 \text{ }\mu\text{M}$) in acqua; (c) intensità di fluorescenza del nanomateriale Ht/Phe in assenza (barra rossa) e in presenza di differenti cationi metallici ($37.5 \text{ }\mu\text{M}$) senza (barre blu) e con (barre rosa) l'aggiunta di ioni Zn^{2+} ($37.5 \text{ }\mu\text{M}$) in acqua; in verde è riportata la risposta di fluorescenza di Ht/Phe all'aggiunta di Zn^{2+}

Al fine di determinare la sensibilità del nanomateriale Ht/Phe verso gli ioni Zn^{2+} , è stato calcolato il limite di rivelazione (LOD, *Limit of Detection*). Il LOD rappresenta la minima concentrazione di analita rilevabile da un sistema analitico con un livello di confidenza accettabile, costituendo quindi un parametro chiave per valutare l'efficacia di un sensore; più basso è il valore di LOD, maggiore è la capacità del materiale di riconoscere tracce dell'analita di interesse. Come mostrato in **Figura 10a**, l'aggiunta di concentrazioni crescenti di Zn^{2+} induce un progressivo incremento dell'intensità della banda di emissione a 370 nm , segnale a questo punto diretto della formazione di un complesso di coordinazione tra gli ioni metallici e il sistema Ht/Phe. L'analisi quantitativa di questo comportamento, ottenuta tramite la regressione lineare dei dati sperimentali, ha permesso di calcolare il LOD applicando la seguente relazione:

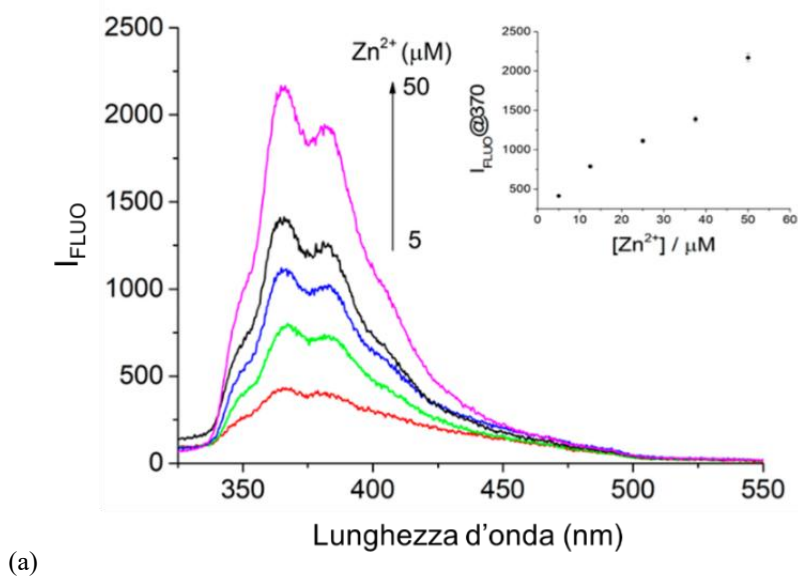
$$LOD = \frac{3\sigma}{k} \quad (\text{Eq. 1})$$

dove σ corrisponde alla deviazione standard dell'intercetta e k alla pendenza della regressione lineare. Il valore ottenuto, pari a $5.2 \text{ }\mu\text{M}$, risulta pienamente confrontabile con quanto riportato in letteratura per sistemi analoghi.⁶⁴ Inoltre, questo risultato assume un significato particolarmente importante se confrontato con le concentrazioni fisiologiche di Zn^{2+} nel plasma umano, che si collocano nell'intervallo $6\text{-}12 \text{ }\mu\text{M}$.⁶⁵ Quindi che il nanomateriale sviluppato possiede un limite di rivelazione compatibile con valori biologicamente rilevanti, rendendolo di potenziale interesse per applicazioni nel monitoraggio di Zn^{2+} in fluidi biologici. Inoltre, l'impiego dell'hectorite, un materiale naturale, economico e biocompatibile, garantisce ulteriori

vantaggi in termini di sostenibilità e semplicità di recupero,⁶⁶ senza la necessità di procedure di purificazione complesse, come suggerito dai risultati riportati di seguito riguardo gli studi di reversibilità e riutilizzo del sistema.

- *Studi di reversibilità e strip test*

L'aumento dell'intensità di fluorescenza del nanomateriale Ht/Phe in presenza di ioni Zn^{2+} è risultato reversibile, come dimostrato dagli esperimenti condotti in presenza di EDTA. L'EDTA, noto agente chelante con elevata affinità per gli ioni metallici, è stato utilizzato per sottrarre selettivamente lo Zn^{2+} coordinato al nanomateriale. In seguito ad aggiunte sequenziali di ioni Zn^{2+} ed EDTA, si è osservato un chiaro comportamento di tipo *off-on-off* del segnale fluorescente del nanomateriale, che è stato mantenuto per almeno otto cicli consecutivi con una perdita minima di intensità del segnale (**Figura 10b**). Questo dato è particolarmente significativo, poiché dimostra non solo la capacità del materiale di riconoscere selettivamente lo Zn^{2+} , ma anche la sua stabilità e possibile riutilizzo, caratteristiche essenziali per lo sviluppo di sensori pratici ed efficienti. La reversibilità, infatti, è un requisito fondamentale in ambito sensoristico: consente di rigenerare il sistema più volte senza perdita di prestazioni, rendendolo competitivo rispetto a sonde monouso.⁶⁷



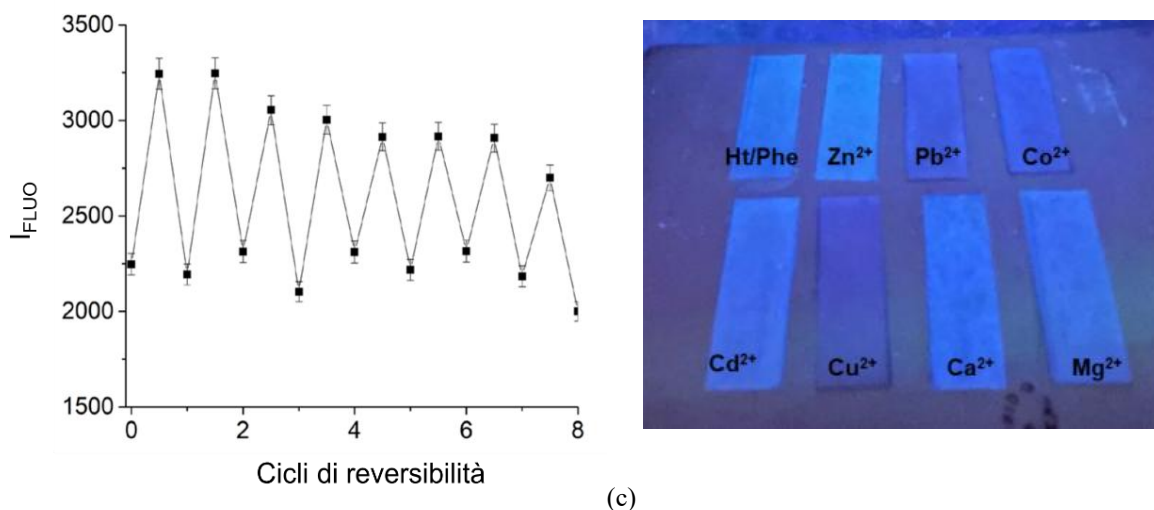


Figura 10. (a) Spettri di fluorescenza del nanomateriale Ht/Phe in seguito all'aggiunta di diverse concentrazioni di ioni Zn^{2+} (5-50 μM); (b) reversibilità del nanomateriale Ht/Zn (0.05 mg mL⁻¹) in seguito ad aggiunte sequenziali di Zn^{2+} ed EDTA, $\lambda_{ex} = 260$ nm (le barre di errore rappresentano la deviazione standard, SD, con $n = 3$); (c) fotografie dello *strip test* per la rilevazione di diversi cationi irradiando a 265 nm.

Per esplorare l'applicabilità pratica del nanomateriale, sono stati inoltre realizzati degli *strip test*. A tale scopo su strisce di carta da filtro è stata depositata una dispersione del nanomateriale Ht/Phe. Come mostrato in **Figura 10c**, irradiando a 265 nm, le strisce contenenti Zn^{2+} hanno mostrato un'intensificazione evidente della luminescenza, mentre in presenza di Ca^{2+} , Cd^{2+} e Mg^{2+} non si sono osservate variazioni significative. Al contrario, l'aggiunta di Pb^{2+} , Cu^{2+} e Co^{2+} ha portato a un *quenching* della fluorescenza in accordo con i dati precedentemente ottenuti. Nel complesso questi dati dimostrano che Ht/Phe presenta un comportamento altamente selettivo nei confronti dello Zn^{2+} , distinguendolo da altri cationi bivalenti che provocano principalmente *quenching* o non inducono alcuna variazione significativa della fluorescenza. Tale specificità, associata alla sensibilità del segnale ottico, e la sua reversibilità rende il nanomateriale un candidato promettente per applicazioni nel rilevamento selettivo dello Zn^{2+} in soluzione acquosa.

Come accennato precedentemente, oltre alle molecole organiche fluorescenti appena descritte che prevedono la chelazione dei metalli, sono molti i nanomateriali utilizzati per il *sensing* di questi. Tra tutti, durante il percorso di dottorato, particolare attenzione è stata rivolta ai *carbon dots*.

3.3.2. I carbon dots nel sensing: proprietà e nuovi sviluppi

I *carbon dots* (CDs), nanoparticelle di carbonio generalmente di dimensioni inferiori ai 10 nm,⁶⁸ sono caratterizzati da una bassa tossicità, semplicità di sintesi, stabilità ottica e notevoli proprietà fluorescenti.^{30,69,70} A seconda delle condizioni sperimentali adottate, della scelta dei precursori e dei trattamenti pre- o post-sintesi, è possibile ottenere CDs con differenti dimensioni e proprietà fotoluminescenti modulabili, che li rendono adatti a una vasta gamma di applicazioni (**Figura 11**).⁷¹

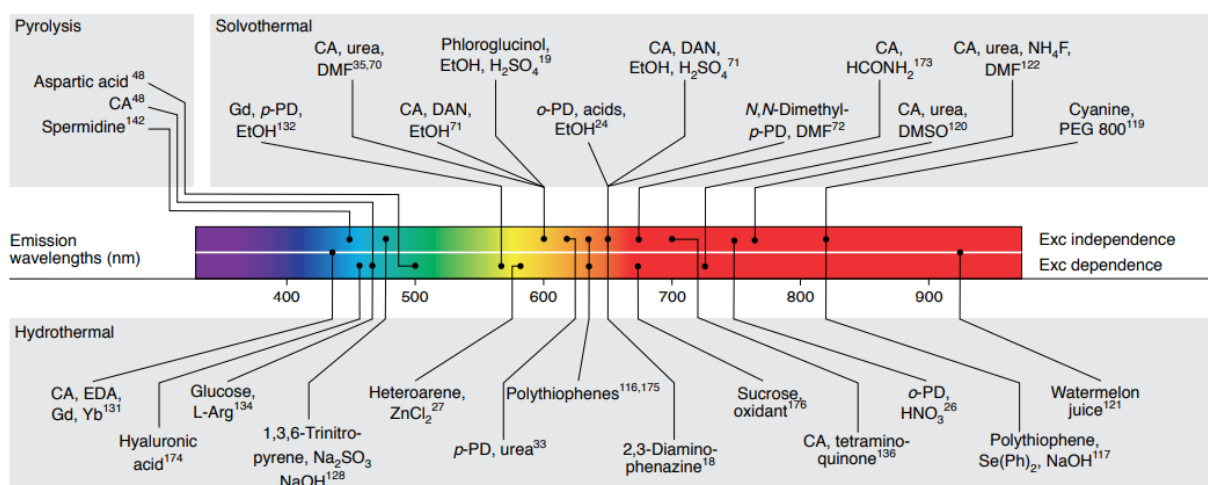


Figura 11. Emissione di fluorescenza dei CDs utilizzando i comuni approcci sintetici. Le diverse lunghezze d'onda di emissione (nm) e la dipendenza/indipendenza dall'eccitazione sono descritte in letteratura e attribuite alla natura eterogenea dei CDs (Đorđević *et al.* 2022).⁶⁸

Dal punto di vista storico, i CDs sono stati scoperti nel 2004 durante la purificazione dei nanotubi di carbonio da parte di Scrivens *et al.*⁷² Da allora, sono stati sviluppati numerosi precursori e differenti metodologie sintetiche,^{73,74} riconducibili a due principali approcci: *top-down* e *bottom-up*. Il primo utilizza materiali carboniosi (grafite, *carbon black*, ecc.) sottoposti a trattamenti chimici aggressivi (forti ossidazioni acide) o fisici (ablazione laser), con la formazione di particelle che mostrano tipicamente emissione nel blu.⁷⁵ L'approccio *bottom-up*, invece, sfrutta piccole molecole sottoposte a trattamenti solvotermici o a microonde, consentendo di ottenere CDs con emissioni modulabili in diverse regioni spettrali.⁷⁶ In particolare, le sintesi *bottom-up* rappresentano una via *green*, rapida ed energeticamente efficiente, come dimostra la sintesi a microonde, nella quale i precursori carboniosi vengono convertiti in nanoparticelle fluorescenti tramite processi di pirolisi.⁷⁷ Grazie alla loro sensibilità

ottica e alle eccellenti prestazioni in termini di limite di rivelazione, sensibilità e selettività, i CDs si sono affermati come piattaforme ideali per applicazioni nel *sensing* di ioni metallici.⁷⁸⁻⁸⁰ In particolare, i meccanismi di *quenching* della fluorescenza, resi possibili dall'interazione dei gruppi funzionali superficiali con i cationi metallici (**Figura 12**),^{81,82} rendono questi nanomateriali particolarmente interessanti per lo sviluppo di sensori fluorescenti selettivi, coniugando semplicità di sintesi, basso costo e biocompatibilità.^{83,84} Tra i diversi metalli studiati, un ruolo di primaria importanza è rivestito dal ferro, elemento essenziale per la vita, che si trova principalmente in due stati di ossidazione: ferroso (Fe^{2+}) e ferrico (Fe^{3+}).⁸⁵

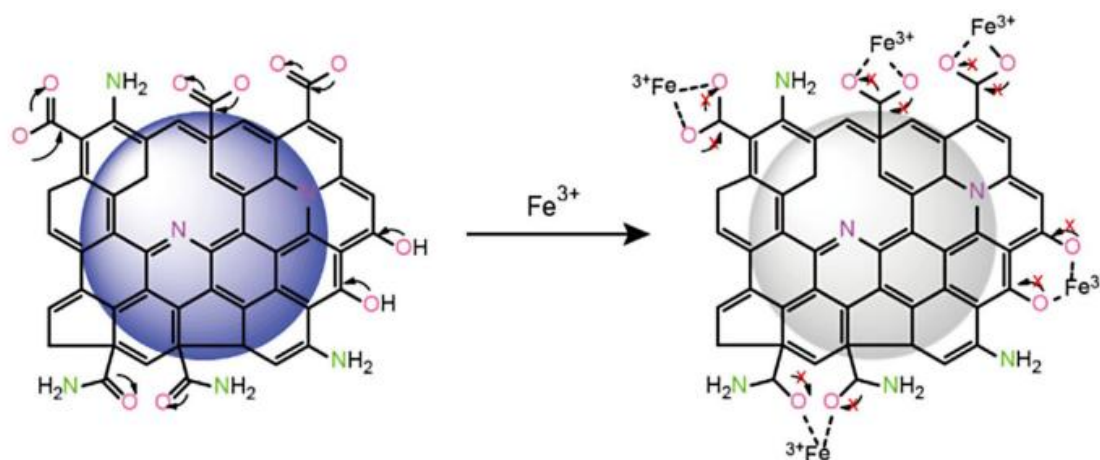


Figura 12. Schema illustrativo dell'inibizione del trasferimento di carica tra atomi appartenenti a differenti gruppi funzionali superficiali e della conseguente attenuazione dell'intensità di PL indotta dalla chelazione con Fe^{3+} (Shah *et al.* 2019).⁸²

Tra i due, lo stato ferrico risulta più pericoloso, sia per la sua scarsa solubilità sia per la capacità di generare radicali tossici. L'accumulo di Fe^{3+} nell'ambiente o nell'organismo umano è stato infatti collegato a diverse patologie, come cancro,⁸⁶ morbo di Parkinson,⁸⁷ malattia di Alzheimer,⁸⁸ fenomeni di citotossicità e disordini metabolici.⁸⁹ L'eccesso di ferro libero o mal regolato può accettare elettroni dall'ambiente circostante, con conseguente danno ai sistemi cellulari. Diversi studi hanno affrontato l'impiego dei CDs per il *sensing* degli ioni Fe(III) , utilizzando approcci ed efficacie differenti.⁹⁰⁻⁹⁵

Tuttavia, un aspetto cruciale riguarda la purezza di queste nanoparticelle; è stato infatti dimostrato che le proprietà di luminescenza dei CDs possono essere influenzate dalla presenza di impurità molecolari secondarie.^{96,97} Per massimizzare le prestazioni è quindi fondamentale una corretta purificazione, poiché metodiche non adeguate possono condurre a interpretazioni errate sui meccanismi di emissione. Le strategie più comuni si basano sulla dialisi a basso *cut-*

off, che tuttavia non risulta sempre efficace; di conseguenza, sono state proposte tecniche alternative.⁷⁷ Numerosi studi hanno sottolineato come questa fase sia determinante non solo per ottenere materiali affidabili, ma anche per chiarire i meccanismi fotofisici.^{98,99}

A proposito di questo, negli ultimi anni, Riela *et al.*, hanno riportato la sintesi di CDs mediante un approccio *bottom-up*, in cui la sorgente carboniosa veniva preventivamente legata a un supporto inorganico, quale l'halloysite (**Figura 13**).¹⁰⁰

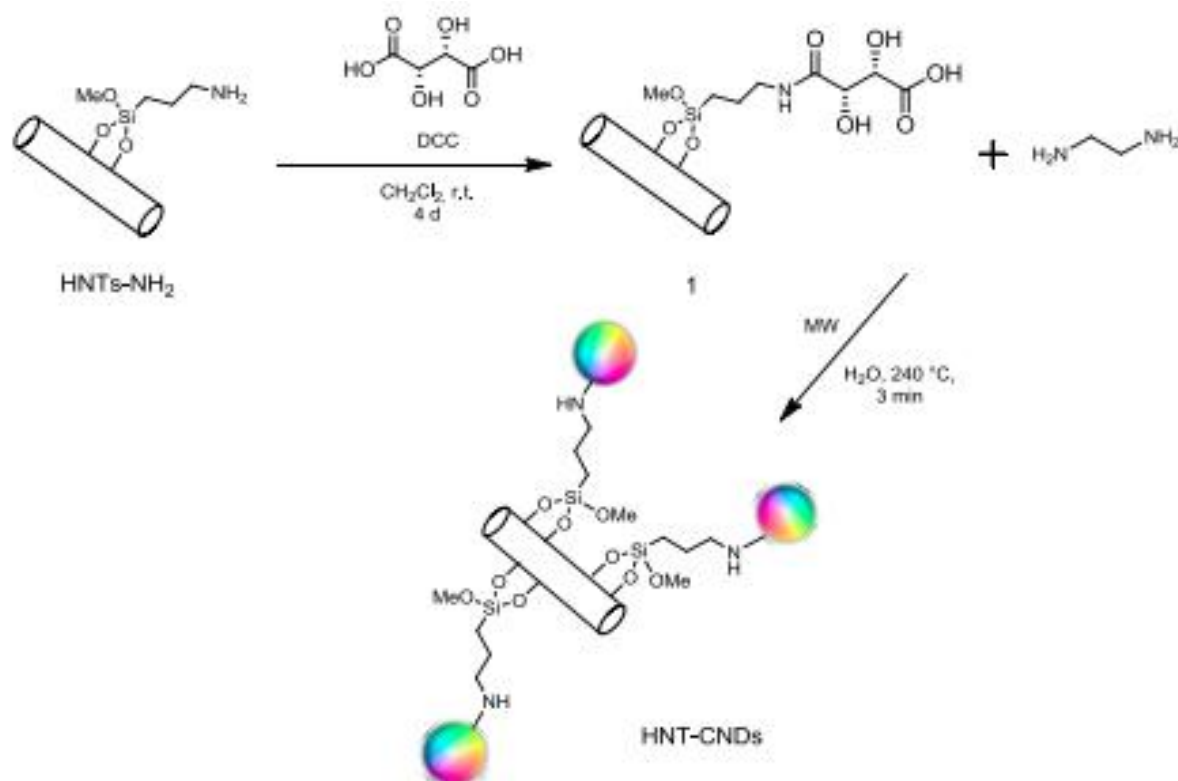


Figura 13. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale HNTs-CNDs (Riela *et. al.*).¹⁰⁰

La presenza degli HNTs e il basso contenuto di molecole organiche legate covalentemente sulla loro superficie hanno permesso di ottenere CDs di dimensioni ridotte e altamente mono dispersi, caratterizzati da interessanti proprietà fotoluminescenti.¹⁰⁰ Inoltre, ulteriori studi, hanno dimostrato la capacità di questi nanomateriali di penetrare le membrane cellulari, localizzarsi a livello citoplasmatico, ma soprattutto a livello nucleare, aprendo la strada a potenziali applicazioni biomediche.¹⁰¹

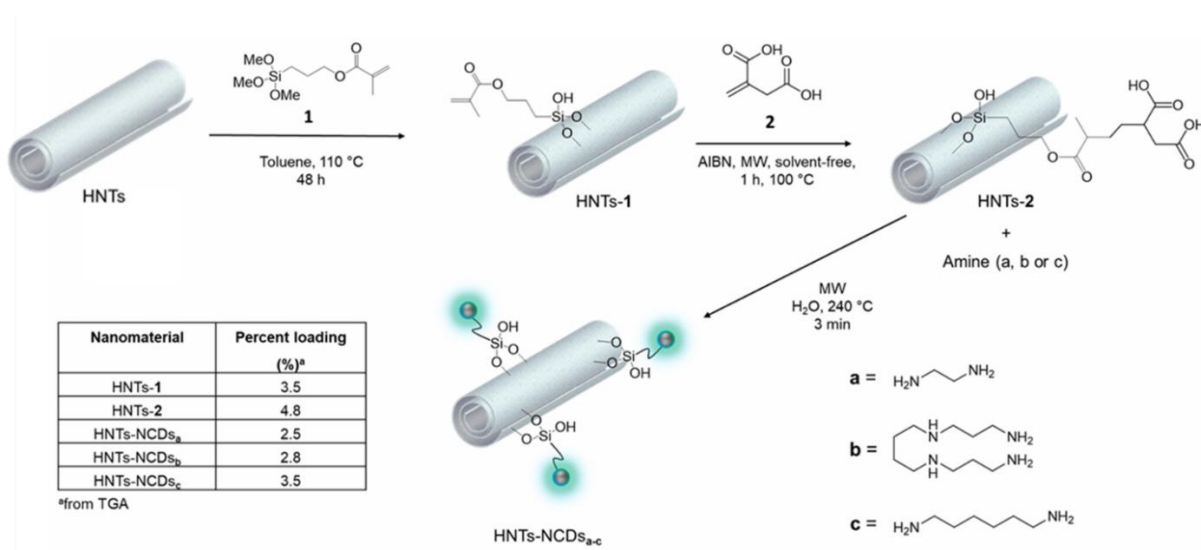
3.3.2.1. *Sintesi e caratterizzazione di nanomateriali a base di HNTs e CDs*

Sulla base dei risultati ottenuti, riguardo l'uso degli HNTs, e il ruolo che i CDs ricoprono nel *sensing* dello ione Fe(III), sono stati sintetizzati e caratterizzati altri nanomateriali fluorescenti a base di *N-doped carbon dots* (NCDs) e HNTs, ed esplorato il loro potenziale uso nel *biosensing*. Nello specifico, sono state utilizzate due diverse vie sintetiche per l'ottenimento dei nanomateriali HNTs-NCDs: (i) la sintesi diretta dei CDs sulla superficie esterna dei nanotubi, sfruttando le modifiche covalenti che è possibile effettuare su questa; (ii) la post-modifica di CDs, precedentemente sintetizzati e purificati, con nanotubi modificati. In ciascuna delle strategie sintetiche adottate, la presenza degli HNTs, potrebbe favorire l'internalizzazione cellulare del nanomateriale finale, ed inoltre, la presenza del loro lume vuoto potrebbe essere impiegato per il rilascio simultaneo di diverse molecole biologicamente attive. Al fine di individuare le condizioni sperimentali migliori per l'ottenimento di nanomateriali a base di halloysite ed NCDs, sono quindi state esplorate due diverse vie. Nello specifico la prima ha portato all'ottenimento di una serie di nanomateriali HNTs-NCDs, tramite una reazione di pirolisi assistita da microonde, a partire dal nanomateriale HNTs-acido itaconico ed in presenza di agenti passivanti; l'acido itaconico è stato scelto come sorgente carboniosa naturale e rinnovabile, poiché deriva dalla fermentazione di carboidrati, come il glucosio, mediante l'*Aspergillus terreus*.¹⁰² La seconda ha portato all'ottenimento dei nanomateriali HNTs-NCDs, mediante post-modifica di NCDs, attraverso delle reazioni con due diversi nanomateriali a base di halloysite, sfruttando i loro corrispettivi gruppi funzionali (HNTs-NH₂ e HNTs-COOH).

- *Sintesi diretta degli NCDs sulla superficie esterna degli HNTs*

Questi nanomateriali sono stati ottenuti tramite una procedura sintetica a tre *step* (**Schema 3**). Inizialmente è stata effettuata la modifica della superficie esterna degli HNTs con il 3-metacrilossi-propiltrimetossi silano per l'ottenimento del nanomateriale HNTs-1.¹⁰³ Il nanomateriale ottenuto ha mostrato una percentuale di caricamento, determinata tramite TGA, di 0.30 mmol g⁻¹, corrispondente al 3.5 %p/p di caricamento, e in accordo con i pochi gruppi Si-OH presenti sulla superficie esterna degli HNTs. HNTs-1 è stato poi utilizzato per legare l'acido itaconico (2) tramite una reazione di tipo ene-ene, catalizzata da AIBN, in assenza di solvente e sotto irradiazione alle microonde. Il nanomateriale HNTs-2 ottenuto ha mostrato una percentuale di funzionalizzazione di 0.18 mmol g⁻¹, che, se confrontata con la percentuale del

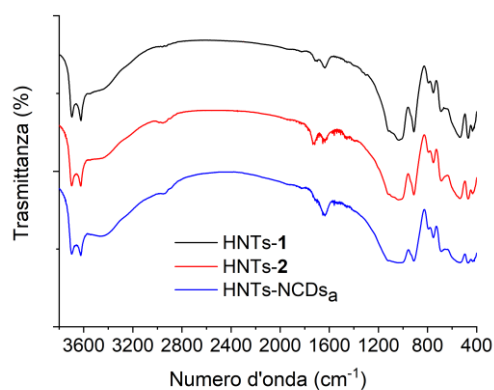
precursore, evidenza, dal rapporto 2:1 tra i gruppi -ene e carbossilici, come la funzionalizzazione del nanomateriale HNTs-1 non sia stata completa. Infine, il nanomateriale HNTs-2 in un ultimo *step* sintetico è stato soggetto ad una reazione di pirolisi mediata da MW, a 240 °C per 3 min, utilizzando acqua come solvente per la reazione e in presenza di ammine come agenti passivanti. I tre diversi nanomateriali HNTs-NCDs_{a-c}, ottenuti con tre diverse ammine (etilendiammina, spermina ed esametildiammina) al fine di modulare le proprietà fluorescenti in base ai gruppi amminici e carbossilici presenti, sono stati recuperati centrifugando e lavati diverse volte con etanolo.



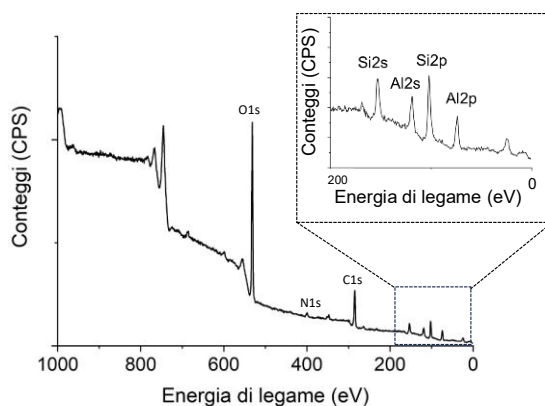
Schema 3. Rappresentazione schematica della sintesi degli NCDs legati direttamente agli HNTs-NCDs_{a-c}. L'inserto mostra la frazione organica caricata sulla superficie degli HNTs dopo ciascuno *step* sintetico, stimata tramite TGA.

I nanomateriali ottenuti, anche in questo caso sono stati caratterizzati con le tipiche tecniche viste ed utilizzate fino ad ora per i nanomateriali a base di argille, e di seguito sono riportati i risultati ottenuti per il nanomateriale HNTs-NCDs_a, utilizzato come esempio. Come visto per gli altri nanomateriali, tramite TGA, è stata determinata la percentuale di porzione organica introdotta ad ogni *step* sintetico. Analizzando il residuo fisso a 800 °C (**Appendice A, Figura A1a**) è stato possibile calcolare la percentuale di caricamento dell'acido carbossilico del nanomateriale HNTs-2, che corrisponde al 4.8 %p/p. In seguito al processo di pirolisi, la quantità di porzione organica legata sulla superficie esterna è ridotta per ciascun nanomateriale HNTs-NCDs, in accordo con la formazione degli NCDs; il caricamento di ciascuno di essi è riportato nello **Schema 3**. La riuscita della sintesi è stata ulteriormente confermata mediante spettroscopia FT-IR e XPS.

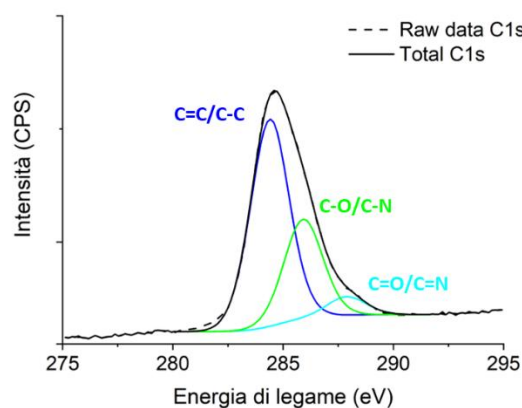
In **Figura 14** sono riportati gli spettri FT-IR dei campioni HNTs-1, HNTs-2 e HNTs-NCDs_a. Come si può osservare, a seguito della reazione di condensazione tra i gruppi –ene presenti sugli HNTs e l’acido itaconico, lo spettro FT-IR di HNTs-2 mostra le tipiche vibrazioni caratteristiche di entrambi i precursori.¹⁰⁴ In particolare, oltre alle bande di *stretching* e *bending* proprie dell’halloysite, negli spettri FT-IR di HNTs-1 e HNTs-2 compare una banda intorno a 1700 cm⁻¹, attribuibile alla vibrazione di *stretching* degli esteri e dei gruppi carbossilici delle rispettive molecole organiche. Dopo il processo di pirolisi, lo spettro di HNTs-NCDs_a evidenzia alcune modifiche, suggerendo un’alterazione della struttura del nanomateriale. In particolare, si osserva la scomparsa della banda a circa 1790 cm⁻¹, relativa allo *stretching* dei gruppi –COOH, e la comparsa di nuove bande nell’intervallo 1600-1400 cm⁻¹, riconducibili ai gruppi funzionali C–N e C=N/C=C tipici degli NCDs. Considerazioni analoghe possono essere estese anche ai campioni HNTs-NCDs_b e HNTs-NCDs_c (**Appendice A, Figura A1b**). La presenza dei diversi gruppi funzionali sulla superficie dei nanomateriali HNTs-NCDs_{a-c} è stata ulteriormente confermata mediante analisi XPS. In **Figura 14b** è riportata la *survey* XPS del nanomateriale HNTs-NCDs_a. In questa è possibile osservare i segnali di C, N e O, con i loro tipici picchi rispettivamente a 285.04 eV (C 1s), 399.29 eV (N 1s) e 531.38 eV (O 1s).



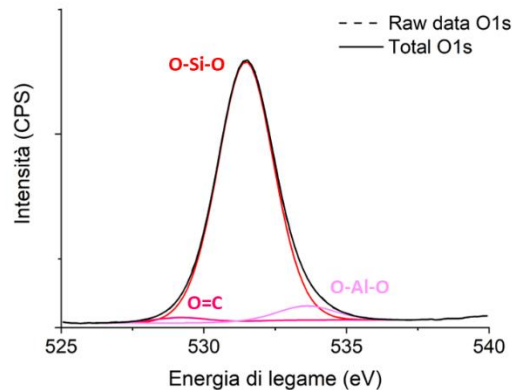
(a)



(b)



(c)



(d)

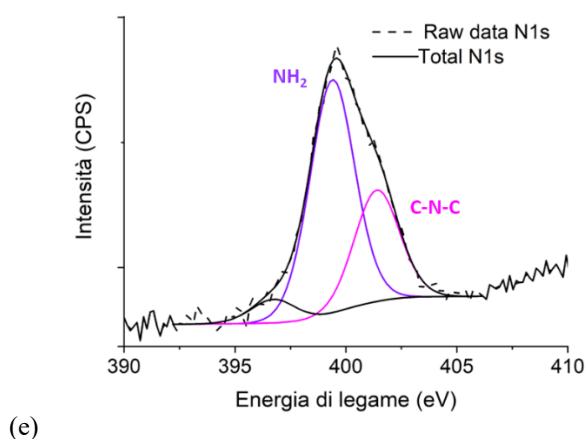


Figura 14. (a) Spettri FT-IR di HNTs-1, HNTs-2 e HNTs-NCDs_a; (b) *survey* XPS del nanomateriale HNTs-NCDs_a; (c) spettro C 1s deconvoluto; (d) spettro O 1s deconvoluto; (e) spettro N 1s deconvoluto.

Inoltre, nello spettro di HNTs-NCDs_a, data la presenza degli HNTs, si possono osservare anche i picchi caratteristici dell'Al 2s, Al 2p, Si 2s e Si 2p. Risultati analoghi sono stati ottenuti per i campioni HNTs-NCDs_{b-c} (**Appendice A, Figura A2-A3**). Facendo la deconvoluzione dei diversi picchi, è possibile ottenere i gruppi funzionali di ciascun elemento: C 1s (**Figura 14c**) è stato deconvoluto in due componenti, attribuibili al C sp² (C=C) a 284.4 eV e a C-O a 285.8 eV; quello dell'O 1s (**Figura 14d**) è stato deconvoluto in tre contributi centrati a 528.8, 531.4 e 533.6 eV, riconducibili rispettivamente a C=O, O-Si-O e O-Al-O; quello dell'N 1s (**Figura 14e**) mostra invece due picchi a 399.1 e 400.9 eV, attribuibili rispettivamente a gruppi NH₂ e C-N-C. Nel complesso, i risultati XPS confermano che tutti i nanomateriali sintetizzati presentano diversi gruppi funzionali superficiali, a seconda delle ammine impiegate, sebbene in percentuali diverse (**Appendice A, Tabella A1**).

Un'ulteriore caratterizzazione ha riguardato la mobilità in ambiente acquoso di tutti i nanomateriali sintetizzati, mediante misure di *Dynamic Light Scattering* (DLS), e i risultati ottenuti sono riportati in **Tabella 1**. L'introduzione di acidi carbossilici in HNTs-2 rallenta la diffusione acquosa degli HNTs, come evidenziato dall'aumento dei diametri idrodinamici apparenti rispetto a quelli dell'halloysite non modificata. Questo comportamento può essere attribuito a interazioni idrofobiche tra le porzioni organiche covalentemente legate sulla superficie esterna del minerale. Osservazioni analoghe sono state riportate anche per HNTs su cui sono state effettuate delle modifiche sia covalenti che supramolecolari della superficie esterna.¹⁰⁵

La presenza di gruppi carbossilici sulla superficie esterna incrementa leggermente la carica negativa dell'halloysite, come dimostrato dai valori di potenziale- ζ riportati in **Tabella 1**.

Tabella 1. Diametri medi e valori di potenziale- ζ dei nanomateriali HNTs, HNTs-2 e HNTs-NCDs_{a-c}.

Nanomateriali	Diametro idrodinamico apparente (nm)	Potenziale- ζ (mV)
HNTs	295 $\pm$ 16	-18.0 $\pm$ 1.0
HNTs-2	686 $\pm$ 57	-25.2 $\pm$ 1.0
HNTs-NCDs _a	523 $\pm$ 35	-25.7 $\pm$ 1.9
HNTs-NCDs _b	433 $\pm$ 64	-18.2 $\pm$ 1.7
HNTs-NCDs _c	450 $\pm$ 55	-23.3 $\pm$ 1.0

Per quanto riguarda i campioni HNTs-NCDs, i valori di potenziale- ζ sono risultati compresi tra -25.7 $\pm$ 1.9 mV (HNTs-NCDs_a) e -18.2 $\pm$ 1.7 mV (HNTs-NCDs_b). Inoltre, è stato osservato che i nanomateriali HNTs-NCDs presentano diametri idrodinamici inferiori rispetto al precursore, evidenziando come il trattamento di pirolisi assistita da microonde incrementi la mobilità acquosa dei nanotubi modificati. In particolare, è stato rilevato il diametro idrodinamico più basso per il campione HNTs-NCDs_b (433 $\pm$ 64 nm), mentre la dinamica acquosa più lenta è stata osservata per HNTs-NCDs_a, caratterizzato da un diametro idrodinamico pari a 523 $\pm$ 35 nm.

Le analisi morfologiche del nanomateriale HNTs-NCDs_a, scelto come modello, sono state effettuata mediante HAADF-STEM. Le immagini hanno evidenziato che, dopo il processo di pirolisi che avviene a 240 °C, il nanomateriale conserva la tipica struttura tubulare dell'halloysite (**Figura 15a**). È inoltre possibile osservare che i tubi tendono ad agglomerarsi, presumibilmente a causa di interazioni attrattive tra le diverse unità di N-doped CDs presenti sulla superficie esterna, in accordo con quanto riportato in letteratura.¹⁰⁵ Le analisi EDX hanno mostrato la presenza di atomi di C e N, riconducibili alle porzioni organiche, oltre agli elementi tipici dell'argilla, ovvero Si, Al e O (**Figura 15c**). Dalla mappatura elementare ottenuta tramite EDX è stato possibile concludere che gli NCDs risultano uniformemente distribuiti sugli HNTs, come evidenziato dai segnali relativi agli atomi di C e N (**Figura 15b**).

Al fine di confermare la formazione di N-doped CDs di piccole dimensioni e altamente monodispersi, i CDs legati alla superficie esterna degli HNTs sono stati idrolizzati in condizioni debolmente acide e successivamente raccolti per centrifugazione. Il surnatante, analizzato mediante TEM, ha evidenziato la presenza di *carbon dots* sferici e con una distribuzione dimensionale piuttosto omogenea (**Figura 15d-e**). L'analisi statistica, infatti, ha permesso di stimare una dimensione media degli NCDs pari a 3.7 $\pm$ 0.9 nm.

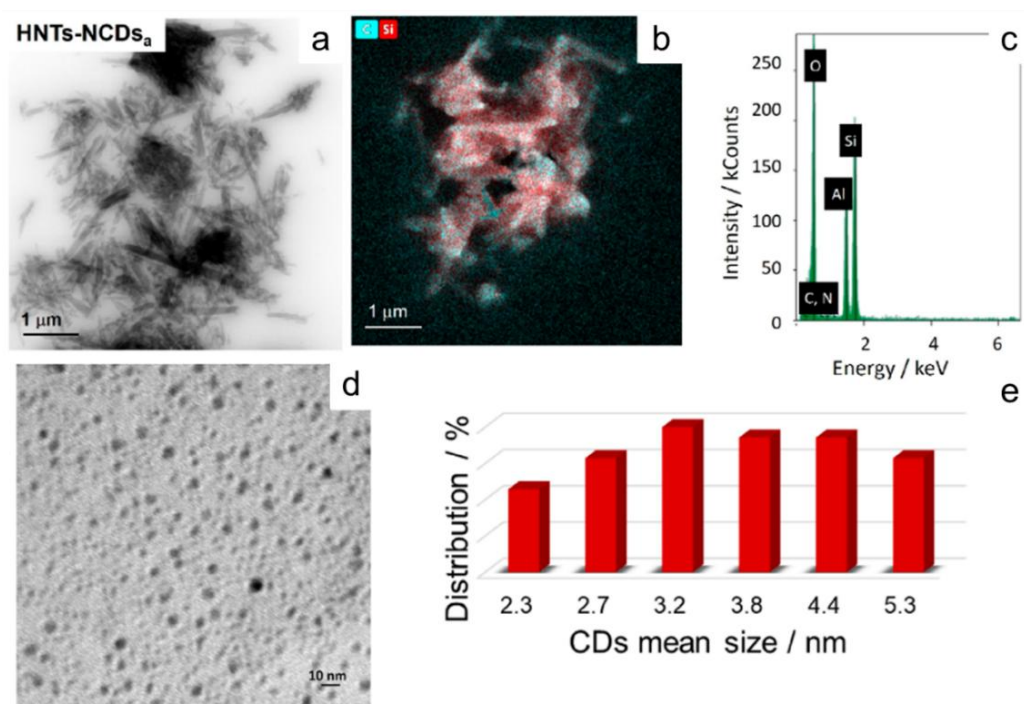
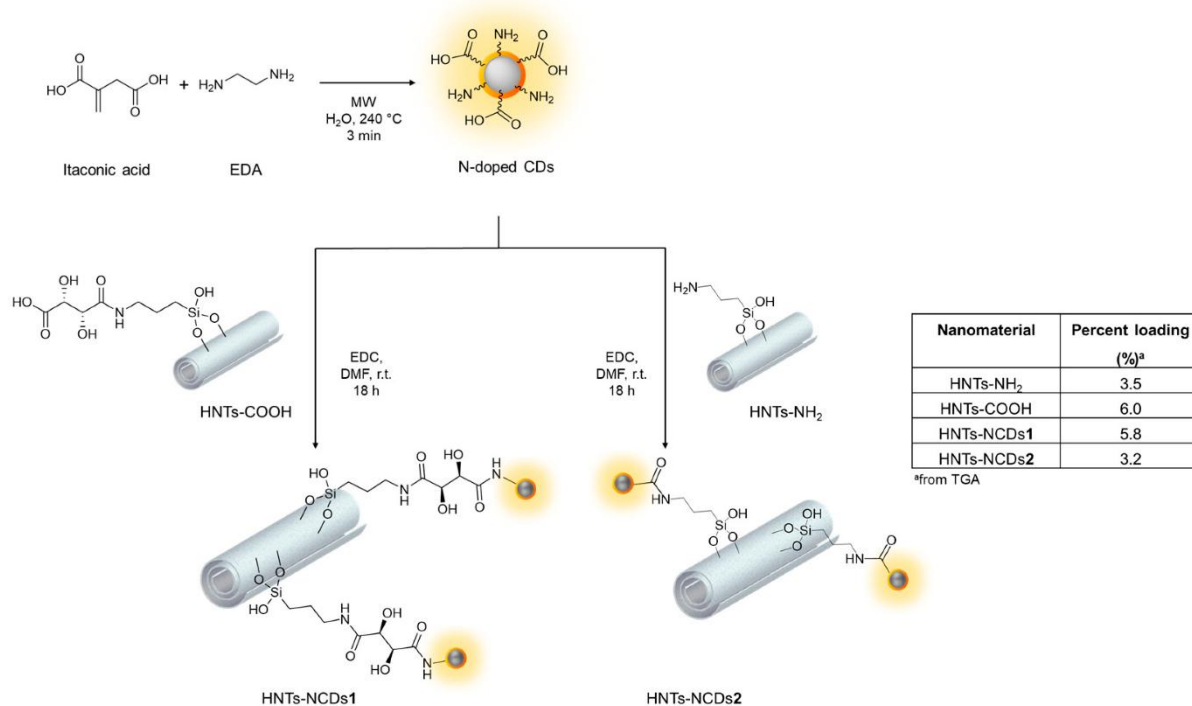


Figura 15. (a) Immagine TEM del nanomateriale HNTs-NCDs_a; (b) mappatura elementare estrapolata dall'analisi EDX; (c) analisi EDX; (d) immagini TEM degli NCDs ottenuti dopo l'idrolisi degli HNTs-NCDs_a; (e) analisi statistica (n = 70).

- *Post-modifica degli NCDs mediante HNTs modificati*

Come accennato precedentemente, gli HNTs-NCDs sono stati preparati tramite una seconda strategia sintetica che ha visto la post modifica di NCDs, precedentemente ottenuti, con HNTs modificati sulla loro superficie esterna (**Schema 4**). Nello specifico, gli NCDs sono stati preparati facendo reagire l'acido itaconico (2) con l'etilendiammina in MW; la scelta di questi precursori è stata dettata dal fatto che in letteratura il loro utilizzo porta all'ottenimento di *N-doped* CDs con proprietà fotoluminescenti uniche.¹⁰² In seguito ad una cromatografia ad esclusione dimensionale,⁷⁷ utilizzata per purificare gli NCDs ottenuti sono state ottenute delle nanoparticelle con dimensioni di ca. 1.2 ± 0.2 nm. Successivamente, gli NCDs sono stati sottoposti ad una post-modifica facendo reagire questi con degli HNTs precedentemente modificati e recanti gruppi terminali amminici o carbossilici sulla loro superficie esterna. Le reazioni di condensazione, condotte in presenza di EDC, hanno portato all'ottenimento dei nanomateriali HNTs-NCDs1 e HNTs-NCDs2, a seconda del precursore a base di halloysite impiegato.



Schema 4. Rappresentazione schematica della sintesi dei nanomateriali HNTs-NCDs1 e HNTs-NCDs2. L’inserto mostra la porzione organica caricata sulla superficie degli HNTs dopo ciascuno *step* sintetico, stimata mediante analisi TGA.

Allo stesso modo dei precedenti, i nanomateriali HNTs-NCDs1 e HNTs-NCDs2 sono stati caratterizzati mediante spettroscopia FT-IR, TGA, XPS, misure DLS e di potenziale- ζ , mentre la morfologia è stata analizzata attraverso immagini HAADF/STEM. Gli Similmente a quanto osservato per il nanomateriale HNTs-NCDs_a, gli spettri FT-IR dei nanomateriali HNTs-NCDs1 e HNTs-NCDs2 mostrano le tipiche bande di vibrazione degli HNTs, insieme a quelle riconducibili alle porzioni organiche introdotte ad ogni *step* sintetico. In particolare, negli spettri sono ben visibili due bande comprese tra 1660 e 1400 cm⁻¹, attribuibili ai gruppi funzionali C-N e C=N/C=C degli N-*doped* CDs (**Appendice A, Figura A4**). Nell’analisi termogravimetrica (**Appendice A, Figura A4**), si osserva in questo caso che la perdita di massa nella regione 200-400 °C è maggiore per HNTs-NCDs1 (5.8 %p/p) rispetto ad HNTs-NCDs2 (3.2 %p/p); il maggiore caricamento degli NCDs osservato è coerente con il differente grado di funzionalizzazione dei precursori utilizzati, HNTs-COOH e HNTs-NH₂. Andando ad analizzare e confrontare i risultati dell’analisi XPS di HNTs-NCDs1, HNTs-NCDs2 e HNTs-NCDs_a, si osservano numero differenze sia nel tipo di gruppi funzionali presenti (**Appendice A, Figura A5**), sia nella loro composizione elementare (**Appendice A, Tabella A2**), suggerendo che le due strategie sintetiche influenzano notevolmente le caratteristiche chimiche finali dei *carbon dots* ottenuti.

Le misure dei DLS hanno evidenziato che la post-modifica degli NCDs ha portato all'ottenimento di due nanomateriali con una migliore mobilità acquosa rispetto ai precursori (380 ± 37 nm e 422 ± 46 nm rispettivamente per HNTs-NCDs1 e HNTs-NCDs2), come evidenziato dalla riduzione del diametro idrodinamico apparente, che risulta notevolmente ridotto rispetto ai valori riportati in **Tabella 2**. Al contrario, per gli NCDs è stato osservato un raggio idrodinamico molto più elevato, che risulta essere di 749 ± 39 nm, probabilmente dovuto alla formazione di grandi aggregati, come già osservato recentemente da Yu, Chen *et al.*, che hanno osservato raggi idrodinamici di ca. 1000 nm per S o N-doped CDs.

Per quanto riguarda invece la carica superficiale dei nanomateriali, le misure di potenziale- ζ (**Tabella 2**), hanno mostrato valori per HNTs-NCDs1 e HNTs-NCDs2 rispettivamente di -16.1 ± 1.7 mV e -14.7 ± 0.4 mV, molto simili a quello degli HNTs non modificati (-18 mV) e notevolmente più bassi rispetto al valore osservato per gli NCDs non modificati (-22 ± 3 mV). Inoltre, questi valori risultano significativamente diversi rispetto a quello del nanomateriale HNTs-NCDs_a (ca. -26 mV); questo fenomeno potrebbe indicare ed essere dovuto alla perdita di alcuni gruppi protonabili e/o deprotonabili sulla superficie degli NCDs durante le reazioni di condensazione della post-modifica, ancora una volta sottolineando come la diversa strategia sintetica si rifletta molto sulle caratteristiche chimiche dei nanomateriali ottenuti.

Tabella 2. Diametri medi e valori di potenziale- ζ dei nanomateriali HNTs, NCDs, HNTs-NCDs1 e HNTs-NCDs2.

Nanomateriali	Diametro idrodinamico apparente (nm)	Potenziale- ζ (mV)
HNTs	295 ± 16	-18.0 ± 1.0
NCDs	749 ± 39	-22 ± 3 mV
HNTs-NCDs1	380 ± 37	-16.1 ± 1.7
HNTs-NCDs2	422 ± 46	-14.7 ± 0.4

Infine, le analisi TEM degli NCDs (**Appendice A, Figura A6**) hanno evidenziato la tipica morfologia sferica di queste nanoparticelle, con dimensioni di ca. 1.2 ± 0.2 nm, in accordo con quanto riportato in letteratura.^{77,102} Tuttavia, dopo aver legato questi ai precursori a base di halloysite (HNTs-COOH e HNTs-NH₂), la morfologia di questi nanomateriali risulta totalmente differente rispetto a quella osservata per i nanomateriali HNTs-NCDs_{a-c} (**Figura 16 e Appendice A, Figura A7**). Questa strategia sintetica porta alla formazione di grandi aggregati, la cui formazione può essere attribuita ancora una volta alla procedura adottata: durante la reazione di condensazione, infatti, differenti NCDs possono fungere da ponte tra diversi nanotubi, attraverso la formazione di legami ammidici.

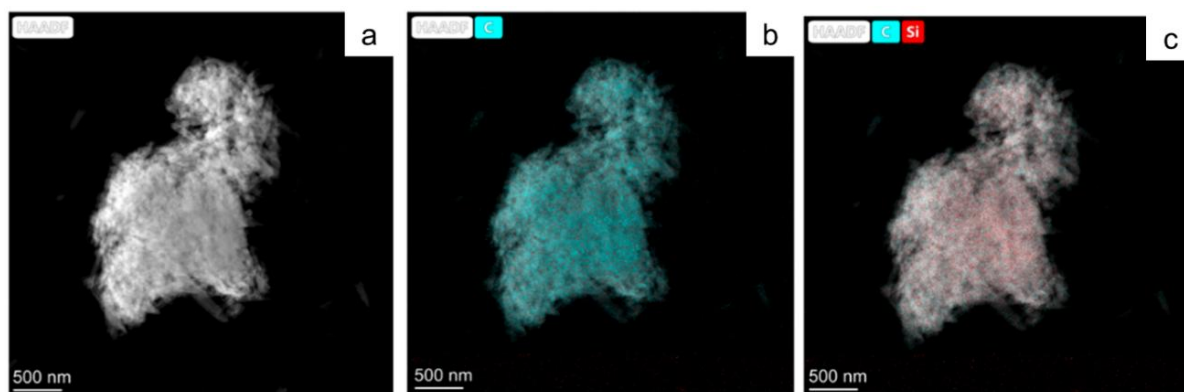


Figura 16. (a) Immagine HAADF/STEM di HNTs-NCDs1; (b-c) mappatura elementare estrapolata da analisi EDX.

- *Proprietà fotoluminescenti dei nanomateriali HNTs-NCDs*

Le proprietà fotoluminescenti (PL) di tutti i nanomateriali sopra descritti sono state studiate mediante spettroscopia UV-*vis* e fluorescenza, sia in dispersione che allo stato solido. Le dispersioni acquose di tutti i nanomateriali (HNTs-NCDs_{a-c}, HNTs-NCDs1 e HNTs-NCDs2) mostrano una brillante fluorescenza blu quando irradiati con una lampada UV a 325 nm. In particolare, gli spettri UV-*vis* dei nanomateriali HNTs-NCDs e degli NCDs (**Figura 17a** e **Appendice A, Figura A8**) mostrano un grande assorbimento nella regione UV (230-350 nm) con una coda che si estende nel visibile e una banda di assorbimento centrata intorno a 230 nm. Dal confronto tra gli NCDs e i nanomateriali HNTs-NCDs, emergono delle piccole differenze nella lunghezza d'onda relativa all'assorbimento nella regione del visibile.¹⁰⁶ Per chiarire la causa di queste differenze, tramite l'analisi dei *Tauc Plot* (**Figura 17b-d**, sono stati calcolati i valori del band gap energetico (E_g). Dai risultati si osserva che gli NCDs presentano un valore di E_g pari a 5.8 eV, mentre i nanomateriali HNTs-NCDs1 e HNTs-NCDs2 (**Appendice A, Figura A8**) mostrano valori di E_g di ca. 5.4 eV. Al contrario, il nanomateriale HNTs-NCDs_a presenta un valore di 3.9 eV, un valore di E_g più basso rispetto ai precedenti nanomateriali, che come descritto in letteratura,¹⁰⁶ può essere associato alla formazione di stati energetici compensatori generati dai gruppi funzionali presenti sugli HNTs, i quali sono invece assenti sia negli NCDs sia nei nanomateriali HNTs-NCDs1 e HNTs-NCDs2.

Questi diversi valori di E_g calcolati possono essere responsabili anche delle differenze osservate negli spettri di emissione dei nanomateriali sintetizzati. Questi posseggono un'ampia banda di emissione quando eccitati a 325 nm, ma centrata a diverse lunghezze d'onda.

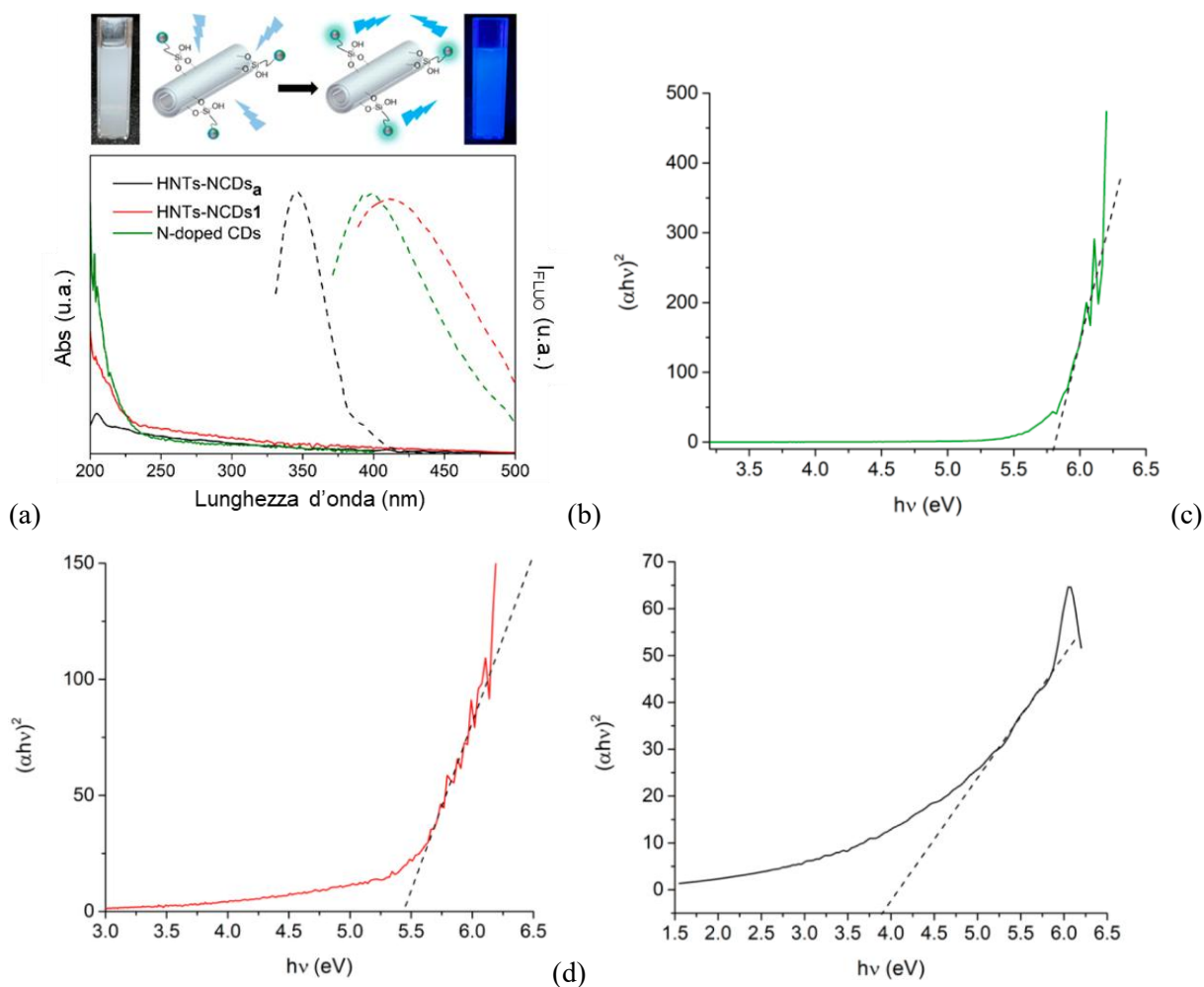


Figura 17. (a) Spettri di assorbimento e di emissione degli NCDs, HNTs-NCDs1 e HNTs-NCDs_a (rispettivamente 0.5 e 0.02 mg mL⁻¹) in acqua ([CDs] = 0.04 mg mL⁻¹) (nel riquadro sono riportate le proprietà PL di HNTs-NCDs_a irradiati a 325 nm); (b–d) *Tauc Plot* di (b) NCDs, (c) HNTs-NCDs1 e (d) HNTs-NCDs_a.

In particolare, il nanomateriale HNTs-NCDs_a presenta un massimo di emissione intorno a 420 nm che risulta spostato a lunghezze d'onda maggiori (20-40 nm) rispetto agli spettri di emissione degli NCDs e del nanomateriale HNTs-NCDs1 (rispettivamente 400 e 380 nm). Inoltre, tutti i nanomateriali HNTs-NCDs ottenuti hanno mostrato il tipico comportamento dei CDs, ovvero una dipendenza della lunghezza d'onda di emissione da quella di eccitazione; questo comportamento è stato osservato sia in dispersione che allo stato solido (**Figura 18** e **Appendice A, Figura A9-A14**).

La resa quantica di fluorescenza (FLQY) rappresenta un parametro fondamentale per valutare l'efficienza emissiva dei materiali fotoluminescenti, in quanto esprime il rapporto tra il numero di fotoni emessi e quelli assorbiti; essa fornisce quindi informazioni cruciali sull'efficacia dei processi radiativi e sull'influenza delle modifiche chimiche sulla risposta ottica dei nanomateriali.¹⁰⁷ A tal fine, usando come standard la chinica solfato, sono state riportate le FLQY di ciascun nanomateriale, i cui valori sono riportati in **Tabella 3**.

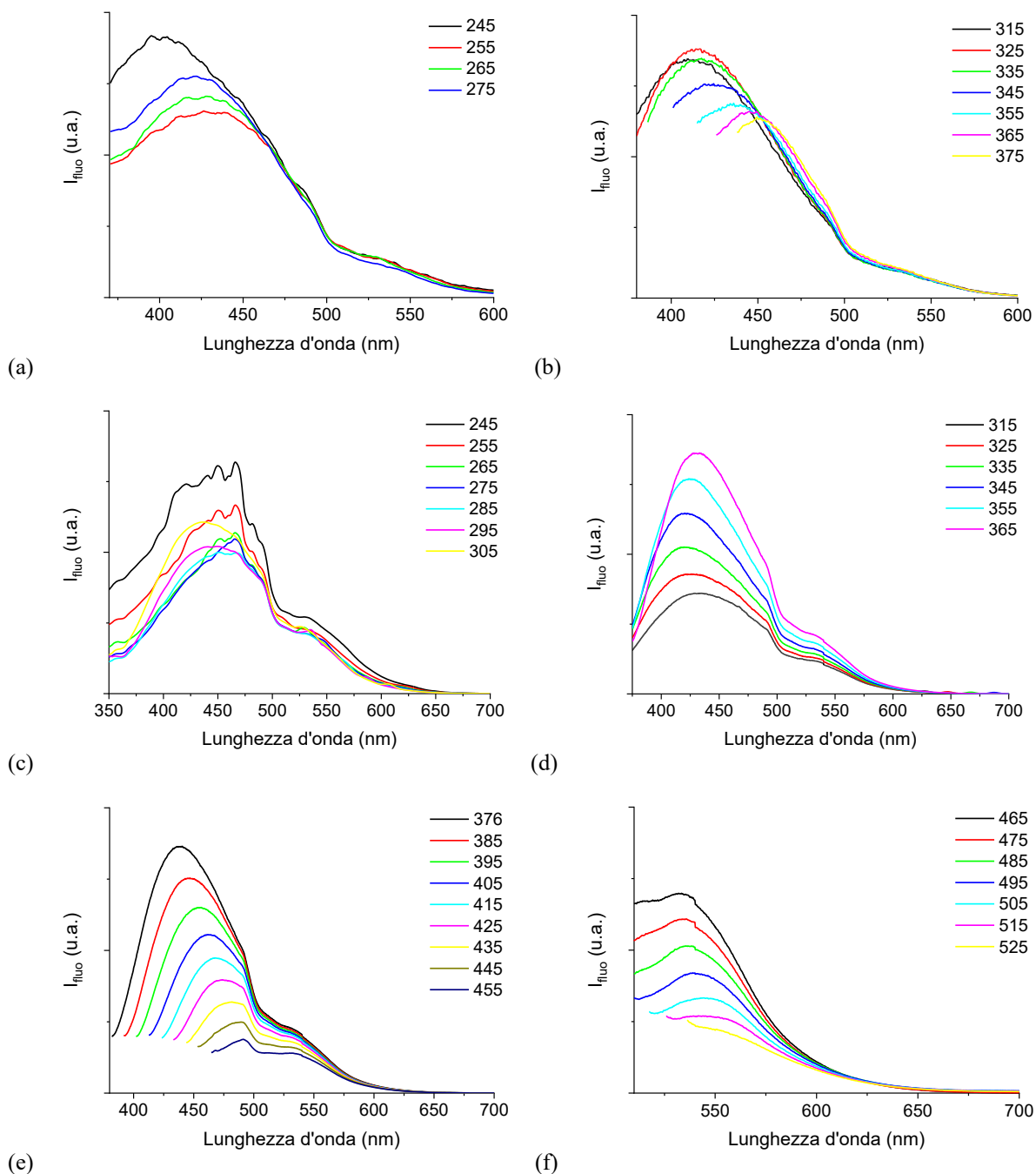


Figura 18. Spettri di fluorescenza in (a,b) soluzione e (c-f) stato solido di HNTs-NCDs_a a diverse lunghezze d'onda di eccitazione.

Come si può osservare il nanomateriale HNTs-NCDs_a mostra un valore di FLQY simile a quello ottenuto per gli NCDs non legati, sottolineando ancora una volta come la procedura sintetica, in particolare la sintesi diretta sulla superficie esterna degli HNTs, abbia portato a NCDs con le stesse proprietà fluorescenti. Al contrario, i nanomateriali HNTs-NCDs₁ e HNTs-NCDs₂ presentano bassi valori di rese quantiche di fluorescenza. Poiché la resa quantica dipende fortemente dal contenuto di gruppi -NH₂ presenti nei nanomateriali,¹⁰⁸ è probabile che questi

gruppi vengano impiegati nella reazione di condensazione e non siano più presenti nel nanomateriale finale.

Tabella 3. Valori di FLQY dei nanomateriali HNTs-NCDs ed N-doped CDs.

	Nanomateriali	FLQY (%)
1	N-doped CDs	26.0
2	HNTs-NCDs _a	24.0
3	HNTs-NCDs _b	11.0
4	HNTs-NCDs _c	8.0
5	HNTs-NCDs1	3.0
6	HNTs-NCDs2	3.0

Per confermare ulteriormente questa ipotesi, sono state eseguite titolazioni potenziometriche acido-base al fine di verificare la presenza di gruppi protonabili/deprotonabili (-COOH o -NH₂) sulla superficie dei *carbon dots*. In particolare, sono state titolate con una soluzione standard di NaOH (0.25 M), dispersioni acquose dei nanomateriali HNTs-NCDs_a, N-doped CDs e HNTs-NCDs1, in presenza di un eccesso di acido forte (HCl).

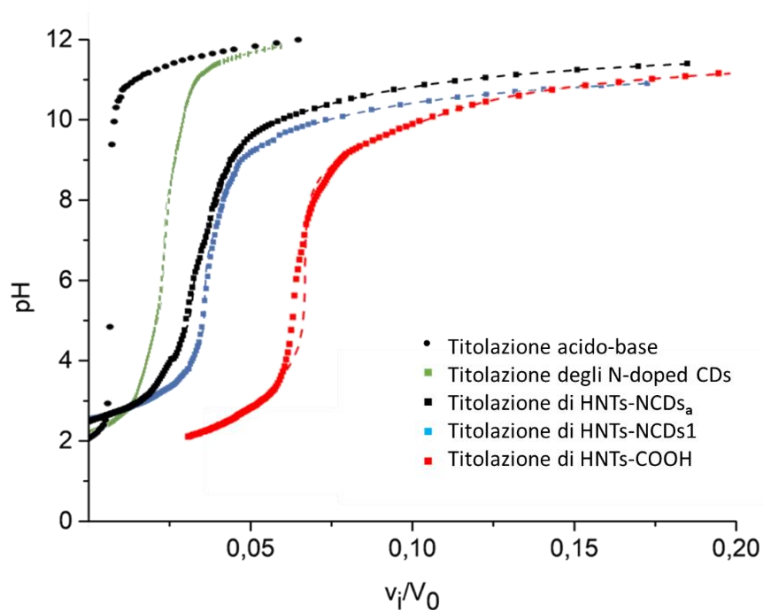


Figura 19. Titolazione potenziometrica degli N-doped CDs, HNTs-NCDs_a, HNTs-NCDs1 e HNTs-COOH. La prima curva in nero rappresenta, a scopo comparativo, la titolazione di una soluzione di HCl (0.1 M) con NaOH 0.25 M.

I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli della titolazione di HNTs-COOH condotta nelle stesse condizioni sperimentali. Come riportato in letteratura, questa misura e la successiva analisi matematica delle curve di titolazione ottenute sperimentalmente (**Figura 19**),^{109,110} consente di determinare il numero di gruppi funzionali deprotonabili.¹¹¹ I parametri ottenuti sono riportati nella **Tabella 4**.

Innanzitutto, è importante sottolineare che le dispersioni acquose di ciascun nanomateriale hanno mostrato valori di pH differenti. In particolare, la dispersione acquosa del nanomateriale HNTs-NCDs_a e quella degli *N-doped* CDs presentano rispettivamente, valori di pH pari a 8.2 e 8.6, mentre il nanomateriale HNTs-NCDs1 mostra un valore di pH di 4.8, vicino a quello del precursore HNTs-COOH (pH = 4.2). Queste differenze possono essere spiegate dalla presenza di differenti gruppi funzionali sulla superficie dei *carbon dots*, in accordo con le misure di potenziale- ζ e le rese quantiche di fluorescenza (FLQY). I parametri ottenuti dall'analisi potenziometrica hanno evidenziato che il nanomateriale HNTs-NCDs_a presenta tre differenti gruppi acidi, attribuibili alla presenza di gruppi carbossilici e ammonici sulla sua superficie, ciascuno caratterizzato da valori di pK distinti. In particolare, l'esistenza di due valori di pK_{BH^+} potrebbe essere associata alla protonazione di due diversi gruppi amminici presenti sulla superficie del nanomateriale, mentre il valore di pK_a è attribuibile ai gruppi -COOH. Gli *N-doped* CDs presentano due differenti gruppi funzionali, così come i nanomateriali HNTs-NCDs1 e HNTs-COOH.

Tabella 4. Parametri calcolati dalle curve di titolazione sperimentali di HNTs-NCDs_a, *N-doped* CDs, HNTs-NCDs1 e HNTs-COOH.

	Nanomateriali	pH ^a	pK _a ^b	n _a /g (mmol g ⁻¹)	pK _{BH⁺1} ^c	nb ₁ /g (mmol g ⁻¹)	pK _{BH⁺2} ^c	nb ₂ /g (mmol g ⁻¹)
1	HNTs-NCDs _a	8.2	4.2	2.6	7.3	2.4	10.3	1.1
2	<i>N-doped</i> CDs	8.6	4.2	4.8	8.2	4.3	/	/
3	HNTs-NCDs1	4.8	3.8	3.6	9.9	9.5	/	/
4	HNTs-COOH	4.2	3.5	3.4	9.0	9.6	/	/

^a pH della dispersione acquosa del nanomateriale prima della titolazione; ^b pK associato ai gruppi carbossilici; ^c pK associato ai gruppi amminici.

Dall'analisi dei parametri ottenuti emerge che HNTs-NCDs1 e HNTs-COOH presentano valori molto simili sia di pK sia di contenuto di gruppi carbossilici e amminici, da cui si può

concludere che i due nanomateriali possiedono gruppi funzionali simili. Poiché gli unici gruppi protonabili presenti sulla superficie di HNTs-COOH sono i gruppi -COOH e -NH₂ non coinvolti nella reazione di condensazione, è logico dedurre che gli stessi gruppi siano presenti anche su HNTs-NCDs¹. Di conseguenza, la post-modifica degli *N-doped* CDs con HNTs mediante condensazione mediata da EDC ha portato alla scomparsa dei gruppi carbossilici e amminici originariamente presenti sui CDs, confermando ulteriormente l'ipotesi proposta durante questa discussione. Alla luce dei risultati ottenuti, è possibile affermare che l'approccio sintetico *bottom-up* rappresenta la strategia più efficace e vantaggiosa per la realizzazione di nanomateriali fluorescenti multifunzionali a base di halloysite e *carbon dots*. Tale metodologia, infatti, non solo semplifica notevolmente il *work-up* sintetico, eliminando la necessità di lunghi e complessi passaggi di purificazione, ma garantisce anche l'ottenimento di NCDs estremamente uniformi, altamente monodispersi e dotati di eccellenti proprietà ottiche, perfettamente conservate rispetto ai *carbon dots* non legati, ottenuti nelle stesse condizioni sperimentale ma che necessitano però di lunghe e tediose purificazioni. Inoltre, la presenza dell'halloysite, come già accennato, potrebbe conferire ai nanomateriali ulteriori vantaggi funzionali, tra cui un aumento significativo dell'assorbimento cellulare e la possibilità di sfruttare il lume interno dei nanotubi come sistema di rilascio simultaneo e controllato di molecole biologicamente attive, aprendo così la strada a nuove e avanzate applicazioni nei campi della nanomedicina, del rilascio di farmaci e nel *biosensing* fluorescente. Al fine di valutare il potenziale utilizzo dei nanomateriali HNTs-NCDs come biosensori fluorescenti multifunzionali, sono stati condotti ulteriori studi. In particolare, sono stati analizzati gli effetti del pH e della natura del solvente sulle caratteristiche di fotoluminescenza, per comprendere come l'ambiente chimico circostante influenzi l'intensità e la stabilità dell'emissione, parametri fondamentali per l'impiego in condizioni biologiche complesse. Parallelamente, sono state esplorate le capacità di rilevamento selettivo di ioni metallici, con particolare attenzione agli ioni Fe³⁺, valutando il fenomeno di *quenching* della fluorescenza e determinando parametri chiave come il limite di rilevamento (LOD) e la linearità della risposta.

- Effetti di pH e solvente sulle proprietà di fotoluminescenza dei nanomateriali HNTs-NCDs

Per verificare l'esistenza di eventuali effetti del pH del mezzo sulle proprietà di fotoluminescenza dei nanomateriali HNTs-NCDs, sono stati acquisiti gli spettri di fluorescenza di HNTs-NCDs_a, scelto come modello, a diversi valori di pH. Come mostrato in **Figura 20**, è

possibile osservare un aumento dell'intensità della PL con la diminuzione del pH. Come riportato in letteratura, questo comportamento potrebbe essere dovuto ai diversi gradi di protonazione degli *N-doped* CDs a valori di pH differenti, infatti, poiché il grado di protonazione aumenta in condizioni acide, in un intervallo di pH compreso tra 1 e 4, si può ipotizzare che il nanomateriale HNTs-NCDs_a presenti una carica superficiale netta maggiore, che conferisce proprietà idrofiliche, stabilità e una migliore dispersione in acqua, traducendosi in un'elevata intensità di fluorescenza.

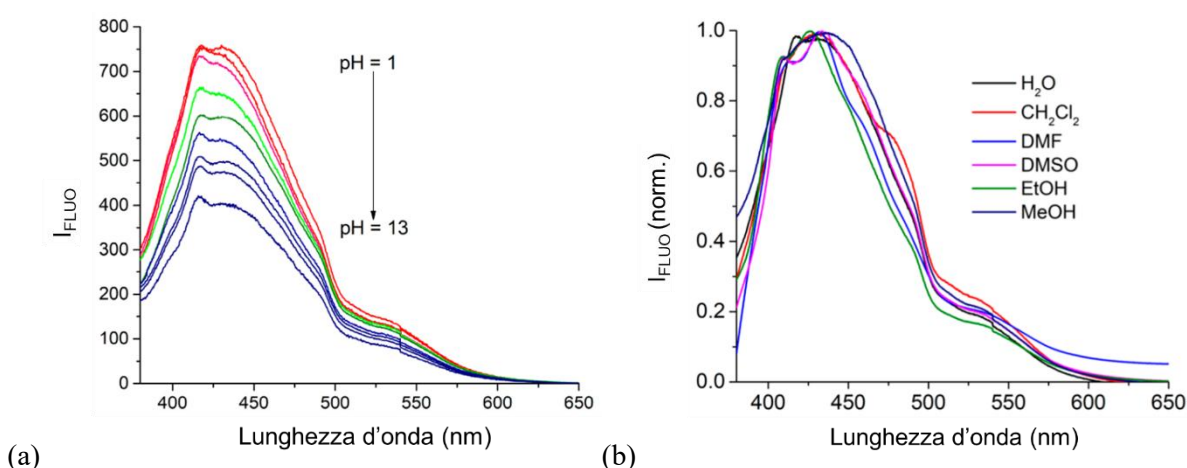


Figura 20. (a) Spettri PL del nanomateriale HNTs-NCDs_a (0.05 mg mL⁻¹) a diversi valori di pH; (b) spettri di fluorescenza normalizzati di HNTs-NCDs_a in differenti solventi ($\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm).

Al contrario, studiando l'effetto del solvente sulla PL dei nanomateriali, la lunghezza d'onda massima di emissione rimane pressoché invariata indipendentemente dal solvente utilizzato, indicando che quest'ultimo esercita un'influenza minima sulle proprietà fotoluminescenti dei nanomateriali.

- *Sensing fluorescente dello ione Fe³⁺*

Per valutare il possibile utilizzo dei nanomateriali ottenuti come sensori fluorescenti per gli ioni Fe³⁺, sono stati registrati gli spettri di fluorescenza di una dispersione acquosa di HNTs-NCDs_a (1 mg mL⁻¹, corrispondente a una concentrazione di CDs di 0.025 mg mL⁻¹) in funzione della concentrazione di ioni Fe³⁺. I risultati ottenuti sono riportati in **Figura 21**. Come si può osservare, l'intensità di fluorescenza di HNTs-NCDs_a diminuisce all'aumentare della concentrazione di ioni Fe³⁺; inoltre, è stata riscontrata una correlazione lineare tra l'efficienza

di *quenching* e la concentrazione di Fe^{3+} in un ampio intervallo di pH. Da questi risultati preliminari si può dedurre che i materiali sviluppati potrebbero essere promettenti sensori per fluidi biologici. Dalla regressione lineare dei dati sperimentali è stato possibile calcolare il valore di LOD del nanomateriale, che è risultato essere pari a ca. $24 \mu\text{M}$, in linea con i valori di LOD di nanomateriali simili utilizzati per il *sensing* dello ione Fe^{3+} .¹¹²

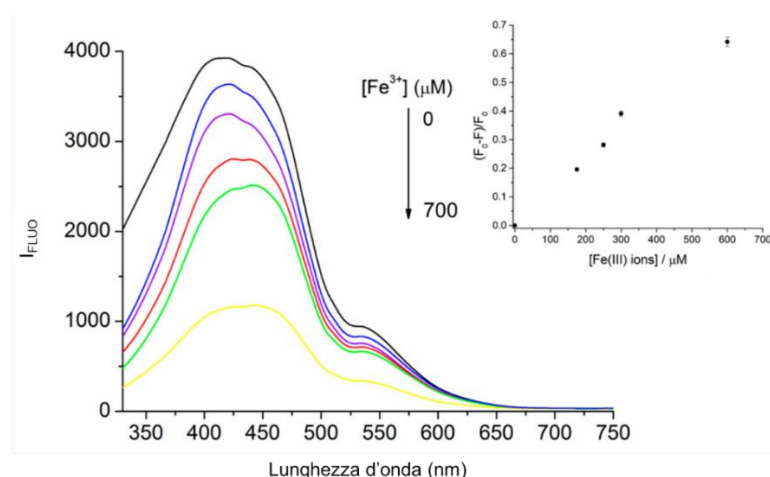


Figura 21. (a) Intensità di fluorescenza di HNTs-NCDs_a (1 mg mL^{-1}) ($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$) dopo l'aggiunta di diverse concentrazioni di ioni Fe^{3+} . L'inserto mostra il grafico lineare del *quenching* della fluorescenza di HNTs-NCDs_a, $(F_0 - F)/F_0$, in funzione della concentrazione di Fe(III) nel range 0–700 μM .

Per valutare la selettività del nanomateriale HNTs-NCDs come sonda fluorescente per il rilevamento di ioni Fe^{3+} , è stata analizzata la variazione dell'emissione di HNTs-NCDs ($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$) (0.5 mg mL^{-1} , corrispondente a una concentrazione di N-doped CDs di $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) in presenza di diversi ioni.

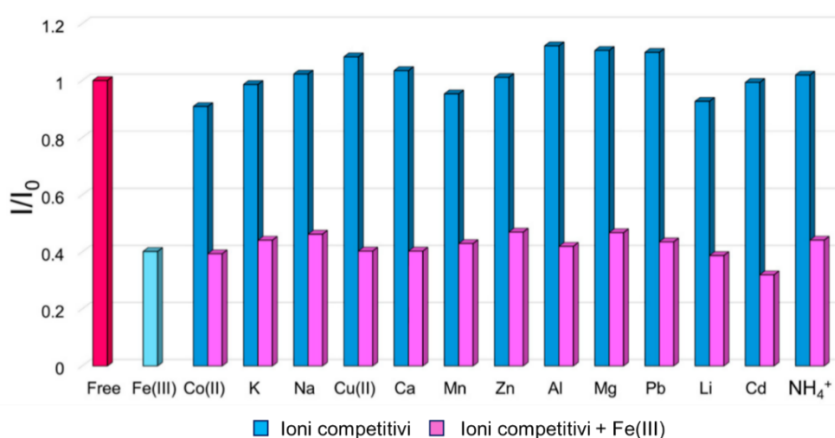


Figura 22. Sono riportati i valori medi di due prove indipendenti (b) Intensità di fluorescenza relativa (I/I_0) di HNTs-NCDs (0.05 mg mL^{-1}) ($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$) in presenza di diversi cationi ($400 \mu\text{M}$) (barre blu) e dopo trattamento delle dispersioni con ioni Fe^{3+} ($400 \mu\text{M}$) (barre rosa).

Dai risultati ottenuti (**Figura 22**) si può osservare un significativo *quenching* dell'emissione di HNTs-NCDs, osservato esclusivamente in presenza di ioni Fe^{3+} , confermando che il nanomateriale mostra un'elevata selettività verso questa specie metallica, mantenuta anche in presenza di altri ioni interferenti.

- *Internalizzazione cellulare e citotossicità degli HNTs-NCDs*

Infine, per validare il potenziale utilizzo dei nanomateriali HNTs-NCDs_{a-c} per il *biosensing* dello ione Fe(III) , è stata studiata la loro internalizzazione cellulare tramite microscopia confocale a scansione laser (CLSM) e misure di fluorescenza. La distribuzione intracellulare del nanomateriale HNTs-NCDs_a è stata analizzata trattando linee cellulari tumorali MCF-7 con il nanomateriale (1 mg mL^{-1}) per un tempo di incubazione di 24 ore. Come mostrato nelle **Figure 23 e 24**, HNTs-NCDs_a, utilizzato come modello, attraversa la membrana cellulare e, come evidenziato dalla fluorescenza verde del nanomateriale all'interno delle cellule, si localizza prevalentemente nella regione perinucleare. Inoltre, un'osservazione più dettagliata delle immagini di fluorescenza (**Figura 24**) rivela una debole emissione anche all'interno dei nuclei cellulari, come già osservato per sistemi simili in cui è stato anche dimostrato che i nanomateriali a base di halloysite e *carbon dots*, ottenuti tramite questa strategia sintetica, non risultano citotossici in un ampio intervallo di concentrazioni.¹⁰¹

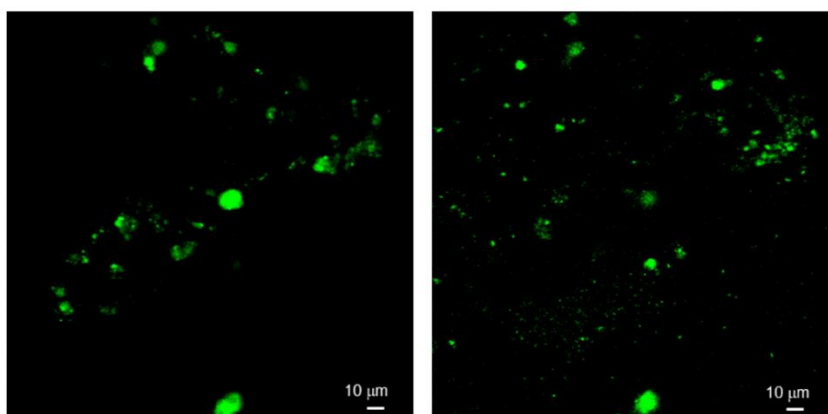


Figura 23. Immagini CLSM di linee cellulari MCF-7 incubate con il nanomateriale HNTs-NCDs_a.

Questo risultato suggerisce che i nanomateriali HNTs-NCDs sono in grado di raggiungere anche la regione nucleare e possono quindi rappresentare sistemi fluorescenti multifunzionali estremamente promettenti per il *biosensing* e, di conseguenza, per la diagnosi precoce, sensibile

e selettiva di numerose patologie correlate alla presenza anomala di ioni metallici come il Fe(III).

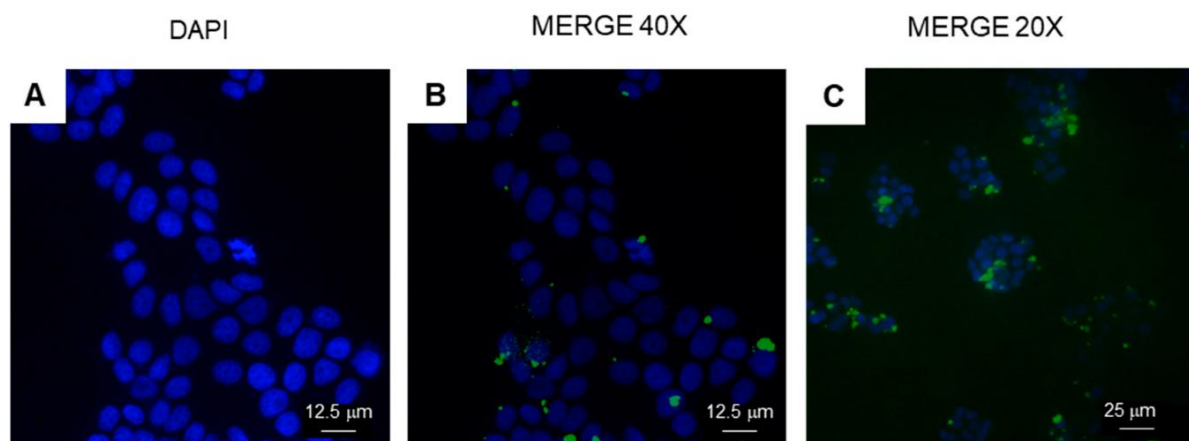


Figura 24. Immagini di microscopia a fluorescenza di cellule MCF-7 trattate con HNTs-NCDs_a (1 mg mL⁻¹) con nuclei fissati e marcati con DAPI: (A) ingrandimento 40×, (B) immagini sovrapposte 40× e (C) immagini sovrapposte 20×.

Grazie alla loro capacità di penetrare all'interno delle cellule e di distribuirsi anche a livello nucleare, questi nanomateriali offrono prospettive significative per lo sviluppo di sonde fluorescenti in grado di monitorare processi biologici complessi e di fornire informazioni cruciali a supporto di strategie diagnostiche e terapeutiche avanzate.

3.3.3. Naftalendiimide (NDI): sistemi emergenti per il sensing fluorescente

Negli ultimi anni, accanto ai fluorofori convenzionali e ai nanomateriali a base di carbonio, come i *carbon dots*, hanno attirato un crescente interesse, come molecole per la progettazione di sensori fluorescenti, i derivati della naftalendiimide (NDI). Queste molecole aromatiche planari, caratterizzate da un *core* π -coniugato elettron-povero,¹¹³ presentano proprietà strutturali ed elettroniche estremamente versatili che le rendono molecole particolarmente adatte al riconoscimento selettivo di specie chimiche e biologiche.¹¹⁴ L'NDI generalmente viene sintetizzato a partire dall'1,4,5,8-naftalenetetracarbossilico dianidride (NDA), un precursore versatile che, grazie alla presenza di due anidridi reattive, può essere facilmente funzionalizzato mediante reazioni di apertura dell'anidride con ammine aromatiche o alifatiche.¹¹⁵ Questo approccio consente di ottenere un'ampia varietà di derivati NDI con proprietà strutturali ed elettroniche modulabili, adattabili a specifiche applicazioni di *sensing*.¹¹⁶⁻¹¹⁸ La possibilità di introdurre differenti sostituenti in posizione imidica permette inoltre di modificare le caratteristiche elettroniche del cromoforo e di regolare la sua interazione con molecole o ioni

target.¹¹⁹ Le peculiari proprietà fotofisiche degli NDI, tra cui l'elevata resa quantica, la stabilità fotochimica e la possibilità di modulare l'intero spettro visibile attraverso semplici modifiche strutturali, li rendono piattaforme ideali per lo sviluppo di sistemi fluorescenti avanzati, inclusi sensori ottici ad alta sensibilità e selettività.^{114,120,121} Ad esempio, la sostituzione con gruppi elettron-donatori sul core aromatico consente di estendere l'assorbimento e l'emissione fino alla regione del rosso dello spettro visibile, caratteristica particolarmente utile per il rilevamento di analiti in ambienti biologici complessi.^{118,122-124} Grazie a queste proprietà gli NDI si sono dimostrati strumenti efficaci per il riconoscimento e *sensing* di numerose specie, sia anioniche che cationiche.¹²⁵⁻¹²⁷

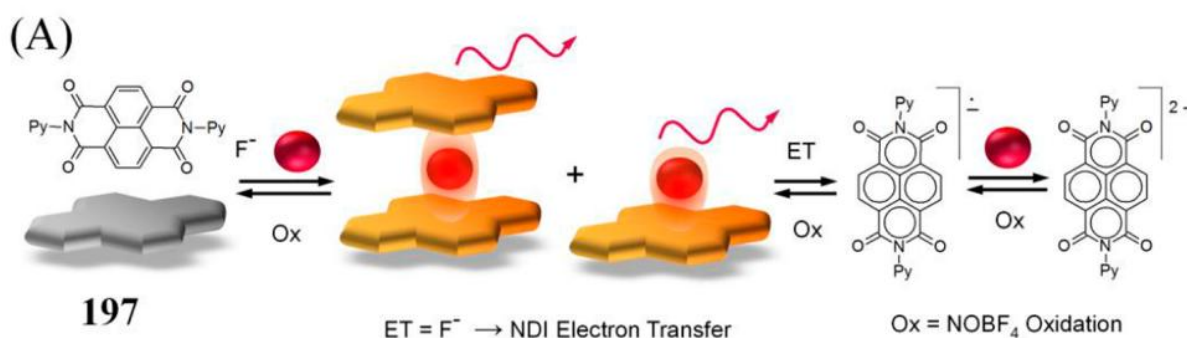


Figura 25. Illustrazione schematica di interazioni anione- π e di trasferimento di carica (CT) tra F^- e il recettore NDI, che generano una risposta fluorescente (Guha *et al.*, 2010).¹²⁸

Ad esempio, Halдар *et al.*, hanno sintetizzato degli NDI contenenti L-fenilalanina ed L-tirosina, legate tramite un legame immidico, usati come derivati donatori-accettori per l'autoassemblaggio di queste strutture e conseguente *sensing* dello ione fluoruro. Queste macrostrutture sferiche formate in miscele metanolo-diclorometano, dal diametro di 200-300 nm, mostrano in ambiente acquoso un comportamento *turn-on* della fluorescenza in presenza di ioni F^- .¹²⁹ Un altro esempio significativo è stato riportato da Saha *et al.*, i quali hanno osservato delle interazioni supramolecolari tra F^- e recettori a base di NDI elettron-poveri e incolori (**Figura 25**). Questa interazione porta alla colorazione della soluzione da arancione (per 5 eq. di F^-), in seguito a formazione del radicale anione $NDI^{\cdot-}$, a rosa (per eq. di $F^- > 5$), in seguito a riduzione di quest'ultimo a dianione NDI^{2-} .^{128,130} Inoltre l'uso di *linker* ha migliorato notevolmente la selettività a sensibilità, consentendo un rilevamento dello ione F^- a concentrazioni nanomolari in soluzioni DMSO/H₂O (85:15).¹²⁸ Per quanto riguarda il rilevamento di cationi, è stato studiato un recettore basato sull'NDI per il rilevamento selettivo di ioni Cu^{2+} e Fe^{3+} , rispetto ad altri cationi (Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Cr^{3+}) (**Figura 26**).¹³¹

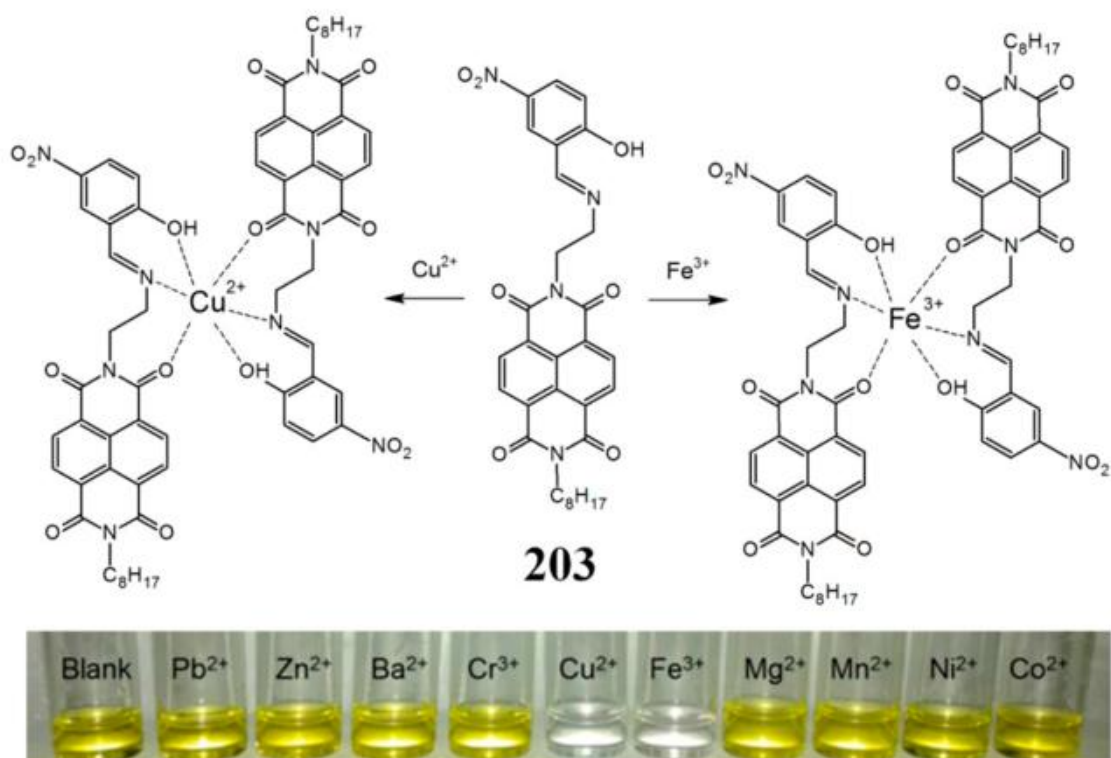


Figura 26. Meccanismi di legame proposti per la coordinazione di Cu^{2+} e Fe^{3+} . Variazione di colore della sonda (2×10^{-5} M) dopo l'aggiunta del sale perclorato di diversi ioni metallici (1×10^{-3} M) (Ghule *et al.*, 2016).¹³¹

Questo sistema si è dimostrato essere una piattaforma semplice, economica e affidabile per la determinazione di tracce di Cu^{2+} e Fe^{3+} , grazie alla selettiva e alla sua elevata sensibilità. Inoltre, Tian *et al.*, hanno progettato sensori fluorescenti *turn-on* nel vicino infrarosso (NIR) basati su NDI ciclici per il rilevamento di Zn^{2+} mediante trasferimento fotoindotto di elettroni, riuscendo anche a effettuare *imaging* intracellulare di questo ione in cellule umane.¹³² Tuttavia, gli NDI presentano un *core* naftalico lipofilo con quattro gruppi carbonilici polari e ciò comporta problemi significativi di solubilità: risultano infatti generalmente solubili soltanto in solventi lipofili a bassa polarità o in solventi polari aprotici, condizione che ne limita fortemente le applicazioni in ambiente biologico.¹²⁰ Per superare la loro scarsa solubilità acquosa, Manet, Freccero *et al.*, hanno riportato la modifica delle unità immidiche e del core naftalenico con gruppi amminici o ammonio quaternario, ottenendo derivati NDI fotosensibilizzatori dell'ossigeno singoletto altamente solubili in acqua.¹³³ Un'ulteriore strategia per superare questi limiti potrebbe essere rappresentata dall'impiego di materiali nanostrutturati inorganici: in particolare, il legame covalente tra NDI e gli HNTs, potrebbe costituire un approccio efficace per migliorarne la dispersione in ambiente acquoso e potenzialmente favorirne l'impiego in applicazioni biologiche di *sensing*, dove la buona stabilità colloidale e l'internalizzazione cellulare risultano fondamentali per migliorarne le proprietà e prestazioni.

3.3.3.1. Sintesi e caratterizzazione del nanomateriale HNTs-NDI

Sulla base di questo, è stata messa a punto la sintesi di un nanomateriale a base di halloysite utilizzando un derivato dell'NDI (Composto 4), in cui sono stati inseriti due gruppi etossilici elettron-donatori sul nucleo naftalenico e un triplo legame terminale in corrispondenza delle due unità immidiche (**Figura 27**); i dettagli della sintesi di questo derivato sono riportati in Borbone, Riela *et al.*, *ACS Appl. Nano Mater.* 2025, 8, 24, 12775-12783.¹³⁴

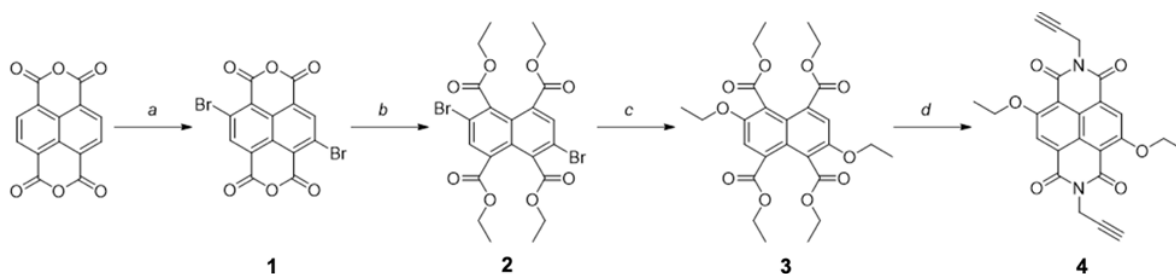
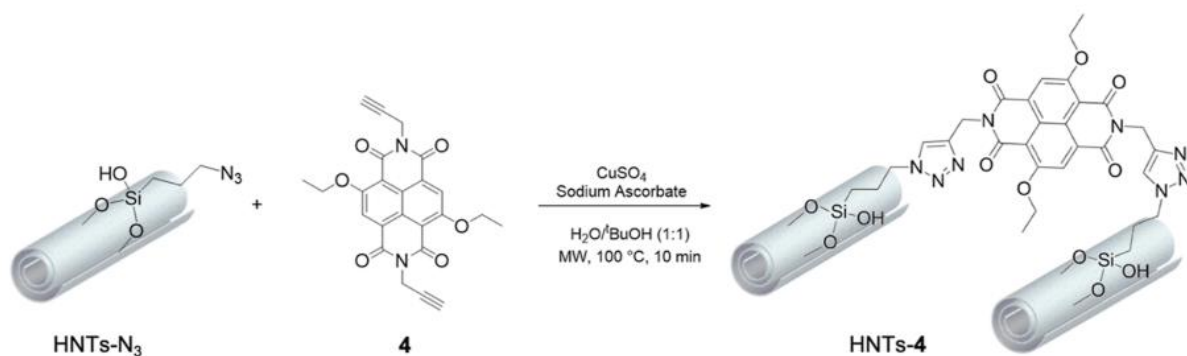


Figura 27. Sintesi dell'NDI simmetrico 4; (a) DBDMH, H_2SO_4 , 60 °C, *overnight*, resa 85%; (b) EtI, K_2CO_3 , EtOH, 80 °C, *overnight*, resa 79%; (c) EtONa, DMF, 50 °C, *overnight*, resa 40%; (d) (i) KOH, *i*-PrOH, riflusso, *overnight*; (ii) propargilammina, AcOH, riflusso, *overnight*, resa 56% - (Borbone, Riela *et al.*, 2025).¹³⁴

Al fine di legare covalentemente il derivato 4 a dei nanotubi di halloysite, questi sono stati precedentemente modificati introducendo dei gruppi azidici sulla sua superficie esterna, che sono stati sfruttati, successivamente, per la formazione di un triazolo che ha permesso di legare covalentemente i due componenti. Nello specifico, la sintesi del nanomateriale HNTs-NDI (indicato in questo testo come HNTs-4) è stata realizzata mediante una reazione di cicloaddizione 1,3-dipolare azide-alchino di Meldal-Sharples-Huisgen,¹³⁵ tra il nanomateriale HNTs- N_3 e il composto 4 (**Schema 5**). Il legame covalente è stato formato tramite una reazione al MW, a 100 °C per 10 min, in presenza di ascorbato di sodio e CuSO_4 come catalizzatori e utilizzando una miscela $\text{H}_2\text{O}/t\text{-BuOH}$ (1:1) come solvente.



Schema 5. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale HNTs-4

Questa procedura adottata è risultata essere strategica, poiché la stessa reazione effettuata tradizionalmente, non ha avuto luogo, a conferma del ruolo cruciale delle microonde nel favorire l'interazione tra i gruppi funzionali coinvolti. Il nanomateriale HNTs-4, in seguito a ripetuti lavaggi in H₂O e DCM, necessari per rimuovere sia i catalizzatori sia eventuali residui di reagenti non reagiti, è stato isolato come polvere gialla. Dall'analisi termogravimetrica è stata determinata una percentuale di composto 4 sugli HNTs pari al 3.0 %p/p, dimostrando l'avvenuta funzionalizzazione della superficie esterna; funzionalizzazione che non è andata a completamento in quanto il rapporto stechiometrico tra HNTs-N₃ e HNTs-4 (rispettivamente 0.24 mmol g⁻¹ e 0.07 mmol g⁻¹) risulta essere di ca. 1:3. Questo fenomeno, che potrebbe essere dovuto ad effetti sterici, è stato inoltre confermato dall'analisi FT-IR.

In **Figura 28a** si riporta lo spettro FT-IR in cui è presente lo spettro del nanomateriale HNTs-N₃, con le sue tipiche bande di vibrazione,¹³⁵ e lo spettro di HNTs-4. Quest'ultimo presenta sia le bande caratteristiche del nanomateriale inorganico, sia quelle attribuibili alla porzione organica, con segnali a 2965, 2930 e 2850 cm⁻¹, corrispondenti allo *stretching* asimmetrico e simmetrico dei gruppi -CH₃ e -CH₂-, e una banda tipica a 1705 cm⁻¹ riconducibile allo *stretching* del gruppo C=O. Ulteriori bande, osservate a 1575, 1450, 1385, 1320, 1270 e 1200 cm⁻¹, possono essere associate allo *stretching* e *bending* dell'anello aromatico e alle vibrazioni di *stretching* dei legami C-O e C-N.¹³⁶ Inoltre, la riduzione dell'intensità della tipica banda di vibrazione del gruppo azidico, localizzata a circa 2100 cm⁻¹, indica che la reazione di *click chemistry* ha avuto luogo con successo, e la mancata scomparsa del segnale, allo stesso tempo, conferma l'ipotesi fatta precedentemente sulla base del rapporto stechiometrico osservato.

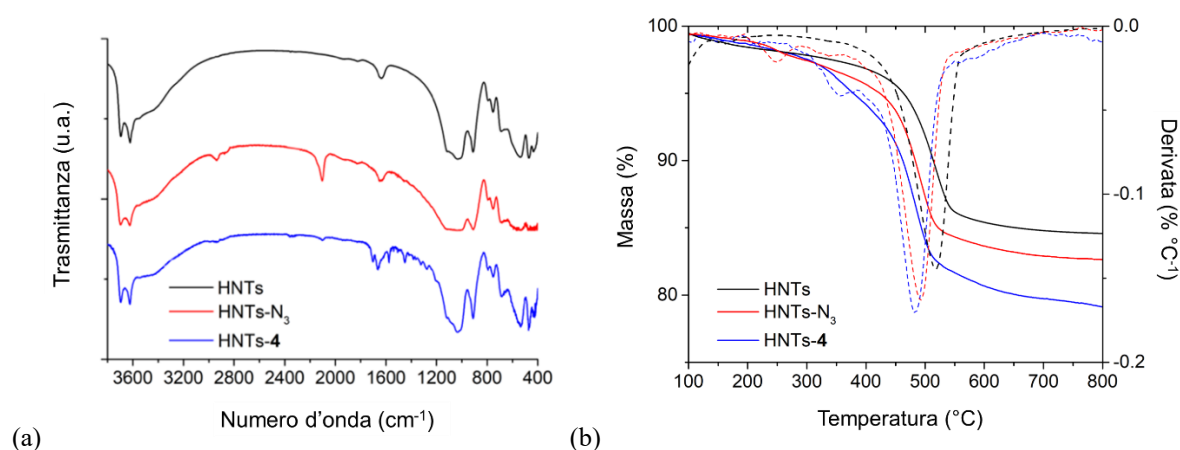


Figura 28. (a) Spettro FT-IR e (b) TGA/DTG di HNTs, HNTs-N₃ e HNTs-4.

L'avvenuta funzionalizzazione è stata confermata anche dall'analisi termogravimetrica (**Figura 28b**) in cui come si può osservare, oltre alle tipiche perdite di massa tipiche dell'halloysite, e alla degradazione e volatilizzazione della componente organica del nanomateriale HNTs-N₃ (ca. 250 °C),¹³⁵ nella curva TGA di HNTs-4 è visibile un processo di degradazione a più stadi con un picco principale, evidenziato nella DTG, a 350 °C. Infine, un'ulteriore conferma è stata data dalle misure di potenziale- ζ , che hanno evidenziato per HNTs-4 un valore di -9.60 mV, leggermente più negativo rispetto a quello di HNTs-N₃ (-5.35 mV). Oltre alle misure di potenziale- ζ , tramite DLS, sono state stimate le dimensioni delle nanoparticelle, in termini di diametro idrodinamico medio, e l'eventuale presenza di aggregati.

Il nanomateriale HNTs-4 ha mostrato una dimensione media di 496 ± 30 nm, maggiore rispetto a quella degli HNTs non modificati (295 nm). Questo incremento conferma, come previsto, che l'introduzione di una porzione idrofobica sulla superficie esterna dei nanotubi porta alla formazione di materiali con una diffusione meno efficiente in ambiente acquoso. Considerando la struttura molecolare del composto 4, la differenza di dimensioni tra HNTs e HNTs-4 è probabilmente attribuibile alla possibilità che un'unità NDI faccia da ponte tra due nanotubi distinti, favorendone così l'aggregazione, in accordo con quanto osservato dalle analisi HAADF-STEM. Le immagini TEM (**Figura 29**), in effetti, mostrano che la struttura tubulare dell'halloysite rimane invariata dopo la funzionalizzazione. Dal punto di vista morfologico, è possibile osservare i nanotubi (evidenziati dalle frecce rosse) ricoperti da materiale organico, con la formazione di aggregati dovuti alla presenza del composto 4 che funge da ponte tra nanotubi differenti. La presenza della porzione organica è stata ulteriormente confermata dalla mappatura elementare, che evidenzia la presenza di atomi di azoto, rilevati tramite spettroscopia EDX (**Figura 29b-c**).

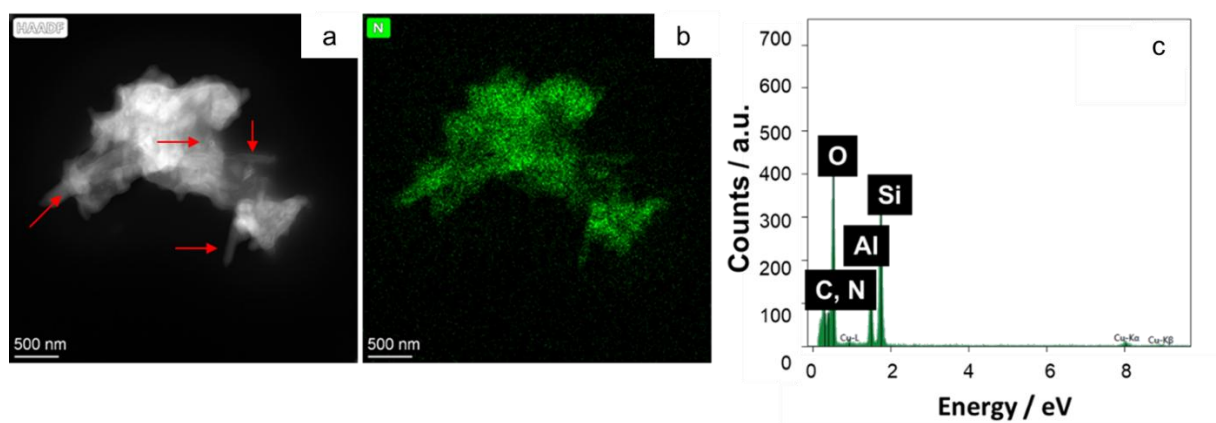


Figura 29. Immagine (a) TEM, (b) mappatura elementare e (c) analisi EDX di HNTs-4

- Proprietà fotofisiche del nanomateriale HNTs-4

Al fine di valutare l'effetto della funzionalizzazione sull'ambiente elettronico del cromoforo e verificare il mantenimento delle sue caratteristiche ottiche dopo l'immobilizzazione sugli HNTs, sono state studiate le proprietà fotofisiche del nanomateriale HNTs-4 attraverso l'analisi degli spettri di assorbimento ed emissione. Lo spettro UV-vis di una dispersione del nanomateriale (1 mg mL^{-1} in DCM) (**Figura 30a**) mostra le tipiche bande di assorbimento dei cromofori a base di NDI, ovvero la transizione $\pi-\pi^*$ tra 340 e 360 nm e una banda dovuta al trasferimento di carica introno a 475 nm.¹³⁷ In particolare, confrontando quest'ultima banda con quella osservata nello spettro del composto 4, si osserva uno *shift* batocromico di circa 10 nm dovuto alla variazione dell'ambiente circostante la molecola. Si può ipotizzare, sulla base dei risultati riportati in letteratura per co-cristalli di naftalendiimmide,¹³⁸ che questa variazione sia dovuta alla presenza di interazioni $\pi-\pi$ tra le diverse molecole legate sulla superficie esterna degli HNTs, come già precedentemente osservato per molecole aromatiche legate covalentemente sullo stesso nanomateriale inorganico.¹³⁹

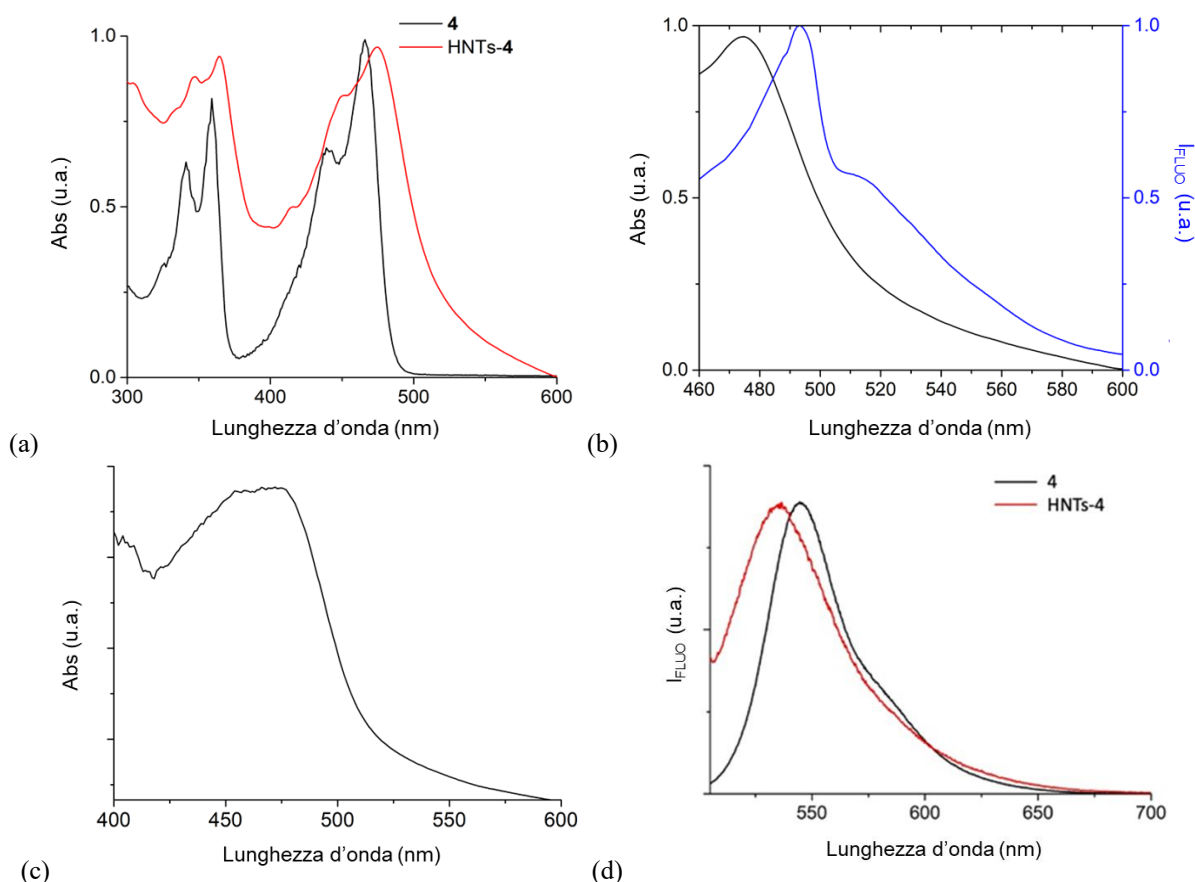


Figura 30. (a) Spettri di assorbimento del composto 4 e del nanomateriale HNTs-4; (b) spettri di assorbimento (linea nera) ed emissione (linea blu) del nanomateriale HNTs-4 (1 mg mL^{-1}); (c) spettro UV-vis del nanomateriale HNTs-4 in acqua (1 mg mL^{-1}); (d) spettri di emissione allo stato solido del composto 4 e di HNTs-4.

Le stesse bande di assorbimento della molecola sono anche presenti nello spettro della dispersione acquosa del nanomateriale (1 mg mL^{-1}), evidenziando come la presenza degli HNTs aumenti la solubilità della molecola in sistemi acquosi (**Figura 30c**), e come, vista la stabilità nel tempo dell'assorbimento, ne eviti l'aggregazione.¹⁴⁰ Viste le proprietà della molecola è stata inoltre investigata la fluorescenza del sistema, sia in dispersione che allo stato solido. Nel primo caso, il nanomateriale mostra un'emissione di colore verde brillante con un massimo di emissione intorno a 494 nm e uno *Stokes shift* di 20 nm in DCM (**Figura 30b**, linea blu) analogo al composto 4; lo stesso comportamento è stato osservato registrando gli spettri allo stato solido (**Figura 30d**). Questi risultati dimostrano che il cromoforo mantiene le proprie caratteristiche ottiche anche dopo l'immobilizzazione sulla superficie degli HNTs e in dispersione acquosa. Tale comportamento rende il nanomateriale HNTs-4 un sistema promettente come sonda fluorescente, potenzialmente utile nel riconoscimento e nel rilevamento selettivo di specie *target*. Oltre al *sensing* di tipo fluorescente ottenuto grazie alla presenza di cromofori organici, è possibile sfruttare un approccio complementare basato sull'impiego di acidi peptido nucleici (PNA), di cui si era parlato nel precedente capitolo, con l'obiettivo di sfruttarne un'ulteriore proprietà di questi sistemi, ovvero l'elevata capacità di riconoscimento molecolare.

3.4. *HNTs da ponte tra il riconoscimento molecolare e il sensing fluorescente*

Nel campo del riconoscimento molecolare, i PNA stanno emergendo come una valida alternativa alle tradizionali sonde a DNA.¹⁴¹ Lo scheletro poliammidico neutro che li costituisce, conferisce ai *duplex* PNA:RNA o PNA:DNA che si formano, una grandissima stabilità.¹⁴² Oltre a questi vantaggi rispetto all'uso di sonde a DNA nella rilevazione, lo scheletro non naturale conferisce ai PNA un'elevata resistenza all'azione di nucleasi e proteasi e una maggiore stabilità chimica rispetto agli oligonucleotidi naturali, prolungando così la durata di conservazione delle sonde.¹⁴² Poiché vengono sintetizzati come normali peptidi tramite la consolidata sintesi peptidica in fase solida, è possibile introdurre direttamente sul supporto modifiche strutturali (come piccole sequenze peptidiche, ligandi o fluorofori)¹⁴³ sfruttando una gamma di strategie chimiche più ampia rispetto a quella disponibile per le sonde a DNA, per le quali sono richieste reazioni per la formazione di fosforamiditi o accoppiamenti in fase omogenea.¹⁴⁴

Ad esempio, Amato *et al.*, hanno riportato un riconoscimento molecolare tra PNA e strutture *G-quadruplex* (G4) usate come bersaglio. I risultati hanno mostrato come non solo i PNA

riescano a riconoscere delle G4 con specifiche sequenze, ma come ne riescano anche a modulare le strutture, ampliando notevolmente le applicazioni.¹⁴⁵ Essi sono stati infatti proposti sia come biomolecole a uso terapeutico sia come sonde per strumenti diagnostici (**Figura 31**).¹⁴⁶⁻¹⁵⁰ Recentemente Falanga *et al.* ha progettato PNA capaci di legarsi selettivamente alla regione *loop* delle *G-quadruplex* presenti nel promotore del gene *Bcl-2*.¹⁵¹ L'interazione ha mostrato destabilizzare la struttura della G4 con conseguente modulazione dell'espressione genica associata. Il lavoro dimostra l'efficacia dei PNA nel riconoscimento molecolare, anche in contesti biologici complessi.¹⁵²

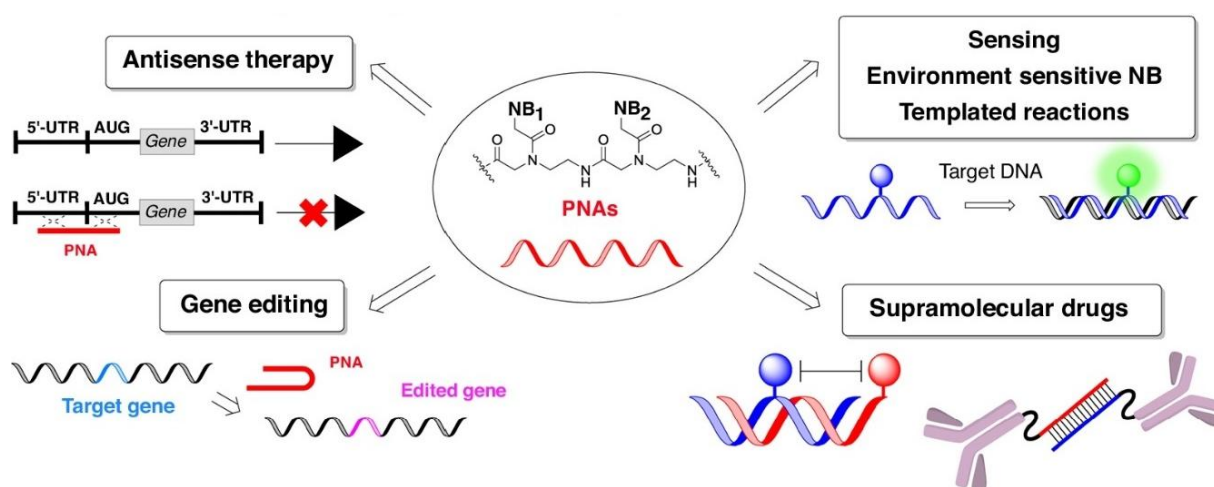


Figura 31. Schematizzazione delle applicazioni terapeutiche e diagnostiche dei PNA (Saarbach *et al.*, 2019).¹⁵³

L'impiego dei PNA presenta tuttavia alcuni svantaggi da considerare durante la progettazione delle sonde.¹⁵⁴ Lo scheletro poliammidico neutro, che assicura la formazione di *duplex* stabili con gli acidi nucleici naturali, può comportare una ridotta solubilità in ambiente acquoso.¹⁵⁴ Nonostante questi limiti, la possibilità di veicolarli facilmente tramite sistemi nanostrutturati ed in particolare tramite l'halloysite, come visto più volte nel corso di questo lavoro di tesi,^{155,156} unita ai vantaggi in termini di stabilità dei *duplex*, potrebbe portare i PNA a trovare numerose applicazioni nelle strategie di riconoscimento molecolare. Inoltre, combinare queste proprietà a quelli di un nanomateriale fluorescente a base di halloysite, potrebbe risultare una strategia efficace per l'ottenimento di un sistema multifunzionale per il *biosensing*, fluorescente e molecolare.

3.4.1. Sintesi dell'oligomero $H_2N-T(18)-Lys(3)-CONH_2$ (PNA)

A tal fine, è stata sintetizzata una sequenza di PNA, utilizzata come modello, e successivamente caricata tramite interazioni supramolecolari su un nanomateriale fluorescente a base di NDI e HNTs (HNTs-5), ottenuto a partire dal nanomateriale HNTs-4 precedentemente descritto. Come *proof of concept* è stata impiegata una sonda modello costituita da una catena di PNA composta da 18 basi timidiniche (T18). Tale lunghezza è stata selezionata in quanto rappresenta un compromesso efficace tra costo di sintesi, resa complessiva e, soprattutto, specificità di riconoscimento nei confronti del *target* cellulare. La scelta di una sequenza omopirimidinica è stata inoltre motivata dalla maggiore efficienza sintetica rispetto a quella di sequenze miste purina/pirimidina.

La sintesi del PNA, effettuata durante un periodo trascorso presso i laboratori di ricerca del Dipartimento di Farmacia della Federico II di Napoli, sotto la supervisione della Prof.ssa Giorgia Oliviero, è stata realizzata tramite la classica metodologia di sintesi peptidica in fase solida. Come supporto solido è stata impiegata una resina MBHA (4-metil-benzidrilammina), sulla quale la sequenza è stata costruita attraverso cicli successivi di accoppiamento e rimozione del gruppo protettivo. L'accoppiamento dei monomeri è stato promosso in DMF mediante l'agente attivante HATU, utilizzato in combinazione con la base organica DIPEA, che favorisce la formazione del legame peptidico e garantisce un'elevata efficienza di reazione. Durante ciascun ciclo, dopo l'accoppiamento del monomero, il gruppo Fmoc è stato rimosso in condizioni basiche per consentire l'aggiunta dell'unità successiva, permettendo così l'allungamento controllato della catena.

Alla fine della sequenza, sono stati introdotti tre residui di lisina all'estremità carbossilica, con l'obiettivo di migliorare la solubilità in ambiente acquoso e favorire l'interazione elettrostatica con la superficie esterna degli HNTs, caratterizzata da carica negativa, ottenendo così l'oligomero $H_2N-T(18)-Lys(3)-CONH_2$ (**Figura 32**).

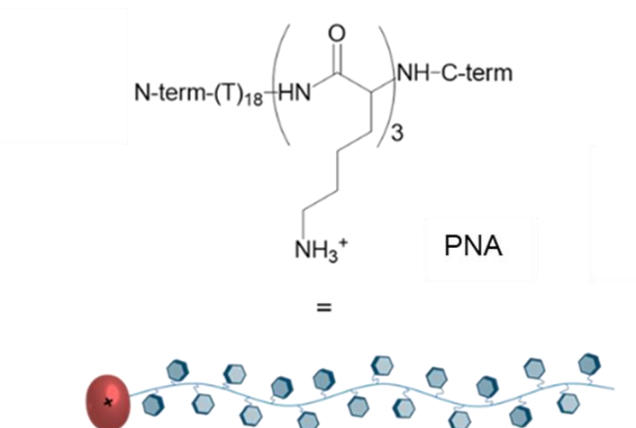
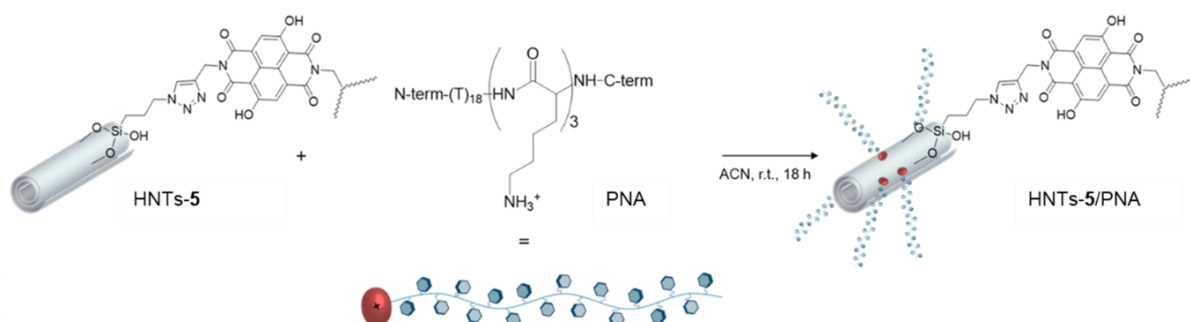


Figura 32. Struttura del PNA $H_2N-T(18)-Lys(3)-CONH_2$ e sua stilizzazione.

Il prodotto grezzo ottenuto al termine della sintesi è stato purificato mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e successivamente caratterizzato tramite spettrometria di massa ESI. L'analisi ha confermato la corretta identità chimica del PNA sintetizzato, mostrando valori calcolati e sperimentali in ottimo accordo: per lo ione $[M+3H]^{3+}$ il valore calcolato è 1731.4 e quello misurato 1733.2, mentre per lo ione $[M+4H]^{4+}$ il valore calcolato è 1298.8 e quello misurato 1300.2 (**Appendice B, Figura B1-B2**). Infine, la quantità di PNA ottenuto è stata determinata tramite analisi spettrofotometrica a 260 nm, confermando l'efficacia della procedura di sintesi.

- Sintesi del sistema HNTs-NDI/PNA

Il caricamento del PNA sul nanomateriale HNTs-5 (la cui sintesi a partire dal composto HNTs-4 è riportata in Borbone, Riela *et al.*, *ACS Appl. Nano Mater.* 2025, 8, 24, 12775-12783) è stato realizzato seguendo una procedura diversa rispetto a quella descritta in letteratura.¹⁵⁶ In particolare (**Schema 6**), una dispersione del nanomateriale HNT-5 in acetonitrile è stata miscelata con una soluzione acquosa di PNA, ottenendo un materiale finale (HNTs-5/PNA) con un contenuto di PNA, stimato tramite spettroscopia UV-*vis* pari a circa il 2.0 %p/p con un'efficienza di caricamento del 100%.



Schema 6. Rappresentazione schematica della sintesi del nanomateriale HNTs-5/PNA

Le curve TGA del materiale risultante e del precursore (**Figura 33a**) mostrano, oltre alle tipiche perdite di massa associate ai nanomateriali a base di HNTs-NDI, un'ulteriore perdita centrata intorno a 250 °C, attribuibile alla degradazione del PNA e indicativa della sua presenza sulla

superficie esterna del nanomateriale HNTs-5/PNA.¹⁵⁶ Anche l'analisi della massa residua a 800 °C ha confermato un contenuto di PNA uguale a quello stimato tramite misure UV-*vis*. Le immagini HAADF/STEM (**Figura 33b**) rivelano una struttura più compatta e rivestita da materiale organico, coerente con l'introduzione delle molecole di PNA, mentre le misure di potenziale- ζ mostrano un leggero aumento del valore (-8.78 mV), segno che la stabilità colloidale del sistema non subisce variazioni significative. Per valutare le potenzialità del nanomateriale in campo biomedico, è stato analizzato il profilo di rilascio del PNA mediante il metodo della membrana da dialisi a pH 7.0 e 37 °C, al fine di simulare delle condizioni fisiologiche. Come riportato in **Figura 33c**, il rilascio avviene in modo rapido, raggiungendo il 100% delle molecole entro circa 150 minuti, in linea con quanto descritto in letteratura per processi di desorbimento dalla superficie esterna degli HNTs.¹⁵⁵

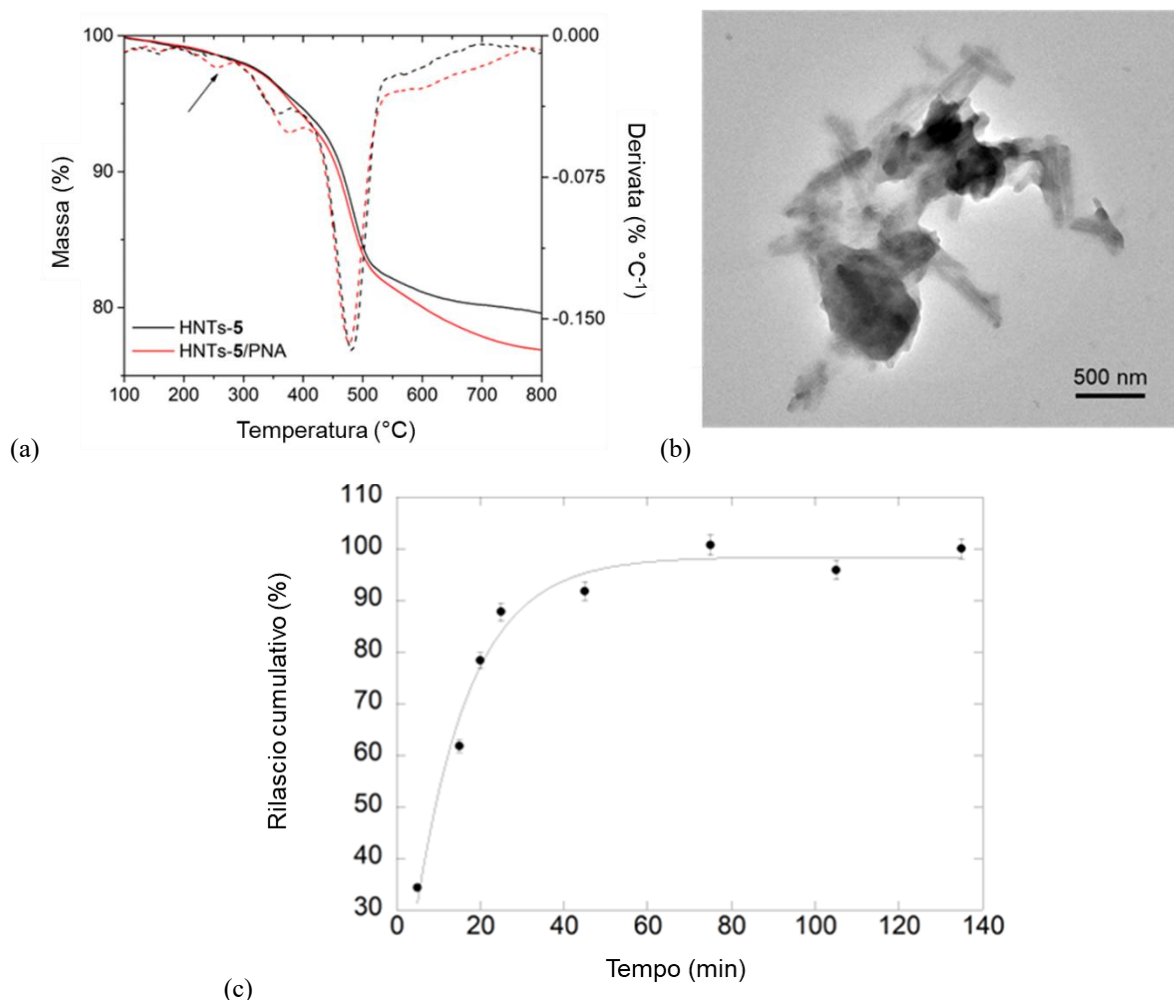


Figura 33. (a) TGA e DTG dei nanomateriali HNTs-5/PNA comparato con il nanomateriale HNTs-5; (b) immagine TEM del nanomateriale HNTs-5/PNA; (c) rilascio cumulativo del PNA dal nanomateriale HNTs-5/PNA a 37 °C e pH 7.0.

Infatti, l'analisi dei dati cinetici mediante modelli matematici di primo ordine e Power Fit ha evidenziato che il rilascio segue una cinetica di primo ordine ($M_{\infty} = 98.4 \pm 1.9 \%p/p$, $k = 0.076 \pm 0.006 \text{ min}^{-1}$, $R^2 = 0.9776$), suggerendo che il processo sia principalmente governato da un meccanismo di diffusione a partire dalla superficie esterna dei nanotubi. È noto però, come è stato già descritto nei capitoli precedenti, che il profilo di rilascio può essere modulato modificando la carica del PNA e di conseguenza il sito di interazione con il nanomateriale in questione.¹⁵⁷ In conclusione, i dati ottenuti dimostrano come il sistema sviluppato, HNTs-5/PNA, rappresenti un nanomateriale multifunzionale in cui le proprietà fluorescenti dell'NDI, utili per il *biosensing*, si combinano con la capacità di riconoscimento molecolare del PNA, aprendo la strada a possibili applicazioni sia nel campo della diagnostica che della terapeutica.

3.5. Conclusioni

In questo capitolo sono state discusse la progettazione e la caratterizzazione di differenti sistemi nanostrutturati a base di argille, con particolare attenzione all'halloysite, come piattaforme fluorescenti per applicazioni nel *biosensing* fluorescente.

In un primo studio è stato sintetizzato e caratterizzato un materiale fluorescente basato su Ht e Phe come potenziale sensore per il rilevamento selettivo di ioni Zn^{2+} . Le analisi chimico-fisiche condotte sul nanomateriale Ht/Phe e Ht/Zn/Phe hanno evidenziato l'intercalazione della fenantrolina all'interno dell'argilla e il mantenimento delle proprietà foto-fisiche della molecola organica. Il nanomateriale ottenuto si è mostrato in grado di riconoscere selettivamente gli ioni Zn^{2+} rispetto ad altri cationi metallici, come suggerito dai test di selettività e dallo *strip test*, suggerendo il suo potenziale utilizzo come sensore fluorescente per lo ione zinco, economico ed efficiente.

Successivamente, sono stati sviluppati nuovi nanomateriali fluorescenti basati su HNTs ed N-doped CDs, con l'obiettivo di ottenere sensori multifunzionali per il *biosensing*. A tal fine sono state confrontate due diverse strategie sintetiche: un approccio *bottom-up*, basato sulla formazione diretta degli NCDs sulla superficie degli HNTs tramite pirolisi in microonde, e un approccio di post-funzionalizzazione, in cui NCDs, precedentemente sintetizzati e purificati, sono stati successivamente legati a nanomateriali a base di halloysite. In entrambi i casi, l'acido itaconico è stato utilizzato come fonte di carbonioso, e tre ammine, quali l'etilendiammina, l'esametildiammina e la spermina, come agenti passivanti. Tutti i nanomateriali hanno mostrato le tipiche proprietà fluorescenti dei *carbon dots*, ovvero una lunghezza d'onda di eccitazione dipendente da quella di emissione; tuttavia le analisi morfologiche e le rese quantiche di fluorescenza determinate, hanno evidenziato come la sintesi diretta degli NCDs porti all'ottenimento di nanomateriali fluorescenti a base di HNTs ed NCDs molto più performanti e caratterizzati da piccoli e uniformi *carbon dots*, evitando il tipico processo lungo e tedioso di purificazione. Le titolazioni spettrofluorimetriche hanno confermato la capacità dei materiali HNTs-NCDs di agire come sensori fluorescenti per lo ione Fe^{3+} , oltre alla loro elevata selettività anche in presenza di specie interferenti. Infine, gli studi di internalizzazione cellulare hanno evidenziato come questi nanomateriali siano in grado di oltrepassare la barriera cellulare, arrivando non solo a livello citoplasmatico ma anche a livello nucleare, confermando un loro potenziale utilizzo come biosensori per lo ione Fe(III) .

Infine, è stato sviluppato un materiale multifunzionale basato su nanotubi di halloysite funzionalizzati con un derivato dell'NDI e con una sequenza PNA, progettato per combinare proprietà fotofisiche modulabili e capacità di riconoscimento molecolare. L'NDI è stato covalentemente ancorato alla superficie esterna degli HNTs mediante una reazione di *click chemistry* assistita da microonde, e il materiale ottenuto è stato caratterizzato con diverse tecniche per confermare l'avvenuta funzionalizzazione. Successivamente, il nanomateriale HNTs-NDI è stato caricato con una sequenza PNA modello, ottenendo così un sistema fluorescente multifunzionale a base di halloysite. Nel complesso, i risultati ottenuti dimostrano come l'halloysite rappresenti una piattaforma naturale, versatile e facilmente modificabile, sia attraverso approcci covalenti che supramolecolari, per la realizzazione di materiali fluorescenti con proprietà fotofisiche modulabili. La possibilità di combinare differenti strategie di funzionalizzazione consente di sviluppare sensori intelligenti basati su argille per applicazioni di *biosensing* fluorescente.

3.6. Sezione sperimentale

3.6.1. Materiali e metodi

Tutti i reagenti sono stati acquistati presso la Merck Life Science S.r.l. (Milano, Italia), TCI (Zwijndrecht, Belgio), BLD Pharm (Reinbek, Germania), VWR (Milano, Italia) e utilizzati senza ulteriori purificazioni. L'hectorite è stata fornita dalla Tolsa Group Inc. (Madrid, Spagna). I nanomateriali HNTs-NH₂, HNTs-1, NCDs_a e HNTs-N₃ sono stati sintetizzati secondo procedure riportate in letteratura.^{102,103,105,135}

Le sintesi assistite da microonde sono state eseguite utilizzando un sistema monomodale CEM DISCOVER (CEM Corporation, Matthews, NC, USA).

Gli NCDs_a sono stati purificati tramite cromatografia ad esclusione dimensionale, utilizzando una procedura riportata in letteratura.⁷⁷

Gli spettri **FT-IR** (KBr) sono stati registrati con uno spettrometro Agilent Technologies Cary 630.

L'analisi **TGA** del materiale Ht/Phe è stata eseguita utilizzando un sistema TGA/DSC1 STAR (Mettler Toledo Inc., Madrid, Spagna). Un campione di 15 mg è stato sottoposto a un pretrattamento in flusso d'aria (30 mL min⁻¹) da 25 °C a 100 °C, con una velocità di riscaldamento di 10 °C min⁻¹ e un tempo di mantenimento a 100 °C di 30 minuti e successivamente, la temperatura è stata aumentata da 100 a 1000 °C sempre in flusso d'aria (30 mL min⁻¹). Le TGA di HNTs-2, HNTs-NCDs_{a-c}, HNTs-COOH e HNTs-NCDs₁₋₂, sono state eseguite utilizzando un apparecchio Q5000 IR (TA Instruments, New Castle, DE, USA). Le misure sono state condotte in atmosfera di azoto (con flussi di gas impostati a 25 e 10 cm³ min⁻¹ rispettivamente per il campione e per la bilancia) in un intervallo di temperatura compreso tra 25 e 800 °C. La velocità di riscaldamento è stata impostata a 20 °C min⁻¹. Infine, le TGA dei nanomateriali HNTs-4 e HNTs-5/PNA sono state eseguite utilizzando uno strumento PerkinElmer Pyris TGA7, nell'intervallo di temperatura compreso tra 50 e 800 °C, con una velocità di riscaldamento di 10 °C min⁻¹ e in atmosfera di azoto (con un flusso di 60 mL min⁻¹).

L'analisi **XRD** è stata eseguita utilizzando un diffrattometro (modello X'Pert Pro, Malvern Panalytical, Madrid, Spagna) dotato di un rivelatore a stato solido (X'Celerator) e di un porta campioni rotante. I diffrattogrammi sono stati registrati utilizzando campioni montati in modo casuale e irradiati con radiazione CuK α , operando a 45 kV e 40 mA, in un intervallo di 4–60° 2 θ .

Le misure **XPS** sono state eseguite con uno spettrometro SPECS SAGE HR 100 (SPECS, Berlino, Germania) in alto vuoto (10^{-1} Pa), dotato di una sorgente di raggi X non monocromatica (Mg) con linea $K\alpha$ di 1253,6 eV. Per neutralizzare la carica è stato utilizzato un *electron gun*. Gli spettri sono stati elaborati e adattati utilizzando il *software* Casa XPS (Versione 2.3.16 PR1.6).

L'analisi **DLS**, del **potenziale- ζ** e dell'indice di polidispersione (**PDI**) di tutti i materiali è stata eseguita con uno strumento Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Worcestershire, UK), dotato di un laser a 532 nm e con angolo di scattering fisso di 173° .

Le analisi **UV-vis** sono state realizzate con uno spettrometro Beckmann DU 650.

Le misure di **fluorescenza** sono state eseguite utilizzando uno spettrofluorimetro JASCO FP8300 (JASCO, Cremella (LC), Italia). Per il nanomateriale Ht/Phe sono state usate fenditure di eccitazione ed emissione impostate a 5 nm, e gli spettri sono stati acquisiti in un intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 300 e 700 nm. Per i nanomateriali HNTs-NCDs_{a-c} e HNTs-NCDs₁₋₂, sono state usate: per le misure in soluzione, fenditure di eccitazione ed emissione di 5 nm in un intervallo compreso tra 300 e 700 nm; per gli spettri allo stato solido fenditure di eccitazione ed emissione rispettivamente a 5 e 2.5 nm, nello stesso intervallo di lunghezze d'onda (300–700 nm). Per il nanomateriale HNTs-4 e il composto 4, sono state usate: per le misure in soluzione fenditure di eccitazione ed emissione di 5 nm in un intervallo tra 400 e 700 nm; per gli spettri allo stato solido fenditure di eccitazione ed emissione rispettivamente di 5 e 10 nm nello stesso intervallo di lunghezze d'onda (400–700 nm).

La **QY** dei nanomateriali HNTs-NCDs_{a-c}, NCDs_a e HNTs-NCDs₁₋₂ sono state calcolare ed eseguite tramite una procedura riportata in letteratura.¹⁰⁵

Le **titolazioni potenziometriche** sono state eseguite aggiungendo diverse aliquote (aggiunte di 2.5 μ L) di una soluzione di NaOH (0.25 M) a una dispersione acquosa (5 mL) del nanomateriale (20 mg) trattato con HCl 0.1 N (300 μ L; $n\text{HCl} = 0.03$ mmol). La dispersione risultante è stata degassata con Ar per 10 minuti prima di iniziare la titolazione. La soluzione acquosa di NaOH è stata aggiunta utilizzando una siringa microlitrica Chemotron, e il valore di pH è stato misurato con il sistema Crison micro-pH 2001 (Crison, Barcellona, Spagna).

Le immagini **SEM** sono state acquisite con un microscopio GEMINI (FESEM) (CARL Zeiss, Oberkochen, Germania) accoppiato a un microanalizzatore EDX (Oxford Instruments, Abingdon, Regno Unito). I campioni sono stati essiccati a 40°C per almeno 48 ore. Successivamente, i campioni in polvere sono stati fissati su supporti standard in alluminio e rivestiti con carbonio. Le immagini sono state ottenute a 3 kV, mentre le analisi EDX sono state effettuate a 15 kV. In entrambi i casi è stato utilizzato un rivelatore a lente d'immersione (InLens, Zeiss, Oberkochen, Germania).

Le analisi **TEM** sono state effettuate con un microscopio a trasmissione ad altissima risoluzione FEI Titan G2 60–300 (FEI, Losanna, Svizzera), accoppiato a un sistema di microscopia elettronica analitica (AEM) dotato di un rivelatore per spettroscopia a dispersione di energia dei raggi X (XEDS). Gli spettri AEM sono stati acquisiti in modalità microscopia elettronica a scansione in trasmissione (STEM) utilizzando un rivelatore di tipo *high-angle annular dark field* (HAADF). Le mappe elementari sono state inoltre ottenute tramite raggi X.

Le immagini di **microscopia confocale** sono state acquisite utilizzando un microscopio confocale a scansione laser Olympus FluoView10i (Olympus, Tokyo, Giappone), dotato di controllo dell'umidità a 37 °C e di un obiettivo 10× con apertura numerica di 0.3. Le misure sono state effettuate utilizzando un laser con eccitazione a 325 nm. La fluorescenza emessa è stata raccolta in modalità di conteggio dei fotoni. Lo spettro è stato acquisito con una fenditura di 5 nm e incrementi di 3 nm, nell'intervallo compreso tra 420 e 740 nm. L'area di scansione (256 × 256 pixel) è stata acquisita con una velocità di scansione di 12 µs per pixel.

I segnali di fluorescenza sono stati rilevati utilizzando un **microscopio a fluorescenza** (Leica, Buccinasco (MI), Italia).

3.6.2. Parte sperimentale sezione 3.3.1.1.

- Sintesi del nanomateriale Ht/Phe

A una soluzione acquosa di fenantrolina (1×10^{-2} M, 20 mL) sono stati aggiunti 200 mg di Ht. La dispersione ottenuta è stata mantenuta sotto agitazione per 18 ore a temperatura ambiente. Trascorso questo tempo, il solvente è stato rimosso mediante filtrazione, e la polvere ottenuta è stata lavata più volte con acqua e successivamente essiccata a 60 °C per tutta la notte.

- Sintesi del nanomateriale Ht/Zn/Phe

A una soluzione acquosa di ZnCl_2 (0.5 M, 5 mL) sono stati aggiunti 200 mg di Ht, e la dispersione ottenuta è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte. Successivamente, la dispersione è stata centrifugata e il solido ottenuto è stato lavato più volte con acqua ed essiccato a 60 °C per tutta la notte. Il nanomateriale Ht/Zn così ottenuto è stato quindi risospeso in 20 mL di una soluzione acquosa di fenantrolina (1×10^{-2} M), ottenendo una dispersione che è stata agitata a temperatura ambiente per tutta la notte. La polvere risultante è stata centrifugata e lavata con acqua per rimuovere eventuali molecole di fenantrolina non reagite, quindi essiccata a 60 °C.

- ***Titolazione spettrofluorimetrica per il rilevamento di ioni metallici***

A una dispersione del nanomateriale Ht/Phe in acqua (0.05 mg mL^{-1}) sono stati aggiunti 750 μL di soluzioni saline ($1 \times 10^{-4} \text{ M}$) fino a raggiungere un volume finale di 2 mL. Le dispersioni ottenute sono state degassate per 10 minuti sotto flusso di Ar. Le fenditure di eccitazione ed emissione sono state impostate a 2.5 nm e gli spettri sono stati acquisiti in un intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 270 e 700 nm.

- ***Titolazione spettrofluorimetrica per il rilevamento di ioni Zn^{2+}***

A una dispersione acquosa del nanomateriale Ht/Phe (0.05 mg mL^{-1}) sono stati aggiunti volumi crescenti (0-1 mL) di una soluzione acquosa del sale dello ione ($1 \times 10^{-4} \text{ M}$). Le dispersioni ottenute sono state degassate per 10 minuti sotto flusso di Ar. Le fenditure di eccitazione ed emissione sono state impostate a 2.5 nm e gli spettri sono stati acquisiti in un intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 270 e 700 nm.

- ***Strip test***

Strisce di carta da filtro sono state imbibite con 100 μL di una dispersione acquosa di Ht/Phe (1 mg mL^{-1}) ed essiccate a 60°C per 10 minuti. Successivamente, sono stati aggiunti 100 μL di una soluzione salina (0.01 M) e le strisce ottenute sono state essiccate a temperatura ambiente. Il colore delle strisce di carta è stato osservato sotto luce ultravioletta a 265 nm.

3.6.3. Parte sperimentale sezione 3.3.2.1.

- ***Sintesi del nanomateriale HNTs-COOH***

In un pallone da 25 mL, sono stati introdotti l'acido L-tartarico (460 mg, 10 e.) e l'1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimmide (EDC, 62 mg, 10 eq.), e solubilizzati in DMF anidra (15 mL). La sospensione è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 10 minuti. Successivamente, sono stati aggiunti rapidamente 0.5 g di HNTs-NH₂. La dispersione è stata agitata per 48 ore e al termine della reazione, il solvente è stato rimosso per filtrazione e la polvere ottenuta è stata lavata con H₂O e CH₂Cl₂ e infine essiccata a 60°C sottovuoto.

- ***Sintesi del nanomateriale HNTs-2***

In una provetta da microonde, sono stati pesati acido itaconico (50 mg) e HNTs-1 (500 mg), ai quali è stato aggiunto AIBN in quantità catalitica. Il miscuglio solido è stato posto nell'apparato

a microonde a 100 °C, sotto agitazione costante, per 1 ora. Il solido ottenuto è stato filtrato, risciacquato con H₂O ed essiccato a 60 °C per tutta la notte.

- ***Sintesi dei nanomateriali HNTs-NCDs_{a-c}***

I nanomateriali HNTs-NCDs_{a-c} sono stati ottenuti mediante irradiazione a microonde di una dispersione acquosa di HNTs-2 in presenza di etilendiammina (EDA), spermina o esametildiammina (1:1 mol/mol). In genere, nanomateriali a base di halloysite (100 mg), EDA (150 µL), esametildiammina (50 mg) o spermina (50 mg) e acqua (460 µL) sono stati riscaldati a 240 °C, con potenza impostata a 200 W, per 240 s in presenza di una quantità catalitica di TEA. Durante il riscaldamento a microonde, la dispersione cambia colore da bianco a giallo a causa della formazione di NCDs sulla superficie esterna degli HNTs. Successivamente, il solido è stato centrifugato, lavato più volte con EtOH per rimuovere i reagenti non reagiti ed essiccato a 60 °C sottovuoto.

- ***Sintesi del nanomateriale HNTs-NCDs1***

In un pallone bicollo da 25 mL, il nanomateriale HNTs-COOH (100 mg) e l'EDC (100 mg) sono stati sospesi in DMF anidro (10 mL). La dispersione ottenuta è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente in atmosfera di Ar per 10 minuti. Successivamente, è stata aggiunta una soluzione di NCDs in DMF (5 mL) e la reazione è stata lasciata sotto agitazione per 48 ore a temperatura ambiente. Al termine della reazione, il nanomateriale è stato lavato con H₂O ed essiccato a 60 °C per tutta la notte.

- ***Sintesi del nanomateriale HNTs-NCDs2***

In un pallone a fondo tondo da 25 mL gli NCDs e l'EDC (0.5 mg) sono stati disciolti in DMF anidro (15 mL) e la soluzione è stata agitata sotto atmosfera di Ar a temperatura ambiente per 10 minuti. Successivamente, sono stati aggiunti 0.1 g di HNTs-NH₂, e la dispersione ottenuta, lasciata ad agitare a temperatura ambiente per 48 ore. Successivamente, la polvere è stata lavata con H₂O ed essiccata a 60 °C per tutta la notte.

- ***Titolazione spettrofluorimetrica per il rilevamento di ioni Fe(III)***

A una dispersione di HNTs-NCDs_a (2 mg mL⁻¹) sono stati aggiunti volumi crescenti (100–600 µM) di soluzioni acquose di ioni Fe(III) (1×10^{-3} M). Le dispersioni ottenute sono state degassate per 10 minuti sotto flusso di Ar. Le fenditure di eccitazione ed emissione sono state impostate a 5 nm e gli spettri sono stati acquisiti in un intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 330 e 750 nm.

- *Colture cellulari*

La linea cellulare di carcinoma mammario umano MCF-7 è stata ottenuta da ATCC (HTB-22™). Le cellule sono state coltivate in mezzo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, HyClone Thermo Scientific, Foster City, CA, USA) in cui sono stati aggiunti un 10% di siero fetale bovino inattivato al calore, 1 mM di piruvato di sodio, 2 mM di L-glutamina, 100 µg/mL di streptomicina e 100 unità/mL di penicillina (HyClone Europe), in atmosfera contenente 5% di CO₂ a 37 °C.

3.6.4. Parte sperimentale sezione 3.3.3.1.

- *Sintesi del nanomateriale HNTs-4*

Il nanomateriale HNTs-N₃ (100 mg), il composto 4 (10 mg), 1 mg di CuSO₄·5H₂O e 1.5 mg di ascorbato di sodio sono stati pesati in una provetta da microonde dotata di tappo. Successivamente, è stato aggiunto 1 mL di una miscela H₂O/tBuOH (1:1) e la dispersione è stata sottoposta a ultrasuoni per circa 1 minuto. Il grezzo è stato poi inserito nell'apparato a microonde a 100 °C, sotto agitazione costante, per 10 minuti. Successivamente, il solido è stato raccolto per centrifugazione, lavato tre volte con acqua e tre volte con CH₂Cl₂, ed infine essiccato a 60 °C sottovuoto.

- *Sintesi, purificazione e caratterizzazione del PNA*

La molecola di PNA H₂N-T(18)-Lys(3)-CONH₂ è stata sintetizzata utilizzando il protocollo di sintesi in fase solida con gruppo protettivo 9-fluorenilmetossicarbonile (Fmoc), impiegando 150 mg di resina 4-metil-benzilammina (MBHA, 0.5 mmol/g). Sono state introdotte 3 unità di Fmoc-L-Lys(MMt)-OH mediante l'accoppiamento all'estremità C-terminale della sequenza PNA, seguendo le stesse condizioni di sintesi: 2.5 equivalenti di Fmoc-L-Lys(MMt)-OH o monomero PNA disciolti in DMF (0.2 M), 2.5 equivalenti di O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio esafluorofosfato (HATU) solubilizzato in DMF (0.2 M); 2.5 equivalenti di N,N-diisopropiletilammina (DIPEA) e 3.75 equivalenti di lutidina per 15 minuti a temperatura ambiente. I gruppi Fmoc sono stati rimossi mediante due trattamenti con una soluzione di piperidina al 20 %v/v in DMF.

I campioni grezzi sono stati purificati mediante analisi HPLC semi preparativa; la purificazione del prodotto grezzo è stata eseguita su un sistema HPLC Jasco utilizzando una colonna a fase inversa C-18 Macherey-Nagel (Düren, Germania) da 10 × 250 mm (dimensione

delle particelle: 5 μm), eluendo con un gradiente lineare da CH_3CN (contenente 0.1 %v/v di TFA) ad H_2O (contenente 0.1 %v/v di TFA) (da 0 a 100% in 30 min, flusso: 3 mL min^{-1}).

Il PNA purificato è stato caratterizzato mediante spettrometria di massa ESI-MS utilizzando uno spettrometro ABSciex 4000 Q TRAP (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) operante in modalità positiva, preparando soluzioni di PNA (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) contenenti 0.1 %v/v di acido formico in H_2O .

La quantità di PNA è stata quantificata mediante spettrofotometria UV con uno spettrofotometro Jasco V-530 a 260 nm e 90 °C, utilizzando il coefficiente di estinzione molare ($\epsilon = 158.4 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) calcolato con il *tool web* PNA Bio.

- **Caricamento del PNA**

A una dispersione di HNTs-5 (50 mg) in ACN (2.5 mL) è stata aggiunta una soluzione di PNA in H_2O (2 mg mL^{-1} , 0.5 mL). La dispersione ottenuta è stata mantenuta sotto agitazione per 18 ore a temperatura ambiente. Trascorso questo tempo, la sospensione è stata centrifugata e la polvere ottenuta è stata lavata con ACN e successivamente essiccata sottovuoto per tutta la notte. La quantità di PNA presente nel surnatante è stata determinata mediante spettrofotometria UV-vis a 266 nm. Il caricamento di PNA e l'efficienza di caricamento (CC% e LE%, rispettivamente) sono stati calcolati secondo le seguenti equazioni:

$$CC\% = \frac{PNA_{HNTs-5}}{m_{HNTs-5} + PNA_{HNTs}} \times 100 \quad (Eq. 2)$$

$$EE\% = \frac{PNA_{HNTs-5}}{PNA_{Tot}} \times 100 \quad (Eq. 3)$$

dove PNA_{HNTs-5} e PNA_{Tot} rappresentano rispettivamente la quantità di PNA caricata sul nanomateriale HNTs-5 e la quantità totale di PNA inizialmente impiegata, mentre m_{HNTs-5} è la quantità di nanomateriale.

- **Rilascio cinetico del PNA dal nanomateriale HNTs-5/PNA**

Il rilascio delle molecole di PNA dal nanomateriale HNTs-5/PNA è stato effettuato come segue: circa 10 mg del campione sono stati dispersi in 1 mL di acqua deionizzata e trasferiti all'interno di una membrana per dialisi sigillata (MWCO 12–14.000, diametro 21.5 mm; Medicell International Ltd, Londra, Regno Unito). Successivamente, la membrana è stata posta in un

pallone a fondo tondo contenente 9 mL del mezzo di rilascio e mantenuta sotto agitazione a 37 °C. A intervalli di tempo prestabiliti, 1 mL del mezzo di rilascio è stato prelevato e analizzato mediante misure UV-*vis* a $\lambda = 266$ nm. Ad ogni prelievo 1 mL di soluzione fresca ha sostituito quella prelevata. La quantità totale di farmaco rilasciato (F_t) è stata calcolata come segue:

$$F_t = V_m C_t + \sum_{i=0}^{t-1} V_a C_i \quad (Eq.4)$$

dove V_m e C_t rappresentano rispettivamente il volume e la concentrazione delle molecole di PNA al tempo t , V_a è il volume del campione prelevato, e C_i è la concentrazione delle molecole di PNA al tempo i ($i < t_i$).

Appendice A

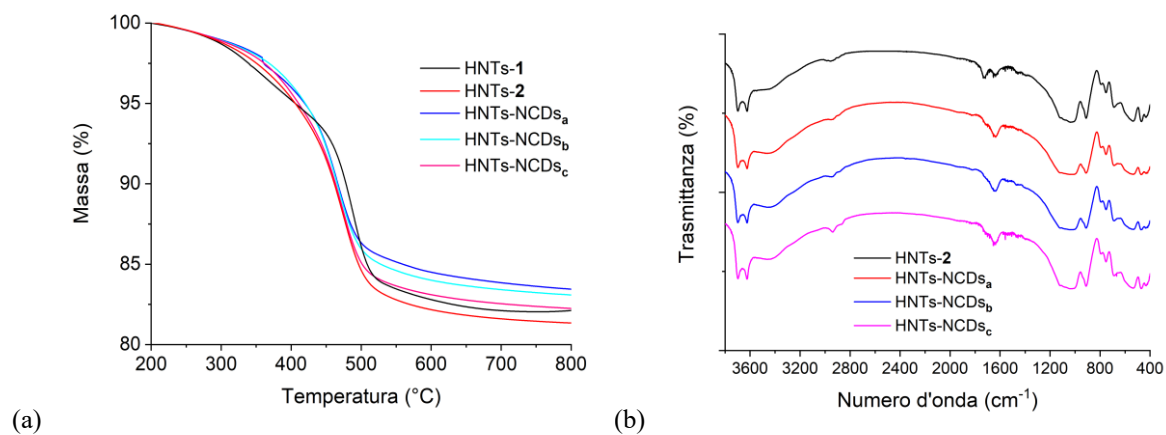


Figura A1. Termogrammi (a) e spettri FT-IR (b) dei nanomateriali HNTs-NCDs_{a-c}.

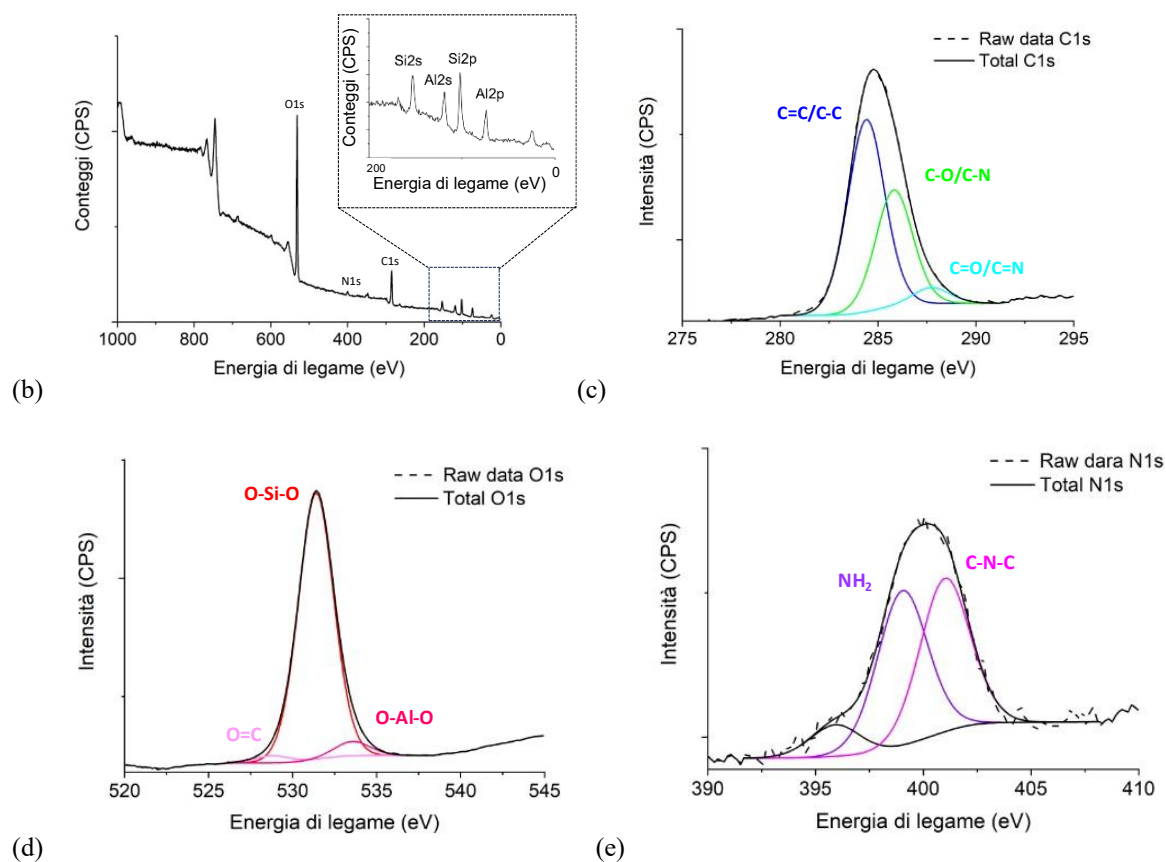


Figura A2. (a) *Survey* XPS del nanomateriale HNTs-NCDs_a; (b) spettro C 1s deconvoluto; (c) spettro O 1s deconvoluto; (d) spettro N 1s deconvoluto.

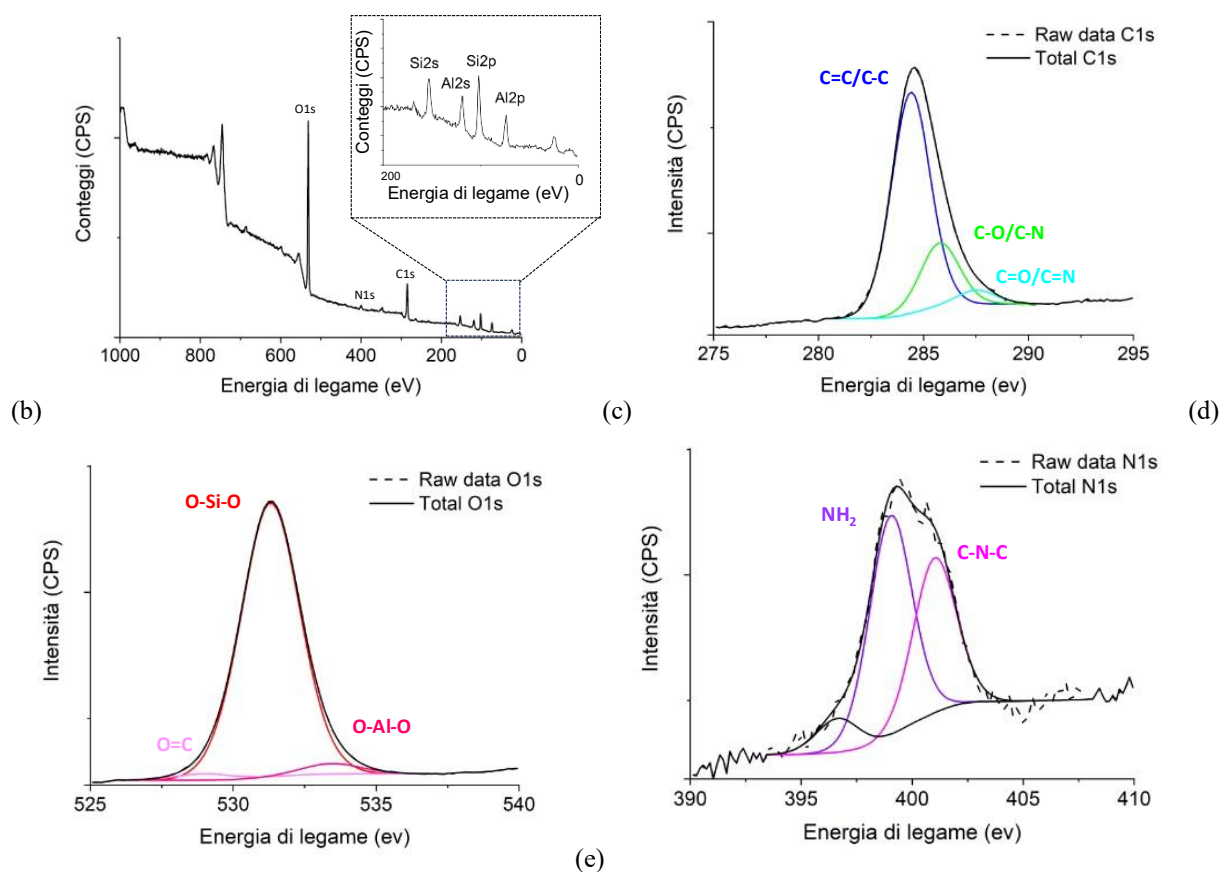


Figura A3. (a) *Survey* XPS del nanomateriale HNTs-NCDs_a; (b) spettro C 1s deconvoluto; (c) spettro O 1s deconvoluto; (d) spettro N 1s deconvoluto.

Tabella A1. Percentuale degli atomi di O, C, N e S, determinata mediante analisi XPS.

	HNTs-NCDS_a	HNTs-NCDS_b	HNTs-NCDS_c
Si%	9.8	12.2	10.3
Al%	12.6	12.9	9.5
C1s %	17.4	17.8	18.9
C=C/C-C	63.6	59.1	73.8
C-O/C-N	30.6	35.9	21.4
C=O/C=N	5.7	4.9	4.8
N1s %	2.3	2.9	2.3
NH₂	67.7	50.3	58.9
C-N-C	32.3	49.7	41.1
O1s %	80.3	79.3	78.8
O-Si-O	93.0	92.6	94.3
O-Al-O	5.1	5.0	3.6
O=C	1.9	2.4	2.1

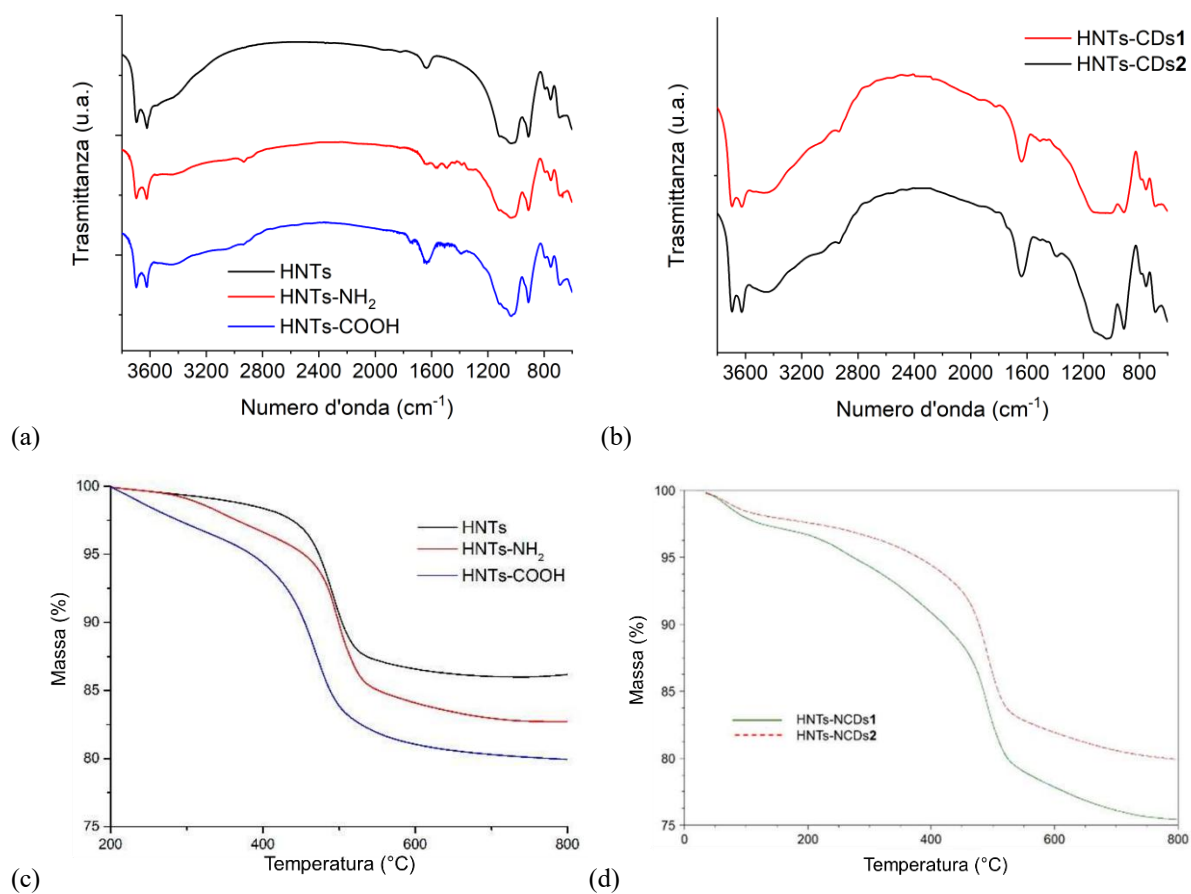
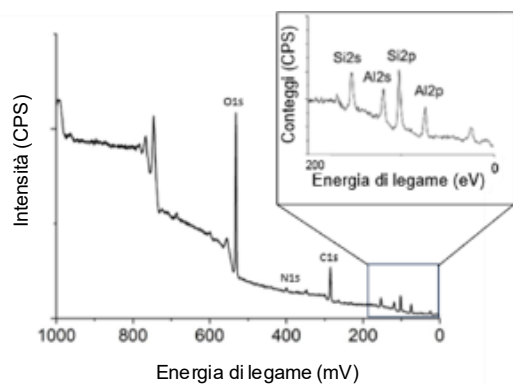
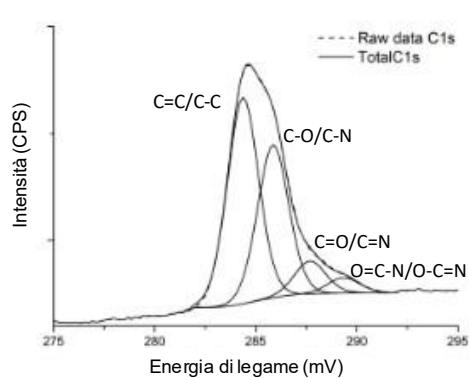


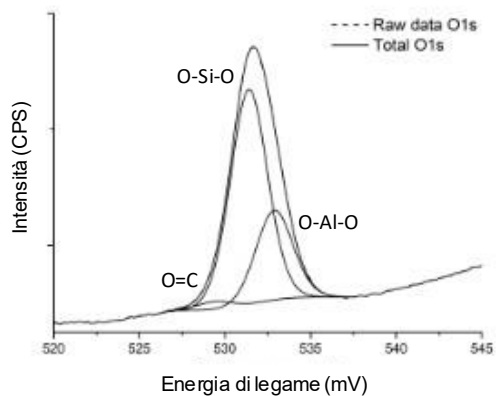
Figura A4. Spettri FT-IR e TGA (a,c) dei nanomateriali HNTs-NH₂ e HNTs-COOH; (b,d) dei nanomateriali HNTs-NCDS1 e HNTs-NCDS2.



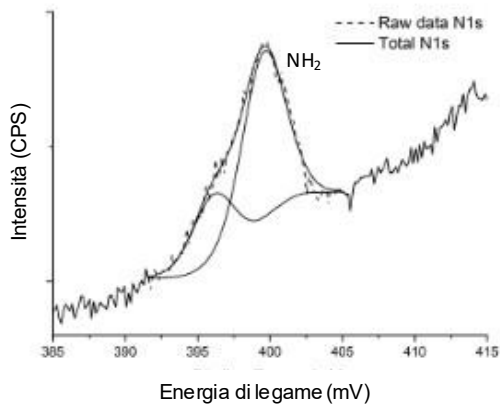
(a)



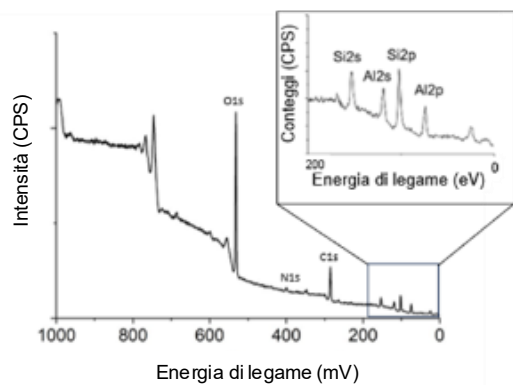
(b)



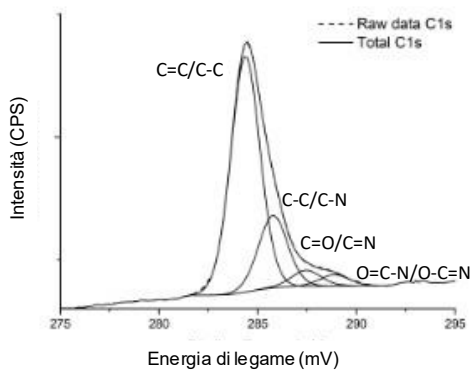
(c)



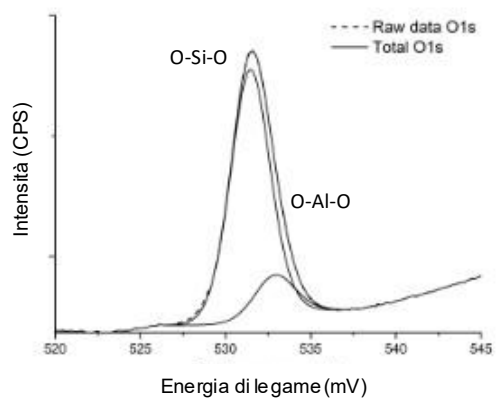
(d)



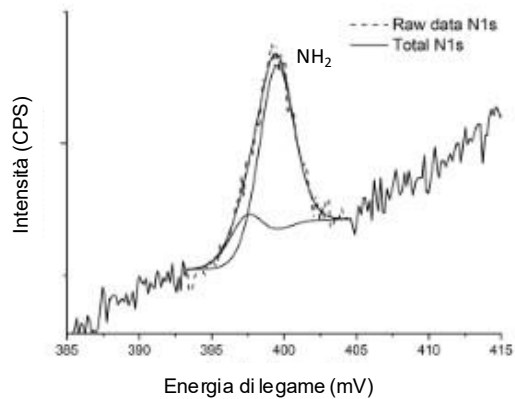
(e)



(f)



(g)



(h)

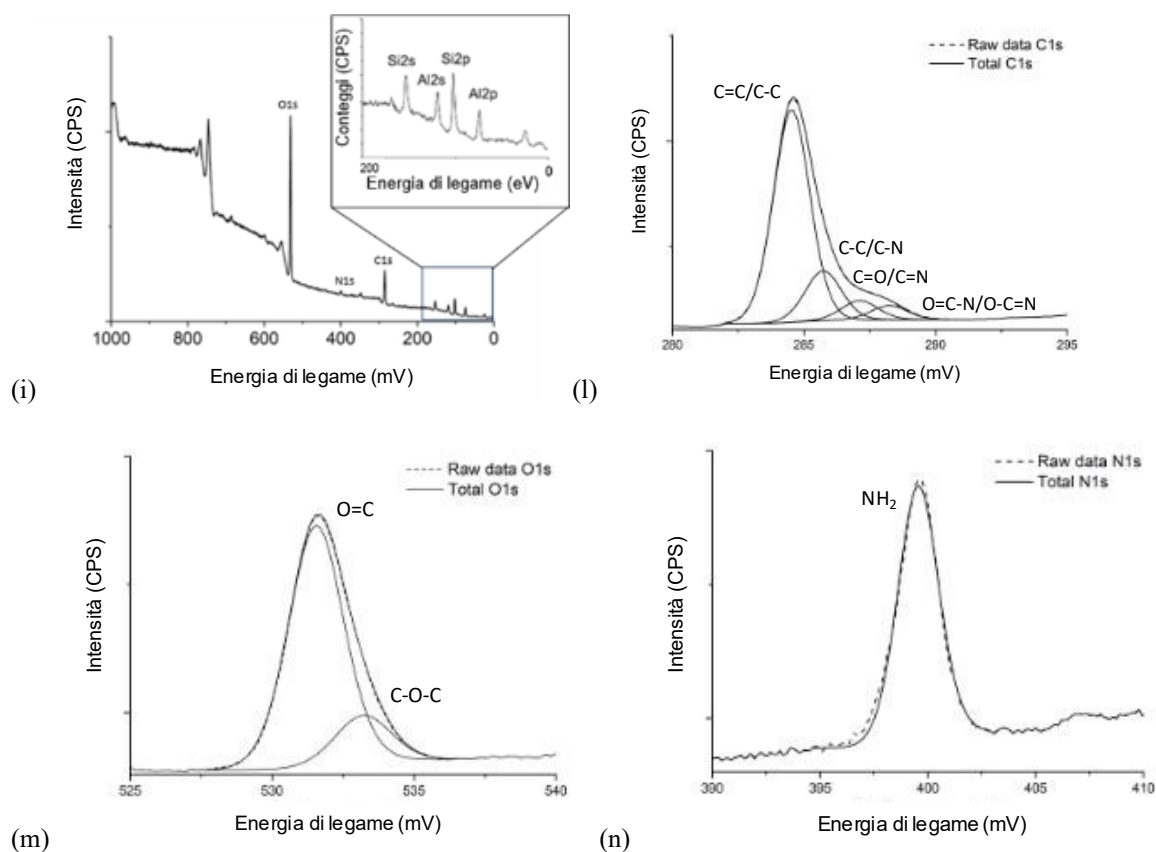


Figura A5. (a) *Survey XPS* di HNTs-NCs1; (b–d) spettri C 1s, O 1s e N 1s deconvoluti di HNTs-NCs1; (e) *survey XPS* di HNTs-NCs2; (f–h) spettri C 1s, O 1s e N 1s deconvoluti di HNTs-NCs2; (i) *survey XPS* N-doped CDs; (l–n) spettri C 1s, O 1s e N 1s deconvoluti degli NCDs.

Tabella A2. Percentuale di atomi di O, C, N e S determinata mediante analisi XPS.

	N-doped CDs	HNTs-NCDs1	HNTs-NCDs2
Si%		1.1	1.4
Al%		13.3	12.3
C1s %	79.0	56.7	65.3
C=C/C-C	71.8	50.6	72.3
C-O/C-N	16.8	37.5	21.4
C=O/C=N	6.5	8.1	3.9
O=C-N/O-C=N	4.9	3.8	2.4
N1s %	4.4	3.6	1.8
NH2	100	70.7	78.7
O1s %	16.6	39.7	32.9
O-Si-O	-	68.8	86.8
O-Al-O	-	28.6	13.2
O=C	84.0	2.6	-
C-O-C	16.0	-	-

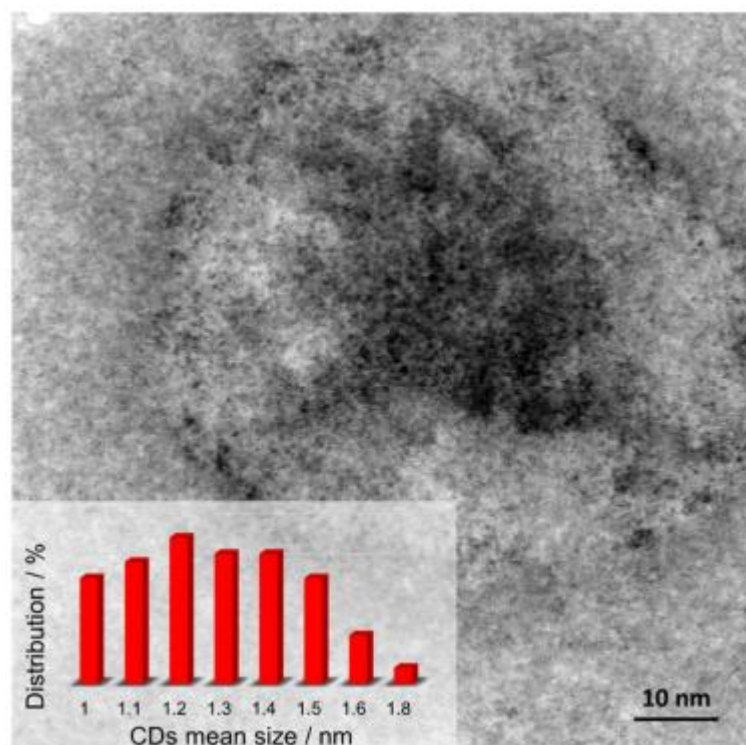


Figura A6. Immagine TEM degli NCDs non modificati e distribuzione statistica delle dimensioni medie ($n = 61$).

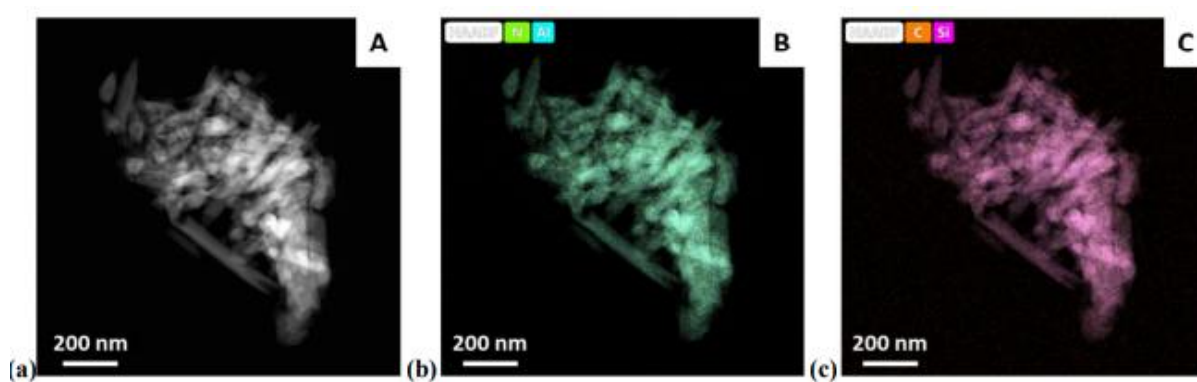


Figura A7. (a) Immagine HAADF/STEM di HNTs-NCDs2; (b,c) mappatura elementare estrapolata dall'analisi EDX.

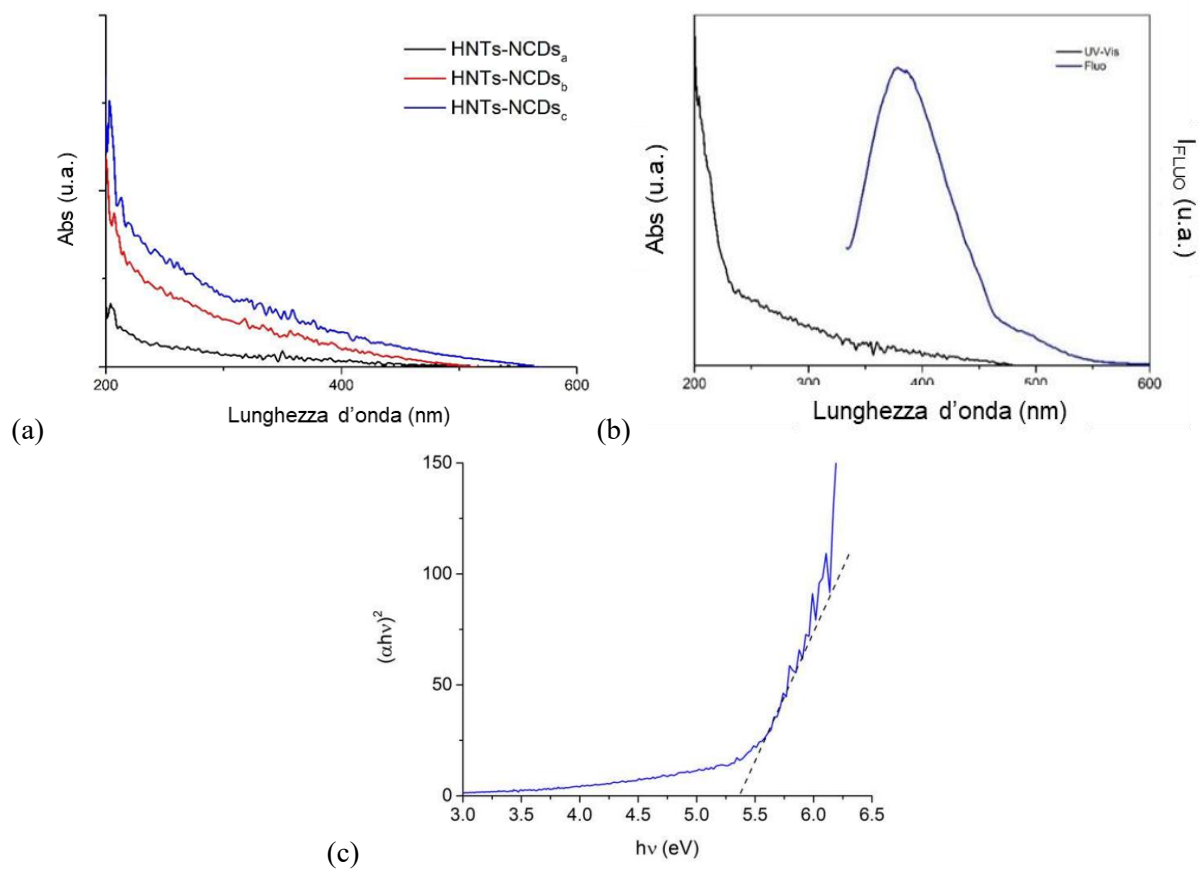


Figura A8. (a) Spettri di assorbimento di HNTs-NCDs_{a-c}; (b) spettri di assorbimento ed emissione di HNTs-NCDs₂; (c) *Tauc Plot* di HNTs-NCDs₂.

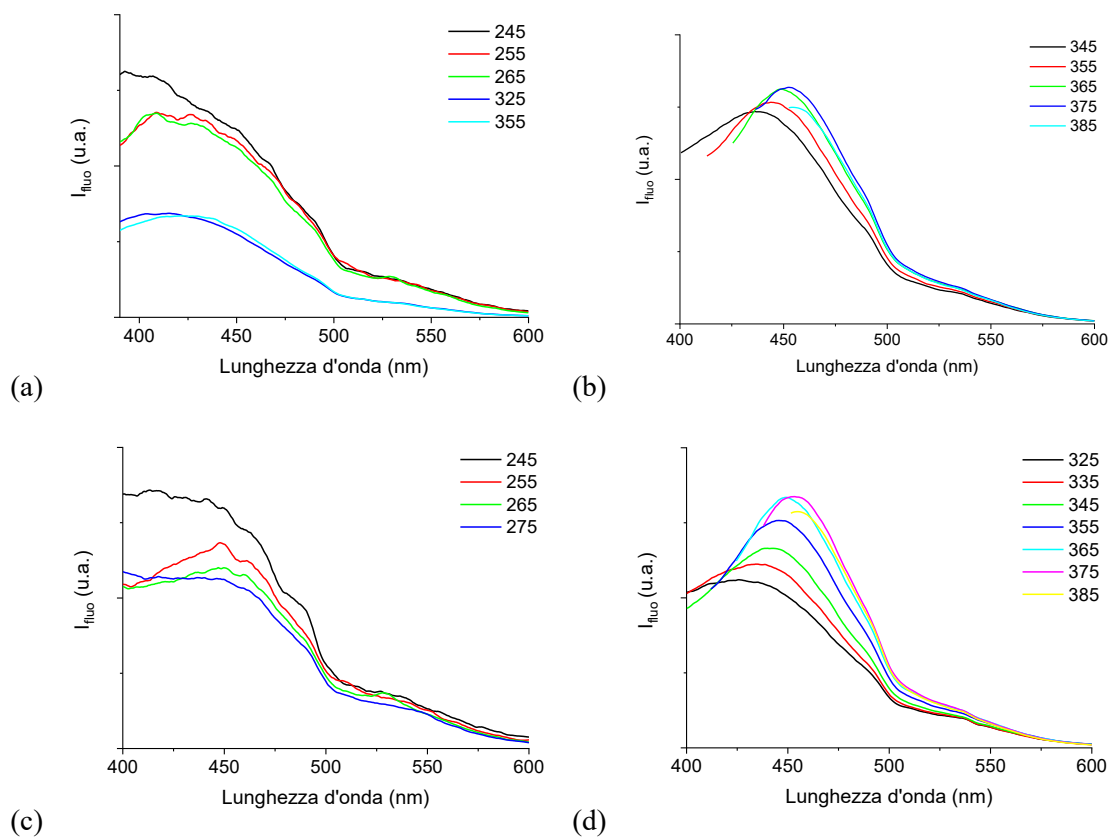


Figura A9. Spettri di fluorescenza in soluzione di HNTs-NCDS_b (a,b) e HNTs-NCDS_c (c,d) a diverse lunghezze d'onda di eccitazione.

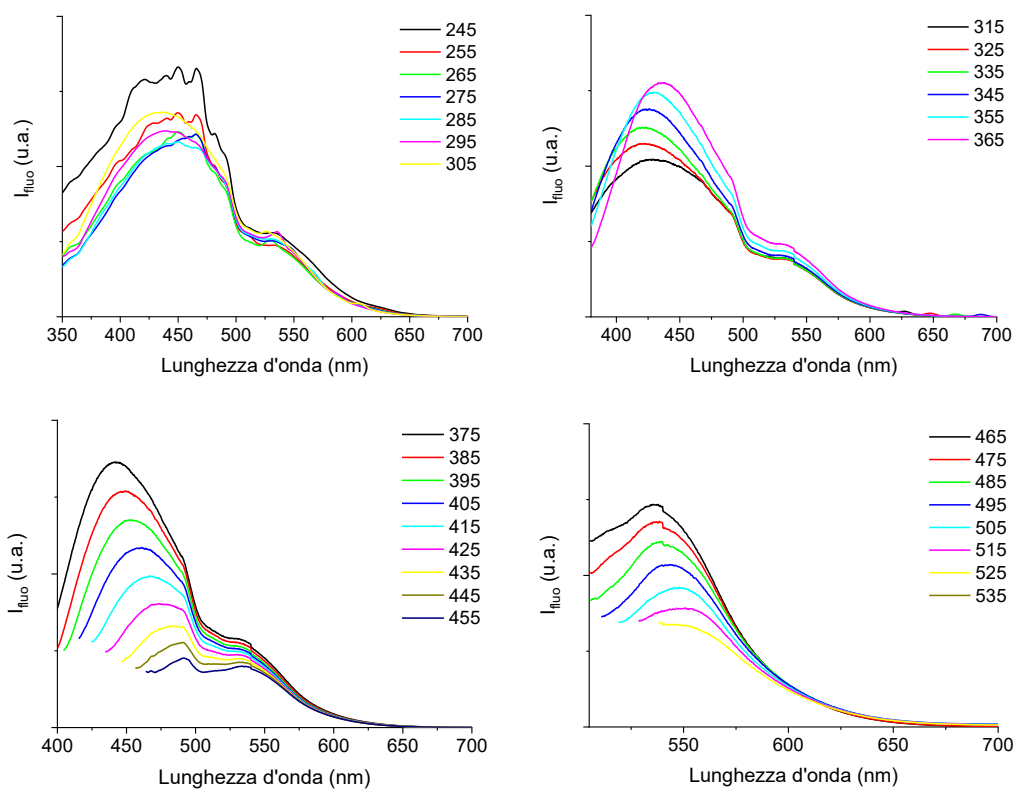


Figura A10. Spettri di fluorescenza stato solido di HNTs-NCDs_b a diverse lunghezze d'onda di eccitazione.

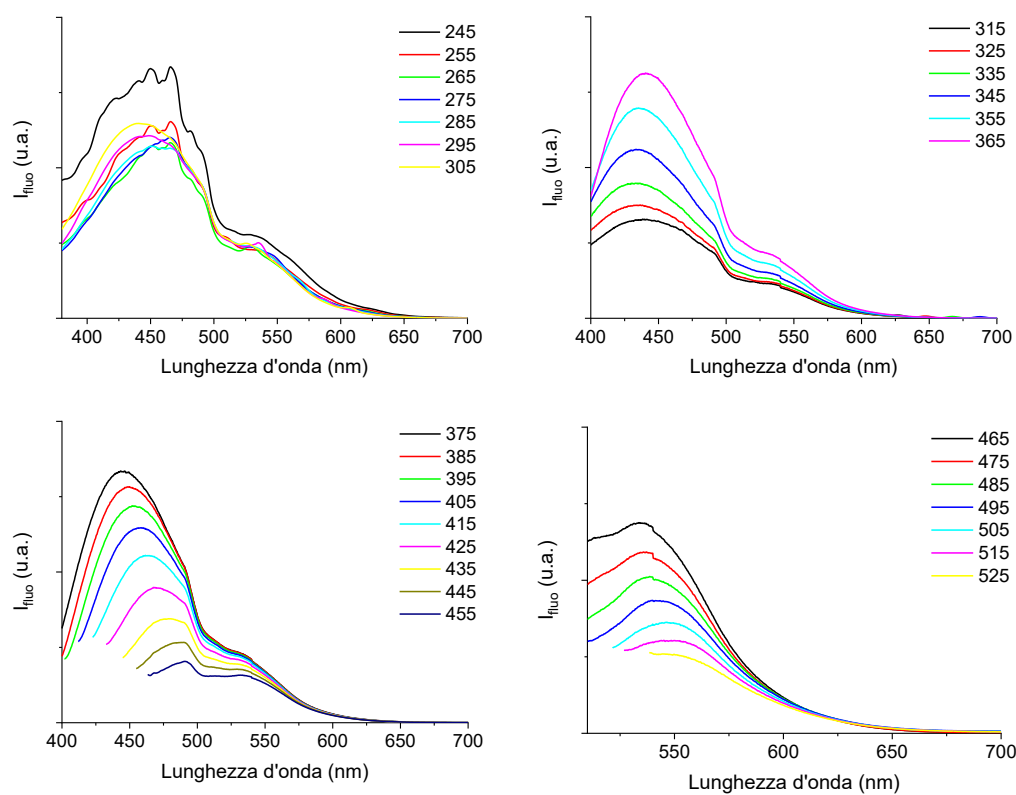


Figura A11. Spettri di fluorescenza stato solido di HNTs-NCDs_c a diverse lunghezze d'onda di eccitazione.

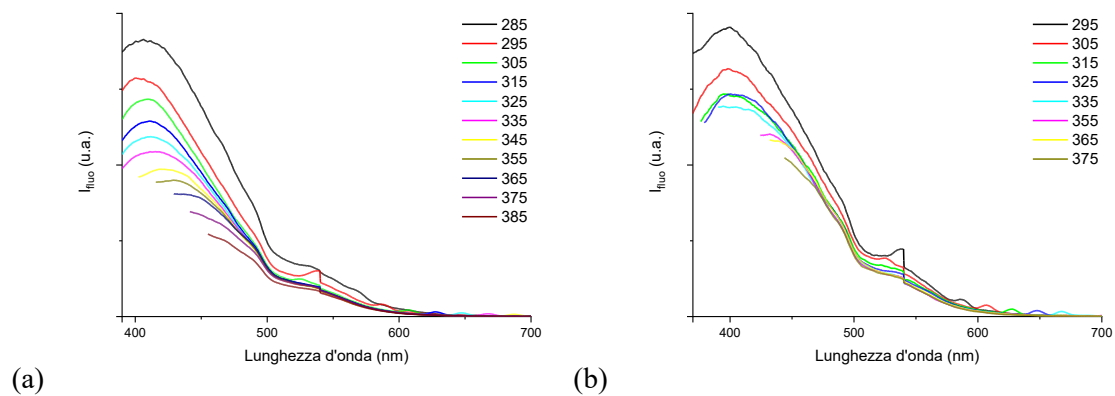


Figura A12. Spettri di fluorescenza in soluzione di (a) HNTs-NCDs1 e (b) HNTs-NCDs2.

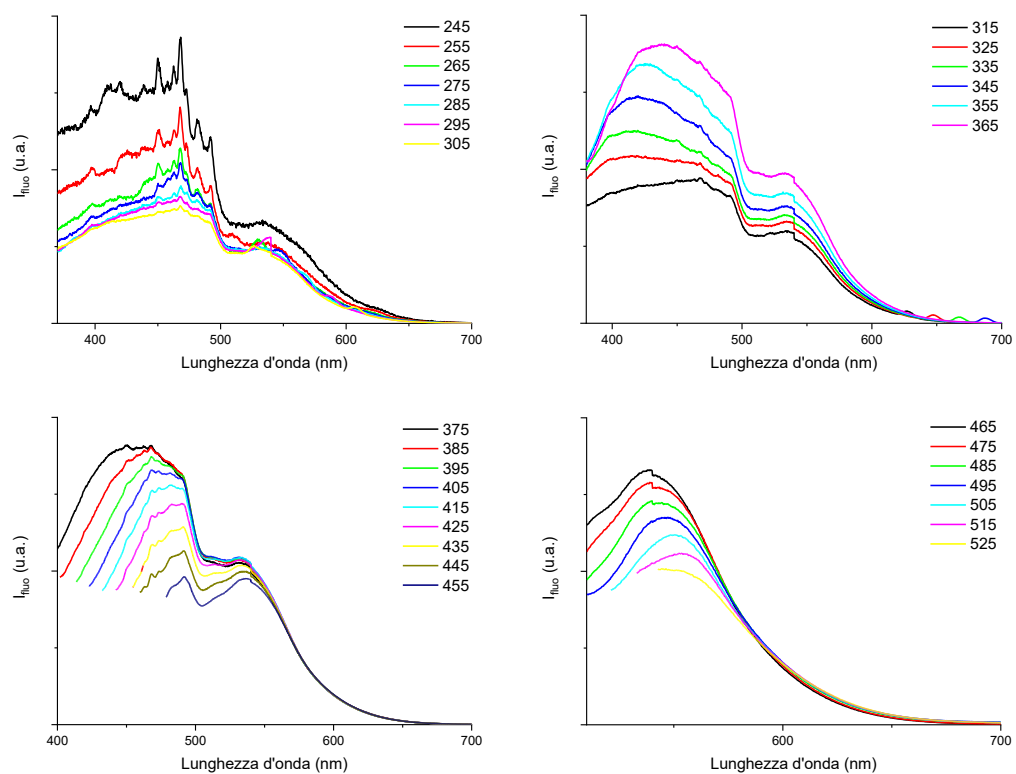


Figura A13. Spettri di fluorescenza stato solido di HNTs-NCDs1 a diverse lunghezze d'onda di eccitazione.

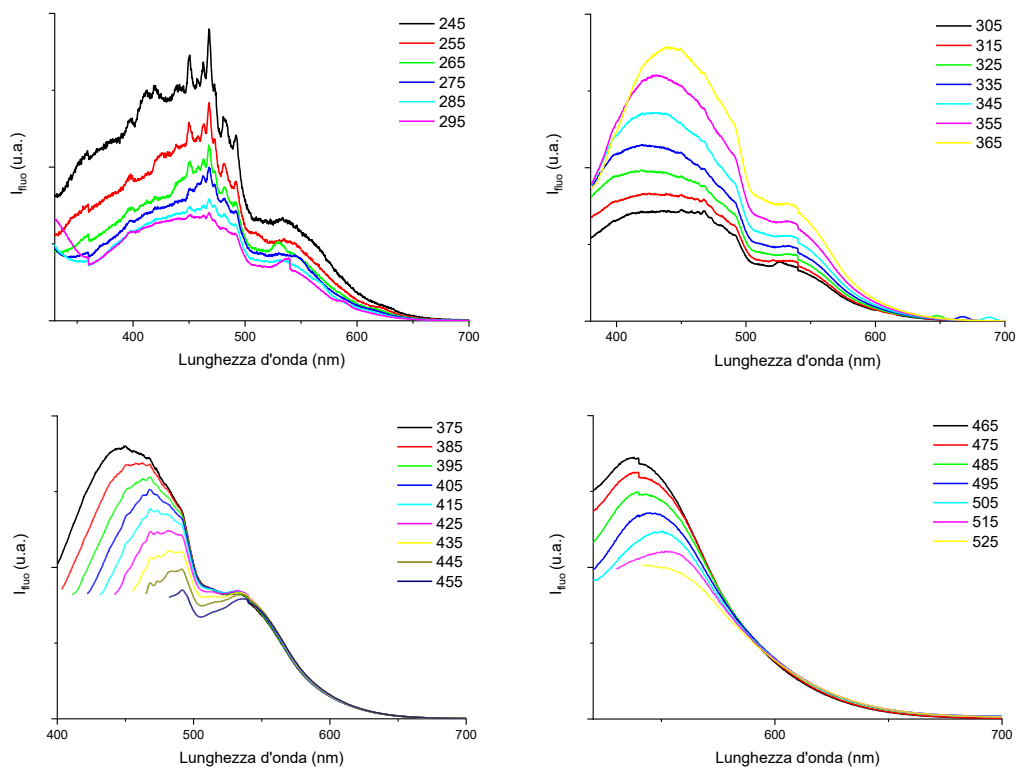


Figura A14. Spettri di fluorescenza stato solido di HNTs-NCDs2 a diverse lunghezze d'onda di eccitazione.

Appendice B

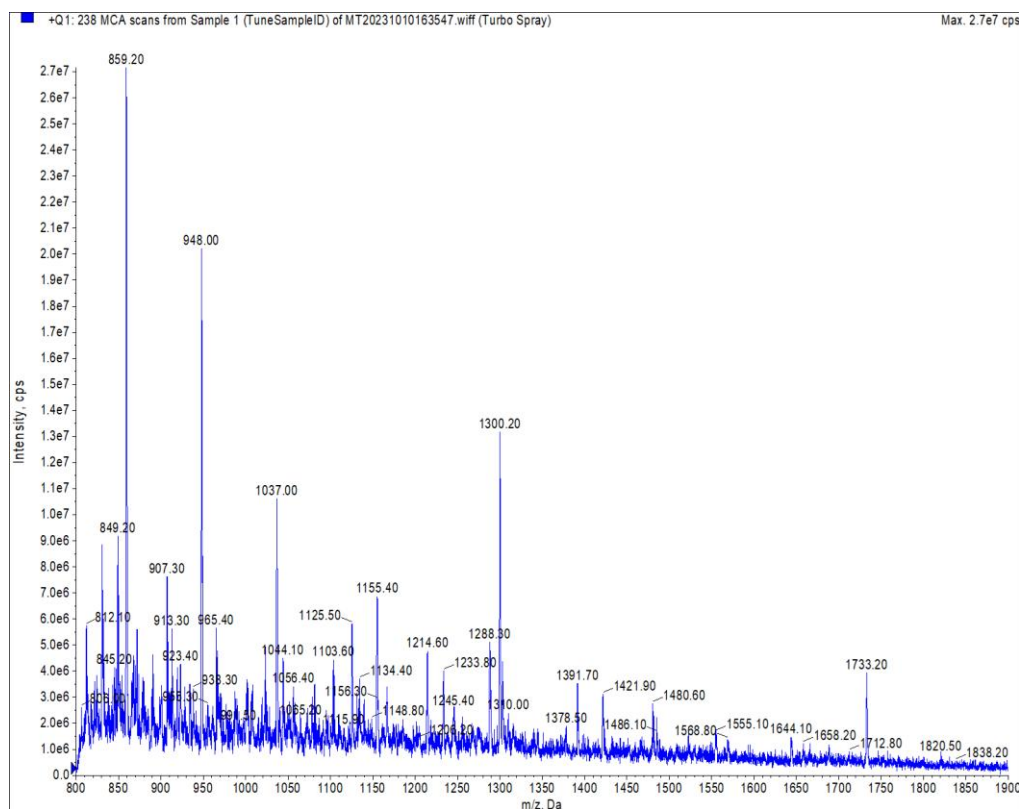


Figura B1. Spettro ESI-MS del PNA registrato in modalità a ioni positivi. Valore calcolato per $[M + 3H]^{3+}$: 1731.4; valore calcolato per $[M + 4H]^{4+}$: 1298.8.

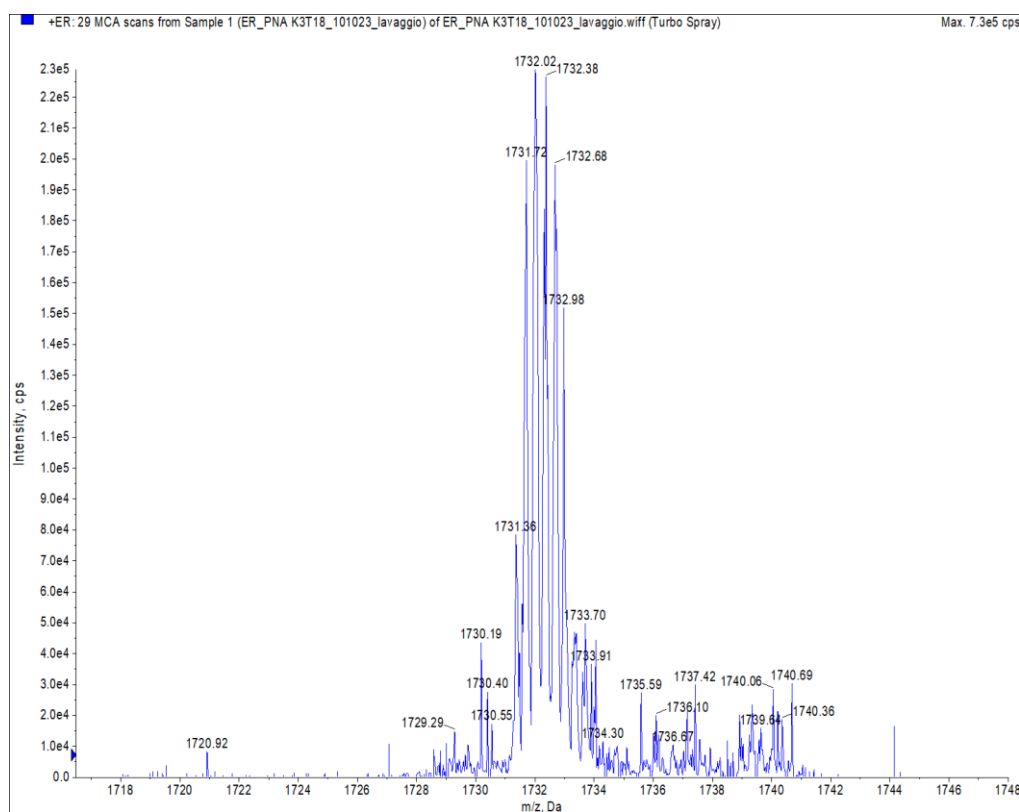


Figura B2. Espansione dello spettro ESI-MS del PNA registrato in modalità a ioni positivi. Valore calcolato per $[M + 3H]^{3+}$: 1731.4; valore sperimentale: 1731.4.

Bibliografia:

1. Hemdan, M., *et al.*, In *Sensors*, (2024), Vol. 24
2. Kim, E. R., *et al.*, *Trends in Biotechnology* (2023) **41** (3), 374
3. Kaur, B., *et al.*, *Biosensors and Bioelectronics* (2022) **197**, 113805
4. Wang, C., *et al.*, *Nano today* (2021) **37**, 101092
5. Mobed, A., *et al.*, *Clinica chimica acta* (2021) **518**, 51
6. Ameri, M., *et al.*, *International journal of biological macromolecules* (2020) **162**, 1100
7. Nammi, D., and Neelapu, N. R. R., *Biomarkers and Early Detection of Gastrointestinal Cancers*, Veera Bramhachari, P., and Neelapu, N. R. R., (eds.) Springer Singapore, Singapore, (2020), pp 133
8. Ribeiro, B. V., *et al.*, *Talanta Open* (2020) **2**, 100007
9. Pirzada, M., and Altintas, Z., *Sensors* (2019) **19** (23), 5311
10. Mahmoud, A. E. D., and Fawzy, M., *Waste recycling technologies for nanomaterials manufacturing*, Springer(2021), pp 229
11. Luo, X., *et al.*, *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis* (2006) **18** (4), 319
12. Nair, P. R., and Alam, M. A., *IEEE Transactions on Electron Devices* (2007) **54** (12), 3400
13. Patolsky, F., *et al.*, Nanowire-based biosensors. ACS Publications(2006)
14. Vu, Q. K., *et al.*, *Materials Today Communications* (2021) **26**, 101726
15. Singh, P., and Yadava, R., Nanosensors for health care. In *Nanosensors for Smart Cities*, Elsevier(2020), pp 433
16. Mehrotra, P., *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* (2016) **6** (2), 153
17. Aydin, M., *et al.*, *Advances in clinical chemistry* (2021) **102**, 1
18. Rashid, J. I. A., and Yusof, N. A., *Sensing and bio-sensing research* (2017) **16**, 19
19. Motwani, M., *et al.*, *Nature Reviews Genetics* (2019) **20** (11), 657
20. Yarman, A., *et al.*, *Electroanalytical Applications of Quantum Dot-Based Biosensors*, Uslu, B., (ed.) Elsevier(2021), pp 121
21. García, I., *et al.*, *Sensors* (2015) **15** (7), 15494
22. Leal-Junior, A., *et al.*, *Sensors & Diagnostics* (2024) **3** (7), 1135
23. Naresh, V., and Lee, N., *Sensors*, (2021), Vol. 21
24. Chen, C., and Wang, J., *Analyst* (2020) **145** (5), 1605
25. de Silva, A. P., *et al.*, *Chemical Reviews* (1997) **97** (5), 1515
26. Wang, X., *et al.*, *Chemical Reviews* (2024) **124** (11), 7106
27. Woidasky, J., *et al.*, *Resources, Conservation and Recycling* (2020) **161**, 104976
28. Bradberry, S. J., *et al.*, (2023)
29. Nawrot, W., *et al.*, *Sensors* (2018) **18** (8), 2357
30. Yan, F., *et al.*, *Microchimica Acta* (2019) **186** (8), 583
31. Zheng, X. T., *et al.*, *small* (2015) **11** (14), 1620
32. Jiang, G., *et al.*, *Angewandte Chemie International Edition* (2024) **63** (11), e202315217
33. Kowada, T., *et al.*, *Chemical Society Reviews* (2015) **44** (14), 4953
34. Dong, H.-Q., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry C* (2020) **8** (39), 13501
35. Jiang, G., *et al.*, *Angewandte Chemie* (2024) **136** (11), e202315217
36. Demchenko, A. P., *Analytical biochemistry* (2005) **343** (1), 1
37. Berezin, M. Y., and Achilefu, S., *Chemical Reviews* (2010) **110** (5), 2641
38. Han, J., and Burgess, K., *Chemical Reviews* (2010) **110** (5), 2709
39. Haidekker, M. A., *et al.*, *Bioorganic Chemistry* (2005) **33** (6), 415
40. Chandra, A., *et al.*, *Frontiers of Nanoscience*, Parak, W. J., and Feliu, N., (eds.) Elsevier(2020), Vol. 16, pp 117
41. The Huy, B., *et al.*, *Microchemical Journal* (2022) **179**, 107511
42. Farhi, A., *et al.*, *Photochemical & Photobiological Sciences* (2019) **18** (12), 3008
43. Zheng, X., *et al.*, (2020) **39** (1), 231
44. Carter, K. P., *et al.*, *Chemical Reviews* (2014) **114** (8), 4564
45. Bakker, E., *et al.*, *Analytical Chemistry* (2000) **72** (6), 1127
46. Rocha, D. L., *et al.*, *Chemosensors*, (2021), Vol. 9
47. Shi, Y., *et al.*, *Chemosensors*, (2023), Vol. 11
48. Batool, M., *et al.*, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* (2022) **52** (4), 756
49. Yoo, D., *et al.*, *Nanoscale Research Letters* (2019) **14** (1), 272
50. Lasitha, P., *Photochemical & Photobiological Sciences* (2020) **19** (11), 1603
51. Bencini, A., and Lippolis, V., *Coordination Chemistry Reviews* (2010) **254** (17), 2096
52. Sammes, P. G., and Yahioğlu, G., *Chemical Society Reviews* (1994) **23** (5), 327
53. Nycz, J. E., *et al.*, *Molecules*, (2024), Vol. 29
54. Mujthaba Aatif, A., and Ashok Kumar, S. K., *Polyhedron* (2023) **232**, 116276
55. Kaur, N., and Alreja, P., *Tetrahedron Letters* (2015) **56** (1), 182

56. Zulfajri, M., *et al.*, *Chemosensors*, (2021), Vol. 9
57. Fernandes, S., *et al.*, *Sensors*, (2023), Vol. 23
58. Gorai, S., *et al.*, *Dyes and Pigments* (2022) **203**, 110343
59. Nycz, J. E., *et al.*, *Molecules*, (2025), Vol. 30
60. Sikora, J., and Ouagazzal, A.-M., *International Journal of Molecular Sciences*, (2021), Vol. 22
61. Kondrakhina, I. N., *et al.*, *Diagnostics*, (2020), Vol. 10
62. Zhong, R., *et al.*, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (2016) **161**, 27
63. Notarbartolo, M., *et al.*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2022) **220**, 112931
64. Massaro, M., *et al.*, *Nanomaterials*, (2024), Vol. 14
65. Li, Y., *et al.*, *Analytica chimica acta* (2019) **1049**, 196
66. Massaro, M., *et al.*, *Applied Clay Science* (2024) **250**, 107271
67. Dong, W.-K., *et al.*, *Sensors and Actuators B: Chemical* (2017) **238**, 723
68. Đorđević, L., *et al.*, *Nature Nanotechnology* (2022) **17** (2), 112
69. Emam, A., *et al.*, *RSC advances* (2017) **7** (38), 23502
70. Li, J., and Gong, X., *Small* (2022) **18** (51), 2205099
71. Arcudi, F., *et al.*, *Accounts of chemical research* (2019) **52** (8), 2070
72. Xu, X., *et al.*, *Journal of the American Chemical Society* (2004) **126** (40), 12736
73. Xia, C., *et al.*, *Advanced Science* (2019) **6** (23), 1901316
74. He, C., *et al.*, *Carbon* (2022) **186**, 91
75. Zhu, S., *et al.*, *Nano research* (2015) **8** (2), 355
76. Shi, X., *et al.*, *Small* (2019) **15** (48), 1901507
77. Arcudi, F., *et al.*, *Angewandte Chemie International Edition* (2016) **55** (6), 2107
78. Liu, Y., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry A* (2015) **3** (34), 17747
79. Sadeghi-Chahnasir, F., *et al.*, *Analytica chimica acta* (2024) **1287**, 342066
80. Hu, J., *et al.*, *Analytica Chimica Acta* (2022) **1209**, 338885
81. Zu, F., *et al.*, *Microchimica Acta* (2017) **184** (7), 1899
82. Shah, H., *et al.*, *Arabian Journal of Chemistry* (2019) **12** (7), 1083
83. Liu, M. L., *et al.*, *Green chemistry* (2019) **21** (3), 449
84. Sun, X., and Lei, Y., *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2017) **89**, 163
85. Shander, A., *et al.*, *Vox sanguinis* (2009) **97** (3), 185
86. Guo, Q., *et al.*, *Frontiers in oncology* (2021) **11**, 778492
87. Mochizuki, H., *et al.*, *Journal of Neural Transmission* (2020) **127** (2), 181
88. Tran, D., *et al.*, *Frontiers in Human Neuroscience* (2022) **16**, 838692
89. Singh, J., *et al.*, *Science of the Total Environment* (2020) **720**, 137604
90. Xu, Q., *et al.*, *Journal of Materials Science* (2015) **50** (6), 2571
91. Song, L., *et al.*, *RSC Advances* (2016) **6** (21), 17704
92. Tan, C., *et al.*, *RSC Advances* (2017) **7** (65), 40952
93. Pu, J., *et al.*, *Analyst* (2021) **146** (3), 1032
94. Zhang, X.-Y., *et al.*, *Journal of Colloid and Interface Science* (2022) **611**, 255
95. Yan, R., *et al.*, *Analyst* (2021) **146** (21), 6450
96. Bartolomei, B., *et al.*, *Angewandte Chemie International Edition* (2022) **61** (20), e202200038
97. Bartolomei, B., and Prato, M., *Small* (2023) **19** (31), 2206714
98. Xiong, Y., *et al.*, *Nano Today* (2018) **23**, 124
99. Essner, J. B., *et al.*, *Chemistry of Materials* (2018) **30** (6), 1878
100. Massaro, M., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry C* (2018) **6** (27), 7377
101. Massaro, M., *et al.*, *Journal of Colloid and Interface Science* (2019) **552**, 236
102. Ramanan, V., *et al.*, *New Journal of Chemistry* (2018) **42** (11), 8933
103. Zhong, S., *et al.*, *Journal of Hazardous Materials* (2014) **276**, 58
104. Guo, J., *et al.*, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* (2016) **11** (6), 735
105. Massaro, M., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry C* (2018) **6** (27), 7377
106. Sawalha, S., *et al.*, *ACS Applied Bio Materials* (2022) **5** (10), 4860
107. Yan, Y., *et al.*, *Advanced materials* (2019) **31** (21), 1808283
108. Ding, H., *et al.*, *Journal of Applied Physics* (2020) **127** (23)
109. Russo, M., *et al.*, *RSC Advances* (2016) **6** (55), 49941
110. Campisciano, V., *et al.*, *Nanoscale Advances* (2020) **2** (9), 4199
111. Filippini, G., *et al.*, *Chem* (2020) **6** (11), 3022
112. Ullal, N., *et al.*, *Chemical papers* (2022) **76** (10), 6097
113. Guha, S., *et al.*, *Journal of the American Chemical Society* (2012) **134** (33), 13679
114. Al Kobaisi, M., *et al.*, *Chemical reviews* (2016) **116** (19), 11685
115. Huang, C., *et al.*, *The Journal of organic chemistry* (2011) **76** (8), 2386
116. Bhosale, S. V., *et al.*, *Organic Letters* (2009) **11** (23), 5418
117. Roy, K., *et al.*, *Langmuir* (2023) **39** (44), 15690
118. Bhosale, S. V., *et al.*, *Chemical Society Reviews* (2021) **50** (17), 9845

119. Suraru, S. L., and Würthner, F., *Angewandte Chemie International Edition* (2014) **53** (29), 7428
120. Bhosale, S. V., *et al.*, *Chemical Society Reviews* (2008) **37** (2), 331
121. Pervin, R., *et al.*, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2023) **436**, 114364
122. Maniam, S., *et al.*, *Chemistry–A European Journal* (2019) **25** (29), 7044
123. Kuila, S., *et al.*, *Chemistry–A European Journal* (2019) **25** (70), 16007
124. Zong, L., *et al.*, *Sensors and Actuators B: Chemical* (2018) **257**, 882
125. Zong, L., *et al.*, *Sensors and Actuators B: Chemical* (2017) **252**, 1105
126. Zong, L., *et al.*, *Sensors and Actuators B: Chemical* (2016) **226**, 239
127. Buckland, D., *et al.*, *Tetrahedron letters* (2011) **52** (16), 1990
128. Guha, S., and Saha, S., *Journal of the American Chemical Society* (2010) **132** (50), 17674
129. Jana, P., *et al.*, *CrystEngComm* (2013) **15** (13), 2512
130. Scott Lokey, R., and Iverson, B. L., *Nature* (1995) **375** (6529), 303
131. Ghule, N. V., *et al.*, *Sensors and Actuators B: Chemical* (2016) **227**, 17
132. Lu, X., *et al.*, *Chemistry–A European Journal* (2010) **16** (28), 8355
133. Doria, F., *et al.*, *The Journal of Organic Chemistry* (2013) **78** (16), 8065
134. Cardano, F., *et al.*, *ACS Applied Nano Materials* (2025) **8** (24), 12775
135. Massaro, M., *et al.*, *Applied Clay Science* (2020) **184**, 105400
136. Seydou, M., *et al.*, *Rsc Advances* (2014) **4** (49), 25698
137. Keshri, S. K., *et al.*, *Chemistry–A European Journal* (2021) **27** (23), 6954
138. Ke, H., *et al.*, *Dyes and Pigments* (2015) **113**, 318
139. Massaro, M., *et al.*, *Applied Clay Science* (2021) **215**, 106310
140. Basak, S., *et al.*, *ACS omega* (2018) **3** (2), 2174
141. Nielsen, P. E., *et al.*, *Science* (1991) **254** (5037), 1497
142. Nielsen, P. E., *Molecular biotechnology* (2004) **26** (3), 233
143. Gasser, G., *et al.*, *Dalton transactions* (2012) **41** (8), 2304
144. Zhang, N., and Apella, D. H., *Journal of Infectious Diseases* (2010) **201** (Supplement_1), S42
145. Yuan, G., *et al.*, *Mass Spectrometry Reviews* (2011) **30** (6), 1121
146. Gambari, R., *Expert Opinion on Therapeutic Patents* (2014) **24** (3), 267
147. Wang, J., *Biosensors and Bioelectronics* (1998) **13** (7-8), 757
148. Xiang, Z., *et al.*, *Angewandte Chemie* (2021) **133** (42), 22841
149. Ozkan, D., *et al.*, *Bioelectrochemistry* (2002) **58** (1), 119
150. Raoof, J. B., *et al.*, *Sensors and Actuators B: Chemical* (2011) **157** (1), 195
151. Falanga, A. P., *et al.*, *Synthesis, characterization and delivery of peptide nucleic acids targeting Bcl-2 gene promoter: a potential tool for cancer treatment*, (2022)
152. Falanga, A. P., *et al.*, *Heliyon* (2024) **10** (3)
153. Saarbach, J., *et al.*, *Current Opinion in Chemical Biology* (2019) **52**, 112
154. Shakeel, S., *et al.*, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology* (2006) **81** (6), 892
155. Riela, S., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* (2023) **11** (28), 6685
156. Falanga, A. P., *et al.*, *Journal of Colloid and Interface Science* (2024) **663**, 9
157. Neri, M., *et al.*, *ACS Biomaterials Science & Engineering* (2021) **8** (10), 4123

Capitolo 4

***I sistemi nanostrutturati come filler di compositi
biopolimerici***

Capitolo 4

I sistemi nanostrutturati come filler di compositi biopolimerici

4.1. Classificazione e applicazioni dei biopolimeri nella scienza dei nanomateriali

I nanocompositi a base di biopolimeri, negli ultimi anni, hanno suscitato un grande interesse per via delle diverse applicazioni che questi trovano in nanomedicina.¹ Questi nanocompositi combinano biopolimeri con nanomateriali, dando origine a bionanocompositi con proprietà meccaniche, termiche e biologiche migliori rispetto al solo biopolimero.² Inoltre, la presenza di una superficie specifica elevata nei nanocompositi favorisce l'instaurarsi di interazioni intermolecolari e interfacciali peculiari tra le diverse componenti, conferendo al materiale proprietà funzionali uniche.³ Grazie a queste caratteristiche, i nanocompositi a base di biopolimeri trovano ampio impiego in numerosi ambiti della nanomedicina, tra cui l'ingegneria tissutale,⁴ il rilascio mirato di farmaci,⁵ la realizzazione di *scaffold* biocompatibili per la crescita cellulare,⁶ la guarigione delle ferite e la medicina rigenerativa.^{7,8} Un ulteriore vantaggio risiede nella loro biodegradazione controllata, che non comporta la formazione di sottoprodotti citotossici, rendendoli particolarmente adatti anche alla formulazione di farmaci e profarmaci antitumorali.⁹ Tipicamente i biopolimeri sono polimeri costituiti da unità molecolari singole unite covalentemente per formare molecole simili a lunghe catene. In quanto materiali biodegradabili, abbondanti e rinnovabili, i biopolimeri sono stati considerati un'alternativa alla plastica derivata dal petrolio.^{10,11} Inoltre, contengono una grande varietà di gruppi funzionali che regolano il modo in cui interagiscono con eventuali *filler*.¹² Attualmente, sono in corso numerose ricerche mirate all'utilizzo di biopolimeri di diversa origine, selezionati in base alle loro proprietà, per la produzione di bionanocompositi;¹³ la classificazione dei vari tipi di biopolimeri è riportata in **Figura 1**. Esistono due principali categorie di biopolimeri: naturali e sintetici. I primi possono essere ulteriormente suddivisi in: carboidrati, come la cellulosa, l'amido, l'arginato, il chitosano, la pectina e la gomma *guar*; a base proteica, come la gelatina, il glutine e il collagene.² Tra questi, tre polisaccaridi sono quelli più frequentemente utilizzati, ovvero, l'alginato, il chitosano e la cellulosa.¹⁴ Di contro, troviamo i biopolimeri sintetici, che sono tipicamente prodotti dalla fermentazione microbica (come il PHA e il PHB) oppure mediante la sintesi chimica a partire dalla biomassa (come il PLA) o da fonti petrolchimiche (come il PCA, il PLA, il PVA e il PGA).^{10,13}

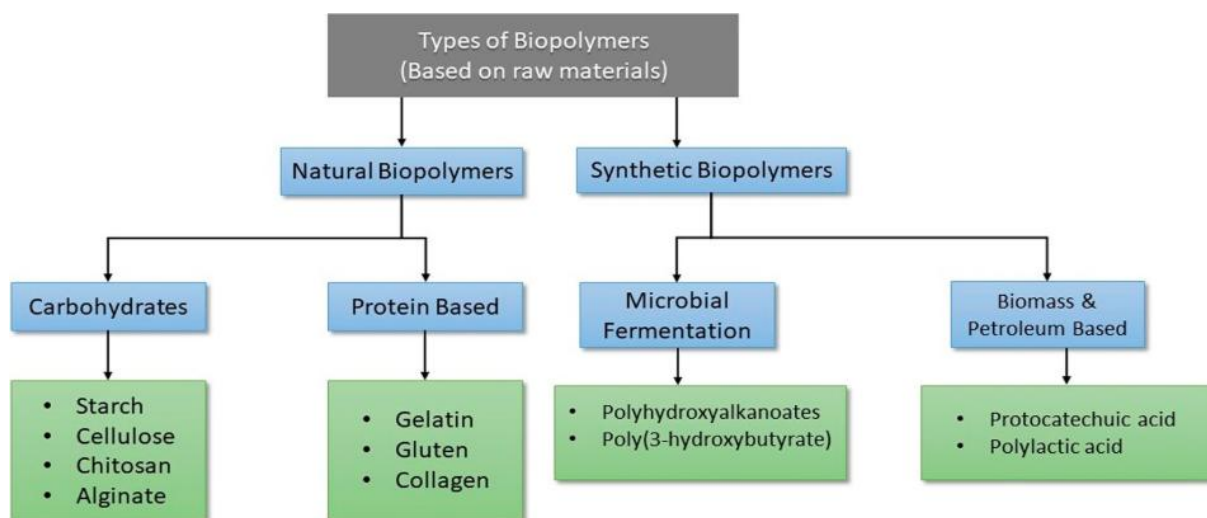


Figura 1. Classificazione dei biopolimeri (Othman *et al.*, 2014).¹⁰

4.1.1. Biopolimeri naturali

I biopolimeri naturali sono quelli che si trovano in natura sotto forma di proteine, amido, polisaccaridi, ecc. Grazie alla loro biodegradabilità, biocompatibilità, bassa immunogenicità e attività antibatterica, i biopolimeri derivati da proteine e polisaccaridi sono preferibili a quelli sintetici.⁵ Ad esempio, diversi biopolimeri naturali, tra cui collagene e chitosano, sono stati utilizzati per il ricoprimento di leghe di magnesio che tipicamente vengono utilizzate per applicazioni mediche.¹⁵ Quasi tutti i polisaccaridi contengono gruppi idrofilici, come gruppi ossidrilici, carbossilici e amminici, che possono interagire chimicamente con altre molecole generando quella che viene chiamata ‘bioadesione’. In particolare, questa interazione viene effettuata attraverso le cariche che questi gruppi possiedono nel mezzo in cui vengono solubilizzati.^{4,16} La **figura 2** mostra le strutture chimiche di alcuni dei biopolimeri naturali più comunemente utilizzati, due dei quali, l’alginato e il chitosano, verranno descritti nel dettaglio nei paragrafi a seguire.

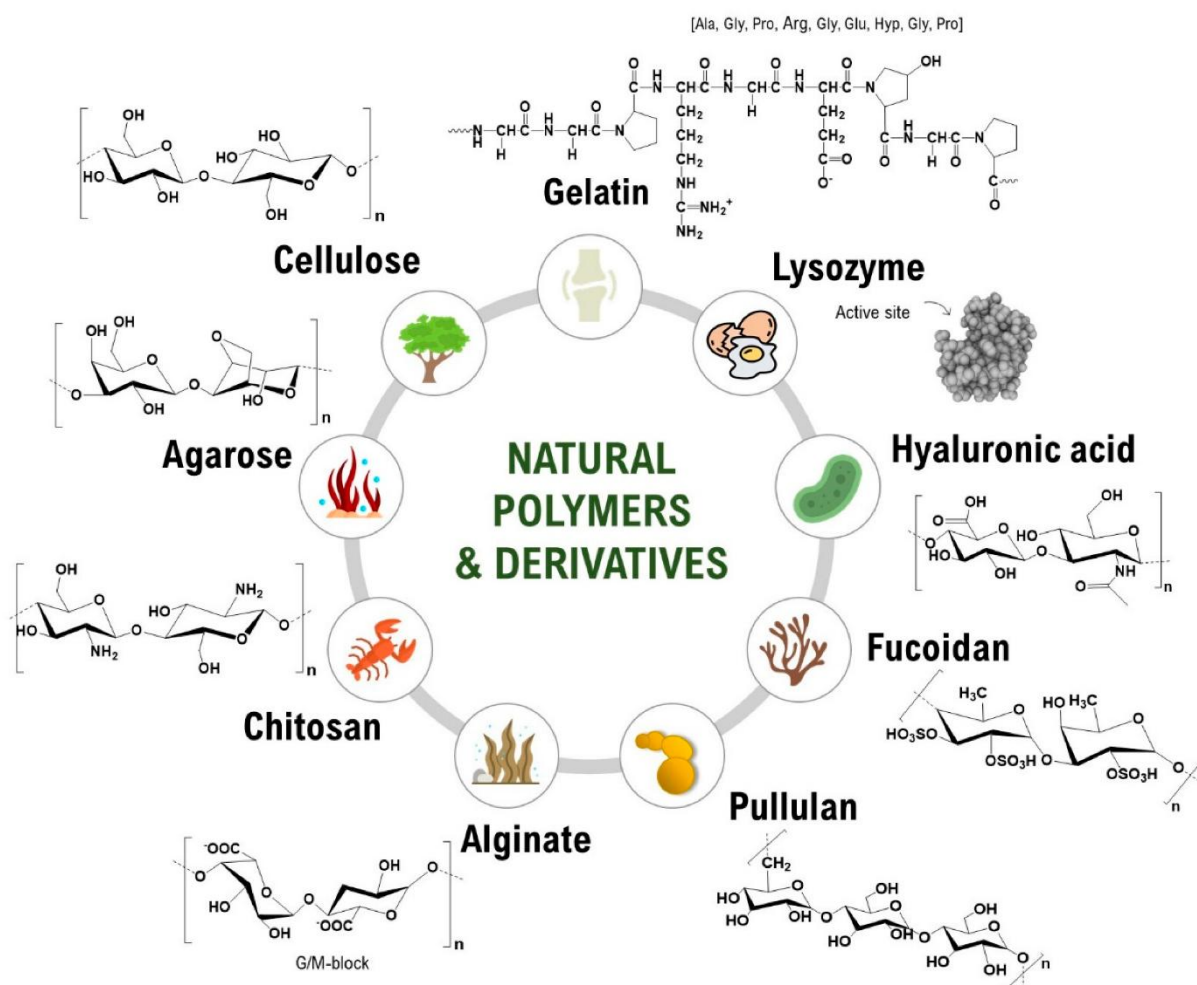


Figura 2. Esempi di polimeri naturali e dei loro derivati utilizzati per la progettazione di materiali dal gruppo di ricerca BioPol4fun.¹⁷

4.1.1.1. *L'alginato*

La principale fonte naturale dal quale si ottiene l'alginato (Alg), è rappresentata dalle alghe brune (*Phaeophyceae*). Questo polisaccaride, molto utilizzato in contesti biomedici,¹⁸ possiede una struttura costituita da unità di acido α -L-gulonico e acido β -D-mannuronico, che ne rappresentano le unità monomeriche fondamentali e conferiscono al materiale una natura di copolimero lineare anionico biocompatibile.¹⁹

Una delle caratteristiche più rilevanti dell'alginato è la sua capacità intrinseca di formare gel tridimensionali, proprietà che lo rende particolarmente adatto alla produzione di idrogel e film con diverse applicazioni tecnologiche (**Figura 3**).²⁰ Tutte queste peculiarità, lo rendono adatto per la terapia genica, per sistemi di rilascio controllato di farmaci, per la produzione di bendaggi e per la guarigione delle ferite.³ Ad esempio, composti a base di alginato in forma particellare hanno mostrato un elevato potenziale nel trattamento di patologie infiammatorie.²¹ Poiché

l'alginato non presenta un'attività antimicrobica intrinseca, esso viene spesso combinato con nanoparticelle, organiche o inorganiche, per la realizzazione di nanocompositi multifunzionali con proprietà antimicrobiche, ampliando così le possibilità d'uso.^{22,23}

4.1.1.2. Il chitosano

Il chitosano (CS) è un polisaccaride, ottenuto per deacetilazione basica della chitina, lineare formato da unità di N-acetil-D-glucosammina e (1-4)-D-glucosammina unite tra loro a formare una catena continua.²⁴ Il chitosano è un polisaccaride lineare, parzialmente cristallino e dotato di una carica positiva, la quale deriva dalla presenza dei gruppi amminici liberi che rimangono disponibili dopo la parziale rimozione dei gruppi acetilici della chitina.²⁵ Questa peculiarità strutturale conferisce al CS una notevole versatilità, vista l'elevata biocompatibilità e bassa tossicità che lo caratterizzano.²⁶

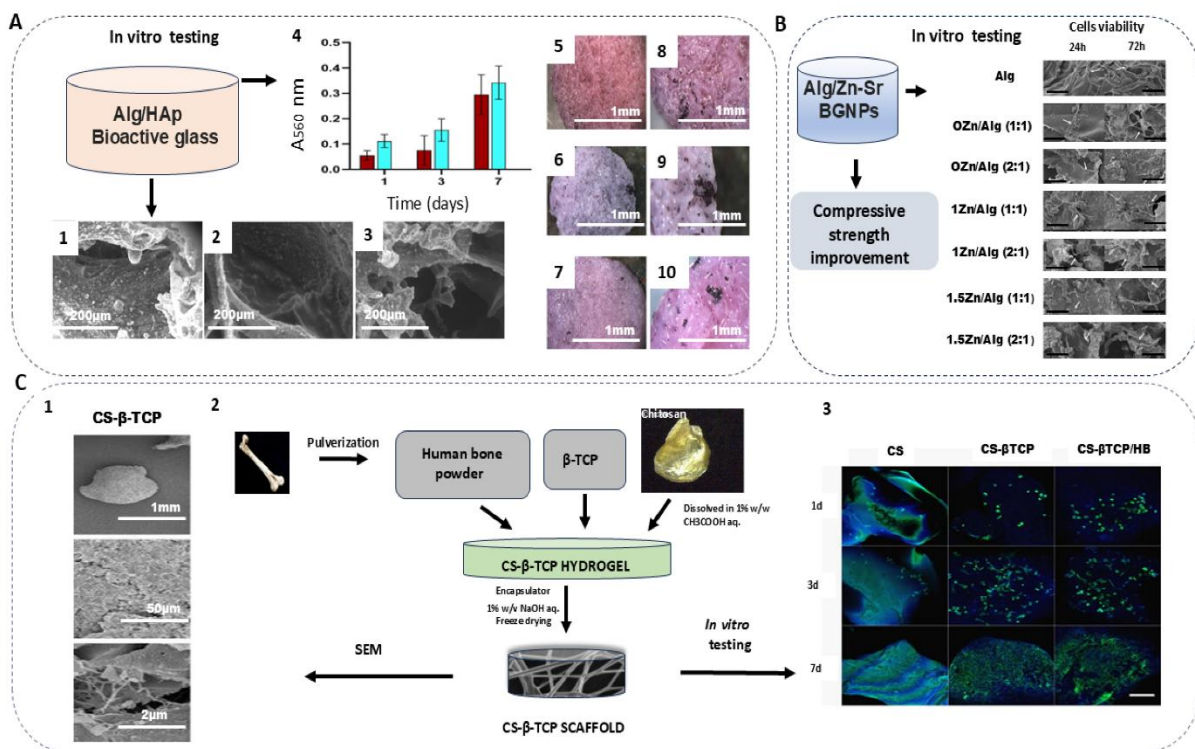


Figura 3. Risultati in vitro di nanocompositi a base di alginato e chitosano per la rigenerazione ossea. (A) Nanocomposito alginato/HAP/BGs e saggio MTT sulla vitalità delle cellule MG63, che evidenzia una maggiore colonizzazione cellulare su BG6-sc; (B) Miglioramento della resistenza a compressione e vitalità cellulare di un nanocomposito alginato/Zn-Sr-BGNPs; (C) Nanocomposito costituito da chitosano, β-TCP e polvere ossea umana: immagini TEM, schema di sintesi e valutazione della vitalità cellulare (barra di scala: 200 μm) (Zaczek-Moczyłowska *et al.*, 2024).²⁷

Il chitosano può infatti essere trasformato in diverse forme farmaceutiche, come compresse, capsule, film, nanoparticelle, e più recentemente strutture tridimensionali. Tra tutte le diverse

forme in cui questo può presentarsi, gli idrogel a base di CS, grazie alla loro versatilità, sono tra i sistemi più promettenti per l'impiego nei sistemi a rilascio controllato di farmaci.²⁸⁻³⁰ Un'ulteriore caratteristica distintiva del CS è rappresentata dalla sua mucoadesività, ovvero la capacità di interagire con le superfici mucose, migliorando così l'assorbimento e l'efficacia terapeutica dei principi attivi e facilitandone la penetrazione attraverso strutture biologiche complesse.³¹ Questa combinazione di proprietà strutturali, chimiche e biologiche rende il CS un materiale di grande interesse per un'ampia gamma di applicazioni che spaziano dall'ambito ambientale a quello biomedico avanzato.³²

4.1.2. Biopolimeri sintetici

Tra i biopolimeri, rientrano anche i biopolimeri sintetici, comunemente indicati come polimeri di origine artificiale, poiché ottenuti attraverso processi chimici controllati in laboratorio.³³ In letteratura, vengono spesso definiti anche come "biosintetici" o "materiali polimerici bioartificiali".³⁴ L'interesse verso questa classe di materiali è cresciuto notevolmente negli ultimi anni, poiché molti biopolimeri naturali presentano proprietà meccaniche limitate, scarsa disponibilità e costi di produzione elevati, rendendo necessario lo sviluppo di alternative sintetiche. Questi materiali trovano applicazione in un'ampia gamma di contesti biomedici e clinici, in particolare nella cura dei pazienti che hanno subito la perdita o il danneggiamento di tessuti e organi.⁶ Tra i biopolimeri sintetici di maggiore interesse nel campo della ricerca e delle applicazioni biomediche rientra anche l'alcol polivinilico,³⁵ un materiale versatile e altamente biocompatibile,³⁶ dalle proprietà filmogene,³⁷ e che ultimamente viene impiegato per la realizzazione di nanocompositi tridimensionali, come vedremo nel corso di questo capitolo.

4.1.2.1. L'alcol polivinilico

L'alcol polivinilico (PVA) si ottiene principalmente tramite idrolisi del polivinil acetato, al quale segue un processo di saponificazione.³⁸ Si tratta di un materiale altamente solubile in acqua e facilmente biodegradabile da molti organismi biologici.³⁹ La presenza di gruppi ossidrilici lungo la catena polimerica consente al PVA di interagire con diverse sostanze organiche e inorganiche, partecipando a processi di reticolazione fisica o chimica che portano alla formazione di idrogel e film. Per queste caratteristiche, il PVA è ampiamente utilizzato in numerosi settori biochimici e biomedici (**Figura 4**).³³ Tra le sue proprietà più rilevanti si

annoverano la non tossicità, l'economicità, l'elevata capacità gelificante e la stabilità termica, fattori che ne fanno un componente ideale per molteplici applicazioni in campo biomedico.^{28,40,41} Le sue applicazioni spaziano infatti dalla produzione di idrogel per il rilascio controllato di farmaci alla realizzazione di bendaggi per ferite, *scaffold* per l'ingegneria tissutale, lenti a contatto, cartilagini artificiali per applicazioni ortopediche e persino cuori artificiali.⁴²⁻⁴⁴

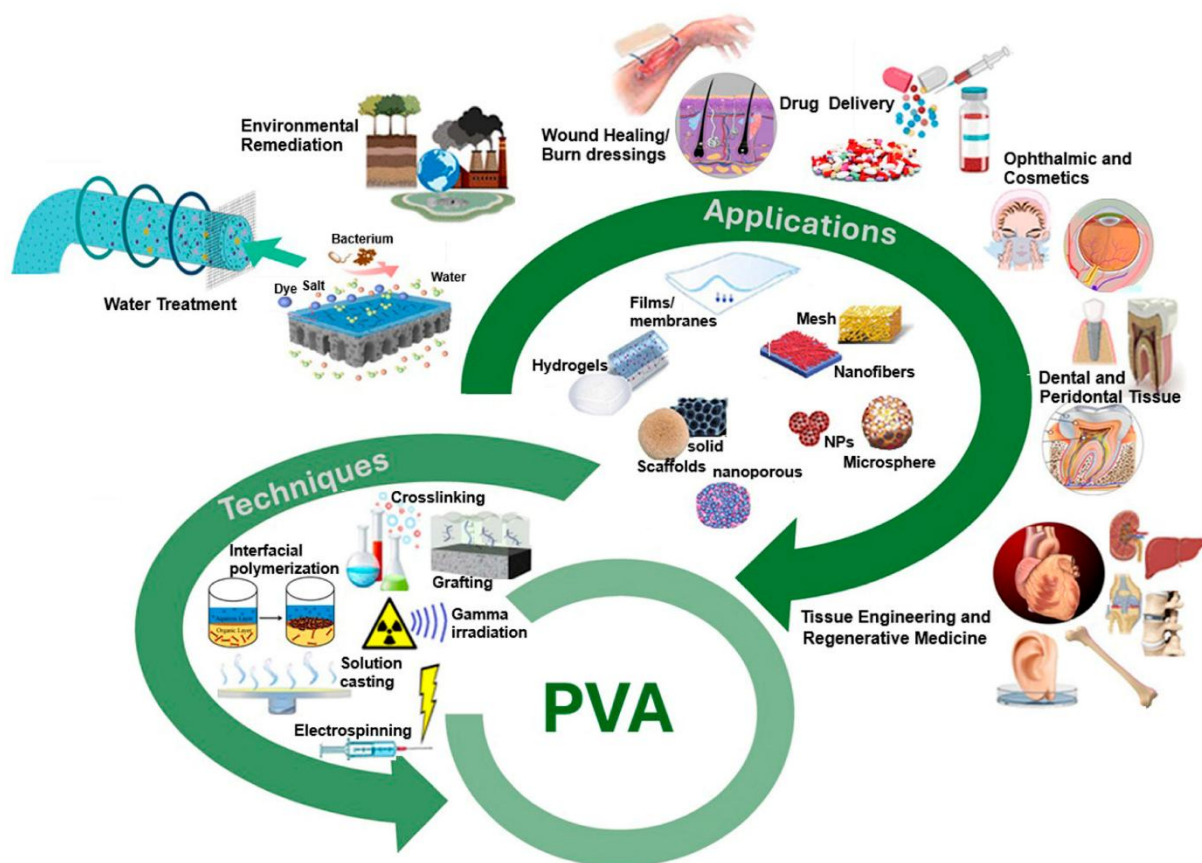


Figura 4. Rappresentazione schematica delle applicazioni di compositi a base di PVA (Filimon *et al.*, 2025).⁴⁵

4.2. Il ruolo dei filler nei nanocompositi polimerici multifunzionali

Nonostante i biopolimeri, come appena visto, presentino numerosi vantaggi, il loro impiego diretto risulta spesso limitato a causa di proprietà meccaniche insufficienti, bassa stabilità termica e prestazioni ridotte.⁴⁶ Per questo motivo, l'integrazione di *nanofiller* per la realizzazione di nanocompositi polimerici rappresenta una strategia efficace per potenziare le caratteristiche strutturali e funzionali dei materiali, ampliandone significativamente le potenziali applicazioni.^{47,48} In questo contesto, le tecniche di preparazione dei nanocompositi giocano un ruolo determinante nel definire le proprietà finali del materiale, poiché ne

influenzano parametri quali la conducibilità e stabilità termica, le proprietà meccaniche, le proprietà barriera e la morfologia.^{49,50} La scelta accurata del metodo di sintesi, in funzione dell'applicazione desiderata, permette di ottenere nanocompositi con proprietà specifiche per specifiche applicazioni.⁵¹

Questo è il motivo per cui i biopolimeri contenenti *nanofiller* e la loro formulazione,^{52,53} data la vasta gamma di nanomateriali oggi studiati, sia organici che inorganici, rappresenta ancora una sfida significativa.^{54,55} Questi nanocompositi mostrano un grande potenziale nell'affrontare sfide centrali della nanomedicina, come il rilascio terapeutico mirato e lo sviluppo di *scaffold* bioattivi.⁵⁶ Inoltre, l'integrazione di strutture supramolecolari e di nanoparticelle funzionalizzate all'interno delle matrici polimeriche rappresenta il motore principale per la progettazione della prossima generazione di nanocompositi.⁵⁷⁻⁵⁹

Tra i diversi tipi di *nanofiller* impiegati nella realizzazione di questi nanocompositi, un ruolo di crescente rilievo è svolto dalle argille minerali, che ancora una volta, grazie alle loro proprietà, disponibilità e basso costo, rappresentano interessanti *filler* inorganici da inglobare all'interno di matrici polimeriche,^{60,61} ed in particolare, tra queste, l'halloysite.⁶²⁻⁶⁴

4.2.1. Gli HNTs come filler in nanocompositi per applicazioni biomediche

Gli HNTs hanno dimostrato eccellenti proprietà quando utilizzati come *filler* per il rinforzo di matrici polimeriche. Grazie alle loro proprietà, che sono state ampiamente descritte nella sezione introduzione di questo lavoro di tesi, questi rappresentano un'alternativa economica e vantaggiosa ad altri tipi di nanomateriali. Tra questi vantaggi, la possibilità di funzionalizzare sia la superficie esterna che quella interna attraverso semplici modifiche, e il lume vuoto, che può consentire l'incapsulamento di molecole biologicamente attive per una vasta gamma di applicazioni. Studi recenti hanno dimostrato che gli HNTs, quando introdotti all'interno di un polimero, determinano un notevole incremento delle prestazioni termiche e meccaniche del nanocomposito. Liu *et al.* hanno mostrato, ad esempio, che *scaffold* porosi di chitosano contenenti nanotubi di halloysite, ottenuti tramite processo di *freeze-drying*, presentano una maggiore resistenza meccanica e una migliore adesione cellulare rispetto al polimero puro (**Figura 5**), rendendoli particolarmente adatti all'ingegneria tissutale e alla rigenerazione di tessuti molli.⁶⁵ Con un approccio simile Lisuzzo *et al.* hanno rivestito la superficie dei nanotubi con CS, creando un sistema ibrido capace di modulare il rilascio di principi attivi, con potenziali applicazioni nella somministrazione controllata di farmaci.⁶⁶

Oltre a questi sistemi più tradizionali, negli ultimi anni sono stati sviluppati approcci ancora più avanzati, come quello messo a punto da Chen *et al.*, che hanno realizzato nanocompositi a base di chitosano e lignina, incorporando in questi HNTs modificati con nanoparticelle d'oro (Au@HNT). Il nanocomposito, capace di raggiungere rapidamente temperature tipiche della terapia fototermica quando irradiato con lunghezze d'onda nel NIR, potrebbe rappresentare un sistema innovativo per la cura delle ferite (**Figura 5**).⁶⁷ Un altro studio dello stesso gruppo ha riportato lo sviluppo di idrogel biomimetici a base di collagene, alginato e acido ialuronico, utilizzando gli HNT come *filler*; questi forniscono al polimero un supporto meccanico e biologico per la crescita cellulare e la formazione di tessuti cutanei, adattandolo ad applicazioni come l'ingegneria tissutale.⁶⁸ Per le stesse applicazioni, Alakija e Mills, hanno progettato *patch* a base di alginato contenenti HNT rivestiti con MgO e nitrato di silicio, capaci di promuovere la proliferazione dei fibroblasti e di rilasciare in modo controllato composti terapeutici, rivelandosi particolarmente utili per il trattamento di ferite croniche.⁶⁹ Un contributo particolarmente rilevante, per quanto riguarda il rilascio controllato di specie biologicamente attive, è stato fornito da Riela *et al.*, i quali hanno progettato un sistema basato su nanotubi di halloysite caricati con insulina e successivamente incorporati in un polimero di chitosano, ottenendo film bionanocompositi per il rilascio controllato transdermico della proteina. L'interazione elettrostatica tra la proteina e la superficie degli HNTs ha consentito di preservare la struttura nativa dell'insulina e di regolarne la cinetica di rilascio, dimostrando l'efficacia del sistema come piattaforma biocompatibile per la somministrazione di biomolecole terapeutiche.⁷⁰

4.2.2. Nanocompositi a base di HNTs per applicazioni nel packaging biomedicale

Parallelamente all'applicazione di questi sistemi nei settori principali della nanomedicina, l'integrazione degli HNTs in matrici biodegradabili ha mostrato risultati promettenti anche nel settore del *packaging* biomedicale e alimentare. Ad esempio, in film di acido polilattico (PLA), l'aggiunta di HNT consente di migliorare la resistenza alla trazione, la stabilità termica e le proprietà barriera, mantenendo al contempo un'elevata trasparenza ottica.⁷¹ Infurna *et al.* hanno dimostrato come il caricamento dei nanotubi con molecole antiossidanti, quali quercetina o acido vanillico, possa conferire ai film biopolimerici un'attività protettiva prolungata e una maggiore resistenza alla degradazione foto-ossidativa, rendendoli materiali intelligenti per applicazioni nel settore alimentare e biomedicale.⁷² In un'ottica simile, Massaro *et al.* hanno

proposto l'incapsulamento di olio essenziale di menta piperita all'interno dei nanotubi, successivamente incorporati in un polimero di pectina (**Figura 5**). Il sistema ottenuto ha mostrato un rilascio controllato dell'olio, attività antimicrobica contro *E. coli* e *S. aureus* e capacità antiossidanti, fornendo un chiaro esempio di come la halloysite possa fungere da veicolo funzionale all'interno di biopolimeri naturali per applicazioni in ambito alimentare e biomedicale.

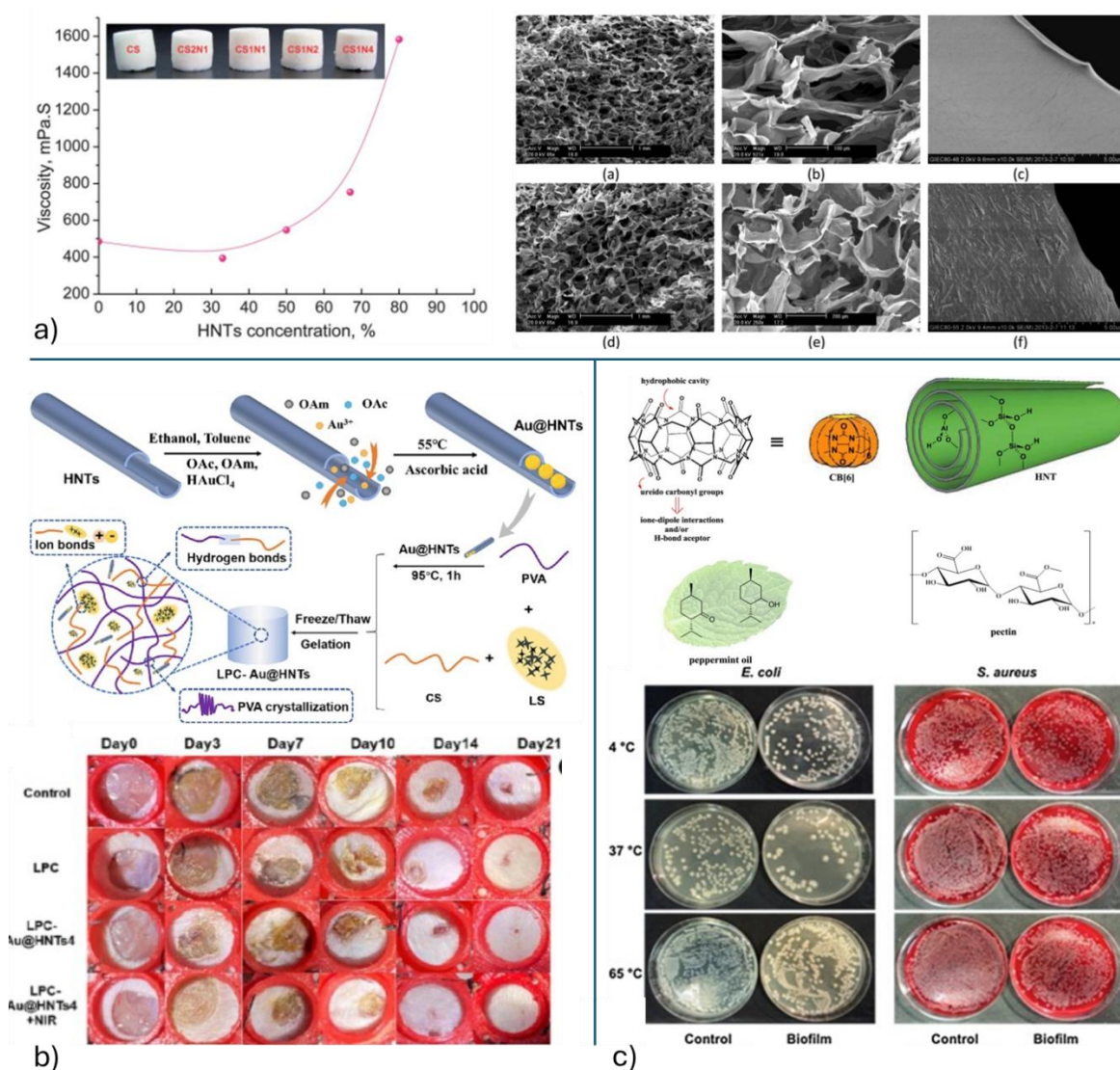


Figura 5. (a) Viscosità della soluzione di chitosano e delle dispersioni chitosano–HNTs, con immagini SEM dei corrispondenti *scaffold* liofilizzati a diversi ingrandimenti (Liu *et al.*, 2013);⁶⁵ (b) processo di preparazione di LPC-Au@HNTs e immagini dell'evoluzione delle ferite murine nell'arco di 21 giorni (Chen *et al.*, 2024);⁷³ (c) rappresentazione schematica dei componenti delle pellicole a base di pectina e attività antibatterica dei film pectina/HNT/PO contro *E. coli* e *S. aureus* a 4, 37 e 65 °C dopo 30 min di incubazione (Massaro *et al.*, 2016).⁷⁴

Un ulteriore vantaggio nell'utilizzo della halloysite risiede nella possibilità di controllare le proprietà strutturali e funzionali dei film attraverso l'interazione *filler*-polimero. Nei sistemi a base di PVA, ad esempio, la dispersione omogenea dei nanotubi e il controllo dell'aggregazione

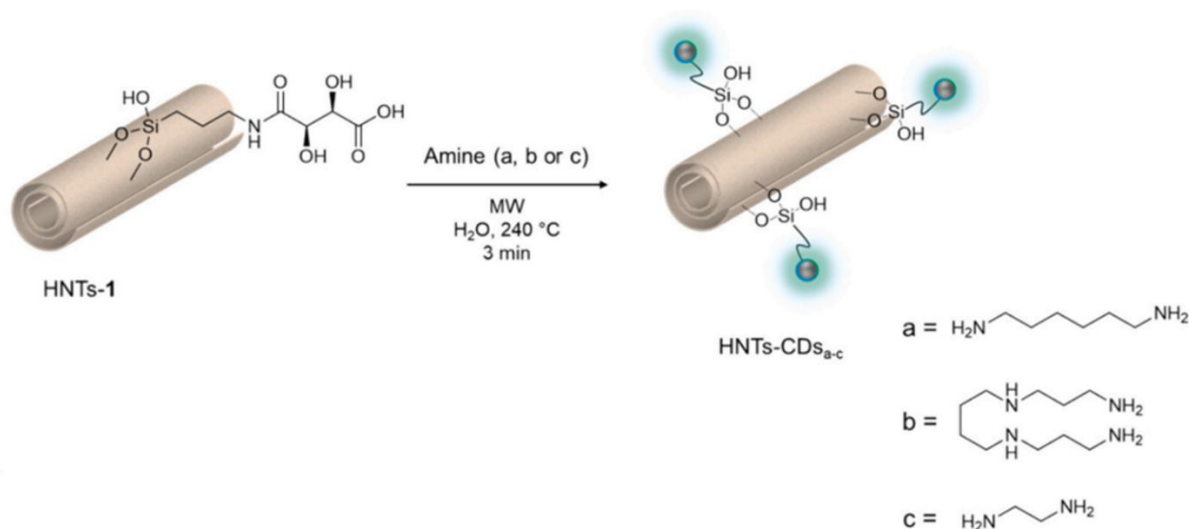
durante l'essiccazione migliorano le proprietà meccaniche e la stabilità termica del materiale, riducendo la permeabilità ai gas e conferendo maggiore durabilità alle pellicole.⁷⁵ Inoltre, la funzionalizzazione della superficie esterna degli HNTs, con organosilani come l'APTES, ha migliorato notevolmente l'adesione interfacciale con la matrice polimerica, riducendo l'aggregazione e potenziando la dispersione del *filler* nel polimero, con un impatto diretto sulle prestazioni finali del composito.⁷⁶ Grazie alla loro versatilità e alla possibilità di modulare caratteristiche del polimero, come la permeabilità, resistenza, biodegradabilità e rilascio di molecole attive, gli HNTs stanno prendendo sempre più campo nella produzione di pellicole protettive multifunzionali che spaziano dal *packaging* biomedicale a quello alimentare.

4.2.3. Sintesi di filler a base di halloysite per lo sviluppo di nanocompositi con diverse applicazioni

In questo contesto, e alla luce dei risultati promettenti riportati in letteratura sull'impiego degli HNTs come *filler* funzionale per biopolimeri, abbiamo sviluppato dei nuovi nanocompositi a base di alginato o chitosano, usando dei nanotubi di halloysite funzionalizzati con *carbon dots* (HNTs-CDs). Come discusso nel capitolo precedente, i nanomateriali HNTs-CDs, presentano proprietà interessanti che potrebbero contribuire a conferire al nanocomposito finale nuove e promettenti proprietà dovute alla modifica covalente *ad hoc* effettuata. I *carbon dots* infatti potrebbero conferire, sulla base delle proprietà che posseggono, proprietà antiossidanti o antibatteriche al nanocomposito. Inoltre, questi nanomateriali ibridi potrebbero migliorare, rispetto ai nanotubi non modificati, tutta una serie di proprietà barriera nei confronti di acqua, vapori o radiazioni UV. Questo nanomateriale è stato quindi impiegato come *filler* all'interno di due diverse matrici polimeriche biodegradabili, con l'obiettivo di realizzare nanocompositi, bidimensionali, o tridimensionali, per diverse applicazioni. Il primo studio effettuato ha riguardato la realizzazione di nanocompositi a base di alginato destinati al *packaging* biomedicale, utilizzando come *filler* HNTs opportunamente modificati. A tal fine, i *filler* HNTs-CDs, sintetizzati tramite la procedura sintetica riportata nel precedente capitolo, e che vede la sintesi diretta dei CDs sulla superficie esterna degli HNTs, è stata variata, in particolare per quanto riguarda la fonte di carbonio utilizzata, al fine di conferire al *filler* nuove proprietà utili alla specifica applicazione.⁷⁷ In questo caso, infatti, è stata utilizzata come fonte di carbonio l'acido L-tartarico che rappresenta un precursore economico,⁷⁸ ma soprattutto in grado di conferire ai CDs, ottenuti da esso, ottime proprietà antiossidanti, biocompatibilità e ottime proprietà fluorescenti.⁷⁹⁻⁸¹

- *Sintesi e caratterizzazione dei nanomateriali HNTs-CDs*

La sintesi dei nanomateriali HNTs-CDs, nello specifico, è stata effettuata tramite la pirolisi assistita da microonde, di un precursore a base di halloysite, in cui l'acido tartarico si trova covalentemente legato alla superficie esterna dei nanotubi. Questo precursore, chiamato HNTs-1, è stato fatto reagire per 3 min sotto irradiazione MW, in presenza di tre diversi agenti passivanti, quali l'esametilendiammina (a), la spermina (b) o l'etilendiammina (c), ottenendo i nanomateriali HNTs-CDs_{a-c} (**Schema 1**).



Schema 1. Rappresentazione schematica della sintesi dei nanomateriali HNTs-CDs_{a-c}

Una volta ottenuti i nanomateriali, questi sono stati lavati molte volte con acqua ed etanolo, al fine di rimuovere tutti i reattivi non reagiti e materiale combusto non covalentemente legato alla superficie degli HNTs. La percentuale di frazione organica, in questo caso di CDs formati sulla superficie in seguito al processo di pirolisi, è stata determinata tramite TGA (**Figura 6a**) che ha evidenziato un caricamento del'8.4, 4.8 e 3.8 %p/p rispettivamente per HNTs-CDs_a, HNTs-CDs_b e HNTs-CDs_c. Il successo della sintesi è stato inoltre confermato dalla spettroscopia FT-IR, che ha evidenziato (**Figura 6b**) la scomparsa della tipica banda di *stretching* del legame C=O del gruppo carbossilico a ca. 1715 cm⁻¹, in accordo con il processo di pirolisi. La presenza e formazione dei CDs è stata ulteriormente verificata mediante analisi XPS, che ha fornito informazioni riguardo il contenuto percentuale e il tipo di gruppi funzionali contenuti ossigeno, carbonio e azoto su ciascun nanomateriale sintetizzato (**Appendice A, Tabella A1**).

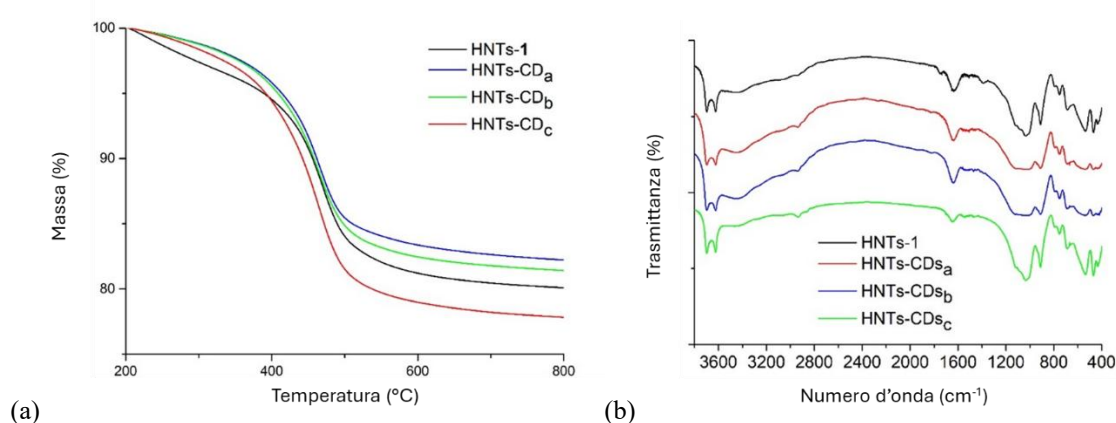


Figura 6. (a) Curve termogravimetriche di HNTs-1 e HNTs-CD_{s-a-c}. (b) Spettri FT-IR di HNTs-CD_{s-a-c}.

Verificato il successo della sintesi, i nanomateriali sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico e morfologico con diverse tecniche. Ad esempio, dal punto di vista morfologico, tramite microscopia HAADF/STEM, è stato possibile osservare come la funzionalizzazione della superficie esterna degli HNTs porti alla formazione di aggregati (**Figura 7a**), un fenomeno che verosimilmente potrebbe essere dovuto all'interazione tra i vari CDs adiacenti.⁸² Inoltre, tramite l'analisi EDX (**Figura 7c**), e la mappatura elementare da essa estrapolata (**Figura 7b**), è stata osservata una distribuzione omogenea dei CDs sulla superficie esterna dei nanotubi sia degli atomi di C che degli atomici di N.

Oltre all'analisi morfologica è stata investigata anche la mobilità in acqua dei nanomateriali HNTs-CD_{s-a-c}, tramite misure di *Dynamic Light Scattering*. I risultati hanno mostrato che l'introduzione di gruppi carbossilici sulla superficie esterna degli HNTs, nel nanomateriale HNTs-1, determina un rallentamento della diffusione in acqua rispetto all'halloysite non modificata, come evidenziato dall'aumento del diametro idrodinamico apparente (514 ± 36 nm per HNTs-1 rispetto a 295 ± 16 nm per HNTs). Un comportamento analogo è stato osservato per i materiali HNTs-CD_{s-a-c}, che presentano, rispettivamente, valori di diametro idrodinamico pari a 523 ± 44 , 619 ± 11 e 664 ± 6 nm.

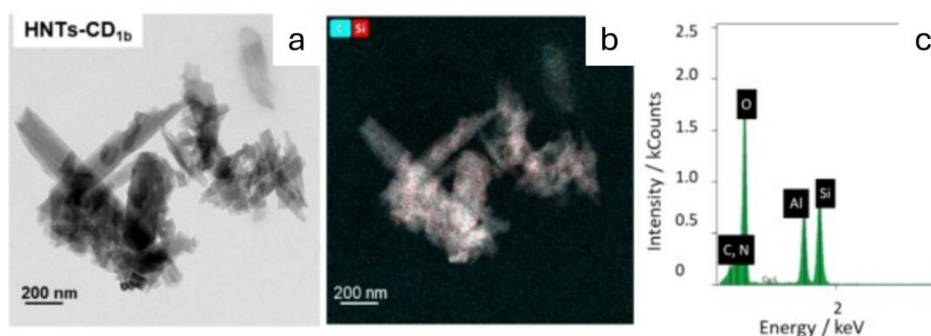


Figura 7. (a) Immagine HAADF/STEM del nanomateriale HNTs-CD_s; (b) immagine della mappatura elementare estrapolata dall'analisi EDX (c).

Tale fenomeno può essere attribuito alla formazione di interazioni elettrostatiche attrattive tra le porzioni organiche covalentemente legate alla superficie esterna dei nanotubi, come osservato per sistemi a base di halloysite modificata selettivamente sulla superficie esterna tramite interazioni covalenti o supramolecolari.⁶⁴ La presenza di gruppi -COOH comporta inoltre un incremento della carica negativa dei nanotubi, come dimostrato dai valori di potenziale- ζ , che passano da -18.0 ± 1.0 mV per l'halloysite grezza a -20.0 ± 5.0 mV per il materiale modificato (HNTs-1). Dopo il processo di pirolisi, i valori di potenziale- ζ risultano ulteriormente diversi (-18.0 ± 1.3 , -15.7 ± 0.8 e -22.2 ± 1.0 mV rispettivamente per HNTs-CDs_a, HNTs-CDs_b e HNTs-CDs_c), confermando l'avvenuta funzionalizzazione superficiale.

Dal punto di vista ottico, anche in questo caso, i nanomateriali ottenuti con questa strategia sintetica hanno mostrato avere un'elevata capacità di assorbimento nella regione UV (**Appendice A, Figura A1**) e proprietà dipendenti dalla lunghezza d'onda di eccitazione, sia in soluzione che allo stato solido (**Appendice A, Figure A1-A2**). Queste proprietà, che sono attribuibili alla presenza di CDs di dimensioni ridotte e uniformi distribuiti sulla superficie degli HNTs, risultano essere essenziali vista l'applicazione a cui sono destinati.⁸³ Queste proprietà, infatti, risultano essere essenziali nell'ottica di ottenere un sistema che riesca a bloccare le radiazioni UV.⁸⁴ Infine, poiché la capacità antiossidante rappresenta un parametro chiave per valutare il potenziale utilizzo di questi nanomateriali in ambito biomedicale, abbiamo determinato l'attività antiossidante dei nanomateriali HNTs-CDs_{a-c} sintetizzati mediante il saggio del DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile). Questo test colorimetrico, ampiamente utilizzato per la valutazione dell'attività antiossidante,⁸⁵ si basa sulla riduzione del radicale stabile DPPH $\cdot$, caratterizzato da un intenso colore viola e da un massimo di assorbimento a circa 517 nm, da parte di specie in grado di donare atomi di idrogeno o elettroni.⁸⁶ La riduzione del radicale alla forma neutra DPPH-H provoca una diminuzione dell'assorbanza, proporzionale all'attività antiossidante del campione analizzato (**Figura 8a**).

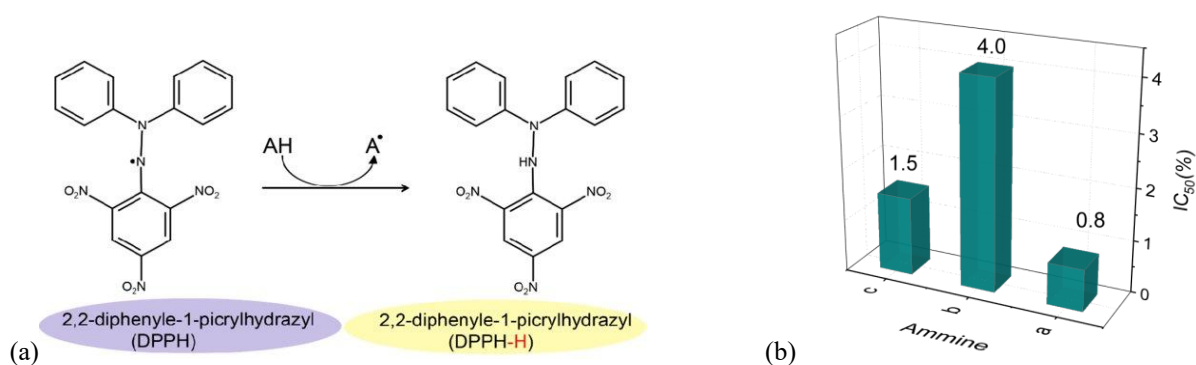


Figura 8. (a) rappresentazione schematica della variazione di colore tipica del saggio colorimetrico con DPPH e (b) valori di IC₅₀ dei nanomateriali HNTs-CDs_{a-c} (a = esametildiammina, b = spermina, c = etilendiammina).

I risultati ottenuti hanno mostrato che i materiali presentano un'attività compresa tra 0 e 2.5 mg mL⁻¹, con valori di IC₅₀ nell'intervallo 0.8-4 mg mL⁻¹. Tale attività aumenta con la concentrazione del materiale e varia in funzione dell'ammina impiegata nella sintesi: in particolare, il campione HNTs-CDs_a ha mostrato la migliore attività antiossidante, mentre quella più bassa è stata osservata per HNTs-CDs_b (**Figura 8b**). È noto infatti, che l'attività antiossidante dei CDs sia strettamente correlata alla presenza di gruppi funzionali superficiali, quali gruppi carbossilici e amminici, capaci di interagire con le specie radicaliche.^{87,88} Considerando che il radicale DPPH· può essere neutralizzato tramite trasferimento di atomi di idrogeno, trasferimento di elettroni o attraverso una combinazione di entrambi i meccanismi, si può ipotizzare che i gruppi -COOH presenti sulla superficie dei CDs favoriscano un trasferimento diretto di idrogeno, portando alla formazione di DPPH-H. Al contrario, i gruppi amminici primari sembrano operare prevalentemente attraverso un meccanismo di trasferimento indiretto.^{89,90} Pertanto, la presenza di differenti gruppi amminici e carbossilici sulla superficie degli HNTs-CDs potrebbe contribuire a migliorare le proprietà interfacciali del nanocomposito finale quando questi materiali vengono impiegati come *filler* all'interno di matrici polimeriche. Questi gruppi funzionali, infatti, possono instaurare interazioni non covalenti (come legami a idrogeno e interazioni elettrostatiche) con le catene polimeriche, favorendo l'ottenimento di nanocompositi omogenei e uniformi.

Alla luce di questi risultati, il nanomateriale HNTs-CDs_a, d'ora in poi indicato semplicemente come HNTs-CDs, è stato scelto come *filler* per l'alginato, biopolimero naturale utilizzato in questo primo studio, al fine di sviluppare un nuovo nanocomposito Alg/HNTs-CDs. Come mostrato in **Figura 9**, attraverso un semplice processo di *casting*, è stato possibile ottenere un film nanocomposito omogeneo, trasparente e privo di difetti macroscopici, confermando la buona compatibilità tra il *filler* e il polimero. Infine, sono stati preparati con lo stesso metodo, due nanocompositi utilizzati come controlli, ovvero un film di solo alginato (Alg) e un film in cui come *filler* è stata utilizzata dell'halloysite non modificata (Alg/HNTs). Lo studio e caratterizzazione di questi è di fondamentale importanza per comprendere come la modifica covalente della superficie esterna degli HNTs, ed in particolare la presenza dei CDs, influenzi le proprietà dei nanocompositi ottenuti.

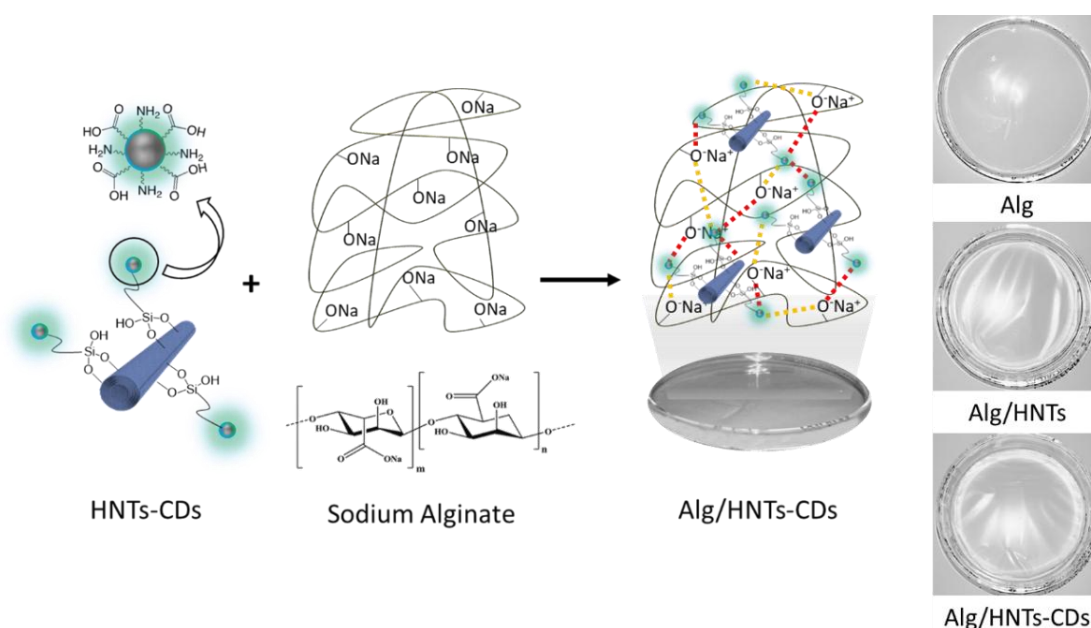


Figura 9. Rappresentazione schematica della sintesi dei film Alg/HNTs-CDs.

- *Caratterizzazione dei nanocompositi Alg, Alg/HNTs e Alg/HNTs-CDs*

Dopo aver ottenuto i nanocompositi, innanzitutto, sono state studiate le proprietà chimico-fisiche dei film Alg/HNTs-CDs al fine di valutarne il loro potenziale utilizzo nel *packaging* biomedicale. In particolare, in un primo momento, l'attenzione è stata rivolta alla stabilità dei nanocompositi all'irradiazione UV e ad altre proprietà barriera, due parametri fondamentali per garantire l'efficacia e la durata di questi sistemi polimerici destinati a questo specifico tipo di applicazione. L'esposizione alla luce, che tipicamente promuove fenomeni di foto-ossidazione o fotodegradazione,⁹¹ durante il loro utilizzo rappresenta un fattore cruciale da prendere in considerazione.⁹² Per questo motivo, un numero crescente di studi oggi è focalizzato sullo sviluppo di materiali con capacità schermanti nei confronti della radiazione UV, in grado di prevenire qualsiasi tipo di processo degradativo o di invecchiamento.⁹³⁻⁹⁵ In questo contesto, i *carbon dots*, mostrano ottime proprietà di assorbimento e diffusione della luce, che consentono di convertire i fotoni UV in calore, contribuendo così alla protezione del materiale dall'irradiazione.^{96,97} Sulla base di queste premesse, è stata studiata l'influenza dell'esposizione a radiazioni UV sulle prestazioni meccaniche di tutti i nanocompositi ottenuti, tramite misure di *Dynamic Mechanical Analysis* (DMA). In **Figura 10a-c** sono riportate le curve sforzo vs deformazione dei nanocompositi Alg/HNTs-CDs, Alg/HNTs e Alg prima e dopo una lunga esposizione ai raggi UV. L'analisi di queste curve ha permesso di determinare le proprietà meccaniche dei film, ed in particolar modo il modulo elastico, lo sforzo alla rottura e l'allungamento massimo (**Tabella 1**).

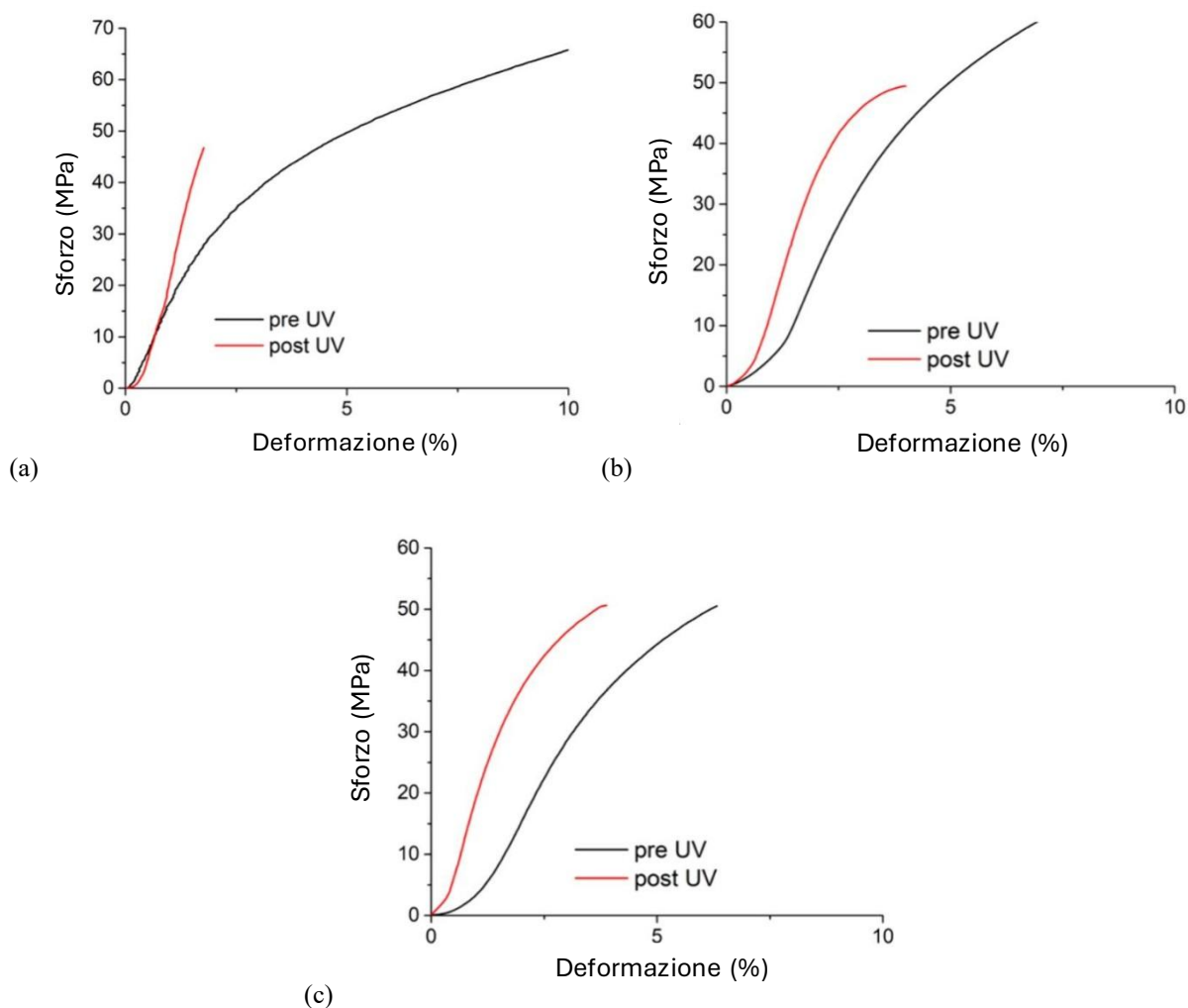


Figura 10. Curve sforzo vs deformazione prima e dopo l'esposizione all'irradiazione UV per i film a base di (b) Alg, (c) Alg/HNTs e (d) Alg/HNTs-CDs.

Dai dati ottenuti è possibile osservare che l'irradiazione UV provoca una diminuzione dell'allungamento massimo dei nanocompositi. Questo comportamento suggerisce che il materiale diventi meno duttile e più fragile, tollerando poche deformazioni prima che si rompa. In accordo con questo andamento è stato osservato, in tutti i campioni, un aumento del modulo elastico dopo l'esposizione alle radiazioni, indice di una maggiore rigidità e di una minore mobilità delle catene polimeriche.^{98,99} La resistenza meccanica dei film è stata valutata considerando i valori di sforzo alla rottura. Come riportato in **Tabella 1**, il campione a base di puro alginato mostra una minore resistenza meccanica in seguito alla sua esposizione ai raggi UV, come evidenziato da una riduzione significativa del valore di sforzo alla rottura (28 %). Questo effetto risulta leggermente attenuato nel caso dei film di Alg/HNTs, per il quale è stata calcolata una diminuzione del 21 % in seguito ad irradiazione.

Tabella 1. Proprietà meccaniche dei film a base di alginato prima e dopo l'esposizione all'irradiazione UV. Sono riportati i valori medi $\pm$ deviazione standard derivanti da tre esperimenti indipendenti.

Nanocompositi	Modulo elastico (MPa)	Sforzo alla rottura (MPa)	Allungamento massimo (%)
Alg (pre UV)	1942 $\pm$ 180	67 $\pm$ 5	10.5 $\pm$ 1.4
Alg (post UV)	2809 $\pm$ 225	48 $\pm$ 4	1.8 $\pm$ 0.1
Alg/HNTs (pre UV)	1700 $\pm$ 160	61 $\pm$ 6	7.1 $\pm$ 0.6
Alg/HNTs (post UV)	2356 $\pm$ 205	49 $\pm$ 5	3.9 $\pm$ 0.2
Alg/HNTs-CDs (pre UV)	1285 $\pm$ 151	51 $\pm$ 5	6.3 $\pm$ 0.4
Alg/HNTs-CDs (post UV)	2675 $\pm$ 250	51 $\pm$ 4	3.9 $\pm$ 0.2

Secondo quanto riportato in letteratura, la presenza degli HNTs può determinare un miglioramento delle proprietà meccaniche dei film a base di alginato, garantendo una parziale protezione della struttura del biopolimero nei confronti delle radiazioni UV.^{100,101} Un effetto particolarmente interessante e significativo è stato osservato nei nanocompositi Alg/HNTs-CDs. Infatti, in questo caso, a differenza di quanto osservato per i precedenti nanocompositi, il valore di sforzo alla rottura di questo nanocomposito rimane pressoché invariato anche dopo l'irradiazione UV. Questo comportamento indica che l'aggiunta del nanomateriale HNTs-CDs è in grado di proteggere completamente l'alginato dagli effetti della radiazione. In altre parole, gli HNTs funzionalizzati con i *carbon dots*, agiscono come una barriera foto-protettiva altamente efficace, in grado di preservare l'integrità strutturale del polimero anche dopo l'esposizione ai raggi UV. Questo effetto di foto-protezione è stato investigato tramite misure di trasmittanza della luce. In **Figura 11a** sono riportati gli spettri di trasmissione dei film di Alg, Alg/HNTs e Alg/HNTs-CDs. In generale si osserva un aumento della trasmittanza all'aumentare della lunghezza d'onda, in accordo con il fenomeno di *light scattering* causato dall'argilla dispersa nel polimero. Come previsto, l'introduzione di HNTs e HNTs-CDs determina una riduzione dei valori di trasmittanza, più marcata nel caso del film contenente il nanomateriale HNTs-CDs, a conferma dell'efficace azione schermante esercitata dal *filler*.

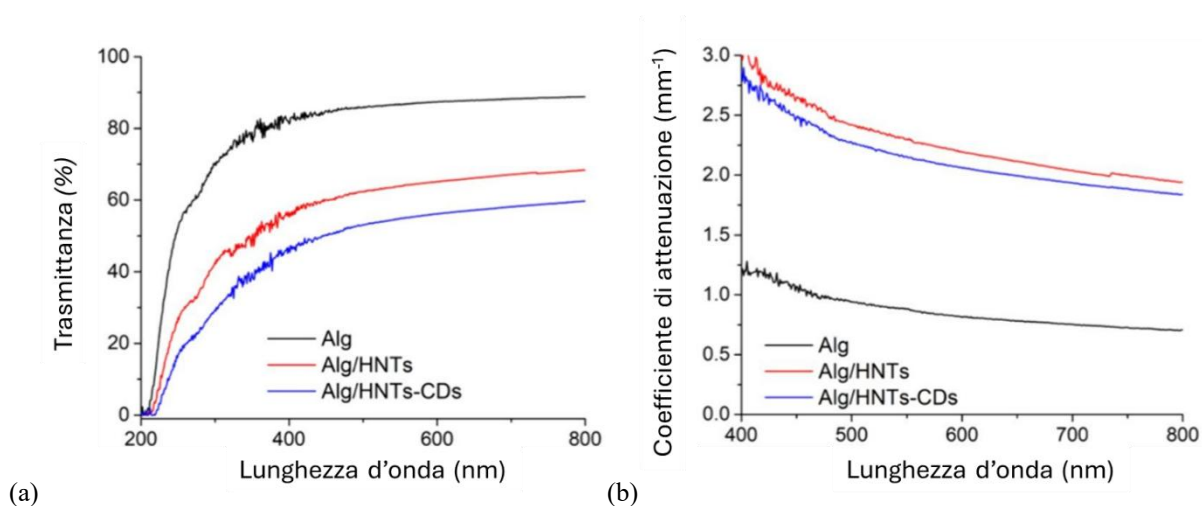


Figura 11. (a) Trasmittanza e (b) coefficiente di attenuazione in funzione della lunghezza d'onda per i film Alg, Alg/HNTs e Alg/HNTs-CDs. Sono riportati i valori medi derivanti di tre esperimenti indipendenti (UV).

Per approfondire l'effetto del *filler* sulla trasparenza del nanocomposito a base di alginato, è stato calcolato il coefficiente di attenuazione (k), e i risultati, in funzione della lunghezza d'onda sono riportati in **Figura 11b**. I valori di k sono stati calcolati a partire dai valori di assorbanza (A) utilizzando la seguente equazione:

$$K = \frac{A}{2.3 \times D} \quad (\text{Eq. 1})$$

dove D rappresenta lo spessore del film (m). Come è possibile osservare dalla **Figura 11b**, l'introduzione del *filler* inorganico ha determinato un aumento del coefficiente di attenuazione dell'alginato; di conseguenza, i nanocompositi hanno mostrato una trasparenza inferiore rispetto al film a base di Alg puro.¹⁰² I valori di trasmittanza dei nanocompositi a 300 nm (regione UV-B) e a 600 nm (luce visibile), sono riportati in **Tabella 2**. Come è possibile osservare, entrambi i nanocompositi (Alg/HNTs-CDs e Alg/HNTs) mostrano una riduzione significativa del valore di trasmittanza a 300 nm rispetto all'Alg puro ($p < 0.05$); in particolare, il nanocomposito Alg/HNTs-CDs presenta il valore più basso. Questo comportamento è probabilmente dovuto alla presenza dei CDs, i quali possiedono un'elevata capacità di assorbimento nella regione compresa tra 200 e 300 nm.

Tabella 2. Valori di trasmittanza dei film nanocompositi Alg/HNTs-CDs, Alg/HNTs e Alg a 300 nm (UV-B) e 600 nm (luce visibile). Sono riportati i valori medi derivanti da tre misure indipendenti ed espressi come media $\pm$ deviazione standard. Lettere diverse nella stessa colonna indicano gruppi significativamente differenti ($p < 0.05$) secondo l'analisi ANOVA.

Nanocomposito	T%@300	T%@600
Alg	68.0 $\pm$ 2.0 a	86.0 $\pm$ 1.0 a
Alg/HNTs	41.0 $\pm$ 1.0 b	64.0 $\pm$ 1.0 b
Alg/HNTs-CDs	28.0 $\pm$ 0.6 c	55.0 $\pm$ 0.5 c

Una volta studiate le proprietà foto-protettive dei nanocompositi, è stata successivamente analizzata la morfologia superficiale dei film Alg/HNTs-CDs, Alg/HNTs e Alg mediante microscopia a forza atomica (AFM, *Atomic Force Microscopy*), con l'obiettivo di valutare l'effetto dell'introduzione del *filler* nella struttura polimerica e sull'organizzazione superficiale del nanocomposito. La **Figura 12** mostra le immagini AFM dei film acquisite a differenti ingrandimenti (5 μm e 2 μm) e riporta, inoltre, una ricostruzione tridimensionale (3D) utile ad evidenziare con maggiore chiarezza le differenze nella topografia superficiale. I film a base di Alg presentano una struttura omogenea, caratterizzata da una rete compatta e con un'elevata densità di reticolazione (**Figura 12a–c**). L'aggiunta di HNTs al polimero sembra influenzare l'orientamento del film, che appare leggermente inclinato rispetto alla direzione di acquisizione delle immagini (**Figura 12d–f**), pur mantenendo pressoché invariata la rugosità superficiale. È interessante notare che, sulla superficie dei film Alg/HNTs-CDs (**Figura 12g–i**), le particelle di CDs risultano chiaramente visibili, suggerendo un processo di segregazione all'interfaccia (si veda in particolare la **Figura 12i**).

Questo comportamento può essere spiegato in termini di interazioni elettrostatiche: infatti, sia l'alginato sia il nanomateriale HNTs-CDs presentano una carica negativa, e le conseguenti forze repulsive potrebbero favorire la migrazione dei CDs verso l'interfaccia. L'analisi delle sezioni ha inoltre permesso di stimare le dimensioni dei CDs, che risulta essere di circa 5.43 ± 1.24 nm, valore in buon accordo con le dimensioni delle particelle presenti sulla superficie degli HNTs.⁸⁰ Le differenze morfologiche tra i film sono state quantificate attraverso la variazione dei valori di rugosità, riportati nella **Tabella 3**. Queste interazioni tra il *filler* HNTs-CDs e la matrice polimerica potrebbero essere responsabili anche di un altro effetto osservato studiando le proprietà fisiche dei nanocompositi (**Tabella 4**). Come si osserva in tabella, infatti, l'introduzione di HNTs non comporta variazioni significative nello spessore del film Alg/HNTs,

mentre l'aggiunta del 5.0 %/p/p di HNTs-CDs determina un aumento dello spessore del film Alg/HNTs-CDs.

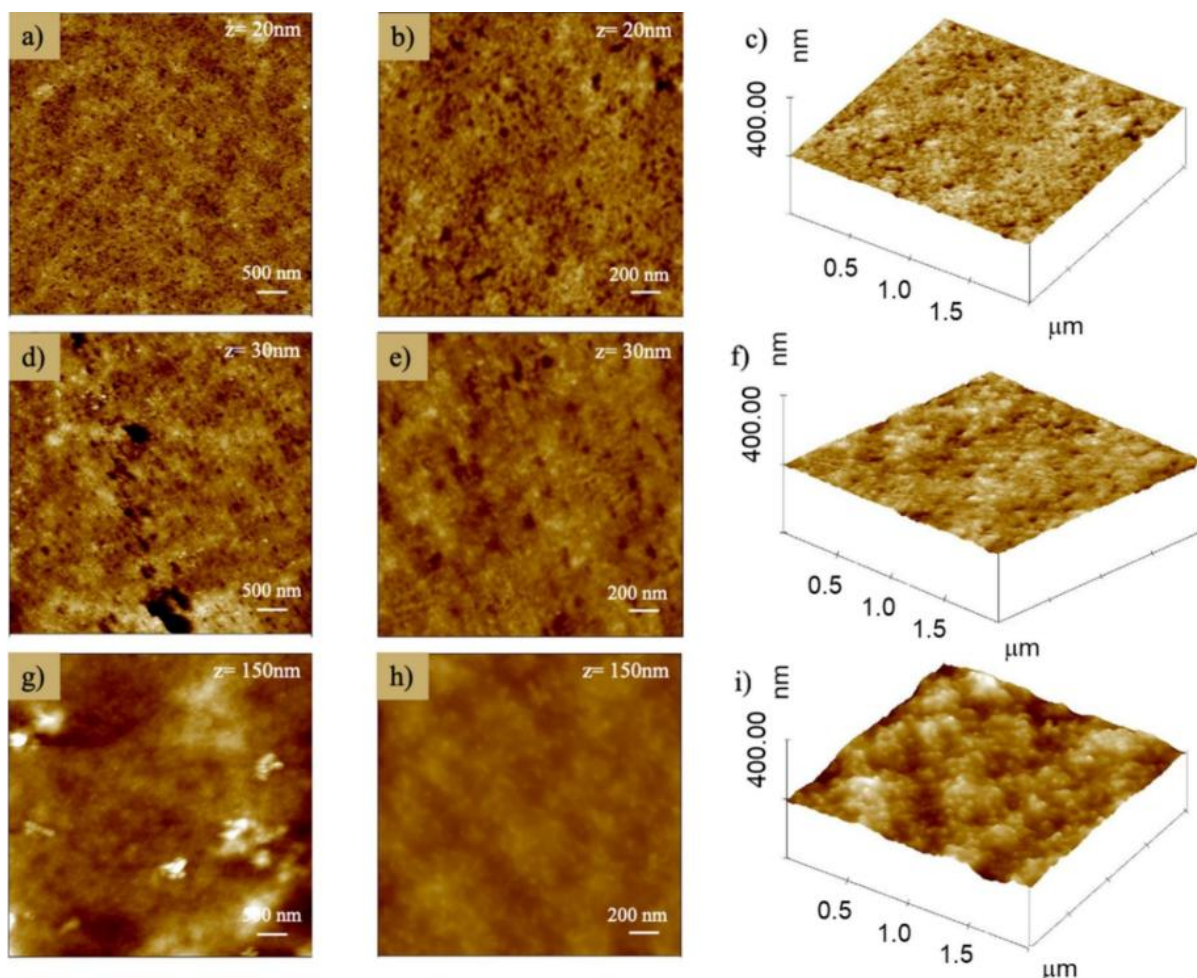


Figura 12. Immagini AFM in modalità *tapping* acquisite a differenti ingrandimenti (5 μm , 2 μm) e ricostruzione 3D di (a–c) Alg, (d–f) Alg/HNTs e (g–i) Alg/HNTs-CDs.

Tabella 3. Valori della rugosità quadratica media (R_q), della rugosità aritmetica (R_a) e della rugosità massima (R_{max}) per i film Alg, Alg/HNTs e Alg/HNTs-CDs.

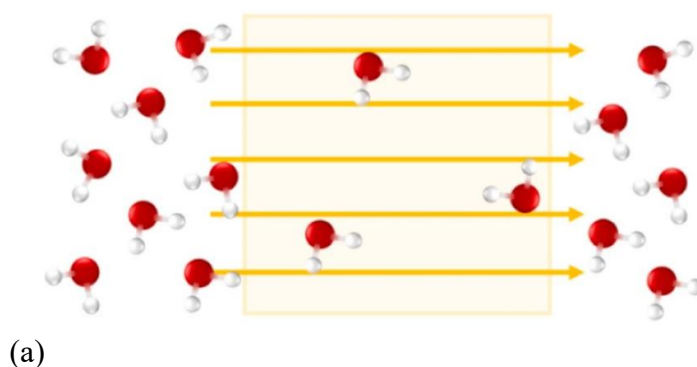
Nanocomposito	R_q (nm)	R_a (nm)	R_{max} (nm)
Alg	1.56 ± 0.12	1.19 ± 0.09	12.95 ± 2.50
Alg/HNTs	1.59 ± 0.17	1.24 ± 0.13	11.53 ± 1.41
Alg/HNTs-CDs	3.45 ± 0.31	2.76 ± 0.27	22.08 ± 1.96

Tabella 4. Proprietà fisiche dei film Alg, Alg/HNTs e Alg/HNTs-CDs. Sono riportati i valori medi $\pm$ deviazione standard derivanti da tre esperimenti indipendenti. Lettere diverse nella stessa colonna indicano gruppi significativamente differenti ($p < 0.05$) secondo l'analisi ANOVA.

Nanocompositi	Spessore (mm)	WVP $((\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}) \cdot 10^{-8})$	Contenuto di umidità (%) ^(a)
Alg	0.037	1.53 ± 0.04 a	32.8 ± 1.3 a
Alg/HNTs	0.037	1.44 ± 0.17 a	26.0 ± 2.2 b
Alg/HNTs-CDs	0.054	0.95 ± 0.04 b	22.2 ± 0.4 c

^a Ottenuto dopo 7 giorni.

L'introduzione di entrambi i *filler*, ossia HNTs e HNTs-CDs, influisce in modo significativo, su altre due proprietà fisiche dei nanocompositi, ossia sul contenuto di umidità e sulla permeabilità al vapore acqueo (WVP, *Water Vapor Permeability*) ($p < 0.05$). Questi due parametri rappresentano aspetti fondamentali nel *packaging* biomedicale, in quanto possono influenzare la qualità, la stabilità e l'integrità del materiale e dei prodotti con cui viene a contatto.¹⁰³ In assenza di qualsiasi *filler*, l'umidità dell'ambiente viene trasferita al materiale sottostante diffondendo attraverso la matrice polimerica (**Figura 13a**). Quando viene introdotta l'halloysite si osserva una diminuzione della permeabilità al vapore acqueo (WVP) dei film nanocompositi poiché, come noto,¹⁰⁴ questa possiede proprietà barriera nei confronti dell'acqua, creando percorsi di diffusione tortuosi e aumentando così la lunghezza media del loro percorso all'interno del polimero. Come già riportato per la montmorillonite, ad esempio, tale comportamento può essere attribuito alla presenza dello strato di silicio impermeabile dell'argilla, che sinergicamente al primo effetto, ostacola la diffusione dell'acqua.¹⁰⁵



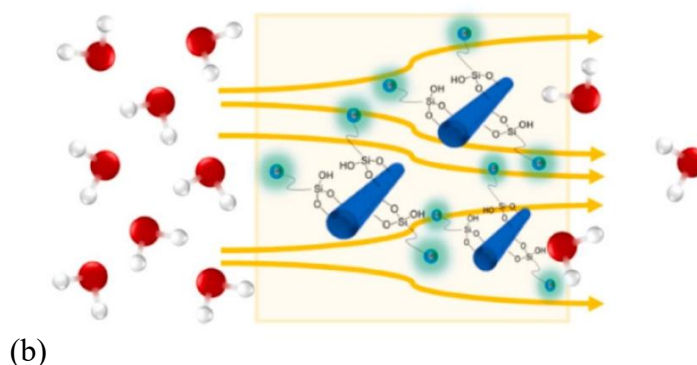


Figura 13.(a–b) Ipotesi del meccanismo di barriera all’acqua per i film di (a) **Alg** e (b) **Alg/HNTs-CDs**.

L’introduzione del *filler* HNTs-CDs nel film Alg/HNTs-CDs determina un’ulteriore riduzione del valore di WVP rispetto sia al film di Alg puro sia al film contenente HNTs non funzionalizzati. Questo effetto è attribuibile ancora una volta alla presenza dei *carbon dots* sulla superficie esterna dell’halloysite. È infatti noto,¹⁰⁶ che i gruppi funzionali presenti sui CDs sono capaci di instaurare interazioni elettrostatiche o legami a idrogeno con i gruppi funzionali dell’alginato, ostacolando ulteriormente il passaggio delle molecole d’acqua attraverso il polimero (**Figura 13b**). Considerazioni analoghe possono essere fatte per quanto riguarda il contenuto di umidità (MC) dei nanocompositi. Anche in questo caso, l’introduzione di HNTs nel polimero determina una riduzione del contenuto di umidità. Il valore di MC diminuisce ulteriormente in presenza del nanomateriale HNTs-CDs, in accordo con quanto osservato per la WVP (**Figura 14**).

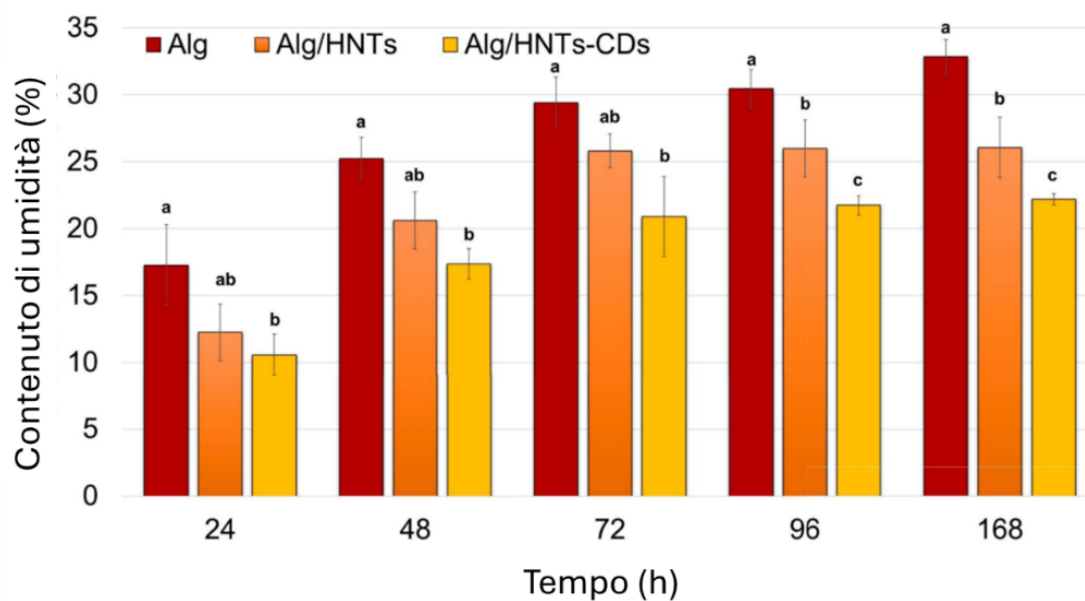


Figura 14. Contenuto di umidità in funzione del tempo per i film Alg, Alg/HNTs e Alg/HNTs-CDs. Sono riportati i valori medi derivanti da tre esperimenti indipendenti. In ciascun grafico, lettere diverse sopra le colonne indicano differenze significative ($p < 0,05$) nel contenuto di umidità.

È interessante notare che monitorando l'andamento del MC nel tempo, l'aggiunta di HNTs o HNTs-CDs porta a una riduzione del contenuto di umidità già dopo circa 72 h, mentre nel caso dell'Alg puro tale valore continua ad aumentare anche dopo 7 giorni. Anche in questo caso, la presenza dei CDs svolge un ruolo fondamentale, in quanto consente di reticolare parzialmente l'alginato grazie alle interazioni favorevoli tra il polimero e i gruppi funzionali dei CDs presenti sulla superficie dell'HNTs, limitando così l'assorbimento di acqua.

- Attività antiossidante e caricamento di un antimicrobico

Le proprietà antiossidanti e antibatteriche rappresentano caratteristiche fondamentali per i materiali destinati al *packaging* biomedicale. L'attività antiossidante è particolarmente importante poiché consente di neutralizzare le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di prevenire fenomeni di ossidazione che possono compromettere l'integrità chimico-fisica del materiale o la stabilità di eventuali molecole bioattive incorporate.¹⁰⁷ Allo stesso modo, l'attività antibatterica riveste un ruolo chiave nella prevenzione della crescita microbica sulla superficie del film, riducendo il rischio di contaminazioni e prolungando la funzionalità del materiale nel tempo.¹⁰⁸

Il nanomateriale HNTs-CDs ha mostrato buone proprietà antiossidanti con un valore di IC_{50} pari a 0.8 mg mL^{-1} , grazie alla presenza dei vari gruppi funzionali sulla sua superficie.⁸⁹ Poiché l'obiettivo di questo studio è lo sviluppo di materiali multifunzionali per applicazioni biomediche, i test di attività antiossidante sono stati eseguiti utilizzando simulanti alimentari standardizzati come *proof of concept*, al fine di valutare il comportamento dei film in ambienti complessi e realistici simili a quelli con cui potrebbero entrare in contatto in applicazioni biomedicali (ad esempio fluidi biologici o soluzioni contenenti molecole bioattive).

L'attività antiossidante del film Alg/HNTs-CDs è stata valutata, ancora una volta, mediante il metodo del DPPH, utilizzando come solvente una miscela 50 %v/v acqua/etanolo, scelta secondo la normativa europea, come simulante per matrici con carattere lipofilo (D1). In questa miscela, il nanomateriale HNTs-CDs ha mostrato una buona attività antiossidante, che aumenta all'aumentare della concentrazione, con un valore di IC_{50} pari a 1.0 mg mL^{-1} . Applicando lo stesso metodo al film Alg/HNTs-CDs, è stato osservato che, dopo 96 h, la percentuale di inibizione del DPPH era di circa 25 %, indicando che il materiale mantiene le proprietà antiossidanti del *filler*.

Al fine di conferire nuove proprietà ai nanocompositi a base di alginato, che come precedentemente visto non possiede intrinseche proprietà antibatteriche, il film Alg/HNTs-CDs è stato inoltre caricato con un estratto naturale noto per la sua attività antibatterica.¹⁰⁹

A tal fine, è stato utilizzato l'estratto metanolico delle foglie di *M. cisplatensis*, che ha mostrato un'elevata attività contro due differenti ceppi di *Staphylococcus aureus* (ATC29213 e MRSA) con valori rispettivamente di IC₅₀ pari a 128 µg mL⁻¹ e 64 mg mL⁻¹.¹⁰⁹ Il nanomateriale HNTs-CDs, pur essendo modificato sulla superficie esterna, mantiene il lume interno vuoto, il quale può essere sfruttato per il caricamento di molecole idrofobiche.¹¹⁰ In base alle proprietà chimico-fisiche sia degli HNTs sia dei principali componenti dell'estratto di *M. cisplatensis* è possibile che tra di essi si instaurino interazioni idrofobiche, attrazioni elettrostatiche e legami a idrogeno tra i gruppi Al–OH presenti nel lume dell'halloysite e i gruppi carbonilici, ossidrilici e ossigenati delle molecole che compongono l'estratto.¹¹⁰

Utilizzando una strategia comunemente impiegata per il caricamento di specie attive all'interno di *carrier* a base di HNTs,¹¹¹ l'estratto (E) è stato caricato nel nanomateriale HNTs-CDs. Dopo il processo di *work-up*, il nanomateriale ha mostrato un caricamento percentuale pari a circa 6.8 %p/p, come confermato dalle analisi UV–vis. Successivamente, il nanomateriale caricato (HNTs-CDs/E) è stato utilizzato come *filler* per la sintesi del film Alg/HNTs-CDs/E. Per evitare la degradazione o la volatilizzazione dei componenti dell'estratto durante la formazione del film, è stato adottato un metodo di *casting* alternativo, precedentemente ottimizzato dal nostro gruppo per sistemi analoghi,⁷⁴ in alternativa al metodo classico.

Una volta caricato l'estratto è stata valutata la cinetica di rilascio di questo sia dal nanomateriale HNTs-CDs/E sia dal film Alg/HNTs-CDs/E in un simulante a 25 °C mediante analisi UV–vis, assumendo che tutti i componenti dell'estratto fossero rilasciati in modo proporzionale nel tempo.¹¹¹ In **Figura 15a** è riportato il profilo di rilascio dell'estratto dal nanomateriale HNTs-CDs/E. Come si può osservare, l'intera quantità di estratto caricata nel nanomateriale è stata rilasciata entro 250 min, e i dati cinetici sono risultati ben descritti da un modello cinetico del primo ordine ($M_{\infty} = 98.8 \pm 3.6$ %p/p; $k = 0.013 \pm 0.001$ min⁻¹; $R^2 = 0.9922$). Al contrario, la **Figura 15b** mostra il profilo di rilascio dal film (espresso come mg di estratto per cm² di film), che è stato descritto accuratamente dal modello Power Fit ($k = 0.007 \pm 0.001$ h⁻¹; $n = 0.11$; $R^2 = 0.9860$). Questi risultati indicano che l'introduzione del *filler* HNTs-CDs/E all'interno del film di alginato consente un rilascio graduale e prolungato delle specie antimicrobiche, garantendo così una protezione a lungo termine.¹¹²

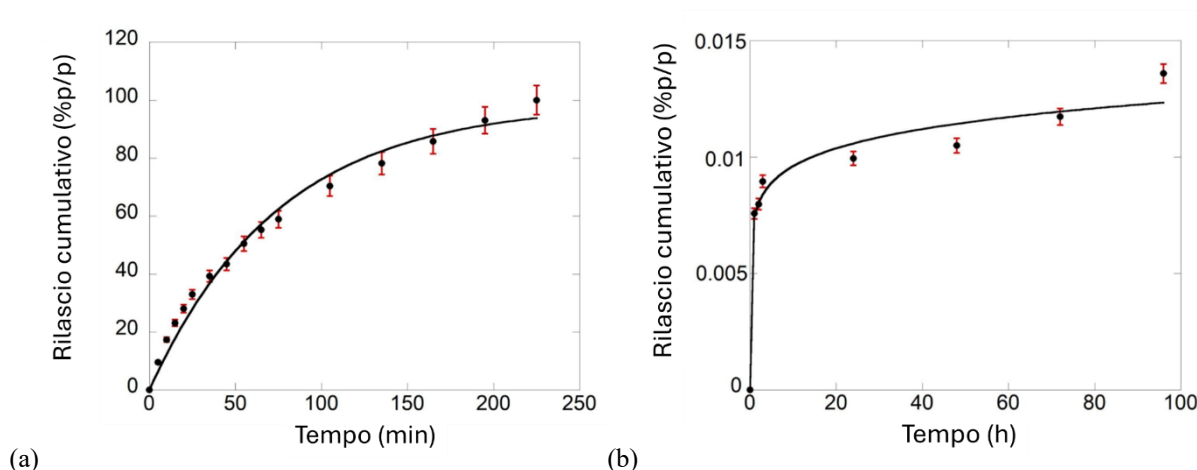


Figura 15. Cinetica di rilascio dell'estratto E da (a) HNTs-CDs/E e (b) film Alg/HNTs-CDs/E nel simulante a 25 °C. Sono riportati i valori medi $\pm$ deviazione standard derivanti da due prove indipendenti.

Studi preliminari sull'effetto del film Alg/HNTs-CDs/E sono stati condotti su frutti rivestiti e non rivestiti, monitorando visivamente le variazioni dell'aspetto di mele e banane, scelte come modelli sperimentali. La **Figura 16** mostra le immagini delle fette di mela e banana, rivestite e non rivestite con il film sviluppato, dopo 7 giorni di conservazione a temperatura ambiente e con umidità relativa (RH) = 60 %. Entrambi i frutti non rivestiti mostrano un progressivo imbrunimento durante il periodo di conservazione, riconducibile a fenomeni ossidativi; inoltre, nel caso della mela non rivestita, si osservano evidenti segni di degradazione microbica già dopo 7 giorni. Al contrario, il rivestimento con il film Alg/HNTs-CDs/E previene i processi ossidativi e contribuisce a prolungare il tempo di conservazione dei frutti.

Sulla base di queste indagini preliminari, si può concludere che la combinazione tra il l'alginato, il nanomateriale HNTs-CDs e l'estratto di *M. cisplatensis* fornisce un sistema multifunzionale in grado di costituire una barriera efficace ai raggi UV, prevenire i fenomeni ossidativi e offrire protezione antimicrobica, prolungando così la *shelf-life*, in questo caso dei frutti utilizzati come sistema modello, ma potenzialmente anche di materiali o superfici sensibili impiegati in ambito biomedico. Questi risultati rappresentano un importante punto di partenza per l'esplorazione di nanocompositi multifunzionali basati sull'uso di HNTs funzionalizzati. In particolare, la versatilità e l'efficacia di questi *filler* possono essere sfruttate con successo anche in altre matrici polimeriche di interesse biotecnologico, come il chitosano, per lo sviluppo di nanocompositi avanzati con architetture sia bidimensionali (film, membrane, *patch* funzionalizzati) sia tridimensionali, ottenuti ad esempio, tramite tecniche di stampa 3D.



Figura 16. Fette fresche di mela e banana non rivestite e rivestite con il film nanocomposito Alg/HNTs-CDs/E dopo 7 giorni di conservazione a temperatura ambiente con umidità relativa (RH) = 60 %.

Questi nuovi approcci non solo ampliano le possibili applicazioni tecnologiche dei sistemi a base di HNTs, ma aprono la strada alla realizzazione di materiali intelligenti e altamente personalizzabili, in grado di combinare funzionalità multiple con proprietà strutturali e meccaniche su misura, rappresentando così un passo significativo verso la progettazione di nanocompositi di nuova generazione.

4.3. Biostampa 3D: principi, materiali e potenzialità nella medicina rigenerativa

La stampa tridimensionale (3D *printing*) è una tecnologia relativamente recente, impiegata per modellare e realizzare strutture tridimensionali attraverso un processo additivo strato su strato. In questo contesto, un *software* di progettazione assistita dal computer (CAD) viene utilizzato per creare e generare un *g-code*, il linguaggio macchina che sarà successivamente letto dalla stampante 3D per costruire l'oggetto desiderato.¹¹³ Oggi esistono numerose tecniche di stampa 3D, con vantaggi e svantaggi, che si differenziano principalmente per la natura dei materiali impiegati e per l'applicazione finale del materiale (Figura 17).¹¹³

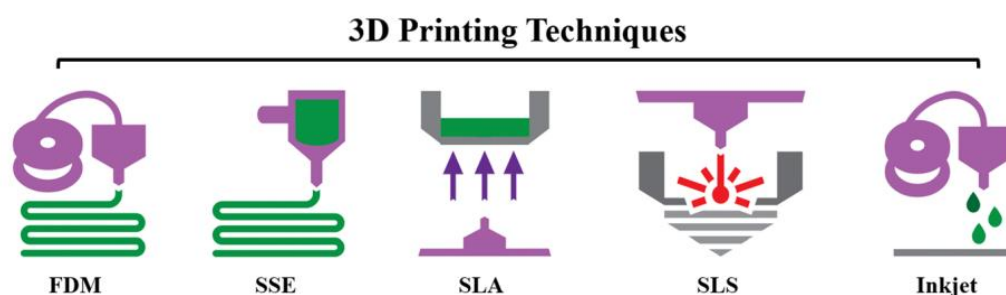


Figura 17. Schema riassuntivo delle diverse tecniche di stampa 3D con corrispettivi vantaggi e svantaggi delle diverse tecniche di stampa 3D (Qiao *et al.*, 2022).¹¹⁴

Tra le varie aree di utilizzo, quella biomedica rappresenta uno dei settori in cui questa tecnologia mostra con maggiore evidenza il suo potenziale e la sua versatilità. In tale ambito prende il nome di “biostampa tridimensionale” (3D *bioprinting*, 3DBP) o semplicemente “*bioprinting*”.^{115 116} La biostampa è una tecnologia emergente e altamente promettente che consente di realizzare dispositivi e impianti personalizzati, nonché *scaffold* su misura per l'ingegneria tissutale e molte altre terapie individualizzate.¹¹⁷ Alla base di questa tecnica vi è lo sviluppo di quello che viene definito “*bioink*” (BI), ovvero un materiale biocompatibile, specificamente progettato per essere utilizzato nella biostampa tridimensionale, principalmente costituito da polimeri biocompatibili, naturali o sintetici.^{118,119} Tra i componenti naturali più utilizzati figurano alginato, gelatina, collagene (tipo I), chitosano, fibroina della seta, albumina, agarosio, trombina, fibrinogeno, acido ialuronico, chitina e cellulosa.¹²⁰ Tuttavia, molti di questi materiali naturali presentano limiti significativi in termini di proprietà meccaniche, stabilità strutturale e durata nel tempo, caratteristiche essenziali per il successo della biostampa.

Per ovviare a tali limitazioni, è comune l'impiego di *filler* inorganici capaci di migliorare le prestazioni dei BI.¹²¹ Tra quelli con comprovata biocompatibilità, come l'idrossiapatite, i nanotubi di carbonio e altre nanoparticelle a base di silicio, stanno attirando un interesse crescente le argille minerali.^{122,123} Questi additivi non solo contribuiscono a rafforzare le proprietà meccaniche delle strutture stampate, ma possono anche migliorarne la funzionalità complessiva, ampliando ulteriormente il potenziale applicativo della biostampa tridimensionale.¹¹⁴

4.3.1. Le argille minerali nella stampa 3D: prospettive e nuovi sviluppi

La combinazione tra argille minerali e stampa 3D rappresenta un campo di ricerca relativamente recente ma in rapida espansione. In particolare, le argille minerali fibrose (come la sepiolite, Sep) hanno mostrato essere promettenti *filler* per le tecniche di stampa 3D.^{124,125} La loro morfologia può infatti risultare estremamente utile per il rinforzo dei polimeri impiegati nei processi di stampa.¹²⁶ Ad esempio, la Sep è stata incorporata nel polietilene glicole tereftalato (PETG) per la stampa 3D mediante *fused deposition modeling* (FDM).¹²⁷

I risultati ottenuti suggeriscono che le argille possano essere impiegate con successo nella rigenerazione di tessuti che richiedono un'elevata resistenza meccanica,¹²⁸ come tendini, legamenti, muscoli o ossa, ed evidenziano il loro potenziale uso con altri polimeri biocompatibili per altre tecniche di stampa.^{129,130} Inoltre, essi possono ottimizzare il processo di stampa sia attraverso l'aggiunta diretta all'inchiostro di stampa, modificandone ad esempio la reologia o la temperatura di fusione, sia agendo come materiali ausiliari o di supporto durante il processo di stampa.^{124,131}

Un esempio significativo è lo studio condotto da Fakhrullin *et al.*, che hanno sviluppato uno *scaffold* costituito da chitosano, agarosio, gelatina e HNTs per applicazioni nell'ingegneria tissutale (**Figura 18a-b**).¹³² I nanocompositi hanno mostrato essere altamente biocompatibili (*in vitro* e *in vivo*) (**Figura 18c**) e, cosa ancora più importante, che le cellule aderivano saldamente alla sua superficie, favorendo una completa ripresa dell'apporto sanguigno entro 6 settimane (**Figura 18d**).¹³² Un ulteriore esempio significativo riguarda l'idrofilicità e l'adesione cellulare di strutture stampate in PLA, che sono state significativamente migliorate grazie a un rivestimento con HNTs. Infatti, il PLA presenta una scarsa adesione cellulare, in questo caso superata tramite il rivestimento con HNTs per migliorare l'affinità cellulare delle strutture e favorire l'allineamento delle cellule staminali.¹³³

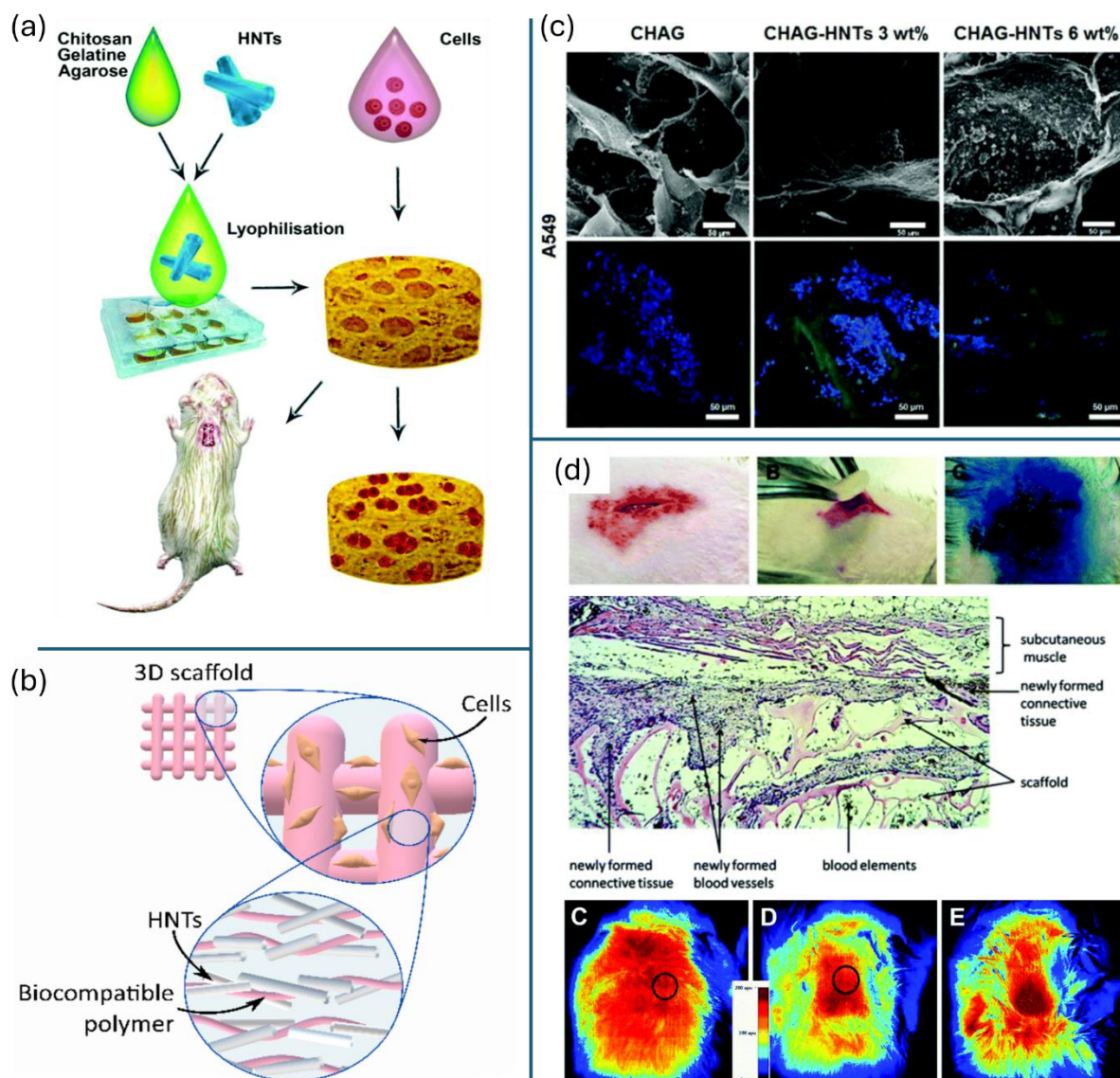


Figura 18. (a) Schema di fabbricazione di *scaffold* a base di halloysite e test di biocompatibilità; (b) effetto delle argille su adesione e allineamento cellulare; (c) immagini SEM e confocali della distribuzione di cellule A549 e Hep3B su *scaffold* 3D porosi; (d) schema dell'impianto sottocutaneo e immagini *Laser Doppler* che mostrano la formazione di nuovo tessuto e il miglioramento della perfusione sanguigna dopo 6 settimane.

Sulla base di queste recenti evoluzioni, durante questi anni sono stati sviluppati e confrontati due diversi approcci per lo sviluppo di nanocompositi a base di chitosano: il *casting* per l'ottenimento di film bidimensionali e la stampa 3D per la produzione di *scaffold* tridimensionali. In un primo caso, sono stati realizzati nanocompositi bidimensionali, nei quali è stato impiegato come *filler* per il chitosano un nanomateriale a base di halloysite e *carbon dots*, simile a quello precedentemente descritto in questo lavoro di tesi. Questi sistemi sono stati oggetto di un'approfondita caratterizzazione chimico-fisica, morfologica e meccanica al fine di valutarne l'idoneità per applicazioni in campo biomedico. Parallelamente, sono stati progettati e sviluppati nanocompositi tridimensionali, sempre a base di chitosano e HNTs-CDs come

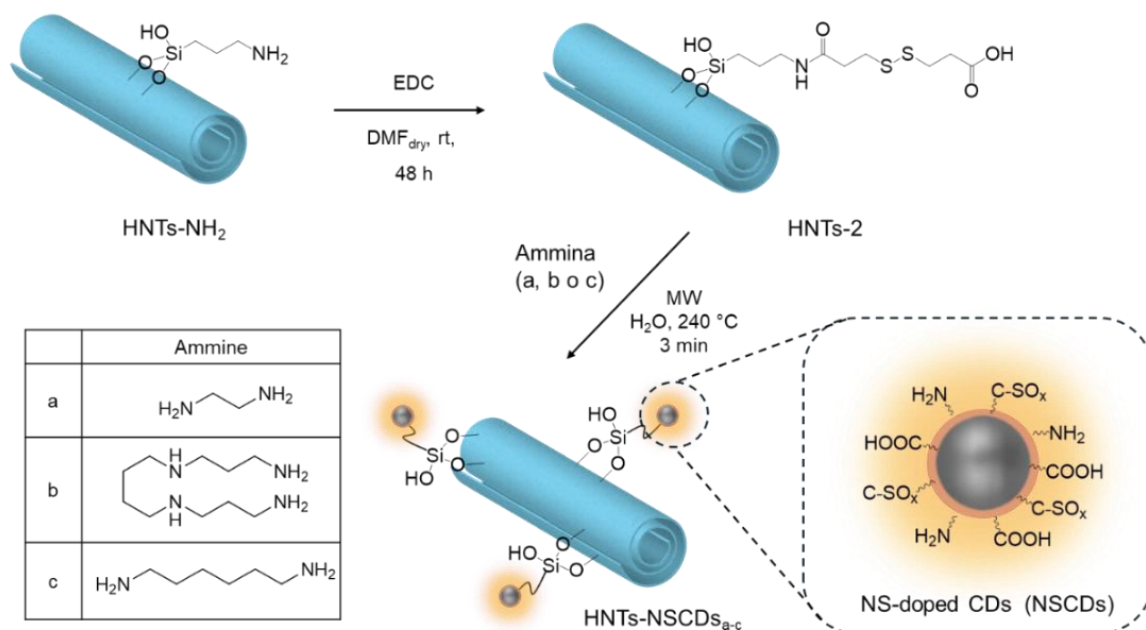
filler, fabbricati mediante tecniche di stampa 3D ad estrusione semisolida (SSE). In questa fase, particolare attenzione è stata rivolta all'ottimizzazione delle proprietà dei *bioink*, ottenuti attraverso l'introduzione di additivi quali la sepiolite, in particolare la PS9, e l'alcool polivinilico. La sezione seguente presenta e discute nel dettaglio i risultati ottenuti, analizzando l'influenza del *filler* e degli additivi sulle proprietà dei nanocompositi sviluppati, con particolare attenzione agli aspetti morfologici, meccanici e adesivi che questi possiedono.

Per l'ottenimento dei nanocompositi a base di chitosano, nell'ottica di migliorare le interazioni tra il *filler* e il polimero, la sintesi del nanomateriale HNTs-CDs è stata effettuata utilizzando una fonte di carbonio, quale l'acido ditiopropionico, in grado di conferire alla superficie dei CDs ulteriori gruppi funzionali. L'inclusione di eteroatomi rappresenta un metodo ottimale per migliorare le proprietà ottiche e le caratteristiche chimiche superficiali dei *carbon dots*.¹³⁴ In particolare, i N- ed S-*doped* CDs suscitano grande interesse grazie alle dimensioni atomiche, agli stati di valenza, nonché all'inerzia chimica e alla bassa tossicità degli atomi di azoto e zolfo.^{135,136} Inoltre, è noto,¹³⁷ che gruppi i solfonici ad esempio (-SO_x), stabiliscono forti interazioni di natura elettrostatica con i gruppi -NH₂ del chitosano, data la carica opposta che questi posseggono. Queste interazioni risultano inoltre maggiormente favorite a pH acidi, condizioni in cui il chitosano risulta maggiormente solubile.¹³⁸

- *Sintesi e caratterizzazione dei nanomateriali HNTs-NSCDs*

La sintesi dei nanomateriali a base di N- ed S-*doped* CDs e HNTs è stata effettuata tramite una procedura a due *step* che ha previsto la formazione di un legame covalente tra l'acido ditiopropionico e i gruppi amminici di un nanomateriale a base di halloysite, precedentemente sintetizzato (HNTs-NH₂) (**Schema 2**).⁸⁰ La reazione di condensazione ammidica, effettuata in presenza di EDC, ha portato all'ottenimento del nanomateriale HNTs-2. Questo ha mostrato una percentuale di funzionalizzazione di 0.28 mmol g⁻¹, che, se confrontata con la percentuale del precursore (0.60 mmol g⁻¹), evidenzia la non completa funzionalizzazione del nanomateriale. Infine, il nanomateriale HNTs-2 è stato sottoposto ad una reazione di pirolisi assistita da MW, a 240 °C per 3 min, in presenza di tre diverse ammine, al fine di ottenere i nanomateriali HNTs-NSCDs_{a-c}. Al termine della reazione i nanomateriali sono stati lavati per centrifugazione diverse volte con acqua ed etanolo per rimuovere tutti i composti non reagiti ed eventuali materiali combusti non covalentemente legati alla superficie esterna degli HNTs. Dall'analisi TGA (**Figura 19a**), effettuata per determinare la percentuale di porzione organica introdotta ad ogni *step* sintetico, è evidente come in seguito al processo di pirolisi la percentuale

di caricamento diminuisca, passando dal 7.2 %p/p di HNTs-2 al 5.5, 5.1 e 5.2 %p/p, rispettivamente per HNTs-NSCDs_a, HNTs-NSCDs_b e HNTs-NSCDs_c.



Schema 2. Rappresentazione schematica della sintesi dei nanomateriali HNTs-2 e HNTs-NSCDs_{a-c}.

Questa diminuzione è in accordo con la formazione di piccoli e uniformi CDs sulla superficie esterna degli HNTs.^{80,139} La riuscita della sintesi è stata confermata mediante analisi FT-IR e XPS. In **Figura 19b** sono riportati gli spettri FT-IR di HNTs-NH₂, HNTs-2 e HNTs-NSCDs_b, usato come modello: dopo la reazione di condensazione tra i gruppi -NH₂ presenti sull'HNT e l'acido ditiopropionico, lo spettro FT-IR di HNTs-2 mostra le tipiche bande vibrazionali di entrambi i precursori¹⁴⁰.

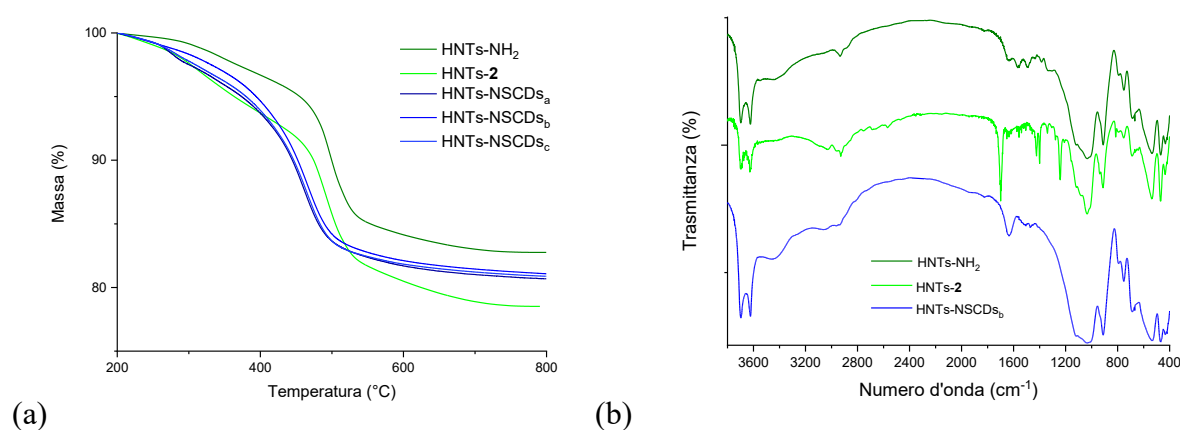


Figura 19. (a) TGA e (b) spettri FT-IR di HNTs-NH₂, HNTs-2 e HNTs-NSCDs_b.

Dopo il processo di pirolisi, lo spettro di HNT-NSCDs_b presenta alcune variazioni indicative di modifiche strutturali, tra cui la scomparsa della banda a circa 1790 cm⁻¹ attribuibile allo *stretching* dei gruppi -COOH e la comparsa di nuove bande tra 1600 e 1400 cm⁻¹, riconducibili ai gruppi funzionali C-N e C=N/C=C dei *carbon dots*. Risultati analoghi sono stati ottenuti per tutti i materiali sintetizzati (**Appendice B, Figura B1**). La presenza di differenti gruppi funzionali sulla superficie dei nanomateriali HNTs-NSCDs è stata determinata tramite XPS.

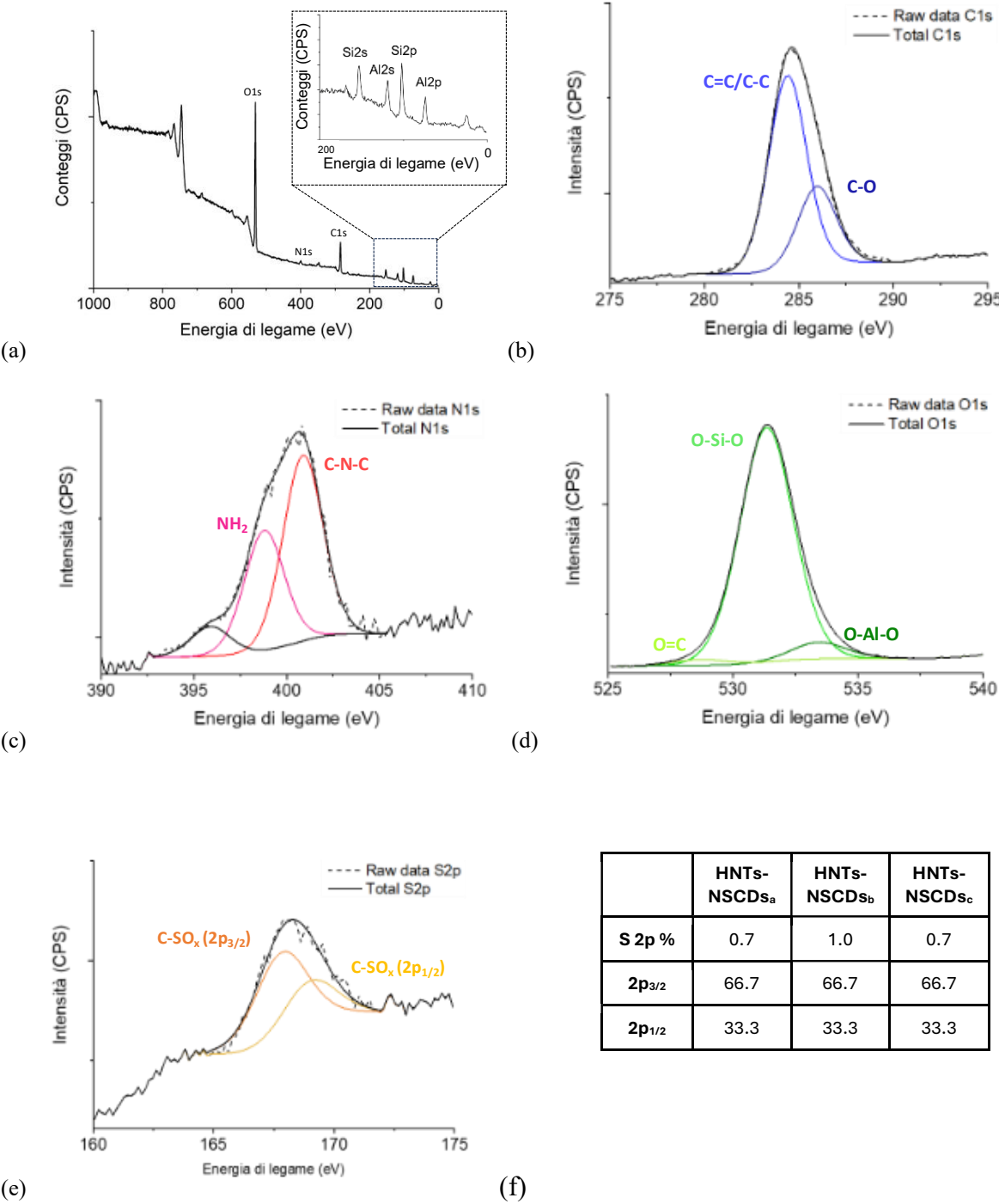


Figura 20. (a) *Survey* XPS del nanomateriale HNTs-NSCDs_a; deconvoluzione dello spettro del (b) C 1s, (c) N 1s, (d) O 1s, (e) S 2p e (f) tabella con il contenuto percentuale di gruppi funzionali dell’S 2p (sp^{1/2} e sp^{3/2}).

Come mostrato in **Figura 20**, nella *survey* di HNT-NSCDs_b si osservano i segnali di C (285.04 eV), N (399.29 eV) e O (531.38 eV); il segnale dello zolfo non è visibile, probabilmente a causa della sua bassa concentrazione. Sono inoltre rilevati picchi relativi ad Al 2s/2p e Si 2s/2p, associati all'halloysite. L'analisi ad alta risoluzione del C 1s (**Figura 20b**) mostra due componenti principali, attribuite ai gruppi C=C (284.4 eV) e C-O (285.8 eV). Dalle deconvoluzione dello spettro O 1s (**Figura 20d**) risultano tre picchi a 528.8, 531.4 e 533.6 eV, associati rispettivamente ai gruppi C=O, O-Si-O e O-Al-O. Il segnale N 1s (**Figura 20c**) evidenzia due contributi a 399.1 e 400.9 eV, corrispondenti ai gruppi -NH₂ e C-N-C, mentre lo spettro S 2p (**Figura 20e**) mostra due picchi a 167.8 e 168.9 eV (sp^{1/2} e sp^{3/2}) relativi a gruppi C-SO_x.¹⁴¹ Come aspettato, l'utilizzo di una fonte carboniosa contenente atomi di S, ha portato all'ottenimento di N- ed S-*doped* CDs, con contenuti percentuali di S (**Figura 20f**) e N diversi a seconda del precursore utilizzato. Nel complesso, i risultati XPS confermano che tutti i nanomateriali sintetizzati presentano diversi gruppi funzionali sulla superficie, con contenuti variabili in funzione degli acidi carbossilici o delle ammine utilizzati come precursori (**Appendice B, Figura B2-B3**).

L'analisi al DLS dei nanomateriali HNTs-NSCDs ha permesso di valutare la loro mobilità acquosa. La funzionalizzazione dell'halloysite con l'acido ditiopropionico (HNTs-2) determina un rallentamento della diffusione acquosa dei nanotubi, come dimostrato dall'incremento dei diametri idrodinamici apparenti rispetto a quelli osservati per l'halloysite non modificata (295 ± 16 per HNTs e 753 ± 23 per HNTs-2). Tale comportamento può essere attribuito alla formazione di interazioni idrofobiche tra le porzioni organiche introdotte covalentemente sulla superficie esterna del nanotubo.⁸² La presenza dei gruppi carbossilici, inoltre, come evidenziato dai valori di potenziale-ζ, comporta un leggero aumento della carica negativa superficiale dell'halloysite (-22.5 ± 0.5 mV) rispetto agli HNTs non modificati (-18.0 ± 1.0). Per quanto riguarda i campioni HNTs-NCDs, i valori di potenziale-ζ risultano -19.2 ± 0.3, -19.7 ± 3.4 e -23.2 ± 0.6 mV, rispettivamente per, HNTs-NSCDs_a, HNTs-NSCDs_b e HNTs-NSCDs_c. Inoltre, è stato osservato che questi ultimi presentano diametri idrodinamici inferiori rispetto al precursore (rispettivamente 507 ± 78, 575 ± 53 e 479 ± 34 nm), indicando che il processo di pirolisi assistita da microonde favorisce un incremento della mobilità acquosa dei nanotubi modificati, come già osservato per sistemi simili.⁸²

Infine, come ultima caratterizzazione dei nanomateriali, sono state effettuate delle analisi morfologiche tramite HAADF-STEM, sul nanomateriale HNTs-NSCDs_b utilizzato come modello. In **Figura 21a** sono riportate le immagini HAADF-STEM di HNTs-NSCDs_b; come è possibile osservare, il processo di pirolisi a 240 °C ha mantenuto inalterata la tipica struttura

tubulare dei nanotubi che appaiono agglomerati, per via delle interazioni tra i diversi HNTs-NSDCs_b. Le analisi EDX hanno evidenziato la presenza di atomi di C e N, riconducibili alle porzioni organiche legate alla superficie degli HNTs, oltre agli elementi tipici dell'argilla, ossia Si, Al e O (**Figura 21c**). Inoltre, la mappatura elementare ottenuta dall'analisi EDX indica una distribuzione omogenea degli NSCDs lungo tutta la superficie dell'halloysite (**Figura 21b**).

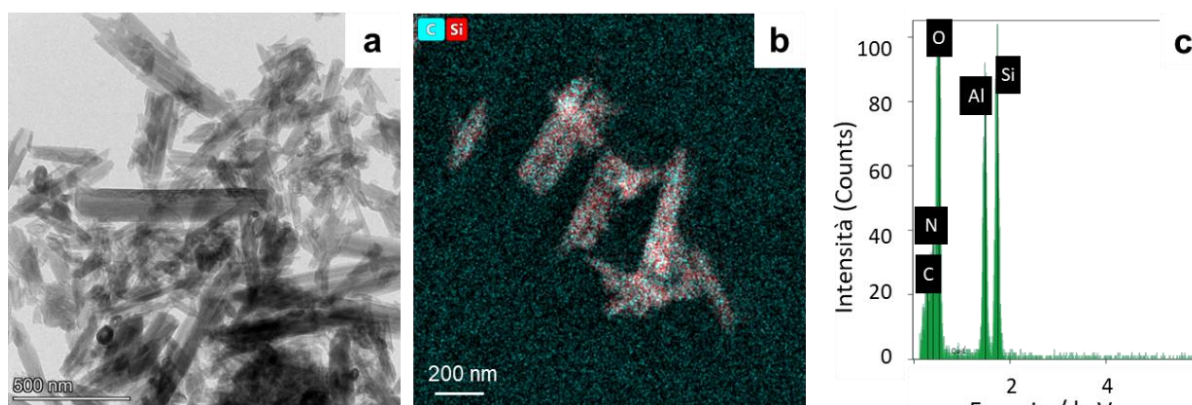


Figura 21. (a) Immagine HAADF/STEM del nanomateriale HNTs-NSCDs_b; (b) immagine della mappatura elementare estrapolata dall'analisi EDX (c).

- *Proprietà foto-fisiche dei nanomateriali HNTs-NSCDs*

Dal punto di vista ottico, i nanomateriali ottenuti impiegando una diversa sorgente di carbonio, quale l'acido ditiopropionico, presentano un comportamento simile ai sistemi precedentemente descritti. In particolare, mostrano un marcato assorbimento nella regione dell'ultravioletto (**Appendice B, Figura B4**) e un'emissione fotoluminescente modulabile in funzione della lunghezza d'onda di eccitazione, sia in soluzione (**Appendice B, Figura B4**) che allo stato solido (**Figura 22 e Appendice B, B5**).

Queste proprietà abbiamo visto essere di notevole interesse, in quanto sono proprio quelle responsabili dell'effetto foto-protettivo che questo tipo di nanomateriale potrebbe conferire ai materiali polimerici. In particolare, si può ipotizzare che l'integrazione di tali nanomateriali in matrici a base di chitosano consenta di ottenere nanocompositi capaci di schermare efficacemente le radiazioni UV, migliorando la stabilità fotochimica e preservando le prestazioni del materiale. A supporto di questa ipotesi, è stato già dimostrato che, nel caso di matrici a base di alginato, l'esposizione a radiazione UV non comporta variazioni significative delle proprietà meccaniche; è quindi verosimile che un comportamento analogo possa essere osservato anche per i sistemi a base di chitosano.

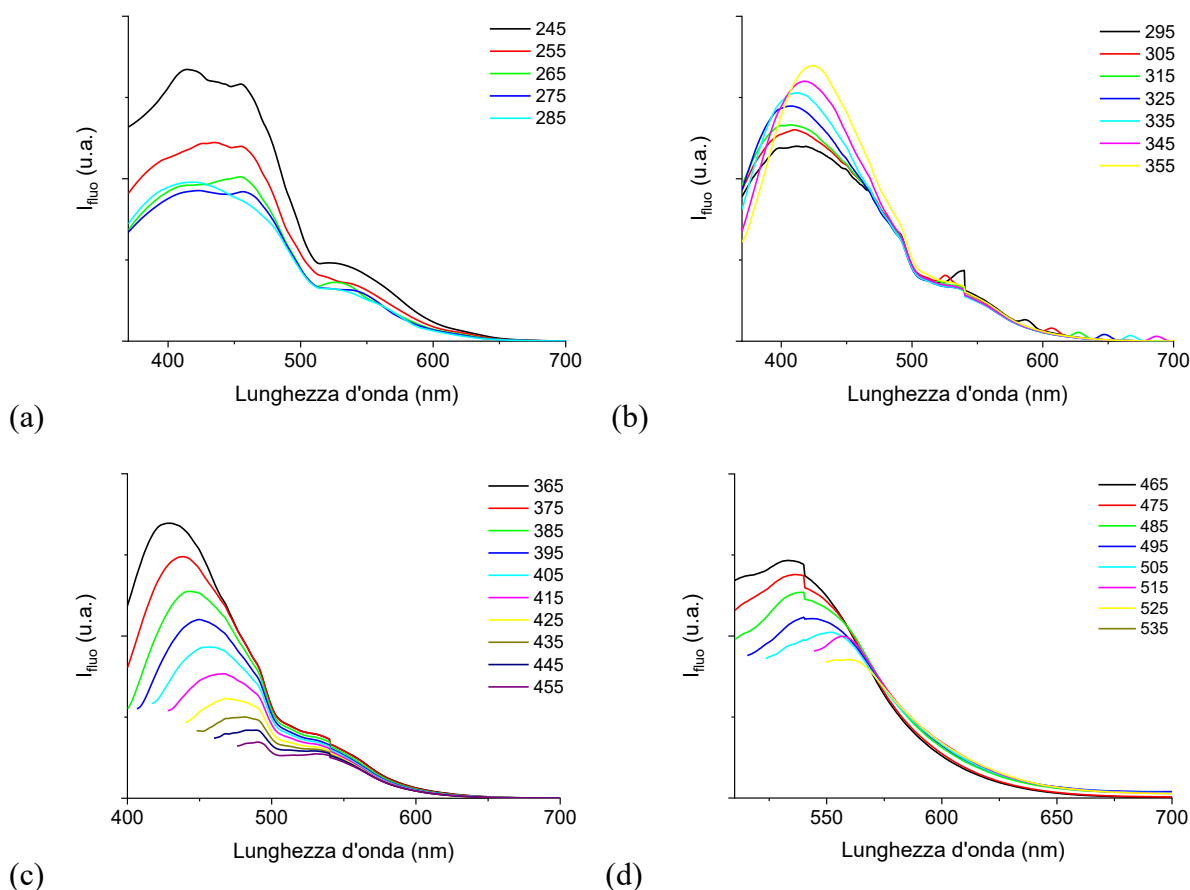


Figura 22. Spettri di fluorescenza allo stato solido di HNTs-NSCDs_b a diverse lunghezze d'onda di eccitazione.

Nell'ottica di esplorare appieno le potenzialità di questi nanomateriali, è stato inoltre valutato il loro comportamento come sistemi *carrier*, ampliando ulteriormente le possibili applicazioni di questi nanomateriali come *filler* per nanocompositi. A tal fine, è stato scelto come molecola modello il metotressato (MTX), un farmaco idrofobico, che è già stato utilizzato come farmaco modello per altri sistemi a base di halloysite modificata.¹⁴²

- *Caricamento e studio della cinetica di rilascio di MTS da HNTs-NSCDs*

Per effettuare questo studio è stato utilizzato come modello il nanomateriale HNTs-NSCDs_b, che in seguito al caricamento del farmaco, ha portato all'ottenimento del nanomateriale HNTs-NSCDs_b/MTX. Il nanomateriale in questione è stato sintetizzato secondo una metodologia riportata in letteratura,¹⁴² che ha previsto l'aggiunta di una soluzione concentrata di MTX in miscela MeOH/DMSO (1:1) (10^{-2} M) ad una dispersione acquosa di HNTs-NSCDs_b. Dopo aver effettuato tre cicli di vuoto la dispersione è stata lasciata ad agitare per 16 h e, dopo il *work-up*, le acque di lavaggio lette all'UV-vis per determinare la percentuale di caricamento del farmaco

che è risultata essere del 2.2 %p/p, con un'efficienza di caricamento del 34 %. Una volta caricato il farmaco e determinata la sua percentuale di caricamento, è stata studiata la cinetica di rilascio dell'MTX dal *carrier*, utilizzando il metodo della membrana da dialisi e simulando delle condizioni fisiologiche (pH 7.4 a 37 °C). In **Figura 23** è riportata la percentuale di farmaco rilasciata in funzione del tempo. Come è possibile osservare, il metotressato viene rilasciato dal nanomateriale in maniera lenta e costante, infatti, solo il 70 %p/p di questo viene rilasciato dopo 24 h.

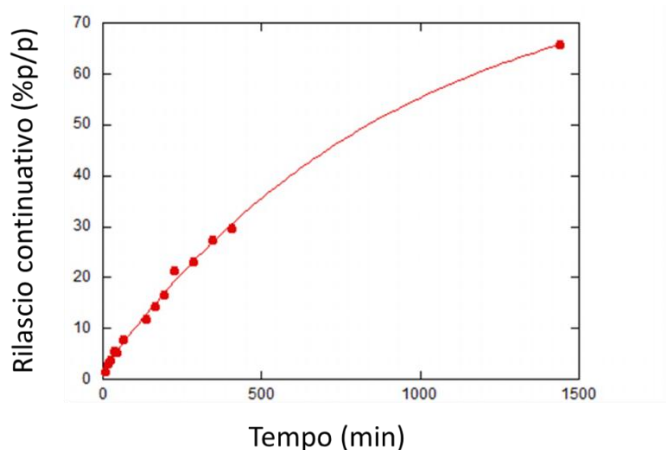


Figura 23. Cinetica di rilascio di MTX dal nanomateriale HNTs-NSCDsb/MTX a pH 7.4 a 37 °C.

I dati sperimentali sono stati analizzati utilizzando diversi modelli matematici di rilascio. La regressione non lineare ha evidenziato come il modello cinetico di primo ordine descriva più accuratamente il comportamento osservato ($k = 0.00108 \pm 0.00006 \text{ min}^{-1}$; $R^2 = 0.99759$). Tale modello suggerisce che il rilascio avvenga principalmente per diffusione del farmaco dal lume dei nanotubi, in linea con quanto riportato per sistemi analoghi. Questi risultati assumono particolare importanza in vista della futura realizzazione di nanocompositi a base di chitosano, poiché dimostrano come il *filler* sviluppato non sia soltanto un elemento strutturale o fotoprotettivo, ma possa anche svolgere un ruolo attivo come sistema di incapsulamento e rilascio di molecole bioattive. L'efficace caricamento del metotressato e il suo rilascio graduale suggeriscono infatti che, una volta incorporato in matrici polimeriche, questo nanomateriale potrebbe contribuire a modulare la disponibilità del principio attivo nel tempo, ampliando così le potenzialità applicative dei futuri materiali compositi. Inoltre, è verosimile ipotizzare che tale rilascio possa essere ulteriormente modulato, poiché è noto che l'inclusione dei *filler* all'interno di matrici polimeriche tende a rallentare la diffusione del farmaco. Ciò avviene sia per la maggiore tortuosità del percorso di diffusione attraverso la rete polimerica, sia per le possibili interazioni tra il principio attivo e il polimero stesso, che ne ostacolano la migrazione verso

l'ambiente esterno, consentendo un rilascio ancora più controllato e prolungato nel tempo. A tal fine sono stati prodotti dei nanocompositi a base di chitosano, partendo da materiali semplici da ottenere, come i film bidimensionali.

- *Sviluppo di nanocompositi bidimensionali*

Per lo sviluppo di nanocompositi bidimensionali, tra tutti i nanomateriali sintetizzati. HNTs-NSCDs_b, da ora in poi chiamato HNTs-CDs per semplicità, è stato scelto come modello per via delle migliori proprietà chimico-fisiche. Oltre allo sviluppo del nanocomposito CS/HNTs-CDs, per investigare l'effetto delle modifiche effettuate sulla superficie esterna degli HNTs, anche in questo caso è risultato essenziale preparare e studiare i due film di controllo, CS/HNTs e CS (Figura 24). La preparazione dei film è stata effettuata seguendo una procedura descritta in letteratura,¹⁴³ che ha previsto la dispersione del *filler* in una soluzione di acido acetico al 3.0 %v/v, e la successiva aggiunta del CS (2.0 %p/p). Dopo 16 h di agitazione la dispersione è stata trasferita in una *petri* e lasciata in stufa sottovuoto a 30 °C per 48 h, per evitare la formazione di bolle. Come è possibile osservare dalla **Figura 24**, il film di solo CS è l'unico che, visibilmente, ha presentato la presenza di bolle d'aria, e l'unico che mantiene una buona trasparenza, al contrario dei film CS/HNTs e CS/HNTs-CDs che risultano molto più omogenei e opachi.

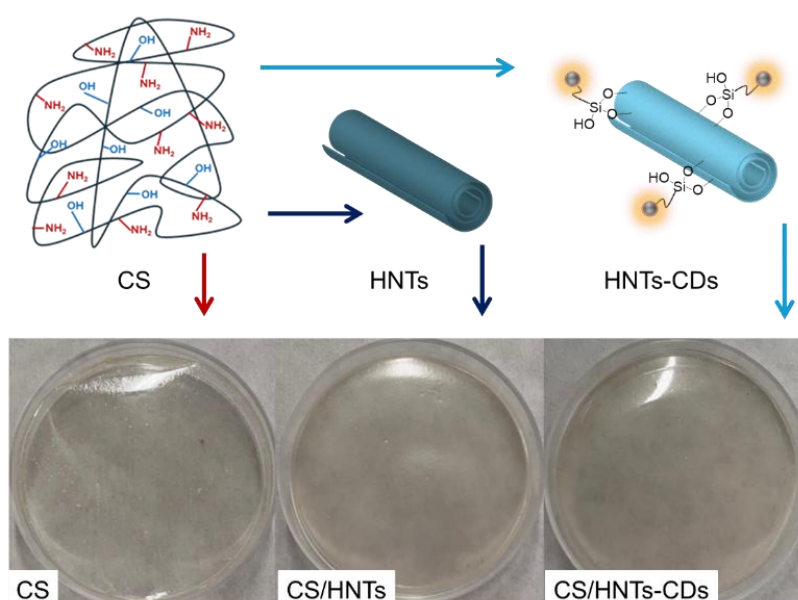
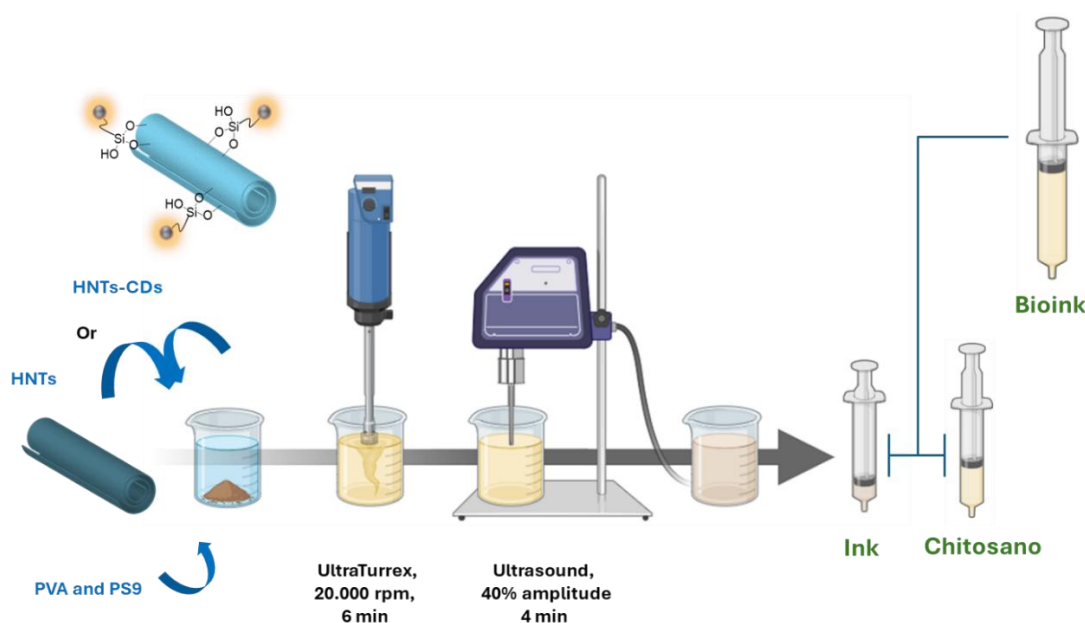


Figura 24. Schema rappresentativo della formazione dei nanocompositi CS/HNTs-CDs, CS/HNTs e CS, con immagini reali dei film ottenuti.

Parallelamente allo sviluppo dei nanocompositi 2D, è stata investigata la stampa 3D ad estrusione semisolida, come tecnica innovativa ed alternativa per l'ottenimento di nanocompositi.

- *Sviluppo di nanocompositi tridimensionali tramite stampa 3D*

Per l'ottenimento dei nanocompositi 3D, è stato dapprima sviluppato un *bioink* multifase costituito da due componenti principali: una fase polimerica idrofila a base di PVA e sepiolite (PS9), e una fase polisaccaridica a base di chitosano (**Schema 3**), successivamente combinati in una proporzione definita per ottenere la miscela finale destinata alla stampa 3D. La prima fase è stata ottenuta a partire da una soluzione acquosa di PVA al 10 %p/p, alla quale è stato aggiunto propilenglicole come plastificante per migliorare la flessibilità del *network* polimerico e modulare il comportamento viscoelastico dell'inchiostro.¹⁴⁴ A questa è stata aggiunta la PS9 in una concentrazione pari a 8 %p/p rispetto alla soluzione di PVA. Il PVA svolge un ruolo essenziale sia nel garantire la corretta viscosità del sistema, indispensabile per l'estrusione controllata durante il processo di stampa, e, inoltre, la sua natura filmogena contribuisce alla formazione di una rete polimerica omogenea, favorendo una dispersione uniforme dei *filler* all'interno del polimero.¹⁴⁵ La sepiolite, infine, contribuisce ad aumentare la viscosità della soluzione e a migliorarne la stabilità colloidale.¹⁴⁶

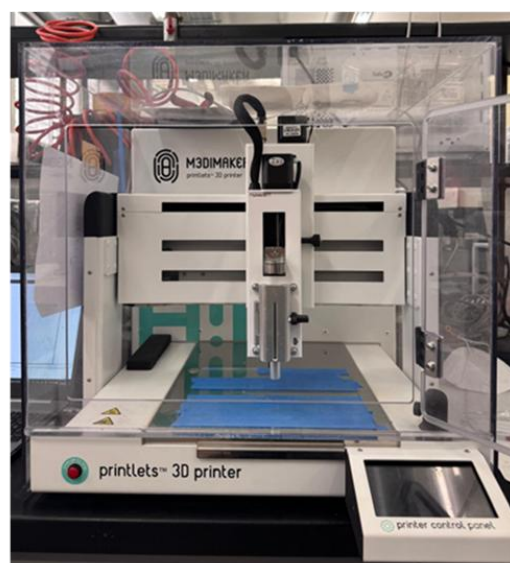


Schema 3. Rappresentazione schematica dello sviluppo della prima fase dell'Ink e formazione del *bioink* a base di CS.

Una volta prodotto l'inchiostro di base (PVA/PS9), sono stati prodotti gli altri due inchiostri, incorporando il nanomateriale HNTs-CDs o l'HNTs come *filler* (1.0 %p/p) insieme alla sepiolite per essere efficacemente dispersi durante le fasi di omogenizzazione all'Ultraturrax e dispersione agli ultrasuoni (**Schema 3**). La seconda fase del *bioink*, costituita da una soluzione di chitosano al 6 %p/p (CS), rappresenta il componente principale del nanocomposito. Una volta preparate le due diverse fasi si è proceduto con la progettazione del modello 3D. La fase di progettazione ha previsto la realizzazione di un modello tridimensionale, in ambiente CAD, che è stato successivamente convertito in un file compatibile con la stampa 3D e tradotto in un file *G-code*. I nanocompositi 3D, con forma rettangolare (15 × 30 mm e 1 mm di altezza) e composti da due strati, sono stati realizzati utilizzando un ago da 0.6 mm su substrati di vetro, mantenendo tutto il sistema a 25 °C. Tutti gli altri parametri di stampa sono riportati in **Figura 25a**. Una volta ottimizzati i parametri si è proceduto con la stampa dei nanocompositi. Per ottenere il *bioink* finale, le due fasi precedentemente descritte sono state combinate in un rapporto 1:3. Prima della stampa, alla soluzione di chitosano è stata aggiunta una soluzione di trietanolammina (15 %v/v),¹⁴⁷ un agente reticolante in grado di promuovere la formazione di legami intermolecolari per la formazione del polimero.¹⁴⁸ Questo passaggio preliminare è cruciale poiché consente di migliorare la coesione del *bioink* in tutti i suoi componenti. Il *bioink* così ottenuto è stato caricato nella stampante 3D (M3DIMAKER 1), equipaggiata con una testina di estrusione semisolidi, appositamente progettata per la deposizione di inchiostri ad alta viscosità (**Figura 25b**).

Parametri di stampa ^a	Valori
Layer height (mm)	0.5
First layer height (mm)	0.5
First diameter (mm)	10
Extrusion multiplier	4
Fill angle (°)	45
Extrusion width (%)	100
First layer speed (mm/s)	10
Perimeters speed (mm/s)	15
Infill speed (mm/s)	10
Extrusion pressure (N)	2
Extrusion pressure (N)	5
Extrusion speed (mm/min)	60

(a) ^a Il nome dei parametri è stato lasciato invariato rispetto alle indicazioni del software.



(b)

Figura 25. (a) tabella con tutti i parametri di stampa utilizzati per l'ottenimento dei nanocompositi; (b) fotografia della stampante 3D e dell'estrusore utilizzato.

Al termine del processo, i nanocompositi ottenuti, chiamati CS/PVA/PS9-HNTs-CDs, CS/PVA/PS9/HNTs e CS/PVA/PS9 (questi ultimi due utilizzati come controllo) sono stati sottoposti a un trattamento di post-reticolazione immergendoli nuovamente in soluzione di trietanolammina, e lavati con acqua per rimuovere l'eccesso di reagente. I campioni così preparati (**Figura 26**) sono stati infine conservati a 4 °C prima delle successive analisi. La deposizione uniforme del materiale e l'assenza di difetti macroscopici (**Figura 26**) indicano che la combinazione dei componenti selezionati garantisce la formazione di strutture tridimensionali stabili, un aspetto fondamentale per applicazioni biomedicali che richiedono un controllo accurato della forma e della distribuzione interna del materiale.

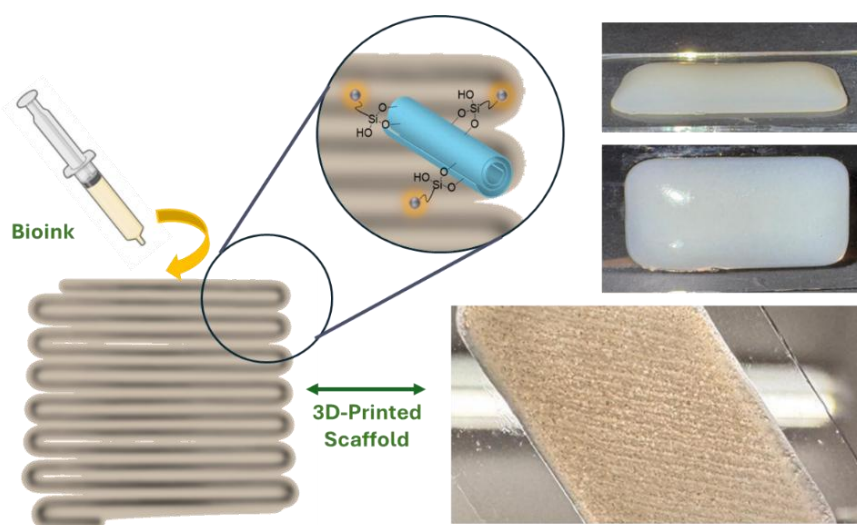


Figura 26. Rappresentazione schematica della struttura del nanocomposito e immagine reale della struttura tridimensionale ottenuta.

- *Caratterizzazione chimico fisica dei nanocompositi bi- e tridimensionali e analisi morfologica*

Una volta ottenuti i nanocompositi, sia 2D che 3D, sono state innanzitutto analizzate le loro proprietà fisiche, al fine di evidenziare eventuali differenze derivanti dalle due tecniche di fabbricazione impiegate. La **Tabella 5** riporta le proprietà fisiche dei nanocompositi ottenuti. Come si può osservare, nei nanocompositi 2D l'introduzione di HNTs ha comportato un aumento dello spessore del film Chit/HNTs, mentre l'aggiunta del 5 %p/p del nanomateriale HNTs-CDs ha determinato una diminuzione dello spessore del film Alg/HNTs-CDs. Al contrario, nei nanocompositi 3D si è osservata una tendenza all'aumento dello spessore a seguito dell'aggiunta sia di HNTs che di HNTs-CDs. Questo risultato, insieme alle differenze

riscontrate tra i due tipi di nanocompositi, potrebbe essere attribuito alle diverse interazioni tra i *filler* HNTs o HNTs-CDs e il CS nel caso dei nanocompositi 2D, oppure tra i *filler* e la PS9, oltre che con il CS, nei nanocompositi 3D, come evidenziato anche dallo studio condotto sui nanocompositi a base di alginato. Per valutare la riproducibilità delle due tecniche è stato preso in considerazione il peso dei nanocompositi ottenuti, evidenziando come la stampa 3D presenti una maggiore riproducibilità rispetto al metodo del *casting*, come dimostrato dalla bassa deviazione standard dei valori misurati (**Tabella 5**). Nel caso dei nanocompositi tridimensionali è stato inoltre determinato il contenuto di umidità percentuale (MC %), che si attesta intorno al 78 % per tutte le formulazioni (**Tabella 5**), e risulta particolarmente rilevante poiché fornisce informazioni sull'omogeneità del *bioink* e dei nanocompositi ottenuti.¹⁴⁹

Tabella 5. Spessore, peso e MC% dei nanocompositi bi- e tridimensionali con deviazioni standard.

Nanocompositi	Spessore (mm) ^a	Peso (mg) ^a	MC (%) ^b
Casting			
CS	0.078 ± 0.010	222.6 ± 6.4	-
CS/HNTs	0.102 ± 0.004	237.0 ± 9.7	-
CS/HNTs-CDs	0.090 ± 0.005	233.3 ± 13.2	-
Stampa 3D			
CS/PVA/PS9	1.36 ± 0.08	603.9 ± 1.7	78.1 ± 1.9
CS/PVA/PS9/HNTs	1.60 ± 0.08	600.8 ± 1.6	78.5 ± 0.6
CS/PVA/PS9/HNTs-CDs	1.71 ± 0.07	605.3 ± 1.9	78.5 ± 1.5

- le deviazioni standard sono state condotte su ^a 10 campioni, ^b 3 campioni

La caratterizzazione chimico-fisica dei nanocompositi è stata condotta utilizzando tre principali tecniche: FT-IR, TGA e DSC. In **Figura 27** è riportato lo spettro FT-IR dei nanocompositi 2D. Come si può osservare, gli spettri presentano un'ampia banda intorno a 3292 cm⁻¹, attribuibile alle vibrazioni di *stretching* dei gruppi -OH, sovrapposte a quelle del legame N-H dei gruppi amminici. Le bande a 2921 e 2878 cm⁻¹ sono invece riconducibili alle vibrazioni di *stretching* dei gruppi metilenici (-CH₂) e metilici (-CH).¹⁵⁰ Ulteriori segnali a 1624, 1544, 1320 e 1257 cm⁻¹ possono essere associati rispettivamente alla vibrazione di *stretching* del legame C=O (amide I), alla vibrazione di *bending* del legame N-H (amide II) e alle vibrazioni di *stretching* dei legami C-N e N-H (amide III), caratteristiche del chitosano.¹⁵¹ La banda a 1405 cm⁻¹ è invece riferibile alle vibrazioni di *stretching* simmetriche e asimmetriche del gruppo

carbossilato ($-\text{COO}^-$),¹⁵² mentre quelle intorno a 1198 e 1040 cm^{-1} sono attribuite alle vibrazioni di *stretching* del legame C-O.¹⁵³

Segnali analoghi sono stati osservati anche negli spettri dei nanocompositi 3D (**Appendice B, Figura B6**), nei quali tuttavia compare una banda aggiuntiva a 1733 cm^{-1} , associata alla vibrazione di *stretching* del gruppo carbonilico ($\text{C}=\text{O}$) per PVA.¹⁵⁴ I risultati di questa analisi indicano che l'aggiunta dei *filler* HNTs o HNTs-CDs non altera in modo significativo la struttura del polimero. Tuttavia, in accordo con quanto riportato in letteratura, considerando la ridotta quantità di nanomateriale introdotta si osservano lievi variazioni nell'intensità di alcuni picchi (indicati dalle frecce in **Figura 27**).¹⁵⁵ Queste variazioni sono probabilmente attribuibili a interazioni fisiche, da parte degli HNTs e dei CDs covalentemente legati alla superficie esterna nel caso del nanomateriale HNTs-CDs, come legami a idrogeno o forze di van der Waals, tra i gruppi funzionali dei *filler* e il chitosano.¹⁵⁶

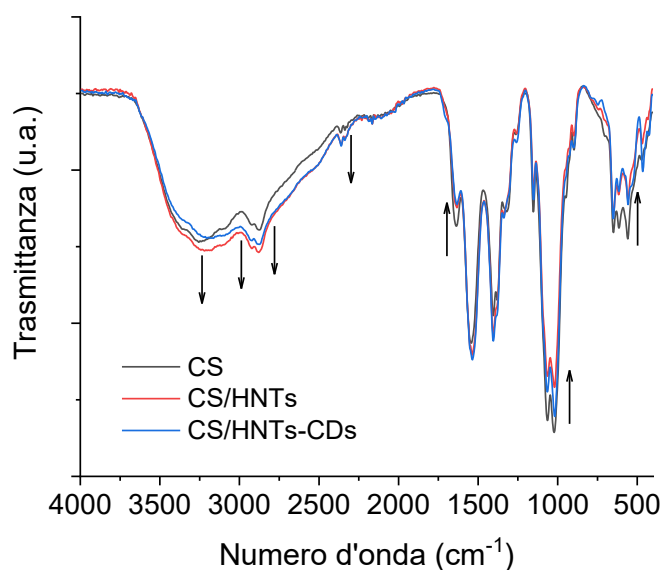


Figura 27. Spettro FT-IR dei nanocompositi 2D di CS, CS/HNTs e CS/HNTs-CDs.

Dai termogrammi dei nanocompositi (**Figura 28**) è possibile osservare il profilo di degradazione del polimero, che avviene in quattro stadi distinti.¹⁵⁷ Il primo stadio ($30\text{--}150\text{ }^{\circ}\text{C}$) è associato alla perdita di acqua debolmente legata e di alcune sostanze volatili. Il secondo stadio ($150\text{--}230\text{ }^{\circ}\text{C}$) è attribuito alle reazioni di deaminazione e disidratazione del chitosano. Il terzo stadio ($230\text{--}380\text{ }^{\circ}\text{C}$) riguarda la degradazione della catena principale del polimero e la scissione dei legami glicosidici $\text{C}-\text{O}-\text{C}$. Infine, il quarto stadio ($380\text{--}900\text{ }^{\circ}\text{C}$) è associato alla degradazione ossidativa dei residui carboniosi formatisi durante la fase precedente.^{157,158} Per

quanto riguarda i nanocompositi 2D (**Figura 28**), l'introduzione dei due *filler*, HNTs o HNTs-CDs, porta a una riduzione del residuo fisso a 900 °C rispetto al chitosano puro.

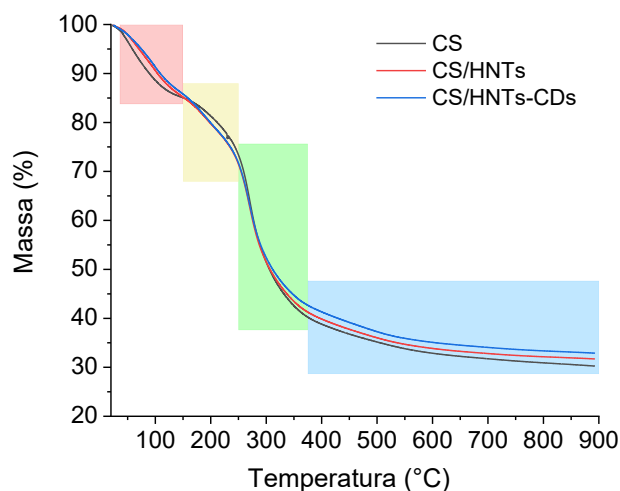


Figura 28. TGA dei nanocompositi 2D di CS, CS/HNTs e CS/HNTs-CDs.

Nel secondo stadio, inoltre, le reazioni di deacetilazione e deidrossilazione del chitosano avvengono leggermente più rapidamente rispetto al polimero puro. Ciò può essere attribuito alla presenza di interazioni tra i gruppi funzionali dei nanomateriali e quelli del polimero, che risultano maggiormente esposti.¹⁵⁹ e al fatto che i nanomateriali limitano la mobilità delle catene polimeriche riducendo il rilascio di prodotti volatili di degradazione, come evidenziato dalla minore perdita di massa osservata nel primo stadio di degradazione.⁶⁵

Le stesse considerazioni possono essere estese anche ai termogrammi dei nanocompositi 3D (**Figura 29**), nei quali, tuttavia, si osserva una perdita di massa sensibilmente più contenuta per il nanocomposito CS/PVA/PS9/HNTs rispetto al riferimento CS/PVA/PS9.

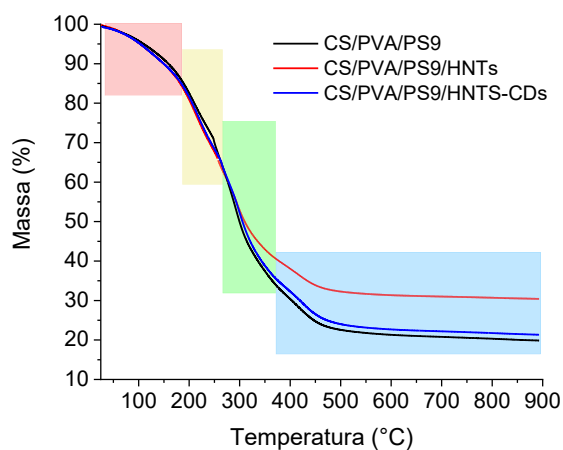


Figura 29. TGA dei nanocompositi 3D di CS/PVA/PS9, CS/PVA/PS9/HNTs e CS/PVA/PS9/HNTs-CDs

Questo oltre alla ridotta mobilità delle catene del CS, potrebbe essere dovuto alla formazione di aggregati da parte degli HNTs, con formazione di zone termicamente più stabili.¹⁵⁸ In questi termogrammi, inoltre, si può notare rispetto ai termogrammi dei nanocompositi 2D uno spostamento del primo stadio di degradazione, che si estende fino a circa 180 °C, mentre il secondo stadio risulta ridotto e compreso tra 180 e 250 °C. Queste variazioni indicano un'evoluzione differente del processo di degradazione termica rispetto al chitosano puro, suggerendo un effetto diretto delle interazioni tra il polimero, il *filler*, il PVA e la PS9 sulle cinetiche di decomposizione.^{160,161} Al contrario, il nanocomposito 3D CS/PVA/PS9/HNTs-CDs mostra una degradazione più marcata. Tale effetto può essere ricondotto alle interazioni tra i gruppi funzionali dei *carbon dots*, presenti sulla superficie esterna delle HNTs, e quelli del polimero, che favoriscono la formazione di una struttura più omogenea e, di conseguenza, facilitano un processo di degradazione più completo e uniforme.^{162,163} Dall'analisi DSC dei nanocompositi bidimensionali (**Figura 30a**) si osservano, per tutti e tre i materiali, due distinti picchi endotermici, attribuibili rispettivamente alla perdita di acqua fortemente legata e alla transizione vetrosa (T_g). I valori di entalpia totale (ΔH_{tot}) associati a tali transizioni sono riportati nella **Tabella 6**, mentre in **Appendice B, Tabella B1** sono mostrati i corrispondenti valori di entalpia specifica (ΔH_s). Come si può osservare, l'aggiunta di halloysite determina una riduzione di ΔH_{tot} di circa il 17 %, probabilmente dovuta alle interazioni tra il *filler* e il polimero.¹⁶⁴ Tale comportamento è coerente con la diminuzione della T_g da 188 °C a 183 °C, suggerendo che i nanotubi, come riportato in letteratura, possano abbassare l'energia di attivazione della cristallizzazione e favorire la formazione di agglomerati che riducono così la cristallinità finale del sistema (da +12.91 a +10.72 J, passando dal CS al CS/HNTs).¹⁶⁴⁻¹⁶⁶

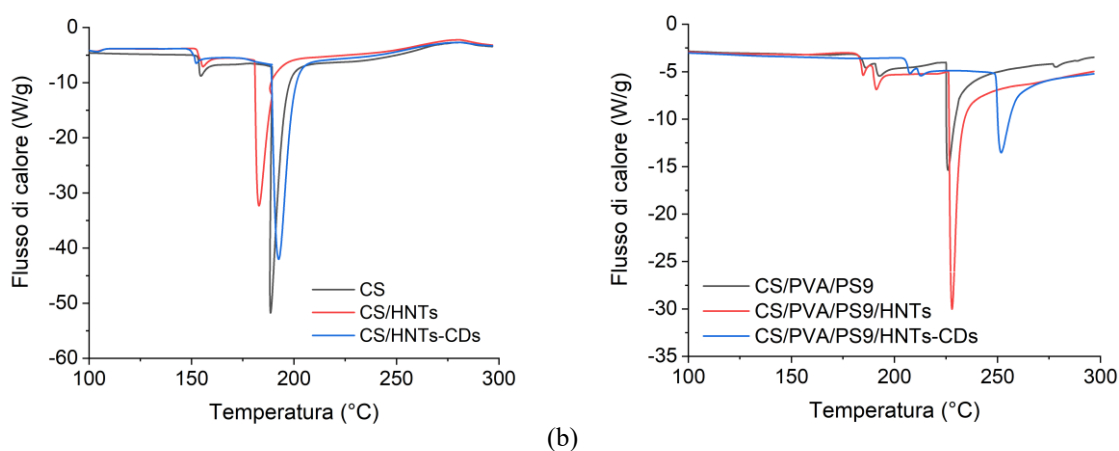


Figura 30. DSC dei nanocompositi (a) bidimensionali e (b) tridimensionali.

L'inclusione del nanomateriale HNTs-CDs comporta invece uno spostamento del picco di transizione vetrosa verso temperature più elevate (193 °C), indice di una maggiore stabilità termica. In questo caso, il valore di ΔH_{tot} risulta superiore a quello del nanocomposito CS/HNTs, pur restando inferiore a quello del chitosano puro, suggerendo un parziale recupero della cristallinità,¹⁶⁷ e garantendo così un buon compromesso tra stabilità termica e grado di ordine strutturale del CS.¹⁶⁸

Tabella 6. Valori di ΔH_{tot} calcolati per i nanocompositi 2D e 3D.

Casting			
	CS	CS/HNTs	CS/HNTs-CDs
ΔH_{tot} (J)	+12.91	+10.72	+11.13
Stampa 3D			
	CS/PVA/PS9	CS/PVA/PS9/HNTs	CS/PVA/PS9/HNTs-CDs
ΔH_{tot} (J)	+4.01	+7.46	+3.74

Al contrario, i nanocompositi tridimensionali (**Figura 30b**) mostrano picchi endotermici spostati verso temperature più elevate rispetto ai nanocompositi bidimensionali. Tra i sistemi 3D, il campione CS/PVA/PS9/HNTs presenta il valore di ΔH_{tot} (**Tabella 6**) più elevato, mentre il nanocomposito CS/PVA/PS9/HNTs-CDs mostra il valore di ΔH_{tot} più basso e la Tg più alta, coerentemente con una maggiore resistenza termica e un'organizzazione polimerica più ordinata rispetto al primo. Nel complesso, questi risultati confermano che i materiali ottenuti tramite stampa 3D presentano una stabilità termica e un'organizzazione strutturale superiore rispetto a quelli preparati per *casting*.

Tali effetti non sono tuttavia attribuibili unicamente al processo di produzione, poiché la presenza di PVA, contribuisce ad aumentare la coesione del CS e a innalzare la Tg.^{169,170} Allo stesso modo, la sepiolite, grazie alla sua morfologia fibrosa potrebbe allineare le catene polimeriche e migliorarne ulteriormente la stabilità termica.^{171,172} In questo contesto, il *filler* HNTs-CDs svolge però un ruolo chiave nell'amplificare questi effetti sinergici, migliorando le proprietà termiche di entrambe le forme nanocomposite. Sulla base di queste evidenze, sono state effettuate delle analisi morfologiche per approfondire l'organizzazione strutturale dei nanocompositi.

- *Analisi morfologiche dei nanocompositi 2D e 3D*

L'analisi morfologica dei nanocompositi bidimensionali è stata condotta mediante AFM operando in *tapping mode*, con l'obiettivo di valutare l'effetto dell'introduzione del *filler* nella struttura polimerica e sull'organizzazione superficiale del nanocomposito. La **Figura 31** mostra le immagini AFM dei film acquisite a differenti ingrandimenti (5 μm e 2 μm). Nel campione CS/HNTs (**Figure 31b-c**) sono chiaramente visibili strutture allungate sulla superficie, attribuibili ai nanotubi di halloysite, indicativi di una parziale segregazione superficiale del *filler*. Al contrario, nel campione CS/HNTs-CDs (**Figure 31e-f**) la superficie appare più omogenea e priva di rilievi riconducibili ai nanotubi, con una morfologia che si avvicina a quella del chitosano puro (**Figure 31a-b**), suggerendo una dispersione più uniforme e un'efficace internalizzazione del materiale all'interno della matrice polimerica.¹⁷³ Queste osservazioni morfologiche sono coerenti con i risultati spettroscopici e termici, che indicano interazioni *filler*-polimero più intense e una struttura più ordinata nel sistema contenente il nanomateriale HNTs-CDs.

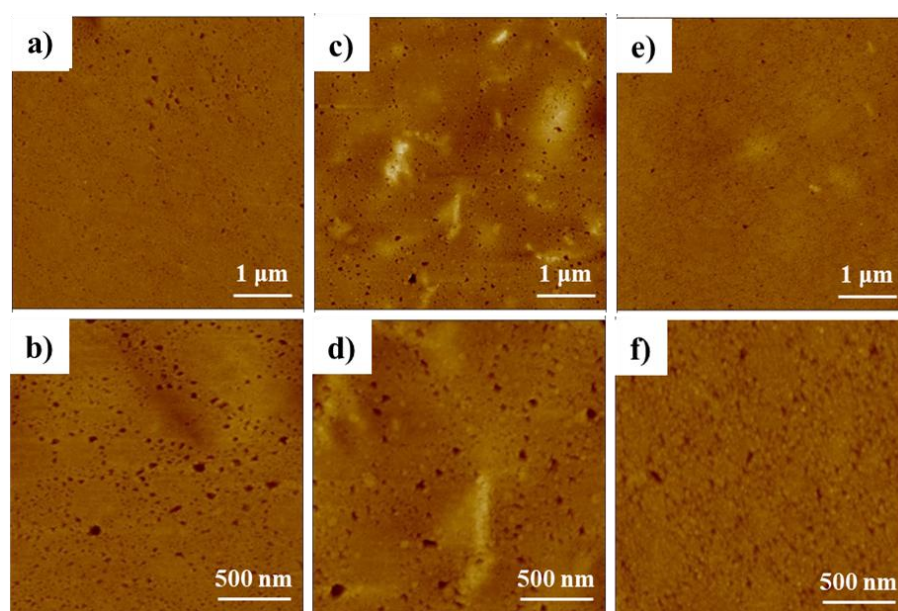


Figura 31. Immagini AFM in modalità *tapping* acquisite a differenti ingrandimenti (5 μm , 2 μm) di (a-b) CS, (c-d) CS/HNTs e (e-f) CS/HNTs-CDs.

L'analisi morfologica dei nanocompositi 3D è stata invece condotta mediante SEM (**Figura 32**). Dall'osservazione complessiva emerge che l'aggiunta del *filler* al polimero, sia HNTs che HNTs-CDs, non altera in modo significativo la morfologia globale della matrice polimerica, la quale mantiene un aspetto continuo e omogeneo in tutti e tre i nanocompositi (**Figura 32a-d-**

g). Tale comportamento risulta coerente con la bassa percentuale in peso dei *filler* introdotti, insufficiente a modificare la macrostruttura del composito. A ingrandimenti maggiori, tuttavia, è possibile osservare con maggiore chiarezza la presenza della sepiolite, che appare distribuita in modo uniforme in tutti i campioni e mostra una marcata direzionalità (**Figura 32b-e-f**). Questo comportamento è in linea con quanto riportato in letteratura per i materiali compositi a base di chitosano e sepiolite, nei quali le fibre dell'argilla tendono ad allinearsi secondo la direzione imposta dalla matrice polimerica durante il processo di polimerizzazione.^{132,174}

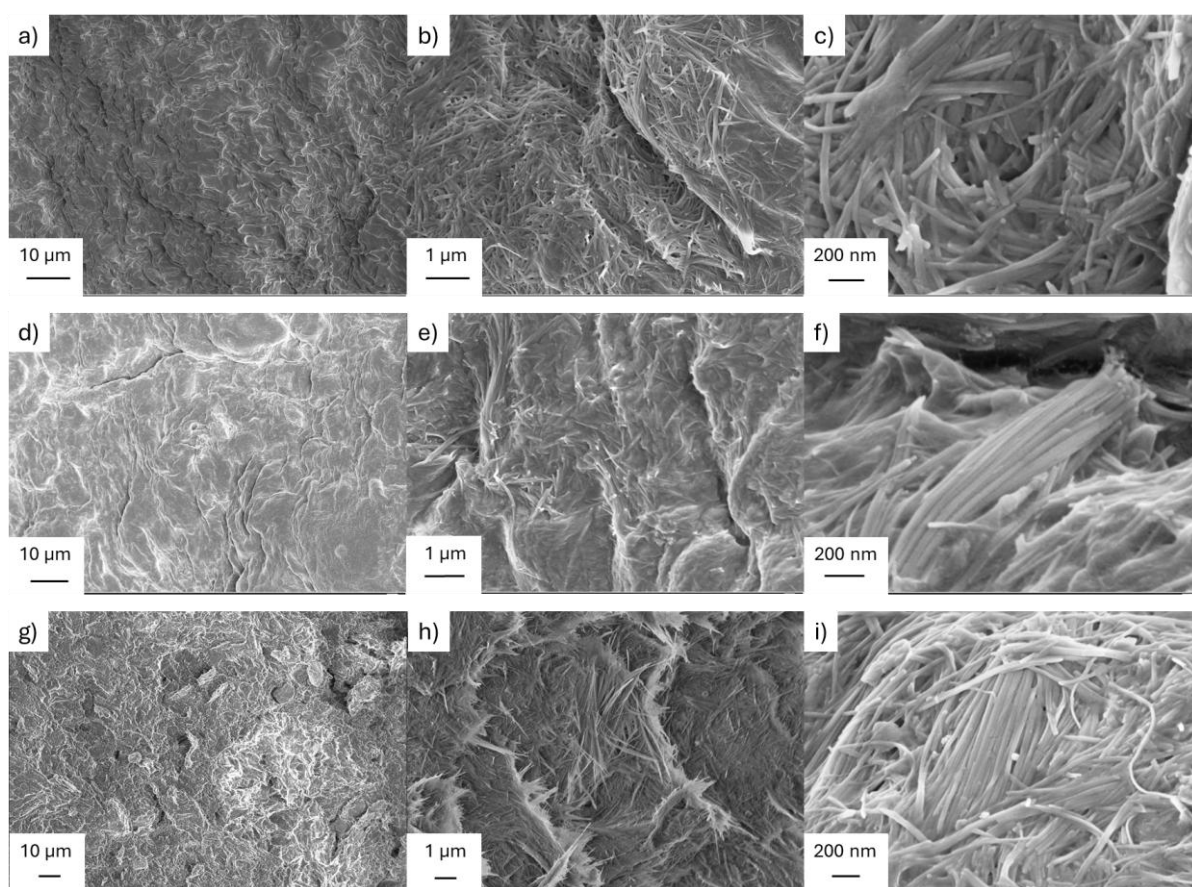


Figura 32. Immagini SEM di (a-c) CS/PVA/PS9, (d-f) CS/PVA/PS9/HNTs e (g-i) CS/PVA/PS9/HNTs-CDs.

Infine, alle più alte risoluzioni osservate (**Figura 32c-f-i**), le immagini SEM mettono in evidenza come nei campioni, CS/PVA/PS9/HNTs e CS/PVA/PS9/HNTs-CDs, contenenti rispettivamente HNTs o HNTs-CDs, tale effetto risulti ancora più pronunciato, con le fibre di sepiolite orientate in modo più marcato rispetto al campione privo di *filler*. Ciò suggerisce che la presenza dei nanotubi possa contribuire a guidare o facilitare l'allineamento delle fibre di PS9, probabilmente grazie alle interazioni di legami a idrogeno tra le due argille.¹³²

Al fine di correlare le caratteristiche strutturali osservate con le prestazioni e possibili applicazioni dei due diversi nanocompositi, bidimensionali o tridimensionali, sono state studiate le loro proprietà meccaniche.

- ***Proprietà meccaniche e adesive dei nanocompositi***

Il comportamento meccanico dei nanocompositi è stato indagato valutando il valore di sforzo alla rottura e l'allungamento massimo dei campioni (**Tabella 7**). Le misure sono state effettuate utilizzando il Platform Rig HDP/FSR, progettato specificamente per la caratterizzazione di film o semisolidi. Tale configurazione consente di ottenere una deformazione biassiale, più rappresentativa delle reali condizioni d'uso, rispetto ai test tradizionali con effettuati con *clamp*, che forniscono solo una sollecitazione uniassiale.¹⁷⁵ Durante l'analisi, infatti, i campioni sono stati sottoposti a un allungamento orizzontale mentre venivano contemporaneamente deformati verticalmente dalla sonda emisferica in movimento, simulando in maniera più realistica la resistenza che possiede il materiale.¹⁷⁵

I risultati riportati in **Tabella 7** mostrano differenze significative tra i film ottenuti per *casting* (CS, CS/HNTs e CS/HNTs-CDs) e i materiali semisolidi ottenuti per stampa 3D (CS/PVA/PS9, CS/PVA/PS9/HNTs e CS/PVA/PS9/HNTs-CDs). I film hanno evidenziato valori di sforzo alla rottura compresi tra 0.393 ± 0.017 MPa e 0.548 ± 0.007 MPa, associati a un allungamento massimo relativamente basso (21-25%), in linea con la loro natura più rigida e compatta. L'aggiunta di HNTs ha determinato una riduzione dello sforzo alla rottura e dell'allungamento massimo, effetto attribuibile sia a una dispersione non omogenea del *filler*, con conseguente formazione di difetti strutturali, sia al possibile accumulo di nanotubi all'interno della matrice polimerica, come già osservato in precedenti studi.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ La funzionalizzazione con *carbon dots* ha invece mitigato questi effetti, consentendo un parziale recupero delle proprietà meccaniche.¹⁷⁸ In particolare, rispetto al film di riferimento privo di *filler*, il nanocomposito CS/HNTs-CDs mostra valori più elevati di sforzo alla rottura e un allungamento massimo maggiore, evidenziando come l'introduzione del nanomateriale HNTs-CDs migliori le proprietà meccaniche e la flessibilità.

I materiali semisolidi stampati in 3D hanno invece mostrato un comportamento opposto, caratterizzato da valori dello sforzo alla rottura inferiori (0.039-0.060 MPa) ma da un allungamento massimo significativamente più elevato (65-75%). Tale comportamento è attribuibile alla presenza di PVA e acqua, che conferiscono maggiore plasticità e flessibilità ai

nanocompositi ottenuti con questa tecnica. L'incorporazione di HNTs in questi sistemi ha aumentato lo sforzo alla rottura senza ridurre l'allungamento massimo, indicando un effetto di rinforzo meccanico.¹⁷⁹ Anche se con l'aggiunta di HNTs-CDs lo sforzo alla rottura risulta leggermente inferiore rispetto al sistema con soli HNTs, l'allungamento massimo rimane pressoché invariato e nettamente superiore a quello del sistema privo di *filler*, confermando l'efficacia del nanomateriale HNTs-CDs nel mantenere elevata la flessibilità e nel migliorare le prestazioni complessive del materiale rispetto alla formulazione di base.

Tabella 7. Valori di sforzo alla rottura e allungamento massimo dei nanocompositi 2D e 3D con relative variazioni standard.

Nanocompositi	Sforzo alla rottura (MPa)10 ⁻²	Allungamento massimo (%)
CS	54.8 ± 0.7	25.0 ± 2.3
CS/HNTs	39.3 ± 1.7	21.6 ± 0.1
CS/HNTs-CDs	47.2 ± 1.7	23.4 ± 0.3
CS/PVA/PS9	4.35 ± 0.08	65.5 ± 2.3
CS/PVA/PS9/HNTs	6.01 ± 0.21	75.4 ± 5.6
CS/PVA/PS9/HNTs-CDs	3.92 ± 0.40	70.1 ± 5.9

Infine, vista la natura semisolida dei nanocompositi 3D, sono stati effettuati dei test meccanici di compressione per valutare altri due aspetti che potrebbero essere particolarmente utili per applicazioni biomediche: l'adesività e la forza massima di compressione.¹⁸⁰ I risultati evidenziano come l'introduzione dei *nanofiller* inorganici (HNTs e HNTs-CDs) influenzi in modo significativo entrambi i fattori (**Tabella 8**). I semisolidi 3D di chitosano puro mostrano il valore di energia di adesione più basso (528 J/m²) e la forza massima alla compressione più elevata (15.73 N), indice di una struttura relativamente rigida e compatta. L'introduzione dell'halloysite determina un marcato incremento dell'energia di adesione fino a 1933 J/m² (oltre 3.5 volte superiore rispetto al chitosano puro)(**Figura 33b**), accompagnato da una riduzione della forza massima alla compressione a 12.29 N. Questo comportamento suggerisce, in accordo con tutte le altre misure precedentemente effettuate, che la presenza dei nanotubi altera l'organizzazione della matrice polimerica, con conseguente miglioramento delle proprietà

adesive. Tuttavia, tale incremento è associato a un parziale deterioramento della risposta meccanica alla compressione, con un materiale che risulta meno resistente. Il nanocomposito CS/PVA/PS9/HNTs-CDs, al contrario, presenta valori intermedi di energia di adesione (1369 J/m²) e forza massima alla compressione (13.74 N) (**Figura 33a**), rappresentando un buon compromesso tra capacità adesiva e risposta meccanica alla compressione. La funzionalizzazione della superficie esterna dei nanotubi, per l'ottenimento diretto di CDs, sembra modulare efficacemente le proprietà interfacciali, migliorando l'adesività e mantenendo allo stesso tempo una resistenza alla compressione adeguata.

Tabella 8. Forza alla compressione e adesività dei nanocompositi 3D con deviazione standard.

Nanocomposito	Forza alla compressione (N)	Adesività (J/m ²)
CS/PVA/PS9	15.7 ± 0.3	528 ± 115
CS/PVA/PS9/HNTs	12.3 ± 1.4	1933 ± 152
CS/PVA/PS9/HNTs-CDs	13.7 ± 1.1	1369 ± 108

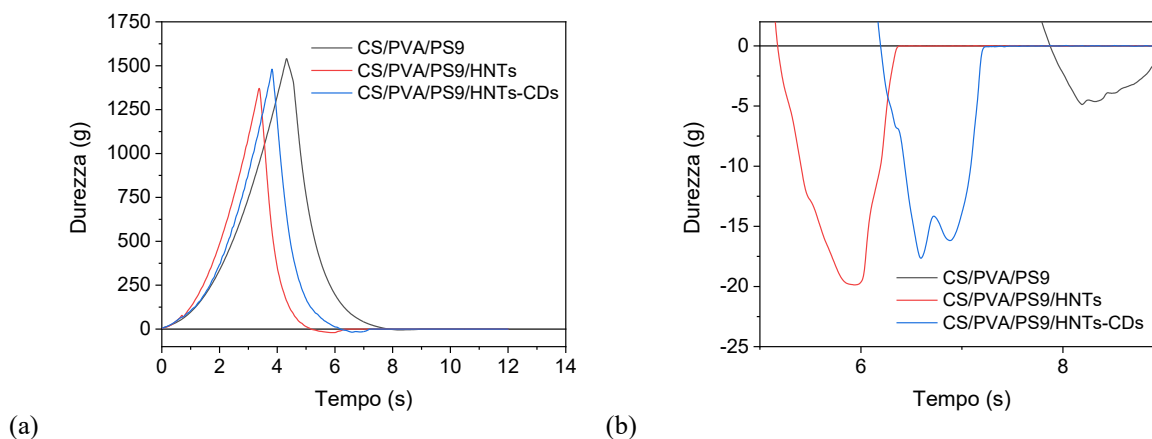


Figura 33, (a) Risposta alla compressione dei nanocompositi 3D e (b) ingrandimento per la risposta di adesione.

In conclusione, dalle analisi meccaniche effettuate, su entrambe le forme nanocomposite è evidente il ruolo cruciale che la modifica covalente della superficie esterna degli HNTs ha nel modulare le proprietà di questi. L'utilizzo del nanomateriale HNTs-CDs come *filler* ha infatti portato all'ottenimento di nanocompositi a base di chitosano, bidimensionali o tridimensionali, termicamente e meccanicamente superiori rispetto al solo polimero e che possono trovare impiego in diversi ambiti della nanomedicina.

4.4. Conclusioni

In sintesi, nel presente capitolo sono stati sviluppati e caratterizzati differenti nanocompositi a base di alginato o chitosano, che sono stati rinforzati utilizzando dei *filler* a base di halloysite modificati ad *hoc*.

Nel primo caso, è stato realizzato un film a base di alginato contenente nanotubi di halloysite modificati con N-*doped* CDs (HNTs-CDs), che conferiscono al nanomateriale proprietà antiossidanti, come dimostrato dalle misure con il DPPH, e capacità di assorbimento nella regione UV. Le analisi meccaniche hanno dimostrato che l'introduzione del nanomateriale HNTs-CDs protegge la struttura dell'alginato dall'irraggiamento UV, mantenendo invariati i valori di sforzo alla rottura e rendendo il film una barriera foto-protettiva efficace. L'inserimento di questo filler ha inoltre migliorato le proprietà di barriera all'acqua e ridotto il contenuto di umidità del film. Per ampliare le potenzialità del sistema, il *filler* è stato anche caricato con un estratto naturale di *M. cisplatis*, caratterizzato da attività antimicrobica, e gli studi di rilascio effettuati, hanno mostrato un rilascio lento e sostenuto del principio attivo nel tempo. Infine, i test preliminari condotti su fette di frutta hanno infine dimostrato che il rivestimento con il film nanocomposito Alg/HNTs-CDs/E previene i processi ossidativi e prolunga i tempi di conservazione. Nel complesso, la combinazione tra alginato e il nanomateriale HNTs-CDs ha quindi portato allo sviluppo di un nanocomposito multifunzionale potenzialmente utile nel *packaging* biomedicale.

Nella seconda parte del lavoro, l'attenzione è stata rivolta allo sviluppo di nanocompositi a base di chitosano contenenti nanotubi di halloysite funzionalizzati con N- ed S-*doped* CDs (HNTs-NSCDs). Il nanomateriale risultante ha mostrato non solo ottime proprietà foto-fisiche (assorbimento UV e fotoluminescenza eccitazione-dipendente), ma anche capacità di caricamento e rilascio controllato di molecole idrofobiche. L'impiego di HNTs-NSCDs come *filler* all'interno di matrici di chitosano ha permesso di ottenere materiali sia bidimensionali che tridimensionali. Nei film 2D, la modifica covalente della superficie esterna degli HNTs ha migliorato la compatibilità tra *filler* e polimero e favorito una dispersione più omogenea, con un conseguente recupero delle proprietà meccaniche e un incremento della stabilità termica rispetto ai sistemi contenenti HNTs non funzionalizzati. Nei compositi 3D, invece, il *filler* ha contribuito a mantenere un'elevata flessibilità del materiale, bilanciando resistenza meccanica e deformabilità, e modulando efficacemente adesione e forza di compressione. Le analisi termiche hanno evidenziato una maggiore stabilità e un'organizzazione strutturale più ordinata, come confermato dalle analisi morfologiche.

Nel complesso, la modifica covalente della superficie esterna degli HNTs, per la sintesi diretta su questa di *carbon dots*, ha permesso di ottenere *filler* multifunzionali capaci di trasferire alle matrici polimeriche proprietà avanzate e complementari, tra cui migliore interfaccia *filler*-polimero, maggiore stabilità termica, comportamento meccanico e adesivo ottimizzato e capacità di rilascio controllato. Questi risultati aprono prospettive concrete per la realizzazione di materiali nanocompositi ad alte prestazioni, con potenziali applicazioni nel campo della nanomedicina e del *packaging* biomedicale avanzato.

4.5. Sezione sperimentale

4.5.1. Materiali e metodi

Tutti i reagenti utilizzati per la sintesi dei nanomateriali sono stati acquistati da Merck e impiegati senza ulteriori purificazioni. L'estratto di *M. Cisplatensis* è stato ottenuto secondo quanto riportato in letteratura.¹⁸¹

Le sintesi assistite da microonde sono state eseguite utilizzando un sistema monomodale CEM DISCOVER in un reattore chiuso.

Gli spettri **FT-IR** dei nanomateriali HNTs-CDs_{a-c} e HNTs-NSCDs_{a-c} (KBr) sono stati registrati con uno spettrometro Agilent Technologies Cary 630 FT-IR. I campioni per queste analisi sono stati preparati omogenizzando 5 mg di polvere del campione con 100 mg di KBr. Gli spettri dei nanocompositi a base di alginato e chitosano, sia 2 che 3D, sono state acquisite in modalità ATR.

Le misure **XPS** sono state eseguite con uno spettrometro SPECS SAGE HR 100 (SPECS, Berlino, Germania) in alto vuoto (10^{-1} Pa), dotato di una sorgente di raggi X non monocromatica (Mg) con linea K α di 1253.6 eV. Per neutralizzare la carica è stato utilizzato un *electron gun*. Gli spettri sono stati elaborati e adattati utilizzando il *software* Casa XPS (Versione 2.3.16 PR1.6).

Le **TGA** dei nanomateriali HNTs-CDs_{a-c} e HNTs-NSCDs_{a-c} sono state condotte utilizzando uno strumento Q5000 IR (TA Instruments). Le misure sono state effettuate in atmosfera di azoto (con flussi di gas impostati a 25 e 10 cm³ min⁻¹ rispettivamente per il campione e per la bilancia) da 25 a 700 °C, con una velocità di riscaldamento di 20 °C min⁻¹. Le TGA dei nanocompositi 2D e 3D a base di chitosano sono state condotte utilizzando uno strumento SDT Q600 (TA Instruments, New Castle, DE, USA). I accuratamente pesati sono stati inseriti in porta campioni di allumina aperti (90 μ L) e riscaldati fino a 900 °C con una velocità di riscaldamento di 10 °C/min. Le analisi sono state effettuate in atmosfera di azoto con una portata di 100 mL/min.

Le misure **DSC** sono state eseguite con uno strumento DSC Q20 (TA Instruments, New Castle, DE, USA). I campioni accuratamente pesati sono stati sigillati ermeticamente in crocette di alluminio Tzero (40 μ L) e riscaldati fino a 350 °C con una velocità di riscaldamento di 10 °C/min. L'azoto è stato utilizzato come gas di spurgo inerte con una portata di 100 mL/min. Gli strumenti sono stati calibrati utilizzando indio e bismuto come standard di riferimento.

Le misure di **potenziale- ζ** e **DLS** sono state effettuate con uno Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments) a 25.0 ± 0.1 °C.

Le immagini **TEM** sono state acquisite con un microscopio FEI Titan G2 60–300 ad altissima risoluzione (FEI, Losanna, Svizzera), accoppiato a microscopia elettronica analitica (AEM) mediante un rivelatore di spettroscopia a dispersione di energia dei raggi X (XEDS). Gli spettri AEM sono stati acquisiti in modalità STEM utilizzando un rivelatore HAADF (*high angle annular dark field*). Le mappe elementari sono state ottenute tramite raggi X.

Le immagini **SEM** sono state acquisite con un microscopio GEMINI (FESEM) (CARL Zeiss, Oberkochen, Germania) accoppiato a un microanalizzatore EDX (Oxford Instruments, Abingdon, Regno Unito). I campioni sono stati essiccati a 40 °C per almeno 48 ore. Successivamente, i campioni in polvere sono stati fissati su supporti standard in alluminio e rivestiti con carbonio. Le immagini sono state ottenute a 3 kV, mentre le analisi EDX sono state effettuate a 15 kV. In entrambi i casi è stato utilizzato un rivelatore a lente d'immersione (InLens, Zeiss, Oberkochen, Germania).

Le immagini **AFM** sono state eseguite in modalità *tapping* utilizzando un microscopio Nanoscope IIIA-MultiMode AFM (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA). Lo strumento era equipaggiato con uno scanner <J> calibrato fornito dal produttore del reticolo. Le immagini sono state acquisite con una velocità di scansione di 1 Hz e una risoluzione di 512×512 pixel per immagine (condizioni di alta risoluzione), utilizzando punte di silicio drogato con fosforo (n) aventi resistività di 0.5–2 Ω cm, montate su cantilever con costante di forza nominale di 40 N m⁻¹ e frequenza di risonanza di 300 kHz. La forza esercitata è stata mantenuta al valore più basso possibile regolando continuamente il *set point* durante l'acquisizione delle immagini. L'analisi delle immagini è stata effettuata utilizzando il software DI, versione 4.23r6, e le immagini sono state appiattite per rimuovere eventuali pendenze di fondo.

Le misure **UV-vis** sono state effettuate con uno spettrofotometro Beckmann DU 650, acquisendo gli spettri nell'intervallo 250–700 nm.

Le misure di **fluorescenza**, sia in soluzione che in stato solido, sono state realizzate con uno spettrofluorimetro JASCO FP8300. Per le misure in soluzione, le fenditure di eccitazione ed emissione sono state impostate a 5 nm e gli spettri sono stati registrati nell'intervallo 300–700 nm. Gli spettri allo stato solido sono stati acquisiti impostando le fenditure di eccitazione ed emissione rispettivamente a 5 e 2.5 nm, nello stesso intervallo di lunghezze d'onda (300–700 nm).

Le **proprietà meccaniche** a trazione sono state determinate utilizzando uno strumento DMA Q800 (TA Instruments). Per tutte le misure meccaniche, i campioni avevano forma rettangolare (10.00 mm $\times$ 6.00 mm $\times$ 0.120 mm) e le prove di trazione sono state condotte con un gradiente di resistenza di 1 MPa min⁻¹ a 26.0 ± 0.5 °C. Sono stati determinati i valori del modulo elastico, calcolato dalla pendenza della regione lineare della curva sforzo-

deformazione. Inoltre, sono stati stimati la resistenza a trazione (definita come lo sforzo alla frattura del materiale) e l'allungamento al punto di rottura. Ogni nanocomposito è stato misurato cinque volte e i valori medi sono riportati.

Lo **spessore** e le **dimensioni** dei nanocompositi 2D e 3D sono stati misurati utilizzando un calibro digitale elettronico con campo di misura compreso tra 0 e 150 mm e risoluzione di 0.01 mm (Digital Caliper, VWR, Germania), e un micrometro digitale elettronico con campo di misura compreso tra 0 e 0.25 mm e risoluzione di 0.001 mm (Chronos Engineering Supplies, Bedfordshire, Regno Unito). Lo spessore è stato determinato effettuando misurazioni in dieci punti differenti del campione e calcolando il valore medio. Dopo la rimozione dallo stampo, il peso dei nanocompositi è stato misurato utilizzando una bilancia analitica ad alta precisione (Shimadzu AUW120, Manila, Filippine).

4.5.2. Parte sperimentale sezione 4.2.3.

- Sintesi del nanomateriale HNTs-1

Per l'ottenimento di HNTs-1, l'acido tartarico (460 mg, 10 eq.) e l'1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimmide (EDC, 62 mg, 10 eq.) sono stati sospesi in DMF anidro (15 mL) e mantenuti sotto agitazione a temperatura ambiente per 10 min. Successivamente, sono stati aggiunti rapidamente 500 mg di HNTs-NH₂ e la dispersione è stata lasciata sotto agitazione per 48 h. Al termine della reazione, il solvente è stato rimosso per filtrazione, il solido ottenuto è stato lavato accuratamente con H₂O e CH₂Cl₂, e infine essiccato a 80 °C sotto vuoto.

- Sintesi dei nanomateriali HNTs-CDs_{a-c}

I nanomateriali HNTs-CDs_{a-c} sono stati ottenuti mediante irradiazione a microonde di una dispersione acquosa di HNTs-1 in presenza di etilendiammina (EDA), spermina o esametildiammina (rapporto molare 1:1). I nanomateriali a base di halloysite (100 mg), EDA (150 µL), esametildiammina (50 mg) oppure spermina (50 mg) e acqua (460 µL) sono stati riscaldati a 240 °C ad una potenza di 200 W per 3 minuti, in presenza di una quantità catalitica di TEA. Durante il riscaldamento a microonde, la dispersione cambia colore da bianco a giallo, evidenziando la formazione dei *carbon dots* sulla superficie esterna dell'halloysite. Al termine della reazione, il solido ottenuto è stato raccolto, lavato più volte con etanolo per rimuovere i reagenti non reagiti e infine essiccato a 80 °C sottovuoto.

- **Microscopia a Forza Atomica**

La rugosità superficiale dei film è stata valutata su immagini in modalità TM ottenute con una velocità di scansione di 1 Hz su aree di $2 \times 2 \mu\text{m}^2$, analizzando almeno sei zone differenti per ciascun campione prelevate da regioni distinte. I valori di rugosità sono stati espressi in termini di Ra, Rq e Rmax. Ra rappresenta il valore medio aritmetico delle deviazioni in altezza della superficie rispetto al piano medio all'interno della finestra di analisi ed è calcolato secondo la seguente equazione:

$$Ra = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |Z_i - \bar{Z}| \quad (\text{Eq. 2})$$

dove Z_i è il valore di altezza del singolo punto, $\bar{Z}$ è l'altezza media e n è il numero totale di punti considerati. Rq è la deviazione standard dei valori di altezza (Z) e viene calcolata come:

$$Rq = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (Z_i - \bar{Z})^2} \quad (\text{Eq. 3})$$

Rmax rappresenta infine la distanza verticale massima tra il punto più alto e quello più basso all'interno della finestra di analisi.

- **Caricamento dell'estratto di *M. cisplatis* sul nanomateriale HNTs-CDs**

Per il caricamento dell'estratto di *M. cisplatis* (E), a una dispersione di HNTs-CDs (50 mg) in H_2O (5 mL) sono stati aggiunti 0.5 mL di una soluzione di E in MeOH (0.45 mg mL^{-1}). La dispersione è stata sonicata per 5 min e quindi sottoposta a tre cicli di evacuazione, per poi essere mantenuta sotto agitazione per 6 h a temperatura ambiente. Trascorso questo tempo, la polvere è stata lavata più volte con acqua per rimuovere E non reagito ed essiccata sottovuoto. La quantità di E caricata sugli HNTs-CDs è stata stimata mediante spettroscopia UV-vis analizzando la soluzione filtrata alla lunghezza d'onda di 276 nm e utilizzando una curva di calibrazione. La percentuale di caricamento (CC%) è stata calcolata secondo la seguente equazione:

$$CC\% = \frac{E_{\text{HNTs}}}{m_{\text{HNTs}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

dove E_{HNTs} è la quantità di estratto di *M. cisplatensis* caricata sui nanomateriali e m_{HNTs} è la massa di HNTs-CDs utilizzata nella procedura.

- ***Rilascio cinetico dell'estratto dal nanomateriale HNTs-CDs/E***

Il rilascio dell'estratto E dal nanomateriale HNTs-CDs/E è stato eseguito come segue: 10 mg di HNTs-CDs/E sono stati trasferiti all'interno di una membrana per dialisi (Medicell International Ltd., MWCO 12–14.000, diametro 21.5 mm) e bagnati con 1 mL del simulante alimentare D1 (H₂O/Etanolo 1:1 v/v). La membrana è stata quindi immersa in un matraccio a fondo tondo contenente 9 mL di simulante alimentare, mantenuto a 25 °C sotto agitazione costante. A intervalli di tempo prestabiliti, 1 mL del mezzo di rilascio è stato prelevato e analizzato; ogni volta è stato aggiunto 1 mL di simulante fresco per mantenere costante il volume della soluzione. La concentrazione dell'estratto nella soluzione è stata determinata mediante spettrofotometria UV–vis utilizzando la legge di Lambert-Beer, misurando l'assorbanza a 276 nm, assumendo che a ciascun tempo tutte le componenti dell'estratto fossero rilasciate in modo proporzionale. La quantità totale di E rilasciato (F_t) è stata calcolata con la seguente equazione:

$$F_t = V_m C_t + \sum_{i=0}^{t-1} V_a C_i \quad (\text{Eq. 5})$$

dove V_m e C_t rappresentano rispettivamente il volume e la concentrazione di E al tempo t , V_a è il volume del campione prelevato, e C_i è la concentrazione di E al tempo i ($i < t_i$).

- ***Preparazione dei film nanocompositi a base di alginato***

In primo luogo, è stata preparata una soluzione acquosa di alginato di sodio al 2 %p/p, lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte. Successivamente, 10 mg di HNTs, HNTs-CDs oppure HNTs-CDs/E sono stati aggiunti alla soluzione di alginato e mantenuti sotto agitazione per circa 6 h. Per la preparazione dei film nanocompositi Alg/HNTs e Alg/HNTs-CDs, la miscela acquosa ben dispersa è stata colata in piastre di Petri di vetro e posta a 60 °C per favorire l'evaporazione dell'acqua fino al raggiungimento di un peso costante. I film nanocompositi essiccati contenevano il 5 %p/p di *filler*. Al contrario, il film nanocomposito Alg/HNTs-CDs/E è stato preparato colando la miscela acquosa ben dispersa in piastre di Petri di vetro, lasciandola poi a temperatura ambiente sottovuoto all'interno di una camera contenente silice e P₂O₅, rinnovati durante l'esperimento.

- ***Determinazione del contenuto di umidità (MC) dei film nanocompositi***

Il contenuto di umidità (MC) dei film nanocompositi è stato determinato su 3 campioni di film con dimensioni di 2×2 cm. I campioni sono stati inizialmente essiccati sottovuoto a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ per circa 2 h. Successivamente, i film sono stati collocati in un essiccatore contenente una soluzione sovrasatura di NaBr, al fine di mantenere l'umidità relativa (RH) costante al 60 %. La temperatura delle camere ermetiche è stata mantenuta a $25.0 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. I film sono stati pesati ogni 24 h per una settimana e il contenuto di umidità è stato calcolato secondo la seguente equazione:

$$MC\% = \frac{W_f - W_i}{W_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

dove $MC\%$ rappresenta la percentuale di contenuto di umidità, espressa come media $\pm$ deviazione standard dei tre campioni, W_f è il peso dopo l'esposizione a 60 %RH e W_i è il peso iniziale prima dell'esposizione.

- ***Permeabilità al vapore acqueo (WVP)***

La permeabilità vapore acqueo (WVTR) è stata determinata secondo lo standard ASTM E96–05 (ASTM, 2005). I film di Alg, Alg/HNTs e Alg/HNTs-CDs sono stati sigillati sull'apertura di una *vial* contenente CaCl_2 anidro. Le *vial* così preparate sono state collocate all'interno di un essiccatore sottovuoto contenente una soluzione sovrasatura di NaBr, in modo da mantenere un'umidità relativa (RH) del 60 % a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. I film nanocompositi sono stati pesati dopo 24 h, e il WVTR è stato calcolato secondo la seguente equazione:

$$\text{WVTR} = \frac{\Delta m}{t \times A} \quad (\text{Eq. 7})$$

Dove $\Delta m/t$ è la pendenza della retta ottenuta dal grafico del peso guadagnato (g) in funzione del tempo (h) e A è l'area della *vial* (m^2). La permeabilità al vapore acqueo (WVP) è stata poi calcolata con la seguente formula:

$$WVP = \frac{WVTR \times L}{P \times \Delta RH} \quad (\text{Eq. 8})$$

Dove L è lo spessore del film (m), P è la pressione di vapore saturo dell'acqua a 25 °C e ΔRH è la differenza di umidità relativa tra i due lati della *vial*.

- **Attività antiossidante**

L'attività antiossidante dei nanomateriali HNTs-CDs e del film nanocomposito Alg/HNTs-CDs è stata determinata mediante il metodo basato sul radicale 2,2-difenil-1-picrilidrazile (DPPH·). L'attività di rimozione dei radicali liberi è stata valutata come segue. Diverse aliquote del nanomateriale HNTs-CDs sono state disperse in 1 mL di etanolo al 50 %v/v con concentrazioni comprese tra 0 e 4.3 mg mL⁻¹. A ciascuna dispersione è stato aggiunto 1 mL di una soluzione di DPPH (1.5 x 10⁻⁴ M) in etanolo al 50 %v/v. Le dispersioni ottenute sono state agitate vigorosamente e lasciate riposare a temperatura ambiente al buio per 40 min. La percentuale di inibizione del radicale libero DPPH· è stata calcolata secondo la seguente equazione:

$$\text{Inibizione}(\%) = \frac{Abs_0 - Abs_s}{Abs_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 9})$$

Dove Abs₀ è l'assorbanza della soluzione di DPPH senza HNTs-CDs $\lambda = 523$ nm e Abs_s è l'assorbanza del campione in esame. Tutti i test sono stati eseguiti in duplicato e i risultati sono riportati come media $\pm$ deviazione standard. La percentuale di inibizione dei HNTs-CDs rilasciati è stata inoltre determinata dopo l'immersione per 96 h di un campione di film nanocomposito Alg/HNTs-CDs di dimensioni 1 × 1 cm nel simulante alimentare D1.

- **Rilascio cinetico dell'estratto dal film Alg/HNTs-CDs/E**

Per lo studio del rilascio cinetico dell'estratto dal film Alg/HNTs-CDs/E, campioni di film di dimensioni 1 × 1 cm sono stati immersi in 1 mL di simulante alimentare in diverse *vial* sigillate e conservati a 25 °C. A intervalli di tempo prestabiliti, i film sono stati rimossi dalle *vial* e il liquido di immersione è stato analizzato mediante spettroscopia UV-vis al fine di determinare la quantità di estratto rilasciata nel tempo.

- **Test preliminari di coating su frutta**

Sono stati effettuati test preliminari di rivestimento su mele e banane. I frutti sono stati tagliati a fette e immersi nella miscela Alg/HNTs-CDs/E per 2 min, quindi lasciati sgocciolare per

rimuovere l'eccesso di materiale di rivestimento. I campioni rivestiti sono stati conservati a temperatura ambiente per 1 settimana in condizioni di umidità relativa (RH) pari al 60 %. Frutti non rivestiti sono stati utilizzati come controllo e mantenuti nelle stesse condizioni sperimentali.

- ***Analisi statistica***

L'analisi statistica dei dati sperimentali è stata eseguita utilizzando il software Past 4.03. Tutti i test sono stati condotti in duplicato o triplicato (come indicato nel testo), e i dati ottenuti sono stati analizzati mediante analisi della varianza a una via (ANOVA). Le differenze significative tra i campioni sono state valutate utilizzando il test di Tukey con un intervallo di confidenza del 95% ($p < 0.05$). I risultati finali sono stati riportati come media $\pm$ deviazione standard.

4.5.3. Parte sperimentale sezione 4.3.1.

- ***Sintesi del nanomateriale HNTs-NH₂***

Il nanomateriale HNTs-NH₂ è stato preparato introducendo 2.0 g di HNTs in un pallone a doppio collo da 100 mL dotato di ancorotta magnetica. A questo sono stati aggiunti tramite una siringa, 50 mL di toluene anidro in ambiente inerte e successivamente aggiunti 4 mL di (3-amminopropil)trimetossi silano (APTES) sotto agitazione. La reazione è stata lasciata sotto agitazione a riflusso (110 °C) per 48 h. Successivamente, il contenuto del pallone è stato filtrato sottovuoto e lavato ripetutamente con MeOH e infine lasciato ad asciugare in stufa per 24 h a 60 °C.

- ***Sintesi del nanomateriale HNTs-2***

L'acido ditiopropionico (1.3 g, 10 eq.) e la 1-Etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodimide (EDC, 1.2 g, 10 eq.) sono stati dispersi all'interno di un pallone monocollo da 50 mL in CH₂Cl₂ (30 mL). La dispersione è stata agitata in atmosfera inerte e a temperatura ambiente per 10 minuti. Trascorso questo tempo è stato aggiunto rapidamente 1.0 g di HNTs-NH₂ e si è lasciato ad agitare per 48 h al termine della reazione il solvente è stato filtrato, la polvere è stata lavata con H₂O e CH₂Cl₂ e infine essiccata in stufa a 60 °C per una notte.

- ***Sintesi dei nanomateriali HNTs-NSCDs_{a-c}***

I nanomateriali HNTs-NSCDs_{a-c} utilizzando la procedura precedentemente riportata per l'ottenimento dei nanomateriali HNTs-CDs_{a-c}, utilizzando come precursore il nanomateriale

HNTs-2. Tutti gli altri reagenti, solventi e parametri del MW, sono stati utilizzati come prima (Sezione 2.3.1.).

- ***Sintesi del nanomateriale HNTs-NSCDs/MTX***

Ad una dispersione acquosa di HNTs-NSCDs (5 mL) sono stati aggiunti 1 mL di miscela di MTX in MeOH/DMSO 1:1 (10^{-2} M). Sono stati eseguiti a questo punto 3 cicli di vuoti da circa 3 min ciascuno e al termine di questi la dispersione è stata lasciata sotto agitazione per una notte a temperatura ambiente. Trascorso questo tempo il nanomateriale è stato filtrato e con una quantità nota di H₂O e lasciato in stufa per una notte a 60 °C. La quantità di MTX caricata sugli HNTs-NSCDs è stata stimata mediante spettroscopia UV–vis analizzando la soluzione filtrata alla lunghezza d’onda di 300 nm utilizzando una curva di calibrazione.

- ***Cinetica di rilascio di MTX da HNTs-NSCDs/MTX***

Il rilascio del MTX dal nanomateriale *HNTs-NSCDs/MTX* è stato effettuato introducendo 10 mg del nanomateriale all’interno di una membrana per dialisi (Medicell International Ltd., MWCO 12–14.000, diametro 21.5 mm) e bagnati con 1 mL di tampone fosfato (50 mM, pH 7.4) a 37 °C. La membrana è stata quindi immersa in un matraccio a fondo tondo contenente 9 mL di tampone, mantenuto a 37 °C sotto agitazione costante. A intervalli di tempo prestabiliti, 1 mL del mezzo di rilascio è stato prelevato e analizzato; ogni volta è stato aggiunto 1 mL di tampone fresco per mantenere costante il volume della soluzione. La concentrazione del farmaco nella soluzione è stata determinata mediante spettrofotometria UV–vis utilizzando la legge di Lambert-Beer, misurando l’assorbanza a 300 nm. La quantità totale di MTX rilasciato è stata calcolata con l’equazione utilizzata precedentemente per l’estratto E.

- ***Preparazione dei nanocompositi 2D***

I nanocompositi bidimensionali sono stati ottenuti tramite una comune procedura di *casting* riportata in letteratura. In primo luogo, è stata preparata una soluzione acquosa di chitosano a 3 %p/p (basso peso molecolare), mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte. Successivamente, 10 mg di HNTs o HNTs-CDs sono stati aggiunti alla soluzione e mantenuti sotto agitazione per circa 24 h. Per la preparazione dei film nanocompositi CS/HNTs e CS/HNTs-CDs, la dispersione acquosa è stata colata in piastre di Petri di vetro e lasciata asciugare a 30 °C fino al raggiungimento di un peso costante. I film nanocompositi essiccati contenevano il 5 %p/p di *filler*.

- Preparazione dei bioink per la stampa 3D

Una soluzione di PVA al 10 %p/p è stata inizialmente preparata sciogliendo il polimero in una soluzione di propilenglicole (PG) al 16 %p/p. Il PVA è stato mantenuto sotto agitazione in un contenitore sigillato a 90 °C per 6 h. La soluzione ottenuta è stata poi conservata a 4 °C per eliminare la schiuma formata durante la miscelazione e successivamente utilizzata per disperdere una quantità precisa di sepiolite (PS9), in modo da ottenere una concentrazione finale dell'8 %p/p. Dopo l'aggiunta della sepiolite, la miscela è stata omogeneizzata mediante agitazione meccanica e successivamente trattata con un Ultra-Turrax T18 (IKA Work, Staufen, Germania) a 20.000 rpm per due cicli da 3 minuti ciascuno. La miscela è stata poi sonicata per 3 minuti a potenza 4 e frequenza costante (Branson Sonifier 450®, Danbury, USA) e conservata a 4 °C per 24 h prima dell'uso. Separatamente, è stata preparata una soluzione di chitosano a basso peso molecolare al 6 %p/p in acido lattico al 5 %v/v, mantenuta sotto agitazione per 24 h a temperatura ambiente e poi conservata in frigorifero.

- Progettazione e impostazione di stampa 3D

Il modello 3D è stato progettato utilizzando il software BlocksCAD (versione 1.13.0, Burlington, MA, USA). Il design è stato quindi esportato come file .stl e successivamente processato con il software IdeaMaker (versione 3.1.7, Raise3D Technologies, Irvine, CA, USA) per generare il codice G-code necessario alla stampa. La stampa è stata eseguita con una stampante farmaceutica M3DIMAKER 1 (FABRX Ltd., UK) equipaggiata con una testina di estrusione SSE Laguna intercambiabile. La stampante è stata controllata tramite il software M3DIMAKER Studio (FABRX AI, Spagna). I nanocompositi stampati, di forma rettangolare (15 × 30 mm, altezza 1 mm) e composti da due strati, sono stati realizzati utilizzando un ago da 0.6 mm su substrati di vetro. La temperatura dell'estrusore e del piano di stampa è stata mantenuta a 25 °C. Tutti gli altri parametri di stampa sono riportati nella **Figura XX**.

- Stampa dei nanocompositi 3D

Per la realizzazione dei nanocompositi 3D, la miscela a base di PVA e la soluzione di chitosano al 6 %p/p sono state combinate in un rapporto 1:3. Entrambe le componenti sono state trasferite in siringhe Luer-lock da 10 mL e centrifugate: la miscela PVA è stata centrifugata a 2500 rpm per 5 min per prevenire la separazione di fase, mentre la soluzione di chitosano è stata centrifugata a 5000 rpm per 10 min per eliminare eventuali bolle d'aria. Successivamente, utilizzando connettori Luer-lock, la soluzione di chitosano è stata miscelata con 300 µL di una soluzione di trietanolammina al 15 %v/v mediante passaggi avanti e indietro per 30 volte. La

miscela risultante è stata quindi combinata con la soluzione a base di PVA seguendo la stessa procedura (30 passaggi) per ottenere il *bioink* finale. Il *bioink* è stato trasferito in una siringa compatibile da 20 mL e caricato nella stampante 3D. Al termine della stampa, i nanocompositi sono stati immersi per 10 minuti in una soluzione di trietanolamina al 15 %v/v per completare la reazione di reticolazione. Successivamente, i campioni sono stati accuratamente lavati con acqua deionizzata per rimuovere l'eccesso di reticolante, conservati a 4 °C per 24 h e infine conservati sottovuoto.

- *Proprietà meccaniche, di adesione e compressione dei nanocompositi*

Le analisi meccaniche sono state eseguite utilizzando un Texture Analyser TX.AT plus 100 (Stable Micro Systems, ANAME, Madrid, Spagna) equipaggiato con una cella di carico da 5 kg e con un supporto per film HDP/FSR, che consente una misura dell'estensione biassiale per valutare lo sforzo alla rottura di campioni filmici. I film 2D sono stati tagliati in quadrati di 1.5 × 1.5 cm, mentre i nanocompositi 3D utilizzati tal quali, e posizionati tra una base in Perspex® e un supporto con un'apertura circolare. Una sonda semisferica è stata poi spinta attraverso questa apertura per eseguire le misurazioni di estensione ed elasticità. Durante il test, è stata registrata la forza massima necessaria per rompere il campione. La velocità di sollevamento della sonda è stata mantenuta costante a 0.5 mm/s, mentre la distanza finale tra i puntali è stata impostata a 10 cm. Le proprietà meccaniche, tra cui lo sforzo alla rottura e l'allungamento massimo, sono state calcolate secondo le seguenti equazioni:

$$\text{Sforzo alla rottura (MPa)} = \frac{F_{\max}}{A} \quad (\text{Eq. 10})$$

dove $F_{\max}$ è la forza massima applicata (N), A è l'area di contatto tra la sonda e il campione (mm^2).

$$\text{Allungamento massimo (\%)} = \frac{L-L_0}{L_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 11})$$

Dove L è la distanza percorsa dalla sonda fino alla rottura del film (mm) ed L_0 è la distanza iniziale (mm). I test di trazione sono stati eseguiti in triplicato per ciascun nanocomposito. Il Texture Analyzer TX.AT plus (Stable Micro Systems, UK), già descritto in precedenza,

equipaggiato con una cella di carico da 5 kg e con una sonda P/10, è stato utilizzato anche per valutare la capacità adesiva e la resistenza alla compressione dei nanocompositi 3D. L'analisi è stata condotta in modalità di compressione, con una velocità di test di 0.1 mm s^{-1} , una velocità post-test di 10 mm s^{-1} e un tempo di contatto di 10 s. L'adesività, cioè il lavoro complessivo richiesto per separare il materiale dalla sonda, è stata calcolata misurando l'area sotto la curva negativa osservata nel grafico durezza vs tempo, mentre il valore della compressione è rappresentato dal picco massimo positivo osservato. Per garantire l'accuratezza delle misure, sono state effettuate tre repliche per ciascun campione.

Appendice A

Tabella A1. Percentuale di atomi di O, C e N determinata mediante analisi XPS.

	HNTs-CDs_a	HNTs-CDs_b	HNTs-CDs_c
C1s %	17.9	17.1	23.1
C=C/C-C	53.0	54.6	33.1
C-O/C-N	40.8	40.0	69.2
C=O/C=N	6.2	5.5	2.3
N1s %	4.6	3.4	3.9
NH₂	60.2	51.1	66.3
C-N-C	39.8	48.9	33.7
O1s %	77.5	78.9	73.0
O-Si-O	92.3	86.2	88.5
O-Al-O	5.1	11.0	9.3
O=C	2.5	3.0	2.1

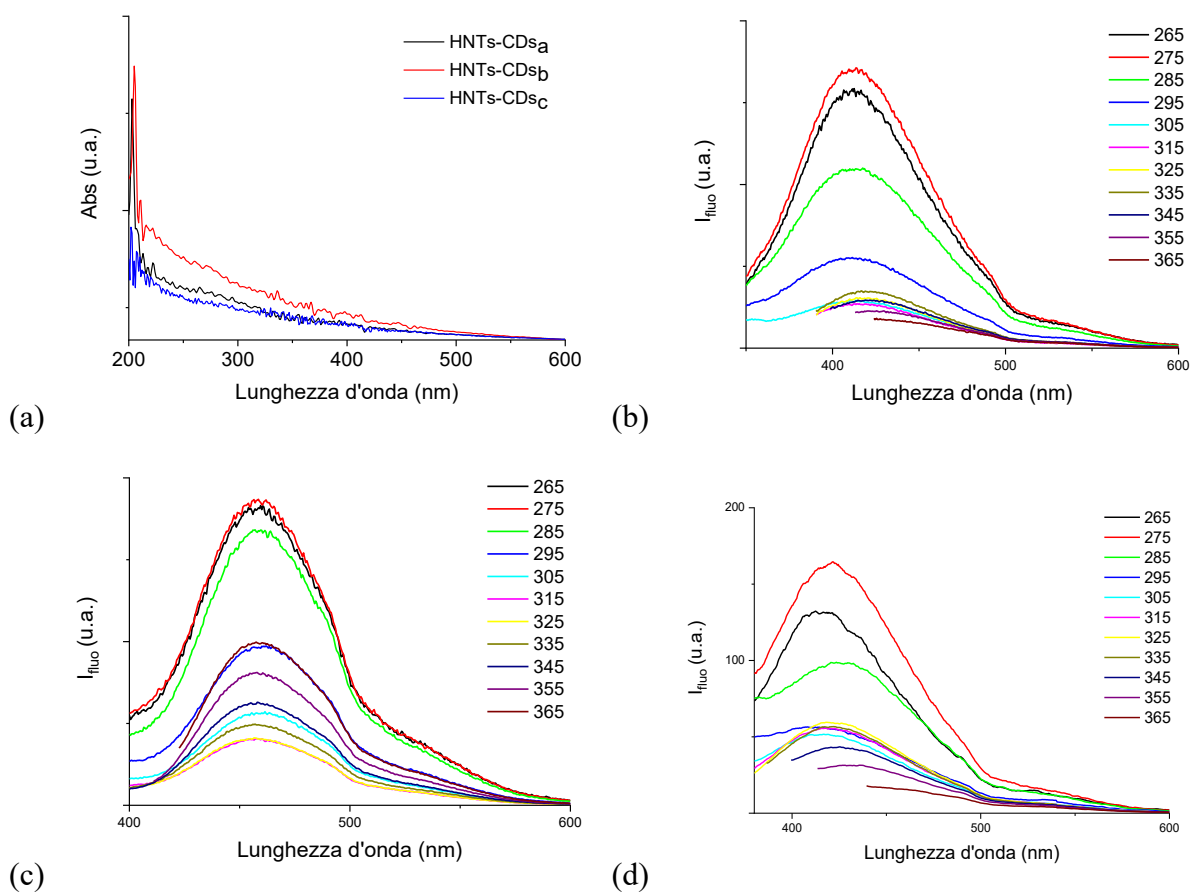
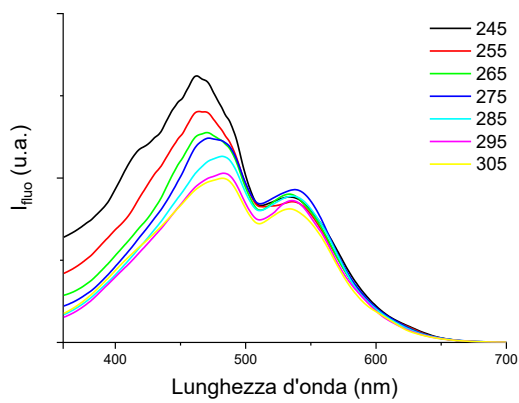
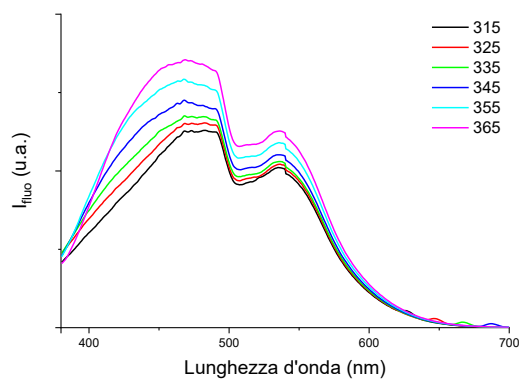


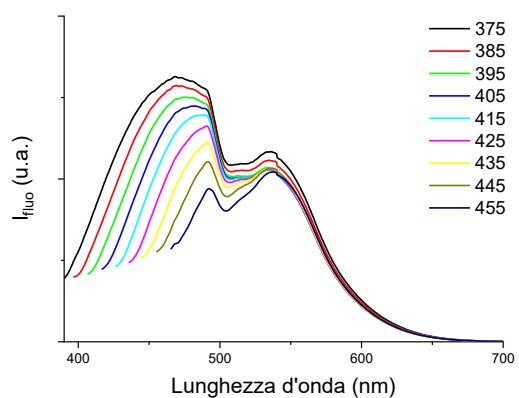
Figura A1. (a) Spettri di assorbimento di HNTs-CDs_{a-c}; (b) Spettro di fluorescenza in soluzione di HNTs-CDs_a; (c) HNTs-CDs_b; (d) HNTs-CDs_c.



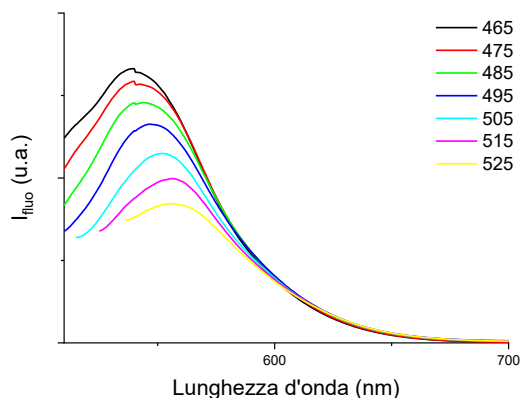
(a)



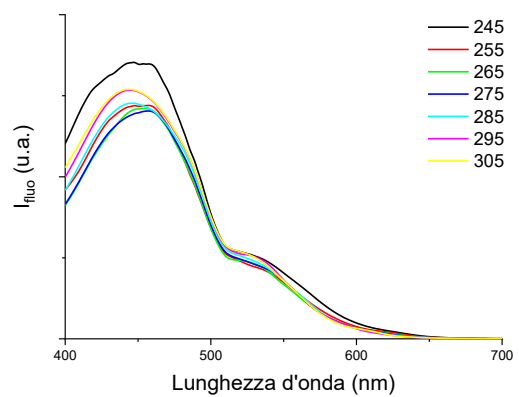
(b)



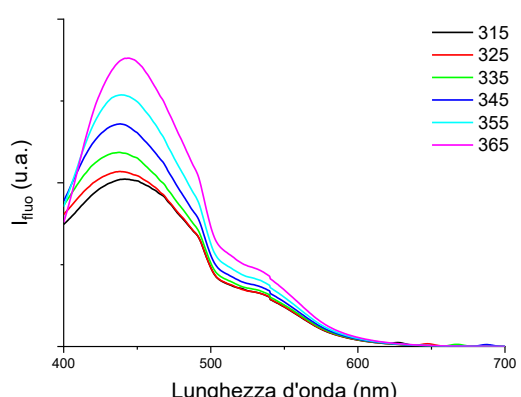
(c)



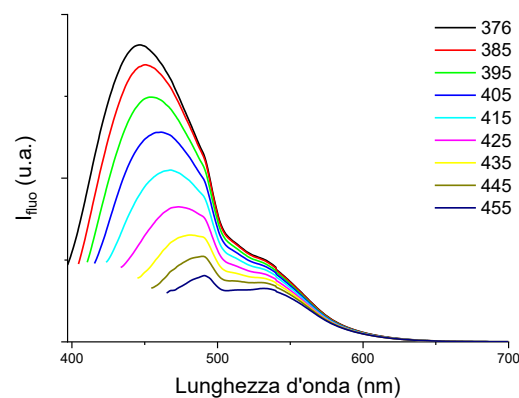
(d)



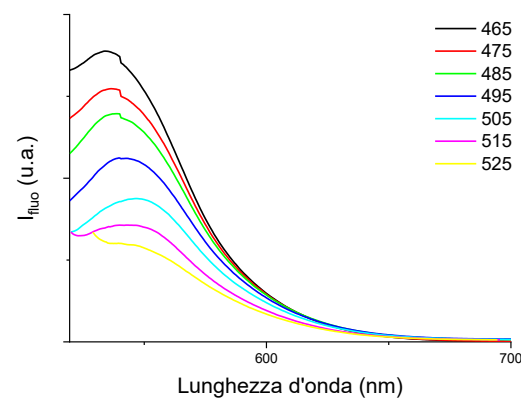
(e)



(f)



(g)



(h)

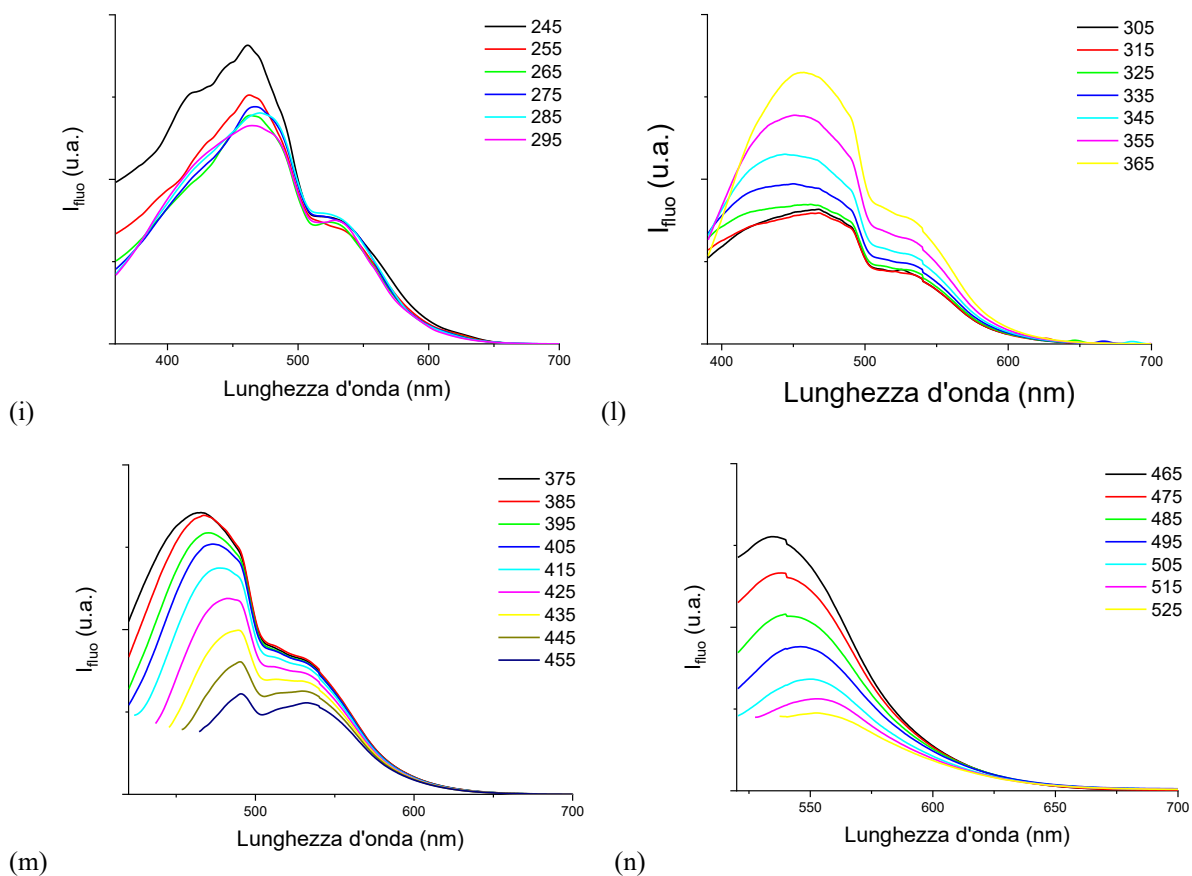


Figura A2. Spettri di fluorescenza allo stato solido di (a-d) HNTs-CDs_a, (e-h) HNTs-CDs_b e (i-n) HNTs-CDs_c a diverse lunghezze d'onda di eccitazione.

Appendice B

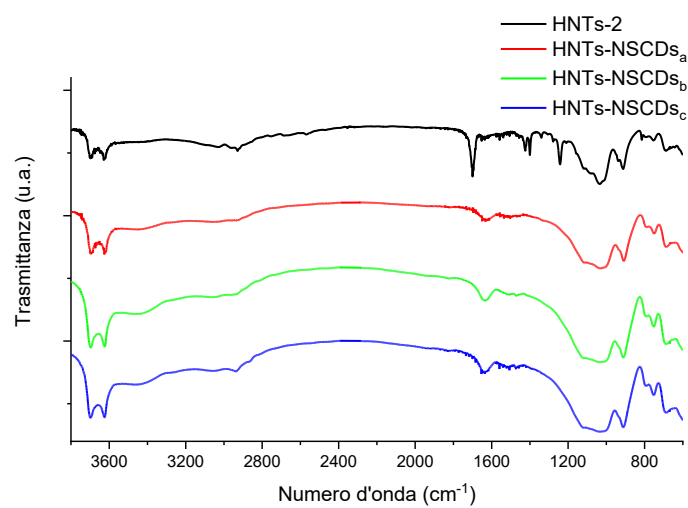


Figura B1. Spettri FT-IR di HNTs-2 e HNTs-NSCDs_{a-c}.

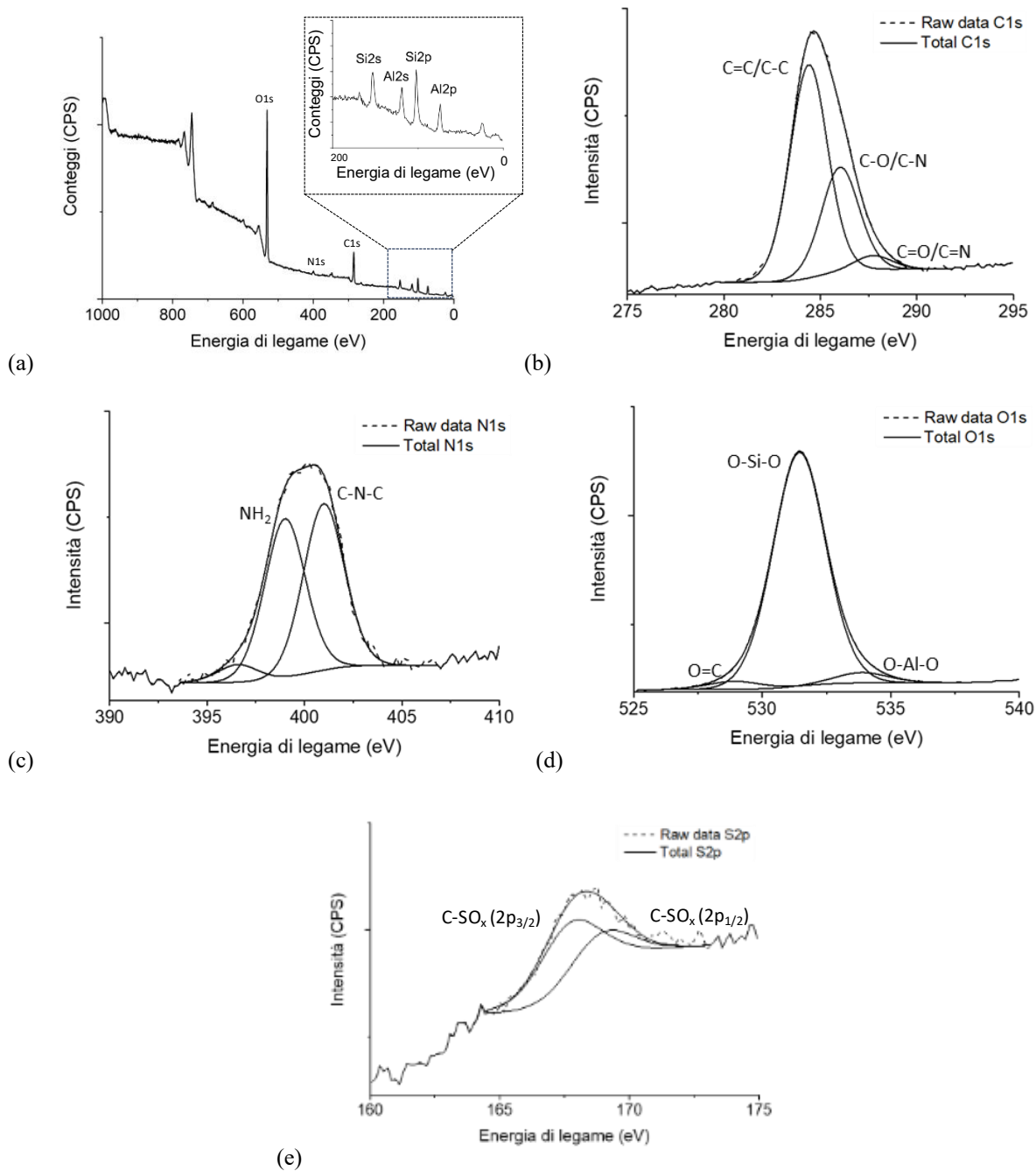


Figura B2. (a) *Survey XPS* del nanomateriale HNTs-NSCDs_a; deconvoluzione dello spettro del (b) C 1s, (c) N 1s, (d) O 1s e (e) S 2p.

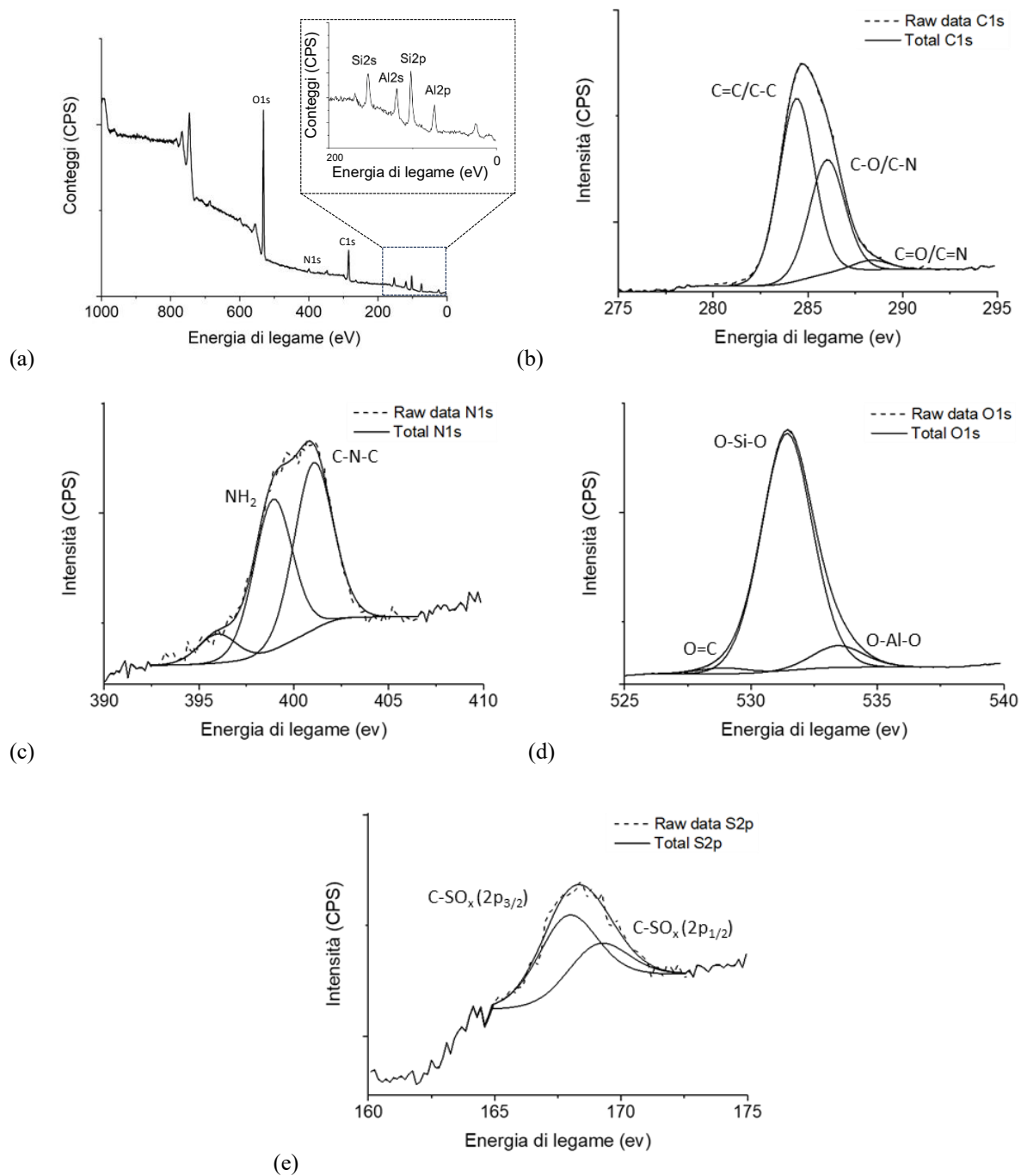


Figura B3. (a) *Survey* XPS del nanomateriale HNTs-NSCDs_c; deconvoluzione dello spettro del (b) C 1s, (c) N 1s, (d) O 1s e (e) S 2p.

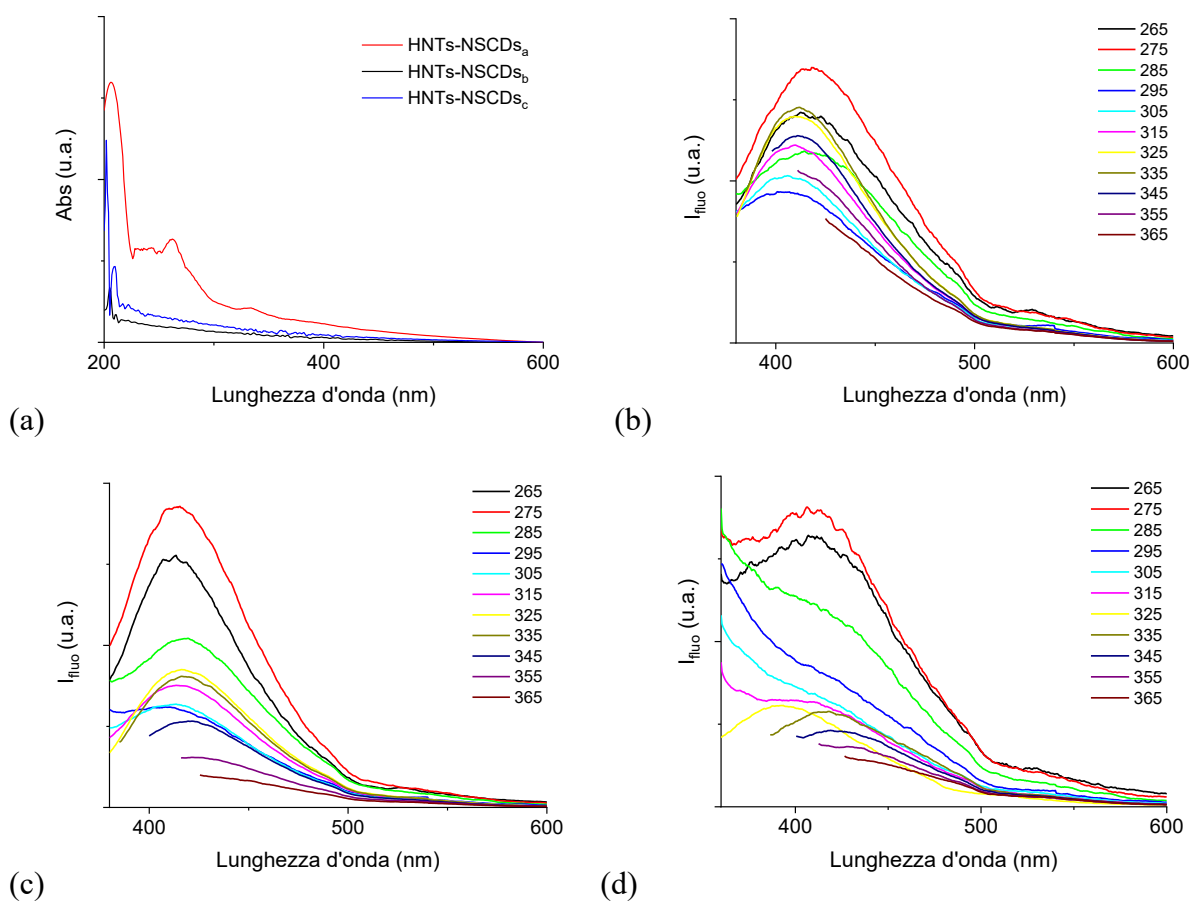


Figura B4. (a) Spettri di assorbimento di HNTs-CDs_{a-c}; (b) Spettro di fluorescenza in soluzione di HNTs-NSCDs_a; (c) HNTs-NSCDs_b; (d) HNTs-NSCDs_c.

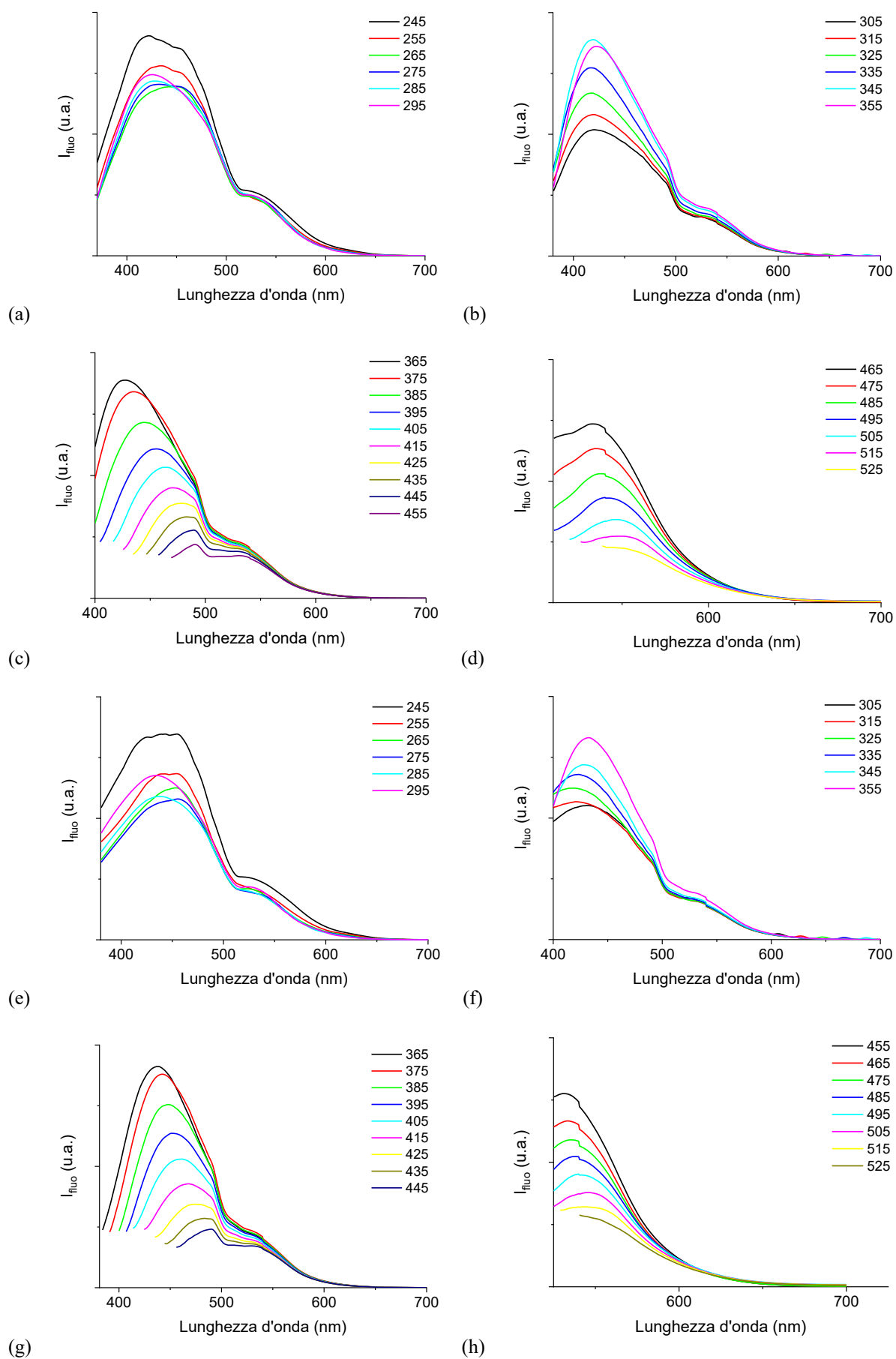


Figura B5. Spettri di fluorescenza allo stato solido di (a-d) HNTs-NSCDs_a e (e-h) HNTs-NSCDs_c a diverse lunghezze d'onda di eccitazione.

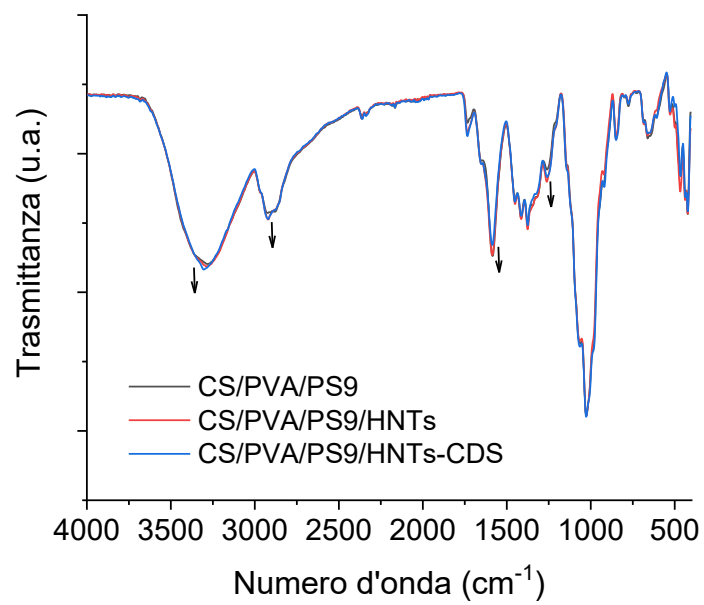


Figura B6. Spettro FT-IR dei nanocompositi 3D di CS/PVA/PS9, CS/PVA/PS9/HNTs e CS/PVA/PS9/HNTs-CDS

Tabella B1. Valori di T_g , ΔH_s e ΔH_{tot} , dei nanocompositi 2D e 3D.

Nanocompositi	Picco	T (°C)	Area (W·min/g)	ΔH_s (J/g)	ΔH_{tot} (J)
Casting					
CS	1	154	−10.00	+600.0	+3.00
	2	188	−33.03	+1981.8	+9.91
					+12.91
CS/HNTs	1	156	−6.13	+367.8	+1.84
	2	183	−29.59	+1775.4	+8.88
					+10.72
CS/HNTs-CDs	1	152	−4.10	+246.0	+1.28
	2	193	−31.57	+1894.2	+9.85
					+11.13
Stampa 3D					
CS/PVA/PS9	1	186	−3.48	+208.8	+0.71
	2	193	−5.535	+332.1	+1.13
	3	227.7	−10.6589	+639.5	+2.17
					+4.01
CS/PVA/PS9/HNTs	1	186	−3.9142	+234.9	+1.06
	2	193	−4.0551	+243.3	+1.10
	3	225	−19.677	+1180.6	+5.31
					+7.46
CS/PVA/PS9/HNTs-CDs	1	207.4	−1.4486	+86.9	+0.28
	2	212.7	−3.2448	+194.7	+0.62
	3	252.2	−14.7799	+886.8	+2.84
					+3.74

Bibliografia:

1. McMichael, A. J., and Butler, C. D., *Health promotion international* (2006) **21** (suppl_1), 15
2. Shaikh, A. A., *et al.*, *Journal of Polymer Engineering* (2024) **44** (2), 83
3. Pathania, D., and Kumari, S., *Adapting 2D Nanomaterials for Advanced Applications*, ACS Publications(2020), pp 375
4. Nitta, S. K., and Numata, K., *International journal of molecular sciences* (2013) **14** (1), 1629
5. Jacob, J., *et al.*, *Materials today chemistry* (2018) **9**, 43
6. Okamoto, M., and John, B., *Progress in Polymer Science* (2013) **38** (10-11), 1487
7. Kumar, S. S. D., *et al.*, *International journal of biological macromolecules* (2018) **115**, 165
8. Stoppel, W. L., *et al.*, *Annals of biomedical engineering* (2015) **43** (3), 657
9. Nguyen, C. K., *et al.*, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* (2017) **8** (1), 015001
10. Othman, S. H., *Agriculture and Agricultural Science Procedia* (2014) **2**, 296
11. Muratore, G., *et al.*, *Journal of food engineering* (2005) **67** (4), 393
12. Colusso, E., and Martucci, A., *Journal of Materials Chemistry C* (2021) **9** (17), 5578
13. Reddy, M. S. B., *et al.*, *Polymers* (2021) **13** (7), 1105
14. Rhim, J.-W., and Ng, P. K., *Critical reviews in food science and nutrition* (2007) **47** (4), 411
15. Zhen, Z., *et al.*, *Surface modification of magnesium and its alloys for biomedical applications*, Elsevier(2015), pp 301
16. Hoque, M., *et al.*, *Materials Science and Engineering: R: Reports* (2023) **156**, 100758
17. Silva, A. C. Q., *et al.*, *Natural Polymers-Based Materials: A Contribution to a Greener Future*. In *Molecules*, (2022), Vol. 27
18. Bibi, A., *et al.*, *Materials Research Express* (2019) **6** (9), 092001
19. Smidsrød, O., and Skja, G., *Trends in biotechnology* (1990) **8**, 71
20. Lee, K. Y., and Mooney, D. J., *Progress in polymer science* (2012) **37** (1), 106
21. Ge, F., *et al.*, *Iranian Journal of Immunology* (2018) **15** (3), 228
22. Guggenbichler, J.-P., *et al.*, *Infection* (1999) **27** (Suppl 1), S16
23. Paul, S., *et al.*, *Energy Nexus* (2021) **4**, 100032
24. Elieh-Ali-Komi, D., and Hamblin, M. R., *International journal of advanced research* (2016) **4** (3), 411
25. Rinaudo, M., *Progress in polymer science* (2006) **31** (7), 603
26. Hsu, S.-h., *et al.*, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* (2011) **85** (2), 198
27. Zaczek-Moczydłowska, M. A., *et al.*, *International Journal of Molecular Sciences*, (2024), Vol. 25
28. Gholamali, I., and Yadollahi, M., *Regenerative Engineering and Translational Medicine* (2021) **7** (2), 129
29. Zhao, D., *et al.*, *Polymers* (2018) **10** (4), 462
30. Zhang, J., *et al.*, *Marine drugs* (2010) **8** (7), 1962
31. Ahmed, F., *et al.*, *Research in veterinary science* (2019) **126**, 68
32. Xu, Y., and Du, Y., *International journal of pharmaceutics* (2003) **250** (1), 215
33. Gobi, R., *et al.*, *Polymers* (2021) **13** (12), 1962
34. Sionkowska, A., *Progress in polymer science* (2011) **36** (9), 1254
35. Baker, M. I., *et al.*, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* (2012) **100** (5), 1451
36. Teodorescu, M., *et al.*, *Biotechnology advances* (2019) **37** (1), 109
37. Aslam, M., *et al.*, *Polymer Engineering & Science* (2018) **58** (12), 2119
38. Pal, K., *et al.*, *Aaps Pharmscitech* (2007) **8** (1), 21
39. Jadoun, S., and Jangid, N., *Biocomp Bio Med* (2019) **20**, 111
40. Shao, J., *et al.*, *Starch-Stärke* (2019) **71** (5-6), 1800281
41. Gholamali, I., *et al.*, *Regenerative Engineering and Translational Medicine* (2020) **6** (2), 138
42. Oliveira, R., *et al.*, *Interface focus* (2014) **4** (1), 20130049
43. Kumar, A., and Han, S. S., *International journal of polymeric materials and polymeric biomaterials* (2017) **66** (4), 159
44. Orduño Rodríguez, A. M., *et al.*, *Polymer Bulletin* (2020) **77** (3), 1217
45. Filimon, A., *et al.*, *Polymers*, (2025), Vol. 17
46. Yadav, V., *et al.*, *Environmental Pollution and Management* (2025) **2**, 256
47. Jamróz, E., *et al.*, *Polymers (Basel)* (2019) **11** (4)
48. Baishya, H., *et al.*, *Advanced Functional Materials* **n/a** (n/a), 2503819
49. Mohammed, M., *Optical Materials* (2022) **133**, 112916
50. Mochane, M. J., *et al.*, *Crystals* (2020) **10** (7), 612
51. Goh, P. S., *et al.*, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* (2014) **56**, 103
52. Vengatesan, M. R., and Mittal, V., *Surface modification of nanoparticle and natural fiber fillers* (2015), 1

53. Rong, M., *et al.*, *Materials science and technology* (2006) **22** (7), 787
54. Ahmadi, Y., *Handbook of Nanofillers*, Springer(2025), pp 53
55. Bréchet, Y., *et al.*, *Advanced engineering materials* (2001) **3** (8), 571
56. Hassan, T., *et al.*, *Journal of Polymer Research* (2021) **28** (2), 36
57. Valentino, A., *et al.*, *Gels* (2024) **10** (11), 689
58. Bitinis, N., *et al.*, *Advanced Materials* (2011) **23** (44), 5229
59. Tipa, C., *et al.*, *Nanomaterials* (2022) **12** (19), 3308
60. Okada, A., and Usuki, A., *Macromolecular materials and Engineering* (2006) **291** (12), 1449
61. Cavallaro, G., *et al.*, *Green Materials* (2014) **2** (4), 232
62. Liu, M., *et al.*, *Progress in polymer science* (2014) **39** (8), 1498
63. Zhang, Y., *et al.*, *Applied Clay Science* (2016) **119**, 8
64. Massaro, M., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* (2018) **6** (21), 3415
65. Liu, M., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* (2013) **1** (15), 2078
66. Lisuzzo, L., *et al.*, *Polymers*, (2020), Vol. 12
67. Xu, X., *et al.*, *Int J Biol Macromol* (2024) **258** (Pt 1), 128704
68. Xu, R., *et al.*, *Bioactive Materials* (2025) **45**, 148
69. Alakija, F. B., and Mills, D. K., *International Journal of Molecular Sciences*, (2025), Vol. 26
70. Massaro, M., *et al.*, *J Colloid Interface Sci* (2018) **524**, 156
71. Risyon, N. P., *et al.*, *Food Packaging and Shelf Life* (2020) **23**, 100450
72. Infurna, G., *et al.*, *Polymers (Basel)* (2020) **12** (9)
73. Xu, X., *et al.*, *International Journal of Biological Macromolecules* (2024) **258**, 128704
74. Biddeci, G., *et al.*, *Carbohydrate Polymers* (2016) **152**, 548
75. Vahedi, V., and Pasbakhsh, P., *Polymer nanocomposites reinforced by halloysite nanotubes: A review.* (2015), pp 141
76. Liao, J., *et al.*, *Advances in Colloid and Interface Science* (2023) **311**, 102812
77. Wang, H., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* (2021) **9** (1), 125
78. Versari, A., *et al.*, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology* (2001) **76** (5), 485
79. Xu, M., *et al.*, *Nanoscale* (2015) **7** (38), 15915
80. Massaro, M., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry C* (2018) **6** (27), 7377
81. Massaro, M., *et al.*, *Journal of Colloid and Interface Science* (2019) **552**, 236
82. Massaro, M., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry C* (2018) **6** (27), 7377
83. Wekhof, A., *et al.*, *The first international conference on ultraviolet technologies*, (2001), Vol. 15
84. Ran, X., *et al.*, *Journal of Composites Science* (2023) **7** (10), 410
85. Foti, M. C., *Journal of agricultural and food chemistry* (2015) **63** (40), 8765
86. Gulcin, İ., and Alwasel, S. H., *Processes* (2023) **11** (8), 2248
87. Sharma, N., *et al.*, *Environmental Chemistry Letters* (2025), 1
88. Christensen, I. L., *et al.*, *Journal of biomedical nanotechnology* (2011) **7** (5), 667
89. Ji, Z., *et al.*, *Molecules* (2019) **24** (1), 152
90. Suzuki, K., *et al.*, *The Journal of Organic Chemistry* (2013) **78** (6), 2301
91. Ezati, P., *et al.*, *Food Hydrocolloids* (2023) **142**, 108771
92. Gore, A. H., and Prajapat, A. L., *Frontiers in materials* (2022) **9**, 855727
93. Huang, X.-J., *et al.*, *Journal of materials science* (2019) **54** (11), 8581
94. Zhang, L., *et al.*, *Green Chemical Engineering* (2022) **3** (4), 338
95. Zhang, M., *et al.*, *ACS Applied Materials & Interfaces* (2024) **16** (4), 5009
96. Chung, Y. J., *et al.*, *ACS nano* (2020) **14** (6), 6470
97. Đorđević, L., *et al.*, *Nature Nanotechnology* (2022) **17** (2), 112
98. Mahzan, S., *et al.*, *IOP conference series: materials science and engineering*, IOP Publishing(2017), Vol. 165, p 012021
99. Campos, A. d., *et al.*, *Polymer degradation and stability* (2012) **97** (10), 1948
100. Cavallaro, G., *et al.*, *International Journal of Biological Macromolecules* (2022) **222**, 228
101. Kouser, S., *et al.*, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* (2021) **118**, 104441
102. Cavallaro, G., *et al.*, *International Journal of Biological Macromolecules* (2023) **234**, 123645
103. Liu, Y., *et al.*, *Carbohydrate Polymers* (2024) **323**, 121465
104. Naidu, D. S., and John, M. J., *Polymers* (2020) **12** (10), 2279
105. Alboofetileh, M., *et al.*, *Journal of Food Engineering* (2013) **117** (1), 26
106. Mao, L., *et al.*, *International Journal of Biological Macromolecules* (2023) **253**, 126653
107. Ghani, A., *et al.*, *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* (2024) **7**, 100428
108. Nikmanesh, A., *et al.*, *Foods*, (2023), Vol. 12
109. Guzzo, F., *et al.*, *Plants* (2023) **12** (5), 1046
110. Massaro, M., *et al.*, *Applied Clay Science* (2022) **230**, 106719
111. Falanga, A. P., *et al.*, *Journal of Colloid and Interface Science* (2024) **663**, 9
112. Viscusi, G., *et al.*, *Nanomaterials*, (2022), Vol. 12

113. García-Villén, F., *et al.*, *Pharmaceutics*, (2021), Vol. 13
114. Zhang, L., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* (2022) **10** (37), 7473
115. Schwab, A., *et al.*, *Chemical reviews* (2020) **120** (19), 11028
116. Liu, H., *et al.*, *Small Methods* (2024) **8** (3), 2301121
117. Pedroza-González, S. C., *et al.*, *International journal of bioprinting* (2021) **7** (2), 333
118. Groll, J., *et al.*, *Biofabrication* (2018) **11** (1), 013001
119. Gu, Q., *et al.*, *Science China Life Sciences* (2015) **58** (5), 411
120. Manita, P. G., *et al.*, *Pharmaceutics* (2021) **14** (4), 362
121. Chakraborty, A., *et al.*, *Biomaterials Science* (2021) **9** (19), 6337
122. Papageorgiou, D. G., *et al.*, *Nanoscale* (2020) **12** (4), 2228
123. Heid, S., and Boccaccini, A. R., *Acta biomaterialia* (2020) **113**, 1
124. Gyawali, B., *et al.*, *Results in Engineering* (2024) **24**, 103024
125. Aydin, E. M., *et al.*, *Construction and Building Materials* (2022) **350**, 128935
126. Castillo, L., *et al.*, *Applied Clay Science* (2022) **228**, 106595
127. Kim, H., *et al.*, *ACS applied materials & interfaces* (2020) **12** (20), 23453
128. Ahlfeld, T., *et al.*, *Biofabrication* (2017) **9** (3), 034103
129. Zhang, L., *et al.*, *ACM Transactions on Graphics (TOG)* (2024) **43** (4), 1
130. García-Villén, F., *et al.*, *Pharmaceutics* (2021) **13** (11), 1806
131. Chan, S. S., *et al.*, *Additive Manufacturing* (2020) **35**, 101335
132. Naumenko, E. A., *et al.*, *Nanoscale* (2016) **8** (13), 7257
133. Wu, F., *et al.*, *Chemical Engineering Journal* (2019) **359**, 672
134. Mombrú, D., *et al.*, *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* (2019) **113**, 130
135. Wang, B.-B., *et al.*, *Journal of Colloid and Interface Science* (2019) **551**, 101
136. Song, Z., *et al.*, *Carbon* (2016) **104**, 169
137. Lee, E. J., and Lim, K.-H., *Journal of Bioscience and Bioengineering* (2016) **121** (1), 73
138. Fredheim, G. E., and Christensen, B. E., *Biomacromolecules* (2003) **4** (2), 232
139. Massaro, M., *et al.*, *International Journal of Molecular Sciences*, (2024), Vol. 25
140. Yuan, P., *et al.*, *The Journal of Physical Chemistry C* (2008) **112** (40), 15742
141. Saengsrichan, A., *et al.*, *International Journal of Molecular Sciences*, (2022), Vol. 23
142. Massaro, M., *et al.*, *Colloids Surf B Biointerfaces* (2022) **213**, 112385
143. Massaro, M., *et al.*, *Applied Clay Science* (2025) **276**, 107942
144. Ramnandan, D., *et al.*, *Molecules* (2021) **26** (13)
145. Gnatowski, T., *et al.*, *Pharmaceutics* (2025) **17** (6)
146. Hanratty, N., *et al.*, *Buildings*, (2024), Vol. 14
147. Yu, M., *et al.*, *RSC Advances* (2016) **6** (32), 27016
148. Borgohain, R., *et al.*, *Separation and Purification Technology* (2019) **222**, 177
149. Jose, J., *et al.*, *Results in Engineering* (2024) **22**, 102060
150. Roy, S., *et al.*, *Carbohydrate Polymers* (2020) **231**, 115729
151. Kalaycıoğlu, Z., *et al.*, *International Journal of Biological Macromolecules* (2017) **101**, 882
152. Kafy, A., *et al.*, *Scientific Reports* (2017) **7** (1), 17683
153. Roy, S., *et al.*, *Nanomaterials*, (2021), Vol. 11
154. Norouzi, M. A., *et al.*, *Polymer Testing* (2021) **93**, 106914
155. Ezati, P., *et al.*, *Carbohydrate Polymers* (2020) **246**, 116614
156. Sul, Y., *et al.*, *International Journal of Biological Macromolecules* (2023) **246**, 125600
157. Chylińska, M., *et al.*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2019) **176**, 379
158. Xie, M., *et al.*, *International Journal of Biological Macromolecules* (2020) **151**, 1116
159. Guojiann, W., *et al.*, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* (2009) **40** (9), 1476
160. Ali, M., *et al.*, *RSC Advances* (2024) **14** (22), 15777
161. Tanveer, S., *et al.*, *Polymer-Plastics Technology and Materials* (2021) **60** (17), 1913
162. Konwar, A., *et al.*, *Carbohydrate Polymers* (2015) **115**, 238
163. Baruah, U., *et al.*, *Nanoscale* (2016) **8** (16), 8542
164. Ghadirian, S., and Karbasi, S., *International Journal of Biological Macromolecules* (2023) **233**, 123651
165. Fahim, A., *et al.*, *Journal of Material Science and Technology Research* (2016) **3** (1), 7
166. Sikora, J. W., *et al.*, *Polymers* (2019) **11** (5), 787
167. Huo, H., *et al.*, *Nature Communications* (2025) **16** (1), 6221
168. Ma, Y., *et al.*, *International Journal of Biological Macromolecules* (2024) **254**, 127676
169. Elhassani, C. E., *et al.*, *Journal of Applied Polymer Science* (2023) **140** (16), e53755
170. Liao, G.-M., *et al.*, *Journal of Membrane Science* (2015) **485**, 17
171. Li, D., *et al.*, *Carbohydrate Polymers* (2020) **249**, 116858
172. Huang, D., *et al.*, *Materials Letters* (2012) **86**, 69
173. Kouser, S., *et al.*, *International Journal of Biological Macromolecules* (2020) **165**, 1079

- 174. Biddeci, G., *et al.*, *International Journal of Molecular Sciences*, (2023), Vol. 24
- 175. Rodríguez Pozo, F. R., *et al.*, *Pharmaceutics*, (2024), Vol. 16
- 176. Caner, C., *et al.*, *Polymers for Advanced Technologies* (2023) **34** (7), 2248
- 177. Zhang, Y., *et al.*, *Food Hydrocolloids* (2023) **145**, 109102
- 178. Kandra, R., and Bajpai, S., *Arabian Journal of Chemistry* (2020) **13** (4), 4882
- 179. Infurna, G., *et al.*, *Polymers* (2020) **12** (9), 1973
- 180. Lu, Y., *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* (2023) **11** (15), 3338
- 181. Guzzo, F., *et al.*, *Plants*, (2023), Vol. 12

Conclusioni generali

Conclusioni generali

In questa tesi sono stati sviluppati e caratterizzati diversi sistemi nanostrutturati per applicazioni in nanomedicina, basati su argille minerali e loro derivati funzionalizzati, con l'obiettivo di ottenere nanomateriali capaci di caricare e rilasciare molecole bioattive, svolgere funzioni di *biosensing* fluorescente e costituire nanocompositi polimerici per applicazioni di interesse biomedico. Dal primo capitolo è emerso come la struttura e la composizione delle argille influenzino in modo determinante il loro comportamento come *carrier* di composti naturali. L'*halloysite* si è rivelata particolarmente adatta al caricamento dell'estratto di vinaccia, consentendo di mantenerne l'attività antiossidante e di controllarne il rilascio in funzione del pH. La bentonite purificata ha mostrato una buona capacità di caricare acido L-ascorbico, mantenendone l'attività e mostrando interazioni superficiali e parziale confinamento interlamellare. L'estensione dello studio agli oli ozonizzati ha evidenziato l'importanza della morfologia minerale: la bentonite ha presentato la più elevata capacità di caricamento, sepiolite e palygorskite valori intermedi, mentre l'*halloysite*, pur con un contenuto inferiore, ha mostrato una migliore stabilità in ambiente acquoso. Nei gel tissotropici a base di diverse argille, inclusa la Laponite®, l'inserimento dell'olio ozonizzato non ha compromesso la stabilità del sistema ma ne ha migliorato le proprietà reologiche, garantendo un rilascio lento e controllato nel tempo. Nel complesso, tali risultati confermano che le argille rappresentano *carrier* complementari per il rilascio controllato di molecole naturali. Il secondo capitolo ha approfondito l'impiego delle argille, e in particolare dell'*halloysite*, come sistemi di *carrier* e/o *delivery* per molecole biologicamente attive. I sistemi ottenuti con nMP e nDP hanno mostrato la possibilità di modulare il rilascio in base alla natura del fosfato e quindi alle interazioni tra la molecola organica e l'argilla. La funzionalizzazione covalente della superficie esterna con un PNA ha permesso di ottenere un materiale (HNTs-PNA-FITC/5DP) capace di trasportare due molecole diverse, sfruttando in modo complementare le due superfici del nanotubo. Il sistema multicavità sviluppato per il derivato stilbenico idrofobico, basato su HNTs funzionalizzati con calix[5]arene, rappresenta il primo esempio di questo tipo di modifica e ha consentito di estendere l'approccio ai gel tissotropici di Laponite®, mantenendone le caratteristiche strutturali. Il sistema Lap/CB[6]/FFA, sviluppato in parallelo, ha ulteriormente confermato la validità dell'approccio supramolecolare, suggerendo un possibile impiego in formulazioni topiche. Nel complesso, questi studi hanno confermato il ruolo dell'*halloysite* e della Laponite® come *carrier* efficaci per la somministrazione di farmaci antitumorali e neuroattivi. Nel terzo

capitolo sono stati sviluppati materiali fluorescenti a base di argille, con l'obiettivo di ottenere biosensori selettivi. Il sistema Ht/Phe si è mostrato idoneo al riconoscimento dello ione Zn^{2+} , mentre i materiali a base di HNTs e *N-doped carbon dots*, ottenuti sia per sintesi diretta che per post-funzionalizzazione, hanno presentato le caratteristiche tipiche dei *carbon dots* (CDs), mostrando capacità di riconoscimento dello ione Fe^{3+} anche in presenza di interferenti. Gli studi di internalizzazione cellulare hanno dimostrato che tali nanomateriali possono attraversare la membrana cellulare e raggiungere il nucleo, confermando il loro potenziale impiego come biosensori intracellulari. Il sistema HNTs-NDI-PNA, infine, ha combinato proprietà fotofisiche modulabili e capacità di riconoscimento molecolare, confermando l'halloysite come piattaforma naturale versatile e funzionalizzabile per la preparazione di materiali fluorescenti multifunzionali. Nel quarto capitolo sono stati preparati nanocompositi a base di alginato e chitosano contenenti nanotubi di halloysite modificati con carbon dots. Nei film di alginato, l'inserimento del *filler* HNTs-CDs ha conferito proprietà antiossidanti, fotoprotettive e barriera all'acqua, preservando la stabilità meccanica del materiale anche dopo irraggiamento UV. Il caricamento con l'estratto di *M. cisplatis* ha consentito un rilascio lento e sostenuto, mentre i test su fette di frutta hanno mostrato la capacità del film di prolungarne la conservazione, indicando potenziali applicazioni nel *packaging* biomedicale. Nei sistemi a base di chitosano e HNTs-CDs, la funzionalizzazione covalente ha migliorato la compatibilità tra *filler* e polimero, la dispersione e la stabilità termica, garantendo proprietà meccaniche e adesive equilibrate. I materiali tridimensionali ottenuti tramite stampa 3D a estrusione semi-solida hanno mantenuto una buona flessibilità e resistenza alla compressione, mostrando una struttura ordinata e stabile.

Nel complesso, i risultati di questo lavoro dimostrano come le argille minerali, opportunamente modificate e combinate con altre componenti funzionali, possano dare origine a sistemi nanostrutturati multifunzionali dalle proprietà complementari. Tali materiali si sono rivelati in grado di caricare, proteggere e rilasciare diverse molecole bioattive, di riconoscere selettivamente ioni metallici e di migliorare le prestazioni di matrici polimeriche naturali. I risultati ottenuti aprono la strada a futuri sviluppi orientati allo studio *in vitro* e *in vivo* dei sistemi più promettenti, alla messa a punto di *carrier* specifici per il rilascio mirato di molecole attive e all'impiego dei nanocompositi a base di argille in applicazioni biomediche e nel *packaging* biomedicale. In particolare, l'approccio combinato basato su modifiche covalenti e supramolecolari si è rivelato determinante per modulare le proprietà superficiali delle argille, e in modo particolare dell'halloysite, rendendola una piattaforma estremamente versatile per la progettazione di nanomateriali avanzati destinati alla nanomedicina.

Curriculum Studiorum

Comunicazioni a Congressi:

Comunicazioni poster:

1. 11-15 Settembre 2022 – XL Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Organica della Società Chimica Italiana, Palermo, Italia.
Comunicazione poster: G. Cinà, S. Riela, G. Cavallaro, G. Lazzara, M. Massaro, M. Notarbartolo, M. Prato, *‘Boosting fluorescent properties of carbon dots using halloysite nanotubes for biomedical applications’*.
2. 12 Gennaio 2023 – First STEBICEF Young Researcher Workshop, Palermo, Italia.
Comunicazione poster: G. Cinà, M. Prato, G. Cavallaro, G. Lazzara, M. Massaro, M. Notarbartolo, A. Silvestri, S. Riela, *‘Bottom-up and top-down approaches for the synthesis of nanomaterials based on halloysite and carbon dots’*
3. 27 Febbraio 2023 – V Workshop – I chimici per le biotecnologie, Napoli, Italia.
Comunicazione poster: G. Cinà, M. Prato, G. Cavallaro, G. Lazzara, M. Massaro, M. Notarbartolo, A. Silvestri, S. Riela, *‘Exploring different synthetic strategies to develop halloysite-carbon dots nanomaterials’*
4. 10-14 Settembre 2023 - XLI Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Organica della Società Chimica Italiana, Roma, Italia.
Comunicazione poster: G. Cinà, M. Prato, G. Cavallaro, G. Lazzara, M. Massaro, A. Silvestri, S. Riela, *‘Modified halloysite nanomaterials as nano-filler of functional biopolymer films for food packaging’*
5. 16-18 Ottobre 2023 – Autumn Meeting for Young Chemists in the Biomedical Sciences (AMYC-BIOMED), Firenze, Italia.
Comunicazione poster: G. Cinà, M. Prato, G. Cavallaro, G. Lazzara, M. Massaro, A. Silvestri, S. Riela, *‘Functional biofilm based on alginate polymer filled with modified halloysite for active food packaging’*.
6. 11-12 Dicembre 2023 – Convegno Congiunto delle Sezioni Sicilia e Calabria della Società Chimica Italiana (SciSiCa) 2023 - Palermo, Italia.
Comunicazione poster: G. Cinà, M. Massaro, M. Prato, G. Cavallaro, G. Lazzara, A. Fiorentino, B. D’Abrosca, G. M. L. Messina, S. Riela, *‘Halloysite-carbon dots filler for nanocomposites with potential application in active food packaging’*.
7. 26-30 Agosto 2024 – XXVIII Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana 2024 – Palermo, Italia.
Comunicazione poster: G. Cinà, C. Bonaccorso, R. de Melo Barbosa, C.G. Fortuna, M. Massaro, P. G. Mineo, A. Nicosia, M. Notarbartolo, C. Viseras-iborra, S. Riela, *‘Halloysite/heteroaryl ethylene nanomaterials for potential biomedical applications’*.
8. 30-31 Ottobre 2024 – International Workshop NUCLEO-OMICS24 – Napoli, Italia.

Comunicazione poster: G. Cinà, N. Borbone, S. D'Errico, A.P. Falanga, M. Massaro, P.G. Mineo, A. Nicosia, M. Notarbartolo, G. Oliviero, R. Sanchez-Espejo, C. Viseras, S. Riela, *'Halloysite nanotubes as carrier for the simultaneous delivery of PNA and IDPR molecules''*.

9. 13-18 Luglio 2025 – 18th International Clay Conference (ICC) - Dublino, Irlanda.
Comunicazione poster: G. Cinà, N. Cardullo, G.G. Mancari, M. Marina, P.G. Mineo, A. Nicosia, R. Sanchez-Espejo, C. Sciacca, C. Viseras, V. Muccilli, S. Riela, *'A Novel Nanomaterial Based on Halloysite and Laccase: A Sustainable Approach for Dyes Degradation''*.
10. 12-15 Ottobre 2025 – Italian Symposium on Organic Chemistry (JISOC) - Bari, Italia.
Comunicazione poster: C. Sciacca, S. Riela, G.G. Mancari, M. Massaro, N. Cardullo, R. Sanchez-Espejo, C. Viseras, V. Muccilli, G. Cinà *'Design of a Halloysite–Laccase Nanomaterials for Biocatalytic Degradation of Organic Dyes''*.

Comunicazioni orali:

1. 13-15 Novembre 2023 – Merck Young Chemists' Symposium (MYCS) 2023 - Rimini, Italia.
Comunicazione orale: G. Cinà, M. Prato, M. Massaro, G. Cavallaro, G. Lazzara, S. Riela, *'Nanocomposite based alginate and modified halloysite for potential use in food packaging''*.
2. 2-3 Dicembre 2024 – Convegno Congiunto delle Sezioni Sicilia e Calabria della Società Chimica Italiana (SciSiCa) 2024 - Messina, Italia.
Comunicazione orale: G. Cinà, N. Borbone, S. D'Errico, A.P. Falanga, M. Massaro, P. G. Mineo, A. Nicosia, G. Oliviero, R. Sanchez-Espejo, C. Viseras, S. Riela, *'Development of nanomaterials based on halloysite as carrier for IDPR molecules and PNA''*.
3. 29-30 Maggio 2025 – 1st Interdivisional Workshop Biotechnology and Magnetic Resonance: Connecting Academia and Industry - Catania, Italia.
Comunicazione orale: G. Cinà, M. Marina, G. Cavallaro, R. de Melo Barbosa, G. Lazzara, R. Sanchez-Espejo, C. Viseras, S. Riela, *'Hybrids Nanomaterials Based on Halloysite and Carbon Dots: Properties and Applications''*.
4. 13-18 Luglio 2025 – 18th International Clay Conference (ICC) - Dublino, Irlanda.
Comunicazione orale: G. Cinà, M. Marina, G. Cavallaro, R. de Melo Barbosa, G. Lazzara, R. Sanchez-Espejo, C. Viseras, S. Riela, *'A perspective of Halloysite and Carbon Dots-Based Nanomaterials''*.
5. 21-25 Settembre 2025 - XLII Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Organica (CDCO) – Villasimius, Italia.
Comunicazione orale: G. Cinà, M. Massaro, G. Cavallaro, R. de Melo Barbosa, G. Lazzara, R. Sanchez-Espejo, C. Viseras, S. Riela, *'Photoluminescent Hybrid Nanomaterials Based on Halloysite and Carbon Dots: Recent Developments and Future Perspective''*.

Visiting Researcher:

1. 21-28 Febbraio 2023 – Napoli, Italia
Visiting Researcher presso i laboratori strumentali del Centro di servizio di Ateneo per le Scienze e Tecnologie per la Vita (CESTEV) dell'Università di Napoli Federico II, all'interno

del progetto “Interazione tra acidi nucleici e loro derivati con argille variamente funzionalizzate per applicazioni di delivery e diagnostica”.

2. 2-27 Ottobre 2023 – Napoli, Italia
Visiting Researcher presso i laboratori strumentali del Dipartimento di Farmacia dell’Università degli Studi di Napoli Federico II, per attività di ricerca incentrata sullo “Studio e sintesi di sonde biologiche per l’ottenimento di nanomateriali multifunzionali a base di Halloysite”
3. 15-19 Aprile 2024 – Granada, Spagna
Visiting Researcher presso i laboratori del Dipartimento di Farmacia e Tecnologie Farmaceutiche dell’Università di Granada, per diversi esperimenti scientifici presso i laboratori del Professore César Viseras-Iborra.
4. 21-29 Ottobre 2024 – Benevento, Italia
Visiting Researcher presso la sezione di Ricerca e Sviluppo dell’azienda Erbagil srl, per la messa a punto di metodi chimici, fisici e strumentali per la realizzazione di gel tissotropici da argille, capaci di incorporare matrici oleose ed in particolare Ozoile®, specifico brevetto Erbagil.
5. 19-20 Febbraio 2025 – Napoli, Italia
Visiting Researcher presso i laboratori strumentali del Centro di servizio di Ateneo per le Scienze e Tecnologie per la Vita (CESTEV) dell’Università di Napoli Federico II, per l’utilizzo della strumentazione in dotazione del centro destinata alla caratterizzazione di nanomateriali funzionalizzati.

Periodo all’estero:

01/04 - 04/07/2025 - *Dipartimento di Farmacia e Tecnologie Farmaceutiche delle Università di Siviglia sotto la supervisione della Prof.ssa Raquel de melo Barbosa e presso il Dipartimento di Farmacia dell’Università di Granada (Spagna) sotto la supervisione del Prof.re Cesar Viseras.*

Studio messa a punto e sviluppo di bio-inchiostri a base di argille e polimeri naturali per l’ottenimento di *scaffold*, per la cura e la prevenzione della pelle, tramite stampa 3D. Utilizzo e studio di tecniche utili per la formulazione farmaceutica: tecniche di preparazione delle formulazioni sol/gel, tecniche di omogenizzazione e dispersione di farmaci e materiali. Ottenimento di *scaffold* tramite stampa a estrusione di semisolidi con stampante 3D. Caratterizzazione chimico-fisica dei nanocompositi ottenuti tramite tecniche quali: TGA, FT-IR, DSC, XRD, Tomografia a raggi X, SEM, TEM. Caratterizzazione meccanica dei film tramite DMA e test di adesione e compressione (tramite Texture Analyser).

Pubblicazioni scientifiche:

1. M. Massaro, R. Ciani, **G. Cinà**, C.G. Colletti, F. Leone, S. Riela, Antimicrobial Nanomaterials Based on Halloysite Clay Mineral: Research Advances and Outlook, *Antibiotics*, **2022**, *11*, 1761.
2. D. Hernández, A. Montalvo, I. Pérez, C. Charnay, R. Sánchez-Espejo, P. Cerezo, C. Viseras, S. Riela, **G. Cinà**, A. Rivera, Antioxidant Efficacy and “In Vivo” Safety of a Bentonite/Vitamin C Hybrid, *Pharmaceutics*, **2023**, *15*, 1171.

3. M. Massaro, **G. Cinà**, A. Borrego-Sánchez, C.I. Sainz-Díaz, C. Viseras-Iborra, R. Sánchez-Espejo, R. De Melo Barbosa, F. Leone, I. Pibiri, R. Noto, S. Riela, Thixotropic Hydrogels Based on Laponite® and Cucurbituril for Delivery of Lipophilic Drug Molecules, *ChemPlusChem*, **2023**, 89, e202300370. (Cover of Issue)
4. M. Massaro, A. Borrego-Sánchez, C. Viseras-Iborra, **G. Cinà**, F. García-Villén, F.L. Liotta, A. Lopez Galindo, C. Pimentel, C.I. Sainz-Díaz, R. Sánchez-Espejo, S. Riela, Hectorite/Phenanthroline-Based Nanomaterial as Fluorescent Sensor for Zn Ion Detection: A Theoretical and Experimental Study, *Nanomaterials*, **2024**, 19, 14.
5. M. Massaro, **G. Cinà**, G. Cavallaro, G. Lazzara, A. Silvestri, R.d.M. Barbosa, R.d.M, R. Sánchez-Espejo, C. Viseras-Iborra, M. Notarbartolo, S. Riela, Comparison of Synthetic Pathways for Obtaining Fluorescent Nanomaterials Based on Halloysite and Carbon Dots for Potential Biological Sensing, *International Journal of Molecular Science*, **2024**, 25, 5370.
6. **G. Cinà**, M. Massaro, G. Cavallaro, G. Lazzara, R. Sánchez-Espejo, C. Viseras Iborra, B. D'Abrosca, A. Fiorentino, G.M.L. Messina, S. Riela, Development of alginate film filled with halloysite-carbon dots for active food packaging, *International journal of biological macromolecules*, **2024**, 277, 134375.
7. F. Cardano, M. Massaro, F. Leone, **G. Cinà**, N. Borbone, A.P. Falanga, G. Oliviero, A. Nicosia, M. Fresia, A. Fin, V. Scardaci, R. de Melo Barbosa, S. Riela. Halloysite Nanotubes Functionalized with Naphthalene Diimide and Peptide Nucleic Acid Derivatives: Toward Multifunctional Nanomaterials, *ACS Applied Nano Materials*, **2025**. 8, 12775-12783 (Cover of Issue).
8. **G. Cinà**, M. Massaro, A. Pappalardo, C. Bonaccorso, G.C. Fortuna, P.G. Mineo, A. Nicosia, P. Poma, R. Sanchez-Espejo, C. Testa, C. Viseras, S. Riela, Covalently Functionalized Halloysite-Calixerene Nanotubes for Injectable Hydrogels: A Multicavity Platform for Hydrophobic Drug Delivery, *Pharmaceuticals*, **2025**, 18, 1356..
9. R. de Melo Barbosa, F. Garcia-Villen, M. Ruggeri, **G. Cinà**, M. Massaro, M. Protti, G. Sandri, S. Riela, L. Mercolini, C. Viseras, Laponite-Based Microemulsions of Amazonian Oils, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. **2026**, 115 (2), 107669.